

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Purifikace a enzymatická charakterizace předpokládané rostlinné adenosindeaminasy**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Petr Dvořák</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>RNDr. Lenka Dzurová, Ph.D.</b>
Rok:	2016

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

V Olomouci dne .....

Mé poděkování patří vedoucí práce RNDr. Lence Dzurové, Ph.D. za její čas, poskytnuté vědomosti, vstřícný přístup, odborné vedení a přátelské jednání.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Davidu Kopečnému, Ph.D. a Mgr. Tomáši Hluskovi za pomoc při měření vzorků a odbornou diskusi výsledků. V neposlední řadě bych rád poděkoval Mgr. Michaele Formanové za odbornou diskusi a cenné rady při tvorbě diplomové práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petr Dvořák
Název práce	Purifikace a enzymatická charakterizace předpokládané rostlinné adenosindeaminasy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	RNDr. Lenka Dzurová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

### Abstrakt

Adenosindeaminasy patří do amidohydrolasové rodiny (EC 3.5.4.-) a katalyzují ireverzibilní deaminaci adenosinu a 2'-deoxyadenosinu. Byly identifikovány v celé škále eukaryot i prokaryot. V odborné literatuře nejsou doposud uvedeny žádné informace popisující přítomnost a aktivitu těchto enzymů u rostlin, a to i přesto, že v genomových databázích existují geny kódující předpokládané rostlinné adenosindeaminasy. Tyto enzymy by mohly hrát klíčovou roli při vývoji rostlin.

Prezentovaná diplomová práce navazuje na již ukončenou bakalářskou práci se zaměřením na potvrzení aktivity předpokládané rostlinné adenosindeaminasy. V první řadě byla tato práce zaměřena na nalezení vhodných purifikačních podmínek pro SUMO modifikovanou adenosindeaminasu s následným kvantitativním odštěpením His-SUMO kotvy. Následně byla měřena aktivita třemi principově odlišnými metodami, z nichž jako nejvhodnější byla nakonec vybrána UHPLC. Aktivita adenosindeaminasy byla porovnávána s lidskou adenosindeaminasou a připravenou adenosindeaminasou podle Pospíšilová et al., 2008. U předpokládané rostlinné adenosindeaminasy byly finálně stanoveny kinetické parametry vůči pravděpodobně hlavnímu substrátu AMP.

Klíčová slova	Adenosindeaminasa, SUMO modifikace, SUMO proteasa, krystalizace proteinů, detekce aktivity adenosindeaminas.
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Petr Dvořák
Title	Purification and enzymatic characterization of putative plant adenosine deaminase
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	RNDr. Lenka Dzurová, Ph.D.
The year of presentation	2016

### Abstract

Adenosine deaminases belong to the amidohydrolase family (EC 3.5.4.-) and catalyse the irreversible deamination of adenosine and 2'-deoxyadenosine. They have been identified in a wide range of eukaryotes and prokaryotes. In the genome databases have been identified many genes, which are annotated as putative plant adenosine deaminases. But until now the presence and activity of these enzymes in plants was not confirmed. It is possible that they can play a crucial role in plant development.

The presented diploma thesis continues with work, which was done during finished bachelor thesis. The main ambition of the thesis was to confirm the putative plant adenosine deaminase activity. Primarily, this work was focused on finding the best purification conditions for SUMO-modified adenosine deaminase what was followed by quantitative cleavage of His-SUMO tag from the enzyme. Subsequently, the activity was measured by three different methods. As the most suitable was selected UHPLC. Adenosine deaminase activity was measured and compared with activity of human adenosine deaminase and adenosine deaminase prepared according to protocol describe in work Pospíšilová et al., 2008. Finally the kinetic parameters against probably the main substrate AMP have been determined.

Keywords	Adenosine deaminase, SUMO modification, SUMO protease, protein crystallization, detection of adenosine deaminase activity
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

<b>Cíle práce</b> .....	8
<b>1 Úvod</b> .....	9
<b>2 Současný stav řešené problematiky</b> .....	10
2.1 Adenosindeaminasy.....	10
2.1.1 Obecná charakteristika adenosindeaminas .....	10
2.1.2 RNA adenosindeaminasy.....	16
2.2 Rekombinantní proteiny .....	19
2.2.1 Proteinové fúzní kotvy.....	20
2.2.1.1 Typy fúzních kotev .....	20
2.2.2 Specifické proteasy odstraňující fúzní kotvy.....	23
2.2.3 SUMO modifikace .....	24
2.2.4 SUMO proteasa.....	28
2.3 Metody stanovení aktivity adenosindeaminas.....	32
2.4 Krystalizace proteinu.....	35
<b>3 Experimentální část</b> .....	38
3.1 Materiál .....	38
3.1.1 Přístrojové vybavení a chemikálie.....	38
3.1.2 Mikroorganismy a plasmidové konstrukty .....	40
3.2 Metody.....	41
3.2.1 Příprava zásobních roztoků, kultivačního LB média a agarových selekčních LB ploten .....	41
3.2.2 Transformace <i>E. coli</i> BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3) tepelným šokem.....	41
3.2.3 Kultivační a expresní podmínky .....	41
3.2.4 Lýze buněk <i>E. coli</i> BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3) obsahujících cílové plasmidy .....	42
3.2.5 Purifikace proteinů pomocí nízkotlaké afinitní chromatografie .....	43
3.2.6 Postup purifikace pro His-SUMO-ADA a AtADA2.....	43
3.2.7 Purifikace SUMO proteasy na Ni <sup>2+</sup> -NTA agarose .....	44
3.2.8 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přítomností SDS (SDS-Page) ....	44
3.2.9 Vizualizace SDS-Page gelů .....	45
3.2.10 Dialýza a zakoncentrování proteinů .....	45
3.2.11 Stanovení koncentrace rekombinantních proteinů.....	46
3.2.12 Stanovení aktivity SUMO proteasy .....	46

3.2.13 Kvantitativní odštěpení SUMO kotvy s následnou purifikací .....	46
3.2.14 Měření aktivity adenosindeaminasy .....	47
3.2.14.1 Stanovení aktivity pomocí spektrofotometru .....	47
3.2.14.1.1 Přímá detekce .....	47
3.2.14.1.2 Spřažená reakce .....	48
3.2.14.2 Stanovení aktivity a kinetických parametrů pomocí metody UHPLC ...	48
3.2.15 Příprava vzorku pro UHPLC .....	50
3.2.16 Analýza vzorků pomocí UHPLC .....	50
3.2.17 CD spektroskopie.....	51
3.2.18 Krystalizace adenosindeaminasy .....	52
<b>4 Výsledky .....</b>	<b>53</b>
4.1 Optimalizace purifikačních podmínek His-SUMO-ADA .....	53
4.2 Příprava rekombinantní SUMO proteasy .....	55
4.3 Stanovení aktivity rekombinantní SUMO proteasy .....	57
4.4 Kvantitativní odštěpení His-SUMO kotvy .....	58
4.5 Spektrofotometrické stanovení aktivity rekombinantní adenosindeaminasy .....	59
4.6 Detekce aktivity a kinetických parametrů proteinu pomocí metody UHPLC.....	62
4.7 Porovnání struktur AtADA1 a AtADA2 metodou cirkulárního dichroismu .....	64
4.8 Optimalizace krystalizace proteinu .....	66
<b>5 Diskuze .....</b>	<b>67</b>
<b>6 Závěr.....</b>	<b>71</b>
<b>7 Literatura.....</b>	<b>72</b>
<b>8 Seznam použitých symbolů a zkratk .....</b>	<b>80</b>

## **Cíle práce**

- 1.** Vypracovat literární rešerši na téma: adenosindeaminasy, příprava rekombinantních proteinů, SUMO modifikace, SUMO proteasa, detekce aktivity adenosindeaminas, krystalizace proteinů.
- 2.** Optimalizace purifikačních podmínek pro His-SUMO-ADA.
- 3.** Příprava aktivní SUMO proteasy s následným kvantitativním odštěpením His-SUMO kotvy z rekombinantní adenosideaminasy.
- 4.** Stanovení aktivity připravené adenosindeaminasy.
- 5.** Nalezení vhodných krystalizačních podmínek pro připravený rekombinantní protein.



## 1 Úvod

Adenosindeaminasy patří do skupiny enzymů nazývaných amidohydrolasy (EC 3.5.4.-) a katalyzují cílenou deaminaci adenosinu na inosin. Jejich studium společně s dalšími enzymy, podílejícími se na regulaci hladin nukleotidů v organismu, vedlo k objasnění zákonitostí jednotlivých metabolických drah purinových a pyrimidinových bází (Moffatt et al., 2002). Nefunkčnost jednoho z celé řady enzymů funkčních v metabolických drahách nukleotidů může mít za následek velké komplikace, případně až úmrtí cílového organismu (Nyhan, 2005). Z toho důvodu je pochopení reakčních mechanismů a objasnění struktury jednotlivých enzymů předmětem vědeckého bádání.

U rostlin, jakožto u jedněch z mála organismů, doposud nebyla prokázána přítomnost aktivity adenosindeaminas. Některé vědecké práce dokonce tvrdí, že u rostlin nejsou tyto enzymy vůbec přítomny a jejich aktivita je nahrazena jinými enzymy (Moffatt et al., 2002). Jelikož v genomové databázi *Arabidopsis thaliana* a dalších rostlin jsou přítomny geny kódující domnělé adenosindeaminasy, je jejich přítomnost v rostlinách stále otevřenou otázkou. Pro úplné potvrzení nebo vyvrácení přítomnosti adenosindeaminas u rostlin je zapotřebí produkty těchto domnělých genů charakterizovat a dle získaných výsledků odpovědět na danou otázku.

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Adenosindeaminasy

#### 2.1.1 Obecná charakteristika adenosindeaminas

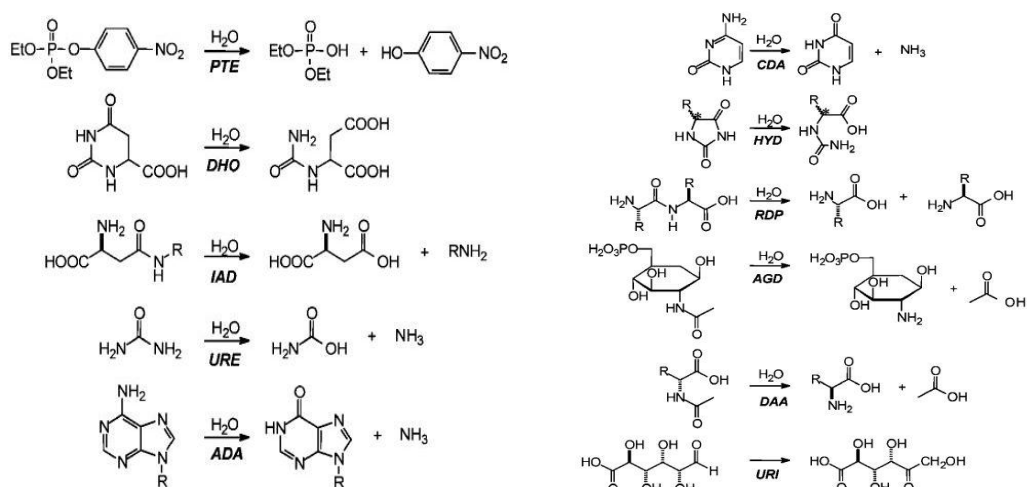
Adenosindeaminasy (ADA, EC 3.5.4.4) jsou enzymy vyskytující se ve většině známých žijících organizmů. Vzhledem k jejich širokému výskytu a nezastupitelnosti v řadě metabolických procesů jsou tyto enzymy velmi důkladně studovány. Základní reakcí, kterou ADA katalyzují, je přeměna adenosinu (Ado) nebo 2'-deoxyadenosinu na inosin nebo 2'-deoxyinosin za současného uvolňování amoniaku.

ADA je schopná metabolizovat i jiné substráty, jejichž afinita k enzymu je však podstatně nižší. Mezi ně patří například adenin (Ade), adenosinmonofosfát (AMP), adenosindifosfát (ADP) a adenosintrifosfát (ATP) (Jun et al., 1994). Některé články poukazují na schopnost štěpit různé deriváty Ado a Ade, jako jsou adeninarabinosid (Ling et al., 1991), tRNA (Keegan et al., 2000), 6-methoxypurinribosid (Lupidi, 1998) a mnohé další. U dvou rekombinantně připravených kvasinkových ADA ze *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* byla zjištěna enzymatická aktivita vůči některým rostlinným hormonům z řady cytokininů, jako je například *cis*-zeatin, *N*6-isopentenyladenin, kinetin, *m*-topolin (Pospíšilová et al., 2008). Hodnota pH optima se významně liší u ADA pocházejících z různých druhů organizmů. Obvykle se omezuje na pH 5,0 až 8,0 (Pospíšilová a Frébort, 2007).

Adenindeaminasy (ADE) a AMP-deaminasy katalyzují deaminaci na heterocyklu Ade za vzniku jeho 6-oxo produktu. Společně s ADA jsou tyto enzymy akční v metabolismu purinů. Konkrétně ADA a ADE jsou aktivní v recyklační dráze a AMP-deaminasy jsou aktivní v katabolismu purinových nukleotidů.

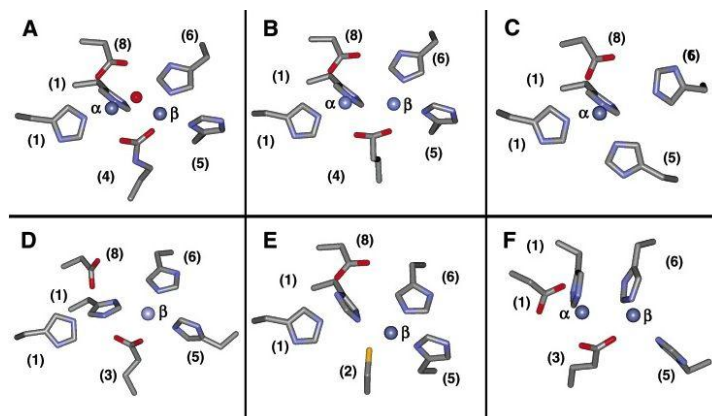
V práci publikované roku 2005 Seibert et al. byly ADA zařazené do amidohydrolasové superrodiny, která se vyznačuje několika typickými strukturními znaky a zahrnuje pozoruhodnou sadu enzymů, které katalyzují hydrolýzu široké škály substrátů nesoucích amidovou nebo esterovou funkční skupinu na uhlíku nebo fosforovém centru (Obr. 1). Hlavním charakteristickým znakem pro tuto skupinu hydrolytických enzymů je mononukleární nebo binukleární kovové centrum obsahující „(α/β)<sub>8</sub>-barelový“ strukturní motiv. Jedná se o metaloenzymy mající ve svém aktivním místě dvojmocný atom zinku, niklu nebo železa. Způsob a počet vázaných iontů

v kovovém centru dělí amidohydrolasy do 7 podskupin, přičemž ADA, ADE a AMP-deaminasy společně s cytosindeaminasou patří do podskupiny 3 (Obr. 2). Ta se vyznačuje tím, že ve svém aktivním místě má pouze jeden atom  $Zn^{2+}$  (ADA, ADE, AMP-deaminasa) nebo  $Fe^{2+}$  (cytosindeaminasa). Podskupině 3 chybí jeden aminokyselinový postranní řetězec vycházející ze „4  $\beta$ -barelového“ řetězce, který tvoří překlenutí mezi druhým chybějícím atomem kovu a tím pádem je pozměněna pozice některých histidinových reziduí (Seibert, 2005). ADA se všeobecně vyskytují jako monomery nebo dimery (Cristalli et al., 2001).



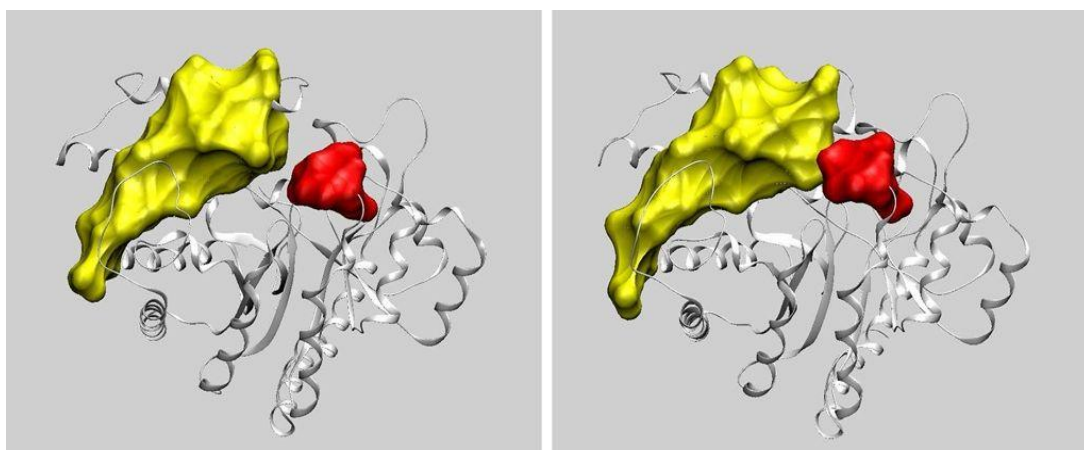
**Obrázek 1 - Reakce enzymů patřících do amidohydrolasové superrodiny**

PTE - fosfotriesterasa; DHO - dihydroorotasa; IAD - isoaspartyl dipeptidasa; URE - ureasa; ADA - adenosindeaminasa; CDA - cytosindeaminasa; HYD - hydantoinasa; RDP - renaldipeptidasa; AGD acetylglukosamin-6-fosfátdeacetylasa; DAA - D-aminokyselinová deacetylasa; URI - uronatisomerasa (převzato a upraveno podle Seibert, 2005).



**Obrázek 2 - Možnosti vazby jedno nebo dvojmocného kationtu v aktivním místě enzymů amidohydrolasové superrodiny**

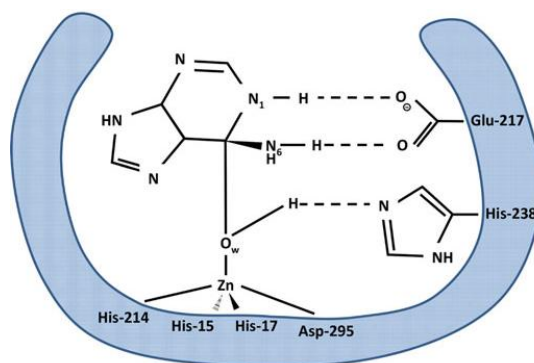
A) subtyp I; B) subtyp II; C) subtyp III; D) subtyp IV; E) subtyp V; F) subtyp VI (převzato a upraveno podle Seibert, 2005).



**Obrázek 3 - Otevřená a zavřená forma ADA ze skotu**

A) Otevřená forma (PDB kód 1VFL); B) zavřená forma s 6-hydroxyl-1,6-dihydropurinribosidem (PDB kód 1KRM) (převzato a upraveno z Cortes et al., 2015).

Ve všech vyřešených krystalových strukturách ADA byl vždy nalezen „( $\alpha/\beta$ ) - barelový“ motiv s aktivním místem umístěným v dutině  $\beta$ -barelu na C-konci s těsně vázaným atomem  $Zn^{2+}$ , což je nezbytné pro katalytickou funkci a stabilitu nativního proteinu (Wilson et al., 1991; Kinoshita et al., 2005). Koordinační geometrie  $Zn^{2+}$  v aktivním místě je trigonální bipyramida. To znamená, že je koordinován třemi imidazolovými postranními řetězci His15, His17 a His214 a jedním karboxylátem z postranního řetězce Asp295 (Wang et al., 1998). Aktivní místo ADA může přecházet mezi dvěma konformacemi (Obr. 3). Při nepřítomnosti substrátu se enzym nachází v otevřené formě, kdežto uzavřená forma je obvykle pozorována při interakci s hlavními substráty nebo deriváty obsahujícími ve své struktuře adeninový heterocyklus (Kinoshita et al., 2005). Samotná katalytická reakce je zahájena vytvořením hydroxidového nukleofilu z molekuly vody, která interaguje s atomem zinku při přenesení protonu na Glu217. Protonovaný Glu217, nacházející se ve stejné rovině s purinovým kruhem, aktivuje substrát pro jeho následnou adici. Dochází přitom ke tvorbě dvojné vazby mezi C6 a N1 atomy purinového kruhu, který se tím stává více citlivým vůči nukleofilnímu ataku hydroxidové skupiny vázané na  $Zn^{2+}$ . Vzniká tak tetraedrický meziprodukt na C6 uhlíku, který je v interakci 6-OH skupinou vázanou  $Zn^{2+}$  a polárními skupinami His238 a Asp295. V posledním kroku je k C6 amino skupině připojen proton. Dochází k rozpadu tetraedrického meziproduktu a uvolňování amoniaku a inosinu, jakožto výsledných produktů (Obr. 4) (Wu et al., 2010).



**Obrázek 4 - Schematický diagram transitního stavu při reakci katalyzované ADA**  
(převzato a upraveno z Cortes et al., 2015).

Nutnost studia ADA vyplývá z jejich vlivu na řadu metabolických pochodů, ve kterých je tento enzym u savců přítomen. Mnoho z nich je spojeno s hlavním substrátem Ado, který hraje důležitou roli v různých metabolických a patologických onemocněních, jako je astma, hypoxie nebo srdeční ischemie. Taktéž je aktivní při regulaci závažnosti zánětu v průběhu imunitní odpovědi a reguluje intrarenální metabolickou funkci ledvin (Persson et al., 2013; Cicala a Ialenti, 2013). Stále větší pozornost je nyní věnována roli Ado, jako endogennímu imunoregulátoru v patogenezi rakoviny, a jeho vlivu na funkci lidského mozku (Kumar, 2013). Adenosinová nerovnováha bývá spojována s onemocněními, jako jsou Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba či schizofrenie (Selley, 2004; Wardas, 2008).

U lidí jsou přítomny dvě isoformy ADA1 a ADA2, které byly již enzymaticky charakterizovány. Dalším identifikovaným enzymem u lidí je „ADA-podobný“ (ADA-like, ADAL nebo ADA3) enzym, jehož funkce je zatím neobjasněna (Maier et al., 2005; Rosemberg et al., 2007). Nejvíce prostudovaným enzymem je lidská ADA1, jejíž gen je tvořen 11 introny o celkové velikosti 32 kb a je lokalizován na 20. chromozomu (20q12-q13.11). ADA1 je produkována ve všech tkáních a erytrocytech jako 41 kDa monomer tvořený 363 aminokyselinami (AMK). Nejvyšší koncentrace ADA1 se nachází ve dvanáctníku a lymfatickém systému, konkrétně v lymfatických uzlinách, slezině a brzlíku (Chechik et al., 1981). Její hlavní funkcí je snižovat hladinu intracelulárního Ado a 2'-deoxyadenosinu, čímž chrání buňky před apoptosou. Vysoká hladina Ado je pro buňky toxická, zejména pro lymfocyty.

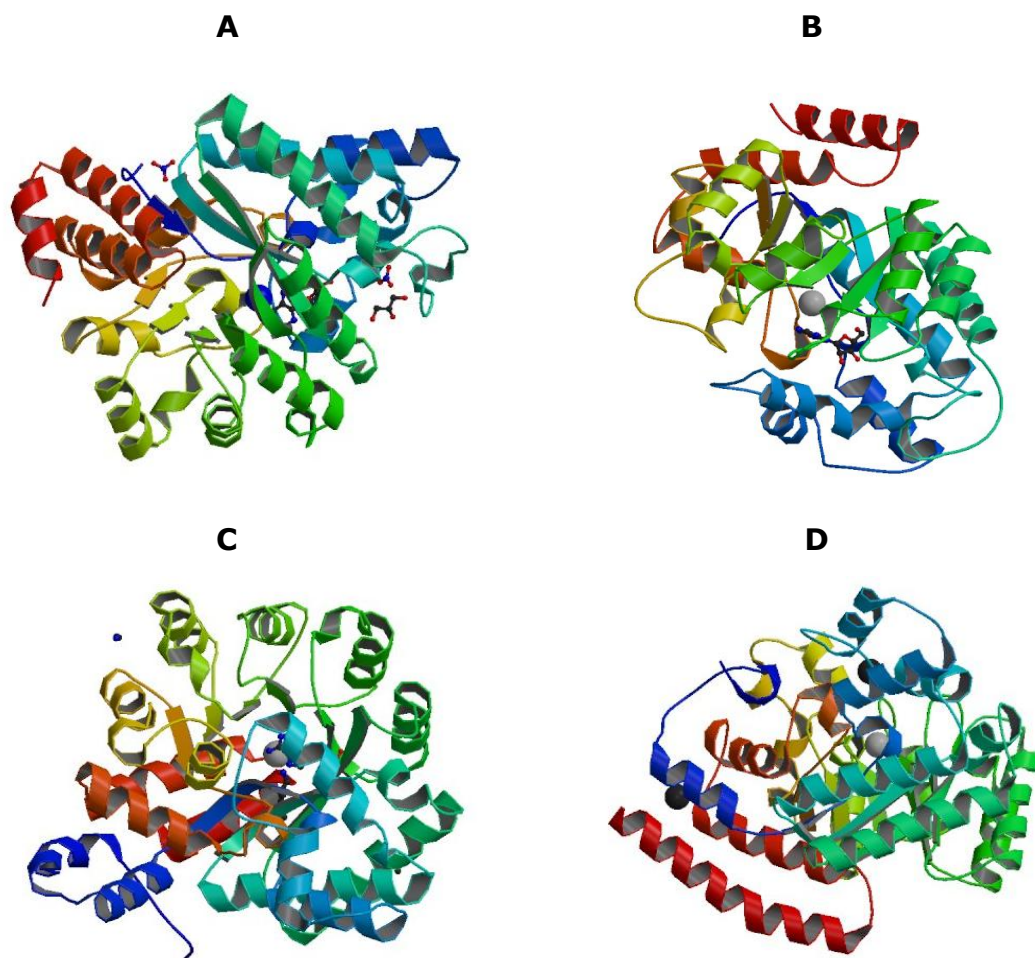
ADA1 má zásadní úlohu při zrání lymfoidních buněk a vývoji imunitního systému (Blackburn et al., 2005). Výrazný nedostatek ADA1 má za následek těžkou kombinovanou imunodeficienci (SCID - Severe Combined Immunodeficiency

Diseases), což je autozomálně recesivní metabolická porucha, která byla jako první geneticky léčena pomocí cílové genové terapie (Blaese et al., 1995). Nemoc je charakteristická tím, že nedochází ke správnému vývoji T a B lymfocytů, což vede k jejich následné nefunkčnosti. Důsledkem je kompletní absence buněčné a humorální obranyschopnosti. U pacientů trpících SCID bylo identifikováno více než 70 mutací způsobených záměnou až 30 různých aminokyselin (Hershfield, 2003).

