

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Měření aktivity AMP deaminasy u
nádorových buněk**

Diplomová práce

Bc. Anna Petráčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.

Prohlášení

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

V Olomouci, 24. dubna 2015

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce doc. RNDr. Petru Mlejnkovi, Ph.D. za jeho čas, odborné vedení a rady. Dále pak RNDr. Petru Doleželovi, CSc. a Mgr. Elišce Růžičkové za pomoc při experimentální části práce.

Souhrn

Adenosinmonofosfát (AMP) deaminasa (EC 3.5.4.6) je enzym ze skupiny hydrolas, který katalyzuje ireverzibilní deaminaci adenosinmonofosfátu za vzniku inosinmonofosfátu a amoniaku. Tato reakce je důležitým článkem nukleotidového metabolismu eukaryot a je vstupní reakcí purinového nukleotidového cyklu. U člověka byly objeveny čtyři hlavní izoformy enzymu kódovány třemi geny.

AMP deaminasa hraje významnou roli v době zvýšených nároků na energii a podílí se na regulaci hladiny AMP, která spolu s ostatními adeninovými nukleotidy odráží energetický stav buňky. Při narušení energetické homeostázy je tak AMP deaminasa klíčovým enzymem.

Praktická část se zabývá adaptací metody pro měření aktivity AMP deaminasy v rámci podmínek naší laboratoře. Dále byl touto metodou analyzován vliv inhibitoru 2'-deoxycoformycinu na enzymovou aktivitu a bylo zjištěno, že není příliš účinný. Proto byla následně provedena molekulárně-biologická inhibice pomocí RNA interference v experimentu, ve kterém byly připraveny buňky K562 se sníženou expresí *AMPD3*. Také byl proveden expresní profil genů AMP deaminasy u linie K562 a bylo zjištěno, že u těchto buněk je exprimován gen *AMPD3* a také překvapivě *AMPD1*.

Summary

Adenosine monophosphate (AMP) deaminase (EC 3.5.4.6) is an enzyme that belongs to the group of hydrolases. It catalyses an irreversible deamination of adenosine monophosphate to inosine monophosphate, freeing an ammonia molecule in the process. The reaction is an important part of nucleotide metabolism of eukaryote and it is the entry reaction of a purine nucleotide cycle. In humans, there are four main isoforms of AMP deaminase encoded by three genes.

AMP deaminase plays an important role in times of high energy demands and it is involved in regulation of AMP level, which corresponds together with other adenine nucleotides to energetic status of a cell. Therefore, AMP deaminase is the key enzyme in situations of the disruption of energetic homeostasis.

Experimental part of this thesis deals with adaptation of method for measuring AMP deaminase activity in our laboratory. By this method, the effect of inhibitor 2'-deoxycoformycin was analysed and it was found to be a weak agent. Consecutively, molecular biological inhibition was performed by RNA interference and the K562 cells with low expression of *AMPD3* were prepared. An expression profile for AMP deaminase genes was performed as well and it was found that *AMPD3* and surprisingly also *AMPD1* genes are expressed.

Obsah

1	Úvod	3
2	Metabolismus adeninových nukleotidů	4
2.1	Biosyntéza purinů	5
2.2	Recyklační dráha purinů	8
3	Adenosinmonofosfát deaminasa	11
3.1	Izoenzym M	13
3.2	Izoenzym L	15
3.3	Izoenzym E	15
3.4	Inhibitory	17
4	AMP-aktivovaná proteinkinasa	18
5	Metody stanovení aktivity AMP deaminasy	20
5.1	Analýza IMP pomocí HPLC na reverzní fázi ve spojení s MS/MS	20
6	Cíle práce	22
7	Praktická část	22
7.1	Materiál	22
7.1.1	Biologický materiál	22
7.1.2	Chemikálie	22
7.1.3	Přístroje	24
7.2	Pracovní postupy	25
7.2.1	Kultivace buněčné linie	25
7.2.2	Příprava buněčných extraktů	25
7.2.3	Měření koncentrace proteinů	26
7.2.4	Stanovení enzymové aktivity	26
7.2.5	Vliv 2'-deoxycoformycinu na viabilitu buněk	28
7.2.6	Izolace RNA	28
7.2.7	Reverzní transkripce	28
7.2.8	Amplifikace cDNA o plné délce pomocí NESTED PCR	29

7.2.9	Potlačení exprese <i>AMPD3</i> genu RNA interferencí	30
7.3	Výsledky	31
7.3.1	Optimalizace přípravy buněčných extraktů	31
7.3.2	Stanovení enzymové aktivity	31
7.3.3	Vliv 2'-deoxycoformycinu na viabilitu buněk	34
7.3.4	Izolace RNA, reverzní transkripce a amplifikace cDNA o plné délce	34
7.3.5	Potlačení exprese <i>AMPD3</i> genu RNA interferencí	35
8	Diskuze	38
9	Závěr	40
10	Seznam použitých zkratk	41
11	Literatura	43

1 Úvod

Adenosinmonofosfát (AMP) deaminasa (EC 3.5.4.6) je enzym ze skupiny hydrolas, který katalyzuje ireverzibilní deaminaci adenosinmonofosfátu za vzniku inosinmonofosfátu a amoniaku. Tato reakce je důležitým článkem nukleotidového metabolismu eukaryot a je vstupní reakcí purinového nukleotidového cyklu. U člověka byly objeveny čtyři hlavní izoformy enzymu kódovány třemi geny. Nejvíce aktivní je AMP deaminasa v kosterním svalstvu, což je důsledek vysoké exprese genu *AMPD1* pro svalovou izoformu [1]. Z klinického hlediska je tento gen významný, protože je-li mutovaný, způsobuje onemocnění svalů. Právě v systému svalových buněk je enzym nejvíce studován.

AMP deaminasa hraje významnou roli v době zvýšených nároků na energii a podílí se na regulaci hladiny AMP, která spolu s ostatními adeninovými nukleotidy odráží energetický stav buňky. Při narušení energetické homeostázy je tak AMP deaminasa klíčovým enzymem. Adeninové nukleotidy totiž allostericky ovládají mnohé regulační enzymy, a tak koncentrace AMP, ADP a ATP, jejich vzájemné poměry a změny v nich se podílí na kontrole celého buněčného metabolismu. Je-li energetická homeostáza narušena, buňka umírá [2].

AMP představuje důležitou intracelulární signální molekulu, která působí prostřednictvím AMP-aktivované proteinkinasy. Ta je zodpovědná za udržování energetické rovnováhy jak na buněčné úrovni, tak na úrovni celého organismu, působí jako senzor energetických změn v eukaryotních buňkách [3] a jakmile je aktivní, inhibuje energeticky náročné biosyntetické procesy a naopak zvyšuje aktivitu nebo expresi proteinů zapojených v katabolismu [4].

2 Metabolismus adeninových nukleotidů

Adeninové nukleotidy jsou tvořeny z purinové báze adeninu, pětiuhlíkatého cukru ribosy nebo deoxyribosy a nejméně jedné fosfátové skupiny. Tvoří společně s guaninovými a pyrimidinovými nukleotidy základní složku nukleových kyselin, hrají nezastupitelnou roli v energetickém metabolismu všech živých organismů, podílí se na buněčné komunikaci prostřednictvím adenosinu, cAMP a AMP a jsou složkami koenzymů NAD^+ , NADP^+ , FMN, FAD a koenzymu A.

Adenosin vznikající při defosforylaci AMP slouží jako extracelulární signální molekula, která se podílí na udržování energetické homeostázy organismu prostřednictvím adenosinových receptorů (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), a to zejména při stresových situacích jako je hypoxie. Ta totiž negativně ovlivňuje aktivitu adenosinkinasy, tudíž adenosin není refosforylován na AMP a hromadí se. Za normálních podmínek vzniká relativně velké množství adenosinu, ale většina (80 %) je zase zpětně fosforylována na AMP [5]. Při blokaci adenosinkinasy tedy dochází k výraznému zvýšení hladiny adenosinu, který je uvolněn do extracelulárního prostředí a dále působí prostřednictvím receptorů. Například po aktivaci A_1 a A_3 receptorů dochází ke zpomalení metabolismu, ovšem vliv na konkrétní metabolické dráhy se liší podle buněčného typu (např. v adipocytech dochází k inhibici lipolýzy) [6].

Dalším velmi známým přenašečem signálu je cAMP, intracelulární signální molekula, která v buňce hraje roli druhého posla [7]. A nakonec také AMP je intracelulární signální molekulou. Skrze aktivaci AMP-aktivované proteinkinasy dochází k udržování energetické rovnováhy jak na buněčné úrovni, tak na úrovni celého organismu. O AMP-aktivované proteinkinase bude pojednáno dále.

Většina bioenergetických procesů je navzájem propojena přes adeninové nukleotidy, které jsou spotřebovány nebo regenerovány v různých enzymatických reakcích, a zejména ATP je považován za nejdůležitější molekulu pro uchování a přenos energie v buňkách. ATP je získáván při různých metabolických reakcích, hlavně z buněčného dýchání, substrátové fosforylace, fotofosforylace a fermentace. Naopak využíván je zejména v biosyntetických reakcích, k zajištění pohyblivosti, při buněčném dělení a v allosterických regulacích [8, 9]. Adeninové nukleotidy nejsou svázány pouze s metabolickými drahami v buněčném energetickém systému, ale samy také allostericky ovládají mnohé regulační enzymy. Koncentrace AMP, ADP a ATP, jejich vzájemné poměry a změny v nich se tak podílí na kontrole celého buněčného metabolismu [2]. Hladiny adeninových nukleotidů

a hlavně poměry mezi nimi odrážejí energetický stav buňky. Nejznámější index, který popisuje energetický stav buňky, navrhl Atkinson a je definován jako:

$$AEC = \frac{[ATP] + 0,5[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Organismy za fyziologických podmínek obvykle udržují AEC (*adenylate energy charge*) mezi 0,7 - 0,95, což znamená, že reakce produkující ATP jsou v rovnováze s reakcemi ATP spotřebovávajícími. Za nepříznivých podmínek (např. během buněčného stresu) AEC klesne a může vyústit v buněčnou smrt [2]. Hladiny adeninových nukleotidů jsou v buňce udržovány pomocí procesů biosyntézy, recyklační dráhy a katabolismu.

Rovnovážnou koncentraci adeninových nukleotidů také výrazně ovlivňuje enzym adenylátkinasa, který katalyzuje reverzibilní fosforylaci jednoho ADP pomocí druhého za vzniku ATP a AMP:



Díky této unikátní reakci je nejen zužitkována energie ADP, ale také má tato reakce funkci sensitivního prostředníka, který umožňuje „zviditelnit“ malé změny mezi hladinami ATP a ADP na velké změny koncentraci AMP, které jsou samy o sobě energetickým signálem ovlivňujícím mnoho dalších buněčných procesů [10].

2.1 Biosyntéza purinů

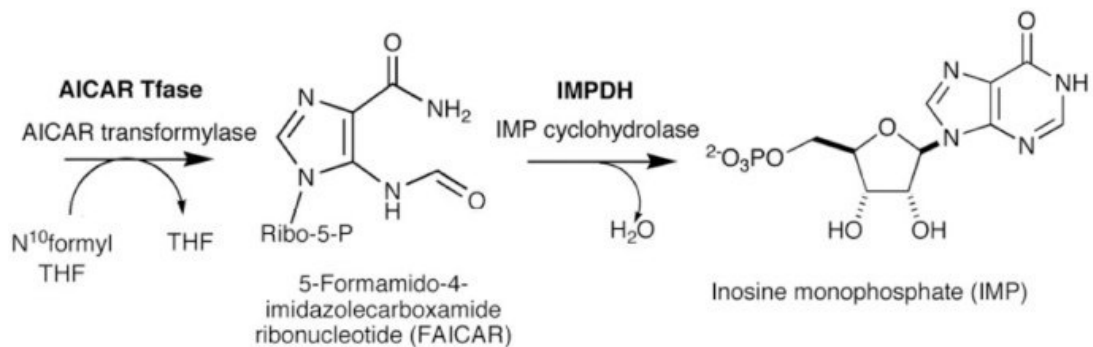
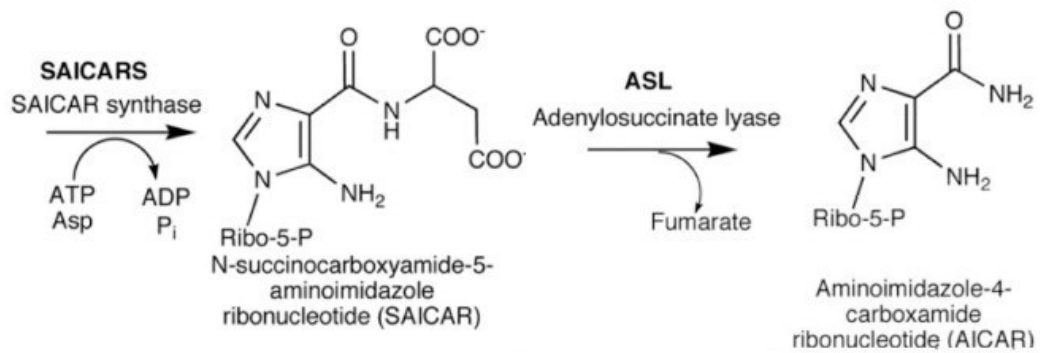
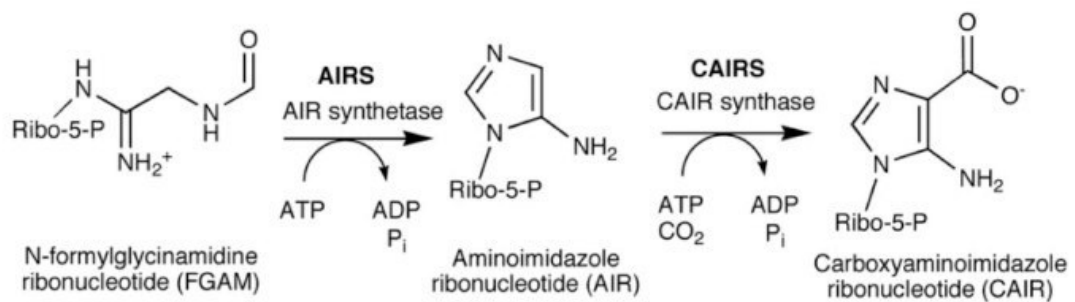
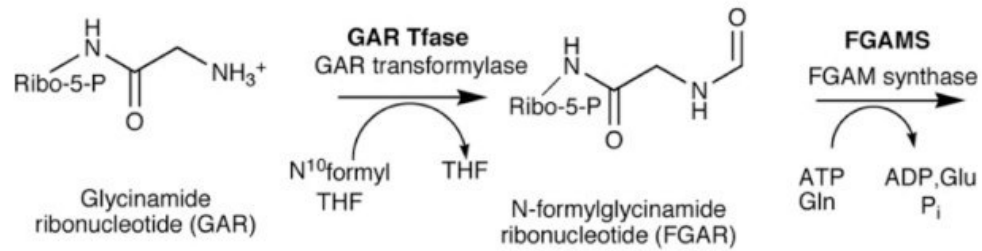
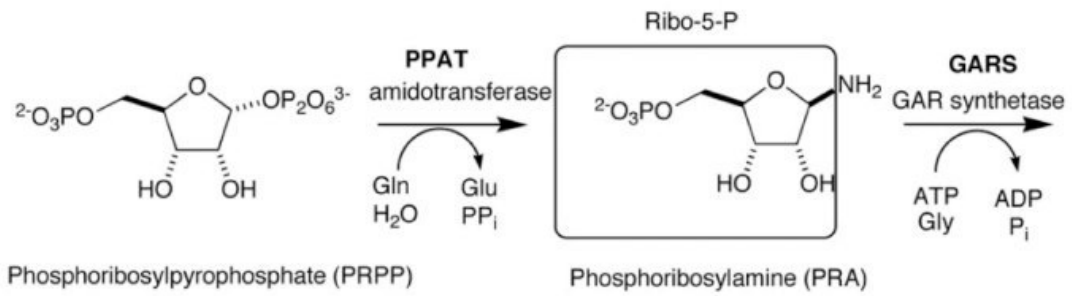
Purinové nukleotidy buňka získává dvěma způsoby: *de novo* syntézou nebo recyklační dráhou. Purinová *de novo* syntéza představuje konzervovanou metabolickou dráhu, která je energeticky náročná a je typická pro rychle se dělící buňky (např. při embryonálním vývoji, ale také pro buňky maligně transformované), které mají zvýšenou hladinu nukleotidů kvůli syntéze nukleových kyselin [11, 12]. U člověka je pak aktivní především v játrech [13, 14]. Biosyntéza purinů probíhá u vyšších eukaryot v deseti krocích, ve kterých je fosforibosylpyrofosfát přeměněn na IMP, prekurzor adeninových a guaninových nukleotidů, viz Obr. 1. Ty jsou z IMP odděleně syntetizovány v dalších dvou krocích [15].

