

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Heterologní exprese a studium vlastností enzymu
polyaminoxidasy a její splicingové varianty z kukuřice**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Zuzana Mičková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	30. 7. 2012

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

V Olomouci dne 30. 7. 2012

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli RNDr. Ondřeji Plíhalovi, Ph.D za všestrannou pomoc a odborné vedení při tvorbě této bakalářské práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Zuzana Mičková
Název práce	Heterologní exprese a studium vlastností enzymu polyaminoxidasy a její splicingové varianty z kukuřice
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, oddělení molekulární biologie
Vedoucí práce	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Polyaminoxidasa z kukuřice je monomerický glykoprotein, který obsahuje 1 molekulu FAD jako kofaktor. Enzym je lokalizován v buněčných stěnách semenáčku kukuřice (ve výhoncích a kořenech) a katalyzuje oxidaci polyaminů sperminu a spermidinu a jejich acetylderivátů na sekundární aminoskupině za vzniku příslušného aminoaldehydu (spontánní cyklizace), propan-1,3-diaminu a peroxidu vodíku. Zkrácená forma kukuřičné polyaminoxidasy je genová forma vzniklá z alternativního setřihu s dosud neznámou funkcí, jejíž existence byla potvrzena na úrovni mRNA. Experimentální část práce je věnována přípravě konstruktů zkrácená mPAO ve vektoru pPICZαA, genetické transformaci kvasinek <i>Pichia pastoris</i> X33 tímto konstruktem a konstruktem mPAO ve vektoru pGAPZαA a měření enzymové aktivity rekombinantních enzymů mPAO a zkrácené formy enzymu. Pomocí metody Western blot jsem prokázala, že zkrácená forma mPAO v expresním médiu zcela chybí (nebo je přítomna jen ve velice nízké, nedetekovatelné koncentraci). V expresním médiu rovněž nebyla naměřena žádná enzymová aktivita zkrácené mPAO, na rozdíl od média, ve kterém byla exprimována plná forma mPAO.</p>
Klíčová slova	polyaminoxidasa z kukuřice, alternativní sestřih kukuřičné polyaminoxidasy, genetická transformace kvasinek, <i>Pichia pastoris</i> X33, rekombinantní enzym, enzymová aktivita
Počet stran	49

Počet příloh	0
Jazyk	Český

.

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Zuzana Mičková
Title	Heterologous expression and study of the properties of polyamine oxidase and its splicing variant from maize
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the region Haná for biotechnological and agricultural research
Supervisor	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
The year of presentation	2012
Abstract	<p>Polyamine oxidase from maize is monomeric glycoprotein, which contains 1 molecule of FAD as cofactor. The enzyme is localized in the cell walls of maize seedlings (in shoots and roots) and catalyzes the oxidation of polyamines spermine and spermidine and their acetyl-derivates at the secondary amino group to appropriate aminoaldehyde (spontaneous cyclization), 1,3-diaminopropane and hydrogen peroxide. Splicing variant of maize polyamine oxidase is the gene form with unknown function, which originates from alternative splicing. Its existence was confirmed at the mRNA level. The experimental part is devoted to the preparation of the construct coding for the short mPAO in the vector pPICZαA, genetic transformation of yeast <i>Pichia pastoris</i> X33 by this construct and mPAO construct (mPAO in the vector pGAPZαA) and measurement of enzyme activity of recombinant enzymes mPAO and short mPAO. Using Western blot method, I demonstrated, that in YPD medium, there was no detectable short form of mPAO. Accordingly, no enzymatic activity was measured in the expression medium. In contrast, significant enzymatic activity of the complete form of mPAO</p>

	was demonstrated.
Keywords	polyamine oxidase from maize, alternative splicing of maize polyamine oxidase, genetic modification of yeast, <i>Pichia pastoris</i> X33, recombinant enzyme, enzyme activity
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce	- 9 -
1 TEORETICKÁ ČÁST	- 10 -
1.1 Polyaminy.....	- 10 -
1.1.1 Biosyntéza polyaminů	- 11 -
1.2 Diaminoxidasa (DAO, E.C. 1. 4. 3. 6.).....	- 13 -
1.3 Polyaminoxidasa (PAO, E.C. 1. 5. 3. -).....	- 13 -
1.3.1 Rostlinná polyaminoxidasa	- 15 -
1.4 Hostitelský organismus pro expresi polyaminoxidasy a zkrácené polyaminoxidasy.....	- 21 -
1.4.1 <i>Pichia pastoris</i>	- 21 -
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 23 -
2.1 Materiál.....	- 23 -
2.1.1 Vektor, konstrukty a mikroorganismy	- 23 -
2.1.2 Komerční kity.....	- 23 -
2.1.3 Enzymy.....	- 23 -
2.1.4 Chemikálie	- 23 -
2.1.5 Další materiál	- 24 -
2.1.6 Přístroje.....	- 24 -
2.2 Metody	- 26 -
2.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	- 26 -
2.2.2 Agarosová elektroforéza	- 27 -
2.2.3 Ligace	- 27 -
2.2.4 Minipreparativní izolace plasmidové DNA	- 28 -

2.2.5	Maxipreparativní izolace plasmidové DNA.....	- 29 -
2.2.6	Ethanolová precipitace DNA.....	- 29 -
2.2.7	Štěpení DNA restrikčními enzymy.....	- 29 -
2.2.8	Genetická transformace Top10 elektrokompetentních buněk <i>E. coli</i>	- 30 -
2.2.9	Genetická transformace kvasinek <i>Pichia pastoris</i> X33.....	- 30 -
2.2.10	Expese proteinu.....	- 31 -
2.2.11	Měření enzymové aktivity rekombinantního enzymu.....	- 34 -
2.2.12	SDS-PAGE proteinová elektroforéza.....	- 35 -
2.2.13	Western blot.....	- 36 -
2.2.14	Příprava kultivačních médií.....	- 36 -
2.3	Výsledky.....	- 37 -
2.3.1	Příprava konstruktů zkrácené mPAO ve vektoru pPICZαA.....	- 37 -
2.3.2	Transformace kvasinek <i>Pichia pastoris</i> X33 vytvořeným konstruktem zkrácené mPAO ve vektoru pPICZαA a konstruktem mPAO ve vektoru pGAPZαA.....	- 41 -
2.3.3	Testování transformovaných kvasinek <i>Pichia pastoris</i> X33.....	- 42 -
3	ZÁVĚR	- 46 -
	Seznam použité literatury.....	- 47 -
	Seznam použitých zkratk.....	- 49 -

Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma charakteristika enzymu polyaminoxidasy se zaměřením na rostlinnou polyaminoxidasu a polyaminoxidasu z kukuřice.
- Příprava konstruktů pro zkrácenou variantu kukuřičné polyaminoxidasy.
- Genetická transformace kvasinek *Pichia pastoris* X33 konstruktem pro mPAO a konstruktem pro zkrácenou formu enzymu.
- Měření aktivity rekombinantních enzymů mPAO a zkrácené formy mPAO.
- Ověření přítomnosti rekombinantního enzymu zkrácené mPAO technikou Western blot.

1 Teoretická část

1.1 Polyaminy

Polyaminy jsou organické polykationty s malou molekulovou hmotností, které obsahují 2 a více primárních aminoskupin. Vyskytují se ve všech živých organismech a jsou zapojeny do mnoha biologických procesů (Takahashi & Kakehi, 2010).

Nejběžněji se vyskytujícími polyaminy jsou diamin putrescin, triamin spermidin a tetraamin spermin (Niitsu & Samejima, 1993). Jde o malé alifatické aminy, které se vyskytují jak v prokaryotických, tak eukaryotických buňkách (Wallace et al., 2003). Koncentrace putrescinu a spermidinu je obvykle vyšší než koncentrace sperminu, který se vyskytuje v nižším či pouze stopovém množství (Torrighiani et al., 1995). Dalšími významnými zástupci jsou diaminy kadeverin a propan-1,3-diamin, které se vyskytují v rostlinách a mikroorganismech (Niitsu & Samejima, 1993). Některé málo běžné polyaminy, jako je norspermidin, homospermidin, norspermin, homospermin či thermospermin se hojně vyskytují v extrémně termofilní bakterii *Thermus thermophilus* a můžeme je též najít v bakteriích, řasách, houbách, vyšších rostlinách a u živočichů (Cohen, 1998).

Polyaminy při fyziologickém pH vystupují jako polykationty, proto se můžou pevně vázat na negativní náboje některých buněčných složek (nukleové kyseliny, proteiny, kyselé fosfolipidy) (Cohen, 1998). V rostlinných buňkách se můžou polyaminy konjugovat přes amidovou vazbu za vzniku hydroxycinnamických kyselin a sloužit jako prekurzory pro některé sekundární metabolity, např. nikotin (Martin-Tanguy, 1997).

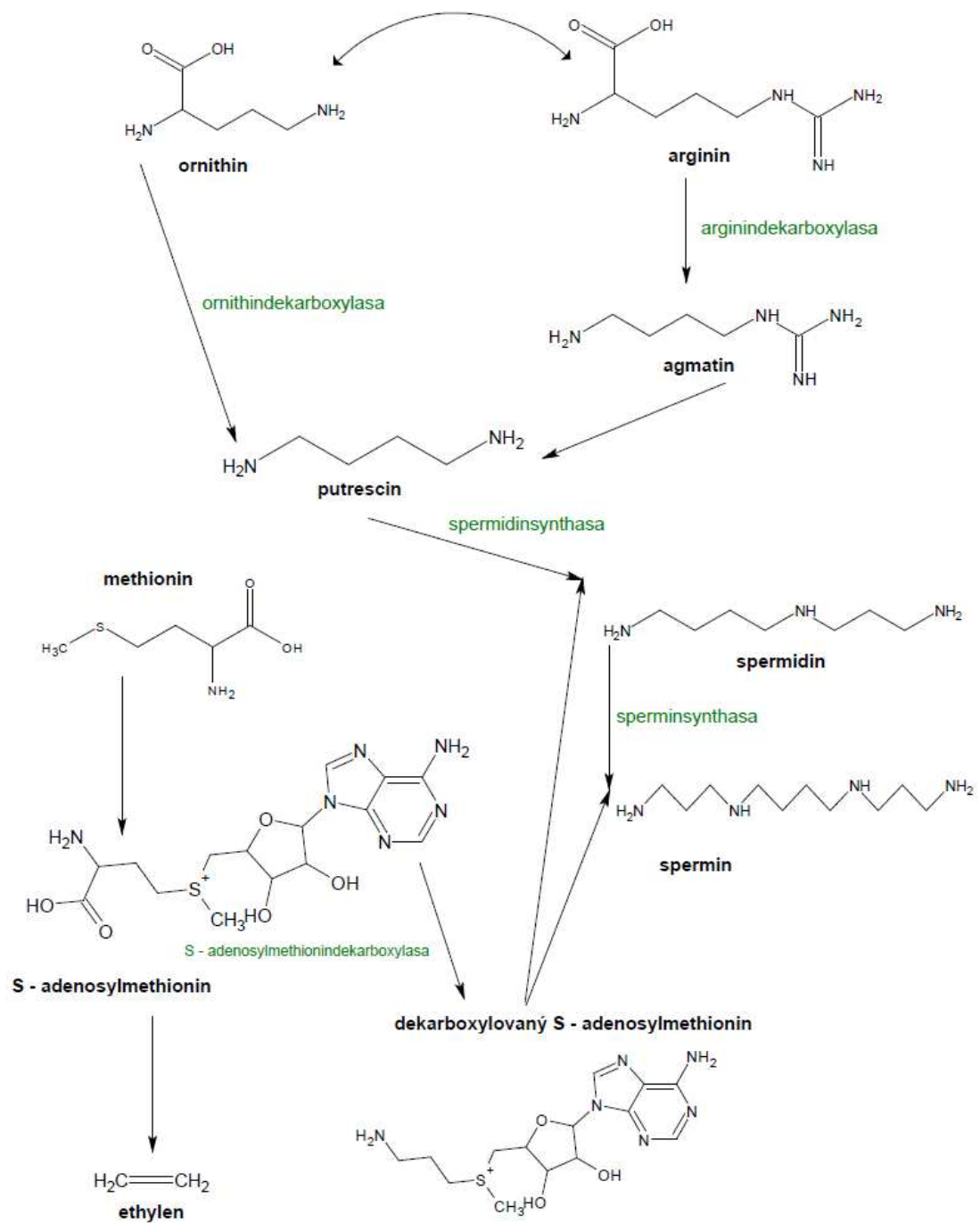
Polyaminy hrají důležitou roli při stabilizaci DNA a RNA, syntéze proteinů, stabilizaci membrán, modulaci iontových kanálků a ochraně proti kyslíkovým radikálům. Jsou podstatné pro buněčnou homeostázu, buněčný růst a tumorigenezi (Wallace et al., 2003). Rostlinné polyaminy jsou také zapojeny do různých procesů souvisejících s buněčným růstem a diferenciací (buněčná proliferace a diferenciace, morfogeneze, dormance a klíčení semen, indukce kvetení a vývoj květu, růst a zrání plodů, embryogeneze, senescence) (Kumar et al., 1997). Ve vyšších rostlinách jsou polyaminy zapojeny do reakcí na různé typy biotického a abiotického stresu (např. nedostatek draslíku, osmotický šok, sucho) a do interakcí mezi rostlinnými patogeny (Bouchereau et al., 1999).