Druhá isoforma ADA2 byla nejdříve popsána jako růstový faktor u hmyzu. Její deaminasová aktivita byla zjištěna až později (Iijima et al., 2008). Gen je lokalizován na 22. chromozomu (22q11.2) a je tvořen 41 kb. ADA2 má jen malý podíl na celkové aktivitě ADA v tkáních, ale je převládající isoformou cirkulující v séru. Je uvolňována monocyty a následně makrofágy, což koresponduje s její zvýšenou aktivitou a zvýšenou hladinou makrofágů v zánětlivých tkáních (Iwaki-Egawa et al., 2006).

ADA2 má stonásobně nižší afinitu k Ado a 2'-deoxyadenosinu a své maximální aktivity dosahuje při mírně kyselém pH v porovnání s ADA1. Došlo u ní nejspíše v průběhu evoluce ke zvýšení aktivity v místech s nižším pH, kde je zvýšená koncentrace Ado jako je zánět, hypoxie nebo růst nádoru (Zavialov et al., 2010; Stubbs et al., 2000). Mezi další nemoci, u kterých je přítomné zvýšení nebo snížení hladiny ADA1 a ADA2, patří hemolytická anémie, tuberkulóza, systémový lupus, revmatoidní artritida, fibromyalgie, některé typy karcinomu, neurologické poruchy a meningitida (Cortes et al., 2015).

Geny kódující domnělé ADA byly díky sekvenování celých genomů nalezeny v celé řadě prokaryot a eukaryot (hmyz, nižší obratlovci, ryby, savci či rostliny). Některé z nich již byly připraveny jako rekombinantní proteiny, enzymaticky charakterizovány a byla u nich dokonce vyřešena krystalová struktura. Na základě porovnání aminokyselinové sekvence předpokládané rostlinné ADA (At4g04880) se sekvencemi v proteinové data bance (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>; 7.4.2016) bylo nalezeno 17 vyřešených struktur ADA, z nichž ani jedna nebyla rostlinná. Z eukaryot je vyřešena struktura pouze u skotu, myši, lidské ADA (obě isoformy, Obr. 5A), dále ADA z *Plasmodium vivax* a *yoelii* (Obr. 5C, 5B). Z prokaryotických ADA byla vyřešena struktura u *Burkholderia ambifaria* (Obr. 5D).



**Obrázek 5 - Vyřešené struktury ADA**

A) Lidská ADA1 (PDB kód 3IAR); B) myší ADA (PDB kód 1FKW); C) ADA z *Plasmodium vivax* (PDB kód 2PGF); D) ADA z *Burkholderia ambifaria* (PDB kód 4GXW, převzato z <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>; 10.3.2016).

Přítomnost ADA v rostlinách nebyla nikdy zcela prokázána, a to i přesto, že v genomových databázích řady rostlin jsou obsaženy geny pro tento enzym. Téměř u žádného genu nebyl doposud získán jeho odpovídající rekombinantní produkt a prověřena enzymatická aktivita vůči substrátům. V odborných publikacích jsou dokonce zastávány názory o celkové nepřítomnosti ADA v rostlinách a předpokládá se, že jejich funkce v recyklační dráze purinových nukleotidů je zastoupena enzymem adenosinkinasou (Gowda et al., 2007; Zrenner et al., 2006). Řada hypotetických produktů rostlinných ADA genů obsahuje na základě sekvenční homologie adenosinovou/adenosinmonofosfátovou konzervovanou cd00443 doménu, která je přítomná u řady prokaryotických a eukaryotických ADA patřících do adenosin/adenindeaminasové rodiny (Pospíšilová a Frébort, 2007). U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* jsou přítomny dva domnělé geny pro ADA (At1g01760,

At4g04880) a dva geny pro transferovou (tRNA)-ADA. Z nich byl již jeden gen (At4g04880) klonován do vektorů pET100/D-TOPO a pET151/D-TOPO a následně transformován do expresní bakterie *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3), ze které byl získán a purifikován cílový protein. Aktivita rekombinantně připravené ADA byla takřka mizivá (Pospíšilová et al., 2008). Přítomnost ADA v rostlinách však zůstává stále otevřenou otázkou.

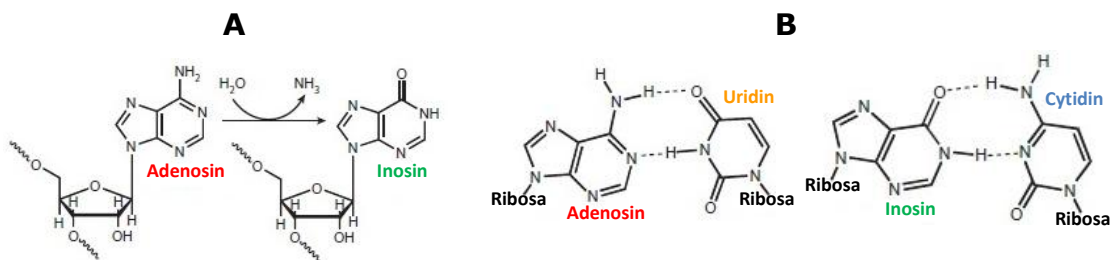
### 2.1.2 RNA adenosindeaminasy

Nejenom ADA, ale i další enzymy deaminují Ado v jeho biologicky aktivních molekulách, čímž dochází k celé řadě ovlivnění biochemických pochodů organismu. Existují dvě skupiny RNA adenosindeaminas, u kterých byla prokázána jejich deaminační aktivita. ADA působící na dvouvláknovou RNA (dsRNA) (ADAR) a ADA působící na tRNA (ADAT), kdy enzymy těchto skupin vykazují specifitu pro modifikované místo.

ADAR jsou enzymy vyskytující se u eukaryot patřících do říše živočichů, jejichž hlavní funkcí je deaminovat Ado za vzniku inosinu v řetězci dsRNA v procesu zvaném RNA editace (Obr. 6A). U živočichů, konkrétně u myši a lidí, jsou přítomny 3 geny kódující jednotlivé formy těchto enzymů. ADAR1 a ADAR2 jsou exprimovány ve většině tkání a jejich schopnost deaminovat dsRNA byla již potvrzena (Kim et al., 1994). Třetím enzymem je ADAR3, která je exprimována pouze v centrálním nervovém systému. Funkce tohoto enzymu je doposud neobjasněna, jelikož u něho nebyla prokázána deaminační aktivita (Keegan et al., 2004).

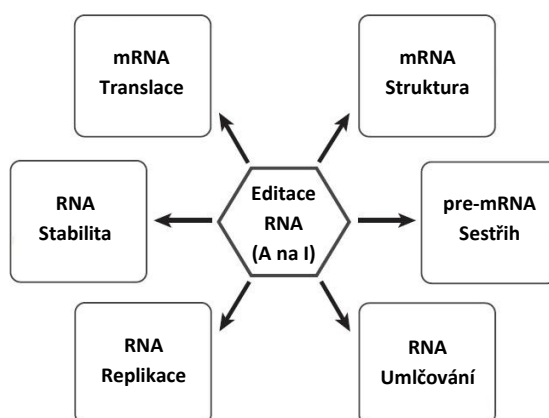
Význam přeměny Ado na inosin v RNA spočívá ve strukturní podobnosti s guanosinem, kdy může dojít k záměně aminokyseliny v průběhu translace v důsledku špatného přečtení kodonu (Obr. 6B). Taktéž může docházet ke změnám sestřihů (splicing) při tvorbě mRNA z pre-mRNA. ADAR mohou upravovat nekódující RNA. Vykazují také některé regulační funkce, jako je ovlivnění biogeneze, zpracovávání a cílová selekce siRNA, miRNA a mnohé další (Obr. 7) (Zinshteyn et al., 2009). U rostlin probíhá taktéž editace mRNA, která slouží ke kontrole genové exprese z organel. Editace mRNA probíhá na nukleotidech cytosinu a uracilu, a to přeměnou C na U nebo U na C (Takenaka et al., 2013).





**Obrázek 6 - Deaminace dsRNA**

A) Reakce katalyzovaná enzymem ADAR; B) změna párování bází po deaminaci adenosinu (převzato a upraveno z Nishikura et al., 2010).

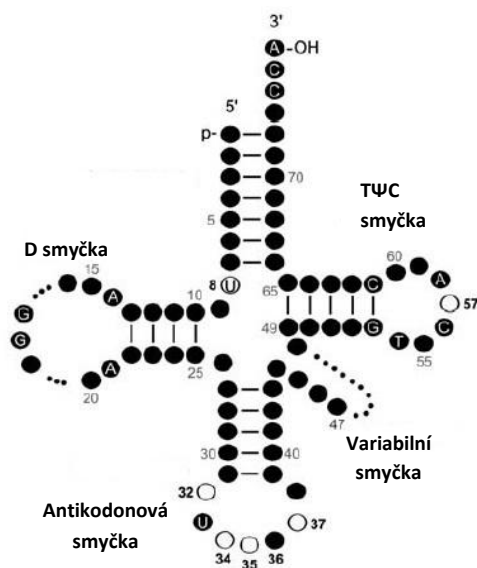


**Obrázek 7 - Děje ovlivněné ADAR prostřednictvím RNA editace** (převzato a upraveno z George et al., 2014).

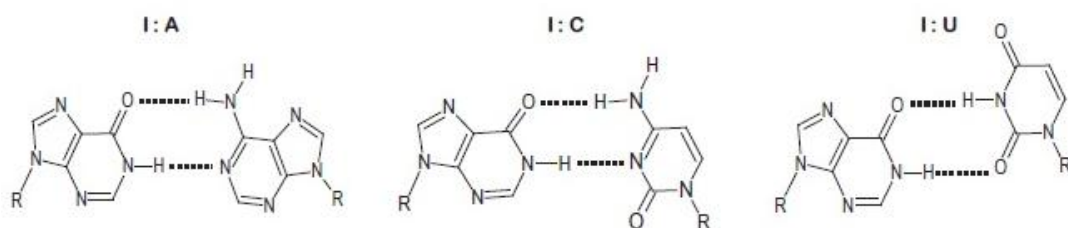
tRNA představují základní molekuly potřebné při přepisu mRNA do aminokyselinové sekvence. Obsahují antikodon složený z reziduí 34, 35 a 36 (viz Obr. 8), který rozpoznává kodony na mRNA, a přiřazuje tak do rostoucího řetězce další AMK. Pro získání funkční molekuly tRNA je potřeba mnoho specifických modifikací, mezi které patří i deaminace Ado pomocí ADAT (Su et al., 2011). Výsledný produkt těchto enzymů (inosin) byl nalezen ve třech polohách tRNA, a to v poloze 34 jako první nukleotid antikodonu (wobble-pozice), 37 (následující hned za kodonem) a 57 na TΨC-smyčce (Juhling et al., 2009). Přítomnost samotných nebo methylovaných inosinů v těchto třech pozicích je velmi rozmanitá a liší se mezidruhově. U většiny organismů bývá inosin v poloze 37 a 57 methylován, přičemž inosin v poloze 34 je již výsledkem posttranslační modifikace (Grosjean et al., 1996). U archeí byl jako jediný nalezen nemodifikovaný inosin v poloze 57 a u hypertermofilních bakterií je v poloze 57 Ado přeměněn na dimethylováný inosin (Yamaizumi et al., 1982). U 8 eukaryotických cytosolických tRNA je v pozici 34 přítomen inosin. Samotná deaminační reakce je

katalyzována heterodimerním enzymem tRNA adenosindeaminasou (hetADA) složenou z dvou podjednotek ADAT2/Tad2 a ADAT3/Tad3 (Gerber et al., 1999). U prokaryot byla charakterizována pouze jedna ADAT (pojmenována TadA) (Wolf et al., 2002).

Význam těchto deaminací v poloze 34 vysvětluje lepší schopnost párování inosinu s dalšími ribonukleotidy mRNA (A, U a C) (Obr. 9), zatímco Ado je schopný se párovat pouze s uridinem. Skutečnost, že inosin lze spárovat s více deoxynukleosidy může rozšiřovat počet kodonů, které tRNA rozpozná. Specifita rozpoznávání kodonu a interakce s ribozomálními podjednotkami je taktéž ovlivněna modifikacemi v blízkosti antikodonu v poloze 37, 32 a dalšími (Torres et al., 2014). K deaminaci nedochází pouze na Ado, ale také na cytidinu za vzniku uridinu pomocí tRNA-cytidindeaminas.



**Obrázek 8 - Struktura tRNA**  
(převzato a upraveno z Su et al., 2011).



**Obrázek 9 - Párování inosinu s adenosinem, cytosinem a uridinem**  
(převzato a upraveno z Torres et al., 2014).

## 2.2 Rekombinantní proteiny

Získání rekombinantního proteinu představuje v genovém inženýrství několika krokovou proceduru. První fází je získání odpovídajícího genu, který může být připraven z izolované mRNA cílového organismu s následnou reverzní transkripcí do komplementární DNA (cDNA) a specifickou PCR reakcí, kdy se získá mnohonásobně replikovaný cílový gen. Jako templát může být také použita i genomová DNA, avšak u eukaryotických organismů je velmi pravděpodobné, že získaný gen bude obsahovat introny. Dnes je již zcela běžné, že gen kódující studovaný protein, je připraven synteticky. Následně je gen pomocí klonovacích technik zaveden do vhodného vektoru, a poté transformován do expresního systému, kterým je finálně produkován rekombinantní protein. Díky pokrokům v genomice, proteomice a bioinformatice se mnohonásobně zvýšilo využívání rekombinantní DNA jako způsobu studia proteinů. Rekombinantní DNA technologie a afinitní značení umožňují rychlou identifikaci, modifikaci, produkci, izolaci a cílenou purifikaci proteinu z expresního hostitelského systému.

Mezi nejčastěji využívané expresní systémy patří bakterie a kvasinky. Pro expresi mohou být také využity i rostliny, hmyzí buňky či savčí buněčné linie. Každý z těchto expresních systémů je vhodný pro specifický druh proteinů. Výběr optimálního expresního hostitele závisí na velikosti proteinu, buněčné lokalizaci, posttranslačních modifikacích a výtěžku exprese cílového proteinu. I přes vhodný výběr expresního hostitele se můžeme potýkat s problémy, jako jsou exprese proteinu do inkluzních tělísek, malá rozpustnost proteinu, toxicita produktu pro hostitelskou buňku, nesprávné sbalení proteinu a s tím související nefunkčnost enzymu. Tyto problémy jsou nejčastěji řešeny změnou expresního hostitele, změnou síly promotoru, expresí za pomoci chaperonu nebo expresí proteinu ve formě fúzního proteinu (Frey a Görlich, 2014).

Běžným přístupem pro překonání některých expresních problémů a přípravu nativních proteinů je využití fúze studovaného proteinu s jiným proteinem (proteinová fúzní kotva). Fúze se provádí buďto na N- nebo C-konci proteinu. Fúzní protein je většinou vkládán v tandemovém uspořádání spolu s afinitními, detekčními nebo sekrečními značkami. V ideálním případě lze tyto značky v průběhu purifikace odstranit, což nám umožňuje získat nativní protein (Arnau et al., 2006). Odstranění je prováděno místně specifickými proteasami, které rozpoznávají jedinečnou

aminokyselinovou sekvenci, která je vložena mezi cílový protein a proteinovou fúzní kotvu.

### 2.2.1 Proteinové fúzní kotvy

Příprava rekombinantních proteinů se dnes již neobejde bez používání proteinových fúzních kotev. Výběr vhodného expresního systému a fúzních kotev, jak samotných nebo v tandemovém uspořádání, je nutno velmi dobře promyslet již na samotném začátku experimentu. Pro proteiny pocházející z různých organizmů (prokaryota, eukaryota) není vždy vhodné použít stejnou sadu fúzních kotev. Zásadní rozdíl při výběru hraje také cíl použití připraveného rekombinantního proteinu, jako je například strukturní analýza (NMR, rengenostrukturní analýza, kryoelektronová mikroskopie), testování funkční aktivity nebo jiné.

#### 2.2.1.1 Typy fúzních kotev

Glutathion-S-transferasa, maltosu vázající protein, thioredoxin A, SUMO (Viz kapitola 2.2.3), protein disulfidisomerasa I, ketosteroidisomerasa, hemaglutininový antigen, FLAG epitop, streptavidin vázající peptid, poly-arginin a poly-histidin patří v současné době mezi nejvíce vyhledávaná řešení pro usnadnění přípravy, purifikace a detekce rekombinantního proteinu.

**Glutathion-S-transferasa (GST)** je 26 kDa velký protein pocházející z *Schistosoma japonicum*, který je schopný chránit studovaný protein před intracelulární proteolýzou. Stabilizuje proteiny v rozpustné frakci jako monomery nebo homodimery (Kaplan et al., 1997). Purifikace proteinů probíhá na imobilizovaném glutathionu, přičemž protein je následně vyplaven 10 mM redukovaným glutathionem. Detekce výsledného fúzního proteinu může být provedena pomocí enzymatického testu nebo specifické protilátky. Před GST bývá ve většině vektorů přidávána sekvence, která je rozpoznávána specifickou proteasou a umožňuje její odstranění. GST může být přidáván na N- i C-konec a využíván ve všech dostupných expresních systémech (Mitchell et al., 1993; Rudert et al., 1996).

**Maltosu vázající protein (MBP)** je 42 kDa velký produkt genu *maltE* pocházející z *E. coli* K12 (Duplay et al., 1988). Může se nacházet na N- i C-konci proteinu. Umožňuje zvýšení výtěžku exprese společně se zvýšením rozpustnosti modifikovaného

proteinu. Bylo prokázáno, že pozitivním způsobem ovlivňuje skládání eukaryotických proteinů exprimovaných v bakteriálním hostiteli (Kapust et al., 1999). Purifikace fúzního proteinu je prováděna na afinitní amylosové koloně. Pro eluci je využíván roztok 10 mM maltózy v pufru. Přečištěný protein lze pak velmi snadno detekovat pomocí imunotestu. Za MBP bývá také vkládána sekvence rozpoznávaná specifickou proteasou (Factor Xa) pro jeho odstranění. Nevýhodou je velikost MBP, kdy fúze s většími eukaryotními proteiny již není zcela vhodná pro expresi v *E. coli*, pro kterou je vrchní hranice translace proteinu 50-60 kDa.

**Thioredoxin A (TrxA)** je protein pocházející z *E. coli* o velikosti 11,6 kDa. Jeho přednosti spočívají ve vysoké rozpustnosti v cytoplasmě společně s tepelnou stabilitou, které jsou propůjčeny i studovanému proteinu (LaVallie et al., 2000). TrxA napomáhá krystalizaci proteinů, i když ve většině případů bývá před krystalizací proteinu odstraňován specifickými proteasami (Corsini et al., 2008). Modifikace může být vkládána na oba konce proteinu. Pro purifikaci fúzního proteinu musí být použita jiná fúzní kotva (nejčastěji poly-histidinová kotva), jelikož TrxA sám o sobě neumožňuje afinitní purifikaci. Expres proteinu obsahující TrxA modifikaci je možná jak v prokaryotických, tak i eukaryotických systémech.

**Protein disulfidisomerasa I (PDI1)** je 21,1 kDa velký protein, jehož funkce je katalyzovat tvorbu disulfidických vazeb v bakterii *E. coli* (Martin et al., 1993). Protein s PDI1 fúzí může být exprimován buď do periplasmy díky signální sekvenci obsahující PDI1 nebo do cytoplasmy, a to použitím vektoru obsahujícího delecí signální sekvence v PDI1. Tato modifikace podporuje rozpustnost proteinu, a to ve srovnání s TrxA až dvojnásobně (Zhang et al., 1998). Expres do neredukčního prostředí periplasmy může zlepšit skládání cílového proteinu. Je vhodná pro proteiny obsahující značné množství disulfidických vazeb. Pro purifikaci musí být zařazena další fúzní kotva, jelikož samotný PDI1 nelze využít pro afinitní purifikaci. Fúze je možná na N- i C-konci a je využívána především v prokaryontních expresních systémech.

**Lidský c-Myc epitop** (AMK sekvence - EQKLISEEDL) je jedna z prvních detekčních kotev s možností fúze na obou koncích proteinu, kdy při detekci rekombinantního proteinu bývají využívány metody western blot, imunoprecipitace a průtokové cytometrie (Kipriyanov et al., 1996). c-Myc epitop může být využit také při purifikaci proteinu na divinylsulfon-aktivované agarose nesoucí protilátku mAb9E10.

Tento druh purifikace se využívá jen velmi zřídka, jelikož eluce vyžaduje velmi nízké pH, které může negativně ovlivnit aktivitu proteinu (McKern et al., 1997).

**FLAG epitop** je krátký hydrofilní peptid (DYKDDDDK), který je velmi často používán k detekci produktu. Umožňuje purifikaci fúzního proteinu na imobilizované monoklonální protilátce v nedenaturačním prostředí a eluce je prováděna snížením pH nebo přidáváním chelatačního činidla - kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) (Hopp et al., 1988). FLAG epitop může být štěpen pomocí enterokinasy, která štěpí uvnitř sekvence epitopu (Maroux et al., 1971).

**Poly-argininová kotva (Poly-R)** se skládá nejčastěji z 5 nebo 6 za sebou jdoucích argininů vkládaných převážně na C-konec rekombinantního proteinu. Takto modifikovaný produkt bývá purifikován pomocí adsorpce na iontoměničovém SP-Sephadexu. Protein je vyplavován pomocí lineárního gradientu NaCl při alkalickém pH (Sassenfeld et al., 1984). Poly-R kotva může být odstraněna díky karboxypeptidase B. Při výběru této kotvy je důležité brát v potaz možnost ovlivnění terciální struktury proteinu skrz tvorbu hydrofobního C-konce proteinu (Sassenfeld et al., 1984).

**Poly-histidinová kotva (Poly-H)** je nejhojněji využívanou purifikační modifikací (Manjasetty et al., 2008). Její výhodou je nízká imunogenita, malá velikost (využívá se 3 - 10 histidinů v sérii), možnost purifikace při nativních nebo denaturačních podmínkách a jen velmi zřídka dochází k ovlivnění aktivity proteinu při umístění na C- nebo N-konci proteinu (Chaga et al., 2001). Fúzní protein bývá purifikován pomocí imobilizované metalo-afinitní chromatografie (IMAC), kdy v imobilizované matici je koordinován iont přechodného kovu ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), který vytváří koordinační vazby s imidazolovými jádry obsaženými v histidinu. Eluce rekombinantního proteinu bývá prováděna gradientem imidazolu (20 - 250 mM) v roztoku pufru, změnou pH nebo metalovou chelatací. Během nanášení fúzního proteinu na afinitní kolonu může docházet k nespécifickému navázání hostitelských proteinů. Zkrácením doby nanášení (3 hod a méně) nebo přidáním nízké koncentrace imidazolu (2 - 50 mM) do nanášecího pufru mohou být tyto nespécifické vazby eliminovány. Po úspěšné purifikaci je nutné odstranit imidazol dialýzou, jelikož může mít za následek vznik proteinových agregátů a ovlivnit tím funkčnost proteinu nebo interferovat v NMR a krystalografické analýze (Hefti et al., 2001).