Rychlost purinové biosyntézy je závislá na koncentraci fosforibosylpyrofosfátu. Ta je dána především dostupností ribosa-5-fosfátu a aktivitou fosforibosylpyrofosfát syntetasy, která je regulována hladinou fosfátu a allostericky purinovými nukleotidy [16]. V dalším kroku, katalyzovaném fosforibosylpyrofosfát amidotransferasou, dochází ke zpětnovazebné regulaci, kdy se konečný produkt metabolické dráhy váže na allosterické místo enzymu

a působí na něj inhibičně. Fosforibosylpyrofosfát amidotransferasa má ve struktuře dvě různá vazebná místa pro nukleotidy AMP, ADP, GMP a GDP, která obě překrývají aktivní místo enzymu [17, 18].

Významný kontrolní bod se dále nachází v části syntézy AMP a GMP z IMP, kdy AMP inhibuje adenylsukcinátsyntasu a GMP inosinmonofosfát dehydrogenasu. Rovnováha mezi adeninovými a guaninovými nukleotidy se tak zachovává díky jejich vzájemnému propojení, kdy GTP je substrátem pro syntézu AMP a naopak ATP je substrátem pro GMP [19, 20].

Enzymy purinové biosyntézy jsou dále zajímavé tím, že mohou vytvořit reverzibilní multienzymový komplex, nazvaný purinosom, jež představuje jakousi vzájemnou spolupráci enzymů, kdy jsou meziprodukty drženy v blízkosti aktivního místa následujícího enzymu, a tak je zvýšena účinnost katalyzované reakce i celé dráhy [21]. Hypotéza purinosomu byla potvrzena pomocí fluorescenční mikroskopie, která umožnila přímé pozorování kompartmentalizace všech šesti enzymů v cytoplazmě různých rakovinných buněk. Sestavení purinosomu bylo zde závislé na hladině purinů v médiu a bylo obzvlášť patrné při jejich nedostatku [22].



Obr. 1: *De novo* syntéza purinů. Probíhá v deseti krocích, které jsou katalyzovány šesti enzymy: fosforibosylpyrofosfát amidotransferasou (PPAT); trifunkčním enzymem složeným z glycinamid ribonukleotid syntetasy (GARS), glycinamid ribonukleotid transformylasy (GAR Tfase) a aminoimidazol ribonukleotid syntetasy (AIRS); formylglycinamidin ribonukleotid syntetasou (FGAMS); bifunkčním enzymem složeným z karboxyaminoimidazol ribonukleotid syntetasy (CAIRS) a sukcinylaminoimidazolkarboxamid ribonukleotid syntetasy (SAICARS); adenylosukcinátlyasou (ASL) a bifunkčním enzymem složeným z aminoimidazolkarboxamid ribonukleotid transformylasy (AICAR Tfase) a inosinmonofosfát cyklohydrolasy (IMPDH). Převzato z [15].

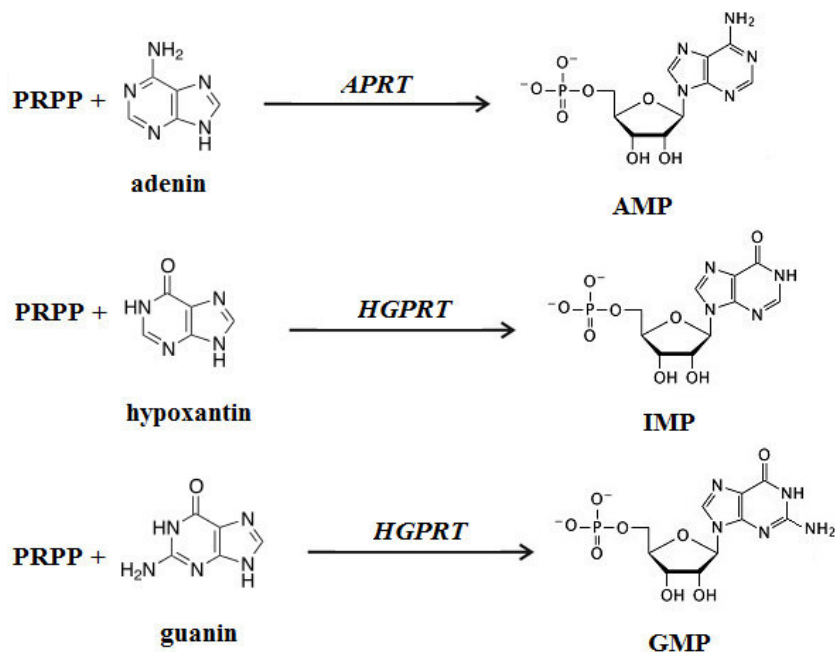
2.2 Recyklační dráha purinů

V případě, že má buňka k dispozici dostačující množství hypoxantinu, meziprojektu vznikajícího odbouráváním purinů, jsou purinové nukleotidy preferenčně syntetizovány recyklační dráhou, která je méně energeticky náročná. Recyklační dráhou jsou tak organismem využity volné purinové báze vznikající hydrolytickou degradací nukleových kyselin při trávení [23]. Hypoxantin je konvertován na IMP díky působení hypoxantin-guanin fosforybosyltransferasy, guanin je přeměněn na GMP za katalýzy téhož enzymu a adenin je konvertován na AMP pomocí adeninfosforibosyltransferasy, viz Obr. 2.

Recyklační dráhy negativně ovlivňují *de novo* syntézu purinů skrze zpětnovazebnou inhibici fosforibosylpyrofosfát amidotransferasy purinovými nukleotidy, které recyklačními dráhami vznikají, a dále spotřebou fosforibosylpyrofosfátu, který je společným substrátem hypoxantin-guanin fosforybosyltransferasy a adeninfosforibosyltransferasy [24].

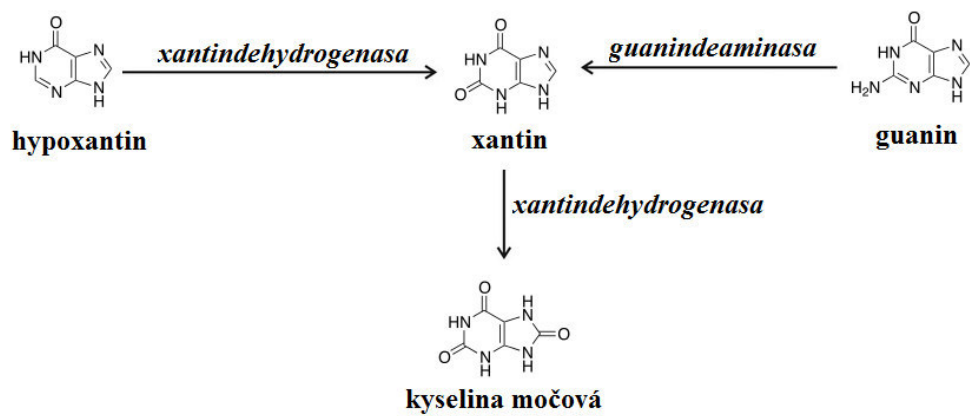
V rámci metabolismu purinů existují enzymové defekty, které u člověka způsobují onemocnění. Jedno z nejznámějších je deficiencie hypoxantin-guanin fosforybosyltransferasy, což v případě částečné ztráty aktivity enzymu vede k hyperurikémii (hladina kyseliny močové v krvi je vysoká oproti normálnímu stavu), v případě úplné ztráty aktivity se jedná o závažné onemocnění Lesh-Nyhanova syndromu [25]. Známé jsou také deficiencie fosforibosylpyrofosfát syntetasy [26], adenylosukcinátlyasy [27] a aminoimidazolkarboxamid ribonukleotid transformylasy [28].

Purinový metabolismus je dále z klinického hlediska důležitý jako cíl mnoha léčiv. Více než 20 % léků schválených v onkologii jsou antimetabolity purinů nebo pyrimidinů [29]. Příkladem mohou být thiopuriny (léčba lymfocytární leukémie) nebo purinové analogy (např. fludarabine) [30]. Kromě látek přímo působících na enzymy existují také léčiva na bázi antifolátů, které narušují purinovou biosyntézu (např. methotrexát) [31].



Obr. 2: *Recyklační dráhy purinových nukleotidů* [32, 33, 34, 35]. Hypoxantin je konvertován na IMP díky působení hypoxantin-guanin fosforybosyltransferasy (HGPRT), guanin je přeměněn na GMP za katalýzy téhož enzymu a adenin je konvertován na AMP pomocí adeninfosforibosyltransferasy (APRT). Společným substrátem je fosforibosylpyrofosfát (PRPP).

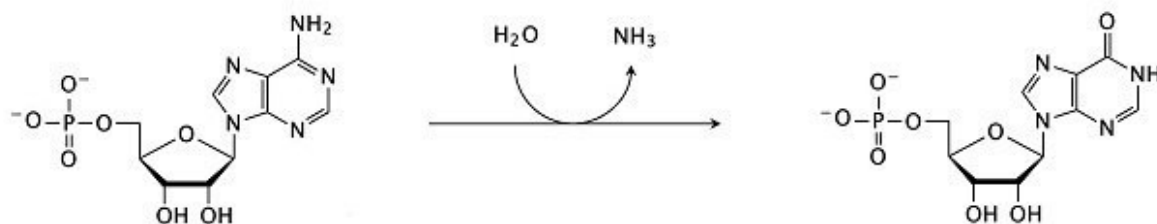
AMP vzniklý purinovou biosyntézou nebo recyklační dráhou je dále zařazen do energetického metabolismu, kde dochází k jeho fosforylaci, nebo je odbourán pomocí defosforylace či deaminace. Defosforylaci zajišťuje enzym 5'-nukleotidasa a produktem této reakce je adenosin, který může plnit signální úlohu nebo být deaminován adenosindeaminasou na inosin, jež je dále degradován na hypoxantin. Druhou cestou je deaminace, která je katalyzována AMP deaminasou. Všechny puriny jsou degradovány přes xantin na kyselinu močovou, viz Obr. 3.



Obr. 3: Schéma degradace purinů [35].

3 Adenosinmonofosfát deaminasa

Adenosinmonofosfát (AMP) deaminasa (EC 3.5.4.6) je enzym ze skupiny hydrolas, který katalyzuje ireverzibilní deaminaci adenosinmonofosfátu za vzniku inosinmonofosfátu a amoniaku, viz Obr. 4. Deaminace AMP je důležitým článkem nukleotidového metabolismu eukaryot a je vstupní reakcí purinového nukleotidového cyklu.



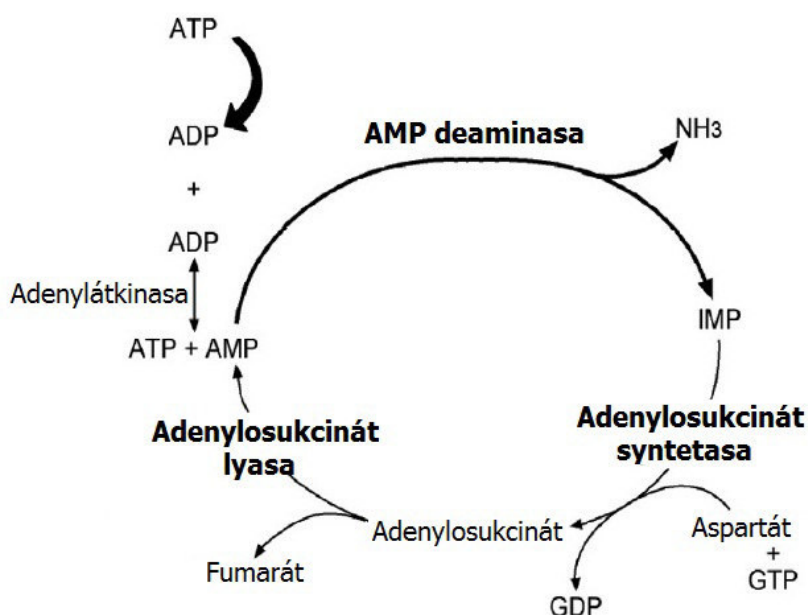
Obr. 4: *Reakce katalyzovaná AMP deaminasou [32, 33].*

U savců existuje několik tkáňově a vývojově specifických izoform AMP deaminasy [1]. U člověka byly nalezeny čtyři izoformy kódovány třemi geny. Všechny izoformy obsahují čtyři identické podjednotky o přibližné velikosti 80 kDa [36]. Enzym je řazen mezi metaloproteiny, protože obsahuje vázaný zinečnatý kationt [37]. Nejvíce aktivní, zhruba stokrát více než u jiných tkání, je AMP deaminasa v kosterním svalstvu, což je důsledek vyšší exprese genu *AMPD1* ve svalových buňkách [1, 38]. Svalová forma AMP deaminasy se označuje M a je kódována genem *AMPD1*. Produktem *AMPD2* genu je izoforma L, která je syntetizovaná zejména v játrech, ale také ve slezině, ledvinách, srdci a mozku [39, 40]. *AMPD3* kóduje izoformy E1 a E2, které jsou produkty alternativní transkripce a které se predominantně nacházejí v erytrocytech [41], dále také v srdci a slezině [42].

Z klinického hlediska je významný gen *AMPD1*, protože je-li mutovaný, způsobuje onemocnění svalů. Deficience AMP deaminasy se u postižených jedinců projevuje při fyzické námaze brzkou únavou svalů, bolestí a křečemi [43]. Kromě svalů byla také prokázána deficience AMP deaminasy u erytrocytů, která má ale projev asymptomatický [44].

Samotná fyziologická funkce AMP deaminasy ještě není zcela objasněna a je nejvíce studována u svalových buněk. Předpokládá se, že AMP deaminasa hraje důležitou roli v době zvýšených nároků na energii. Při spotřebě ATP dochází v buňkách k akumulaci ADP a AMP, přičemž vysoký nárůst ADP je regulován a zužitkován adenylátkinasou, která katalyzuje fosforylaci jednoho ADP pomocí druhého za vzniku ATP a AMP. Aku-

mulace AMP je limitována AMP deaminasou, pomocí které je odebírán AMP a rovnováha adenylátkinasové reakce se mění ve prospěch produktů [45, 46]. Návrat adeninových nukleotidů, které jsou ztraceny během energetických nároků, je zabezpečen purinovým nukleotidovým cyklem, ve kterém dochází k reaminaci IMP [47]. Alternativně mohou být také z IMP odvozeny guaninové nukleotidy. Purinový nukleotidový cyklus zahrnuje tři reakce, které jsou katalyzované enzymy AMP deaminasou, adenylosukcinátsyntetasou a adenylosukcinátlyasou, viz Obr. 5. V poslední reakci dochází k produkci fumarátu, který je meziproduktem citrátového cyklu. Je možné, že tak dochází k posílení aktivity citrátového cyklu [48].



Obr. 5: *Purinový nukleotidový cyklus*. Zahrnuje tři reakce, které jsou katalyzované enzymy AMP deaminasou, adenylosukcinátsyntetasou a adenylosukcinátlyasou. Zobrazena je také adenylátkinasová reakce. [49].

Dalším aspektem, který ovlivňuje energetický metabolismus, je produkce amoniaku při deaminaci AMP. U kvasinek bylo prokázáno, že amonný kationt spolu se sníženou hladinou ATP posiluje aktivitu fosfofruktokinasy a pyruvátkinasy a tím reguluje glykolýzu [50]. Pozitivní efekt na glykolýzu má dále zvýšená hladina volného AMP. Fosfofruktokinasa je allostericky inhibována vysokou hladinou ATP tak, že snižuje afinitu tohoto enzymu k fruktosa-6-fosfátu. AMP naopak dovede zvrátit inhibiční účinek ATP, a tak se s klesajícím poměrem ATP/AMP zvyšuje aktivita enzymu [51]. AMP a IMP mimo to allostericky zvyšují aktivitu glykogenfosforylasy, enzymu katalyzujícího první krok štěpení

glykogenu, zatímco ATP má účinek inhibiční [52].