Oxidace polyaminů (putrescin, kadeverin) na primární aminoskupině je katalyzována aminoxidasami s obsahem mědi. Produkty této reakce jsou příslušné aminoaldehydy, amoniak a peroxid vodíku. Oxidace polyaminů (spermin, spermidin) na sekundární aminoskupině je katalyzována polyaminoxidasami obsahujícími FAD jako kofaktor, přičemž vznikají příslušné aminoaldehydy, propan-1,3-diamin a peroxid vodíku (Tavladoraki et al., 1998).

Intracelulární polyaminy jsou regulovány různými homeostatickými procesy, jako biosyntéza polyaminů, jejich katabolismus a transport přes buněčnou membránu (Wallace et al., 2003).

1.1.1 Biosyntéza polyaminů

Polyaminy jsou syntetizovány z argininu a ornithinu za přítomnosti arginindekarboxylasy a ornithindekarboxylasy. Meziprodukt agmatin, který je syntetizován z argininu, je přeměněn na putrescin a ten dále na spermin či spermidin postupným přenesením aminopropylových skupin z dekarboxylovaného S-adenosylmethioninu za katalýzy specifickými synthasami sperminu a spermidinu. Aminopropylové skupiny pochází z methioninu, který je nejdříve přeměněn na S-adenosylmethionin a poté dekarboxylován v reakci katalyzované S-adenosylmethionindekarboxylasou. Dekarboxylovaný S-adenosylmethionin slouží jako aminopropylový donor. S-adenosylmethionin je společným prekursorem pro oba polyaminy a ethylen, přičemž biosyntézy těchto polyaminů jsou shodně regulovány S-adenosylmethionindekarboxylasou „Obr. 1“ (Kaur-Sawhney et al., 2003).



Obrázek 1 Biosyntéza polyaminů (vytvořeno podle Kaur-Sawhney et al., 2003).

1.2 Diaminoxidasa (DAO, E.C. 1. 4. 3. 6.)

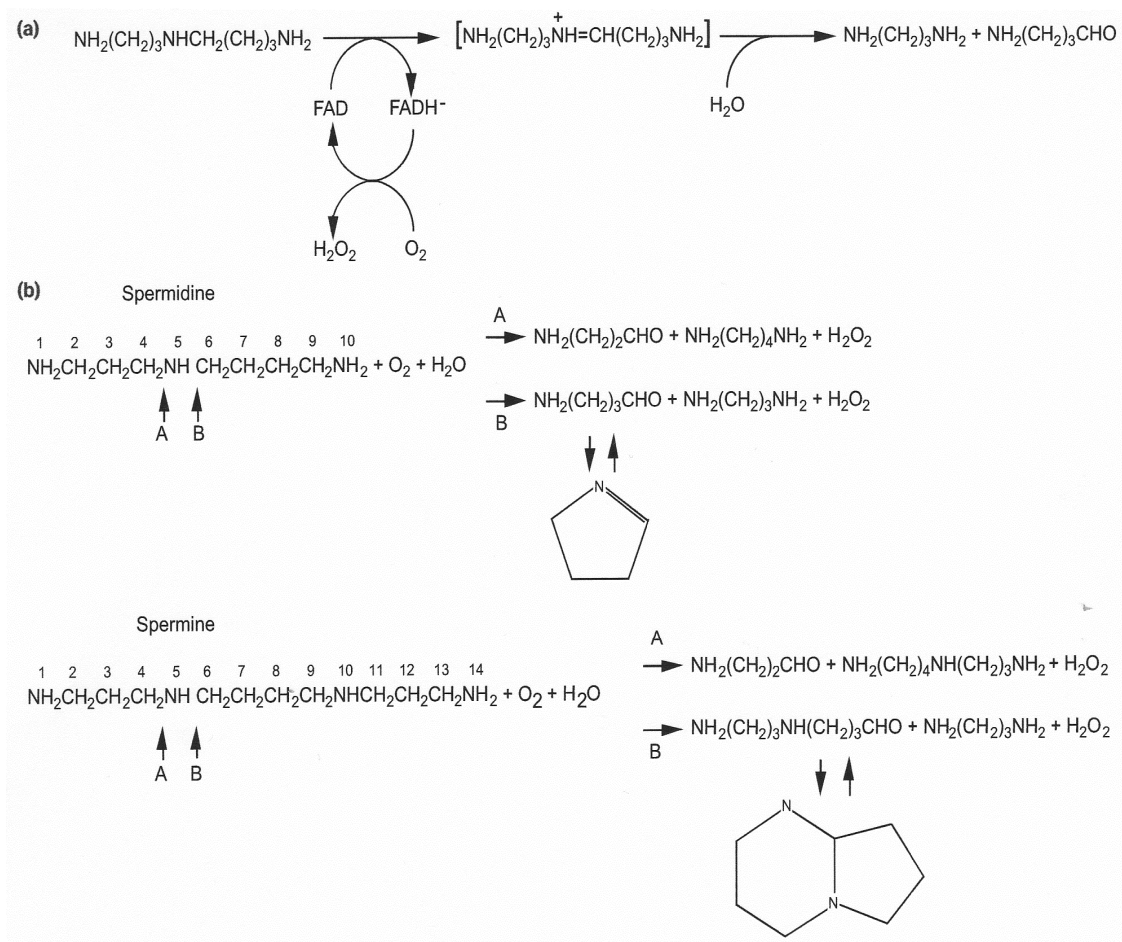
Diaminoxidasa je enzym obsahující měď. Byla purifikována a charakterizována u jednoděložných i dvouděložných rostlin, nejvíce se však vyskytuje u rostlin čeledi *Leguminosae* (bobovité), kde také vykazuje poměrně vysokou enzymovou aktivitu (Angelini et al., 1995). Diaminoxidasa katalyzuje oxidaci polyaminů na primární aminoskupině za vzniku příslušných aminoaldehydů, amoniaku a peroxidu vodíku (Tavladoraki et al., 1998).

1.3 Polyaminoxidasa (PAO, E.C. 1. 5. 3. -)

Polyaminoxidasa je enzym obsahující flavinadenindinukleotid (FAD) jako kofaktor. Katalyzuje oxidaci polyaminů na jejich sekundární aminoskupině. Polyaminoxidasy dělíme na základě jejich biochemických vlastností, metabolických produktů, fyziologických funkcí a původu (Tavladoraki et al., 1998).

Reakční produkty oxidativní deaminace závisí na zdroji enzymu (Šebela et al., 2001). Živočišná polyaminoxidasa katalyzuje oxidaci sperminu, spermidinu, nebo jejich acetylderivátů za vzniku příslušného aminoaldehydu, spermidinu nebo putrescinu a peroxidu vodíku a účastní se tedy zpětné přeměny polyaminů. Naproti tomu rostlinná a bakteriální polyaminoxidasa katalyzuje oxidaci sperminu a spermidinu, přičemž vzniká příslušný aminoaldehyd, propan-1,3-diamin a peroxid vodíku, je proto zapojena do konečného katabolismu polyaminů (Tavladoraki et al., 2006). V případě reakce katalyzované rostlinnou polyaminoxidasou dochází ke spontánní cyklizaci vzniklých aminoaldehydů na 1-pyrrolin a 1,5-diazabicyklo[4.3.0]nonan „Obr. 2 (b)“ (Šebela et al., 2001). Rostlinná a bakteriální PAO katalyzuje oxidaci uhlíku na vnitřní straně N^4 -dusíku sperminu a spermidinu. Živočišná PAO katalyzuje oxidaci uhlíku na vnější straně N^4 -dusíku acetylderivátů sperminu a spermidinu (Tavladoraki et al., 2006). Přes tyto rozdíly mají rostlinné, bakteriální i živočišné PAO v podstatě identické molekulové vlastnosti (Binda et al., 1999).

Celkovou reakci katalyzovanou polyaminoxidasou lze rozdělit na redukivní a oxidativní část. V redukivní části je redukován flavin při oxidaci polyaminů, v oxidativní části je redukován flavin reoxidován molekulovým kyslíkem za uvolnění peroxidu vodíku. Hydrolyzou nestálé iminosloučeniny vzniknou konečné produkty reakce „Obr. 2 (a)“ (Binda et al., 1999).



Obrázek 2 Substráty PAO. **(a)** Schéma oxidace spermidinu katalyzované kukuřičnou PAO. **(b)** Oxidace sperminu a spermidinu s reakčními produkty. Písmena A a B značí místo ataku enzymu u živočišné (A) a rostlinné či bakteriální (B) PAO (Binda et al., 1999).

1.3.1 Rostlinná polyaminoxidasa

Rostlinná PAO se vyskytuje převážně v buněčné stěně jednoděložných rostlin (Tavladoraki et al., 1998). PAO byla izolována zejména z rostlin čeledi *Gramineae* (lipnicovité). Přítomnost enzymu byla prokázána v ovsu (*Avena sativa*), kukuřici (*Zea mays*), ječmenu (*Hordeum vulgare*), pšenici (*Tritium aestivum*) a žitu (*Secale cereale*). Jediné 2 jednoděložné rostliny, ve kterých byla prokázána přítomnost PAO a nepatří do čeledi *Gramineae*, jsou vodní hyacint (*Eichhornia crassipes*) a lilie (*Lilium longiflorum*). Z dvouděložných rostlin se PAO zřejmě nachází ve vojtěšce (*Medicago sativa*) (Šebela et al., 2001).

Vysoká specifická aktivita PAO byla naměřena v extracelulárních tekutinách kukuřičných mezokotylů a u enzymu z primárních listů ova. Aktivita PAO je velmi nízká u odpočívajících semen a může být detekována až po započetí klíčení. V průběhu růstu se enzymová aktivita PAO ve výhonku souvisle zvyšuje (Šebela et al., 2001).

Rostlinná PAO katalyzuje oxidaci sperminu a spermidinu na 4-aminobutanal (cyklizace za vzniku 1-pyrrolinu) nebo 1-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal (cyklizace za vzniku 1,5-diazabicyklo[4.3.0]nonanu), propan-1,3-diamin a peroxid vodíku. Produkce H_2O_2 v buněčné stěně je možným prostředníkem různých fyziologických procesů jako je programovaná buněčná smrt, lignifikace, ztužování buněčné stěny nebo buněčná ochrana (Tavladoraki et al., 1998).

Hodnoty isoelektrických bodů (pI) rostlinných PAO spadají do kyselé oblasti. PAO dává typické absorpční spektrum oxidovaného flavoproteinu s absorpčními maximy 280, 380 a 450-460 nm. Čistá PAO má díky přítomnosti FAD žlutou barvu (Šebela et al., 2001).

1.3.1.1 Kinetické vlastnosti rostlinné polyaminoxidasy

Hodnota Michaelisovy konstanty (K_m) rostlinných PAO se pohybuje v rozmezí 10^{-5} - 10^{-6} M. pH optimum pro oxidaci substrátů je u různých druhů PAO rozdílné, ve většině případů se však pohybuje v rozsahu 5,5 - 6,8. Výjimkou je PAO z ječmene, jejíž pH optimum je 4,8 pro spermin a 8,0 pro spermidin (Šebela et al., 2001).