**Streptavidin vázající kotva II (WSHPQFEK)** je upravená varianta původně používané streptavidin vázající kotvy (WRHPQFGG), pocházející z proteolytický

zkrácené verze bakteriálního proteinu (Schmidt et al., 1993). Tato modifikace je považována za inertní a vysoce odolnou vůči buněčným proteasám, avšak není vhodná pro purifikaci za denaturačních podmínek. Může být použita společně s mírnými detergenty a je optimální pro purifikaci rekombinantních proteinů za fyziologických podmínek. Specifickou vazbu zajišťuje imobilizovaný Strep-Tactin, kdy jako eluční činidlo je použit roztok obsahující desthiobiotin. Výhodou této kotvy je její nezávislost na přítomnosti kovových iontů během purifikace. Je tedy velmi vhodnou variantou pro purifikaci metaloproteinů (Skerra et al., 2000).

### 2.2.2 Specifické proteasy odstraňující fúzní kotvy

Odstranění proteinových fúzních kotev může být v některých případech nevyhnutelným úkonem, a to z důvodu negativního vlivu na strukturu nebo biologickou funkci proteinu. Pro tyto účely jsou využívány krátké sekvence, které jsou vkládány před studovaný protein a rozpoznávány specifickými proteasami. Jako výsledný produkt je získán rekombinantní protein v nativním stavu. U některých proteas může docházet k nespecifickému štěpení, a proto musí být optimalizovány podmínky jejich aktivity (pH, teplota, přítomnost některých solí atd.). Účinnost štěpení dané proteasy se může nepředvídatelně lišit u rozdílných fúzních proteinů, kdy může docházet například ke sterickému bránění štěpitelné sekvence. Mezi nejčastěji využívané proteasy patří Faktor Xa, enterokinasa, SUMO proteasa (Viz kapitola 2.2.4), proteasa z viru tabákové mozaiky nebo trombin.

**Faktor Xa** je specifická proteasa rozpoznávající sekvenci I(E/D)GR<sup>X</sup>, kdy v pozici X může být jakákoliv AMK kromě prolinu nebo argininu (Nagai et al., 1984). Proteasa se skládá ze dvou disulfidicky vázaných řetězců (27 kDa a 16 kDa), a proto může být ovlivněna její aktivita v pufrch obsahujících redukční činidla. Štěpení substrátu se může provádět v rozmezí teplot 4 - 24°C (Terpe, 2003).

**Enterokinasa** specificky rozpoznává AMK sekvenci DDDDK<sup>X</sup>. Štěpí na karboxylovém konci lysinu s proměnlivou účinností, která je závislá na typu AMK v poloze X. Například byl-li v poloze X prolin, účinnost štěpení byla 61%, naopak následoval-li alanin, účinnost byla 88% (Hosfield et al., 1999). Některé články uvádí možnost nespecifického štěpení enterokinasy, avšak ve spojení s rozpoznávanou sekvencí FLAG epitopu bývá často využívána (Choi et al., 2001).

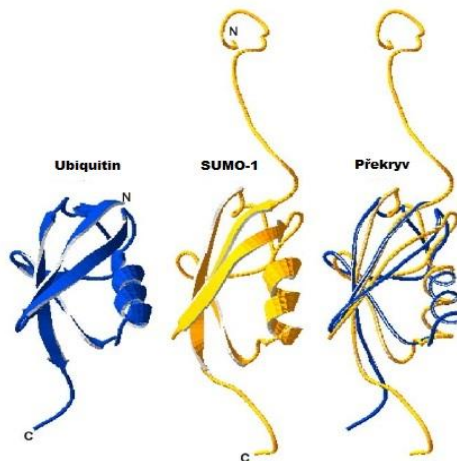
**Proteasa z viru tabákové mozaiky** (Tobago etch virus; TEV proteasa) štěpí v sekvenci ENLYFQG<sup>S</sup> mezi glutaminem a serinem. Je oblíbená pro svoji vysokou specifitu a schopnost účinně štěpit i při nízkých teplotách (4 - 30°C) (Parks et al., 1994). U TEV proteasy byly provedeny cílené mutace pro zvýšení výtěžků při expresi a následné purifikaci proteinu. Zavedené mutace zvýšily stabilitu enzymu a zvýšily jeho aktivitu až dvakrát oproti původní TEV protease (Kapust et al., 2001).

**Trombin** je serinová proteasa, která specificky rozeznává sekvenci AMK LVPR<sup>GS</sup>, a štěpí mezi argininem a glycinem. Přestože štěpení trombinu je poměrně specifické, některé práce upozorňují na jeho možné nespecifické štěpení (Chang et al., 1985). Trombin je heterodimer spojený disulfidovým můstkem. Obsahuje také tři intramolekulární disulfidické vazby, což jej celkově činí náchylným k redukčním činidlům. Nejvyšší aktivity dosahuje při 45°C, přičemž při 15°C si zachovává alespoň 20% ze své maximální aktivity. Enzym je aktivní v rozmezí pH 5,0 - 10,0. Trombin jako enteropeptidasa je relativně dost odolný vůči široké škále detergentů (Vergis et al., 2011).

### 2.2.3 SUMO modifikace

Většina buněčných eukaryotických proteinů je po jejich transkripci různými způsoby modifikována. Mezi posttranslační modifikace patří chemické změny aminokyselin (citrulinace, deaminace, racemizace), strukturální změny v proteinech (tvorba disulfidických můstků, zrání prekurzorového proteinu proteolytickým štěpením), přidávání funkčních skupin (acetylace, metylace, fosforylace, glykosylace) a další. Speciálním druhem posttranslačních modifikací je připojení modifikujících proteinů ke studovanému proteinu. Nejčastěji se jedná o ubiquitin nebo proteiny odvozené od ubiquitinu (ubiquitin-like proteins; UBLs). Ubiquitin a UBLs sdílí jen velmi nízkou podobnost ve složení primární AMK sekvence. Naproti tomu mají společné strukturální znaky typické pro strukturu ubiquitinu (globular ubiquitin-like  $\beta$ -grasp fold) a evolučně zachovanou enzymatickou strategii pro jejich aktivaci s následným přichycením k vhodnému substrátu (Obr. 10) (Hochstrasser, 2009).



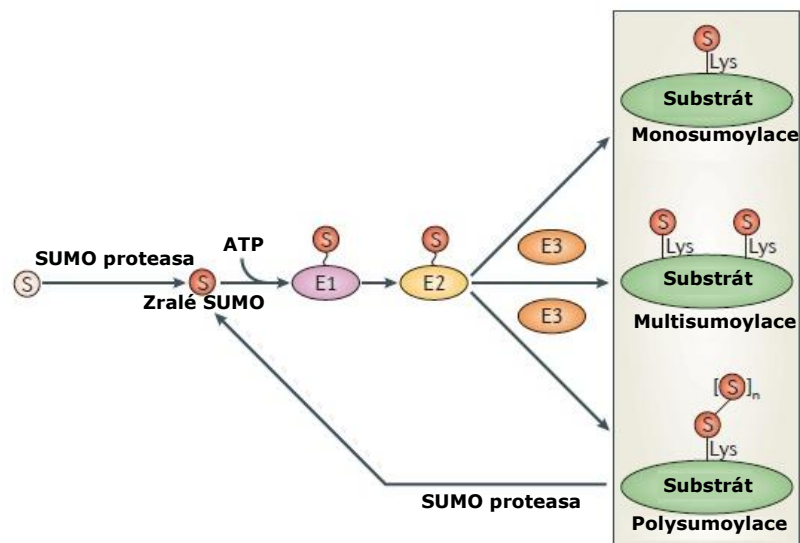


**Obrázek 10 - Porovnání struktur ubiquitinu a lidské SUMO-1**  
(převzato a upraveno z Dohmen, 2004).

Ubiquitin je 8,5 kDa (76 AMK) velký regulační protein, který modifikuje proteiny v procesu známém jako ubiquitinace. Isopeptidová vazba s cílovým proteinem je zprostředkována přes jeho  $\epsilon$ -amino skupinu lysinu a karboxylovou skupinu glycinu patřící ubiquitinu. Jde o tříkrokový enzymatický proces, při kterém je ubiquitin nejprve aktivován ubiquitin-aktivačními enzymy, následně dochází ke konjugaci pomocí ubiquitin-konjugačních enzymů. Posledním krokem je ligace pomocí ubiquitinligasy (Pickart, 2001). U eukaryot je ubiquitin vysoce konzervován a rozdíl mezi kvasinkovým a lidským ubiquitinem je jen ve 3 AMK reziduích. Polyubiquitinace signalizuje degradaci proteinu ve 26S proteasomu, reguluje transkripci (vazba přes Lys48 na ubiquitinu), tvoří spojovací můstek pro další tvorbu proteinových komplexů, cytosolický transport, endocytózu a DNA opravy (vazba přes Lys63 ubiquitinu). Naproti tomu monoubiquitinace může regulovat proteinovou aktivitu a jejich buněčnou lokalizaci. Ubiquitinace je esenciální pro růst buněk a jejich životaschopnost, taktéž hraje významnou roli při regulaci buněčného cyklu (Hochstrasser, 2009).

Do skupiny UBLs patří více než 12 proteinů, z nichž byly již některé charakterizovány (Obr. 11). U většiny byla prokázána schopnost regulace různých aspektů buněčné aktivity prostřednictvím modulace struktury a s tím spojenou funkcí proteinů (Hochstrasser, 2009). Jedním ze zástupců je malý ubiquitin podobný protein (Small Ubiquitin-Like Modifier; SUMO), který byl poprvé objeven u zvířat při studiu proteinu jaderného póru RanGAP (Matunis et al., 1996). S ubiquitinem sdílí přibližně jen 18% sekvenční homologie, avšak struktura a enzymatická strategie k aktivaci a





**Obrázek 12 - Cyklus SUMO modifikace**

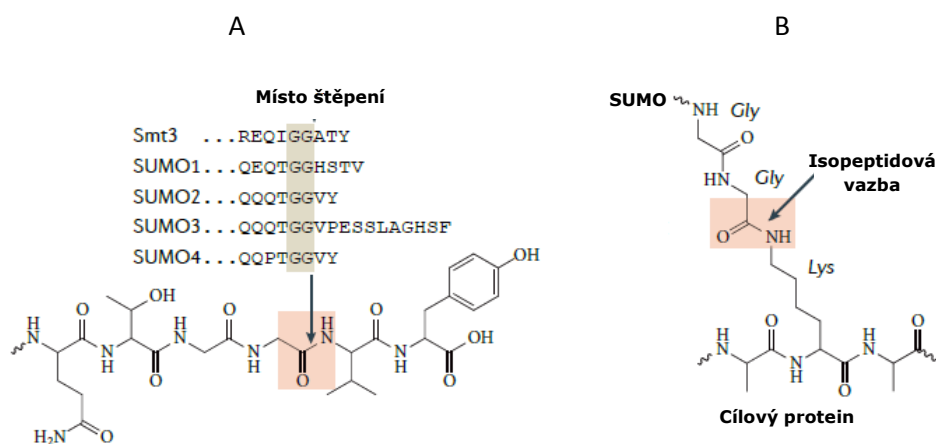
E1) aktivační enzym; E2) konjugační enzym; E3) ligasa (převzato a upraveno z Hickey et al., 2012).

Využitím zmíněných specifických vlastností SUMO modifikace může být vyřešen problém exprese nerozpustných a špatně složených proteinů v prokaryotickém nebo eukaryotickém organismu. V dnešní době existuje již několik komerčně dostupných vektorů (Champion™ pET SUMO, Invitrogen; pCIOX, Addgene; a mnohé další) umožňujících SUMO fúzi (většinou se SUMO modifikací z kvasinky, SMT3) se studovaným proteinem. V mnoha případech vedlo využití této modifikace ke zvýšení exprese a získání rozpustného proteinu. Zvýšení rozpustnosti proteinu je vysvětlováno samotnou strukturou SUMO modifikace. Ta obsahuje vnější hydrofobní povrch a vnitřní hydrofobní jádro, které interaguje s povrchem hydrofobních proteinů a pomáhá tak solvaci jinak nerozpustných proteinů (Malakhov et al., 2004). Další hypotéza, tzv. molten-globulární hypotéza (molten globule hypothesis), říká, že SUMO modifikace působí jako nukleační jádro při skládání proteinu (Englander, 2000). Tuto hypotézu potvrzuje fakt, že ubiquitin, který má vysoce hydrofobní jádro, je jeden z nejrychleji se skládajících známých proteinů (Khorasanizadeh et al., 1996). SUMO modifikace mohou působit také jako chaperony, a tudíž napomáhat správnému skládání proteinu. Tato teorie byla již prokázána u maltosu vázajícího proteinu a předpokládá se i u SUMO modifikace (Fox et al., 2001). SUMO modifikace, jakožto antagonist ubikvitinu, přirozeně zabraňuje degradaci cílového proteinu a může zapříčinit jeho translokaci

z cytosolu do jádra (Kishi et al., 2003). Jedna z hlavních výhod využití této modifikace je její snadné odstranění pomocí specifických SUMO proteas.

## 2.2.4 SUMO proteasa

Připojení SUMO modifikace k cílovému proteinu je přesně řízený a regulovaný proces, ve kterém svoji dílčí roli sehrávají enzymy zvané SUMO proteasy nebo SUMO isopeptidasy (EC 3.4.22.68). SUMO proteasy katalyzují dvě zásadní reakce v sumoylační a desumoylační dráze, kde je jejich přítomnost zcela nezastupitelná. Jsou přítomny u všech eukaryot (Droescher et al., 2013). První reakcí je příprava SUMO z jejich C-terminálního proteinového prekurzoru, kdy je využíváno endopeptidasové aktivity SUMO proteasy. Jednotlivé SUMO jsou od sebe odděleny dvojicí glycinových reziduí, za kterými specificky štěpí SUMO proteasa. V druhé reakci je využívána právě jejich isopeptidasová aktivita, pro uvolnění SUMO a jeho vrácení do sumoylační dráhy, mezi dvojicí glycinových reziduí a reziduem lysinu daného proteinu (Obr. 13). Aktivita SUMO proteas určuje hladinu rovnovážného stavu zralých SUMO pro jeho následné využití v sumoylačním aparátu buňky (Hickey et al., 2012). SUMO proteasy tedy ovlivňují řadu buněčných pochodů, které jsou spojeny s regulací pomocí SUMO modifikace.

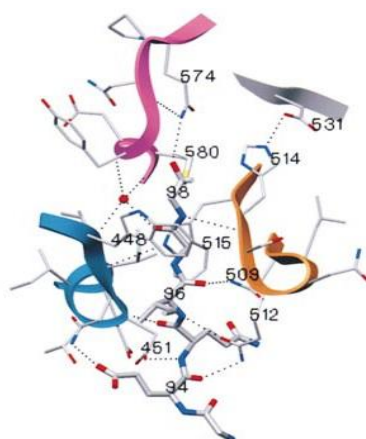


### Obrázek 13 - Reakce katalyzované SUMO proteasou

A) Místa štěpení jednotlivých SUMO modifikací (kvasinková SMT3; ostatní lidské) katalyzované SUMO proteasami; B) znázornění místa štěpení isopeptidové vazby mezi zralými SUMO a cílovým proteinem (převzato a upraveno z Hickey et al., 2012).

První SUMO proteasa byla identifikována v kvasince *S. cerevisiae* a byla označena ubiquitinu-podobná proteasa 1 a 2 (ubiquitin-like protease; Ulp1 a Ulp2) (Li et al., 1999; Li et al., 2000). U enzymu Ulp1 byla jako první vyřešena krystalová struktura společně se substrátem SUMO (produkt genu SMT3). Z výsledku bylo zjištěno, že celková architektura katalytické domény Ulp1 odpovídá cysteinovým proteasám, které cíleně rozpoznávají terciární strukturu SUMO modifikace (Mossessova et al., 2000) (Obr. 14). Specifity pro SUMO je zde dosaženo prostřednictvím rozsáhlého povrchu zahrnujícího unikátní hydrofobní interakce a četné solné můstky. Díky porovnání sekvencí katalytické domény Ulp1 a Ulp2 s dalšími sekvencemi předpokládaných SUMO proteas byla identifikována přítomnost těchto enzymů v celé řadě eukaryotických organizmů (Li et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 2007).

První identifikovaný lidský protein sdílel vysokou podobnost s Ulp1. Po potvrzení jeho SUMO proteasové aktivity byl pojmenován jako sentrin-specifická proteasa 1 (SEN1, SUMO = sentrin) (Gong et al., 2000). Všechny doposud identifikované enzymy z různých eukaryotických organizmů se SUMO proteasovou aktivitou patří mezi cysteinové proteasy, jejichž složení aktivního místa odpovídá protease papainu (Hickey et al., 2012). U lidí je celkově přítomno šest SENP enzymů, a to SENP1-3 a SENP5-7. Nedávno provedené studie identifikovaly tři nové SUMO-proteasy, a to desumoylační isopeptidasy 1 a 2 (DESI1 a DESI2) a ubiquitin-specifické protease podobní protein 1 (ubiquitin-specific protease-like 1, USPL1) (Shin et al., 2012).



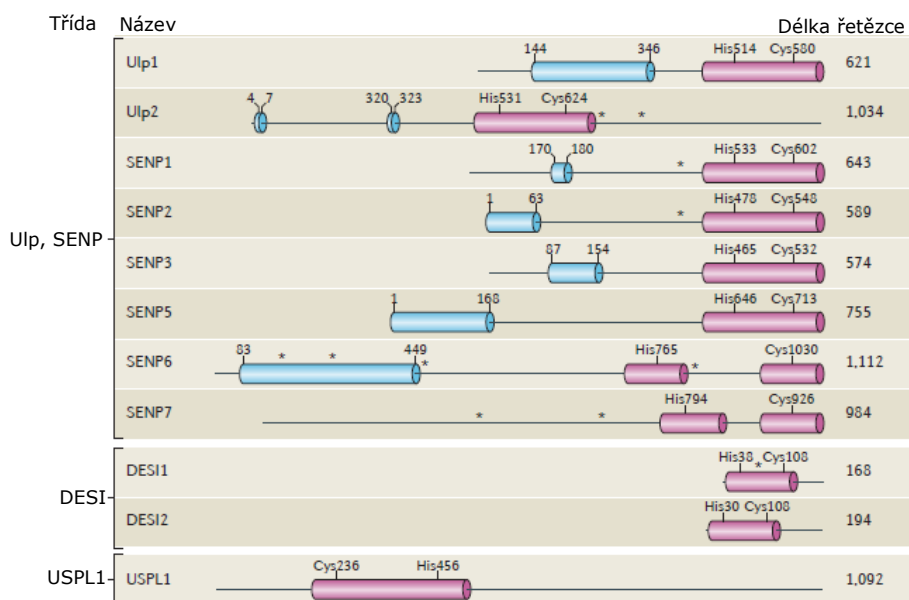
**Obrázek 14 - Struktura aktivního místa Ulp1**

Čísly 580 (Cys), 514 (His), 531 (Asp) je znázorněno reziduum katalytické triády (převzato a upraveno z Mossessova et al., 2000).

U většiny známých SUMO proteas hrají velmi důležitou roli jejich nekatalytické domény nacházející se v N-terminální části enzymu. Tyto domény regulují následnou intracelulární lokalizaci enzymu (Obr. 15). U některých SUMO proteas je předpovídána přítomnost SIMs regionů, které nejspíše zvyšují afinitu SUMO k daným enzymům nebo pomáhají správné orientaci sumoylovaného proteinu vůči SUMO protease (Hickey et al., 2012).

Specifita SUMO proteas k substrátu byla prostudována *in vivo* i *in vitro* a z výsledků je patrné, že je velmi silně ovlivněna lokalizací proteinu. Napovídají tomu tak i výsledky z nejjednoduššího a nejlépe prostudovaného kvasinkového systému *S. cerevisiae* (Hickey et al., 2012).

Enzym Ulp1 vykazuje širokou substrátovou specifitu a je schopen štěpit jak exprimované SUMO prekurzory, isopeptidově vázané SUMO, tak i poly-SUMO modifikace z proteinů. Není však schopen editace poly-SUMO řetězce, což znamená štěpení dílčích SUMO modifikací ze SUMO řetězce vázaného na proteinu (Li et al., 2003). Naopak enzym Ulp2 neštěpí prekurzorové SUMO, ale je velmi aktivní při editaci poly-SUMO řetězců. Taktéž je zachována schopnost štěpit isopeptidovou vazbu mezi lysinem modifikovaného proteinu a SUMO řetězcem (Bylebyl et al., 2003).



**Obrázek 15 - Organizace domén a velikost jednotlivých řetězců SUMO**

Katalytická doména je značena růžově společně s AMK histidinu a cysteinu obsažených v aktivním místě enzymu. Předpokládané SIMs regiony jsou označeny hvězdičkou. Domény zodpovědné za buněčnou lokalizaci jsou značeny modře (převzato a upraveno z Hickey et al., 2012).

Díky výhodným vlastnostem SUMO modifikace a vysoké specifitě SUMO proteas se staly expresní SUMO vektory velmi oblíbenou variantou pro přípravu eukaryotních rekombinantních proteinů. V dnešní době je na trhu dostupná celá řada komerčně připravovaných SUMO proteas (Thermo Fisher, Lifesensors, Enzynomics a další). Nejčastěji se jedná o kvasinkový enzym Upl1 připravený rekombinantně v *E. coli*. SUMO proteasa účinně štěpí při teplotách 4 - 37°C v rozsahu pH 5,5 - 10,5, a dokonce bylo prokázáno, že štěpí substrát v přítomnosti 2M močoviny bez nežádoucích nespecifických produktů štěpení (Malakhov et al., 2004). To umožňuje snadnější purifikaci SUMO modifikovaných produktů z inkluzních tělísek. Většina výrobců garantuje vysokou efektivitu štěpení SUMO modifikovaných substrátů s výtěžností až 85% při pH v rozmezí 5,5 - 9,5 a teplotě 30°C po dobu 1 hodiny (<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12588018>; 9.3.2016).

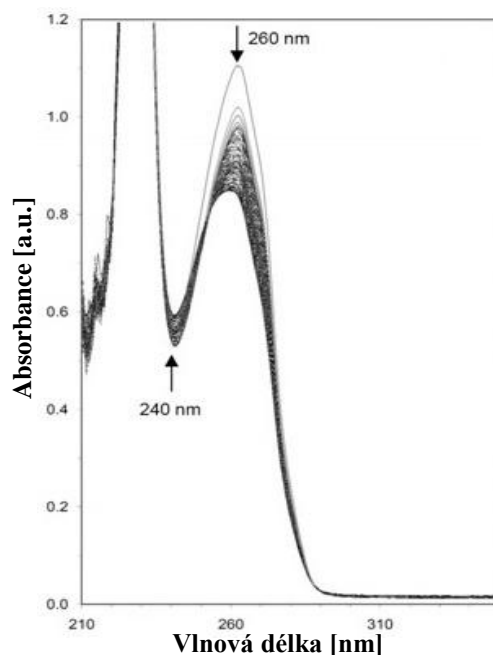
### 2.3 Metody stanovení aktivity adenosindeaminas

Absorpce záření a další fyzikální vlastnosti látek mohou být použity k jejich detekci. Základem úspěšného stanovení aktivity enzymu je zvolení vhodné detekční metody, kterou jde nepřímě stanovit rychlost přeměny substrátu na produkt za určitý časový interval. Pro správný výpočet je nutné, aby úbytek substrátu a nárůst produktu probíhal v čase lineárně. Základními konstantami charakterizujícími enzymatické vlastnosti proteinu jsou: Michaelisova konstanta ( $K_m$ ; mol.dm<sup>-3</sup>), číslo přeměny (turnover number,  $k_{cat}$ ; s<sup>-1</sup>), měřítko katalytické účinnosti ( $k_{cat}/K_m$ ), aktivita enzymu vyjádřená v katalech ( $kat$ ; mol.s<sup>-1</sup>) nebo v mezinárodní jednotce ( $UI$ ; μmol.min<sup>-1</sup>) a specifická aktivita, což je aktivita proteinu vztažená na jeho množství ( $kat/mg$ ). Tyto veličiny jsou stanoveny při měření za optimálních podmínek (pH, teplota, pufr, kofaktor atd.), konstantní koncentrace enzymu a nejméně pěti různých koncentrací substrátu.

Hlavním substrátem ADA je Ado a 2'-deoxyadenosin. Mezi další substráty, které jsou metabolizovány tímto enzymem, ale s nižší afinitou patří Ade, AMP, ADP a ATP. Tyto látky mají ve své struktuře Ade a jejich absorpční maximum odpovídá absorpčnímu maximu Ade při 260 nm. Produkty reakce, které byly deaminovány, absorbují zase při 240 nm. Nejpoužívanějšími přístroji pro detekci aktivity ADA, ale i jiných enzymů, jsou spektrofotometr, vysokotlaká kapalinová chromatografie s detekcí pomocí diodového pole (HPLC-DAD), HPLC spojená s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS), kapilární elektroforéza a další.

Základním přístupem k měření aktivity většiny enzymů bývá detekce pomocí spektrofotometru. V případě detekce aktivity ADA mohou být zvoleny dvě odlišné varianty. První je přímá detekce reakčních složek (ADA a substrát v prostředí pufru), kdy je sledován buďto úbytek substrátu nebo přírůstek produktu při odpovídajících vlnových délkách (Kalckar, 1947). Velkou nevýhodou této reakce je poměrně malá vzdálenost absorpčních maxim produktu a substrátu, kdy může docházet ke zkreslení výsledků (Obr. 16).