Samotná AMP deaminasa také podléhá regulaci. Bylo zjištěno, že aktivitu enzymu stimulují jednomocné kationty, zejména draselný iont [53]. Toto je dále ovlivněno přítomností aniontu, se kterým je K^+ kombinován. Enzymová aktivita totiž klesá se zvyšujícím se negativním nábojem aniontu. Předpokládá se, že existuje regulační místo enzymu, kam se musí vázat aniontové prvky či sloučeniny (včetně AMP) pro kompletní aktivaci enzymu [54]. Enzym je dále aktivován spíše kyselějším pH, jehož poměrně široké optimum demonstrují různé *in vitro* studie na hodnotách v rozmezí 6-6,5. [55, 56, 57], ale také 5,9 [58] nebo 7 [59].

AMP deaminasa je allostericky regulována AMP, ADP, ATP a anorganickým fosfátem. Zvýšení AMP a ADP koncentrací má aktivační efekt, zatímco ATP a P_i inhibiční [60, 61]. Enzym je také ovlivňován GTP a GDP, nicméně se má za to, že v *in vivo* podmínkách není tato regulace důležitá [60].

Další možnost kontroly AMP deaminasy je pomocí fosforylace [62]. Proteinkinasa C je zatím jediným popsáním enzymem, který fosforyluje savčí svalovou AMP deaminasu v přítomnosti vápenatých kationtů a fosfatidylserinu, a tak jej aktivuje [63, 64].

Jiná teoretická práce navrhuje adenylátkinasu a AMP deaminasu jako efektivní systém ke snížení produkce ATP anaerobní glykolýzou při svalové námaze (a minimálním efektem na oxidativní fosforylaci). To se děje skrze snížení koncentrace ADP a AMP, aktivátory glykolýzy, což významně zpomaluje proces poklesu pH ve svalu, prodlužuje tak jeho schopnost práce a snižuje možnost poškození buněk [65].

Všechny AMP deaminasy obsahují konzervovanou aminokyselinovou sekvenci o rozsahu dvou třetin její délky a zahrnují střední a C-koncovou oblast. N-koncová část se odlišuje a je tak zřejmě odpovědná za izoenzymově specifickou kinetiku, regulaci a imunologické vlastnosti [41]. V experimentech, při kterém byly polypeptidy AMP deaminasy připraveny tak, aby postrádaly 250 N-koncových aminokyselin, bylo prokázáno, že nedošlo ke ztrátě katalytické aktivity [66, 67]. V C-koncové oblasti byl dále nalezen konzervovaný motiv SLSTDDP, který je zřejmě součástí katalytického místa AMP deaminas [68].

3.1 Izoenzym M

Izoenzym M je nejdříve prostudován v rámci AMP deaminas. Lidská izoforma kosterního svalstva má molekulovou hmotnost podjednotky 72 kDa [36]. V literatuře uváděné hod-

noty K_m pro AMP jsou 0,6 - 1 mmol/l. Enzym vykazuje hyperbolickou křivku závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu (v přítomnosti K^+) [36, 69].

Izoforma M je kódována genem *AMPD1*, který je lokalizován na chromozomu 1 p13-p21, je velký 29 kb a obsahuje 16 exonů o velikostech 101 - 220 nukleotidů kromě exonu 2, který se skládá pouze z 12 nukleotidů [70]. Primární transkript *AMPD1* podléhá alternativnímu sestřihu, a tak může být generováno více forem tohoto izoenzymu [71].

V literatuře jsou popsány mutace genu *AMPD1*, které způsobují svalové onemocnění deficiencie AMP deaminasy. Ve většině případů se jedná o tranzici 34 nukleotidu C na T, který se nachází v druhém exonu. Vzniká tak nesmyslný kodon, který způsobuje předčasné ukončení translace [72, 73]. Frekvence této mutantní alely je 8–11 % u bělošské populace s 2 % homozygotních jedinců a 20 % heterozygotních [74]. U heterozygotních jedinců bylo naměřeno snížení aktivity AMP deaminasy na pouhých 39 % v porovnání se skupinou zdravých jedinců [43]. Také bylo zjištěno, že překvapivě existují jedinci, nesoucí mutantní alelu, ale nevykazující symptomy onemocnění. Možné vysvětlení spočívá v netypickém alternativním sestřihu, týkajícího se méně než 5 % *AMPD1* transkriptů, který vystřihne exon 2 a umožní tak translaci funkčního peptidu. Zdá se, že i malé množství funkčního enzymu stačí k zachování normálního fenotypu [75]. V současnosti není k dispozici účinná léčba, pro zmírnění symptomů je možné pacientům podávat D-ribózu, která se snadno vstřebává a dostane do energetického metabolismu a která tak slouží jako dodatečný zdroj energie [76].

Svalová AMP deaminasa je zajímavá tím, že se může vázat na myosin, zvláště v době svalové práce, což má pozitivní efekt na její aktivitu. Lokalizace AMP deaminasy do míst s vysokým obratem ATP se zdá být důležitá pro efektivní aktivaci enzymu [77, 78].

Nedávno bylo také objeveno, že izoforma M je inhibována metforminem, lékem používaným v léčbě diabetu II. typu, který je charakterizován zejména nedostatečnou citlivostí tkání k účinkům inzulínu. Právě inhibice svalové AMP deaminasy je zřejmě dalším mechanismem účinku metforminu. Nahromadění AMP v důsledku inhibice AMP deaminasy vede k aktivaci AMP-aktivované proteinkinasy, která dále způsobuje snížení jaterní glukoneogeneze a stimulaci příjmu glukózy periferními tkáněmi, čímž snižuje hladinu glukózy v krvi [79, 80]. Přesný mechanismus inhibice metforminem ale ještě není objasněn. Bylo pouze publikováno, že purifikovaná AMP deaminasa je metforminem inhibována a že účinek metforminu u myši vymizel po vyřazení genu AMP deaminasy [81].

3.2 Izoenzym L

Izoforma L *Homo sapiens* má molekulovou hmotnost podjednotky 68 kDa [36]. Uváděné hodnoty K_m pro AMP jsou 4,5 - 9,9 mmol/l. Enzym vykazuje sigmoidní saturační křivku (v přítomnosti K^+) [36, 82].

Izoforma L je kódována genem *AMPD2*, který je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 1 v oblasti p13.3, obsahuje 19 exonů a je velký 14 kb. Transkript *AMPD2* také podléhá alternativnímu sestřihu, při kterém jsou využívány exony 1A a 1B, oba obsahující iniciační kodon. [39].

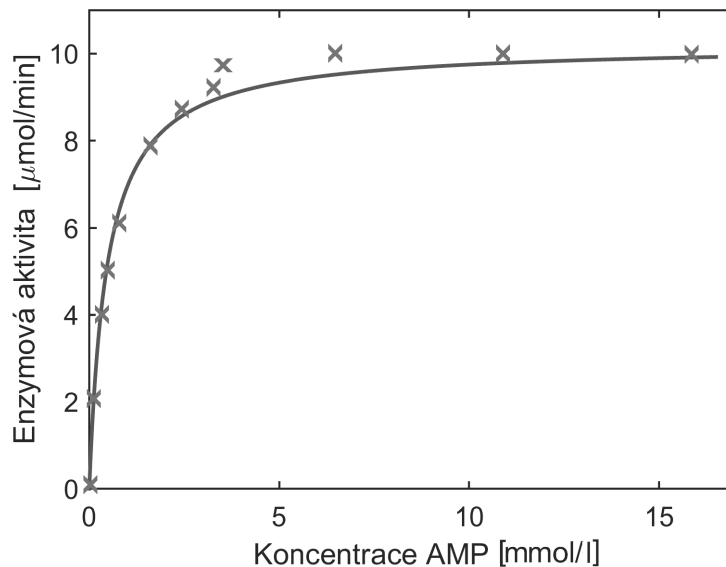
V literatuře jsou popsány mutace *AMPD2*, které způsobují dědičné neurodegenerativní poruchy. U postižených jedinců dochází ke špatnému vývoji mozku, ve kterém je téměř kompletně nepřítomná L forma AMP deaminasy. Zároveň byla u těchto buněk zjištěna zvýšená hladina adeninových nukleotidů a snížená hladina nukleotidů guaninových. V současnosti se má za to, že akumulace adeninových nukleotidů zpětně inhibuje *de novo* syntézu purinů (inhibicí fosforibosylpyrofosfátsyntetasy a fosforibosylpyrofosfátamidotransferasy). Právě nedostatek guaninových nukleotidů zřejmě způsobuje patologický fenotyp, který se výrazně projevuje také v zastavení proteosyntézy (závislé na GTP). Tato hypotéza byla dále podpořena experimentem, ve kterém došlo po podání ribonukleotidového purinového prekursoru k obnově syntézy guaninových nukleotidů, proteosyntézy a tedy i přežívání buněk z linie odvozené z pacientovy tkáně [83].

3.3 Izoenzym E

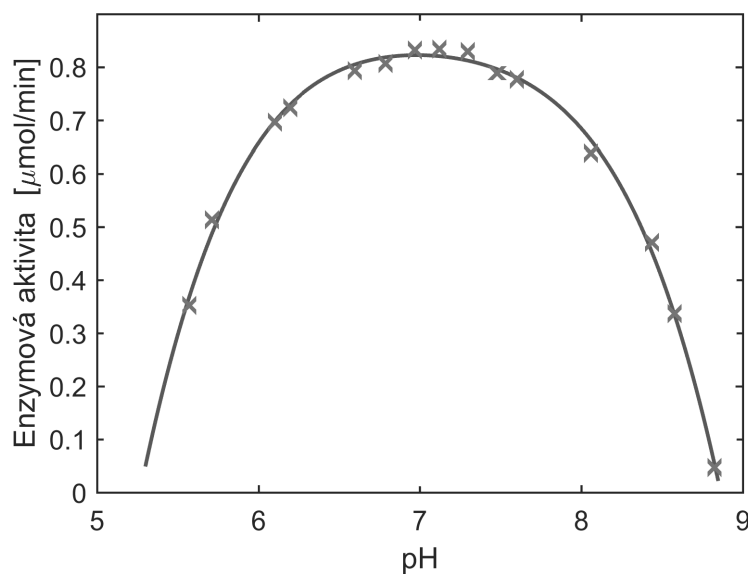
Uváděná molekulová hmotnost pro lidskou erytrocytární formu je 80 kDa [36]. Hodnoty K_m pro AMP jsou 0,6 - 1,2 mmol/l. Enzym vykazuje hyperbolickou saturační křivku (v přítomnosti K^+), viz Obr. 6. V nepřítomnosti monovalentního kationtu je sigmoidní, stejně jako u izoformy M [36, 84]. Optimum pH pro tuto izoformu je 7 - 7,1 [84], viz Obr. 7.

Izoenzymy E jsou kódovány genem *AMPD3*, který se skládá ze 17 exonů a je velký 60 kb. Náchází se na krátkém raménku chromozomu 11 v oblasti p13 a je pod kontrolou tří tandemově uspořádaných promotorů, které se podílejí na transkripční 5'-koncové variabilitě genu [85]. U *AMPD3* je popsána bodová mutace vedoucí ke katalyticky neaktivnímu enzymu. Tato deficiencie má asymptomatický průběh [44].

AMP deaminasa u erytrocytů je pozitivně regulována vazbou na Ca^{2+} -calmodulin, což zřejmě hraje roli při deficienci fosfofruktokinasy, onemocnění, které je provázeno zvýše-



Obr. 6: Saturační křivka erytrocytární AMP deaminasy [84].



Obr. 7: Závislost aktivity erytrocytární AMP deaminasy na pH [84].

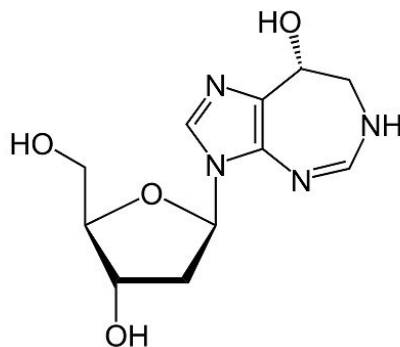
ným čerpáním vápníku do erytrocytů za spotřeby ATP a následujícím zvýšením hladiny IMP právě pomocí aktivované AMP deaminasy. Erytrocyty ale nejsou schopny znova syntetizovat AMP z IMP kvůli vývojové ztrátě adenylsukcinátsyntetasy, a tak dochází k nevratnému vyčerpání adeninových nukleotidů [86]. Jiným případem regulace erytrocytární AMP deaminasy je 2,3-bisfosfoglycerát, známý negativní allosterický modulátor hemoglobinu, který aktivitu E formy inhibuje [87].

3.4 Inhibitory

AMP deaminasa může být inhibována antibiotikem nukleosidové struktury coformycinem a jeho 2'-deoxy derivátem, viz Obr. 8. Jedná se o kompetitivní inhibici s hodnotami K_i $2 \cdot 10^{-8}$ mol/l pro coformycin a $3,6 \cdot 10^{-7}$ mol/l pro 2'-deoxycoformycin (hodnoty zjištěny pro králičí svalovou AMP deaminasu) [88]. Zajímavé je, že tyto nukleosidy jsou v buněčném systému metabolizovány na fosforylované formy [89], které mohou také inhibičně působit, například 2'-deoxycoformycin 5'-fosfát s hodnotou K_i $1 \cdot 10^{-9}$ mol/l [88].

Coformycin ale není specifický inhibitor a kromě AMP deaminasy působí také na adenosindeaminasu [90]. Je tedy snaha hledat potenciální inhibitory, které by byly selektivní pouze pro AMP deaminasu. Příprava takových látek, strukturně analogických coformycinu, ale také látek nenukleotidových, byla již publikována [91, 92]. Příkladem můžou být 3-(karboxyfenylethyl)-imidazo[2,1-f][1,2,4]triaziny, z nichž jeden zástupce vykazoval u všech tří rekombinantních izoenzymů AMP deaminasy dobré inhibiční vlastnosti ($IC_{50} = 0,9-5,7 \mu\text{mol/l}$) [93]. Tyto nové inhibitory ale nejsou komerčně dostupné.

AMP deaminasa je zřejmě také inhibována léčivem metforminem, viz níže [81].



Obr. 8: 2'-deoxycoformycin [94].

4 AMP-aktivovaná proteinkinasa

V souvislosti s energetickým metabolismem celkově a metabolismem adeninových nukleotidů je ještě třeba se zmínit o AMP-aktivované proteinkinase. Ta je zodpovědná za udržování energetické rovnováhy jak na buněčné úrovni, tak na úrovni celého organismu. Působí jako senzor energetických změn v eukaryotních buňkách [3] a jakmile je aktivní, inhibuje energeticky náročné biosyntetické procesy a naopak zvyšuje aktivitu nebo expresi proteinů zapojených v katabolismu [4].

AMP-aktivovaná proteinkinasa je cytoplazmatický enzym, patřící do rodiny serin/threoninových proteinových kinas [3]. Strukturně se jedná o heterotrimerní komplex, skládající se z jedné katalytické α podjednotky a ze dvou regulačních: β a γ . U člověka existuje více izoform podjednotek, každá kódována vlastním genem: α a β mají dvě a γ tři. Transkripty některých izoform navíc podstupují alternativní sestřih, což vede k různým obměnám komplexu. Výsledné izoenzymy jsou tkáňově a vývojově specifické [95].

Na úrovni organismu je enzym regulován pomocí hormonů, např. leptin, adiponektin, inzulin, a cytokinů, např. IL-6. Koordinace AMP-aktivované proteinkinasy s leptinem a ghrelinem například zajišťuje správnou signalizaci informací o nasycenosti nebo potřeby potravy organismu mezi periferními tkáněmi, hypothalamem a žaludkem [96, 97].