Rostlinné PAO jsou obvykle rovnoměrně aktivní se sperminem i spermidinem. Jedinou výjimkou je opět PAO z ječmene, která oxiduje spermin 14krát rychleji než spermidin (Šebela et al., 2001).

Specifická aktivita purifikovaného proteinu z cereálií obvykle dosahuje hodnot 100 - 1500 nkat/mg. Izolovaný enzym zůstává stabilní bez významnější ztráty aktivity i několik týdnů, při uchovávání při teplotě 4 °C nebo zmrazené na -15 °C (Šebela et al., 2001).

U ječmene a ovsu byla prokázána ztráta enzymové aktivity PAO v průběhu degradace polyaminů. Inhibice je způsobena aminoaldehydy produkovanými v průběhu reakce (Šebela et al., 2001). PAO z vodního hyacintu je kompetitivně inhibována oktamethyldiaminem ($K_i \sim 10^{-6}$ M) (Yanagisawa et al., 1987), PAO z lilie zase hexamethyldiaminem ($K_i \sim 10^{-6}$ M) (Yanagisawa et al., 1996). Analogy sperminu a spermidinu, vzniklé zkrácením či prodloužením tetramethylenového řetězce, způsobují kompetitivní inhibici oxidace polyaminů u PAO z ječmene a ovsu ($K_i \sim 10^{-6} - 10^{-4}$ M). PAO z ovsu je také inhibována fungicidem guazatin ($K_i \sim 10^{-8}$ M), který obsahuje guanidinové skupiny. Inhibitory PAO z ječmenu jsou methylglyoxal-*bis*(guanylylhydrazon), semikarbazid a β -hydroxyethylhydrazin. PAO z cereálií a vodního hyacintu jsou inhibovány quinacrinem díky přítomnosti kofaktoru FAD (Šebela et al., 2001).

1.3.1.2 Kukuřičná polyaminoxidasa (maize polyamine oxidase - mPAO, E. C. 1. 5. 3. 14)

Kukuřičná PAO je monomerní glykoprotein, který obsahuje 1 molekulu FAD a 2,5 % cukru, převážně arabinosu (Tavladoraki et al., 1998). Vyskytuje se převážně v apoplastu (Šebela et al., 2001). Enzym je lokalizován v buněčných stěnách semenáčků kukuřice (ve výhoncích a kořenech) (Augeri et al., 1990).

mPAO je vůbec první PAO, u které byla zjištěna kompletní aminokyselinová sekvence. Nukleotidová sekvence cDNA kukuřičné PAO je dlouhá 1737 bp (Tavladoraki et al., 1998). Pro mPAO existují 3 kopie genu pro produkci identických sekrečních proteinů (Cervelli et al., 2000).

Kukuřičná PAO katalyzuje mimo spermin a spermidin i některé jejich acetylderiváty, konkrétně N^1 -acetylspermidin, N^1 -acetylspermin a N^8 -acetylspermidin při stejném pH optimu 6,5. Enzym je však v průběhu reakce rychle inaktivován (Federico et al., 1996). pH optimum pro stabilizaci nativního enzymu je 5,0 (Federico et

al., 1990). mPAO je vždy pouze částečně oxidována i za striktně aerobních podmínek, koncentrace kyslíku by mohla být významným rychlost určujícím faktorem v in vivo prostředí (Bellelli et al., 1997).

Produkty oxidace polyaminů, 4-aminobutanal a 1-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal, vystupují jako kompetitivní inhibitory mPAO ($K_i \sim 10^{-4}$ M) (Federico et al., 1990). Aminoaldehyd vzniklý oxidací N^1 -acetylsperminu je také kompetitivním inhibitorem tohoto enzymu ($K_i \sim 10^{-5}$ M) (Federico et al., 1996).

1.3.1.2.1 Ultrastrukturální lokalizace PAO v různých orgánech semenáčku kukuřice

mPAO se vyskytuje pouze v buňkách se sekundární buněčnou stěnou, zvláště pak v endodermálních buňkách primárních a laterálních kořenů. Je také přítomna v sekundárních buněčných stěnách xylemových buněk, při sekundárním tloustnutí zralých buněk a u diferencujících se vaskulárních buněk zapojených do depozice sekundární buněčné stěny. V mezokotylu se mPAO vyskytuje v sekundárních stěnách velkých cév a vaskulárním parenchymu. mPAO nenajdeme vůbec v mezibuněčných prostorech a v primární buněčné stěně a jen zřídka v epidermálních buněčných stěnách (Angelini et al., 1995).

1.3.1.2.2 Krystalová struktura kukuřičné polyaminoxidasy

PAO ze semenáček kukuřice je jedinou PAO, jejíž trojrozměrná struktura byla vyřešena „Obr. 3“. Kukuřičná polyaminoxidasa se skládá ze 13 α helixů a 19 β vláken, které formují 2 domény. Doména vázající FAD je tvořena 3 fragmenty, jejichž hlavními strukturálními prvky jsou centrální paralelní β list lemovaný β záhybem a 3 α helixy. Doména vázající substrát se skládá ze 2 fragmentů, obsahuje šestivlákněný smíšený β list lemovaný 5 α helixy. Tyto 2 domény vymezují katalytický U-tunel na jejich rozhraní „Obr. 3“ (Binda et al., 1999).

Prostetická skupina FAD je na protein vázána nekovalentní vazbou a je uložena hluboko v jeho struktuře, na rozhraní obou domén. Významnými atomy FAD jsou C5a, N5 a C4a, které obklopují aktivní centrum enzymu (Binda et al., 1999).

Aktivní centrum mPAO sestává z katalytického tunelu tvaru „U“, který prochází skrz proteinovou strukturu na rozhraní mezi doménou vázající FAD a doménou vázající substrát. Tunel je dlouhý 30 Å. Šířka tunelu je po celé délce téměř konstantní,

s průměrem 3,8-4,3 Å. Důsledkem „U“ tvaru tunelu jsou 2 vstupy na stejné straně povrchu proteinu, které jsou od sebe vzájemně vzdálené 16 Å. Mezi chemickým složením 2 ramen katalytického tunelu je zřetelný rozdíl. Pravé rameno je lemováno převážně aromatickými zbytky. Jeho vstup připomíná nálevku, na jejímž okraji jsou přítomné kyselé postranní řetězce (prstenec z Asp a Glu). Povrch levého ramene je tvořen hlavně atomy kyslíku a liší se také svým úzkým vstupem. Důsledkem této asymetrie je, že substrát může být přijat do vazebného místa vždy pouze za použití jednoho ze vstupů. Pro vstup polyaminového substrátu do tunelu je výhodnější pravé rameno tunelu, jehož vstup je obklopen Asp a Glu (Binda et al., 1999).

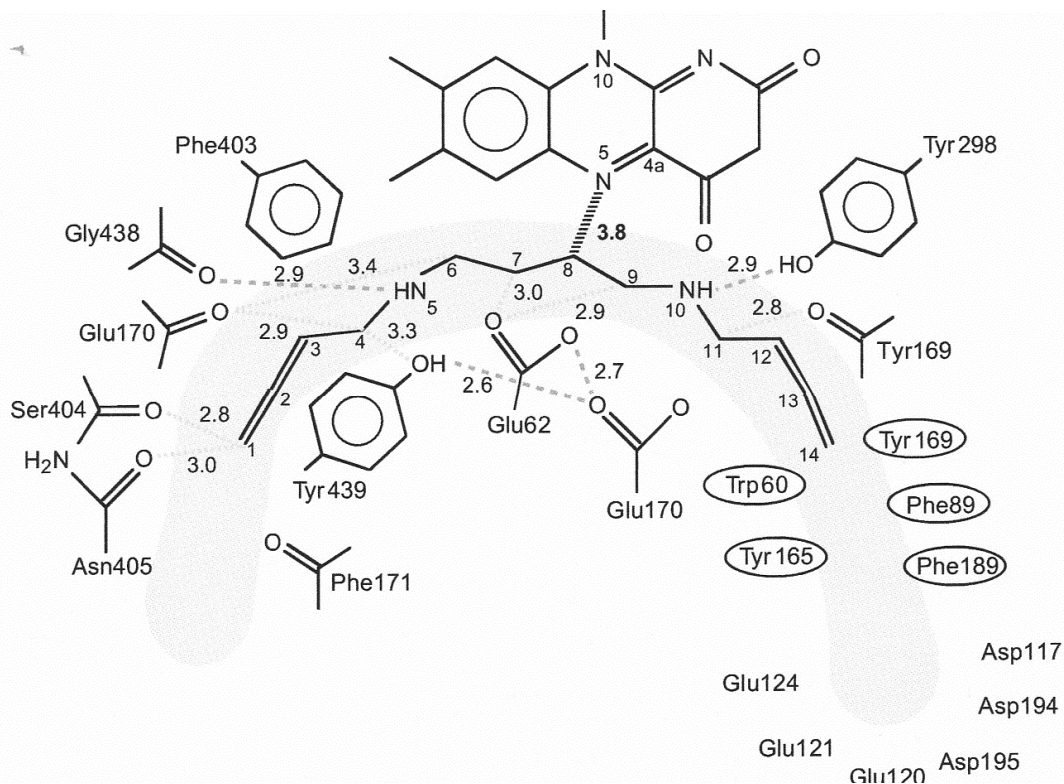


Obrázek 3 Struktura kukuřičné polyaminoxidasy. Žlutě je zvýrazněn kofaktor FAD a červeně katalytický tunel tvaru „U“ (Binda et al., 2002)

1.3.1.2.3 Způsob vázání substrátu do aktivního místa kukuřičné polyaminoxidasy

Způsob vázání substrátu do aktivního místa enzymu byl zkoumán pomocí analogu substrátu *N,N*-bis(2,3-butadienyl)-1,4-butandiamin (MDL72527), který způsobuje kompetitivní inhibici kukuřičné PAO. MDL72527 se váže do centrální části katalytického tunelu, kde získá konformaci, jež odpovídá tvaru tunelu „Obr. 4“. Navázání ligandu nezpůsobuje žádné významné konformační změny enzymu. Navázaný inhibitor tvoří vodíkové můstky a van der Waalsovy interakce s atomy okolních proteinů a interaguje s FAD. Polovina atomů uhlíku inhibitoru je lokalizována v blízkosti atomů kyslíku enzymu, vznikají tzv. CH-O vodíkové vazby. Molekula vody, vázaná vodíkovým můstkem s N5 atomem flavinu, má dobrou pozici k tomu, aby mohla hydrolyzovat iminosloučeninu za účelem tvorby konečných produktů oxidace polyaminů - aldehydů (Binda et al., 1999).

Inhibitor MDL72527 se liší od sperminu pouze absencí primární aminoskupiny. Z toho lze soudit, že primární aminoskupina substrátu je striktně vyžadována enzymem, aby mohlo dojít ke katalyzované oxidaci substrátu. Primární atomy dusíku sperminu mají pozitivní náboj, který ovlivňuje hodnoty pK_a sekundárních aminoskupin (Binda et al., 1999).



Obrázek 4 Schéma katalytického U-tunelu s navázaným inhibítorom MDL72527. Vodíkové mústky medzi sekundárnými aminoskupinami inhibítora a proteínom sú značené prerušovanými čarami a CH-O vodíkové väzby tečkovaně. Vzdálenosť medzi C8 atomom inhibítora a N5 atomom flavínu je 3,8 Å. Všetchny vzdálenosti sú v angströmech (Å) (Binda et al., 1999).

1.3.1.2.4 Zkráčená forma kukuřičné polyaminoxidasy

Zkráčená mPAO je genová forma vzniklá z alternatívneho sestřihu, jejíž funkce není dosud známá. Její existence byla potvrzena na úrovni mRNA. Velikost kódující sekvence je 1191 bp.