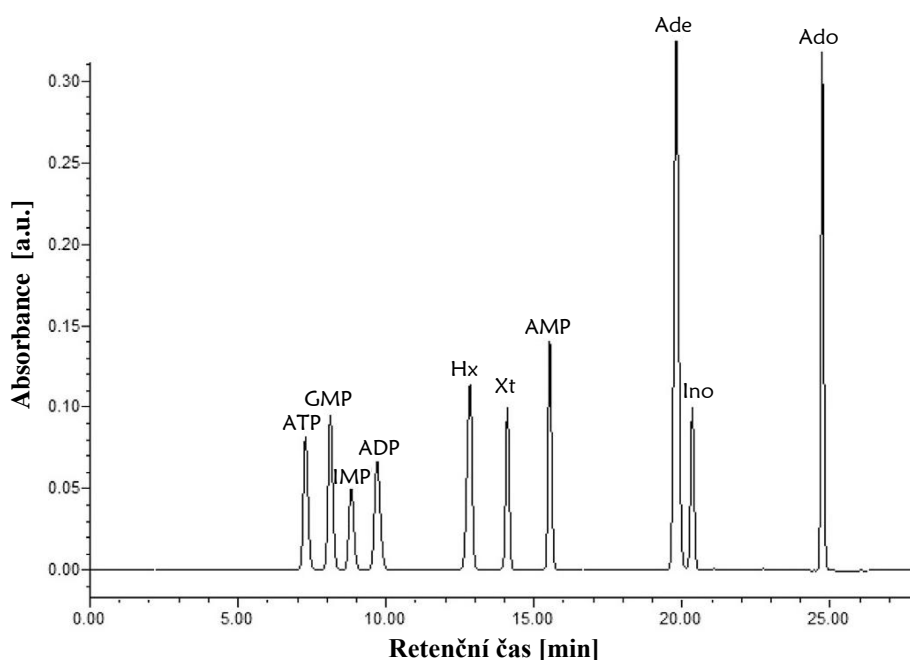
**Obrázek 16 - Spektrum katalytické přeměny adeninu na hypoxantin**

240 nm detekce nárůstu hypoxantinu (Hyp) a 260 nm detekce úbytku Ade (převzato a upraveno z Pospíšilová et al., 2008).

Druhou variantou je možnost využití spřažené reakce, kdy v první fázi dochází k již zmíněné deaminaci substrátu za vzniku jeho 6-oxo produktu katalyzovanou ADA. Uvolňovaný amoniak je společně s 2-oxoglutarátem v následné reakci přeměňován glutamátdehydrogenasou na glutamát za současné oxidace NADH (Elis et al., 1970). Úbytek absorbance redukované formy NADH, který je převáděn na svoji oxidovanou formu  $\text{NAD}^+$ , je detekován spektrofotometricky změnou absorbance při 340 nm. Uvolňovaný amoniak lze taktéž detekovat metodou využívající vlastností indofenolu, který má absorpční maximum při 625 nm. Indolfenol je vytvářen při reakci fenolu s amonnými a chlornanovými ionty v alkalickém prostředí (Chaney, et al 1962). Jiná varianta detekce aktivity poukazuje na možnost využití tří spřažených reakcí ADA s nukleosidfosforylasou a xanthinoxidasou. Při této reakci dochází v posledním kroku k oxidaci xantinu na kyselinu močovou, kdy je detekován pokles absorbance při 606 nm skrze redukci barevného 2,6-dichlorfenolindofenolu na jeho bezbarvý produkt (Oosthuizen et al., 1993).

Moderním přístupem detekce aktivity enzymů je separace vzniklých produktů od zbývajících substrátů ze zastavené reakce pomocí vhodné separační techniky. Nejhojněji využívanou separační technikou je v dnešní době HPLC, která je založena na principu rozdělení jednotlivých složek vzorku mezi stacionární a mobilní fázi. Interakce

jednotlivých látek se stacionární fází je založena na jejich rozdílných chemických a fyzikálních vlastnostech. Mobilní fáze unáší vzorky skrze systém a její složení ovlivňuje interakce se stacionární fází. Na kolonách obsahujících nepolární reverzní fázi (například silikagel s C18 nebo C8 řetězci) lze změnou gradientu mobilní fáze (od polární k méně polární) účinně separovat jednotlivé nukleotidy ze směsi, což potvrzují některé již provedené experimenty. V roce 2016 Qiu et al. úspěšně separovali na C18 reverzní fázi 10 nukleotidů za použití diodového pole jako detektoru (Obr. 17). Dalším vhodným detektorem ve spojení s HPLC je hmotnostní spektrometrie, která umožňuje velmi přesnou možnost kvantifikace (Cohen et al., 2009).



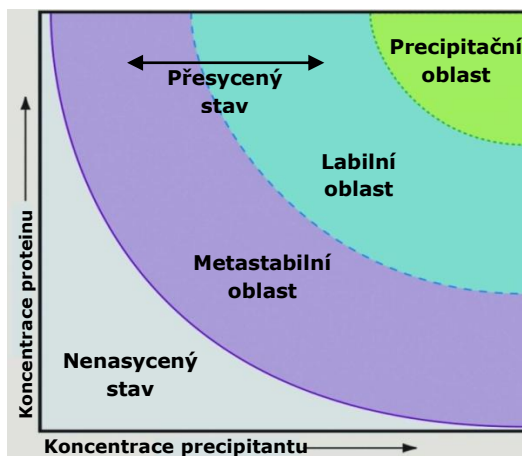
**Obrázek 17 - Chromatogram 10 separovaných nukleotidů**

ATP - adenosintrifosfát; ADP - adenosindifosfát; GMP - guanosinmonofosfát; IMP - inosinmonofosfát; Hx - hypoxantin; Xt - xantin; AMP - adenosinmonofosfát; Ade - adenin; Ino - inosin; Ado - adenosin (převzato a upraveno z Qiu et al., 2015).

## 2.4 Krystalizace proteinu

Pro pochopení celé řady funkcí biologicky aktivních molekul je zcela zásadní znalost jejich struktury. Studium prostorové struktury proteinů využívá několik základních technik pro její stanovení, jako jsou nukleární magnetická rezonance, kryoelektronová mikroskopie a rentgenostrukturní analýza krystalů proteinu. V současnosti je nejvíce využívána rentgenostrukturní krystalografie, která byla použita v přibližně 90% vyřešených struktur (Rupp, 2010). Základními kroky pro úspěšné stanovení struktury pomocí rentgenostrukturní krystalografie jsou: příprava proteinu a jeho krystalizace, sběr dat, determinace fáze, analýza elektronové hustoty a modelování struktury. Jedním ze zásadních kroků pro vyřešení struktury je samotná krystalizace proteinu.

Podstatou krystalizace je převedení proteinu z roztoku do periodicky se opakující krystalové mřížky, jejíž vznik spočívá v pomalém převedení systému do stavu snížené rozpustnosti a dosažení limitního stupně přesycení postupnou modifikací vlastností systému (pH, teplota, krystalizační roztok). Smícháním studovaného proteinu a krystalizačního roztoku (solí, těkavá a netěkavá organická rozpouštědla, polymery - polyethylenglykoly) se protein dostává buďto do přesyceného (nastává krystalizace), nebo nenasyceného stavu (protein je rozpuštěn v kapalně fázi), což je vyjádřeno fázovým diagramem (Obr. 18). Oblast přesyceného stavu je rozdělena na tři části: metastabilní, labilní a precipitační. V metastabilní a labilní části se protein nachází v nízkém až středním přesycení, což jsou podmínky vhodné pro tvorbu krystalů, naopak v precipitační části dochází k vysrážení amorfního proteinu (Li et al., 2009).



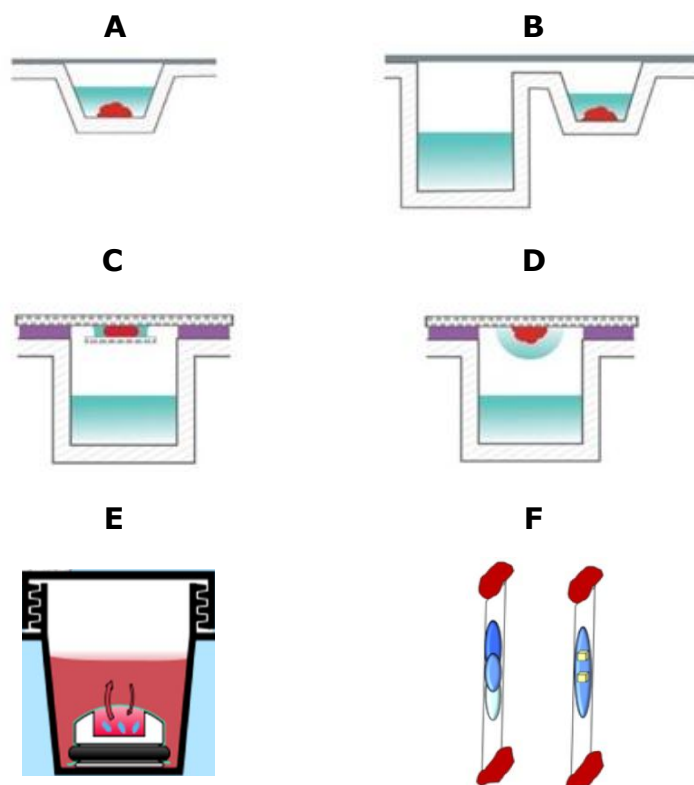
Obrázek 18 - Fázový diagram krystalizace proteinu

Samotný krystalizační proces je rozdělen do dvou kroků. Prvním krokem je nukleace, která nastává pouze v případě, dosáhne-li koncentrace proteinu v roztoku labilního přesycení. Při dosažení tohoto stavu dojde k vytvoření krystalizačních jader, díky kterým dochází k dalšímu seskupování a růstu vznikajícího krystalu. Růst krystalu je tedy druhou fází, při které dochází k poklesu koncentrace proteinu v roztoku a přesunutí se do fáze metastabilní, kde již nemůže docházet k nukleaci jader, nýbrž pouze k růstu krystalů (Rupp, 2010).

Před samotnou krystalizací, je nutné získat velmi čistý protein (95% čistota po vizualizaci na SDS-Page), jelikož případné kontaminace mohou bránit úspěšnosti krystalizace. Následné kroky vedou k nalezení vhodných činidel a chemicko-fyzikálních podmínek, při kterých probíhá krystalizace nejefektivněji za použití standardních krystalizačních technik.

Základní a nejjednodušší metodou je tzv. dávková krystalizace (batch crystallization), kdy se přímo míchá protein s velmi koncentrovaným krystalizačním roztokem, který rovnou převádí protein do přesyceného stavu. Během inkubace tedy dochází k postupné krystalizaci (Obr. 19A). Nevýhodou této metody je poměrně velký objem krystalizační směsi. Existuje však modifikace této metody nazývaná mikrodávková metoda (microbatch method), kdy je malé množství proteinu smícháno s krystalizačním roztokem a překryto vrstvou parafinového oleje, který umožňuje difúzi vodních par (Rupp, 2010).

Dalšími nejčastěji využívanými možnostmi krystalizace proteinů jsou metody založené na difúzi plynné fáze. Byly vyvinuty ve třech provedeních nazvaných „sedící, visící a sendvičová“ kapka (sitting, hanging a sandwich drop), kdy roztok proteinu o objemu 1-10  $\mu\text{l}$  společně s roztokem vysoce koncentrovaného krystalizačního činidla (kolem 100  $\mu\text{l}$ ) jsou společně v uzavřeném systému (Obr. 19B, C, D). Hnací silou celé reakce je rozdíl mezi tlakem vodních par v rezervoáru a kapkou obsahující protein. Dochází zde k difúzi vodních par z kapky obsahující protein do rezervoáru v důsledku Raoultovova zákona. To má za následek zvýšení koncentrace proteinu v kapce, která pozvolna přechází do požadovaného stavu přesycení (Li et al., 2009).



**Obrázek 19 - Metody krystalizace**

A) Dávková metoda; B) metoda sedící kapky; C) sendvičová metoda; D) metoda visící kapky  
 E) metoda mikrodialýzy F) metoda volně-povrchové difúze (převzato a upraveno z Caffrey et al., 2009 a [www.en.wikipedia.org/wiki/Protein\\_crystallization](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Protein_crystallization); 20.3.2016).

Dalším fyzikálním jevem, který je využíván pro úspěšnou krystalizaci proteinu, je mikrodialýza přes polopropustnou membránu. Vzorek je zde oddělen od krystalizačního roztoku (v tomto případě nejčastěji soli) pomocí polopropustné membrány, která umožňuje přechod malých molekul a iontů. Naopak molekuly proteinu nemohou přes membránu projít, čímž dochází k jejich postupnému přesycování v roztoku vlivem zvyšující se koncentrace krystalizačního roztoku (Obr. 19E).

Poslední využívanou metodou je povrchově-volná difúze (Free-interface diffusion). Princip je založen na vzájemném kontaktu roztoku proteinu a krystalizačního činidla v úzké kapiláře bez předchozího promíchání. Následně jsou tyto roztoky v uzavřeném systému ponechány k volné difúzi proti sobě (Obr. 19F).

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Přístrojové vybavení a chemikálie

Autokláv MLS 3020 - Sanyo (Německo)

CD spektrofotometr J815 - Jasco (Japonsko)

Centrifuga Mikro200R - Hettich (Německo)

Centrifuga Rotanta 460R - Hettich (Německo)

Elektroforéza pro proteiny Mini-PROTEAN 3 Cell - BIO-RAD (USA)

Fermentor BIOSSTAT<sup>®</sup> C plus - Sartorius (Německo)

Míchačka magnetická RTC basic - IKAMAG (ČR)

Nízkotlaká kapalinová chromatografie BioLogic - LP BIO-RAD (USA)

pH metr Jenway 3505 - Jenway (UK)

Sonikátor 3000 MP - BioLogics, Inc. (USA)

Spektrofotometr 8453 UV-VIS - Agilent (USA)

Termoblok AccuBlock<sup>TM</sup> digital Dry Baths - Labnet (USA)

Termomixer comfort - Eppendorf (Německo)

UFLC Nexera - Shimadzu (Japonsko)

Váhy Boeco - Boeco (Německo)

Zdroj Standard power Pack P25 - Biometra (Německo)

- *Komerční kity*

Stanovení koncentrace proteinu: Pierce<sup>TM</sup> BCA protein Assay kit (USA) a Quick Start<sup>TM</sup> Bradford Protein Assay (USA).

Stanovení optimálních podmínek krystalizace proteinu: JCSG-plus Screen, Box 1 a 2 (Velká Británie).

- *Software*

Ovládání nízkotlaké kapalinové chromatografie BioLogic<sup>TM</sup> Chromatography systems - LP Data View Software 1.03 (USA).

Ovládání spektrometru - UV-visible Chemstation Software Agilent (USA).

Vyhodnocení výsledků UHPCL analýzy v programu LabSolutions 5.30. - Shimadzu (Japonsko)

**Tabulka 1 - Seznam chemikálií**

<b>Výrobce, město a krajina původu</b>	<b>Chemikálie</b>
Duchefa (Holansko)	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG), kanamycin, trypton
Fluka (Švýcarsko)	peroxidisulfát amonný (APS), Coomassie Brilliant Blue R-250, $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , adenosin, dithiothreitol (DTT)
Fermentas (Kanada)	Page Ruler <sup>TM</sup> unstained Protein Ladder, tetraethylmethyldiamid (TEMED)
Himedia (Indie)	Agar
Lach-Ner (ČR)	$\text{CH}_3\text{COOH}$ , ethanol, KCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , methanol, NaCl, NaF, octan amonný, octan sodný, aceton, trichloroctová kyselina, formaldehyd, $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , $\text{AgNO}_3$ , glycin, $\text{MgCl}_2$ , glukosa
Penta (ČR)	EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , glycerol, NaOH, dodecylsírán sodný (SDS)
Qiagen (Německo)	NTA agarosa
Roth (Německo)	imidazol
Serva (Německo)	Tris
Sigma-Aldrich (USA)	akrylamid, bromfenolová modř, $\text{CaCl}_2$ , jodacetamid, mercaptoethanol, triton X-100, kvasničný extrakt, adenosin, adenin, ATP, ADP, AMP, hypoxantin, inosin, NADH, triethylamin (TEA), $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Igepal, fenylmethansulfonylfluorid (PMSF), kyselina mravenčí, 2-oxoglutarát, $\beta$ -merkaptoethanol, ampicilin, glutamátdehydrogenasa, hovězí sérový albumin (BSA)

### 3.1.2 Mikroorganizmy a plasmidové konstrukty

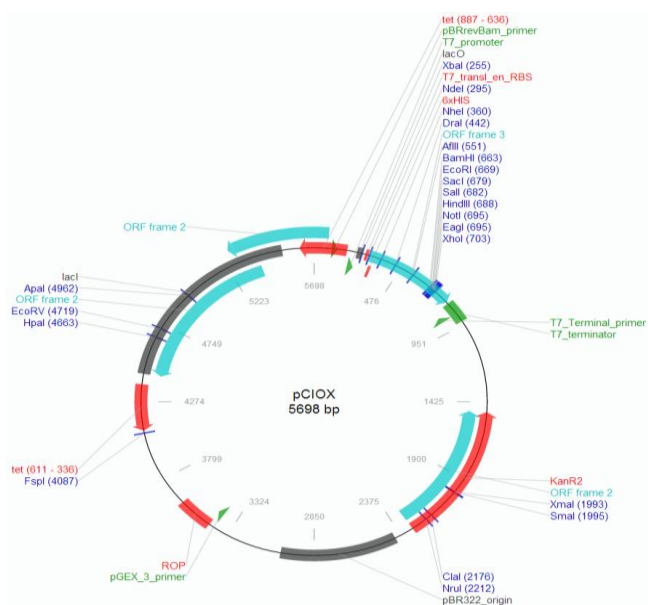
*Escherichia coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) - Invitrogen (USA)

Vektor pCIOX (Obr. 20) - Andrea Mattevi (Univerzita v Pavii, Itálie)

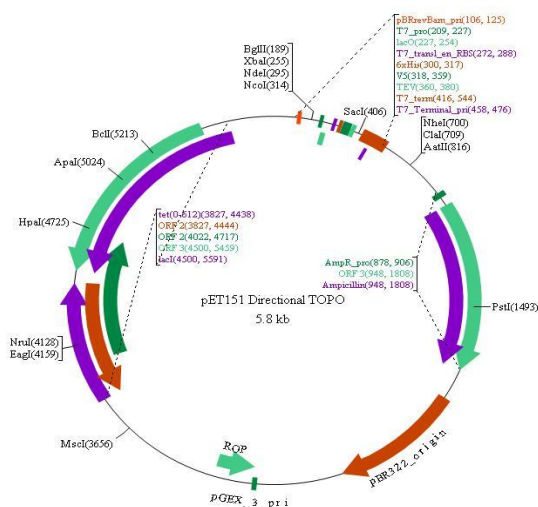
Vektor pET151/D-TOPO (Obr. 21) - Invitrogen (USA)

Gen At4g04880 z *Arabidopsis thaliana*

Neznámý vektor s genem kódující SUMO proteasu (rezistence na kanamycin a poly-His kotva) - Andrea Mattevi (Univerzita v Pavii, Itálie)



**Obrázek 20 - Mapa vektoru pCIOX**  
(převzato z [www.addgene.org/51300](http://www.addgene.org/51300); 25.3.2015).



**Obrázek 21 - Mapa vektoru pET151/D-TOPO**  
(převzato z [http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET151\\_Directional\\_TOPO.htm](http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET151_Directional_TOPO.htm); 25.3.2015).



## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava zásobních roztoků, kultivačního LB média a agarových selekčních LB ploten

Zásobní roztoky o koncentraci 100 mg/ml byly připraveny rozpuštěním pevného kanamycinu nebo ampicilinu v destilované vodě. Roztoky byly přefiltrovány pomocí sterilní stříkačky a filtru Ophthalsart (0,2 µm) v laminárním boxu (Safe Fast Classic, Faster, Itálie).

Pro přípravu 1 litru kultivačního Luria-Bertani (LB) média bylo použito 10 g NaCl, 10 g tryptonu a 5 g kvasničného extraktu. Získané médium bylo sterilizováno 20 minut při 121°C. Při kultivaci bakterií, obsahujících rezistenci proti antibiotiku, byl do kultivačního média přidán kanamycin (50 µg/ml) nebo ampicilin (100 µg/ml).

Selekční plotny byly připraveny stejným způsobem, akorát byl přidán do LB média agar o výsledném obsahu 2%. Po ochlazení bylo přidáno antibiotikum kanamycin (50 µg/ml) a vzniklé médium bylo nalito do plastových Petriho misek.

### 3.2.2 Transformace *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) tepelným šokem

K 50 µl chemicky kompetentních buněk umístěných v mikrozkuhavce na ledu bylo přidáno 5 µl plazmidové DNA. Směs se nechala inkubovat na ledu po dobu 10-15 minut. Poté byla mikrozkuhavka přemístěna na 1 min do vyhřátého termobloku na 42°C. Po teplotním šoku byla zkuhavka přenesena zpět na led, kde proběhla inkubace další 3 minuty. Ke kultuře bylo přidáno 300 µl SOC media (2% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 2,5 mM KCl, 0,05% NaCl, 9,95 mM MgCl<sub>2</sub> a 20 mM glukosa) a následně byla inkubována 1 hod při 37°C v rotačním inkubátoru (Kühner Shaker, Švýcarsko).

### 3.2.3 Kultivační a expresní podmínky

Pro expresi bylo vždy připraveno inokulum bakterie *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) obsahující plazmid *pCIOX::At4g04880*, kdy byl z narostlé kultury odebrán 1 ml pro další kultivaci. Kultivace probíhala v 50 ml LB media s kanamycinem (50 µg/ml) v

Erlenmayerových baňkách při 37°C a 160 rpm v rotačním inkubátoru. Nárůst buněk byl sledován pomocí měření optické hustoty při 600 nm do dosažení hodnoty 0,4. Následně bylo přidáno indukční činidlo IPTG o koncentraci 0,6 mM, čímž byla zahájena exprese proteinu His-SUMO-ADA. Erlenmayerovy baňky s kulturou byly ihned přemístěny do třepací místnosti, která byla temperovaná na expresní teplotu 18°C, přičemž samotná exprese probíhala po dobu 18 hod při 160 rpm. Poté byly kultury centrifugovány při 4500 g, 4°C po dobu 15 - 20 minut. Supernatant byl odlit a pelety byly buďto hned zpracovány, nebo zmrazeny při -80°C.

Expresa plazmidu *pCIOX::At4g04880* v *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) byla také provedena za použití velkoobjemové exprese ve fermentoru. Samotná exprese probíhala v objemu 10 L média bez antibiotik za stejných kultivačních podmínek jako v případě kultivace v Erlenmayerových baňkách.

Expresa proteinu adenosindeaminasy 2 (AtADA2) z plazmidu *pET151/D-TOPO::At4g04880* v bakterii *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) probíhala téměř stejně jako v případě *pCIOX::At4g04880*. Nárůst buněk byl však sledován do dosažení optické hustoty 0,6 a poté bylo přidáno indukční činidlo IPTG o výsledné koncentraci 0,4 mM v 50 ml kultury.

Expresa SUMO proteasy z bakterie *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) probíhala v litrových Erlenmayerových baňkách s 200 ml LB media a kanamycinem (50 µg/ml). Do nich byly následně přidány 4 ml kultury z nasazeného inokula. Nárůst buněk probíhal v rotačním inkubátoru při 160 rpm, 37°C a byl sledován do optické hustoty 2. Následně bylo přidáno indukční činidlo IPTG (výsledná koncentrace v roztoku 0,75 mM). Expresa probíhala při 30°C po dobu 4 hod. Poté byla kultura centrifugována při 4500 g po dobu 15 minut. Získané pelety byly zmrazeny při -80°C.

#### **3.2.4 Lýze buněk *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) obsahujících cílové plasmidy**

Buněčný pelet byl rozsuspendován v lyzačním pufru (5 ml pufru na 1g peletu; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0 pro vektory *pCIOX* a *pET151/D-TOPO*; pro SUMO proteasu 50mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM β-merkapt ethanol, 25 mM imidazol, 1 mM PMSF, 0,2% igepal a 1U/ml DNAsy, pH 8,0) a následně 30 minut inkubován na ledě.

Lýze buněk byla provedena pomocí sonikátoru: 3 - 4x 5 min, puls zapnutý 6 s a puls vypnutý 9 s při 50% intenzitě. Následně byl roztok centrifugován při 14000 g po dobu 40 min. Získaný supernatant byl přečištěn přes filtr Ophthalsart (0,2 µm).

### 3.2.5 Purifikace proteinů pomocí nízkotlaké afinitní chromatografie

Ve všech zkoumaných proteinech je obsažena poly-His kotva, která umožňuje afinitní purifikaci. V našem případě byly využity kolony obsahující NTA-agarosu s navázanými ionty  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  nebo  $\text{Zn}^{2+}$ . Kov vázaný na koloně umožňuje koordinační vazbu s poly-His kotvou obsaženou ve struktuře proteinu, čímž dochází k zadržení proteinu na koloně. Eluce je následně prováděna různými koncentracemi imidazolu, který kompetuje o vazebné místo na koloně s proteinem. Purifikace pro všechny zkoumané proteiny probíhala při 4°C, přičemž jednotlivé frakce byly jímány do zkumavek a zhodnoceny pomocí SDS-Page.