Na buněčné úrovni dochází k aktivaci enzymu při změně poměru AMP:ATP v buňce, když hladina AMP narůstá, což nastává při různých formách buněčného stresu nebo po aktivaci procesů vyžadujících velké množství ATP. AMP se váže do regulačního místa v γ podjednotce AMP-aktivované proteinkinasy a působí jako allosterický aktivátor [4]. Enzym se tímto stává lepším substrátem pro nadřazenou kinasu LKB1, která jej aktivuje fosforylací [98], a také vazba AMP brání proteinovým fosfatázám toto místo defosforylovat [99]. Kinasa LKB1 disponuje vysokou bazální aktivitou, proto je fosforylace regulována právě vazbou AMP [100]. AMP-aktivovanou proteinkinasu může fosforylovat ještě Ca^{2+} /calmodulin dependentní kinasa, která je aktivována zvýšením hladiny Ca^{2+} v cytoplazmě (např. v rámci buněčné odpovědi na stres) [101].

Aktivní AMP-aktivovaná proteinkinasa pak inhibuje například syntézu mastných kyselin a cholesterolu [102, 103], a to skrze inhibiční fosforylaci acetyl-CoA karboxylasy, enzymu katalyzujícího vznik malonylu-CoA (substrátu lipogeneze) z acetyl-CoA. Snížení hladiny malonylu-CoA vede k aktivaci β oxidace a inhibici syntézy mastných kyselin [104]. V případě cholesterolu má AMP-aktivovaná proteinkinasa inhibiční účinek na 3-

hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktasu, což je enzym katalyzující redukcí 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA na mevalonát [105].

Dále se aktivní AMP-aktivovaná proteinkinasa podílí na potlačení glukoneogeneze v játrech skrze inhibici transkripce genů pro fosfoenolpyruvátkarboxykinasu a glukosa-6-fosfatasu [106]. Ve svalových buňkách navíc podporuje translokaci glukosového transportéru GLUT4 do plazmatické membrány, což zvyšuje vstup glukosy do buněk [107].

Vzhledem ke schopnosti AMP-aktivované proteinkinasy přepínat mezi anabolickým stavem na katabolický je v posledních letech navrhována jako atraktivní cíl pro léčbu metabolických onemocnění, zvláště pro obezitu a diabetes II. typu. Skutečně se prokázalo, že metformin a thiazolidindiony, látky užívané při léčbě diabetu, nepřímou aktivují AMP-aktivovanou proteinkinasu [108].

AMP-aktivovaná proteinkinasa také hraje roli v procesu autofágie, což je degradační proces buňky obvykle indukovaný hladověním nebo stresem. AMP-aktivovaná proteinkinasa může iniciovat autofagii fosforylací ULK1 (unc-51-like autophagy-activating kinase 1) [109] za současného potlačení aktivity mTORC1 (jež má supresivní účinek na fosforylovanou ULK1) [110]. Skrze signální dráhu mTORC1 AMP-aktivovaná proteinkinasa také inhibuje proteosyntézu [111].

AMP-aktivovaná proteinkinasa se dále podílí na udržování buněčné polarizace fosforylací proteinu CLIP-170 (cytoplasmic linker protein-170), který reguluje mikrotubulovou dynamiku a umožňuje polarizovanou lokalizaci jejich plus konců [112].

Také v souvislosti s protinádorovými účinky je zmiňována AMP-aktivovaná proteinkinasa. Aktivní enzym se totiž podílí na zastavení buněčného cyklu ve fázi G1, což je provázáno fosforylací p53 a nadměrnou expresí CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, také znám jako p21^{WAF1}) [113]. AMP-aktivovaná proteinkinasa se dále ještě fosforylací podílí na stabilizaci CDKN1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, také znám jako p27^{KIP1}) [114], což přispívá k celkovému obrazu úlohy AMP-aktivované proteinkinasy v regulaci buněčného cyklu. Ta ale zatím není zcela objasněna.

Vzhledem k tomu, že aktivace AMP-aktivované proteinkinasy se významně odvíjí od hladiny AMP, je možné, že inhibice AMP metabolizujících enzymů (např. AMP deaminasy) může být zajímavým farmakologickým cílem.

5 Metody stanovení aktivity AMP deaminasy

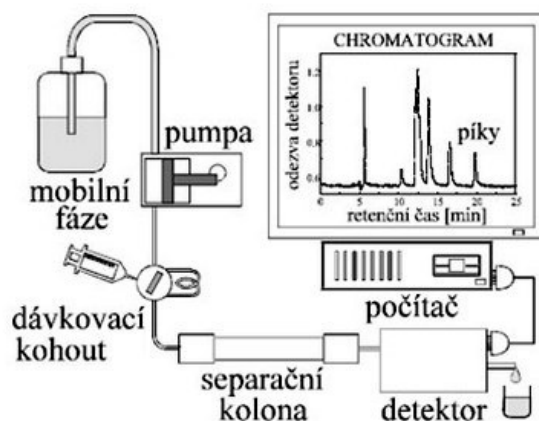
Enzymovou aktivitu je možné nepřímo stanovit kinetickou metodou na základě rychlosti, jakou enzym katalyzuje přeměnu substrátu na produkt ve zvoleném časovém intervalu. Aby bylo možné porovnávat tyto změny, je nutné, aby přeměna substrátu na produkt byla v čase lineární.

Aktivitu AMP deaminasy je možné měřit několika způsoby. Jednou z možností je měření podle množství vyprodukovaného amoniaku. Tento postup využívá modrého zbarvení indofenolu, který se tvoří v reakci fenolu s amonnými a chlornanovými ionty v alkalickém prostředí. Na základě měření absorbance při 625 nm je pak možné stanovit obsah amoniaku [115]. Další postup spočívá v měření oxidace NADH při 340 nm v rámci glutamátdehydrogenasové reakce s přidavkem α -ketoglutarátu v reakční směsi [116]. Oba tyto způsoby jsou ovšem komplikovány uspořádáním experimentu, kdy dochází ke spřažení primární a indikátorové reakce.

Jiným způsobem je sledování změn absorbance, které odráží konverzi AMP na IMP. U vzorků s předpokládanou koncentrací AMP do $250 \mu\text{mol/l}$ se sleduje pokles absorbance při 267 nm a u vzorků nad $250 \mu\text{mol/l}$ vzrůst absorbance při vlnové délce 280 nm [117]. Nevýhodou této metody je, že spektra adeninových nukleotidů se překrývají, a tak měření není přesné. Proto je nejrozšířenější metodou nejprve jednotlivé nukleotidy chromatograficky separovat a poté detekovat. Je možné přímo měřit změny v koncentraci AMP a IMP, a to klasickými postupy na analýzu nukleotidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi. Kvantifikace analytů se pak provádí standardním přidavkem, UV detekcí nebo pomocí hmotnostního spektrometru.

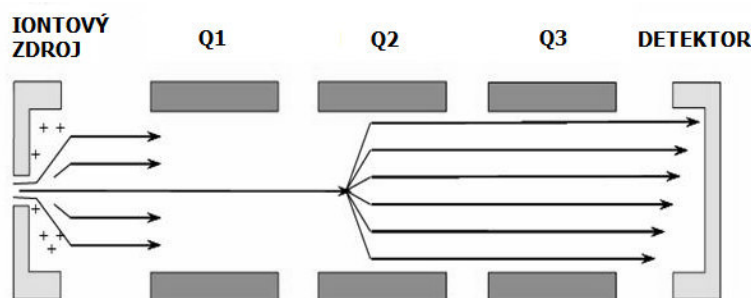
5.1 Analýza IMP pomocí HPLC na reverzní fázi ve spojení s MS/MS

HPLC je separační technika užívaná pro dělení a analýzu směsí látek, která využívá principu rozdělávání jednotlivých složek mezi fáze mobilní a stacionární na základě jejich chemických a fyzikálních vlastností a vzájemných interakcí. V případě uspořádání HPLC na reverzní fázi jsou ve stacionárním sorbentu vázány nepolární alifatické zbytky a jako mobilní fáze se uplatňují polární rozpouštědla (např. methanol, acetonitril). Schéma kapalinového chromatografu je na Obr. 9.



Obr. 9: *Schéma kapalinového chromatografu.* Skládá se ze zařízení pro uchování a transport mobilní fáze (vysokotlaké čerpadlo), zařízení pro dávkování vzorku, chromatografickou kolonu pro separaci látek a zařízení pro detekci látek [118].

U HPLC je možné pro detekci využít hmotnostní spektrometrii, což je technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje a detekuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje. Pro kvantifikaci IMP může být použita tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), která představuje spojení dvou hmotnostně spektrometrických analýz v prostoru nebo čase oddělených procesem disociace iontů. Výsledkem je hmotnostní spektrum, které popisuje vztah rodičovského iontu a jeho fragmentů. Klasické uspořádání pro MS/MS fragmentaci využívá trojitý kvadrupól, který sice poskytuje nižší rozlišení v porovnání s jinými typy, ale má robustní konstrukci a umožňuje kvantifikaci. Schéma MS/MS je na Obr. 10.



Obr. 10: *Schéma tandemově uspořádané hmotnostní spektrometrie.* Skládá se z iontového zdroje, kvadrupólu umožňujícího selekci prekursorového iontu (Q1), kvadrupólu umožňujícího fragmentaci prekursoru v kolizní cele (Q2), kvadrupólu analyzujícího iontové fragmenty prekursoru (Q3) a detektoru. V tomto případě je skonovací mód nastaven pro analýzu prekursorů poskytujících při fragmentaci určitý fragmentační iont [119].

6 Cíle práce

1. Adaptace metody pro stanovení aktivity AMP deaminasy u leukemických buněk (linie K562 a HL-60).
2. Analýza vlivu dostupného inhibitoru 2'-deoxycoformycinu na aktivitu AMP deaminasy.
3. Analýza exprese genů AMP deaminasy u buněk K562.
4. Příprava buněk K562 se sníženou expresí genu *AMPD3*.

7 Praktická část

7.1 Materiál

7.1.1 Biologický materiál

V experimentech byly použity buněčné linie K562 a HL-60.

Buňky K562 jsou odvozeny z chronické myeloidní leukémie a jsou neadherentní. Jedná se o nediferencované pluripotentní blasty s potenciálem diferenciací do pseudoerytrocytů a megakaryocytů [120]. Linie nese fúzní onkogen BCR-ABL, který vznikl reciproknou translokací dlouhých ramének chromozomů 9 a 22. Expresí onkogenu vzniká konstitutivně aktivní tyrozinová kinasa, která dereguluje řadu signálních drah [121].

Buňky HL-60 jsou odvozeny z akutní promyeloidní leukémie. Jedná se z 90 % o promyelocyty, které snadno diferencují do granulocytů a monocytů [122].

7.1.2 Chemikálie

Triton-X 100 (Serva)

RPMI-1640 (Biosera)

Penicillin-Streptomycin (Cell Culture Company)

Fetální Bovinní Sérum (Sigma-Aldrich)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

PBS pufr (1x: NaCl 4 g, KCl 0,1 g, Na₂HPO₄ x 12 H₂O 605 g, KH₂PO₄ 0,01 g, pH 7,4)

Deionizovaná voda (pomocí přístroje Aqua osmotic)

Puromycin (Sigma-Aldrich)

Hepes (Sigma-Aldrich)

CHAPS (Sigma-Aldrich)

EDTA (Duchefa)

Chlorid draselný (Duchefa)

Octan sodný (Lachema)

Agarosa (SERVA)

Formaldehyd 36,5 % (Sigma-Aldrich)

2-Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich)

2'-Deoxycoformycin (Tocris)

Ethidium Bromid (Amresco)

AMP (Sigma-Aldrich)

Kyselina mravenčí (Fluka)

Pufr pro měření obsahující HEPES (1x: 25 mmol/l HEPES, 100 mmol/l KCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l dithiotreitol, pH 7)

Lyzační pufr obsahující HEPES (1x: 25 mmol/l HEPES, 100 mmol/l KCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l dithiotreitol, 0,1 % Triton, pH 7)

Pufr pro měření s imidazolem (2x: 200 mmol/l KCl, 100 mmol/l imidazol, 2 mmol/l dithiotreitol, pH 7)

Lyzační pufr s imidazolem (2x: 200 mmol/l KCl, 100 mmol/l imidazol, 5 mmol/l dithiotreitol, 0,2 % Triton, pH 7)

RNA vzorkový nanášecí pufr (2x: deionizovaný formamid 650 μ l, 37 % formaldehyd 220 μ l, 10x MOPS pufr 100 μ l, ethidium bromid (10 mg/ml) 2 μ l, xylenová zeleň 10 μ l 10 % roztoku, bromfenolová modř 10 μ l 10 % roztoku, H₂O 8 μ l]

DNA vzorkový nanášecí pufr (10x: 50 % glycerol, 0,25 % bromfenolová modř, 0,25 % xylenová zeleň, doplnit 1x TAE pufrem)

Roztok Bradfordové (95 % ethanol 100 ml, 88 % kyselina fosforečná 200 ml, Coomassie Brilliant Blue G 350 mg)

TAE pufr (1x: 40 mmol/l TRIS, 20 mmol/l acetát, 1 mmol/l EDTA, pH 8)

MOPS pufr (10x 0,2 mol/l MOPS, 50 mmol/l acetát, 10 mmol/l EDTA, pH 7)

7.1.3 Přístroje

Vi-Cell XR (Beckmann-Coulter)

Inkubátor 170B-8 (ESCO)

Laminární box biohazard 1800 mm (Thermo Scientific)

Lednice HRF 470 (Haier)

Box skříňový mrazící (-80) (Sanyo)

Termostat suchý TDB-100 (Biosan)

Spektrofotometr GeniosPlus s programem XFluor4 (Tecan)

Sada pipet BioPette Plus 0,1-2,5 μl , 0,5-10 μl , 2-20 μl , 10-100 μl , 50-200 μl , 100-1000 μl
(Labnet)

Pipetor (Hirschmann)

Chlazená centrifuga Z326 K (Hermle)

Analytické váhy AE 240 (Mettler)

pH metr 3510 (Jenway)

Minicentrifuga FUGE mini (Benchmark)

Termocyklér MJ Mini (Bio-Rad)

Vortex V1 (Biosan)

Třepačka OS-10 (Biosan)

Zdroj pro elektroforézu E132 (Consort)

Elektroforetická vana ME-1010 (Major Science)

Mikrovlňná trouba KOR-6L15 (Daewoo)

Transiluminátor UV (Ultra-Lum)

CCD kamera s programem WinFastPVR2 (COHN)

Sonikátor (Branson)

7.2 Pracovní postupy

7.2.1 Kultivace buněčné linie

Práce s buněčnými kulturami byla prováděna ve sterilních podmínkách boxu s laminárním prouděním vzduchu, taktéž použité roztoky a média byly sterilní. Kultivační médium bylo vždy před použitím ohřáto na teplotu 37 °C. Buněčné linie K562 a HL-60 byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s přidavkem fetálního bovinního séra a antibiotik streptomycin a penicilin a kultivace probíhala v inkubátoru při 37 °C, 90 % vlhkosti a v 5 % CO₂.

Stanovení viability a počtu buněk bylo prováděno pomocí přístroje Vi-CELL, který na základě prostupnosti cytoplazmatické membrány pro trypanovou modř vypočítává zastoupení živých a mrtvých buněk v kultuře.

7.2.2 Příprava buněčných extraktů

Exponenciálně rostoucí buňky byly dezintegrovány za účelem přípravy extraktu buněčných proteinů. Bylo vyzkoušeno několik metod: mražení a rozmrazování, sonikace a extrakce pomocí detergentů. Veškeré manipulace byly prováděny na ledu kvůli zajištění stability proteinů.

Nejprve byly napěstované buňky sedimentovány při nízkých otáčkách (1 500 rpm/5 min /4 °C), dvakrát promyty v ledovém PBS a znova sedimentovány. Další postup se lišil podle použité metody.

a. *Mražení a rozmrazování*

Při mražení buněk dochází k tvorbě krystalků ledu, které způsobují poškození buněčných membrán, a tak je dosaženo lýze. Opakované mražení a rozmrazování zvyšuje účinnost této metody.

Buněčný sediment byl resuspendován v 1x pufru pro měření v poměru 400 μl pufru na 10 milionů buněk a přenesen do mrazícího boxu do -80 °C. Po 10 min byl zmražený vzorek přenesen na led, kde došlo k jeho pozvolnému rozmražení. Proces mražení a rozmrazování byl opakován 1-5x a jeho účinnost byla zhodnocena podle výtěžku proteinů.

b. *Sonikace*

Při této metodě dochází k rozrušení buněk pomocí ultrazvuku.