1.3.1.2.5 Srovnání kukuřičné polyaminoxidasy a její zkráčené formy

Velikost kódující sekvence mPAO je 1501 bp, u zkráčené formy je asi o 300 bp kratší (1191 bp). Proteinová sekvence mPAO má 500 aminokyselin, zkráčená mPAO jen 396. Kratší forma je zkráčená v oblasti Phe77 - Asn180, tato oblast zasahuje částečně do nálevkovitého otvoru katalytického U-tunelu (aktivního centra enzymu), kterým vstupuje do tunelu substrát (Binda et al., 1999). V dané oblasti se vyskytují některé aminokyseliny důležité pro katalytickou funkci enzymu - Glu90, Asp145,

Glu148, Glu149 a Glu152 „Obr. 5“, proto je pravděpodobné, že katalytická funkce zkrácené formy mPAO, která je o tuto oblast ochuzena, bude negativně ovlivněna.

MSESPFGLLAVAAALLALSLAQHGSLAATUGPRVIVUGAGMSGISAAKRLSEAGITDLL
ILEATDHIGGRMHKTNFAGINVELGANWUEGUNGGMMP IWP IUNSTLEKLRNFRSDFDYL
AQNVYKEDGGUYDEDVQKR IELAD SUEEMGEKLSATLHASGRDDMSILAMQRLMEHQPN
GPATPVDHVUDYTKFDYEF AEPFRUTSLQNTVPLATFSDFGDDVYFVADQRGYEAVVYEL
AGQYKTDKSGKIWDPRQLNKKVREIKYSPGGVTUMTEDNSVYSADYUMV'SASLGULQ
SDLIQFKPKLPTWKKVRAIYQFDMAVYTKIFLKFPRKFWPEGKGREFFLYASSRRCYFGUN
QEFKQYPDANULLVTVTDEESRRIEQQSDEQTKAEIMQULRKMFGKDVDPATDILVPR
WQSDRFYKGTFSNWPUGUNRYEYDQLRAPUGRVYFTGEHTSEHYNGYMGAYL SGIDS AE
ILINC AQKMKCKYHVQGGKYD

Obrázek 5 Porovnání proteinové sekvence mPAO a její zkrácené formy. Žlutě je zvýrazněna oblast, o kterou je zkrácená forma mPAO ochuzena. Červeně jsou označeny aminokyseliny důležité pro funkci enzymu.

1.4 Hostitelský organismus pro expresi polyaminoxidasy a zkrácené polyaminoxidasy

Výběr vhodného kmenu „Tab. 1“ má velký význam pro úspěšnou expresi daného proteinu. Je třeba, aby biochemické prostředí hostitelské buňky bylo dostatečně kompatibilní a aby byla schopna zpracovat a translatovat transkripty RNA a modifikovat a udržovat translatovaný protein (Čelik & Čalik, 2011).

1.4.1 *Pichia pastoris*

Pichia pastoris jsou methylotropické kvasinky, které mohou využít methanol jako jediný zdroj uhlíku a energie. Striktně regulovaný AOX1 promoter využívá methanol k indukci exprese genu a je jedním z nejsilnějších promoterů u eukaryotických organismů. Protože *P. pastoris* upřednostňují respirační způsob růstu nad fermentativním, koncentrace produktů fermentace (ethanol, kyselina octová)

vzrůstá pomalu, což umožňuje kvasinkám narůst do poměrně vysoké buněčné hustoty. *P. pastoris* má tendenci k sekreci proteinů, a to i těch s velkou molekulovou hmotností. Tím se liší od některých dalších kvasinek, např. *S. cerevisiae*, které skladují protein v periplasmatu. *P. pastoris* se běžně vyskytují ve vegetativním haploidním stavu. Je-li omezen přísun dusíku, kvasinky se shlukují a tvoří diploidní buňky. Všechny expresní kmeny *P. pastoris* mají původ v divokém kmenu NRRL-Y 11430. Většinou se využívá auxotrofických mutantů a kmenů s deficiencí proteasy (Çelik & Çalik, 2011).

P. pastoris můžeme rozdělit do 3 fenotypů - Mut⁺ (divoký typ, který využívá methanol, promotery AOX1 a AOX2 jsou neporušeny), Mut^S (využívání methanolu je pozvolné, promotor AOX1 je přerušeno, promotor AOX2 je neporušen) a Mut⁻ (nevyužívá methanol, promotery AOX1 i AOX2 jsou přerušeny). Využívání methanolu jako induktoru exprese genu má však také jisté nevýhody - toxicita methanolu nedovoluje jeho použití v potravinářském průmyslu - v tomto případě je AOX promotor vyměněn za GAP (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa) promotor. Nežádoucí je také vysoká hořlavost methanolu (Çelik & Çalik, 2011).

Tabulka 1 Kmeny kvasinek *Pichia pastoris*, které nabízí společnost Invitrogen. Zvýrazněný kmen X-33 je kmen použitý v experimentální části práce (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C18000?ICID=search-product>).

Kmen	Genotyp	Využití
GS115	his4	selekce expresních vektorů obsahujících HIS4
X-33	divoký typ	selekce ZeocinTM-rezistentních expresních vektorů
KM71	his4, aox1::ARG4, arg4	selekce expresních vektorů obsahujících HIS4 k tvorbě kmenů fenotypu Mut ^S
KM71H	aox1::ARG4, arg4	selekce Zeocin TM -rezistentních expresních vektorů k tvorbě kmenů fenotypu Mut ^S
SMD1168	his4, pep4	selekce expresních vektorů obsahujících HIS4 k tvorbě kmenů bez aktivity proteasy A
SMD1168H	pep4	selekce Zeocin TM -rezistentních expresních vektorů k tvorbě kmenů bez aktivity proteasy A

2 Experimentální část

2.1 Materiál

2.1.1 Vektor, konstrukty a mikroorganismy

vektor pPICZαA	Invitrogen (USA)
konstrukt zkrácené mPAO ve vektoru pSPORT	oddělení mol. biologie (CR Haná)
konstrukt mPAO ve vektoru pGAPZαA	oddělení mol. biologie (CR Haná)
Top10 elektrokompetentní buňky <i>E. coli</i>	Invitrogen (USA)
kvasinky <i>Pichia pastoris</i> X33	Invitrogen (USA)

2.1.2 Komerční kity

QIAprep Spin Miniprep Kit 250	Qiagen (Německo)
GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	Sigma-Aldrich (ČR)

2.1.3 Enzymy

Phusion DNA Polymerase	Finnzymes (Finsko)
T4 DNA lipasa	NEB - New England Biolabs (USA)
Restrikční enzymy:	
<i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	Takara (Japonsko)
<i>Xmn</i> I, <i>Pme</i> I	NEB (USA)

2.1.4 Chemikálie

Agar	Himedia (Indie)
Dextrosa	Sigma-Aldrich (ČR)
dNTPs	Finnzymes (Finsko)

ethanol 100%	Lachema (ČR)
ethidium bromid	Sigma-Aldrich (ČR)
extrakt z kvasinek	Sigma-Aldrich (ČR)
GeneRuler 1 kb (marker)	Fermentas (Kanada)
Loading Dye 6x	Fermentas (Kanada)
NaCl	Lach-Ner (ČR)
NaOAc	Sigma-Aldrich (ČR)
Pepton	Duchefa (Nizozemí)
Premix AAP/DCHBS	Sigma-Aldrich (ČR)
SOC médium	Invitrogen (USA)
Sorbitol	Sigma-Aldrich (ČR)
Spermidin	Sigma-Aldrich (ČR)
Krypton	Duchefa (Nizozemí)
Zeocin	Invitrogen (USA)

2.1.5 Další materiál

nitroceluloseová membrána	Millipore (USA)
anti-His tag protilátka	Sigma-Aldrich (ČR)

2.1.6 Přístroje

centrifuga stolní	Eppendorf (ČR)
centrifuga sálová	Schoeller (ČR)
digestoř	Forlab (ČR)
laminární box	Forlab (ČR)
spektrofotometr	Agilent (USA)

termocykler T-personal

Biometra (Německo)

třepačka inkubovaná stolní

Heidolph (Německo)

třepačka inkubovaná sálová

Jeio Tech (Korea)

třepačka inkubovaná sálová

Chemos (ČR)

2.2 Metody

2.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je technika, která umožňuje enzymatickou amplifikaci specifických úseků DNA. K tomuto účelu je využito 2 specifických oligonukleotidových primerů, které se na templát navážou v místě počátku a konce požadovaného úseku. PCR reakce se skládá z následujících, cyklicky se opakujících kroků: denaturace DNA, nasednutí primerů a syntéza DNA pomocí DNA polymerasy (Ochman et al., 1988)

2.2.1.1 Podmínky PCR reakce:

Všechny PCR reakce byly prováděny za standardních podmínek:

1x	98°C	30 min
30x	68°C	10 s
	58°C	30 s
	72°C	2 min
1x	72°C	10 min

Složení reakční směsi pro PCR reakci o celkovém objemu 20 ul:

voda	10,35 ul
pufr	4,0 ul 10x pufru Phusion HF
dNTPs	0,4 ul 10mM dNTPs
FW primer	2,0 ul 5uM FW primeru
RE primer	2,0 ul 5uM FW primeru
templát	1,0 ul
enzym	0,25 ul Phusion DNA Polymerasy

Sekvence specifických primerů MPAO_PIC_fw a MPAO_PIC_rev:

MPAO_PIC_fw (zvýrazněná oblast je sekvence restrikčního místa enzymu *Xho*I)

GGG TAT CTC TCG AGA AAA GAG AGG CTG AAG CTG CAA CCG TCG GCC CCA
GGG TCA TCG TCG

MPAO_PIC_rev (zvýrazněná oblast je sekvence restrikčního místa enzymu *Xba*I)

CGG ATG CGG ATC CTC TAG ATC AAT GAT GAT GAT GAT GAT GGT CAT ACT
TTC CCT GGA CAT

2.2.2 Agarosová elektroforéza

Nejprve byla sestavena elektroforetická vana, která byla poté do 2/3 naplněna tekutým 1% agarosovým gelem v 1 x TAE pufru (0,04 M Tris-acetát, 0,001 M EDTA, pH 8,0). Do gelu bylo připipetováno 40 ul 10% barviva ethidium bromid, který byl s gelem řádně promíchán pipetou a hřebínkem. Na jednu stranu gelu byl ponořen hřebínek, který byl po zatuhnutí gelu vyjmut a vytvořil tak jamky, do kterých byly později nanášeny vzorky. Připravený gel byl přenesen do elektroforetického zařízení se zředěným TAE puftrem tak, že jamky pro nanášení vzorků byly umístěny na katodové straně. Do 1. jamky bylo napipetováno 5 ul markeru GeneRuler 1kb, do zbylých jamek 5-10 ul vzorku s 1-2 ul barviva 6xLoading Dye. Elektroforéza běžela při napětí 120 V cca 30 min.

2.2.3 Ligace

Pomocí ligace lze vložit inzert naštěpený restrikčními enzymy do vektoru naštěpeného vhodnými enzymy - za přítomnosti T4 DNA ligasy dojde ke spojení komplementárních konců.

Ligační směs se skládala z vektoru a inzertu naštěpených vhodnými enzymy (poměr množství vektoru a inzertu 1:5), 1 ul pufru, 1 ul T4 DNA ligasy a byla doplněna vodou na konečný objem 10 ul. Ligace probíhala při 16 °C přes noc a ráno byla zastavena zahřátím na 70 °C.

2.2.4 Minipreparativní izolace plasmidové DNA

Minipreparativní izolace plasmidové DNA byla provedla pomocí komerčního kitu od společnosti Qiagen (Qiaprep Spin Miniprep Kit 250). 2 ml kultury bylo přeneseno do mikrozkušavky a centrifugováno při 5000 x g 5 min za laboratorní teploty. Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v 250 ul pufru P1 „Tab. 2“. Bylo přidáno 250 ul pufru P2 „Tab. 2“ a obsah promíchán obracením mikrozkušavky. Po 5 min bylo přidáno 350 ul neutralizačního pufru N3 „Tab. 2“ a opět promícháno obracením mikrozkušavky a centrifugováno při 20000 x g 10 min. Supernatant byl odlit do kolonky a centrifugován při 20000 x g 1 min. Produkt byl zachycen na filtru v kolonce, zbytek byl odlit. Produkt byl promyt 750 ul pufru PE „Tab. 2“ a centrifugován při 20000 x g 1 min. Promývací pufr byl odlit a produkt opět centrifugován při 20000 x g 1 min. Filtr z kolonky byl přenesen do nové mikrozkušavky, bylo přidáno 30 ul pufru EB „Tab. 2“ a centrifugováno při 20000 x g 1 min. Produkt se uvolnil z filtru do mikrozkušavky.