### 3.2.6 Postup purifikace pro His-SUMO-ADA a AtADA2

Prvním krokem je ekvilibrace kolony roztokem obsahujícím 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0. Kolona byla promyta minimálně 10 násobkem jejího objemu při průtoku 0,75 ml/min pro NTA-agarosu.

Získaný supernatant z lyzovaných expresních buněk byl následně nanášen na ekvilibrovanou kolonu při nízkém průtoku 0,25 ml/min tak, aby došlo k promytí minimálně 2 objemy kolony nebo přes noc. Následně byly vymývány nenavázané proteiny promývacím roztokem (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0) při průtoku kolony 0,75 ml/min po dobu minimálně 1 hod nebo při průtoku 0,25 ml/min přes noc. Po ustálení hodnot konduktivity a absorbance byla zahájena samotná eluce proteinu z kolony za použití elučnicích roztoků se stoupající koncentrací imidazolu:

**(A:** 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0; nemusí být využit)

**B:** 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 60 mM imidazol, pH 8,0;

**C:** 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 120 mM imidazol, pH 8,0;

**D:** 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0;

**E.** 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 400 mM imidazol, pH 8,0.

Regenerace kolony byla provedena promytím 0,5 M NaOH a následně destilovanou vodou, opět 10 objemy kolony. Nakonec byla kolona uskladněna ve 20% ethanolu.

### **3.2.7 Purifikace SUMO proteasy na Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose**

Kolona byla ekvilibrována pomocí roztoku (50mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM  $\beta$ -merkптоethanol, 25 mM imidazol, pH 8,0) při průtoku 0,75 ml/min minimálně 10 objemy kolony.

Získaný supernatant byl nanášen na kolonu při průtoku 0,25 ml/min přes noc. Nenavázané proteiny byly vymyty roztokem (50mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM  $\beta$ -merkптоethanol, 25 mM imidazol, pH 8,0) při zvýšeném průtoku 0,75 ml/min až do ustálení hodnot absorbance a konduktivity (přibližně 1 - 2 hod). Eluce proteinu byla provedena roztoky se zvyšujícím se podílem imidazolu:

**A:** 50mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM  $\beta$ -merkптоethanol, 100 mM imidazol, pH 8,0;

**B:** 50mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM  $\beta$ -merkптоethanol, 200 mM imidazol, pH 8,0;

**C:** 50mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM  $\beta$ -merkптоethanol, 500 mM imidazol, pH 8,0.

### **3.2.8 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přítomností SDS (SDS-Page)**

Analýza purifikace vzorků byla prováděna na připravených gelech složených z 10% separačního a 4% koncentračního gelu. Elektrodový pufr byl složen z 50 mM Tris-HCl, 384 mM glycin, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, pH 8,3. Do jedné z jamek byl vždy nanesen standard (Page Ruler<sup>TM</sup> unstained Protein Ladder) a do ostatních byly naneseny vzorky smíchané v poměru 3:1 se vzorkovacím pufrem (200 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% glycerol, 0,04% bromfenolová modř, 400mM  $\beta$ -merkптоethanol, 0,5 mM DTT), které byly denaturovány 5 min při 99°C (Weber a Osborn, 1969). Samotná separace probíhala 15 - 20 minut při 100 V, následně bylo zvýšeno napětí na 120 V po dobu potřebnou k dostatečné separaci.

### 3.2.9 Vizualizace SDS-Page gelů

Pro obarvení gelů byly využity metody barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo barvení stříbrem.

Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue R-250 je složen z 0,025% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanolu, 10% kyseliny octové. Roztok byl nalit na gel a inkubován po dobu minimálně 30 minut. Poté byl vyměněn za odbarvovací roztok (40% methanol, 10% kyselina octová a destilovaná voda) a inkubován přibližně 20 - 30 minut. Na závěr byl gel uskladněn v destilované vodě.

Detekce pomocí barvení stříbrem poskytuje větší citlivost a tím i detekci méně abundantních proteinů separovaných pomocí SDS-Page. Metoda využívá pěti po sobě jdoucích roztoků: fixační roztok (60 ml; 50% acetonu, 1,25% trichloroctové kyseliny, 0,00925% formaldehydu), senzibilizující roztok (60 ml; 0,0166%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , destilovaná voda), barvicí roztok (60 ml; 0,16 g  $\text{AgNO}_3$ , 0,36% formaldehyd, destilovaná voda), vyvíjecí roztok (60 ml; 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,00416%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,015% formaldehyd) a terminační roztok (60 ml; 1% kyselina octová) (Switzer et al., 1979), díky kterým je gel obarven. Obarvené gely byly následně oskenovány pomocí scanneru (Image Scanner PoverLook 1120 USG, AP Czech, ČR).

### 3.2.10 Dialýza a zakoncentrování proteinů

Frakce obsahující cílové proteiny byly zbaveny vysoké koncentrace imidazolu buďto pomocí dialýzy (2 L roztoku obsahující 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM  $\text{NaCl}$ , 5% glycerol, pH 8,0 pro produkty vektorů pCIOX a pET151/D-TOPO, nebo 25mM Tris/HCl pH 8,0 250 mM  $\text{NaCl}$ , 10% glycerol, 1 mM DTT pro SUMO proteasu), nebo přímým zakoncentrováním vzorku v koncentrační zkumavce s filtrem (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, 10 000 MWCO) při 4500 g a 4°C a promytím roztokem bez přítomnosti imidazolu.

### 3.2.11 Stanovení koncentrace rekombinantních proteinů

Pro stanovení koncentrace jednotlivých zakoncentrovaných proteinů byly použity metody bicinchoninová a Bradforda, jakožto zakoupené komerční kity (Smith et al., 1985; Bradford, 1976). Měření probíhala na základě manuálů.

### 3.2.12 Stanovení aktivity SUMO proteasy

Připravená rekombinantní SUMO proteasa má při koncentraci 2 mg/ml aktivitu odpovídající 1 U/ $\mu$ l. To odpovídá schopnosti štěpit 2  $\mu$ g substrátu na 1  $\mu$ l přidané SUMO proteasy při 30°C po dobu 1 hod s výtěžností 85%. Tyto údaje nám byly poskytnuty kolegy z Itálie (Univerzita v Pavii, Itálie).

Ověření aktivity enzymu bylo provedeno pomocí reakcí, které obsahovaly 100  $\mu$ g His-SUMO-ADA a 50  $\mu$ l připravené SUMO proteasy. Štěpení probíhalo po dobu 1, 2, 4 hod a přes noc při 4°C. Také byly nastaveny reakce se snižujícím se obsahem SUMO proteasy na 100  $\mu$ g substrátu a to 40  $\mu$ l, 30  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l (0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1; 0,02 U/ $\mu$ l) za stejných podmínek. Výsledky byly na závěr vyhodnoceny pomocí SDS-Page.

### 3.2.13 Kvantitativní odštěpení SUMO kotvy s následnou purifikací

Přečištěná a zakoncentrovaná His-SUMO-ADA byla podrobena kvantitativnímu štěpení pomocí SUMO proteasy, u které byly zjištěny optimální podmínky pro štěpení (kapitola 4.3). K známému množství His-SUMO-ADA bylo přidáno odpovídající množství SUMO proteasy a směs byla inkubována po dobu 1 - 2 hod při teplotě 4°C.

Pro získání čisté ADA byla provedena purifikace na  $\text{Co}^{2+}$ -NTA agarose, na kterou se navázala jak SUMO proteasa (obsahuje poly-His kotvu), tak i odštěpená His-SUMO kotva. Směs byla nanášena při průtoku 0,35 ml/min po dobu odpovídající minimálně 3 - 4 objemům kolony. Štěpená ADA (AtADA1) se neváže na kolonu, a tím pádem zůstává v roztoku.

### 3.2.14 Měření aktivity adenosindeaminasy

#### 3.2.14.1 Stanovení aktivity pomocí spektrofotometru

Aktivita enzymu je definována jako rychlost katalyzované reakce. Základní jednotka aktivity enzymu je standardně používaný 1 katal, což je aktivita enzymu, při které se přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu. Enzymová aktivita je vyjádřena vztahem:

$$a(\text{katal}) = \frac{\Delta A \times V}{\Delta t \times \epsilon \times l}, \quad (1)$$

kde  $\Delta A$  je změna absorbance,  $V$  objem v  $\text{dm}^3$ ,  $\Delta t$  čas reakce v s,  $\epsilon$  molární extinkční koeficient v  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a  $l$  je šířka kyvety v cm.

Spektrofotometrická měření pro ADA byla prováděna v 1ml křemenné kyvetě.

##### 3.2.14.1.1 Přímá detekce

Metoda přímé detekce je založena na absorpčních vlastnostech měřených substrátů. Nukleotidy (Ado, Ade) mají absorpční maximum při 260 nm, přičemž jejich enzymaticky deaminované produkty (inosin a hypoxantin) mají toto maximum posunuté ke 240 nm. Metoda stanovení aktivity pomocí přímé detekce je založena na již publikovaném protokolu (Kalckar, 1947).

Aktivita připravené AtADA1 byla měřena v pufrch s rozdílným pH (4,5 - 6,0 v 50 mM acetátové pufr; 6,5 - 7,5 v 50 mM fosfátové pufr; 8,0 - 9,0 v 50 mM uhličitanové pufr) pro zjištění pH optima při 30°C. Reakční směs o objemu 1 ml obsahovala substrát Ade ( $\epsilon_{\text{Ade}} = 11050 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{\text{hyp}} = 8850 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a Ado ( $\epsilon_{\text{Ado}} = 5740 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{\text{ino}} = 12930 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) o koncentraci 0,067 nebo 0,0335 mM, enzym o koncentraci 0,18  $\mu\text{g/ml}$  až 0,1  $\text{mg/ml}$  a odpovídající pufr. Reakce byla zahájena přidáním substrátu a monitorována 20 min se startem po 6 s, přičemž hodnoty byly zaznamenávány každých 60 s. Jako referenční enzymy, u kterých byla měřena aktivita při pH 6,7 (převzato z Pospíšilová et al., 2008) a 30°C, byly použity lidská ADA (HsADA; 1U/ml; 10  $\mu\text{l}$  v reakci) a AtADA2 za stejných podmínek.

### 3.2.14.1.2 Spřažená reakce

Metoda je založena na detekci uvolněného amoniaku, který je vytvářen jako vedlejší produkt ADA aktivity, pomocí glutamátdehydrogenasy (GD). Při této reakci dochází k zabudování volného amoniaku do 2-oxoglutarátu za současné oxidace NADH ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) na  $\text{NAD}^+$ , což je detekováno jako pokles absorbance při 340 nm. Metoda stanovení byla převzata z certifikované metody pro měření aktivity lidské ADA1 (Canalias et al., 2002).

Prvním krokem byla kalibrace katalytické koncentrace GD, která byla rozpuštěna v roztoku obsahujícím 0,606 mg/ml GD, 25 mM imidazolový pufr pH 7,9, 2 mg/ml BSA. Samotná reakční směs obsahovala 85 mM imidazolový pufr pH 7,9, 14 mM 2-oxoglutarát, 2,5 mM ADP, 0,19 mM NADH, 200 mM octan amonný v objemu 1 ml. Směs byla vytemperována na teplotu 37°C a reakce byla zahájena přidáním 25  $\mu\text{l}$  GD (1x, 10x, 100x ředěno), přičemž jako blank byla použita reakce s přidavkem 25  $\mu\text{l}$  vody. Reakce probíhala 5 min, se startem v 0 s a mezičasem měření 10 s.

Po stanovení katalytické koncentrace GD se přistoupilo k měření aktivity AtADA1, AtADA2 a HsADA. Reakční směs pro detekci aktivity jednotlivých ADA obsahovala 210 mM fosfátový pufr pH 7,2, 0,25 mM NADH, 21 mM Ado nebo 21 mM Ade, 14,7 mM 2-oxoglutarát, 2,62 mM ADP a 0,5 ml 10x zředěného roztoku GD. Objem reakční směsi činil 1 ml a směs byla vytemperována na teplotu 37°C. Reakce byla zahájena přidavkem 50  $\mu\text{l}$  ADA (0,1 mg/ml; 10  $\mu\text{l}$  HsADA s 40  $\mu\text{l}$  pufru) a probíhala 12 min, se startem v 0 s a mezičasem měření 20 s.

### 3.2.14.2 Stanovení aktivity a kinetických parametrů pomocí metody UHPLC

UHPLC je chromatografická technika sloužící k separaci různých složek vzorku s cílem potvrdit jejich přítomnost (pomocí retenčních časů standardů) a koncentraci ve vzorku. Může sloužit i k izolaci jednotlivých složek směsi. Základem chromatografického systému jsou mobilní a stacionární fáze. Mobilní fáze unáší složky vzorku ložiskem stacionární fáze, přičemž dochází k separaci látek, které s ní rozdílně interagují, na základě jejich rozdílných fyzikálně-chemických vlastností.

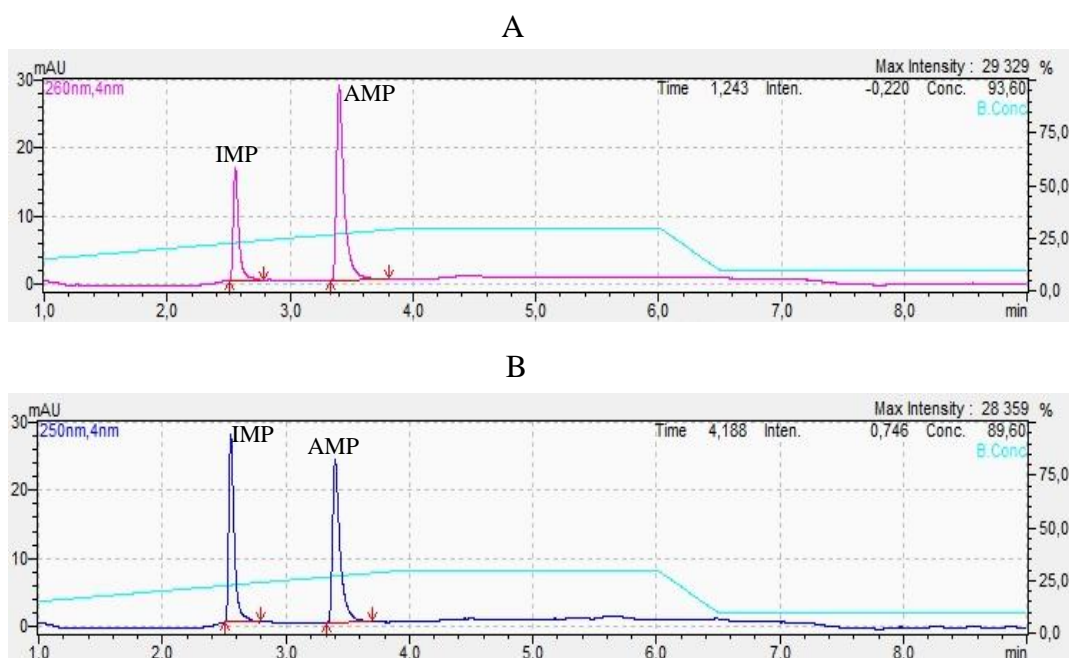
Pomocí metody UHPLC byla měřena aktivita ADA vůči jednotlivým substrátům (Ado, Ade, AMP, ATP) v časových intervalech 0, 1, 3 a 6 hod. Reakční směs



obsahovala 50 mM fosfátový pufr (pH 7,0 nebo pH 7,5), 1 mM substrát a byla vytemperována na teplotu 30°C nebo 37°C. Reakce byla zahájena přidavkem enzymu tak, aby výsledný obsah enzymu byl 0,1 mg na 100 µl reakční směsi. Jednotlivé reakce byly zastaveny přidavkem dvojnásobného objemu methanolu (HPLC Super Gradient). Jako první kontrola byly nastaveny stejné reakce při 37°C v 50 mM fosfátovém pufru pH 7,5 obsahující pouze substrát a pufr. Druhou kontrolou byly stejně nastavené reakce s balastními bakteriálními proteiny, které byly připraveny z bakterií obsahujících prázdný plasmid (při totožných expresních podmínkách jako pro AtADA2) a purifikovány stejným způsobem jako v kapitole 3.2.6.

Substráty a produkty reakce byly identifikovány pomocí retenčních časů jednotlivých standardů (Obr. 22). Plochy píků byly procentuálně vyjádřeny jako změna přeměny substrátu na produkt v daném čase, jejichž součet odpovídá 100%.

Pro stanovení kinetických parametrů Michaelisovy konstanty ( $K_m$ ) a rychlostní konstanty ( $k_{cat}$ ) byla změřena aktivita enzymu AtADA2 s pravděpodobně hlavním substrátem AMP v rozmezí koncentrací 50 - 1000 µM. Reakční směs obsahovala 50 mM fosfátový pufr pH 7,5 a 0,1 mg/ml ADA při teplotě 37°C. Výsledky byly zhodnoceny v programu GraFit verze 4.0.12 (Erithacus; Velká Británie).



**Obrázek 22 - Chromatogram znázorňující separaci standardů AMP a IMP**  
A - detekce při 260 nm; B - detekce při 250 nm.

### 3.2.15 Příprava vzorku pro UHPLC

Vzorky (zastavené reakce) byly centrifugovány 10 min při 14000 g a 4°C. Do nové mikrozkuřavky bylo odebráno 15 µl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 185 µl mobilní fáze (15 mM TEA pH 6,0 pro Ade, Ado, AMP, ATP). Po 10 min inkubaci při laboratorní teplotě byly vzorky přeneseny na filtry (0,2 µm; Costar Spin-X; Corning Inc., USA) a stočeny při 9500 g, 5 min, 4°C. Nakonec byly vzorky napipetovány do vialek určených pro měření pomocí UHPLC.

### 3.2.16 Analýza vzorků pomocí UHPLC

Analýza vzorků byla provedena na přístroji Nexera s UV/VIS detekcí na koloně Kinetex<sup>®</sup> 1,7µm, C 18, 100 Å; LC Column 150 x 2,1 mm (Agilent, USA). Mobilní fáze A byl 15 mM TEA pH 6,0 a mobilní fáze B byl 100% methanol. Analýza na UHPLC probíhala v methanolovém gradientu (Tab. 2 a 3) při průtoku 0,5 ml/min. Sledovaná vlnová délka byla 260 nm a 250 nm. Vyhodnocení bylo provedeno v programu LabSolutions 5.30.

**Tabulka 2 - Složení mobilní fáze při průběhu separace Ado, Ade, AMP a ATP systémem Nexera s UV/VIS detekcí**

Čas (min)	Složka A %	Složka B %
0	90	10
1,5	90	10
3,5	85	15
4	80	20
9	75	25
9,5	70	30
9,6	20	80
10,5	20	80
11	90	10

**Tabulka 3 - Složení mobilní fáze v průběhu měření kinetických parametrů AtADA2 se substrátem AMP systémem Nexera s UV/VIS detekcí**

Čas (min)	Složka A %	Složka B %
0	85	15
1	85	15
4	70	30
6	70	30
6,5	85	15

### 3.2.17 CD spektroskopie

Cirkulární dichroismus (Circular Dichroism: CD) je typem absorpční spektroskopie, která může poskytnout informace o struktuře mnoha typů biomakromolekul a jejich konformačních změnách. Měření je založeno na rozdílu absorpance mezi levotočivou a pravotočivou složkou polarizovaného záření u opticky aktivní látky v oblasti jejího absorpčního pásu. Měření CD spektra ve vzdálené UV oblasti (180 - 240 nm), kde hlavní absorbující skupinou je peptidová vazba, poskytuje informace o sekundární struktuře proteinů, jako je množství  $\beta$ -skládaných listů nebo  $\alpha$ -helixů. Charakter a intenzita získaného spektra udávají poměr zastoupení jednotlivých sekundárních struktur, kdy  $\beta$ -skládaný list má negativní vrchol při 218 nm, pozitivní při 196 nm a  $\alpha$ -helix má negativní vrcholy při vlnové délce 208 nm, 222 nm a pozitivní vrchol při 190 nm.

CD spektrofotometr (Jasco-J815) vyhodnocuje jednotlivá spektra v hodnotách elipticity (mdeg), které musí být převedeny na jednotky reziduální elipticity  $\theta$  ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ) pomocí rovnice:

$$[\theta] = \frac{100 \times \text{signál}}{C \times n \times l}, \quad (2)$$

kde  $[\theta]$  je reziduální elipticita, **signál** jsou hodnoty změřené přístrojem v mdeg, **C** je koncentrace proteinu v mM, **n** je počet AMK a **l** je délka kyvety v cm.

Vzorky byly měřeny při koncentraci 0,25 mg/ml proteinu (AtADA1 a AtADA2) v pufru obsahujícím 300 mM NaF, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,0 a kyvetě o šířce 0,1 cm v rozsahu vlnové délky 195 - 300 nm. Jako blank byl použit stejný pufr bez přítomnosti proteinů. Každý vzorek byl přístrojem změřen 3x a výstupem byl průměr těchto měření.

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu K2D3, který umožňuje predikci procentuálního zastoupení  $\beta$ -skládaného listu a  $\alpha$ -helixu (Jeune et al., 2012; <http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d3//>; 10.3.2016).

### **3.2.18 Krystalizace adenosindeaminasy**

Prvotní optimalizace krystalizačních podmínek ADA byla provedena metodou sedící kapky. Do krystalizační destičky obsahující 24 jamek bylo napipetováno 500  $\mu$ l krystalizačního roztoku tak, aby v každé jamce byl jiný roztok ze sady JCSG-plus Screen (96 různých krystalizačních roztoků). Následně byl do jamek vložen mostek obsahující sedlinu, do které byl přidán 1  $\mu$ l proteinu (2 mg/ml) a 1  $\mu$ l daného krystalizačního roztoku. Krystalizační destička byla utěsněna fólií tak, aby došlo k úplnému uzavření systému. Takto připravené krystalizační destičky byly vloženy do inkubátoru vytemperovaného na 20°C. Vznik krystalů byl pozorován stereoskopickým mikroskopem (STM 722 Intraco Micro, Česká republika).

## 4 Výsledky

Diplomová práce navazuje na již provedenou bakalářskou práci (Dvořák, 2014), ve které byly úspěšně optimalizovány expresní podmínky. Exprimovaná His-SUMO-ADA byla částečně purifikována pomocí  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarosy a byly optimalizovány podmínky pro její následné štěpení pomocí komerční SUMO proteasy (16°C nebo 21°C přes noc). Získané produkty štěpení byly identifikovány pomocí metody LC-ESI-MS.

### 4.1 Optimalizace purifikačních podmínek His-SUMO-ADA

První fází pro následnou optimalizaci purifikace byla příprava velkého množství exprimovaného proteinu v bakterii *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) z *pCIOX::At4g04880*. Pro tento účel byla využita kultivace a exprese ve fermentoru (Viz kapitola 3.2.3). Takto připravená kultura byla rozdělena na 4 rovnocenné díly (2,5 L) a získané pelety byly zmrazeny při -80°C.

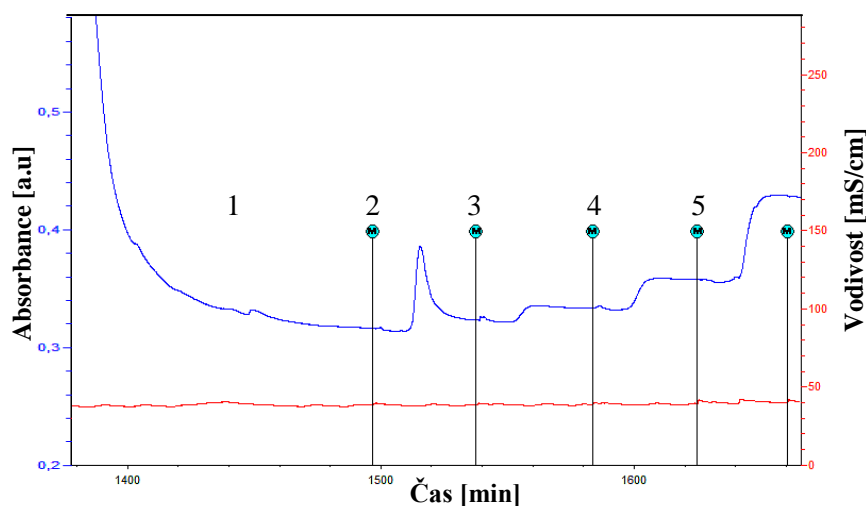
Pelety byly lyzovány a centrifugovány (Viz kapitola 3.2.4), přičemž získané supernatanty obsahující exprimované proteiny byly nanášeny na různé kolony ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ -NTA agarosa). Eluce proteinu byla provedena vždy stejným postupem, kdy byly použity roztoky obsahující 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 300 mM NaCl, 5% glycerol, pH 8,0 s měnící se koncentrací imidazolu na 60, 120, 250, 400 mM (Obr. 23). Frakce byly jímány do 50 ml zkumavek a byla u nich stanovena koncentrace proteinů tak, aby u následné SDS-Page analýzy bylo nanášeno stejné množství proteinů (0,2 mg/ml) (Obr. 24). Cílový protein His-SUMO-ADA má velikost přibližně 55 kDA.