Buněčný sediment byl resuspendován v 1x pufru pro měření a poté byl sonikován za použití škály amplitud (maximální výkon 400 W) a různě dlouhé doby sonikace (1-10 min). Účinnost metody byla zhodnocena podle výtěžku proteinů.

c. Extrakce pomocí detergentů

K lýzi buněk dochází pomocí detergentů, které narušují biologické membrány.

Buněčný sediment byl resuspendován v 1x lyzačním pufru v poměru 400 μ l pufru na 10 milionů buněk. Lyzační pufr obsahoval buď 0,1 % Triton-X 100, nebo 0,1 % CHAPS. Lýze probíhala 30 min za občasného promíchání roztoku. Účinnost této metody byla zhodnocena podle výtěžku proteinů a podle vlivu na aktivitu AMP deaminasy.

Pro odstranění buněčných zbytků byla vždy po buněčné extrakci provedena centrifugace při vysokých otáčkách (18 000 rpm/10 min/4 °C).

7.2.3 Měření koncentrace proteinů

Množství proteinů bylo měřeno metodou Bradfordové, která využívá adsorpci barviva Coomassie Brilliant Blue na proteinové molekuly, jehož výsledkem je změna zbarvení do modra, které je možno spektrofotometricky detekovat při 595 nm.

K 1 ml činidla Bradfordové byl přidán 1 μ l vzorku, po 10 min inkubaci bylo 200 μ l přepipetováno do mikrotitrační destičky a následně změřeny hodnoty absorbance. Jako standard pro kalibrační roztoky byl použit bovinní sérový albumin. Množství proteinů bylo posléze odečteno z kalibrační křivky.

7.2.4 Stanovení enzymové aktivity

Specifická aktivita AMP deaminasy byla měřena na základě množství vzniklého IMP za jednotku času. Reakce probíhala v reakční směsi o objemu 200 μ l při 30 °C a obsahovala: 100 μ l 2x pufru pro měření, 20 μ l 10 mmol/l AMP, 10 μ g proteinů z buněčného lyzátu a na konečný objem byla doplněna destilovanou vodou. Podmínky měření byly optimalizovány z hlediska pH, času, typu pufru a množství přídatku proteinů. Enzymová reakce byla zastavena přidáním 200 μ l ledové 10 % kyseliny mravenčí. Vzorek byl poté centrifugován při vysokých otáčkách (18 000 rpm/10 min/4 °C) a dále separován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi a kvantifikován MS/MS hmotnostní spektrometrií podle externího standardu.

Z množství vyprodukovaného IMP, normalizovaného podle přídatku proteinů, a časového intervalu reakce byla vytvořena závislost, jejíž směrnice odpovídá enzymové aktivitě v jednotkách nmol IMP/min/ μ g proteinů. Pro určení přesné hodnoty vzniklého IMP bylo nutno kvantifikovat požadové množství IMP, které bylo vnášeno do reakce v lyzátu. Toto množství se ukázalo jako zanedbatelné ve srovnání s množstvím přírůstku IMP během reakce.

Vliv inhibitoru 2'-deoxycoformycinu na aktivitu AMP deaminasy byl studován přímo přidáním inhibitoru do reakční směsi a dále také po určité době inkubace s buňkami, protože bylo prokázáno, že může být v buněčném systému metabolizován na fosforylované formy [89], které mají také inhibiční efekt [88].

a. *pH optimum*

Optimální hodnota byla hledána v rozmezí pH 6-8, pro které bylo připraveno 5 roztoků 2x pufru pro měření. Jako pH optimum byla stanovena taková hodnota pH pufru, při které enzym vykazoval nejvyšší aktivitu.

b. *Časový interval reakce*

Enzymová aktivita byla stanovena pro intervaly 15, 30, 45 a 60 min, kvůli zjištění nejvhodnější doby reakce, za který byl považován nejdelší možný interval, při kterém byl ještě přírůstek IMP lineární.

c. *Pufr*

Jako výchozí pufr pro lýzi i měření byl zvolen imidazolový (podle [62], 100 mmol/l KCl, 50 mmol/l imidazol, 1 mmol/l dithiotreitol, pH 7), který ale způsoboval, že vzorek po zamražení precipitoval. Jako alternativu byl zvolen pufr obsahující HEPES (25 mmol/l HEPES, 100 mmol/l KCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l dithiotreitol, pH 7).

d. *Množství proteinů*

Přídavek proteinů z lyzátu do reakční směsi byl vyzkoušen pro 10, 30, 60, 100, 130 a 150 μ g. Jako nejvhodnější bylo považováno co nejnižší množství, při kterém již probíhala konstantní rychlost reakce.

7.2.5 Vliv 2'-deoxycoformycinu na viabilitu buněk

Dále byla analyzována cytotoxicita 2'-deoxycoformycinu testem buněčné proliferace a viability, a to v rozsahu koncentrací 0,1 - 100 $\mu\text{mol/l}$. Inhibitor byl inkubován s buňkami po dobu 48 h.

Orientační stanovení viability bylo provedeno pomocí MTT testu. Jedná se o jednoduchou metodu, založenou na redukci žlutého 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan fialové barvy v reakci je katalyzované dehydrogenázami na mitochondriální membráně živých buněk a tudíž množství vzniklého fialového formazanu je přímo úměrné viabilitě buněk. Obsah formazanu je následně vyhodnocen spektrofotometricky při 570nm.

7.2.6 Izolace RNA

Za účelem analýzy exprese genů pro AMP deaminasu u buněk K562 byla provedena amplifikace mRNA o plné délce na úrovni cDNA. Prvním krokem analýzy byla izolace celkové RNA, která byla provedena pomocí kitu GenEluteTM Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma Aldrich, USA) podle návodu výrobce. Postup ve zkratce spočívá v lýzi buněk za současné inhibice ribonukleas (extrakčním pufrem obsahujícím guanidium thiokyanát, sarcosyl a EDTA), záchyt RNA na silikagel v ethanolovém roztoku, promytí chaotropní solí, promytí ethanolovým roztokem, vysušení kolony a eluce RNA vodným roztokem prostým ribonukleas.

Kvalita vyizolované RNA byla ověřena elektroforeticky za denaturačních podmínek (formaldehyd) v 2 % agarosovém gelu. Koncentrace a čistota RNA byla změřena spektrofotometricky a vypočtena z absorbancí při 260 a 280 nm podle následujících vztahů: hodnota absorbance 1.0 při 260 nm odpovídá 40 $\mu\text{g/ml}$ a čistota je poté určena z poměru absorbancí při 260 a 280 nm, který musí být mezi čísly 1,8 - 2,1, je-li vzorek nekontaminovaný.

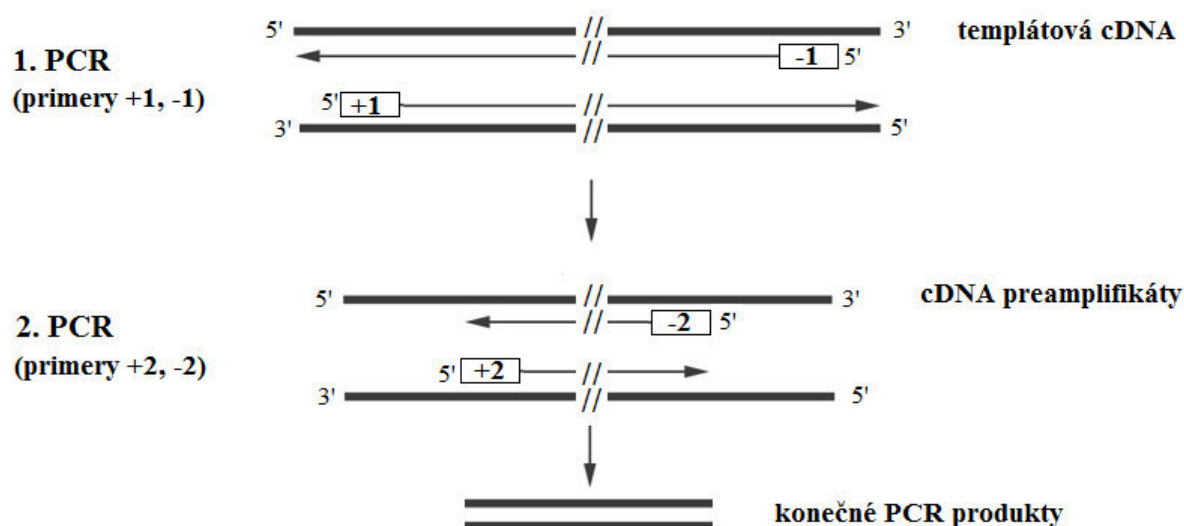
7.2.7 Reverzní transkripce

RNA byla dále přepsána do cDNA pomocí Enhanced Avian HS reverzní transkriptasy (Sigma-Aldrich, USA) podle návodu výrobce. Do reakční směsi o celkovém objemu 20 μl byly vloženy 2 μg templátové RNA, která byla ještě před přidáním transkriptasy 10 min inkubována při 70 °C kvůli rozrušení sekundárních struktur. Jako primery byly použity

náhodné nonamery, dále byl pak do reakce přidán placentární inhibitor ribonukleas. Reakce probíhala podle následujícího protokolu: 25 °C po dobu 15 min, 42 °C po dobu 20 min, 47 °C po dobu 20 min a 51 °C po dobu 20 min. Výsledná směs s cDNA byla ještě 2x zředěna vodou.

7.2.8 Amplifikace cDNA o plné délce pomocí NESTED PCR

Následně byla cDNA použita jako templát pro NESTED PCR. Tato varianta umožňuje zvýšení specifiity amplifikace DNA díky systému dvou primerových párů, kdy v první PCR reakci dochází k syntéze PCR produktu, který je poté použit jako templát pro druhou reakci (viz schéma na Obr. 11), což je zvláště výhodné při amplifikaci dlouhých sekvencí, kdy je vyšší pravděpodobnost vzniku nespecifických produktů.



Obr. 11: Schéma NESTED varianty PCR. Tato metoda využívá systému dvou primerových párů, kdy v první PCR reakci dochází k syntéze PCR produktu, který je poté použit jako templát pro reakci druhou.

Tab. 1: Reakční profil PCR 1.

Počet cyklů	Teplota	Doba trvání
1	95 °C	1 min
15	95 °C	40 s
	T _m primerů - 5 °C	20 s
	68 °C	3 min 40 s
1	68 °C	4 min

Tab. 2: Reakční profil PCR 2.

Počet cyklů	Teplota	Doba trvání
1	95 °C	1 min
25	95 °C	40 s
	T _m primerů - 5 °C	20 s
	68 °C	3 min 6 s
1	68 °C	4 min

Za účelem zisku co nejvíce specifického produktu byla použita polymerasa s 3'-5' exonukleasovou aktivitou Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent, USA). NESTED PCR byla provedena pro všechny tři mRNA odvozené od genů AMP deaminasy. První PCR probíhala podle schématu v Tab. 1, druhá PCR viz Tab. 2 v *end-point* provedení.

Délka PCR produktů byla vypočtena z referenčních sekvencí mRNA pro lidskou AMP deaminasu. Předpokládané délky ampliconů po druhé PCR jsou uvedeny v uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Předpokládané délky PCR produktů pro jednotlivé geny AMP deaminasy.

AMPD1	1 795 bp [123]
AMPD2	2 938 bp [124]
AMPD3	3 061 bp [125]

Vyhodnocení NESTED PCR bylo provedeno pomocí elektroforézy v 1,2 % agarosovém gelu.

7.2.9 Potlačení exprese *AMPD3* genu RNA interferencí

Za účelem analýzy vlivu erytrocytární izoformy AMP deaminasy na K562 linii byly připraveny buňky se sníženou expresí *AMPD3*. Té bylo sodáhnuto způsobem RNA interference prostřednictvím shRNA navrženou na 3' UTR cílové mRNA. Konstrukt byl vnesen způsobem stabilní transfekce, při kterém byly použity Lentivirové částice nesoucí expresní kazetu kódující shRNA a selekční kazetu rezistence vůči puromycinu. Transfekce byla provedena podle pokynů výrobce (Santa Cruz Biotechnology, USA) za pomoci polykationtu polybrenu, který eliminuje náboj na povrchu buněk, a tak usnadňuje interakci virových částic s buňkami. V experimentu byly použity dvě koncentrace polybrenu (3 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versus dva titry virových částic (5 a 15 μl , resp. 25 000 a 75 000 virových částic na 1 ml buněčné suspenze obsahující 230 000 buněk). Inkubace buněk probíhala 1 den, poté byly

selektovány puromycinem o výsledné koncentraci $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$, která byla posléze navyšována na $1 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Měření aktivity AMP deaminasy byla provedena analýza, do jaké míry byla jednotlivých transfektantů snižená exprese genu *AMPD3*.

7.3 Výsledky

7.3.1 Optimalizace přípravy buněčných extraktů

Úspěšnost dezintegrace buněk byla posuzována podle výtěžku proteinů, popř. podle aktivity AMP deaminasy, a byla testována na K562 buňkách. Nejméně účinná byla sonikace, při které byl průměrný výtěžek proteinů okolo $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, i přes použití škály amplitud a různě dlouhého času sonikace.

Mražením a rozmrazováním bylo dosaženo průměrně $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteinů, ke kterému stačily již dva cykly.

Extrakce pomocí detergentů se ukázala jako nejlepší z hlediska výtěžku proteinů, který byl v případě Tritonu-X 100 průměrně okolo $6,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, v případě detergentu CHAPS $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

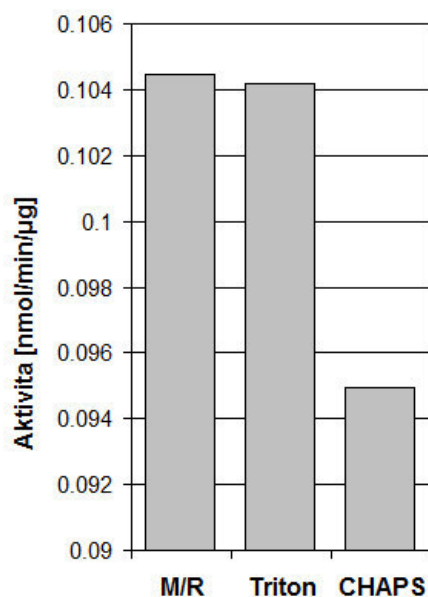
Metody mražení a rozmrazování a lýze pomocí detergentů byly porovnány také podle aktivity AMP deaminasy, viz Obr. 12. Nejvyšších hodnot aktivit bylo dosaženo při buněčné extrakci pomocí Tritonu-X 100 a metodou mražení a rozmrazování. Jako nejvhodnější lýzační postup byla zvolena metoda lýze pomocí Tritonu-X 100.

7.3.2 Stanovení enzymové aktivity

Podmínky měření byly optimalizovány z hlediska pH, času, typu pufru a množství přídatku proteinů porovnáním enzymových aktivit.

Na Obr. 13 je porovnání enzymových aktivit, které byly měřeny při pH 6-8 u buněk K562 a HL-60. Podle těchto výsledků bylo považováno za optimální pH u obou linií hodnota 7.

Vliv pufru byl u buněk K562 zhodnocen podle enzymových aktivit v prostředí pufru obsahujícího imidazol nebo HEPES. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 14 a vyplývá z nich, že pro měření aktivity je vhodnější pufr obsahující HEPES, který byl pak nadále používán namísto výchozího imidazolového pufru (zvolen na základně literatury), který



Obr. 12: Porovnání metod mražení a rozmrazování (M/R) a lýze pomocí detergentů Triton-X 100 a CHAPS podle aktivity AMP deaminasy. Nejvyšších hodnot aktivit bylo dosaženo při buněčné extrakci pomocí Tritonu-X 100 a metodou mražení a rozmrazování.