Tabulka 2 Složení jednotlivých pufrů použitých při minipreparativní izolaci plasmidové DNA

(<http://methodsandreagents.pbworks.com/w/page/20806948/Qiagen's%20Miniprep%20buffers>).

P1	50mM Tris-Cl (pH 8,0), 10mM EDTA, 100ug/ml RNasa A
P2	200mM NaOH, 1% SDS
N3	4,2M Gu-HCl, 0,9 M KAc, pH 4,8
PE	10mM Tris-HCl (pH 7,5), 80% ethanol
EB	10mM Tris-Cl, pH 8,5

2.2.5 Maxipreparativní izolace plasmidové DNA

Maxipreparativní izolace plasmidové DNA byla provedena pomocí komerčního kitu od společnosti Sigma-Aldrich (GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit). Princip maxipreparativní izolace plasmidové DNA je velmi podobný izolaci minipreparativní, liší se však větším objemem výchozího vzorku.

150 ml kultury bylo rozlito do několika umělohmotných zkumavek s víčkem, vyváženo na předvážkách a centrifugováno při 5000 x g 10 min. Supernatant byl odlit a pelet resuspendován ve 12 ml resuspendačního roztoku s RNasou A. K resuspendovaným buňkám bylo přidáno 12 ml lyzačního roztoku, obsah promíchán převrácením zkumavky a ponechán v klidu 3-5 min. Bylo přidáno 12 ml vychlazeného neutralizačního roztoku a promícháno převrácením zkumavky. Poté bylo přidáno 9 ml vazebného roztoku, promícháno převrácením zkumavky a celý obsah zkumavky byl přelit do filtrační stříkačky, kde se nechal 5 min usadit lyzát. Mezitím byla vazebná kolona připojena k vakuu a dovnitř bylo napipetováno 12 ml roztoku pro přípravu kolony, který se nechal protéct skrz. Poté byl pomocí kolony přefiltrován lyzát, přičemž DNA se navázala na filtr v koloně. Navázaná DNA byla promyta 12 ml promývacího roztoku 1 a 12 ml promývacího roztoku 2. Po aplikaci promývacích roztoků bylo ponecháno ještě 10 min zapnuté vakuum, aby se kolona řádně vysušila. Vysušená vazebná kolona byla přemístěna do čisté 50ml zkumavky a DNA bylo uvolněno z filtru přidávkem 3 ml elučního roztoku po centrifugaci při 3000 x g 5 min.

2.2.6 Ethanolová precipitace DNA

K x ml DNA byl přidán 2,5 násobek objemu 100% ethanolu a 10 % objemu 3M NaOAc, pH 5,2. Směs se nechala 1 hod chladit při -20 °C a poté byla zcentrifugována při max. otáčkách 15 min při 4 °C. Supernatant byl odlit a zkumavka s peletem se nechala vysušit dnem vzhůru. Vysušený pelet byl rozpuštěn v 70 ul vody.

2.2.7 Štěpení DNA restrikčními enzymy

DNA byla štěpena restrikčními enzymy před ligací, z důvodu ověření, je-li vytvořený konstrukt správně připraven a také za účelem linearizace konstruktů před transformací kvasinek. Restrikční směs se vždy skládala z restrikčního enzymu (či restrikčních enzymů), DNA, pufru a byla doplněna vodou - množství jednotlivých složek

bylo u různých restrikcí rozdílné. Restrikce probíhaly při 37 °C přes noc (mimo restrikce pomocí enzymů *Bam*HI a *Sma*I, které probíhaly při 30 °C).

2.2.8 Genetická transformace Top10 elektrokompetentních buněk *E. coli*

K 80 ul top10 elektrokompetentních buněk *E. coli* v kyvetě byly napipetovány 3 ul konstruktů, směs byla promíchána 200 ul pipetou a dána chladit na led. Buňky byly transformovány elektroporací při napětí 1800 V. Ihned po proběhnutí elektroporace bylo připipetováno k směsi 250 ul kompetentního SOC média a celý obsah kyvety poté rychle odpipetován do prázdné mikrozkušavky. Transformovanými buňkami byly natřeny misky s LS (low salt) LB médiem a antibiotikem zeocin pro selekci transformovaných buněk.

2.2.9 Genetická transformace kvasinek *Pichia pastoris* X33

2.2.9.1 Příprava *Pichia pastoris* X33 pro elektroporaci

Kvasinky *Pichia pastoris* se nechaly narůst přes noc při 30 °C v 5 ml YPD média. 0,5 ml kultury bylo smícháno s 200 ml čerstvého YPD média a kvasinky se opět nechaly narůst přes noc. Pro další práci bylo důležité, aby buněčná hustota kvasinek v médiu byla v rozmezí $OD_{600} = 1,3 - 1,5$. Buňky byly zcentrifugovány při 1500 x g 5 min při 4 °C, supernatant odlit a pelet resuspendován v 200 ml ledové sterilní vody. Buňky byly zcentrifugovány, supernatant odlit a pelet resuspendován ve 100 ml ledové sterilní vody. Následně byly buňky znovu zcentrifugovány, supernatant odlit a pelet resuspendován ve 20 ml ledového 1M sorbitolu. Buňky byly zcentrifugovány, supernatant odlit a pelet resuspendován v 1 ml ledového 1M sorbitolu. Finální objem kultury byl asi 1,5 ml. Buňky byly před transformací skladovány na ledu (manuál společnosti Invitrogen pGAPZαA, B a C).

2.2.9.2 Transformace *Pichia pastoris* X33 elektroporací

80 ul připravených buněk bylo smíšeno s 5 ug linearizované DNA v 5 ul sterilní vody a směs byla přenesena do vychlazené 0,2 cm elektroporační kyvety. Kyveta se směsí se nechala chladit na ledu asi 5 min. Kyveta poté byla řádně vysušena a byla provedena elektroporace při napětí 1500 V. Ihned po proběhnutí elektroporace byl do kyvety přidán 1 ml ledového 1M sorbitolu a celý obsah kyvety byl přenesen do mikrozkušavky. Buňky se nechaly inkubovat při 30 °C 2 hodiny a poté byly rozetřeny v různém množství (10, 25, 50, 100 a 200 ul) na připravené misky s YPDS médiem se

Zeocinem. Misky se nechaly inkubovat při 30 °C asi 3 dny, než vyrostly kolonie (manuál společnosti Invitrogen pGAPZαA, B a C).

2.2.10 Exprese proteinu

Pro expresi proteinu bylo použito expresní YPD médium, pH 7,2. Kolonie transformovaných kvasinek byla vypíchnuta a přenesena do 10 ml YPD média a směs se nechala inkubovat přes noc při 30 °C na třepačce. 1 ml expresní kultury bylo přeneseno do mikrozkušavky a centrifugováno při max. otáčkách 3 min za laboratorní teploty. Supernatant (médium) byl přenesen do čisté mikrozkušavky. (manuál společnosti Invitrogen pGAPZαA, B a C).

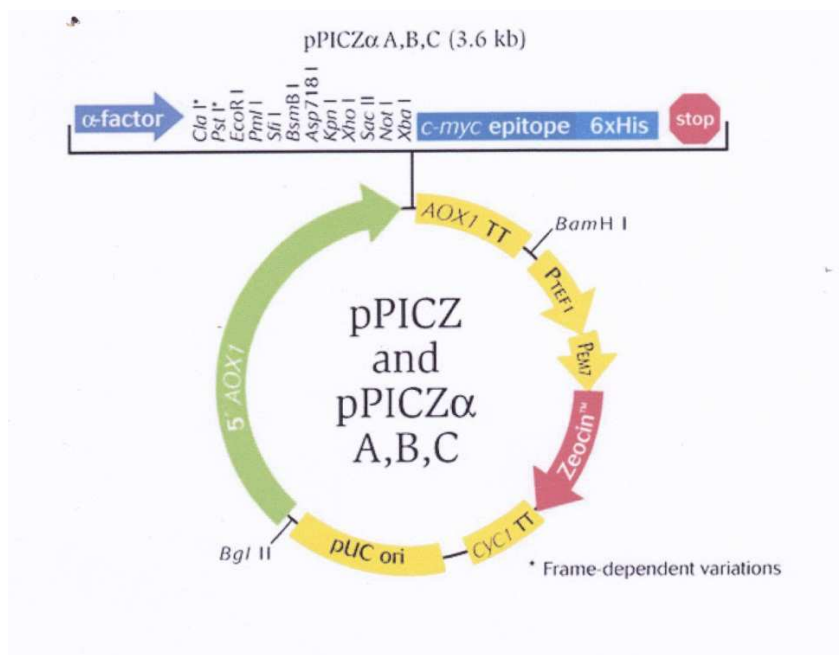
2.2.10.1 Popis komerčních expresních vektorů od společnosti Invitrogen

2.2.10.1.1 Expresní vektor pPICZαA

pPICZαA je 3329 bp velký vektor, který slouží k expresi a sekreci rekombinantních proteinů v *Pichia pastoris*. Rekombinantní proteiny jsou exprimovány jako fúze do N-koncového peptidu, který kóduje sekreční signál (α-faktor). Vektor umožňuje vysoce účinnou, methanolem indukovanou expresi požadovaného genu v různých kmenech kvasinek *Pichia pastoris* (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V19520>). Vektor se skládá z několika klíčkových složek (manuál společnosti Invitrogen - pPICZα A, B, C, <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V19520>) „Obr. 6“:

- 5' koncový AOX1 promoter je 942 bp velký fragment, který umožňuje vysoce účinnou, methanolem indukovanou expresi požadovaného genu v *Pichia pastoris*
- multiklonovací místo (polylinker) se specifickými restrikčními místy umožňuje vložení požadovaného genu do expresního vektoru
- *c-myc* epitop slouží k detekci rekombinantního proteinu pomocí anti-*myc* protilátky
- C-koncový polyhistidinový (6xHis) tag slouží rovněž k detekci rekombinantního proteinu, a to pomocí anti-His tag protilátky
- AOX1 oblast ukončení transkripce (terminátor transkripce - TT) je 260 bp velký fragment

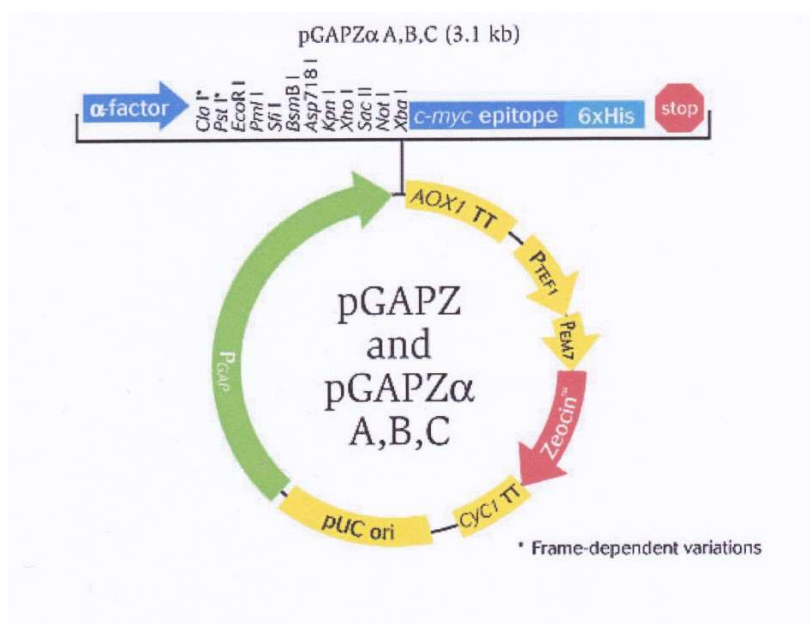
- TEF1 promoter je transkripční elongační faktor 1 ze *Saccharomyces cerevisiae*, který řídí expresi ZeocinTM rezistenčního genu v bakterii *E. coli*
- EM7 promoter je syntetický prokaryotický promoter, který řídí konstitutivní expresi ZeocinTM rezistenčního genu v bakterii *E. coli*
- ZeocinTM rezistenční gen slouží k selekci transformovaných buněk u *E. coli* a *Pichia pastoris*
- CYC1 oblast ukončení transkripce (TT) je 3' koncový gen ze *Saccharomyces cerevisiae*
- pUC počátek replikace umožňuje replikaci a zachování plasmidu v *E. coli*
- sekreční signál (α -faktor) umožňuje sekreci rekombinantního proteinu do média



Obrázek 6 Expresní vektor pPICZ α A (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V19520>).