Při purifikaci na  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarosové koloně dochází k eluci His-SUMO-ADA ve dvou frakcích (120 a 250 mM imidazol) a o různých čistotách proteinu, což je nežádoucí jev a použitá kolona tím pádem není vhodným řešením pro purifikaci (Obr. 24B).

Většina His-SUMO-ADA purifikované na  $\text{Zn}^{2+}$ -NTA agarosové koloně se nachází ve frakci eluované 60 mM imidazolem, což značí jeho nižší afinitu ke koloně. To je spojeno s přítomností více nečistot ve frakci obsahující His-SUMO-ADA (Obr. 24A).

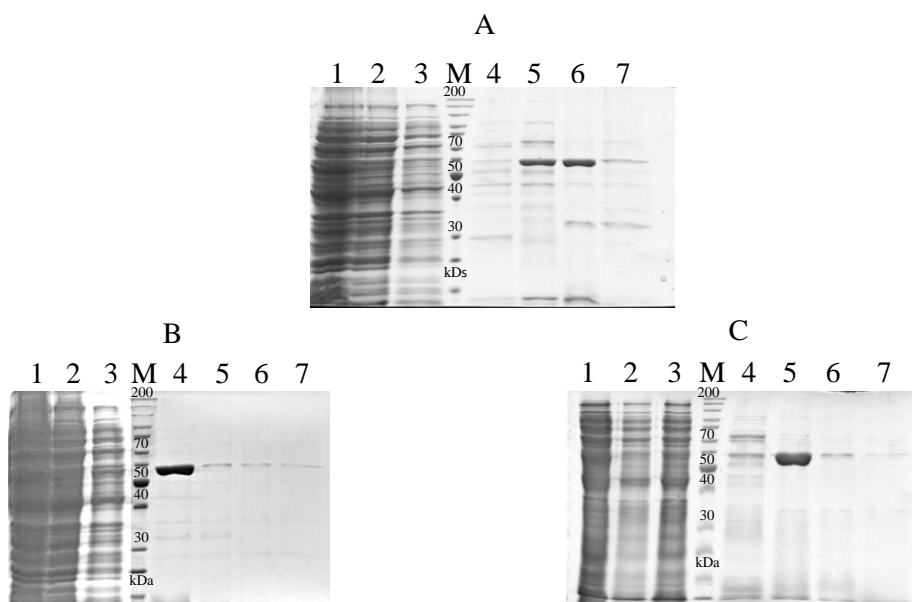
Jako optimální afinitní kolona pro purifikaci His-SUMO-ADA byla nakonec vybrána  $\text{Co}^{2+}$ -NTA agarosa, u které je až 90% enzymu o poměrně vysoké čistotě

eluováno ve frakci obsahující 120 mM imidazol. Nedochází k výraznému vyplavování cílového proteinu ve více frakcích, a tím je usnadněno jeho následné zakonzentrování (Obr. 24C). Pro všechny další purifikace His-SUMO-ADA byla použita právě  $\text{Co}^{2+}$ -NTA agarosová kolona.



**Obrázek 23 - Chromatogram eluce His-SUMO-ADA ze  $\text{Zn}^{2+}$ -NTA agarosové kolony**

Eluce His-SUMO-ADA pomocí lyzačního roztoku obsahujícího 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 300 mM NaCl, 5% glycerol, pH 8,0 se zvyšující se koncentrací imidazolu 1) 10 mM imidazol; 2) 60 mM imidazol; 3) 120 mM imidazol; 4) 250 mM imidazol; 5) 400 mM imidazol. Upraveno v programu LP Data View Software 1.03.



**Obrázek 24 - SDS-Page analýza purifikací na jednotlivých afinitních kolonách**

A)  $\text{Zn}^{2+}$ -NTA agarosová; B)  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarosová a C)  $\text{Co}^{2+}$ -NTA agarosová kolona. Jednotlivé frakce 1) Supernatant; 2) Po nanášení; M) marker; eluce proteinu 3) 10 mM imidazolem; 4) 60 mM imidazolem; 5) 120 mM imidazolem; 6) 250 mM imidazolem; 7) 400 mM imidazolem v lyzačním pufru.

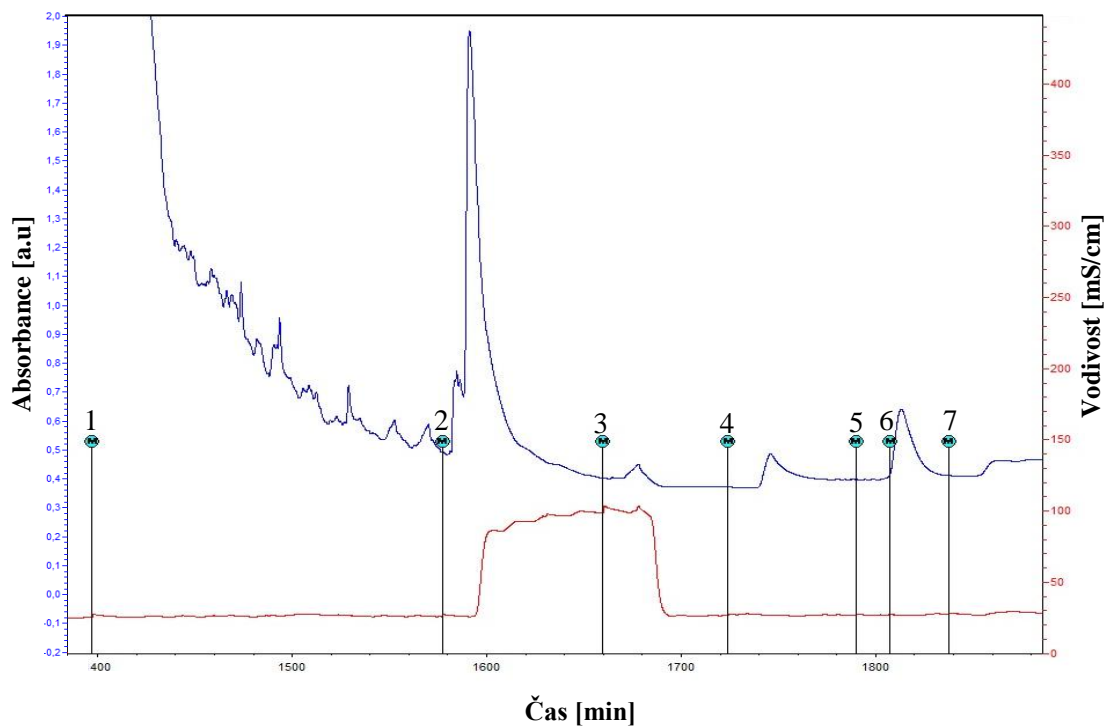
## 4.2 Příprava rekombinantní SUMO proteasy

V bakalářské práci (Dvořák, 2014) bylo optimalizováno štěpení His-SUMO-ADA pomocí komerčně dostupné SUMO proteasy (Invitrogen). Výtěžky štěpení enzymu nebyly dostatečně uspokojivé. Štěpení, které probíhalo při 16°C nebo 21°C přes noc mělo výtěžnost jenom 60% maximálně 70%. Z ekonomického hlediska je použití komerční SUMO proteasy velice náročné (cena a množství proteasy). Díky spolupráci s kolegy z Itálie jsme získali vektor obsahující gen pro SUMO proteasu a protokol pro její přípravu v laboratorních podmínkách. Rozhodli jsme se ji proto připravit a optimalizovat štěpení His-SUMO-ADA (Viz kapitola 3.2.7 a 3.2.12).

Prvním krokem byla transformace plasmidové DNA do chemicky kompetentních bakterií *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3), která byla provedena metodou tepelného šoku. Jedna z mnoha narostlých kolonií byla vybrána pro nasazení inokula, ze kterého bylo následně odebráno 0,5 ml. K odebrané kultuře bylo přidáno 0,5 ml 50% glycerolu a byla uschována při -80°C jako zásobní.

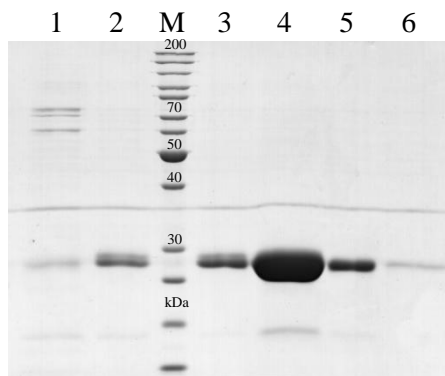
Expres a následná lýze buněk byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.4. Získaný supernatant obsahující SUMO proteasu byl nanášen na Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosovou kolonu. Eluce proteinu byla provedena lyzačním roztokem obsahujícím vzrůstající koncentraci imidazolu (Obr. 25). Výsledky purifikace byly vyhodnoceny pomocí SDS-Page (Obr. 26). Velikost SUMO proteasy odpovídá přibližně 27 kDa.

Největší podíl SUMO proteasy se eluoval z kolony při 200 mM koncentraci imidazolu s relativně vysokou čistotou. Přítomnost proteinu byla i v jiných frakcích (100 mM a 500 mM), avšak v zanedbatelném množství nebo v horší čistotě, a proto se s danými frakcemi dále nepracovalo. Koncentrace byla měřena metodou BCA, kdy po sestrojení kalibrační křivky byla pomocí standardů stanovena koncentrace SUMO proteasy na 18,235 mg/ml.



**Obrázek 25 - Chromatogram eluce SUMO proteasy ze  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarosové kolony**

Eluce proteinu s roztoky obsahujícími 50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM  $\beta$ -merkapt ethanol se vzrůstající koncentrací imidazolu 1) 0 mM; 2) 25 mM frakce 1; 3) 0 mM frakce; 4) 100 mM ; 5) 200 mM 1; 6) 200 mM vzorek; 7) 500 mM. Upraveno v programu LP Data View Software 1.03.



**Obrázek 26 - SDS-Page analýza purifikace SUMO proteasy**

Frakce eluované 1) 100 mM imidazolem vzorek 1; 2) 100 mM imidazolem vzorek 2; 3) 200 mM imidazolem vzorek 1; 4) 200 mM imidazolem (SUMO proteasa) vzorek 2; 5) 200 mM imidazolem vzorek 3; 6) 500 mM imidazolem v lyzačním pufru.

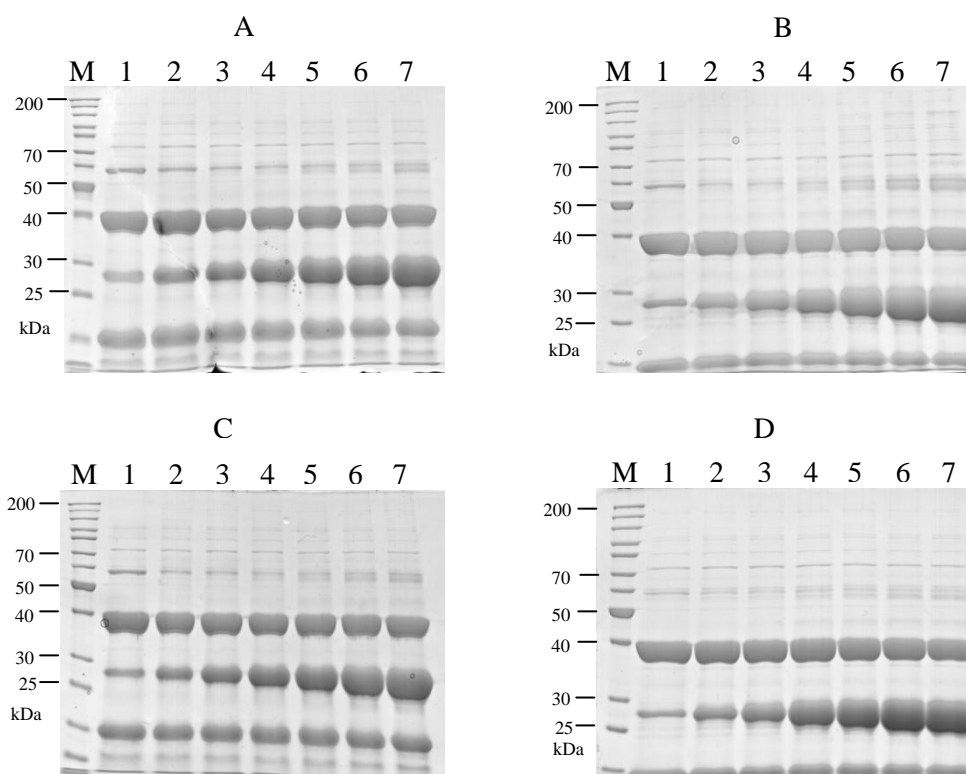


### 4.3 Stanovení aktivity rekombinantní SUMO proteasy

Připravená SUMO proteasa by měla mít při zásobní koncentraci 2 mg/ml aktivitu 1 U/ $\mu$ l při 30°C. To odpovídá aktivitě štěpení 2  $\mu$ g substrátu na 1  $\mu$ l přidané SUMO proteasy po dobu 1 hod a výtěžnosti 85% (Andrea Mattevi, Univerzita v Pavii, Itálie).

Námi připravená SUMO proteasa byla naředěna tak, aby její výsledná koncentrace v roztoku byla 2 mg/ml. Kontrola aktivity enzymu byla provedena podle protokolu uvedeného v kapitole 3.2.12 a výsledky měření byly zhodnoceny pomocí metody SDS-Page (Obr. 27). His-SUMO-ADA má po štěpení velikost přibližně 40 kDa (AtADA1) a odštěpená His-SUMO kotva 15 kDa.

Z výsledku je patrné, že His-SUMO kotva byla kvantitativně odštěpena i při 50x nižším přidavku SUMO proteasy. To znamená, že i 1  $\mu$ l zásobní SUMO proteasy je schopen poštěpit 100  $\mu$ g SUMO-modifikovaného proteinu za 1 hod při 4°C s efektivitou přibližně 95%.



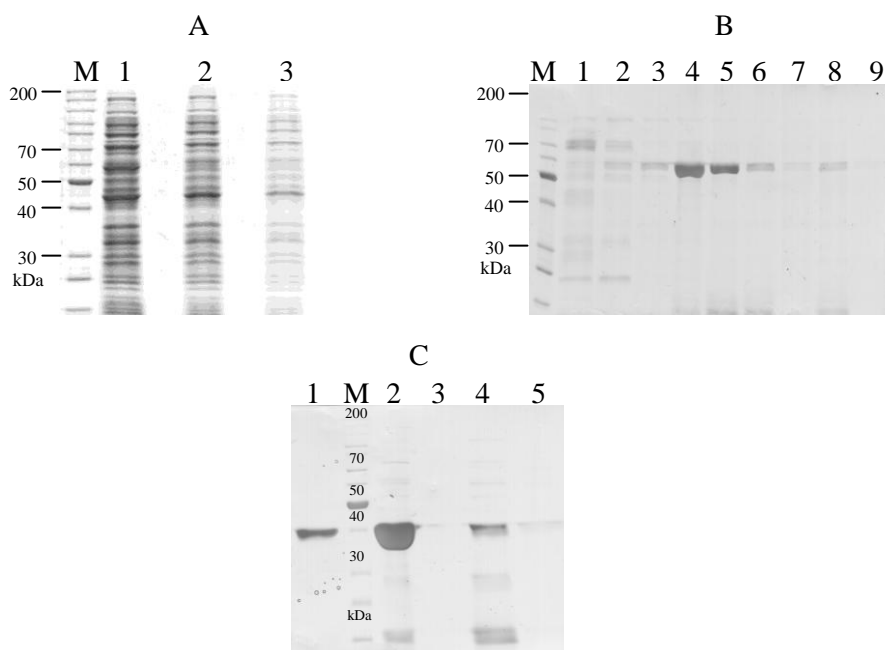
**Obrázek 27 - SDS-Page vizualizace štěpení His-SUMO-ADA pomocí SUMO proteasy**

Doba štěpení A) 1 hod; B) 2 hod; C) 4 hod; D) přes noc. Množství přidané SUMO proteasy 1) 1  $\mu$ l; 2) 5  $\mu$ l; 3) 10  $\mu$ l; 4) 20  $\mu$ l; 5) 30  $\mu$ l; 6) 40  $\mu$ l; 7) 50  $\mu$ l. Koncentrace His-SUMO-ADA byla konstantní pro všechny reakce. His-SUMO-ADA - 55 kDa, AtADA1 - 40 kDa, SUMO proteasa - 27 kDa, His-SUMO - 15 kDa.

#### 4.4 Kvantitativní odštěpení His-SUMO kotvy

Pro získání nativní AtADA1 bylo provedeno kvantitativní štěpení purifikované His-SUMO-ADA (Obr. 28 A, B). Přečištěná frakce obsahující 120 mM imidazol s cílovým proteinem byla nejprve zakoncetována a naředěna tak, aby výsledná koncentrace imidazolu byla nižší než 60 mM. V této frakci byla zjištěna orientační koncentrace proteinů a následně bylo přidáno odpovídající množství SUMO proteasy (1  $\mu$ l na 100  $\mu$ g proteinu). Směs byla inkubována přibližně 1 hod při 4°C.

Po uplynutí inkubační doby byla směs obsahující štěpenou AtADA1, His-SUMO kotvu a SUMO proteasu nanášena na  $\text{Co}^{2+}$ -NTA agarosovou kolonu. Na kolonu by se měly navázat jak odštěpená His-SUMO kotva, tak i SUMO proteasa a zbytek nepoštěpené His-SUMO-ADA. Naopak AtADA1 by měla zůstat v roztoku. Pro kontrolu byla provedena i eluce navázaných proteinů z kolony a všechny frakce byly zhodnoceny metodou SDS-Page (Obr. 28C). Nenavázaná AtADA1 byla následně zakoncetována.



**Obrázek 28 - SDS-Page vizualizace purifikace a kvantitativního odštěpení His-SUMO kotvy**

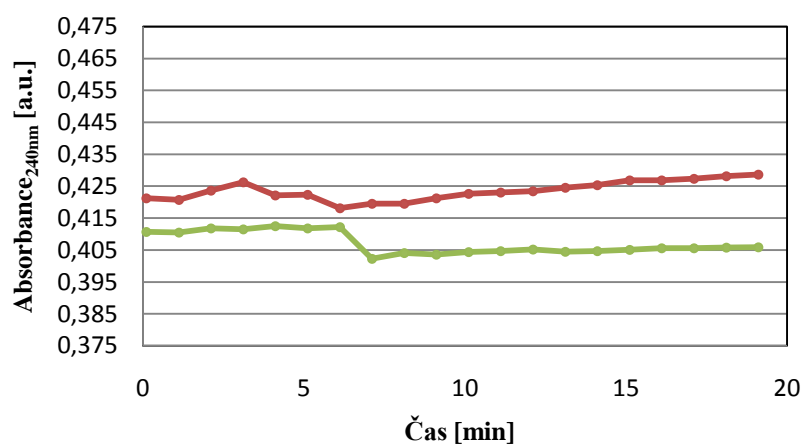
A a B purifikace His-SUMO-ADA, C druhá purifikace a zakoncetování AtADA1. A - M) marker; 1) supernatant; 2) po nanášení; 3) 10 mM imidazol. B - M) marker; eluce proteinů 1) 60 mM imidazolem 1; 2) 60 mM imidazolem 2; 3) 120 mM imidazolem 1; 4) 120 mM imidazolem; 5) 120 mM imidazolem 3; 6) 250 mM imidazolem 1; 7) 250 mM imidazolem 2; 8) 250 mM imidazolem 3 a 9) 400 mM imidazolem v lyzačním pufu. C - 1) Po nanášení; M) marker; 2) koncentrát; 3) proteklá frakce po zakoncetování; eluce proteinů 4) 250 mM imidazolem a 5) 400 mM imidazolem v lyzačním pufu.

Z výsledků je patrné, že došlo ke kvantitativnímu štěpení His-SUMO-ADA a k úspěšné purifikaci AtADA1 pomocí  $\text{Co}^{2+}$ -NTA agarosové kolony s relativně vysokou čistotou. Část štěpené AtADA1 se vyskytla ve frakci 250 mM imidazolu, jedná se však o zanedbatelné množství. U získaného koncentráту AtADA1 byl změřen obsah proteinů metodou BCA na 4,79 mg/ml.

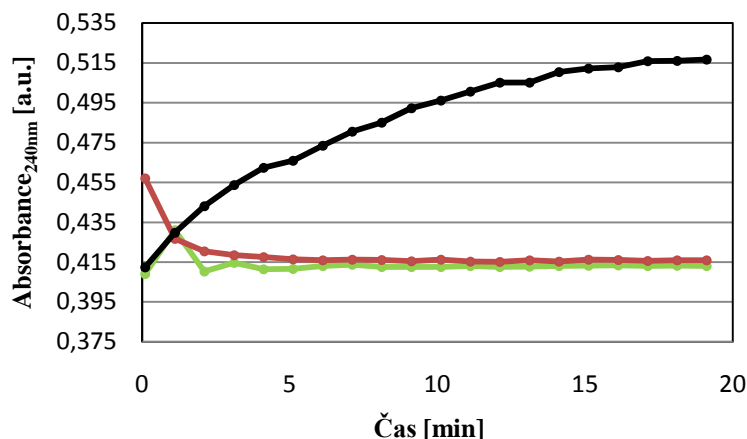
#### 4.5 Spektrofotometrické stanovení aktivity rekombinantní adenosindeaminasy

Po odštěpení His-SUMO kotvy bylo přistoupeno k měření aktivity připravené AtADA1, která by díky dříve připojené SUMO modifikaci mohla nyní vykazovat aktivitu, jelikož mohlo dojít k ovlivnění cílové struktury proteinu. Jako první metoda měření aktivity byla zvolena přímá spektrofotometrická detekce přeměny adenosinu a adeninu (260 nm) na jejich produkty inosin a hypoxantin (240 nm). Tato metoda byla již použita k detekci aktivity stejné rostlinné AtADA2, kde byl s nejvyšší reakční rychlostí přeměňován adenin (100%), dále ATP (68%), AMP (58%) a adenosin (30%), avšak při porovnání s ostatními ADA vykazoval takřka mizivou aktivitu (Pospíšilová et al., 2008).

Prvním krokem bylo stanovení pH optima enzymu v různých pufrch při 30°C (viz kapitola 3.2.14.1.1). Jelikož nebyla u naší připravené AtADA1 zaznamenána aktivita, bylo rozhodnuto o provedení referenčního srovnání s komerční HsADA a AtADA2 připravenou podle článku Pospíšilová et al., 2008 při pH optimu pro tento enzym (pH 6,7) (Obr. 29 a 30).



**Obrázek 29 - Porovnání míry tvorby hypoxantinu pro jednotlivé ADA**  
Zelená barva - AtADA1; červená barva - AtADA2. Koncentrace proteinů byla 0,1 mg/ml.



**Obrázek 30 - Porovnání míry tvorby inosinu pro jednotlivé ADA**

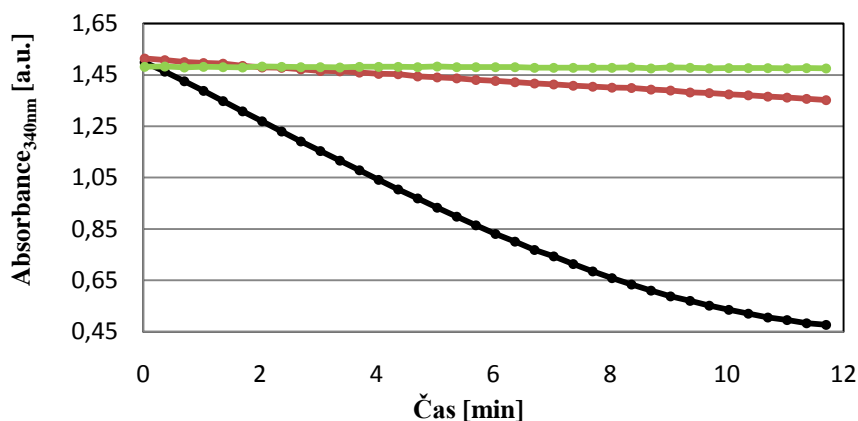
Zelená barva - AtADA1; červená barva - AtADA2; černá barva - HsADA. Koncentrace proteinů byla 0,1 mg/ml.

Měření s adeninem jako substrátem neposkytuje uspokojivé výsledky, jelikož v prvních 5 minutách měření absorbance namísto nárůstu klesá. V dalším časovém úseku je možno pozorovat nepatrný nárůst absorbance u AtADA1 a AtADA2, ale v celkovém měřítku je nárůst takřka nulový.

U měření s adenosinem byla jako kontrola použita i HsADA, která za daných podmínek vykazuje detekovatelnou aktivitu. Ta však neodpovídá aktivitě garantované výrobcem. U AtADA 1 a 2 byla situace podobná jako při měření s adeninem.