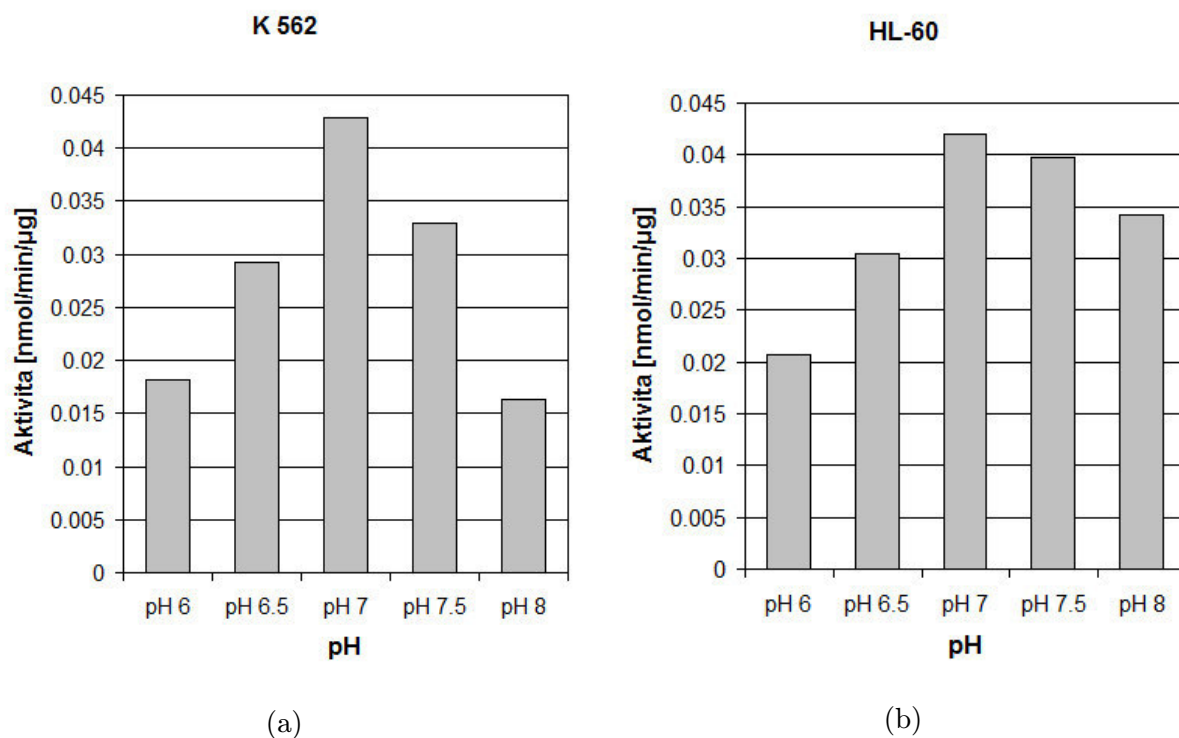
navíc také po zamražení vzorku způsoboval precipitaci, narozdíl od pufr obsahujícího HEPES.

Jako nejvhodnější časový interval pro reakci bylo zvoleno 30 min, což se jevilo jako nejdélší možný interval, při kterém byl přírůstek IMP blízko lineárnímu stavu, viz Obr. 15.

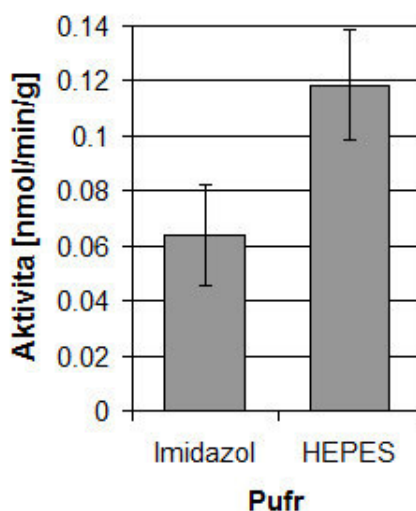
Dále byl testován vliv množství přidávaných proteinů do reakční směsi na enzymovou aktivitu. Jako nejvhodnější bylo považováno co nejnižší množství, při kterém již probíhala konstantní rychlost reakce, v tomto případě bylo zvoleno 10 μg , viz Obr. 16.

Účinek inhibitoru 2'-deoxycoformycinu na aktivitu AMP deaminasy byl studován přímo přidáním inhibitoru do reakční směsi a dále také po určité době inkubace s buňkami. Vliv přímého inhibičního působení 2'-deoxycoformycinu v koncentracích 1, 3 a 10 $\mu\text{mol/l}$ je znázorněn na Obr. 17. Při koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ došlo k významnějšímu poklesu v aktivitě přibližně o 32 %, v případě K562 a v případě HL-60 o 44 %.

Dále byl proveden experiment, kdy byl nejprve inhibitor po určitou dobu inkubován s buňkami a teprve pak bylo provedeno měření aktivity. Byly použity koncentrace 3 a 10 $\mu\text{mol/l}$ a inkubace trvala 3 h. Protože došlo ke stejnému poklesu aktivity, byl další experiment proveden již pro koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$, ve kterém byl testován vliv 2'-deoxycoformycinu v průběhu 1-24 h, viz Obr. 18. Bylo zaznamenáno, že aktivita se s časem snižovala a největší pokles byl v případě 24 h inkubace, kdy aktivita klesla o 32 % u K562

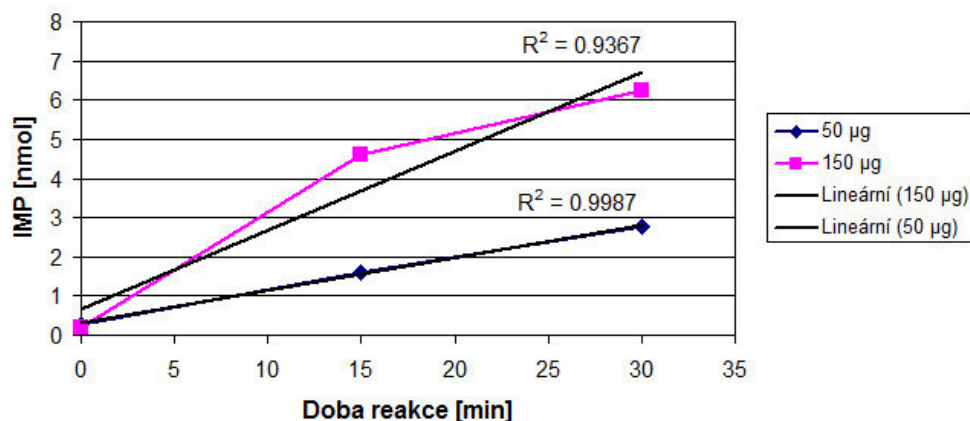


Obr. 13: Vliv pH na aktivitu AMP deaminasy u buněk (a) K562 a (b) HL-60. Měření probíhalo v rozmezí pH 6-8. Optimální pH bylo u obou linií 7.

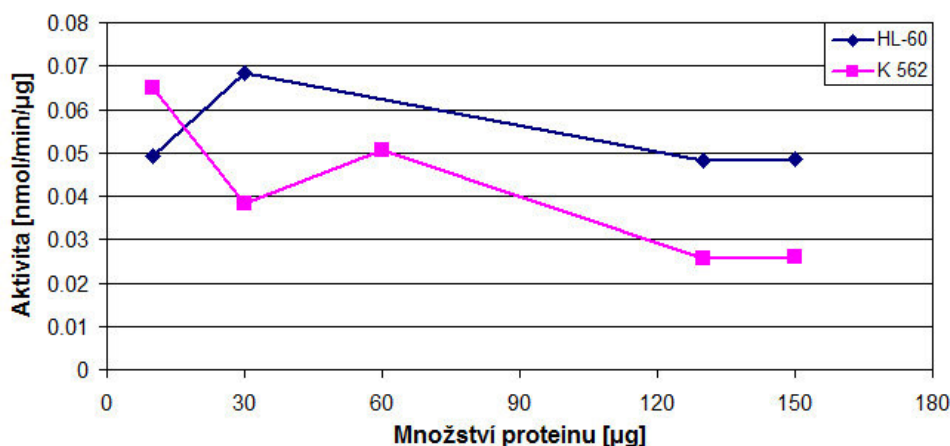


Obr. 14: Vliv složení pufru na aktivitu AMP deaminasy u buněk K562. Enzymová aktivita je v prostředí pufru obsahující HEPES vyšší než v případě pufru s imidazolem a tento rozdíl je signifikantní ($p < 0,05$). Chybové úsečky představují \pm standardní odchylku.

a o 24,5 % u HL-60 buněk. Zřejmě tedy k inhibičnímu účinku přispívaly i metabolizované formy inhibitoru.



Obr. 15: Průběh přírůstku IMP měřený pro přidavek proteinů 50 a 150 µg do reakce. Jako nejvhodnější časový interval bylo zvoleno 30 min, což byl nejdelší možný interval, při kterém byl přírůstek IMP blízko lineárnímu stavu. Křivky jsou proloženy lineární regresí a u obou je uveden koeficient determinace (R^2).



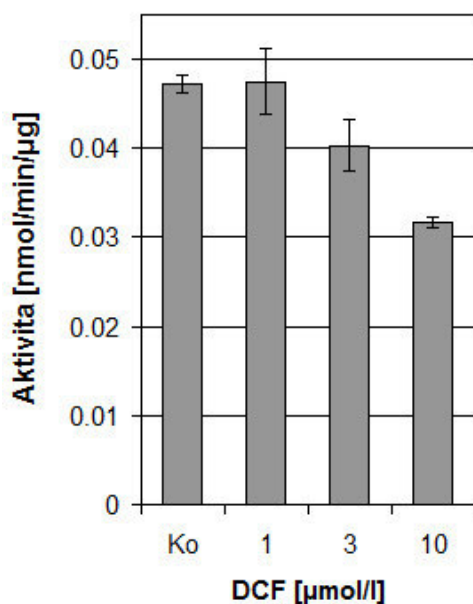
Obr. 16: Vliv množství přidavku proteinů do reakční směsi na enzymovou aktivitu u K562 a HL-60 buněk. Jako optimální byla zvolena hodnota 10 µg.

7.3.3 Vliv 2'-deoxycoformycinu na viabilitu buněk

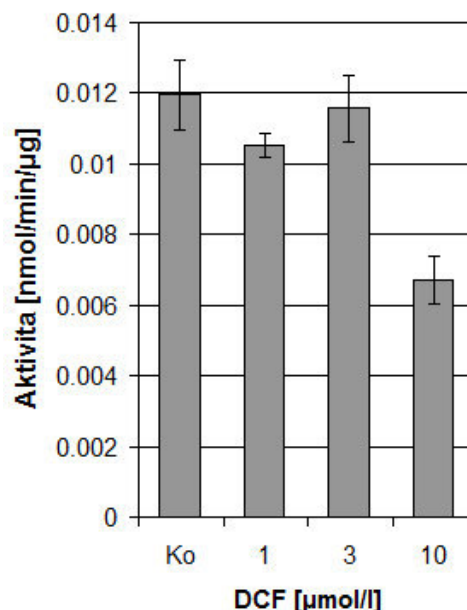
Po vystavení buněk různým koncentracím 2'-deoxycoformycinu nedošlo ke snížení viability. 2'-deoxycoformycin v rozsahu 0,1 - 100 µmol/l tedy není pro K562 linii cytotoxický.

7.3.4 Izolace RNA, reverzní transkripce a amplifikace cDNA o plné délce

Vyizolovaná RNA nebyla kontaminovaná ($A_{260}/A_{280} = 2$) a měla koncentraci 460,16 ng/µl. Kvalita RNA byla posouzena po elektroforetické separaci podle přítomnosti pruhů pro 28S a 18S rRNA a jejich velikostního poměru, který je v případě neporušené RNA 2:1. Z



(a)



(b)

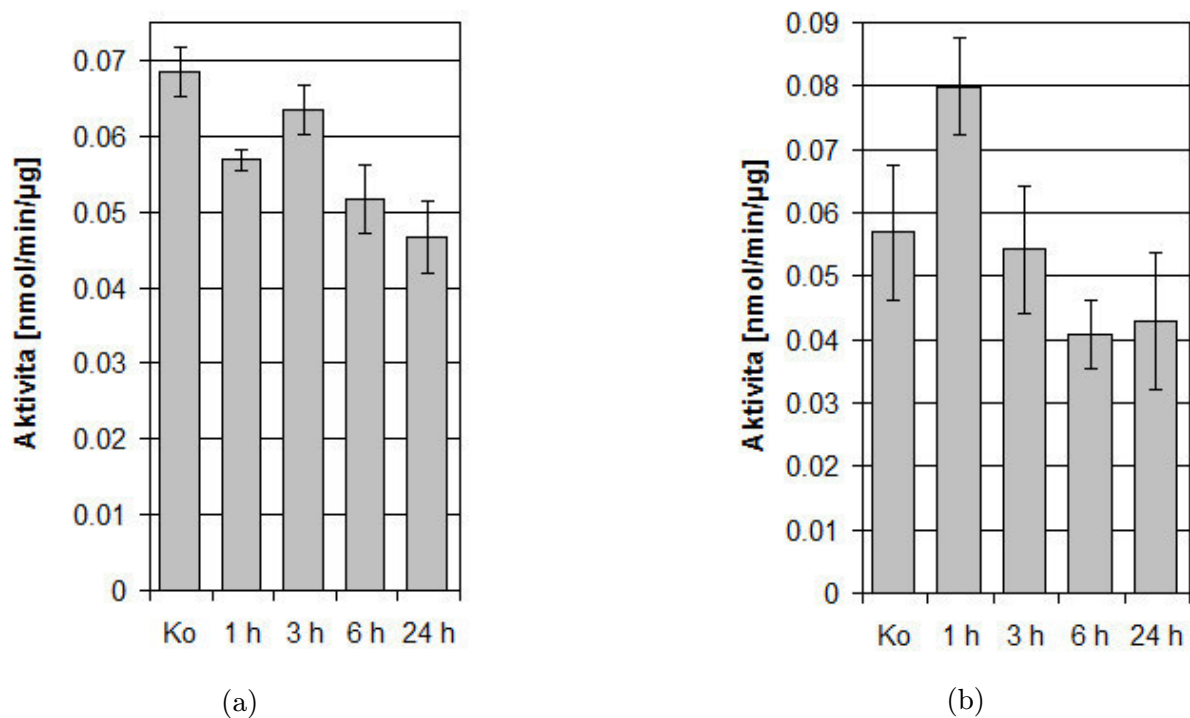
Obr. 17: Účinek 2'-deoxycoformycinu (DCF) v koncentraci 1, 3 a 10 $\mu\text{mol/l}$ na aktivitu AMP deaminasy po přidání do reakční směsi a porovnání s kontrolou. Experiment proveden pro buňky K562 (a) a HL-60 (b). (Ko; buňky bez přidavku inhibitoru.) Při koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ došlo k významnějšímu poklesu v aktivitě přibližně o 32 %, v případě K562 a v případě HL-60 o 44 %. Chybové úsečky představují \pm standardní odchylku.

elektroforetogramu na Obr. 19 je vidět, že RNA byla neporušená a dobré kvality.

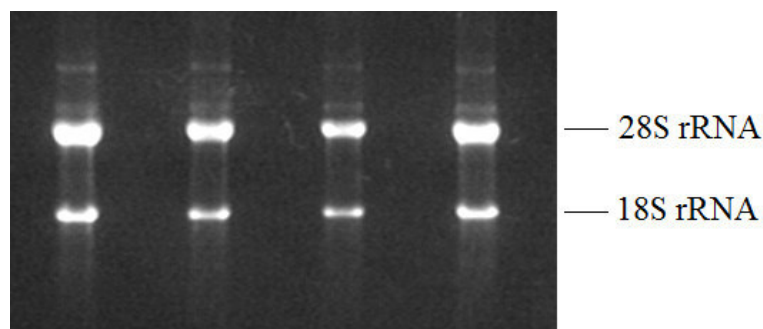
2 μg RNA byly dále použity pro reverzní transkripci a takto vzniklá cDNA byla následně použita pro NESTED PCR. Elektroforetickou analýzou PCR produktů a jejich porovnáním s očekávanou velikostí ampliconů (Tab. 3) bylo zjištěno, že v buňkách K562 jsou exprimovány geny *AMPD1* a *AMPD3*, nikoliv *AMPD2*, viz Obr. 20. Zjištění exprese *AMPD1* bylo překvapivé, vzhledem k tomu, že se tento gen typicky exprimuje ve svalových buňkách. Při amplifikaci mRNA *AMPD1* na úrovni cDNA vzniklo více PCR produktů, protože na gelu jsou kromě výraznějšího pruhu o očekávané velikosti (1 795 bp) také přítomny další tři slabé pruhy. Mohlo by se jednat o různé varianty alternativního sestřihu. Pro mRNA *AMPD2* na úrovni cDNA nevznikl žádný PCR produkt a pro gen *AMPD3* byl specificky amplifikován úsek o očekávané velikosti (3 061 bp).