2.2.10.1.2 Expresní vektor pGAPZαA

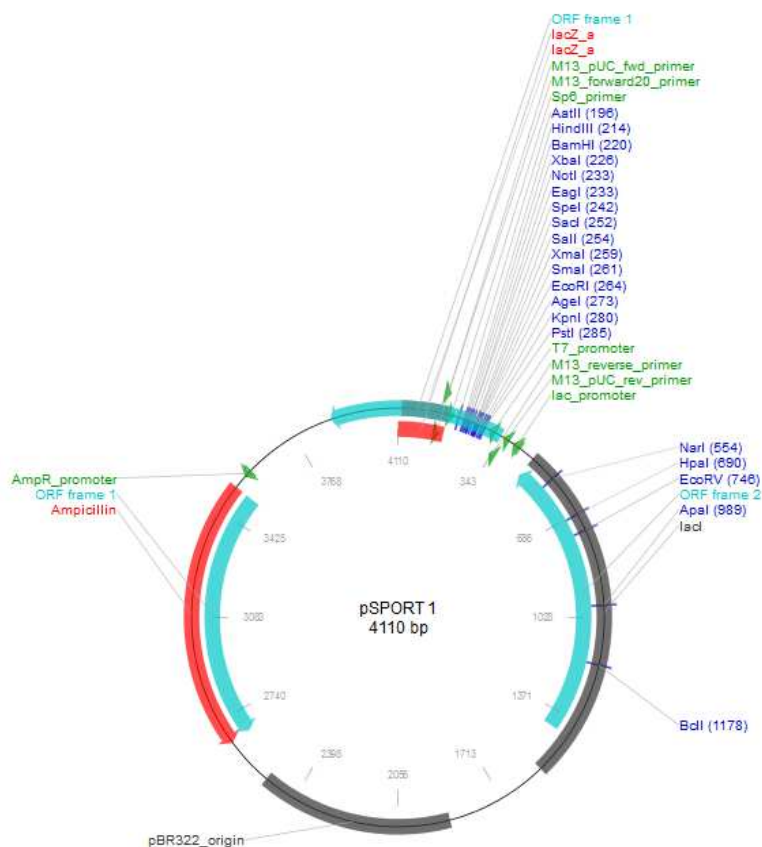
pGAPZαA je expresní vektor o velikosti 3147 bp, který slouží k vysoce účinné konstitutivní expresi v *Pichia pastoris*. Byl vytvořen nahrazením AOX1 promoteru ve vektoru pPICZαA za konstitutivní GAP (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa) promoter. Složení vektoru je tedy až na promoter stejné jako u vektoru pPICZαA „Obr. 7“ (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V20520>).



Obrázek 7 Expresní vektor pGAPZαA (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V20520>).

2.2.10.1.3 Expresní vektor pSPORT 1

pSPORT 1 je plasmid velký 4110 bp, který slouží k bakteriální vysoce účinné konstitutivní expresi. V tomto vektoru není přítomen promoter. K selekci transformovaných bakteriálních buněk slouží gen rezistence vůči ampicillinu „Obr. 8“ (databáze vektorů Addgene, <http://www.addgene.org/vector-database/4203/>).



Obrázek 8 Expresní vektor pSPORT 1 (databáze vektorů Addgene, <http://www.addgene.org/vector-database/4203/>).

2.2.11 Měření enzymové aktivity rekombinantního enzymu

Nejdříve byly na spektrofotometru nastaveny požadované parametry: vlnová délka 515 nm, doba měření 300 s a počáteční čas 10 s. Měření bylo provedeno tak, že k 0,1 ml média bylo přidáno 1,55 ml premixu AAP/DCHBS, směs byla promíchána pipetou a odečetlo se pozadí. Enzymová reakce bylo spuštěna přidávkem 50mM spermidinu - zaplo se START na spektrofotometru, rychle bylo přidáno 35 ul substrátu a směs byla promíchána pipetou - to celé se muselo stihnout do 10 s, kdy spektrofotometr začal měřit.

Výpočet enzymové aktivity rekombinantního enzymu

$$a = \Delta A \cdot V / \epsilon_{515} \cdot l \cdot t$$

ΔA změna absorbance v rozmezí 10-300 s

V celkový objem reakční směsi se vzorkem, $V = 1,685$ ml

ϵ molární absorpční koeficient, $\epsilon_{515} = 2,6 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l délka optické dráhy, $l = 1$ cm

t délka měření, $t = 290$ s

2.2.12 SDS-PAGE proteinová elektroforéza

SDS-PAGE je elektroforéza, která probíhá v polyakrylamidovém gelu a slouží k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. Pro SDS-PAGE byly připraveny 2 gely - 10% dělicí a 2% zaostřovací. Dělicí gel byl připraven smísením 5 ml směsi 30% akrylamidu a 0,8% bisakrylamidu, 2,5 ml pufru, 0,15 ml 10% SDS, 0,015 ml tetramethylethylendiaminu, 0,17 ml 10% APS a 7 ml vody. Zaostřovací gel byl připraven smísením 2 ml směsi 30% akrylamidu a 0,8% bisakrylamidu, 2,5 ml pufru, 0,15 ml 10% SDS, 0,015 ml tetramethylethylendiaminu, 0,17 ml 10% APS a 10 ml vody.

Polymerace gelu byla spuštěna přidávkem persíranu amonného a tetramethylethylendiaminu. Po spuštění polymerace byl dělicí gel nalit mezi dělicí skla a převrstven butanolem. Po ztuhnutí gelu byl butanol odlit a hladina gelu omyta sterilní vodou. Po spuštění polymerace byl zaostřovací gel nalit na dělicí a do gelu byl vsunut hřebínek, který byl po zatuhnutí gelu vyjmut a vytvořil tak jamky pro nanášení vzorků. Skla s gely byla přenesena do elektroforetické cely s dělicím pufrem.

Vzorky (médiá s exprimovanými proteiny) byly denaturovány zahřátím na 95 °C. Po ochlazení byly vzorky stočeny a byly přidány 2 ml DTT a 5 ul pufru. Po nanesení vzorků byla elektroforetická komůrka uzavřena. Elektroforéza běžela 20 min za působení elektrického proudu o velikosti 20 mA a poté 60 min za působení proudu o velikosti 40 mA.

2.2.13 Western blot

Vzorky byly přeneseny z SDS gelu na nitroceluloseovou membránu tak, že byl SDS gel položen na membránu, to celé proloženo čtyřmi listy blotovacího papíru a vzorky přebloťovány pomocí blotovacího zařízení působením 350 mA při napětí 100 V po dobu asi 90 min nebo přes noc při 4 °C. Membrána byla obarvena amidovou černí (0,1 % w/v amidová čern 10B v roztoku methanol:kyselina octová: voda v poměru 45:10:45), aby byly dočasně vizualizovány vzniklé bandy a tak ověřena úspěšnost blottingu, a poté odbarvena pomocí TBS-T (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,5). Membrána byla blokována působením 50 ml 5% mléka v TBS-T po dobu 1 hod a pak se nechala inkubovat 1 hod v Petriho misce s 2 ml roztoku 1% mléka v TBS-T s anti-His tag protilátkou značenou křenovou peroxidasou (ředění protilátky 1:1000). Dále byla membrána 10 min promývána 50 ml TBS-T a 10 min 50 ml TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5). Nakonec byly vizualizovány bandy pomocí Supersignal Pico detekčního systému.

2.2.14 Příprava kultivačních médií

Příprava tekutého YPD média

10 g extraktu z kvasinek a 20 g peptonu bylo rozpuštěno v 900 ml vody. Roztok byl 20 min autoklávován. Poté bylo přidáno 100 ml 20% dextrosy. Tekuté médium bylo skladováno při laboratorní teplotě (manuál společnosti Invitrogen pGAPZαA, B a C).

Příprava YPDS média se Zeocinem™

10 g extraktu z kvasinek, 20 g peptonu a 182,2 g sorbitolu bylo rozpuštěno v 900 ml vody. Poté bylo k roztoku přidáno 20 g agaru a výsledný roztok byl 20 min autoklávován. Bylo přidáno 100 ml 20% dextrosy. Roztok byl ochlazen a byl přidán 1 ml Zeocinu™ o koncentraci 100 mg/ml. Médium bylo rozlito do misek a skladováno při 4 °C ve tmě. Díky nestálosti Zeocinu je trvanlivost tohoto média max. 2 týdny (manuál společnosti Invitrogen pGAPZαA, B a C).

Příprava LSLB média (médium s nižším obsahem soli)

10 g tryptonu, 5 g NaCl a 5 g extraktu z kvasinek bylo rozpuštěno v 950 ml destilované vody. Přídavkem 1M NaOH bylo upraveno pH na 7,5 a roztok byl poté doplněn vodou na konečný objem 1 l. Nakonec bylo přidáno 15 g agaru a roztok byl 20 min autoklávován při teplotě 121 °C. Médium se nechalo vychládnout a poté byl

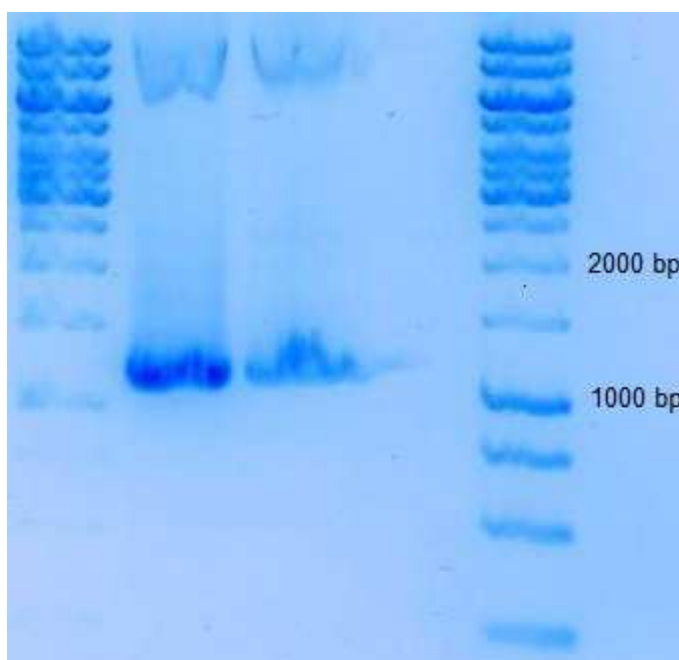
přidán zeocin v takovém množství, aby jeho koncentrace v roztoku byla 25 ug/ml. Hotové médium bylo rozlito do misek, které byly skladovány ve tmě při teplotě 4 °C (manuál společnosti Invitrogen pGAPZαA, B a C).

2.3 Výsledky

2.3.1 Příprava konstruktů zkrácené mPAO ve vektoru pPICZαA

2.3.1.1 Klonování zkrácené formy kukuřičné polyaminoxidasy

Pro tvorbu expresního konstruktů kódujícího zkrácenou formu mPAO bylo použito cDNA pro zkrácenou formu enzymu (ve vektoru pSPORT). Tento konstrukt byl použit jako templát pro PCR reakci (složení reakční směsi popsáno v kapitole 2.2.1) za použití specifických primerů MPAO_PIC_fw a MPAO_PIC_rev. Úspěšnost PCR reakce jsem ověřila pomocí agarosové elektroforézy (2 x 5 ul PCR produktu + 1 ul Loading Dye). Po proběhnutí elektroforézy vyšel vždy 1 band velikosti 1200 bp „Obr. 9“, což odpovídá velikosti kódující sekvence zkrácené formy mPAO. Z toho lze usoudit, že PCR reakce byla úspěšná a skutečně jsem z konstruktů zkrácené mPAO ve vektoru pSPORT 1 naklonovala zkrácenou formu kukuřičné polyaminoxidasy.