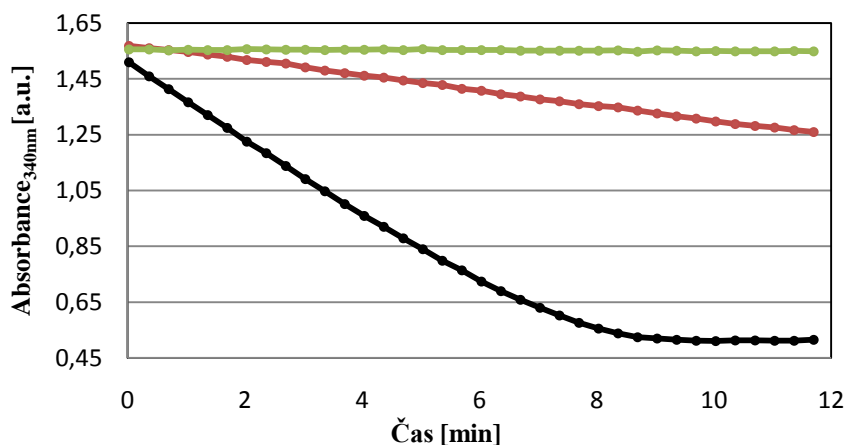
Z provedených měření je tedy patrné, že tato metoda není dostatečně citlivá pro měření aktivity méně aktivních proteinů, jako je to v případě rekombinantních AtADA. Tato metoda tedy nemohla být využita ke stanovení aktivity enzymu, a proto byly hledány alternativní metody detekce aktivity ADA v odborné literatuře.

Nakonec byla zvolena certifikovaná metoda spřažené reakce s GD, využívající detekci amoniaku uvolňovaného při deaminační aktivitě ADA. Standardně je tato metoda používaná ke klinickému stanovení aktivity HsADA (Canalias et al., 2002). Metoda by měla být dostatečně citlivá i pro enzymy vykazující nízkou aktivitu. Výstupem této metody byla detekce aktivity enzymu AtADA1 vůči substrátu adeninu a adenosinu (Obr 31, 32). Jako referenční ADA vzorky byly opět použity HsADA a AtADA2.



**Obrázek 31 - Detekce aktivity různých ADA vůči adeninu**

Zelená barva - AtADA1; červená barva - AtADA2; černá barva - HsADA.



**Obrázek 32 - Detekce aktivity různých ADA vůči adenosinu**

Zelená barva - AtADA1; červená barva - AtADA2; černá barva - HsADA.

Z výsledků je patrné, že AtADA1 má nejnižší aktivitu jak vůči substrátům Ado, tak Ade. Naopak u lidské HsADA byla pozorována nejvyšší aktivita enzymu, a to konkrétně pro Ado, u kterého již po 7 minutě dochází ke spotřebě substrátu NADH.

U AtADA2 byla naměřena aktivita, avšak oproti výsledkům publikovaným v článku Pospíšilová et al., 2008 byla získána vyšší reakční rychlost pro adenosin nežli pro adenin. Tento poznatek vedl k rozhodnutí provést měření substrátové specificity enzymů AtADA1 a 2 vůči substrátům Ade, Ado, AMP, ATP. Pro následné přesné určení aktivity, substrátové specificity a kinetických parametrů enzymů byla vybrána citlivá separační metoda UHPLC.

#### 4.6 Detekce aktivity a kinetických parametrů proteinu pomocí metody UHPLC

Jelikož u spektrofotometrických měření vykazovala AtADA1 nižší aktivitu nežli AtADA2, byla proto ověřena aktivita neštěpeného proteinu His-SUMO-ADA, zdali nedochází v průběhu štěpení a následné purifikaci k degradaci proteinu nebo nespecifickému štěpení SUMO proteasou (Tab. 4).

Z výsledků však vyplývá, že štěpená AtADA1 má větší aktivitu nežli neštěpená, tudíž nedochází ke ztrátě aktivity během štěpení SUMO proteasou nebo v průběhu purifikace. Nicméně AtADA2 disponuje vyšší aktivitou vůči všem testovaným substrátům v porovnání s AtADA1, a proto byla následná měření prováděna pouze s ní.

Jelikož čistota studovaných proteinu nebyla 100%, byla proto provedena kontrolní měření, zda se nejedná o aktivitu bakteriálního proteinu. U expresní baterie *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) obsahující prázdný plasmid pET151 byla provedena exprese a purifikace proteinů s následným potvrzením aktivity balastních proteinů stejným způsobem. Taktéž byly nastaveny slepé reakce obsahující pouze pufr a substrát (Tab. 5).

**Tabulka 4 - Nárůst deaminačních produktů u reakcí katalyzovaných jednotlivými enzymy**  
Přeměna Ado na hypoxantin, Ade na inosin, AMP na IMP, ATP na ITP.

AtADA2				
Doba reakce	Hypoxantin (%)	Inosin (%)	IMP (%)	ITP (%)
0h	0,0	0,0	0,0	0,0
1h	1,6	7,6	67,9	26,6
3h	3,8	12,5	98,1	50,1
6h	5,0	21,6	100,0	67,0
His-SUMO-ADA				
Doba reakce	Hypoxantin (%)	Inosin (%)	IMP (%)	ITP (%)
0h	0,0	0,0	0,0	0,0
1h	0,0	1,5	31,0	3,7
3h	0,0	3,3	68,7	5,9
6h	0,0	4,8	93,9	10,9
AtADA1				
Doba reakce	Hypoxantin (%)	Inosin (%)	IMP (%)	ITP (%)
0h	0,0	0,0	0,0	0,0
1h	0,0	1,3	50,0	14,3
3h	0,1	3,1	81,0	29,8
6h	0,6	4,8	97,3	59,3

**Tabulka 5 - Procentuální přeměna různých substrátů (Ado, ATP) na produkty pro kontrolní reakce s bakteriálními balastními proteiny**

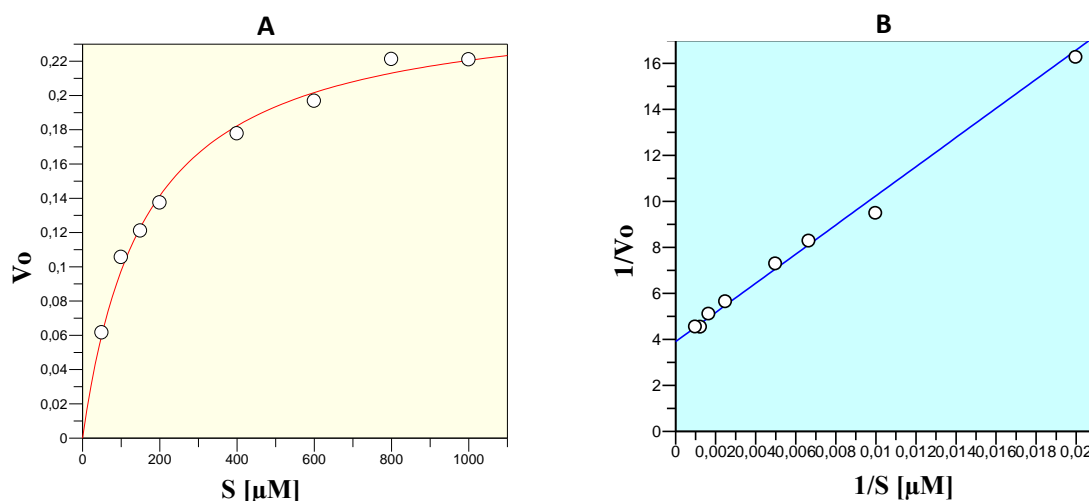
Inosin, adenin, hypoxantin, ADP, AMP, ITP jsou produkty reakce.

Adenosin jako substrát				
Doba reakce	Adenosin (%)	Inosin (%)	Adenin (%)	Hypoxantin (%)
0h	100,0	0,0	0,0	0,0
1h	92,5	1,2	6,2	0,0
3h	84,0	3,9	11,6	0,5
6h	76,3	6,3	16,1	1,3
ATP jako substrát				
Doba reakce	ATP (%)	ADP (%)	AMP (%)	ITP (%)
0h	77,7	5,8	16,5	0,0
1h	71,2	12,8	16,0	0,0
3h	51,2	26,9	21,9	0,0
6h	55,8	30,4	13,8	0,0

U kontrolních měření, obsahujících pozůstatky bakteriálních proteinů, dopadly negativně vzorky pro AMP a Ade, kdy se za dobu 6 hod nepřeměnil žádný substrát. U Ado dochází k mírné přeměně na inosin. V největší míře je Ado hydrolyzován na Ade, z něhož vzniká nepatrné množství hypoxantinu. ATP je hydrolyzován balastními proteiny na ADP a AMP, ale nebyl detekován vznik ITP. Slepé reakce dopadly u všech substrátů negativně. Dá se tedy říci, že detekovaná aktivita vůči AMP a Ade patří cílovým proteinům, avšak měření s Ado a ATP je zatíženo chybou, kterou způsobuje mírná aktivita balastních proteinů.

Na základě získaných výsledků z prvotních a kontrolních měření byl určen AMP (pro porovnání brána přeměna se 100,0% efektivitou v časovém úseku 3 hod) jako hlavní substrát, dále ATP (51,1%), Ado (12,7%), Ade (3,9%) (Viz Tab. 4).

Pro určení kinetických parametrů byla měřena koncentrační řada se substrátem AMP (50 - 1000  $\mu\text{M}$ ) v různých časových intervalech. Kinetické konstanty  $K_m$  a  $V_{lim}$  byly stanoveny pomocí programu GraFit verze 4.0.12 za využití nelineární regrese (Obr. 33). Následně byly odvozeny další konstanty charakterizující enzym, přičemž celkový přehled konstant je uveden v tabulce 6. Ze získaných konstant je patrné, že afinita substrátu k enzymu je poměrně vysoká, avšak rychlost přeměny substrátu je poměrně nízká.



**Obrázek 33 - Grafické vynesení závislosti koncentrace substrátu na počáteční rychlosti pro AtADA2**

A) Vynesení dle Michaelise a Mentenové; B) dvojnásobně reciproké vynesení.

**Tabulka 6 - Kinetické konstanty vypočtené pro enzym AtADA2**

$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$162,50 \pm 12,99$
$V_{lim}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$0,26 \pm 6\cdot 10^{-3}$
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$0,015 \pm 3\cdot 10^{-4}$
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ )	90,27
specifická aktivita ( $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	2,563

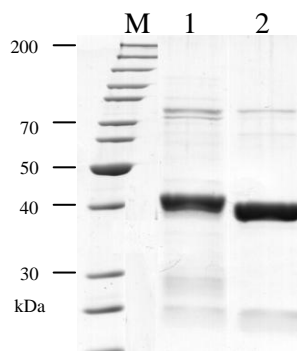
#### 4.7 Porovnání struktur AtADA1 a AtADA2 metodou cirkulárního dichroismu

Štěpená AtADA1 by měla mít totožnou strukturu jako AtADA2, a tím pádem i minimálně stejnou aktivitu vůči substrátům. Jelikož naměřené hodnoty aktivity byly nižší nežli u AtADA2, dá se předpokládat, že u ní může docházet k nesprávnému skládání enzymu, nebo částečným strukturním změnám vyvolaných přítomností His-SUMO kotvy. Tato hypotéza měla být potvrzena nebo vyvrácena pomocí porovnání sekundárních struktur obou enzymů metodou CD při pracovní koncentraci 0,25 mg/ml (Obr. 34).

Na základě překrytí změřených spekter není patrná změna v sekundární struktuře proteinů (Obr 35). Zastoupení  $\alpha$ -helixů a  $\beta$ -skládaných listů vypočtených pomocí programu K2D3 u AtADA1 je 32,2% a 19,1% u AtADA2 29,7% a 19,4 %, přičemž je možné pozorovat rozdíl v procentuálním zastoupení  $\alpha$ -helixů (2,5%). Přesnost překrytí teoretických spekter, kterým odpovídá procentuální zastoupení jednotlivých

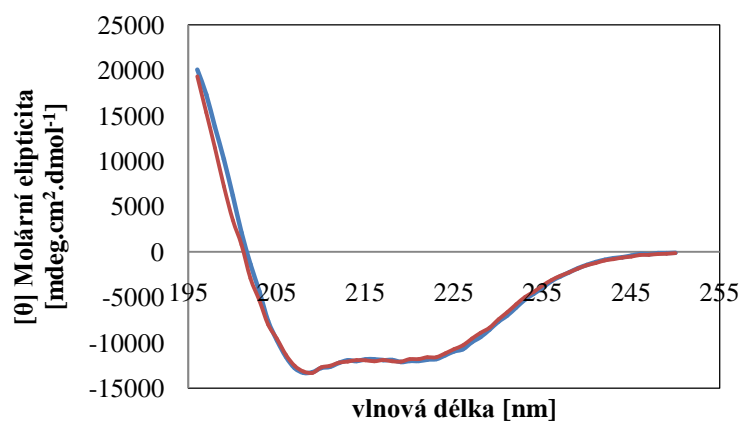


sekundárních struktur vyhodnocených programem K2D3, koreluje s naměřenými daty (Obr. 36).



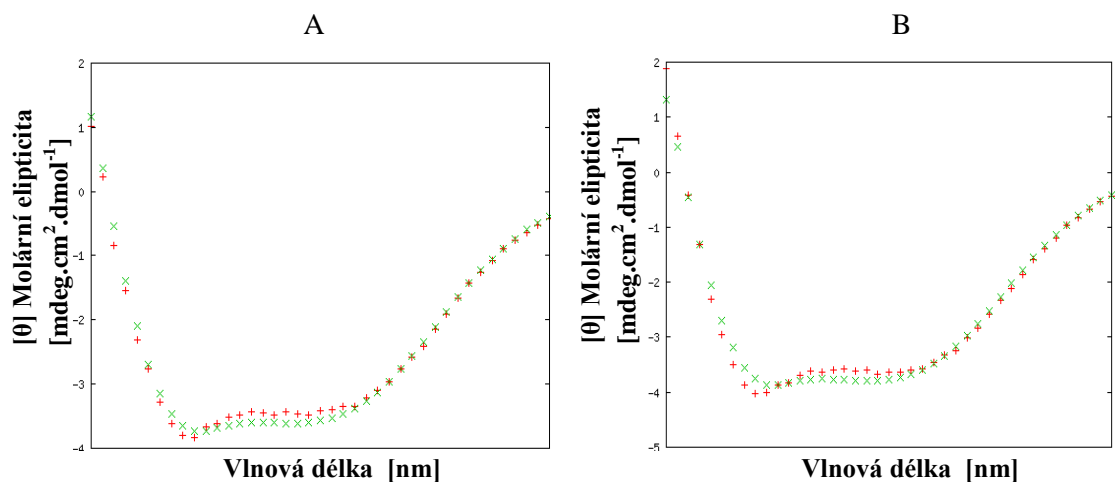
**Obrázek 34 - Čistota vzorků měřených na CD**

M) marker; 1) AtADA2; 2) AtADA1.



**Obrázek 35 - Grafické znázornění výsledků měření CD**

Modrá barva AtADA1; červená barva - AtADA2.

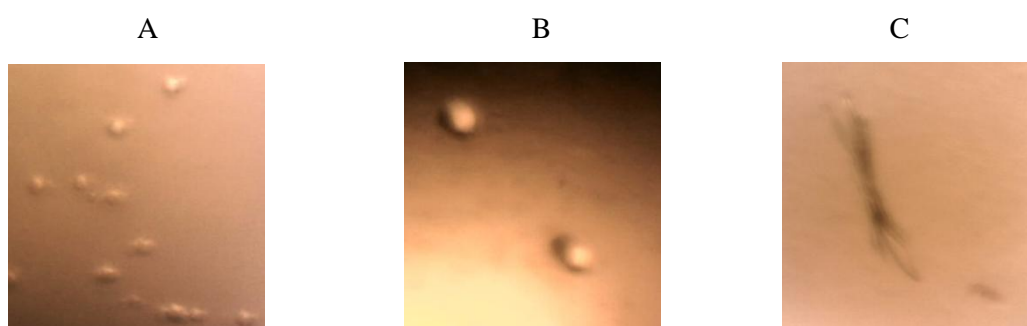


**Obrázek 36 - Porovnání teoretických a naměřených spekter při stanovení zastoupení jednotlivých sekundárních motivů z programu K2D3**

A) AtADA1; B) AtADA2. Zelená barva - teoretické spektrum; červená barva - naměřené hodnoty.

#### 4.8 Optimalizace krystalizace proteinu

Z 96 různých testovaných krystalizačních roztoků byl zaznamenán nárůst krystalů pouze u 5 z nich (Tab. 7, Obr. 37). Samotná délka krystalizace byla 3 týdny. Pravděpodobné proteinové krystaly, vzniklé krystalizací za níže uvedených podmínek, představují počáteční informaci, která bude použita pro další optimalizační experimenty zaměřené na variace v složení jednotlivých komponentů krystalizačních roztoků. Tímto způsobem je možné určit ideální podmínky krystalizace proteinu, přičemž získaný krystal může být následně použit pro rentgenostrukturní analýzu.



**Obrázek 37 - Vybrané krystaly AtADA2**

A) Roztok 1; B) roztok 3; C) roztok 4.

**Tabulka 7 - Složení krystalizačních roztoků**

Roztok	Složení
1	10 % w/v PEG 800; 0,1 M Tris pH 7,0; 0,2 M MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O
2	24 % w/v PEG 1500; 20% glycerol
3	40 % v/v PEG 400; 0,1 M Tris pH 8,5; 0,2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
4	14 % v/v 2-propanol; 30% v/v glycerol; 0,07 M Ca(COOH) <sub>2</sub> ; 0,14 M CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O
5	10 % v/v MPD; 0,1 M bicin pH 9,0

## 5 Diskuze

Hladina intracelulárního adenosinu, jakožto základní purinové báze, významného regulátoru řady buněčných pochodů a prekursoru energeticky bohatých molekul, je regulována enzymy nazývanými ADA. Tyto enzymy jsou přítomny v celé škále organismů v metabolické recyklační dráze purinových bází (Moffatt et al., 2002). Velmi intenzivně jsou studovány u vyšších eukaryot, a to především u savců, jelikož jejich nefunkčnost nebo nadbytek má fatální následky způsobující v krajních případech až úmrtí organismu (Gaspar et al., 2006). Několik savčích ADA, včetně lidské, bylo rekombinantně připraveno za účelem následné rentgenostrukturní analýzy, která přispěla k pochopení mechanismu působení těchto enzymů (Kinoshita et al., 2003).

Přítomnost ADA u rostlin nebyla prozatím prokázána, a to i přesto, že genomové databáze obsahují geny kódující předpokládané ADA. V některých odborných člancích je dokonce uváděno, že ADA je u rostlin nepřítomna a její aktivitu zastupuje adenosinkinasa (Moffatt et al., 2002). V práci publikované v roce 2008 byl připraven rekombinantní produkt genu At4g04880 pomocí expresního hostitele *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3), který kóduje předpokládanou rostlinnou ADA (Pospíšilová et al., 2008). Výsledkem této práce bylo zjištění, že připravený enzym je téměř neaktivní v porovnání s referenční lidskou ADA. Mírná aktivita byla detekována pro substrát adenin, kdy jako metoda detekce aktivity byla zvolena přímá spektrofotometrická detekce nárůstu produktu a úbytku substrátu (viz kapitola 3.2.14.1.1) (Kalckar, 1947).

Jelikož výtěžek exprese a také aktivita cílového proteinu byly poměrně nízké, bylo rozhodnuto o jeho klonování do expresního vektoru pCIOX, který k cílovému proteinu připojí His-SUMO modifikaci (Dvořák, 2014). Tato posttranslační proteinová modifikace je přítomna ve všech eukaryotických organizmech a ovlivňuje celou řadu buněčných pochodů (Hochstrasser et al., 2009). SUMO modifikace působí jako analog ubiquitinu, který mimo jiné slouží k cílené degradaci proteinu na proteasomu, poskytuje modifikovanému proteinu zvýšenou stabilitu, rozpustnost a umožňuje rychlejší a přesnější skládání proteinu. V řadě případů změna expresního vektoru za vektor kódující SUMO modifikaci vedla ke zvýšení exprese, stability proteinu a následné detekce aktivity, která nebyla detekována u rekombinantního produktu připraveného ve vektoru bez SUMO modifikace (Butt et al., 2005). Výhodou využití SUMO modifikujících vektorů je možnost specifického odstranění SUMO kotvy pomocí

SUMO proteasy rozpoznávají diglycinový motiv na C-konci SUMO modifikace. V této diplomové práci byla úspěšně optimalizována metoda purifikace pro připravenou rekombinantní His-SUMO-ADA pomocí různých afinitních kolon, kdy největší výtěžek a přijatelná čistota cílového proteinu byla zaznamenána na  $\text{Co}^{2+}$ -NTA-agarosové koloně. Před samotným kvantitativním odštěpením His-SUMO kotvy byla připravena SUMO proteasa, která nám byla darována jako plasmid s genem kódující SUMO proteasu kolegy z italské univerzity. Plasmid byl transformován do expresní bakterie *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) a byla provedena exprese s následnou purifikací proteinu podle poskytnutého protokolu. Získaný protein byl naředěn na pracovní koncentraci (2 mg/ml), u které byla provedena optimalizace štěpení. Ze získaných výsledků jsme dospěli k závěru, že 1  $\mu\text{l}$  zásobní SUMO proteasy je schopen poštěpit 100  $\mu\text{g}$  His-SUMO-ADA při 4°C v průběhu 1 hod s 95% efektivitou. Oproti komerční SUMO protease, vykazující nižší aktivitu a optimální podmínky štěpení při vyšších teplotách a delší době štěpení (16 - 21°C přes noc), jsme připravili efektivnější enzym, jehož pořizovací cena je mnohonásobně nižší. Pomocí připravené SUMO proteasy byla kvantitativně odštěpena His-SUMO kotva. Zisk cílového proteinu byl 4,79 mg/ml o vysoké čistotě.

Cílem měření aktivity připraveného enzymu mělo být potvrzení přítomnosti funkčních adenosindeaminas v rostlinách. Jelikož se jedná o produkt eukaryotického genu, exprese proteinu společně se SUMO modifikací by pravděpodobně mohla zvýšit správnost skládání cílového proteinu, a tím by mohlo dojít i ke zvýšení aktivity proteinu. Tato teorie byla ověřena dle metody již dříve použité pro předpokládanou rostlinnou AtADA2 v práci Pospíšilová et al., 2008, kdy bylo využito spektrofotometrické detekce nárůstu absorbance produktu a poklesu substrátu při jejich odpovídajících absorpčních maximech. Jelikož danou metodou nebyla detekována žádná aktivita pro námi připravenou AtADA1 (Ade a Ado jako substrát), byla provedena referenční měření s lidskou adenosinademinasou a připravenou AtADA2 dle článku Pospíšilová et al., 2008. Jedině u lidské ADA byla detekována aktivita, avšak výsledky měření neodpovídaly aktivitě garantované výrobcem. Metoda přímé spektrofotometrické detekce aktivity ADA byla vyhodnocena jako velmi nevhodná a především nepoužitelná pro detekci aktivity enzymů s nízkou aktivitou. V odborné literatuře byly následně nalezeny další možné varianty detekce aktivity ADA, z nichž byly vybrány dvě metody. První z nich byla metoda spřažené reakce

s glutamátdehydrogenasou, která může být využívána v klinické praxi pro detekci aktivity lidské ADA (Canalias et al., 2002). Díky této metodě byla detekována aktivita u enzymů AtADA1 a 2 vůči substrátům Ado a Ade. Oba enzymy vykazovaly větší aktivitu vůči substrátu adenosinu. Zajímavé bylo zjištění, že připravená AtADA1 vykazuje nižší aktivitu než AtADA2. Nicméně naměřená aktivita mohla taktéž patřit substrátu ADP, který byl přítomen v reakční směsi (protokol dle Canalias et al., 2002).

Pomocí metody UHPLC byly změřeny aktivity enzymů AtADA1 a 2, His-SUMO-ADA se substráty Ado, Ade, AMP, ATP. Taktéž byly nastaveny kontrolní reakce s balastními bakteriálními proteiny a slepé reakce obsahující pouze substrát a pufr. Z naměřených výsledků byl určen jako pravděpodobně hlavní substrát AMP, u kterého dopadly negativně obě kontroly. Z výsledků kontrol je patrné, že měření aktivity přeměny adenosinu bude při stávající čistotě proteinu zatíženo chybou, jelikož byla detekována deaminační aktivita u balastních proteinů, které taktéž hydrolyzují ATP na ADP a AMP. Reakce nastavené s enzymy His-SUMO-ADA a AtADA1 měly napovědět, zdali nedochází v průběhu štěpení a následné purifikaci k degradaci proteinu nebo nespecifickému štěpení SUMO proteasou, což bylo vyvráceno. Přesto však AtADA1 vykazuje nižší aktivitu než AtADA2, u které byly finálně stanoveny kinetické parametry pro AMP ( $K_m = 162,50 \pm 12,99 \mu\text{M}$ ;  $V_{lim} = 0,26 \pm 6 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $k_{cat} = 0,015 \pm 3 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ;  $k_{cat}/K_m = 90,27 \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ; specifická aktivita =  $2,563 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ).