7.3.5 Potlačení exprese *AMPD3* genu RNA interferencí

Měření aktivitu AMP deaminasy bylo zhodnoceno, do jaké míry došlo k potlačení exprese *AMPD3* genu u jednotlivých transfektantů. Výsledky jsou graficky znázorněny na Obr. 21. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u buněk s koncentrací polybrenu 3 $\mu\text{g/ml}$ v

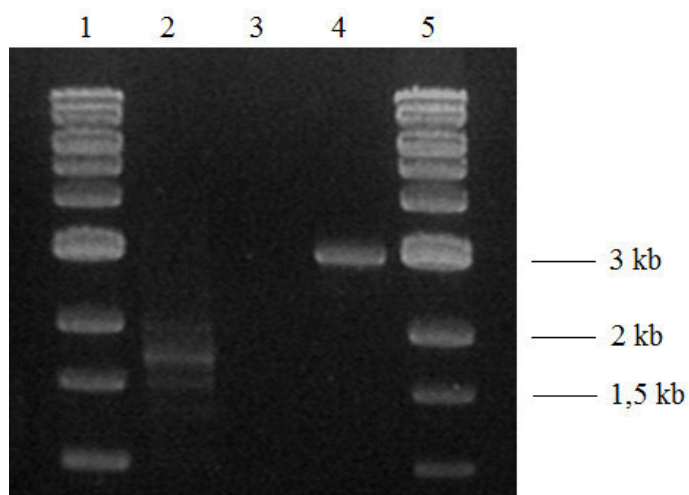


Obr. 18: Účinek 2'-deoxycoformycinu (DCF) v koncentraci $3\ \mu\text{mol/l}$ na aktivitu AMP deaminasy po inkubaci s buňkami. Inhibitor byl nejprve po dobu 1, 3, 6 a 24 h inkubován s buňkami a teprve pak bylo provedeno měření aktivity. Kontrolu (Ko) představují neovlivněné buňky. Provedeno pro buňky K562 (a) a HL-60 (b). Největší pokles v aktivitě byl zaznamenán po 24 h inkubaci, kdy aktivita klesla o 32 % u K562 a o 31 % u HL-60 buněk. Chybové úsečky představují \pm standardní odchylku.

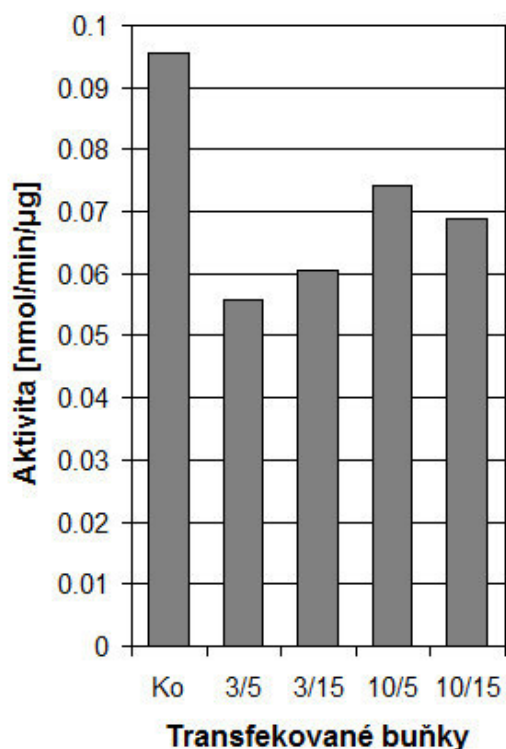


Obr. 19: Elektroforetogram vyizolované RNA. Dva výrazné pruhy představují 28S a 18S rRNA, jejichž vzájemný velikostní poměr je přibližně 2:1, což značí RNA dobré kvality.

kombinaci s $5\ \mu\text{l}$ titrem viru. Enzymová aktivita byla oproti kontrole snížena o 41,8 %. Naopak k nejmenšímu snížení aktivity došlo u transfektantů s koncentrací polybrenu $10\ \mu\text{g/ml}$ v kombinaci s $5\ \mu\text{l}$ titrem viru (aktivita snížena o 22,5 %).



Obr. 20: *Elektroforetogram PCR produktů.* V krajních drahách (1, 5) je standard molekulové hmotnosti, v drahách 2, 3 a 4 jsou postupně vzorky PCR produktů pro *AMPD1*, *AMPD2* a *AMPD3*. Při amplifikaci mRNA *AMPD1* na úrovni cDNA vzniklo více PCR produktů, protože v dráze je vidět kromě výraznějšího pruhu o očekávané velikosti (1 795 bp) také přítomnost dalších tří slabých pruhů; mohlo by se jednat o různé varianty alternativního sestřihu. Pro mRNA *AMPD2* na úrovni cDNA nevznikl žádný PCR produkt a pro mRNA *AMPD3* na úrovni cDNA byl specificky amplifikován úsek o očekávané velikosti (3 061 bp).



Obr. 21: *Aktivita AMP deaminasy u transfekovaných buněk.* Označení jednotlivých transfektantů vychází z použité koncentrace polybrenu / titru viru. Ko představuje kontrolní populaci netransfekovaných buněk. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u buněk 3/5, u kterých byla enzymová aktivita snížena o 27,1 %.

8 Diskuze

V rámci této práce byla v naší laboratoři adaptována metoda pro stanovení aktivity AMP deaminasy u buněk K562 a HL-60. Byla použita metoda nepřímého stanovení kinetickou metodou na základě rychlosti, jakou enzym katalyzuje přeměnu substrátu na produkt ve zvoleném časovém intervalu. Konkrétně byla specifická aktivita měřena na základě množství vzniklého IMP. Metoda byla optimalizována z hlediska pH, typu pufru, časového intervalu reakce a množství přidavku proteinů. První experimenty byly prováděny podle publikovaných postupů ([62]), bylo ale zjištěno, že běžně používaný pufr na bázi imidazolu není vhodný, protože po zamražení vzorku vznikají proteinové precipitáty. Byl proto vyzkoušen pufr obsahující HEPES, který po zamražení vzorku nezpůsobil precipitaci a hlavně měl příznivější dopad na aktivitu AMP deaminasy ($p < 0,05$). Možný důvod by mohl být v samotném imidazolu, který má chelatační vlastnosti, a tak může vyvázat určitou frakci zinečnatých kationtů, které jsou ovšem nutnou součástí fungujícího enzymu. Zjištěné optimální pH se pak shodovalo s hodnotami uváděnými v literatuře.

Dále byl stanoven vliv biochemického inhibitoru 2'-deoxycoformycinu na aktivitu AMP deaminasy a to v průběhu dvou experimentů: přímá inhibice přidáním do reakční směsi a vliv inhibitoru po inkubaci s buňkami. Bylo zjištěno, že při použité koncentraci $10 \mu\text{mol/l}$ došlo ke snížení aktivity zhruba o 30 % v případě přímé inhibice. V experimentu, kdy byl inhibitor v $3 \mu\text{mol/l}$ koncentraci inkubován s buňkami, docházelo ke snížení aktivity s časem a největší pokles byl zaznamenán po 24 h inkubaci (přibližně 30 %). V tomto případě tedy k inhibičnímu účinku přispívaly i metabolizované formy inhibitoru. Celkově bylo zjištěno, že 2'-deoxycoformycin není příliš účinným inhibitorem AMP deaminasy, nicméně jiné inhibitory nebylo možno vyzkoušet vzhledem k dostupnosti. 2'-deoxycoformycin byl dále prokázán jako necytotoxický v testovaném rozsahu $0,1 - 100 \mu\text{mol/l}$.

Následně byla provedena molekulárně-biologická inhibice pomocí RNA interference v experimentu, ve kterém byly připraveny buňky K562 se sníženou expresí *AMPD3*. U jedné populace transfektantů došlo ke snížení aktivity o 40 %, nicméně se jedná o nehomogenní populaci s určitým rozpětím míry snížení exprese, která vyplývá z konkrétních jednotlivých integračních událostí v buňkách. Bylo by tedy vhodné do budoucna tento experiment dokončit rozklonováním za účelem získání homogenní klonální populace buněk s co nejnižší aktivitou AMP deaminasy. Další možností, proč nemusí být tato metoda úspěšná, bylo překvapivé zjištění, že u K562 buněk je exprimován kromě *AMPD3* genu

také gen *AMPD1*, který se typicky exprimuje ve svalových buňkách. Exprese *AMPD1* u buněk K562 může být vysvětlena aneuploidíí buněčné linie. Ovšem hypotézu, že dochází k translaci funkčního izoenzymu M, by bylo vhodné ještě ověřit na úrovni proteinů. Expresní profil byl proveden pomocí amplifikace mRNA na úrovni cDNA o plné délce.

9 Závěr

V teoretické části práce byla vypracována rešerše zabývající se AMP deaminasou a metabolismem adeninových nukleotidů. Byla také zmíněna AMP-aktivovaná proteinkinasa, která s těmito tématy úzce souvisí. Na závěr byly shrnuty metody pro stanovení aktivity AMP deaminasy.

V praktické části byla adaptována metoda pro měření aktivity AMP deaminasy v rámci podmínek naší laboratoře. Dále byl touto metodou analyzován vliv dostupného inhibitoru 2'-deoxycoformycinu na enzymovou aktivitu a bylo zjištěno, že není příliš účinný. Proto byla následně provedena molekulárně-biologická inhibice pomocí RNA interference v experimentu, ve kterém byly připraveny buňky K562 se sníženou expresí *AMPD3*. Také byl proveden expresní profil genů AMP deaminasy u linie K562 a bylo zjištěno, že u těchto buněk je exprimován gen *AMPD3* a také překvapivě *AMPD1*.

10 Seznam použitých zkratek

AMP adenosinmonofosfát

ADP adenosindifosfát

ATP adenosintrifosfát

cDNA komplementární DNA

cAMP cyklický adenosinmonofosfát

CHAPS 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát

DNA deoxyribonukleová kyselina

EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová

FAD flavinadenindinukleotid

FMN flavinmononukleotid

GMP guanosinmonofosfát

GDP guanosinmonofosfát

GTP guanosinmonofosfát

HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IMP inosinmonofosfát

MOPS 3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina

MS/MS tandemová hmotnostní spektrometrie

NAD⁺ nikotinamidadenindinukleotid

NADP⁺ nikotinamidadenindinukleotidfosfát

PBS fosfátový pufr

PCR polymerázová řetězová reakce

RNA ribonukleová kyselina

shRNA small hairpin RNA

TAE Tris-Acetát-EDTA pufr

PPAT fosforibosylpyrofosfát amidotransferasa

GARS glycinamid ribonukleotid syntetasa

GAR Tfase glycinamid ribonukleotid transformylasa

AIRS aminoimidazol ribonukleotid syntetasa

FGAMS formylglycinamidin ribonukleotid syntetasa

CAIRS karboxyaminoimidazol ribonukleotid syntetasa

SAICARS sukcinylaminoimidazolkarboxamid ribonukleotid syntetasa

ASL adenylosukcinátlyasa

AICAR Tfase aminoimidazolkarboxamid ribonukleotid transformylasa

IMPDH inosinmonofosfát cyklohydrolasa

HGPRT hypoxantin-guanin fosforybosyltransferasa

APRT adeninfosforibosyltransferasa

PRPP fosforibosylpyrofosfát

11 Literatura

- [1] R. L. Sabina, J. L. Swain, E. W. Holmes. 1995. Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases: Myoadenylate deaminase deficiency. Vol. 2. 1769-1780. McGraw-Hill. New York.
- [2] I. M. De la Fuente et al. 2014. On the Dynamics of the Adenylate Energy System: Homeorhesis vs Homeostasis. PLoS One 9: 108676.
- [3] D. G. Hardie. 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8: 774-785.
- [4] D. G. Hardie. 2004. The AMP-activated protein kinase pathway: new players upstream and downstream. Journal of Cell Science 117: 5479-5487.
- [5] K. Kroll et al. 1993. Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. Circulation Research 73: 846-856.
- [6] C. Maldonado et al. 2013. Administration of exogenous adenosine triphosphate to ischemic skeletal muscle induces an energy-sparing effect: role of adenosine receptors. Journal of Surgical Research 181: 15-22.
- [7] E. W. Sutherland. 1970. On the biological role of cyclic AMP. The Journal of the American Medical Association 14: 1281-1288.
- [8] D. L. Nelson, M. M. Cox. 2008. Lehninger Principles of biochemistry. New York: WH Freeman.
- [9] D. G. Hardie. 2011. Signal transduction: How cells sense energy. Nature 472: 176-177.
- [10] P. Dzeja, A. Terzic. 2009. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. International Journal of Molecular Sciences 10: 1729-1772.
- [11] Y. Natsumeda et al. 1984. Enzymic capacities of purine de Novo and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues. Cancer Research 44: 2475-2479.
- [12] G. Weber et al. 1983. Salvage capacity of hepatoma 3924A and action of dipyrindamole. Advances in Enzyme Regulation 21: 53-69.
- [13] R. W. Watts. 1983. Some regulatory and integrative aspects of purine nucleotide biosynthesis and its control: an overview. Advances in Enzyme Regulation 21: 33-51.
- [14] W. J. Howard, L. A. Kerson, S. H. Appel. 1970. Synthesis de novo of purines in slices of rat brain and liver. Journal of Neurochemistry 17: 121-123.
- [15] H. Zhao et al. 2013. The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans. Chemical communications 49: 4444-4452.

- [16] J. A. Boyle et al. 1972. Effects of nicotinic acid on human fibroblast purine biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 269: 179-183.
- [17] J. L. Smith. 1998. Glutamine PRPP amidotransferase: snapshots of an enzyme in action. *Current Opinion in Structural Biology* 8: 686-694.
- [18] J. L. Smith et al. 1994. Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science* 264: 1427-1433.
- [19] M. S. Hershfield, J. E. Seegmiller. 1976. Regulation of de novo purine biosynthesis in human lymphoblasts. Coordinate control of proximal (rate-determining) steps and the inosinic acid branch point. *The Journal of Biological Chemistry* 251: 7348-7354.
- [20] M. Welin et al. 2013. Substrate specificity and oligomerization of human GMP synthetase. *Journal of Molecular Biology* 425: 4323-4333.
- [21] O. H. Spivey, J. Ovadi. 1999. Substrate channeling. *Methods* 19: 306-321.
- [22] S. An et al. 2008. Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science* 4: 103-106.
- [23] T. Yamaoka et al. 1997. Amidophosphoribosyltransferase limits the rate of cell growth-linked de novo purine biosynthesis in the presence of constant capacity of salvage purine biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 17719-17725.
- [24] H. A. Simmonds, J. A. Duley, P. M. Davies. 1991. Analysis of purines and pyrimidines in blood, urine and other physiological fluids. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. Wiley-Liss, New York: 397-424.
- [25] M. Lesch, W. L. Nyhan. 1964. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *The American Journal of Medicine* 36: 561-570.
- [26] W. L. Nyhan. 2005. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism* 86: 25-33.
- [27] J. Jaeken, G. Van den Berghe. 1984. An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet* 2: 1058-1061.
- [28] S. Marie et al. 2004. AICA-ribosiduria: a novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC. *The American Journal of Human Genetics* 74: 1276-1281.
- [29] D. S. Wishart et al. 2006. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Research* 34: 668-672.
- [30] W. B. Parker. 2009. Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chemical Reviews* 109: 2880-2893.
- [31] C. J. Allegra et al. 1987. Evidence for direct inhibition of de novo purine synthesis in human MCF-7 breast cells as a principal mode of metabolic inhibition by methotrexate. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 13520-13526.

- [32] AMP. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Adenosine_monophosphate#/media/File:Adenosinmonophosphat_protoniert.svg
- [33] Inosinic acid. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Inosinic_acid#/media/File:Inosinic_acid_structure.svg
- [34] Guanosine monophosphate. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Guanosine_monophosphate#/media/File:GMP_chemical_structure.png
- [35] Purine. Dostupné z: <http://de.wikipedia.org/wiki/Purine>
- [36] N. Ogasawara et al. 1982. AMP deaminase isoenzymes in human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 714: 298-306.
- [37] A. Raggi et al. 1970. Interaction of rat muscle AMP aminohydrolase with chelating agents and metal ions. *FEBS Letters* 10: 101-104.
- [38] R. Marquetant et al. 1987. Evidence for sequential expression of multiple AMP deaminase isoforms during skeletal muscle development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 2345-2349.
- [39] D. K. Mahnke-Zizelman et al. 1996. Cloning, sequence and characterization of the human AMPD2 gene. Evidence for transcriptional regulation by two closely spaced promoters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1308: 122-132.
- [40] M. T. Bausch-Jurken et al. 1992. Molecular cloning of AMP deaminase isoform L. *Journal of Biological Chemistry* 267: 22407-22413.
- [41] D. K. Mahnke-Zizelman, R. L. Sabina. 1992. Cloning of human AMP deaminase isoform E cDNAs. *Journal of Biological Chemistry* 267: 20866-20877.
- [42] N. Ogasawara et al. 1984. Distribution of amp deaminase isozymes in various human blood cells. *International Journal of Biochemistry* 16: 269-273.
- [43] B. Norman, B. Glenmark, E. Jansson. 1995. Muscle AMP deaminase deficiency in 2 % of a healthy population. *Muscle Nerve* 18: 239-241.
- [44] Y. Yamada, H. Goto, N. Ogasawara. 1994. A point mutation responsible for human erythrocyte AMP deaminase deficiency. *Human Molecular Genetics* 3: 331-334.
- [45] A. G. Chapman, A. L. Miller, D. E. Atkinson. 1976. Role of the adenylate deaminase reaction in regulation of adenine nucleotide metabolism in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Research* 36: 1144-1150.
- [46] J. M. Lowenstein. 1972. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiological Reviews* 52: 382-414.
- [47] K. Sahlin, S. Broberg. 1990. Adenine nucleotide depletion in human muscle during exercise: causality and significance of AMP deamination. *International Journal of Sports Medicine* 11: 62-67.
- [48] R. L. Sabina et al. 1980. Disruption of the purine nucleotide cycle: A potential explanation for muscle dysfunction in myoadenylate deaminase deficiency. *Journal of Clinical Investigation* 66: 1419-1423.

- [49] R. L. Sabina et al. 1984. Myoadenylate deaminase deficiency: functional and metabolic abnormalities associated with disruption of the purine nucleotide cycle. *Journal of Clinical Investigation* 73: 720-730.
- [50] M. Yoshino, K. Murakami. 1982. AMP deaminase reaction as a control system of glycolysis in yeast. Activation of phosphofructokinase and pyruvate kinase by the AMP deaminase-ammonia system. *The Journal of Biological Chemistry* 257: 2822-2828.
- [51] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. 2002. *Biochemistry*, 5th edition. W. H. Freeman and Co. New York.
- [52] T. W. Traut. 2007. *Allosteric regulatory enzymes*. Springer. New York.
- [53] K. L. Smiley Jr., C. H. Suelter. 1967. *The Journal of Biological Chemistry* 242: 1980-1981.
- [54] G. Ronca, A. Raggi, S. Ronca-Testoni. 1972. Muscle AMP aminohydrolase. X. Effect of anions on the kinetic and regulatory properties of the rat muscle enzyme. *The Italian journal of biochemistry* 21: 305-321.
- [55] D. Martini et al. 2001. Regulation of skeletal muscle AMP deaminase: lysine residues are critical for the pH-dependent positive homotropic cooperativity behaviour of the rabbit enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544: 123-132.
- [56] Y. P. Lee. 1957. 5'-Adenylic acid deaminase. III. Properties and kinetic studies. *The Journal of Biological Chemistry* 227: 999-1007.
- [57] V. S. Hermann, G. Josepovits. 1949. Myosin as Adenylic Acid Deaminase. *Nature* 164: 845-846.
- [58] G. Nikiforuk, S. P. Colowick. 1956. The purification and properties of 5'-Adenylic acid deaminase from muscle. *The Journal of Biological Chemistry* 219: 119-129.
- [59] E. J. Conway, R. Cooke. 1939. The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. *Biochemical Journal* 33: 479-492.
- [60] T. J. Wheeler, J. M. Lowenstein. 1979. Adenylate deaminase from rat muscle. Regulation by purine nucleotides and orthophosphate in the presence of 150 mM KCl. *The Journal of Biological Chemistry* 254: 8994-8999.
- [61] T. J. Wheeler, J. M. Lowenstein. 1980. Effects of pyrophosphate, triphosphate, and potassium chloride on adenylate deaminase from rat muscle. *Biochemistry* 19: 4564-2567.
- [62] J. W. E. Rush, P. C. Tullson, R. L. Terjung. 1998. Molecular and kinetic alterations of muscle AMP deaminase during chronic creatine depletion. *American Journal of Physiology* 274: 465-471.
- [63] E. K. Tovmasian et al. 1990. Phosphorylation of the skeletal muscle AMP-deaminase by protein kinase C. *FEBS Letters* 259: 321-323.
- [64] J. K. Thakkar et al. 1993. Modulation of mammalian cardiac AMP deaminase by protein kinase C-mediated phosphorylation. *Biochemical Journal* 291: 523-527.

- [65] B. Korzeniewski. 2006. AMP deamination delays muscle acidification during heavy exercise and hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 3057-3066.
- [66] D. J. Merkler et al. 1989. AMP deaminase from yeast. Role in AMP degradation, large-scale purification, and properties of the native and proteolyzed enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 21422-21430.
- [67] I. Mineo et al. 1990. A novel pathway for alternative splicing: identification of an RNA intermediate that generates an alternative 59splice donor site not present in the primary transcript of AMPD1. *Molecular and Cellular Biology* 10: 5271-5278.
- [68] D. K. Wilson, F. B. Rudolph, F. A. Quijcho. 1991. Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* 252: 1278-1284.
- [69] A. Stankiewicz. 1981. AMP-deaminase from human skeletal muscle. subunit structure, amino-acid composition and metal content of the homogenous enzyme. *International Journal of Biochemistry* 13: 1177-1183.
- [70] R. L. Sabina et al. 1990. Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 9423-9433.
- [71] I. Mineo, E. W. Holmes. 1991. Exon recognition and nucleocytoplasmic partitioning determine AMPD1 alternative transcript production. *Molecular and Cellular Biology* 11: 5356-5363.
- [72] P. J. Isackson et al. 2005. Myoadenylate deaminase deficiency caused by alternative splicing due to a novel intronic mutation in the AMPD1 gene. *Molecular Genetics and Metabolism* 86: 250-256.
- [73] R. L. Sabina et al. 1992. Molecular analysis of the myoadenylate deaminase deficiencies. *Neurology* 42: 170-179.
- [74] J. C. Rubio et al. 2005. Frequency of the C34T mutation of the AMPD1 gene in world-class endurance athletes: does this mutation impair performance? *Journal of Applied Physiology* 98: 2108-2112.
- [75] H. Morisaki et al. 1993. Alternative splicing: a mechanism for phenotypic rescue of a common inherited defect. *Journal of Clinical Investigation* 91: 2275-2280.
- [76] M. Gross, S. Reiter, N. Zollner. 1989. Metabolism of D-ribose administered continuously to healthy persons and to patients with myoadenylate deaminase deficiency. *Klinische Wochenschrift* 67: 1205-1213.
- [77] K. W. Rundell, P. C. Tullson, R. L. Terjung. 1992. Altered kinetics of AMP deaminase by myosin binding. *American Journal of Physiology* 263: 294-299.
- [78] D. K. Mahnke-Zizelman, R. L. Sabina. 2001. Localization of N-terminal sequences in human AMP deaminase isoforms that influence contractile protein binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285: 489-495.
- [79] R. S. Hundal et al. 2000. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 2063-2069.

- [80] D. Galuska et al. 1994. Effect of metformin on insulin-stimulated glucose transport in isolated skeletal muscle obtained from patients with NIDDM. *Diabetologia* 37: 826-832.
- [81] J. Ouyang, R. A. Parakhia, R. S. Ochs. 2011. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 1-11.
- [82] M. T. Bausch-Jurken, R. L. Sabina. 1995. Divergent N-terminal regions in AMP deaminase and isoform-specific catalytic properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 321: 372-380.
- [83] N. Akizu et al. 2013. AMPD2 regulates GTP synthesis and is mutated in a potentially treatable neurodegenerative brainstem disorder. *Cell* 154: 505-517.
- [84] S. Yun, C. H. Suelter. 1978. Human erythrocyte 5'-AMP aminohydrolase. Purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 253: 404-408.
- [85] D. K. Mahnke-Zizelman et al. 1996. Characterization of the human AMPD3 gene reveals that 5' exon usage is subject to transcriptional control by three tandem promoters and alternative splicing. *Biochimica et Biophysica Acta* 1306: 75-92.
- [86] R. L. Sabina, A. Waldenstrom, G. Ronquist. 2006. The contribution of Ca^{2+} -calmodulin activation of human erythrocyte AMP deaminase (isoform E) to the erythrocyte metabolic dysregulation of familial phosphofructokinase deficiency. *Haematologica* 91: 652-655.
- [87] R. Sasaki et al. 1976. Regulation of Human Erythrocyte AMP Deaminase by ATP and 2,3-Bisphosphoglycerate. *Agricultural and Biological Chemistry* 40: 1797-1803.
- [88] C. Frieden, L. C. Kurz, H. R. Gilbert. 1980. Adenosine deaminase and adenylylate deaminase: comparative kinetic studies with transition state and ground state analog inhibitors. *Biochemistry* 19: 5303-5309.
- [89] M. F. Siaw, M. S. Coleman. 1984. *In vitro* metabolism of deoxycoformycin in human T lymphoblastoid cells. Phosphorylation of deoxycoformycin and incorporation into cellular DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 9426-9433.
- [90] S. Cha, R. P. Agarwal, R. E. Parks Jr. 1975. Tight Binding Inhibitors-II Non-Steady-State Nature of Inhibition of Milk Xanthine Oxidase by Allopurinol and Alloxanthine and of Human Erythrocytic Adenosine Deaminase by Coformycin. *Biochemical Pharmacology* 24: 2187-2197.
- [91] S. R. Kasibhatla et al. 2001. AMP deaminase inhibitors. 5. Design, synthesis, and SAR of a highly potent inhibitor series. *Journal of Medicinal Chemistry* 44: 613-618.
- [92] B. C. Bookser. 2001. AMP Deaminase Inhibitors. 2. Initial Discovery of a Non-Nucleotide Transition-State Inhibitor Series. *Journal of Medicinal Chemistry* 43: 1495-1507.

- [93] S. D. Lindell, S. Maechling, R. L. Sabina. 2010. Synthesis and Biochemical Testing of 3-(Carboxyphenylethyl)imidazo[2,1-f][1,2,4]triazines as Inhibitors of AMP Deaminase. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 1: 286-289.
- [94] Pentostatin. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Pentostatin#/media/File:Pentostatin_structure.svg
- [95] R. Lage et al. 2008. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends in Molecular Medicine* 14: 539-549.
- [96] N. L. Dzamko, G. R. Steinberg. 2009. AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. *Acta Physiologica* 196: 115-127.
- [97] B. Kola et al. 2005. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 25196-25201.
- [98] S. A. Hawley et al. 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver, and identification of threonine-172 as the major site at which it phosphorylates and activates AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 27879-27887.
- [99] S. P. Davies et al. 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C α and native bovine protein phosphatase-2A C . *FEBS Letters* 377: 421-425.
- [100] D. G. Hardie. 2015. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology* 33: 1-7.
- [101] M. F. Green, K. A. Anderson, A. R. Means. 2011. Characterization of the CaMKKbeta-AMPK signaling complex. *Cellular Signalling* 23: 2005-1012.
- [102] D. G. Hardie. 1989. Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Progress in Lipid Research* 28: 117-146.
- [103] K. M. Habegger et al. 2012. AMPK enhances insulin-stimulated GLUT4 regulation via lowering membrane cholesterol. *Endocrinology* 153: 2130-2141.
- [104] G. D. Lopaschuk, J. Gamble. 1994. Acetyl-CoA carboxylase: an important regulator of fatty acid oxidation in the heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 72: 1101-1109.
- [105] N. Henin et al. 1995. Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *The FASEB Journal* 9: 541-546.
- [106] P. A. Lochhead et al. 2000. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49: 896-903.
- [107] K. Sakamoto, G. D. Holman. 2008. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 295: 29-37.

- [108] N. B. Ruderman et al. 2013. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 123: 2764-2772.
- [109] A. R. Young et al. 2006. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science* 119: 3888-3900.
- [110] J. Kim et al. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology* 13: 132-141.
- [111] S. Krishan, D. R. Richardson, S. Sahni. 2014. AMP kinase (PRKAA1). *Journal of Clinical Pathology* 67: 758-763.
- [112] A. Nakano et al. 2010. AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nature Cell Biology* 12: 583-590.
- [113] R. G. Jones et al. 2005. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular Cell* 18: 283-293.
- [114] J. Liang et al. 2007. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27^{kip1} phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology* 9: 218-224.
- [115] A. L. Chaney, E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry* 8: 130-132.
- [116] E. Kun, H. H. Loh, S. B. El Fiky. 1966. Control of ammonia formation from ATP in a multienzyme system of liver in presence of uncouplers of oxidative phosphorylation. *Molecular Pharmacology* 2: 481-490.
- [117] B. Ashby, C. Frieden. 1978. Adenylate deaminase. Kinetic and binding studies on the rabbit muscle enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 253: 8728-8735.
- [118] Analýza látek pomocí HPLC. Dostupné z: http://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Analyza_latek_pomoci_HPLC_Mevapox17102013.pdf
- [119] Schéma MS/MS. Dostupné z: <http://analytik.pharmaziestudenten-hd.de/ms/theorie/inhalt.htm>
- [120] T. M. Butler, A. Ziemiecki, R. R. Friis. 1990. Megakaryocytic differentiation of K562 cells is associated with changes in the cytoskeletal organization and the pattern of chromatographically distinct forms of phosphotyrosyl-specific protein phosphatases. *Cancer Research* 50: 6323-6329.
- [121] H. Neves et al. 1999. The nuclear topography of ABL, BCR, PML and RAR α genes: evidence of gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 93: 1197-1207.
- [122] S. J. Collins, R. C. Gallo, R. E. Gallagher. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270: 347-349.

- [123] Homo sapiens adenosine monophosphate deaminase 1 (AMPD1), transcript variant 1, mRNA (NCBI Reference Sequence: NM_000036.2). Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000036.2
- [124] Homo sapiens adenosine monophosphate deaminase 2 (AMPD2), transcript variant 1, mRNA (NCBI Reference Sequence: NM_004037.7). Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004037.7
- [125] Homo sapiens adenosine monophosphate deaminase 3 (AMPD3), transcript variant 3, mRNA (NCBI Reference Sequence: NM_001025390.1). Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001025390.1
- [126] R. J. Rolfes, H. Zalkin. 1988. Escherichia coli gene purR encoding a repressor protein for purine nucleotide synthesis. Cloning, nucleotide sequence, and interaction with the purF operator. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 19653-19661.
- [127] G. A. Dudley, R. L. Terjung. 1985. Influence of acidosis on AMP deaminase activity in contracting fasttwitch muscle. *American Journal of Physiology* 248: 43-50.
- [128] R. P. Agarwal et al. 1978. *Chemistry and Biology of Nucleosides and Nucleotides: Coformycin and Deoxycoformycin: Tight-binding Inhibitors of Adenosine Deaminase*. Academic Press. New York.
- [129] S. Ronca-Testoni, A. Raggi, G. Ronca. 1970. Muscle AMP aminohydrolase. III. A comparative study on the regulatory properties of skeletal muscle enzyme from various species. *Biochimica et Biophysica Acta* 198: 101-112.
- [130] D. E. Atkinson, G. M. Walton. 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 242: 3239-3241.
- [131] E. K. Spiegel, R. F. Colman, D. Patterson. 2006. Adenylosuccinate lyase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 89: 19-31.