Obrázek 9 Agarosový gel po elektroforéze PCR produktů (templát konstrukt zkrácené mPAO ve vektoru pSPORT, specifické primery MPAO_PIC_fw a MPAO_PIC_rev).

PCR reakci jsem poté zopakovala s desetinásobným množstvím vzorku (200 ul). Poměr zastoupení jednotlivých složek reakční směsi zůstal stejný jako u předchozí PCR reakce, každou složku jsem však přidala v desetinásobném množství.

2.3.1.2 Naštěpení PCR produktu a vektoru pPICZ α A restrikčními enzymy *Xho*I a *Xba*I

Produkt PCR reakce byl přesrážen ethanolem (viz metody) a DNA resuspendována ve 30 ul vody. Štěpení probíhalo v konečném objemu 50 ul při 37 °C přes noc. Restrikční směs se dále skládala z 1 ul od každého enzymu a 5 ul reakčního pufru. Vektor (5 ug DNA) byl štěpen ve stejném objemu a za stejných podmínek.

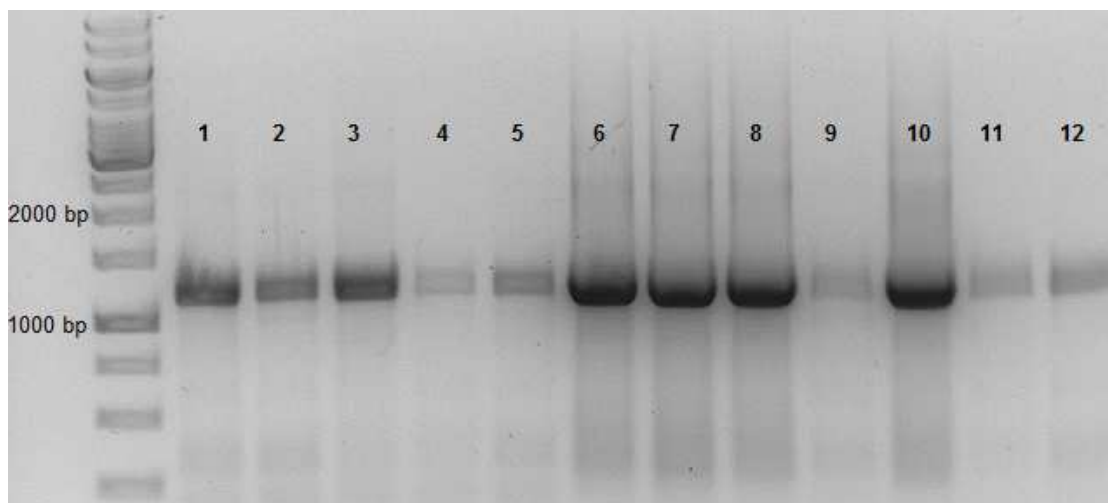
2.3.1.3 Ligace do vektoru pPICZ α A

Připravila jsem 2 ligační směsi. V 1. případě jsem smísila 1 ul vektoru pPICZ α A naštěpeného restrikčními enzymy *Xho*I a *Xba*I (~ 30 ng) s 0,5 ul PCR produktu naštěpeného stejnými enzymy (~ 150 ng), 6,5 ul vody, 1 ul pufru a 1 ul T4 DNA ligasy. Ve 2. případě jsem smísila 2 ul vektoru pPICZ α A naštěpeného restrikčními enzymy *Xho*I a *Xba*I (~ 60 ng) s 1 ul PCR produktu naštěpeného stejnými enzymy (~ 300 ng), 5 ul vody, 1 ul pufru a 1 ul T4 DNA ligasy. Ligace probíhala při 16 °C přes noc a ráno byla zastavena zahřátím na 70 °C.

2.3.1.4 Minipreparativní izolace DNA a ověření úspěšnosti ligace

Ligační směsí jsem transformovala Top10 elektrokompetentní buňky *E. coli* (postup popsán v metodách). Transformovanými buňkami jsem natřela misky s LSLB médiem a antibiotikem zeocinem pro selekci transformovaných buněk. Narostlé buňky jsem vypíchlá do LSLB média. Pomocí komerčního kitu od společnosti Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit 250) jsem provedla minipreparativní izolaci plasmidové DNA z transformovaných *E. coli* (vz. 1-12) a následně provedla kontrolní PCR za využití izolované DNA jako templátu a specifických primerů MPAO_PIC_fw a MPAO_PIC_rev.

Po proběhnutí agarosové elektroforézy PCR produktů (vz. 1-12) jsem získala vždy 1 band velikosti 1200 bp „Obr. 10“ (odpovídá velikosti kódující sekvence zkrácené formy mPAO), z čehož lze usoudit, že ligace byla úspěšná a konstrukt zkrácená mPAO ve vektoru pPICZ α A je správně připraven. Nejlépe vyšly reakce u vz. 8 a 10, proto jsem dále pracovala pouze s těmito vzorky.



Obrázek 10 Agarosový gel po elektroforéze PCR produktů (templát konstrukt zkrácená mPAO ve vektoru pPICZαA, specifické primery MPAO_PIC_fw a MPAO_PIC_rev)

2.3.1.5 Preparativní izolace DNA a další testování vytvořeného konstrukt zkrácené mPAO ve vektoru pPICZαA před transformací kvasinek *Pichia pastoris* X33

Vzorky z minipreparativní izolace DNA po ligaci zkrácené mPAO do vektoru pPICZαA (vz. 8 a 10), jsem podrobila preparativní izolaci plasmidové DNA, kterou jsem provedla pomocí komerčního kitu od společnosti Sigma-Aldrich (GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit). Izolovanou DNA jsem přečistila pomocí ethanolové precipitace (popsáno v metodách).

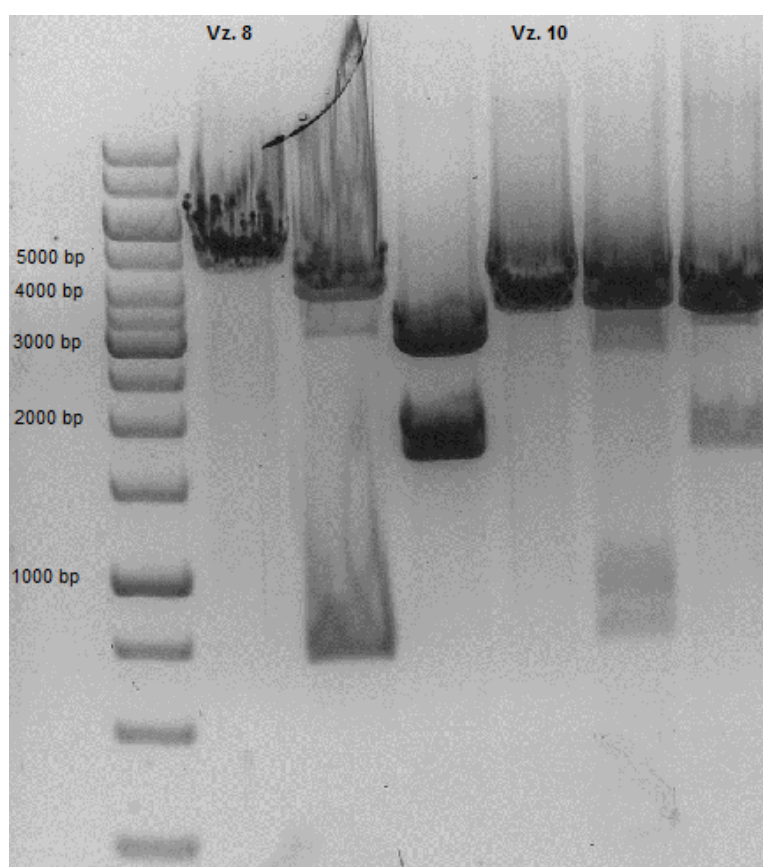
2.3.1.5.1 Kontrolní restrikce izolované DNA z transformovaných buněk *E. coli*

Kontrolní restrikce DNA (vz. 8 a 10) jsem provedla pomocí restrikčních enzymů *Bam*HI, *Xmn*I a *Sma*I.

1. 1 ug DNA + 1 ul enzymu *Bam*HI + 1 ul pufru NEB4 + voda do 10 ul
2. 1 ug DNA + 1 ul enzymu *Bam*HI + 1 ul enzymu *Xmn*I + 1 ul pufru NEB4 + voda do 10 ul
3. 1 ug DNA + 1 ul enzymu *Sma*I + 1 ul pufru NEB4 + voda do 10 ul

Vznik fragmentů odpovídající velikosti po restrikčním štěpení jsem ověřila pomocí agarosové elektroforézy „Obr. 11“. Po štěpení enzymem *Bam*HI došlo k linearizaci DNA, očekávanou velikost 4655 bp měl pouze band u vz. 8. Po štěpení

enzymy *Bam*HI a *Xmn*I vznikly správně 2 fragmenty velikosti 722 a 3933 bp (u vz. 10 band velikosti 722 bp málo viditelný). Po štěpení enzymem *Sma*I, který štěpí na 2 místech, vznikly 2 fragmenty očekávaných velikostí 1689 a 2966 bp pouze v případě vz. 8, u vz. 10 byl band o menší velikosti málo viditelný a 2. band nesprávné velikosti. U vz. 8 bylo tedy ověřeno, že je konstrukt správně vytvořen, což bylo na závěr potvrzeno i sekvenací tohoto konstruktů, a mohla jsem přejít k samotné transformaci kvasinek *Pichia pastoris* X33 tímto konstruktem a konstruktem mPAO ve vektoru pGAPZαA, který jsem obdržela již připravený. Velikosti fragmentů u vz. 10 po kontrolní restrikci neodpovídaly očekávaným výsledkům, proto jsem tento konstrukt v dalším postupu nepoužila.

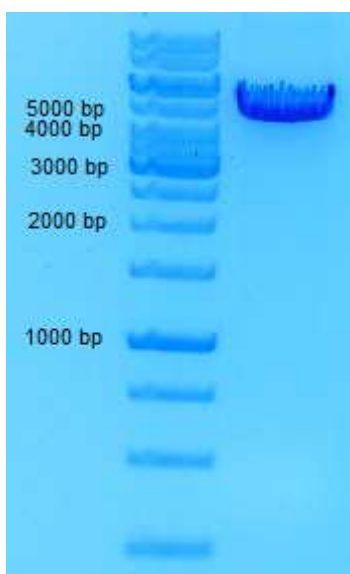


Obrázek 11 Agarosový gel po elektroforéze konstruktů zkrácené mPAO ve vektoru pPICZαA po kontrolní restrikci (vz. 8 a 10). V 1. případě došlo k linearizaci konstruktů, ve 2. a 3. ke vzniku 2 fragmentů - pouze u vz. 8 však vznikly fragmenty správné velikosti.

2.3.2 Transformace kvasinek *Pichia pastoris* X33 vytvořeným konstruktem zkrácené mPAO ve vektoru pPICZ α A a konstruktem mPAO ve vektoru pGAPZ α A

2.3.2.1 Linearizace konstruktů před transformací

Před samotnou transformací kvasinek bylo potřeba konstrukty linearizovat pomocí restrikčního enzymu *Pme*I. Složení restrikční směsi bylo 10 ug DNA + 0,5 ul enzymu *Pme*I + 5 ul pufru + voda do 50 ul. Úspěšnost linearizace konstruktů zkrácené mPAO ve vektoru pPICZ α A jsem ověřila pomocí agarosové elektroforézy, kdy vyšel jediný band velikosti 4655 bp „Obr. 12“, což odpovídá velikosti daného konstruktů.



Obrázek 12 Agarosový gel po elektroforéze linearizovaného konstruktů zkrácené mPAO ve vektoru pPICZ α A

2.3.2.2 Transformace kvasinek *Pichia pastoris* X33

Transformaci kvasinek *Pichia pastoris* X33 vytvořeným konstruktem zkrácené mPAO ve vektoru pPICZ α A a konstruktem mPAO ve vektoru pGAPZ α A jsem provedla elektroporací při napětí 1500 V. Postup přípravy kvasinek před transformací, samotná transformace kvasinek a exprese proteinu jsou popsány v metodách.