Porovnáním aminokyselinové sekvence předpokládané rostlinné ADA v PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>; 7.4.2016) bylo nalezeno 17 vyřešených struktur pro jiné adenosindeaminasy, z nichž žádná nebyla rostlinná. Aktivita enzymu však naznačuje, že by se mohlo jednat o AMP deaminasu. Porovnáním hodnot  $K_m$  konstant uvedených v enzymatické databázi Brenda (<http://www.brenda-enzymes.info/>; 7.4.2016) pro ostatní charakterizované AMP-deaminasy se získanou hodnotou pro AtADA2 lze konstatovat, že připravený enzym má vysokou afinitu k substrátu. Samotná hodnota rychlosti přeměny  $k_{cat}$ , která vyjadřuje efektivitu enzymu je poměrně malá. U rostlin je AMP-deaminasa přítomná jako růstový faktor a její přítomnost je nezastupitelná při přechodu zygoty v embryo a taktéž katabolismu nukleových bází (Xu et al., 2005). Pro správné zařazení enzymů do dané skupiny musí být provedena další měření a v nejlepším případě vyřešena jeho struktura pomocí rentgenostrukturní analýzy.

U připravené AtADA1 byla očekávána vyšší aktiva enzymu nežli u AtADA2, avšak provedená měření prokázala pravý opak. Dá se tedy předpokládat, že AtADA1 je nejspíše nesprávně složená, což má za následek nižší aktivitu. Tato teorie byla ověřena porovnáním zastoupení sekundárních strukturních motivů studovaných enzymů pomocí CD. Překryv získaných spekter pro AtADA1 a AtADA2 je téměř totožný a zastoupení  $\alpha$ -helixů a  $\beta$ -skládaných listů, vypočtených pomocí programu K2D3, ukazuje pouze 2,5% rozdíl v zastoupení  $\alpha$ -helixů. Zásadní změna na úrovni sekundární struktury tedy nebyla zaznamenána, avšak může docházet k nepatrné změně některé domény způsobené koexpresí se SUMO modifikací. Jelikož se ADA mohou vyskytovat v dimerních formách, může i malá změna struktury bránit vzniku dimerní konformace, která je optimální pro aktivitu enzymu. Tato teorie by však musela být potvrzena dalším měřením, jako je například střednětlaká gelová permeační chromatografie a další metody schopné určit zastoupení monomerních a dimerních forem proteinů.

Při optimalizaci krystalizace AtADA2 bylo identifikováno 5 různých krystalizačních roztoků, u kterých byl pozorován nárůst pravděpodobně proteinových krystalů. Tyto nalezené podmínky budou použity pro další optimalizaci za účelem identifikace ideálních krystalizačních podmínek proteinu.

## 6 Závěr

Diplomová práce navazovala na již dříve provedenou práci (Pospíšilová et al., 2008; Dvořák, 2014) s cílem potvrdit přítomnost adenosindeaminasové aktivity u rostlin. V první části byla optimalizována purifikace připravené His-SUMO-ADA, kdy jako nejvhodnější afinitní kolona byla pro purifikaci proteinu vybrána  $\text{Co}^{2+}$ -NTA agarosová kolona. Následně byla připravena darovaná rekombinantní SUMO proteasa, u které byly optimalizovány podmínky štěpení SUMO modifikovaného proteinu (1  $\mu\text{l}$  připravené zásobní SUMO proteasy o koncentraci 2 mg/ml štěpí 100  $\mu\text{g}$  substrátu při 4°C po dobu 1 hod). Další část práce byla pak zaměřena na detekci aktivity připravené AtADA1 v porovnání s enzymy AtADA2 a lidské ADA pomocí tří principově rozdílných technik. Jako optimální detekční metoda byla vybrána metoda UHPLC, díky které byl stanoven pravděpodobně hlavní substrát AMP. Jestliže efektivita přeměny AMP byla 100%, další substráty byly přeměňovány s 51,1% (ATP), 12,7% (Ado) a 3,9% (Ade) efektivitou. Jelikož AtADA2 vykazovala vyšší aktivitu nežli AtADA1, byly stanoveny kinetické parametry pro tento enzym v přítomnosti AMP ( $K_m = 162,50 \pm 12,99 \mu\text{M}$ ,  $V_{lim} = 0,26 \pm 6 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $k_{cat} = 0,015 \pm 3 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m = 90,27 \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ , specifická aktivita =  $2,563 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ).

Překrytím spekter proteinů AtADA1 a AtADA2, získaných z měření na CD, nebyla detekována zásadní změna v sekundární struktuře proteinů. Softwarovým vyhodnocením naměřených spekter bylo určeno zastoupení jednotlivých  $\alpha$ -helixů a  $\beta$ -skládaných listů v struktuře, přičemž byl zaznamenán 2,5% rozdíl v množství  $\alpha$ -helixů.

Bylo nalezeno 5 krystalizačních roztoků, u kterých byl detekován nárůst krystalů, jejichž složení musí být dále optimalizováno tak, aby byly nalezeny nejvhodnější podmínky krystalizace AtADA2.

## 7 Literatura

- Arnau J., Lauritzen C., Petersen G. E., Pedersen J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **48**, 1-13.
- Blackburn M., Kellems R. (2005) Adenosine deaminase deficiency: Metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv. Immunol.* **86**, 1-41.
- Blaese R., Culver K., Miller A., Carter S., Fleisher T., Clerici M., Shearer G., Chang L., Chiang Y., Tolstoshev P., Greenblatt J., Rosenberg S., Klein H., Berger M., Mullen C., Ramsey W., Muul L., Morgan R., Anderson W. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* **270**, 475-480.
- Boison D. (2013) Adenosine kinase: Exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol. Rev.* **65**, 906-943.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-54.
- Bruderer R., Tatham M., Plechanovova A., Matic I., Garg A., Hay R. (2011) Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates. *EMBO Rep.* **12**, 142-148.
- Butt T., Edavettal S., Hall J., Mattern M. (2005) SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* **43**, 1-9.
- Bylebyl R., Belichenko I., Johnson, E. (2003) The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J. Biol. Chem.* **278**, 44113-44120.
- Caffrey M. (2009) Crystallizing membrane proteins for structure determination: use of lipidic mesophases. *Annu. Rev. Biophys.* **38**, 29-51.
- Canalias F., Bota A., Gella F., Profilis C., ISBN 92-894-1812-5 (2002): The certification of the catalytic concentration of human adenosine deaminase (ADA 1) in reconstituted lyophilised material, BCR-647. EUR 19996 EN, 1st ed., European Commission Standards, Measurements & Testing programme, Brusel, Belgie.
- Cicala C., Ialenti A. (2013) Adenosine signaling in airways: Toward a promising antiasthmatic approach. *Eur. J. Pharmacol.* **714**, 522-525.
- Cohen S., Megherbi M., Jordheim L., Lefebvre I., Perigaud C., Dumontet C., Guitton J. (2009) Simultaneous analysis of eight nucleoside triphosphates in cell lines by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **15**, 3831-3840.
- Corsini L., Hothorn M., Scheffzek K., Sattler M., Stier G. (2008) Thioredoxin as a fusion tag for carrier-driven crystallization. *Protein Sc.* **17**, 2070-2079.
- Cortés A., Gracia E., Moreno E., Mallol J., Lluís C., Canela EI., Casadó V. (2015) Moonlighting Adenosine Deaminase: A Target Protein for Drug Development. *Med. Res. Rev.* **35**, 85-125.



- Cristalli G., Costanzi S., Lambertucci C., Lupidi G., Vittori S., Volpini R., Camaioni E. (2001) Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors. *Med. Res. Rev.* **21**, 105-128.
- Dohmen J. (2004) SUMO protein modification. *Biochim. Biophys. Acta.* **29**, 113-131.
- Droescher M., Chaugule K., Pichler A. (2013) SUMO rules: regulatory concepts and their implication in neurologic functions. *Neuromolecular Med.* **15**, 639-660.
- Duplay P., Hofnung M. (1988) Two regions of mature periplasmic maltose-binding protein of *Escherichia coli* involved in secretion. *J. Bacteriol.* **170**, 4445-4450.
- Dvořák P. (2014): *Expresa a charakterizace předpokládané rostlinné adenosindeaminasy.* Bakalářská práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Ellis G., Goldberg D. (1970) A reduced nicotinamide adenine dinucleotide-linked kinetic assay for adenosine deaminase activity. *J. Lab. Clin Med.* **76**, 507-517.
- Englander S. (2000) Protein folding intermediates and pathways studied by hydrogen exchange. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 213-238.
- Fox J., Kapust B., Waugh D. (2001) Single amino acid substitutions on the surface of *Escherichia coli* maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. *Protein Sci.* **10**, 622-630.
- Frey S., Görlich D. (2014) A new set of highly efficient, tag-cleaving proteases for purifying recombinant proteins. *J. Chromatogr A.* **11**, 95-105.
- Gaspar H., Bjorkegren E., Parsley K., Gilmour K., King D., Sinclair J., Zhang F., Giannakopoulos A., Adams S., Fairbanks L. (2006) Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol. Ther.* **14**, 505-513.
- George C., John L., Samuel C. (2014) An RNA editor, adenosine deaminase acting on double-stranded RNA (ADAR1). *J. Interferon Cytokine Res.* **34**, 437-446.
- Gerber A., Keller W. (1999) An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs. *Science* **286**, 1146-1149.
- Gong L., Millas S., Maul G., Yeh E. (2000) Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J. Biol. Chem.* **275**, 3355-3359.
- Gowda M., Venu R., Li H., Jantasuriyarat C., Chen S., Bellizzi M., Pampanwar V., Kim H., Dean R., Stahlberg E. (2007) *Magnaporthe grisea* infection triggers RNA variation and antisense transcript expression in rice. *Plant Physiol.* **144**, 524-533.
- Grosjean H., Auxilien S., Constantinesco F., Simon C., Corda Y., Becker H., Foiret D., Morin A., Jin Y., Fournier M., Fourrey J. (1996) Enzymatic conversion of adenosine to inosine and to N1-methylinosine in transfer RNAs. *Rev. Bioch.* **78**, 488-501.
- Hay T. (2005) SUMO: a history of modification. *Mol. Cell.* **18**, 1-12.
- Hefti M., Toorn, C., Dixon R., Vervoort J. (2001) A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal. Biochem.* **295**, 180-185.

- Hershfield M. (2003) Genotype is an important determinant of phenotype in adenosine deaminase deficiency. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 571-577.
- Hickey C., Wilson N., Hochstrasser M. (2012) Function and regulation of SUMO proteases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 755-766.
- Hochstrasser, M. (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* **458**, 422-429.
- Hopp T., Prickett K., Price V., Libby R. (1988) A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio-Techno.* **6**, 1204-1210.
- Hosfield T., Lu Q. (1999) Influence of the amino acid residue downstream of (Asp)<sup>4</sup>Lys on enterokinase cleavage of a fusion protein. *Anal. Biochem.* **269**, 10-16.
- Chaga G. (2001) Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *J. Bio-chem. Biophys. Met.* **49**, 313-334.
- Chaney A., Marbach E. (1962) Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* **8**, 130-132.
- Chang J., Alkan S., Hilschmann N., Braun D. (1985) Thrombin specificity. Selective cleavage of antibody light chains at the joints of variable with joining regions and joining with constant regions. *Eur. J. Biochem.* **151**, 225-230.
- Chechik B., Schrader W., Minowada J. (1981) An immunomorphologic study of adenosine deaminase distribution in human thymus tissue, normal lymphocytes, and hematopoietic cell lines. *J. Immunol.* **126**, 1003-1007.
- Choi S., Song H., Moon J., Seong B. (2001) Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: Expression from *Saccharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology. *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 718-724.
- Iijima R., Kunieda T., Yamaguchi S., Kamigaki H., Fujii-Taira I., Sekimizu K., Kubo T., Natori S., Homma K. (2008) The extracellular adenosine deaminase growth factor, ADGF/CECR1, plays a role in *Xenopus* embryogenesis via the adenosine/P1 receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 2255-2264.
- Iwaki-Egawa S., Yamamoto T., Watanabe Y. (2006) Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. *Biol. Chem.* **387**, 319-321.
- Jeune C., Andrade-Navarro M., Perez-Iratxeta C. (2012) Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins.* **80**, 374-381.
- Jun H., Kim T., Yeeh Y. (1994) Purification and characterization of an extracellular adenosine deaminase from *Nocardioides* sp. J-326TK. *Biotechnol. Appl. Bioc.* **20**, 265-277.
- Jühling F., Mörl M., Hartmann R., Sprinzl M., Stadler P., Pütz J. (2009) tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **37**, 159-162.
- Kalckar H. (1947) Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. II. Determination of adenine compounds. *J. Biol. Chem.* **167**, 445-459.

- Kaplan W., Husler P., Klump H., Erhardt J. (1997) Conformational stability of pGEX-expressed *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase: A detoxification enzyme and fusion-protein affinity tag. *Protein Sci.* **6**, 399-406.
- Kapust R., Waugh D. (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* **8**, 1668-1674.
- Kapust R., Tozser J., Fox J., Anderson D. (2001) Tobacco etch virus protease: Mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng.* **14**, 993-1000.
- Keegan L., Gerber A., Brindle J., Leemans R., Gallo A., Keller W., O'Connell M. (2000) The properties of a tRNA-specific adenosine deaminase from *Drosophila melanogaster* support an evolutionary link between pre-mRNA editing and tRNA modification. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 825-833.
- Keegan L., Leroy A., Sproul D., O'Connell M. (2004) Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs): RNA-editing enzymes. *Genome Biol.* **5**, 209.
- Kerscher O., Felberbaum R., Hochstrasser M. (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 159-180.
- Kerscher O. (2007) SUMO junction - what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep.* **8**, 550-555.
- Khorasanizadeh S., Peters I., Roder H. (1996) Evidence for a threestate model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 193-205.
- Kim U., Wang Y., Sanford T., Zeng Y., Nishikura K. (1994) Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 11457-11461.
- Kinoshita T., Nakanishi I., Terasaka T., Kuno M., Seki N., Warizaya M., Matsumura H., Inoue T., Takano K., Adachi H., Mori Y., Fujii T. (2005) Structural basis of compound recognition by adenosine deaminase. *Biochem.* **44**, 10562-10569.
- Kinoshita T., Nishio N., Nakanishi I., Sato A., Fujii T. (2003) Structure of bovine adenosine deaminase complexed with 6-hydroxy-1,6-dihydropurine riboside. *Bio. Crystall.* **59**, 299-303.
- Kipriyanov S., Kupriyanova O., Little M., Moldenhauer G. (1996) Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry. *J. Immunol. Met.* **196**, 51-62.
- Kishi A., Nakamura T., Nishio Y., Maegawa H., Kashiwagi A. (2003) Sumoylation of Pdx1 is associated with its nuclear localization and insulin gene activation, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, 830-840.
- Kumar V. (2013) Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: Where to go? *Purinergic. Sig.* **9**, 145-165.

- LaVallie E., Lu Z., Diblasio-Smith E., Collins-Racie L., McCoy J. (2000) Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Met. Enzymol.* **326**, 322-340.
- Li M., Chang W. (2009) Protein crystallization. *Photosynth. Res.* **102**, 223-229.
- Li S., Hochstrasser M. (1999) A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **398**, 246-251.
- Li S., Hochstrasser M. (2000) The yeast *ULP2 (SMT4)* gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2367-2377.
- Li S., Hochstrasser M. (2003) The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *J. Cell Biol.* **160**, 1069-1081.
- Ling F., Inoue Y., Kimura A. (1991) Purification and characterization of adenosine deaminase from *Klebsiella* sp. LF 1202. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 89-92.
- Lupidi G., Marmocchi F., Cristalli G. (1998) Inhibition studies on membrane adenosine deaminase from human placenta. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **46**, 1071-1080.
- Maier S., Galellis J., Mcdermid H. (2005) Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminase. *J. Mol. Evol.* **61**, 776-794.
- Malakhov M., Malakhova O., Drinker M., Weeks S., Butt T. (2004) SUMO fusion and SUMO-specific proteases for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genom.* **5**, 75-86.
- Manjasetty B., Turnbull A., Panjekar S., Bussow K., Chance M. (2008) Automated technologies and novel techniques to accelerate protein crystallography for structural genomics. *Proteomics* **8**, 612-625.
- Maroux S., Baratti J., Desnuelle P. (1971) Purification and specificity of porcine enterokinase. *J. Biol. Chem.* **246**, 5031-5039.
- Martin J., Bardwell J., Kuriyan J. (1993) Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo. *Nature* **365**, 464-468.
- Matunis M., Coutavas E., Blobel G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **135**, 1457-1470.
- McKern N., Ms., Lou, M., Frenkel, M. J., Verkuylen, A. (1997) Crystallization of the first three domains of the human insulin-like growth factor-1 receptor. *Protein Sci.* **6**, 2663-2666.
- Miller M., Barrett-Wilt G., Hua Z., Vierstra R. (2010) Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 16512-16517.
- Mitchell D., Marshall T., Deschenes R. (1993) Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* **9**, 715-722.

- Moffatt B. A., Ashihara H. (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*. 1 st ed. by American Society of Plant Biologists. 1-20.
- Mossesso E., Lima C. (2000) Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol. Cell* **5**, 865-876.
- Mukhopadhyay D., Dasso M. (2007) Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 286-295.
- Nagai K., Thogersen H. (1984) Generation of beta-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* **309**, 810-812.
- Nishikura K. (2010) Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 321-349.
- Nyhan W. (2005) Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol. Genet. Metab.* **86**, 25-33.
- Oosthuizen H., Ungerer J., Bissbort S. (1993) Kinetic determination of serum adenosine deaminase. *Clin. Chem.* **10**, 2182-2185.
- Parks T., Leuther K., Howard E., Johnston S., Dougherty W. (1994) Release of proteins and peptides from Psion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal. Biochem.* **216**, 413-417.
- Persson P., Hansell P., Palm F. (2013) Adenosine A2 receptor-mediated regulation of renal hemodynamics and glomerular filtration rate is abolished in diabetes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **765**, 225-230.
- Pickart C. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 503-533.
- Pospíšilová H., Frébort I., (2007) Aminohydrolases acting on adenine, adenosine and their derivatives. *Biomed. Pap.* **151**, 3-10.
- Pospíšilová H., Šebela M., Novák O., Frébort I. (2008) Hydrolytic cleavage of N6-substituted adenine derivatives by eukaryotic adenine and adenosine deaminases. *Biosci. Rep.* **28**, 335-347.
- Qiu W., Chen S., Xie J., Qu Y., Song X. (2016) Analysis of 10 nucleotides and related compounds in *Litopenaeus vannamei* during chilled storage by HPLC-DAD. *Food Sci. and Tech.* **67**, 187-193.
- Rosemberg D., Rico E., Guidoti M., Dias R., Souza D., Bonan C., Bogo M. (2007) Adenosine deaminase-related genes: Molecular identification, tissue expression pattern and truncated alternative splice isoform in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* **81**, 1526-1534.
- Rudert F., Visser E., Gradl G., Grandison P. (1996) pLEF, a novel vector for expression of glutathione S-transferase fusion proteins in mammalian cells. *Gene* **169**, 281-282.
- Rupp B. (2009): *Biomolecular crystallography, principles, practice and application to structural biology*. 1st ed., Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, 809 stran.

- Sassenfeld H., Brewer S. (1984) A Polypeptide fusion designed for the purification of recombinant proteins. *Bio-Tech.* **2**, 76-81.
- Seibert C., Raushel F. (2005) Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochem.* **44**, 6383-6391.
- Selley M. (2004) Increased homocysteine and decreased adenosine formation in Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* **26**, 554-557.
- Shin E., Shin H., Nam E., Kim W., Kim J., Oh B., Yun Y. (2012) DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep.* **13**, 339-346.
- Schmidt T., Skerra A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng.* **6**, 109-122.
- Skerra A., Schmidt T. (2000) Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **326**, 271-304.
- Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke N., Olson B., Klenk D. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Stubbs M., McSheehy P., Griffiths J., Bashford C. (2000) Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol. Med. Today* **6**, 15-19.
- Su A., Randau L. (2011) A-to-I and C-to-U Editing within Transfer RNAs. *Biochem. (Mosc).* **8**, 932-937.
- Takenaka M., Zehrmann A., Verbitskiy D., Härtel B., Brennicke A. (2013) RNA editing in plants and its evolution. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 335-52.
- Terpe K. (2003) Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523-533.
- Torres A., Piñeyro D., Filonava L., Stracker T., Batlle E., Ribas de Pouplana L. (2014) A-to-I editing on tRNAs: Biochemical, biological and evolutionary implications. *FEBS Lett.* **28** 4279-4286.
- Vergis J., Wiener M. (2011) The variable detergent sensitivity of proteases that are utilized for recombinant protein affinity tag removal. *Protein Expr. Purif.* **78**, 139-142.
- Vierstra R. (2012) The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol.* **160**, 2-14.
- Wang Z., Quioco F. (1998) Complexes of adenosine deaminase with two potent inhibitors: X-ray structures in four independent molecules at pH of maximum activity. *Biochem.* **37**, 8314-8324.
- Wardas J. (2008) Potential role of adenosine A2A receptors in the treatment of schizophrenia. *Front Biosci.* **13**, 4071-4096.
- Weber K., Osborn M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.

- Wilson D., Rudolph F., Quijcho F. (1991) Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition state analog - understanding catalysis and immunodeficiency mutations, *Science* **252**, 1278-1284.
- Wolf J., Gerber A., Keller W. (2002) TadA, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli*. *EMBO J.* **21**, 3841-3851.
- Wu X., Zou G., Quan, J., Wu Y. (2010) A theoretical study on the catalytic mechanism of *Mus musculus* adenosine deaminase. *J. Comput. Chem.* **31**, 2238-2247.
- Xu J., Zhang H. Y., Xie C. H., Xue H. W., Dijkhuis P., Liu C. M. (2005) Embryonic factor 1 encodes an AMP deaminase and is essential for the zygote to embryo transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* **42**, 743-756.
- Yamaizumi Z., Ihara M., Kuchino Y., Gupta R., Woese C., Nishimura S. (1982) Archaeobacterial tRNA contains 1-methylinosine at residue 57 in T psi C-loop. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **11**, 209-213.
- Zavialov A., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Zavialov A., Lauvau G. (2010) Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J. Leuk. Biol.* **88**, 279-290.
- Zhang Y., Olsen D., Nguyen K., Olson P. (1998) Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. *Prot. Expr. Purif.* **12**, 159-165.
- Zinshteyn B., Nishikura K. (2009) Adenosine-to-inosine RNA editing. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **1**, 202-209.
- Zrenner R., Stitt M., Sonnewald U., Boldt R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 805-836.

## 8 Seznam použitých symbolů a zkratek

ADA - adenosindeaminasa

ADAL - adenosindeaminasam podobný protein

ADAR - adenosindeaminasa působící na dvouvláknovou RNA

ADAT - adenosindeaminasa působící na tRNA

ADE - adenindeaminasa

Ade - adenin

Ado - adenosin

ADP - adenosindifosfát

AMK - aminokyselina

AMP - adenosinmonofosfát

APS - peroxodisulfátamonný

AtADA1 - adenosindeaminasa připravená z vektoru pCIOX po odštěpení His-SUMO kotvy

AtADA2 - adenosindeaminasa připravená ve vektoru pET151/D-TOPO

ATP - adenosintrifosfát

BSA - hovězí sérový albumin

CD - cirkulární dichroismus

cDNA - komplementární DNA

DESI1 a DESI2 - desumoylační isopeptidasa 1 a 2

dsRNA - dvouvláknová RNA

DTT - dithiothreitol

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

GD - glutamátdehydrogenasa

GST - glutathion-S-transferasa

hetADA - heterodimerním tRNA adenosindeaminasa

His-SUMO-ADA - adenosindeaminasa připravená z vektoru pCIOX

HsADA - lidská adenosindeaminasa

HPLC-DAD - vysokotlaká kapalinová chromatografie s detekcí pomocí diodového pole

HPLC-MS - vysokotlaká kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního

IMAC - imobilizovaná metalo-afinitní chromatografie

IPTG - isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid



*IU* - mezinárodní jednotka  
*kat* - katal  
*kcat* - katalytická rychlostní konstanta, číslo přeměny  
*kcat/K<sub>m</sub>* - katalytická efektivita  
*K<sub>m</sub>* - Michaelisova konstanta  
MBT - maltosu vázající protein  
PDB - proteinová data banka  
PDI1 - Protein disulfidomerasa I  
PMSF - fenylmethansulfonylfluorid  
Poly-H - Poly-histidinová kotva  
Poly-R - Poly-argininová kotva  
SCID - těžká kombinovaná imunodeficience  
SDS - dodecylsírán sodný  
SDS-Page - elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přítomností SDS  
SEN1 - sentrin specifická proteasa 1  
SIMs - SUMO interagující motiv  
SUMO - malý ubiquitin podobný protein  
TEA - triethylamin  
TEMED - tetraethylmethyldiamid  
TEV proteasa - Proteasa z viru tabákové mozaiky  
TrxA - thioredoxin A  
UBLs - proteiny odvozené od ubiquitinu  
Ulp1 a Ulp2 - ubiquitin podobná proteasa 1 a 2  
USPL1 - ubiquitin-specifické protease podobný protein 1