2.3.3 Testování transformovaných kvasinek *Pichia pastoris* X33

2.3.3.1 Měření aktivity rekombinantního enzymu

Změnu absorbance vzorků „Tab. 3“ (0,1 ml média s exprimovaným proteinem, 1,55 ml premixu AAP/DCHBS, 35 ul 50mM spermidinu) jsem měřila při vlnové délce 515 nm v rozmezí 10-300 s (postup uveden v metodách).

Tabulka 3 Naměřené změny absorbance v rozmezí 10-300 s u enzymů mPAO a zkrácené mPAO exprimovaných v YPD médiu a jejich enzymová aktivita v 1 ml média.

médium	doba kultivace	ΔA (10-300 s)	aktivita rekombinantního enzymu v 1 ml YPD média
s mPAO	1 den	0,037	$8,27 \cdot 10^{-2}$ nkat
s mPAO	2 dny	0,07	$15,64 \cdot 10^{-2}$ nkat
s mPAO	3 dny	0,07	$15,64 \cdot 10^{-2}$ nkat
s mPAO	4 dny	0,07	$15,64 \cdot 10^{-2}$ nkat
se zkrácenou mPAO	4 dny	0	0

Z výsledků vyplývá, že rekombinantní enzym mPAO dosáhl maxima své enzymové aktivity po 2 dnech kultivace v YPD médiu a dále se již tato aktivita nezvyšuje. U rekombinantního enzymu zkrácená mPAO nebyla naměřena žádná enzymová aktivita, což mohlo být způsobeno nepřítomností enzymu v médiu, nebo nízkou koncentrací enzymu v médiu, neboť enzymová aktivita mPAO je také velmi nízká. Proto jsem médium zahustila na membráně (zahuštění z 300 ul na 1 ul) a měření zopakovala „Tab. 4“.

2.3.3.2 Měření aktivity rekombinantního enzymu po zahuštění média s exprimovaným proteinem na membráně

Tabulka 4 Naměřené změny absorbance v rozmezí 10-300 s u enzymů mPAO a zkrácená mPAO exprimovaných v zahuštěném YPD médiu a jejich enzymová aktivita v 1 ml média.

médium	doba kultivace	ΔA (10-300 s)	aktivita rekombinantního enzymu v 1 ml YPD média
s mPAO	4 dny	0,240	0,54 nkat
se zkrácenou mPAO	4 dny	0	0

Neboť ani po zahuštění média nebyla naměřena žádná enzymová aktivita v případě zkrácené mPAO, je pravděpodobné, že enzym v médiu vůbec není. Enzym jsem se tedy rozhodla detekovat metodou Western blot.

2.3.3.3 SDS-PAGE proteinová elektroforéza

Pro SDS-PAGE proteinovou elektroforézu jsem si připravila několik vzorků o objemu 20 ul „Tab. 5“, které se skládaly z 13 ul YPD média s exprimovaným proteinem (kultivace v YPD po dobu 24 hod, 48 hod a 72 hod, 200 ml kultivačního média vždy zahuštěno na 300 ul), 5 ul pufru a 2 ul DTT.

Tabulka 5 Složení vzorků pro SDS-PAGE proteinovou elektroforézu

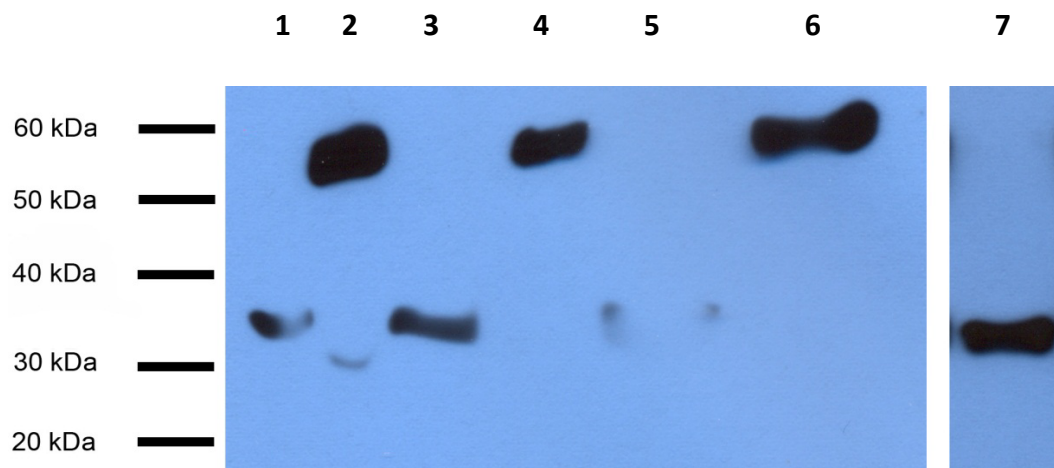
Vzorek č.	médium	doba kultivace	pufř	DTT
1	13 ul se zkrácenou mPAO	1 den	5 ul	2 ul
2	13 ul s mPAO	1 den	5 ul	2 ul
3	13 ul se zkrácenou mPAO	2 dny	5 ul	2 ul
4	13 ul s mPAO	2 dny	5 ul	2 ul
5	13 ul se zkrácenou mPAO	3 dny	5 ul	2 ul
6	13 ul s mPAO	3 dny	5 ul	2 ul
7	13 ul netransformovaná	3 dny	5 ul	2 ul

P. pastoris X33

2.3.3.4 Western blotting

Po separaci vzorků pomocí SDS-PAGE proteinové elektroforézy a přeblování na nitrocelulosoovou membránu jsem enzymy detekovala pomocí anti-His tag protilátky značené křenovou peroxidasou (přesný postup Western blottingu v metodách).

Z výsledků vyplývá že mPAO se objevuje už po 24 hod kultivace (po Western blottu vyšly bandy odpovídající molekulové hmotnosti 56 kDa „Obr. 13“), ale krátkou formu není možné detekovat. Objevuje se pouze band kolem 35 kDa, ale ten je přítomen i v kontrole - netransformovaná kvasinka. Jedná se tedy o nespecifickou detekci, která se projevuje ve vysoce zahuštěných vzorcích na membráně, v nezahuštěných vzorcích expresního média není tato nespecifita viditelná při detekci anti-His tag protilátkou. Enzym zkrácená mPAO tedy prokazatelně není v médiu přítomen (nebo je přítomen jen ve velice nízké, nedetekovatelné koncentraci), k čemuž mohlo dojít z několika důvodů. Kvasinky *Pichia pastoris* X33 mohly po transformaci konstruktem zkrácené mPAO ve vektoru pPICZαA gen pro zkrácenou mPAO rozpoznat jako cizí a degradovat jej. Je také možné, že zkrácená mPAO vůbec neexistuje na proteinové úrovni a v organismu plní zcela jinou funkci, např. regulační.



Obr. 13 Nitroceluloseová membrána po Western blottu. V případě mPAO vyšly jasné bandy odpovídající molekulové hmotnosti 56 kDa, v případě zkrácené mPAO vyšly bandy velikosti 35 kDa, band této velikosti se však vyskytuje i v kontrole (netransformovaná kvasinka). Jde o nespecifickou detekci, jež se projevuje ve vysoce zahuštěných vzorcích.

3 Závěr

V rámci teoretické části práce byla vypracována literární rešerše na téma charakteristika enzymu polyaminoxidasy se zaměřením na rostlinnou polyaminoxidasu a polyaminoxidasu z kukuřice.

V experimentální části práce byl připraven konstrukt zkrácené mPAO ve vektoru pPICZ α A. Kvasinky *Pichia pastoris* X33 byly úspěšně transformovány tímto konstruktem a konstruktem mPAO ve vektoru pGAPZ α A. U rekombinantního enzymu mPAO byla zjištěna enzymová aktivita, rekombinantní enzym zkrácená mPAO nevykazoval žádnou enzymovou aktivitu. Pomocí metody Western blot jsem prokázala, že zkrácená forma mPAO v expresním médiu zcela chybí (nebo je přítomna jen ve velice nízké, nedetekovatelné koncentraci).

Seznam použité literatury

Angelini, R., Federico, R., Bonfante, P. (1995) Maize polyamine oxidase: antibody production and ultrastructural localization. *J. Plant Physiol.* Vol. 145, pp. 686-692.

Augeri, M., Angelini, R., Federico, R. (1990) Sub-cellular localization and tissue distribution of polyamine oxidase in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.* **136**, 690-695.

Bellelli, A., Angelini, R., Laurenzi, M., Federico, R. (1997) Transient kinetics of polyamine oxidase from *Zea mays* L. *Arch. Biochem. Biophys.* **343**, 146-148.

Binda, C., Coda, A., Angelini, R., Federico, R., Ascenzi, P., Mattevi, A. (1999) A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure* **7**, 265-276.

Binda, C., Mattevi, A., Edmondson, D. E. (2002) Structure-function relationship in flavoenzyme-dependent amine oxidations. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, No. 27, pp. 23973-23976.

Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* **140**, 103-125.

Celik, E., Calik, P. (2011) Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol. Adv.*, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.011.

Cervelli, M., Tavladoraki, P., Di Agostino, S., Angelini, R., Federico, R., Mariottini, P. (2000) Isolation and characterization of three polyamine oxidase genes from *Zea mays*. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 667-677.

Federico, R., Cona, A., Angelini, R., Schininà, M. E., Giartosio, A. (1990) Characterization of maize polyamine oxidase. *Phytochemistry* **29**, 2411-2414.

Federico, R., Ercolini, L., Laurenzi, M., Angelini, R. (1996) Oxidation of acetylpolyamines by maize polyamine oxidase. *Phytochemistry* **43**, 339-341.

Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A. F., Altabella, T., Galston, A. W. (2003) Polyamines in plants: An overview. *JCellMolBiol* **2**, 1-12.

Kumar, A., Altabella, T., Taylor, M. A., Tiburcio A. F. (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci.* **2**, 124-130.

Martin-Tanguy, J. (1997) Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol. Plant.* **100**, 675-688.

Niitsu, M., Samejima, K. (1993) Systematic analysis of naturally occurring linear and branched polyamines by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **641**, 115-123.

Ochman, H., Gerber, A. S., Hartl, D. L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**, 621-623.

Šebela, M., Radová, A., Angelini, R., Tavladoraki, P., Frébort, I., Peč, P. (2001) FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researches in biochemistry and physiology of plants. *Plant Sci.* **160**, 197-207.

Takahashi, T., Kakehi, J. (2010) Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann. Bot.* **105**, 1-6.

Tavladoraki, P., Schinina, M.E., Cecconi, F., Di Agostino, S., Manera, F., Rea, G., Mariottini, P., Federico, R., Angelini, R. (1998) Maize polyamine oxidase: primary structure from protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett.* **426**, 62-66.

Tavladoraki, P., Rossi, M. N., Saccuti, G., Perez-Amador, M. A., Polticelli, F., Angelini, R., Federico, R. (2006) Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiol.* Vol. 141, pp. 1519-1532.

Torrighiani, P., Rabiti A. L., Betti, L., Marani, F., Brizzi, M., Bagni, N., Canova, A. (1995) Improved method for polyamine determination in TMV a rod-shaped virus. *J. Virol. Methods* **53**, 157-163.

Wallace, H. M., Fraser, A. V., Hughes, A. (2003), A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* **376**, 1-14.

Yanagisawa, H., Kato, A., Hoshiai, S., Kamiya, A., Torii, N. (1987) Polyamine oxidase from water hyacinth. *Plant Physiol.* **85**, 906-909.

Yanagisawa, H., Hamashima, N., Kato, T. (1996) Polyamine oxidase from leaves of *Lilium longiflorum*: purification and properties. *J. Plant Physiol.* **149**, 657-662.

Seznam použitých zkratek

AOX	alkoholoxidas
APS	ammonium persulfate
DTT	dithiothreitol
FAD	flavinadenindinukleotid
GAP	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
K_i	inhibiční konstanta
K_m	Michaelisova konstanta
LB médium	Luria-Bertani médium
LSLB médium	low salt Luria-Bertani médium (LB médium s nízkým obsahem soli)
mPAO	maize polyamine oxidase (kukuřičná polyaminoxidas)
PAO	polyaminoxidas
PCR	polymerázová řetězová reakce
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium
YPDS	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol