

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra anorganické chemie



Zuzana BARBUŠČÁKOVÁ

Optimalizace PCR metody pro detekci rostlin Arabidopsis

s umlčenými geny pro nukleotid pyrofosfátu

Bakalářská práce

Študijní obor: Bioanorganická chemie

Vedúci práce: Mgr. Tomáš Hluska

Olomouc 2014

Ďakujem predovšetkým vedúcemu mojej bakalárskej práce, Mgr. Tomášovi Hluskovi za nekonečnú trpezlivosť a mnohonásobnú pomoc, rovnako ako za vynikajúce vedenie, odbornú pomoc a nekonečné konzultácie pri vypracovávaní práce a vyhodnocovaní výsledkov. Ďakujem mu predovšetkým, ako aj Olge Ryparovej a pánovi Ing. Alexandrovi Pivovarníkovi, za psychickú podporu a neoceniteľné rady, bez ktorých by táto práca nebola napísaná. Rovnako ďakujem všetkým mojim blízkym za trpezlivosť a podanie pomocnej ruky. V neposlednom rade patrí najväčšie poďakovanie mojej mamke a mojmu dedkovi, ktorý ma neprestali podporovať po celú dobu štúdia a umožnili mi splniť si sen. Preto túto prácu venujem práve im. Ďakujem.

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca nebola predložená k získaniu iného akademického titulu

V Olomouci dňa.....

.....

Zuzana Barbuščáková

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko: Zuzana Barbuščáková
Názov práce: Optimalizace PCR metody pro detekci rostlin *Arabidopsis*
s umlčenými geny pro nukleotid pyrofosfatasu.
Typ práce: Bakalárska
Pracovisko: Centrum regiónu Haná pro biotechnologický a zemědělský
výzkum, Oddělení molekulární biologie, Olomouc
Vedúci práce: Mgr. Tomáš Hluska
Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt:

Cieľom tejto bakalárskej práce je vypracovať rešerše na téma genetické modifikácie organizmov so zameraním na transgenózu rastlín, polymerázovú reťazovú reakciu a modelovú rastlinu *Arabidopsis thaliana*. Ďalej vypracovať rešerše o študovanom enzýme, ktorým je nukleotid pyrofosfatáza/fosfodiesteráza so zameraním na rastlinné enzýmy a mechanizmus katalýzy. Praktická časť tejto bakalárskej práci sa zaoberá optimalizáciou metódy PCR na charakterizáciu rastlín *Arabidopsis thaliana* s umlčanými génmi pre nukleotid pyrofosfatázu/fosfodiesterázu. Následná selekcia homozygotných rastlín umlčenými génmi pre nukleotidpyrofosfatázy/fosfodiesterázy umožní ďalšie štúdium daného enzýmu a jeho význam pre rastlinu.

Kľúčové slová: geneticky modifikované organizmy, transgenóza, polymerázová reťazová reakcia, *Arabidopsis thaliana*, nukleotid pyrofosfatáza/fosfodiesteráza

Počet strán: 62

Počet príloh: 0

Jazyk: Slovenština

Bibliografická identifikácia:

Author's first name and surname: Zuzana Barbuščíková

Title: Optimalization of PCR for detection of *Arabidopsis* plants
with silenced genes for nucleotide pyrophosphatase

Type of thesis: Bachelor

Department: Centre of the Region Haná for Biotechnological and
Agricultural Research, Department of Molecular
Biology, Olomouc

Advisor: Mgr. Tomáš Hluska

The year of presentation: 2015

Abstract:

Objective of this bachelor thesis is to perform a research on issue of genetic modification of organisms with focus on transgenosis of plants, polymerase chain reaction and model organism /plant/*Arabidopsis thaliana*. Next part is to perform a research on nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase with an accent on plant enzymes and catalytic mechanism. Experimental part of this bachelor thesis deals with optimization of PCR for detection of *Arabidopsis thaliana* plants with silenced genes for nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase. Subsequent genotyping of plants and selection of homozygots will allow further study of given enzyme.

Keywords: genetic modified organisms, transgenosis, polymerase chain reaction,
Arabidopsis thaliana, nucleotid pyrophosphatase/phosphodiesterase

Number of pages: 62

Number of appendixes: 0

Language: Slovak

Obsah

1. Transgénné organizmy.....	10
1.1 Základná charakteristika GMO.....	10
1.1.1 Výskum GMO	10
1.1.2 Modelové organizmy.....	10
1.2 Transgénné baktérie a kvasinky.....	11
1.2.1 Základný výskum baktérií a kvasiniek	11
1.2.2 Aplikovaný výskum baktérií a kvasiniek	11
1.2.3 GM baktérie a kvasinky v priemysle.....	11
1.2 Transgénné živočíchy	12
1.2.1 Transgénné živočíchy v základnom výskume	12
1.2.1 GM živočíchy v aplikovanom výskume.....	12
1.2.2 GM živočíchy v priemysle	12
1.3 Transgénné rastliny.....	13
1.3.1 Dôvody štúdia.....	13
1.3.2 Transgénné rastliny vo výskume	13
1.3.3 Molekulárne farmárstvo	15
1.3.4 Rizika a problémy GM plodín.....	15
2. Metódy genetických modifikácií.....	15
2.1 Klonovanie.....	15
2.1.1 Klonovacie vektory.....	15
2.1.2.1 Zložky vektoru.....	16
2.1.2 Knock-outy a overexpresory	16
2.2 Druhy transformácie	17
2.2.1 Biolistické metódy.....	17
2.2.2 Elektroporácia.....	17
2.2.3 Mikroinjekcia	17
2.2.4 Transformácia Agrobakteriom	17
2.3 Selekcia transformovaných rastlín.....	18
2.4 Selekcia homozygotnej línie a štúdium proteínov.....	18
2.5 PCR.....	19
2.5.1 Polymerázová reťazová reakcia.....	19
2.5.2 Druhy PCR	22
3. Arábkovka Thalova.....	24

4. Nukleotid pyrofosfatázy/fosfodiesterázy.....	25
4.1 Základná charakterizácia NPP	26
4.1.1 Funkcia NPP	27
4.1.2 Substrátová špecificita NPP	27
4.1.3 Evolúcia NPP.....	28
4.2 Zvieracie NPP	29
4.2.1 Funkcia zvieracích NPP.....	29
4.2.2 Štruktúra zvieracích NPP.....	30
4.2.4 Katalýza zvieracích NPP	32
4.3 Rastlinné NPP	33
4.3.1 Procesy, ktorých sa rastlinné NPP zúčastňujú.....	33
4.3.2 Výskyt rastlinných NPP.....	34
4.3.3 Izolácia rastlinných NPP	35
4.3.4 Vyizolované NPP z rastlín.....	35
4.3.5 Štruktúra rastlinných NPP	36
4.3.6. Špecifická substrátová špecificita u NPP zo sóji a zemiakov	39
4.3.7 Mechanizmus katalýzy rastlinných NPP	39
4.3.8 Úlohy jednotlivých aminokyselín v aktívnom centre.....	40
4.3.9 Problémy vyskytujúce sa u rastlinných NPP	41
5. Materiál a prístroje.....	42
5.1 Chemikálie	42
5.2 Biologický materiál	42
5.3 Prístroje.....	43
5.4 Zloženie roztokov	43
6. Metódy.....	44
6.1 Sterilizácia semiačok	44
6.2 Selekcia transgenných rastlín	44
6.3 Izolácia genomickej DNA	44
6.3.1 Postup č. 1	44
6.3.2 Postup č. 2	45
6.4 Polymerázová reťazová reakcia.....	45
6.5 Nested PCR.....	47
6.6 Prečisťovanie DNA.....	47

6.7 Elektroforéza v agarózovom geli.....	48
7. Výsledky a diskusia.....	48
7.1 Optimalizácia podmienok pre PCR	49
7.1.1 Rôzne kombinácie primerov.....	49
7.1.2 Optimalizácia pomocou gradientu teploty.....	51
7.1.3 Rôzne koncentrácie Mg ²⁺ iónov	52
7.1.4 Rôzne koncentrácie primerov	52
7.1.5 Nested PCR	54
7.2 Genotypizácia rastlín s knock-outovaným génom.....	54
8. Záver.....	55
9. Zoznam použitých skratiek.....	56
10. Zoznam literatúry.....	57

Úvod

Génové inžinierstvo je dnes jedno z najviac sa rozvíjajúcich odvetví. Génovými manipuláciami sme schopní vytvoriť viac odolné plodiny, čo nám ponúka možnosti riešenia problému vzrastajúcej populácie. Na samotnom počiatku všetkých týchto dovedností stojí zväčša základný výskum, v ktorom pomocou modelových rastlín ako je rastlina *Arabidopsis thaliana* máme možnosť nazrieť do sveta rastlín a následne nájsť cesty ako ich vylepšiť prípadne využiť pre náš prospech. Pomocou metód génového inžinierstva ako sú génové knock-outy alebo overexpresované gény a s využitím biochemických metód ako je polymerázová reťazová reakcia (PCR) môžeme študovať konkrétne proteíny, ich vlastnosti a funkcie.

Nami vybraný študovaný enzým je nukleotid pyrofosfatáza/fosfodiesteráza, ktorá má základné postavenie v metabolizme a recyklácii extracelulárnych nukleotidov. Predmetom štúdia je z dôvodu jej možného zapojenia do izomerácii *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin. Cieľom tejto práce bola optimalizácia metódy PCR na detekciu rastlín *Arabidopsis thaliana* s umlčeným génom pre nukleotid pyrofosfatázu a následna genotypizácia rastlín s cieľom ich ďalšieho použitia vo výskume študovaného enzýmu.

TEORETICKÁ ČASŤ

1. Transgénne organizmy

1.1 Základná charakteristika GMO

Transgénne alebo geneticky modifikované organizmy (GMO) sú organizmy, ktorých pôvodná genetická informácia bola cielene pozmenená. Vnesením cudzích génov do pôvodnej DNA daného organizmu vytvárame kombinácie génov, ktoré by sa prirodzenou cestou nemohli vyskytnúť.

Na modifikáciu organizmov bolo vyvinutých množstvo metód, každá závisí na druhu, ktorý chceme modifikovať. Ich základné rozdelenie je na metódy ktoré spôsobia trvalé genetické zmeny, čiže nový gén sa zabuduje priamo do chromozómu a tie, ktoré spôsobia časovo a miestne obmedzené genetické zmeny. (Galuszka, 2010)

1.1.1 Výskum GMO

Využívame ich vo všetkých oblastiach výskumu. V základnom výskume slúžia na získanie základných informácií o danom fenoméne, takže praktická stránka výskumu nehrá rolu. Informácie zo základného výskumu sa ďalej môžu využívať v aplikovanom výskume, kde je praktické využitie hlavným cieľom. Aplikovaný výskum sa ďalej využíva v priemysle, kde GMO našli využitie v mnohých oblastiach, preto sú genetické manipulácie jedno z najrýchlejšie sa rozvíjajúcich odvetví biotechnológií.

1.1.2 Modelové organizmy

Spomedzi všetkých organizmov sa na štúdium vybrali len niektoré. Sú to modelové organizmy, ktoré slúžia na komplexné štúdium. Zmapovaním ich genómu poprípade štúdiom určitých ich častí, získame obecné informácie nielen o danom organizme, ale môžeme ich prisúdiť aj množstvu iných druhov. Sú vyberané špeciálne a musia spĺňať určité kritéria. Ako modelové organizmy slúžiace na zmapovanie genómu sa vybrali organizmy, ktoré majú krátku generačnú dobu. Naopak organizmy vhodné na priame experimenty nemusia disponovať vhodným genómom, avšak majú k dispozícii ľahko prístupné časti ako napríklad jednoducho izolovateľné veľké embryá ideálne na štúdium.

1.2 Transgénne baktérie a kvasinky

Štúdium baktérii a kvasiniek poprípade iných mikroorganizmov nám prináša množstvo informácií ako aj množstvo nových možností. Ako prvé živé organizmy na tejto planéte nám umožňujú študovať vznik života a iné mnohé základné otázky v biológii. Štúdium uľahčuje ich rapidný životný cyklus, malé rozmery a nenáročné životné podmienky. Ľudia sa ich naučili využívať pre vlastnú potrebu, čím nám uľahčili množstvo procesov a preto sa z nich v určitých oblastiach, ako napríklad v medicíne, stali nenahraditeľní pomocníci.

1.2.1 Základný výskum baktérií a kvasiniek

V základnom výskume sa GM (geneticky modifikované) baktérie a kvasinky využívajú napríklad ako expresné systémy na produkciu rekombinantných proteínov. Čo znamená, že majú schopnosť vytvoriť proteín určitého génu, ktorý sa po purifikácii môže použiť na ďalšie štúdie.

Bakteriálne expresné systémy sú najviac využívané kvôli ich jednoduchosti a vysokému výťažku. Problémom je, že neumožňujú posttranslačné modifikácie a veľkosti exprimovaných proteínov sú obmedzenej veľkosti. (Chen, 2012)

Najvyužívanejšie eukaryotné expresné systémy sú kvasinkové. Produkované proteíny môžu dosahovať väčších rozmerov ako u baktérií a pomocou posttranslačných modifikácií sú schopné poskladať sa do ich prirodzených konformácií. Nevýhodou oproti bakteriálnym expresným systémom sú nižšie výťažky. (Geisse a kol., 1996)

Na vnášanie cudzích génov do iných organizmoch sa využíva hlavne baktéria *Agrobacterium tumefaciens*, ktorá sprostredkuje ich transformáciu. Popis transformácie za pomoci Agrobakteria bude opísaný nižšie.

1.2.2 Aplikovaný výskum baktérií a kvasiniek

V aplikovanom výskume je to hlavne oblasť biopalív (Sjögren, 2014; online) alebo nedávne štúdie modifikovaných baktérií, ktoré napomáhajú znižovať váhu. (Bourzac, 2015; online)

1.2.3 GM baktérie a kvasinky v priemysle

V priemysle sa transformované kvasinky a baktérie využívajú pri výrobe vína, (Rainieri, 2000) baktérie pri produkcii enzýmov, hormónov alebo prtilátok.

1.2 Transgenné živočích

Dôvody štúdia transgenných živočíchov sú jasné, sme jednými z nich. Ich štúdiom a skúmaním poznávame samých seba. Vďaka kmeňovým bunkám máme ale väčšie možnosti štúdia a testovania priamo na ľudských bunkách, keďže testovanie priamo na ľuďoch je momentálne z etických dôvodov zakázané.

1.2.1 Transgénne živočích v základnom výskume

Čo sa týka základného výskumu transgenných organizmov je asi najznámejšia octomilka obecná. (*Drosophila melanogaster*; Johnston, 2002) Predstavuje jeden z najrozšírenejších modelových organizmov v biológii. Rovnako známe sú aj geneticky modifikované laboratórne myši (*Mus*) využívajúce sa v medicíne k štúdiu chorôb, na vývoj liekov a pod. (Pritchard a kol., 2003) Podľa druhu chorôb a štúdie sa vyberajú ďalšie živočích ako sviňa domáca (*Sus scrofa*) na štúdium cukrovky (Wolf a kol., 2014), ovca domáca (*Ovis aries*) pri Huntingtonovej chorobe (Jacobsen a kol., 2010) alebo ryba danio pruhovaný (*Danio rerio*) pri neurodegeneratívnych poruchách (Shairf a Irshat, 2012).

Inou populárnou oblasťou výskumu sú genetické manipulácie embryonálnych a kmeňových, čiže nediferencovaných živočíšnych buniek. Využívajú sa hlavne na štúdium ich samotnej diferenciácie a testovanie nových liečiv. Štúdium sa zameriava aj na genetické manipulácie s embryonálnymi bunkami, kedy sa z embrya odoberie jedna alebo viac buniek, ktoré sú pomocou DNA diagnostiky vyšetrené na možné choroby. Pomocou týchto metód môžeme v ranných embryonálnych štádiách predchádzať v budúcnosti geneticky podmieneným chorobám ešte pred štádiom plodu. (Tuch, 2006)

1.2.1 GM živočích v aplikovanom výskume

Aplikovaný výskum transgenných živočíchov je menej známy. Je to napríklad koza domáca (*Capra hircus*) schopná sekreťovať do mlieka pavúčie vlákna. Tie, vďaka svojej pevnosti a elasticite majú pestré využitie, napríklad vo vojenstve na výrobu nepriestrelných viest. (Zyga, 2015; online) Alebo tur domáci (*Bos taurus*) sekreťujúci do mlieka ľudský lysozym, ktorý chráni novorodenca pred infekciami. Tým sa kravské mlieko nutričnými hodnotami blíží viac ľudskému mlieku. (Yang a kol., 2011)

1.2.2 GM živočích v priemysle

V priemysle zatiaľ GM živočích nie sú ani zďaleka tak využívané ako iné organizmy. Ide hlavne o marketingové živočích ako svietiace rybičky. Prvým transgenným živočíchom

určeným na konzumáciu je losos obecný (*Salmo salar*; „AquAdvantage salmon“) schopný rapidného rastu počas celého roku. (Ledford, 2015; online)

1.3 Transgenné rastliny

1.3.1 Dôvody štúdia

Skrz ciele mutácie a možnosť vypestovania celej rastlinky z jedinej bunky, máme možnosť v pomerne krátkom čase, študovať celé spektrum rôznych efektov, ktoré genetické mutácie spôsobili, ako napríklad funkcie a vlastnosti proteínov, funkcie jednotlivých aminokyselín v enzýmoch, rôzne signálne dráhy a mnoho iných procesov prebiehajúcich na molekulárnej úrovni. Transgenóza rastlín nám umožnila prispôbovať plodiny podľa našich potrieb bez zdĺhavých šľachtení a získavať tak požadované vlastnosti ako rezistenciu, samoopelenie, prípadne zvýšenie obsahu nutričných látok. To nám prinieslo doposiaľ nevídané možnosti v potravinárskom priemysle ako aj riešenie problému zväčšujúcej sa populácii a nedostatku potravín.

1.3.2 Transgénne rastliny vo výskume

1.3.2.1 Základný výskum GM rastlín

Čo sa týka základného výskumu využívajú sa kultúrne rastliny aj rastliny na prvý pohľad bezcenné, ktoré neslúžia ako budúca potrava. Spolu slúžia ako cenní pomocníci pri základnom výskume evolúcie, fyziológie, molekulárnej a bunecnej biológie rastlín. Popri kultúrnych rastlinách sa skúmajú napríklad mach mechúrovka odstávajúca (*Physcomitrella patens*), zelená riasa chlamydomonáda (*Chlamydomonas*) alebo známa burina arábkovka Thalova (*Arabidopsis thaliana*), ktorá bude z časti predmetom mojej teoretickej časti.

1.3.2.2 Aplikovaný výskum GM rastlín

V aplikovanom výskume sa využívajú napríklad pri biofortifikácii, čo je šľachtenie rastlín za účelom zvýšenia nutričných hodnôt pomocou klasických metód, ale aj pomocou genetických manipulácií. Značne diskutovaná je GM ryža (*Oryza sativa*), do ktorej bola vložená genetická informácia z narcisu (*Narcissus* L.) a zavedená celá metabolická dráha na produkciu betakaroténu, ktorý sa v tele premieňa na vitamín A. (Al-Babili a Beyer, 2005) Tým by sa umožnil prístup ľuďom z chudobných krajín k nutrične výživnejšej ryži a zachránilo by sa niekoľko tisíc životov ročne, no keďže GM plodiny sú zatiaľ v spoločenských kruhoch prijímané veľmi ťažko, boj o jej zavedenie na trh trvá už 15 rokov.

Intenzívny výskum momentálne prebieha aj na jednom z najobľúbenejších druhov ovocia, na pomarančoch, ktoré na Floride a v Ázii zastihla choroba HLB („Huanglongbing“)

alebo „zelenanie citrusov“ („citrus greening“). V Ázii sa kvôli enormnému rozšíreniu začala nazývať „choroba žltého draka“. Spôsobujú ju mušky prenášajúce baktériu *Candidatus Liberibacter*, ktorá zastavuje dozrievanie plodov. Výskum sa zameriava na proteíny v špenáte, ktoré by mali po inkorporácii do DNA stromu pomaranču znížiť patogénne účinky baktérie. (Kastrinos, 2014; online)

1.3.2.3 GM rastliny v poľnohospodárstve

Najkontroverznejším témom zo všetkých GMO sú geneticky modifikované rastliny využívané v poľnohospodárstve. Z dôvodu exponenciálneho nárastu ľudskej populácie, ktorá vytvára enormný dopyt po potravinách, sa museli vytvoriť poľnohospodárske plodiny rezistentné voči hmyzu alebo herbicídum, čo sa v spoločenských aj vedeckých kruhoch stalo predmetom mnohých diskusií.

Kritikou zasypávaná nadnárodná spoločnosť Monsanto je jedným z naväčších producentov GM plodín. Produkuje aj iné výrobky ako sladidlá, pesticídy a herbicídy. Negatívne preslávený je napríklad herbicíd Roundup (glyfosát – N-(phosphonomethyl)glycín), ktorý zapríčinił neįeden protest. Monsanto vytvorilo geneticky modifikované plodiny naň rezistentné nazývané „RoundupReady“ plodiny tvoriace väčšinu GM plodín na svete. (Funke a kol., 2006)

Iným príkladom rezistencie ku herbicídum sú plodiny rezistentné na 2,4-D herbicid (2,4-dichlorfenoxycetová kyselina), ktorý pôsobí selektívne na hubenie dvojkličnolistových rastlín. (Egan a kol., 2011)

Ku GM plodinám patria aj Bt plodiny s inkorporovaným génom z pôdnej baktérie *Bacillus thuringiensis* produkujúci proteín Bt δ -endotoxin, ktorý zabíja húsenice, ale neškodí inému hmyzu ako včelám, osám a chrobákom. Tieto plodiny tak nemusia podstúpiť ošetrovanie insekticídmi. (Cannon, 2000)

Čisto na priemyselné využitie boli vytvorené GM zemiaky, nazvané Amflora. Ich výhodou je „vypnutý“ gén zodpovedný za syntézu nechcenej amylozy, ktorá v bežných zemiakoch tvorí 20% škrobu. Zvyšných 80% tvorí polymér amylopektín, ktorý má na rozdiel od amylozy, väčšie praktické využitie. Oddelovanie oboch zložiek škrobu, poprípade chemická modifikácia amylozy (Petr, 2010; online) je príliš nákladná. Tieto kroky ale u Amflora zemiakoch odpadajú a tým sa znižujú náklady na produkciu amylopektínu.

Svoju GM odrodu má už aj papája (*Carica*), v našom podnebnom pásme nie príliš bežná plodina. Po výskyte vírusu PRSV („Papaya ringspot virus“) na Havaji, roku 1980, začala Havajská univerzita vyvíjať GM papaju rezistentnú na tento vírus pomocou

imunochemických metód. Od roku 1999 sa táto GM papája pestuje na Havaji a je povolená aj v Kanade. (Cai a kol., 1999)

1.3.3 Molekulárne farmárstvo

V priemysle sú geneticky modifikované rastliny spojené aj s molekulárnym farmárstvom, ktoré ich využíva na produkciu látok, ktoré sa v nich prirodzene vyskytujú alebo sú pre ne úplne cudzie (Ahmad, 2014). Hlavnými látkami produkovanými pomocou molekulárneho farmárstva sú tuky, sacharidy, proteíny a sekundárne metabolity (Slater a kol., 2005), ktoré rastliny po genetických modifikáciách produkujú vo zvýšenom množstve. Tie sú ďalej využívané v mnohých odvetviach. Na trh sa touto cestou dosali aj látky využívané ako lieky (Fischer a kol., 2000) alebo biodegradovateľné plasty. V neposlednom rade slúžia aj na tvorbu rekombinantných proteínov. (Ramessar, 2008)

1.3.4 Rizika a problémy GM plodín

To, čo vyvoláva v ľuďoch najväčšie obavy sú samozrejme riziká, ktoré GMO so sebou môžu prinášať. Poväčšine sú to len špekulácie, poprípade doposiaľ mnohými štúdiami vyvrátené obavy, ako napríklad možnosť pretvorenia kultúrnej rastliny na burinu z dôvodu tolerancie na herbicíd. Takýto pozitívny selekčný tlak doposiaľ nebol potvrdený. Rovnako ako šírenie vloženého génu do okolitých populácií, čomu sa dá určitými postupmi zabrániť. Zdravotné riziká predstavuje samotný transgén a jeho produkt, ktoré by mohli vyvolať alergické reakcie alebo genotoxické či karcinogénne účinky. No ako u ekologických rizík, ani pri zdravotných doposiaľ neboli žiadne nežiaduce účinky preukázané. Napriek tomu sa Európska únia, na rozdiel od Spojených štátov amerických, ku GM plodinám stavia skepticky.

2. Metody genetických modifikácií

2.1 Klonovanie

2.1.1 Klonovacie vektory

Na prenos cudzej DNA do iného organizmu sa využívajú klonovacie vektory. Sú to vírusy, plazmidy z baktérií alebo krátke úseky DNA z vyšších organizmov, do ktorých je nami vybraná genetická informácia vložená a pomocou nich prenesená do cieľového organizmu.

Nami vybraný gén sa získa enzymatickým vyštiepením z DNA pomocou restriktčných endonukleáz a metódy PCR (viď nižšie). Spojenie vyštiepených úsekov DNA s vektorom

sprostredkovávajú DNA ligázy, ktoré katalyzujú spojenie dvoch molekúl DNA. Takto vytvorený úsek DNA schopný prenosu do iného organizmu sa nazýva rekombinantná DNA (rDNA).

Vzhľadom na degeneráciu genetického kódu je nutné cudziu DNA pred vložením do vektoru vhodne mutáciami upraviť podľa toho, v akom organizme sa má daný gén exprimovať. Rôzne organizmy preferujú rozličné kodóny kódujúce rovnaké aminokyseliny, čo by mohlo spôsobiť zníženie produkcie, prípadne úplnú nemožnosť prepisu nového génu. Najväčšiu prekážku to predstavuje pri expresii eukaryotných proteínov v baktériach.

2.1.2.1 Zložky vektoru

Jednotlivé vektory obsahujú pre ne špecifické časti, no každý klonovací vektor musí obsahovať okrem vloženého úseku DNA tieto sekcie, bez ktorých by prenos do hostiteľskej bunky nebol možný, prípadne by nebola možná identifikácia transformovaných buniek:

1. Počiatok replikácie – je esenciálnou súčasťou vektoru bez ktorého nie je možná replikácia
2. Promotor – je esenciálnou súčasťou transkripčnej jednotky, bez ktorého nedôjde ku replikácii žiadaneho génu vo vektore.
3. Reportérový gén – umožňujúci rýchlu identifikáciu buniek obsahujúcich vektor, u ktorého úspešne prebehla inzercia nového úseku DNA, napríklad na základe zmeny farby buniek.
4. Selekčný gén – najčastejšie predstavuje gen zodpovedný za rezistenciu na antibiotikum ktorý umožňuje selekciu mutantných organizmov na danom médiu s antibiotikom.

2.1.2 Knock-outy a overexpresory

Veľmi rozšírené metódy na štúdium proteínov sú génový knock-out a overexpresovaný gén. Génové knock-outy sa tvoria zámernou inaktiváciou určitého génu. Pomocou mutácie, ktorá vyvolá zmenu fenotypu sa môže usudzovať na funkciu daného proteínu. Overexpresovaný gén je priamym opakom knock-outu. Ide o metódu, kedy sa gén exprimuje v nadmernom množstve, čo nám poskytuje možnosti štúdia proteínov rovnako na základe zmeny fenotypu. Preto sa v základnom výskume tieto metódy využívajú v najväčšej miere. Metóda na vytvorenie takýchto mutantných organizmov je viac. Používa sa napríklad transformácia Agrobaktériom (viď nižšie) alebo aj homológne rekombinácie. (Prelich, 2012; Galli-Taliadoros a kol., 1995)

2.2 Druhy transformácie

2.2.1 Biolistické metódy

Volfrámové alebo zlaté častice (mikroprojektily) obalené plazmidovou DNA sú pomocou vzdušného tlaku urýchlené a nastrelené do rastlinných pletív. V bunke sa dané transgény z kovových častíc uvoľnia a môžu sa inkorporovať do chromozomálnej DNA a podstúpiť tak ich vlastnú expresiu. (Christou, 1992)

2.2.2 Elektroporácia

Využíva krátke pulzy vysokého napätia po dobu mikro až milisekúnd, čím sa docieli dočasná strata semipermeability bunečnej membrány vedúca k unikaniu iónov, metabolitov a zvýšenému prijímaniu liečiv, molekulárnych sond a hlavne krátkych sekvencií DNA. (Tsong; 1991)

2.2.3 Mikroinjekcia

Technika používaná poväčšine na transformáciu zvieracích buniek. Pod mikroskopom sa bunka prisaje na tupú kapiláru a pomocou kapilárnej mikroinjekcie sa DNA zavedie priamo do bunky alebo jej jadra bez jej poškodenia (Neuhaus a Spangenberg, 1990)

Ak sa pri rastlinných bunkách transformovaných pomocou metód zmienených vyššie nepodarí zregenerovať kalus, transgenóza je iba dočasná a neprenáša sa na potomstvo.

2.2.4 Transformácia Agrobakteriom

Pri modifikáciách rastlín sa najčastejšie používa takzvaný Ti-plazmid („tumor-inducing plasmid“; vyvolávajúci nádor;) Tento plazmid pochádza z baktérie *Agrobacterium tumefaciens* žijúcej v pôde, ktorá má schopnosť infikovať rastliny a vyvolať nárast tumoru.

Baktéria transformuje pletivo vyštiepením a zabudovaním segmentu o veľkosti 30 000 párov báz z Ti-plazmidu do hostiteľského genómu. Tento segment nazývaný T-DNA nesie sériu onkogenov a génov pre biosyntézu opinov a rastlinných hormónov, ktorých expresiou sa v transformovanom pletive spustí bunečné bujenie a začnú sa produkovať opíny, ktoré slúžia baktéri ako zdroj dusíka.

Vďaka tejto schopnosti transformácie rastlín sa Ti-plazmid začal využívať ako klonovací vektor a stal sa tak neoddeliteľnou súčasťou transgenózy rastlín v molekulárnej biológii.

Premena tohto plazmidu na klonovací vektor prebieha v dvoch krokoch. V prvom kroku sa musia endogénne, tumor vyvolávajúce gény z T-DNA inaktivovať. V druhom kroku sa cudzia genetická informácia vloží do T-DNA a výsledný rekombinantný

plazmid sa vnesie späť do baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, ktorou sa infikujú protoplasty. Protoplasty sú bunky (rastlín, baktérií alebo húb) zbavené bunecnej steny, z ktorých dokážeme vypestovať celú rastlinu a tým pádom môžeme z jedného infikovaného plazmidu získať celé generácie rastlín obsahujúcich vložený gén, ktorý sa prenáša podľa Mendlových zákonov. Takto sa cudzia genetická informácia uloží do DNA rastliny natrvalo. (Gelvin, 2003; Tzifiral a Citovsky, 2006)

Napriek tomu ako elegantne a efektívne to znie, má aj Ti-plazmid slabé miesta. Baktéria má prirodzene schopnosť infikovať len dvojklíčnolistové rastliny, z ktorých najväčšie využitie v poľnohospodárstve majú sója, zemiaky, tabak a jablká. Preto sa pre mnohé poľnohospodársky veľmi dôležité jednoklíčnolistové rastliny ako pšenica, ryža alebo kukurica používajú iné spôsoby transgenózy. Transgenóza pomocou Agrobakteria u týchto rastlín nebola dlho možná. Postupnými úpravami a rôznymi vylepšeniami ako ošetrovanie acetosyringonom, ktorý aktivuje určité časti Ti-plazmidu, bolo možné infikovať aj jednodeložné rastliny. (Wu a kol., 1999)

2.3 Selekcia transformovaných rastlín

Asi najpraktickejšou otázkou je účinnosť transformácie. Tá sa pri rôznych technikách líši, no vo všeobecnosti je nízka. Preto neoddeliteľnou súčasťou transformácii rastlín je selekcija nainfikovaných rastlín od rastlín „divokého typu“ („wilde type“; WT), ktoré neobsahujú cudziu DNA.

Na selekciju infikovaných rastlín sa používajú selekčné gény zahrnuté v plazmidoch spolu s génom záujmu. Tie infikovanej bunke prepožičiavajú špecifické vlastnosti, vďaka ktorým môžu byť odlišené od neinfikovaných buniek, ktoré danými vlastnosťami nedisponujú. Poväčšine nesú rezistenciu voči určitým druhom antibiotík, ktoré sú za normálnych okolností schopné bunku usmrtiť. Transgénne rastliny sa selektujú na živnom médiu obsahujúcom antibiotikum, ktoré zahubí všetky rastliny neobsahujúce gén na rezistentný. (Gelvin, 2003)

Pre overenie vneseného génu, ktorý chceme študovať sa prevádza tzv. genotypizácia, kedy sa metódou PCR (vid' nižšie) overí prítomnosť cudzieho génu.

2.4 Selekcija homozygotnej línie a štúdium proteínov

Každá transformovaná rastlina je vo výsledku heterozygotná. Na potomstvo sa nový gén prenáša podľa pravidiel vyplývajúcich z objavu, ktorý učinil roku 1865 veľikán, otec genetiky a objaviteľ základných znakov dedičnosti, Gregor Johann Mendel. Podľa týchto

pravidiel bude prvá generácia z dvoch tretín heterozygotná a z jednej tretiny homozygotná. Druhá generácia, po vyselektovaní homozygotných rastlín v prvej generácii bude čisto homozygotná.

Pre vylúčenie pozičného efektu sa sleduje fenotyp niekoľkých nezávislých línií. Ak u nich pozorujeme rovnaký fenotyp, môžeme predpokladať, že daná vlastnosť je spôsobená daným génom.

2.5 PCR

2.5.1 Polymerázová reťazová reakcia

Genotypizácia, čiže selekcia homozygotných a heterozygotných línií sa prevádza pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR z anglického Polymerase Chain Reaction). Táto praktická, všestranná a extrémne citlivá metóda je jednou z najpoužívanejších biochemických metód vôbec. Jej objaviteľ, Karry Mullis, za ňu zaslúžene roku 1993 obdržal Nobelovu cenu za chémiu.

PCR je cyklický enzymatický dej regulovaný teplotou. Princíp metódy spočíva v amplifikácii úsekov DNA pomocou procesu replikácie nukleových kyselín. Z replikačného aparátu využíva primery, ktorými ohraničuje vybraný úsek DNA a enzým DNA-polymerázu na syntézu daného úseku.

Primery sú v tomto prípade krátke reťazce DNA. Ich veľkosti sa pohybujú v rozmedzí 18-25 nukleotidov, čo je v porovnaní s genomom o veľkosti približne 3 miliardy bp („base pair“, párov báz) nepredstaviteľne malý úsek.

Reakcia prebieha v prístrojoch zvaných termocyklery, ktoré sú schopné zvyšovať a znižovať teplotu podľa dopredu nastaveného programu. Podľa teploty prebiehajú v reakčnej zmesi tri kroky, ktoré sa cyklicky opakujú. Po každom cykle sa množstvo produktu zdvojnásobuje čo v konečnom dôsledku vedie k exponenciálnemu vzrastu (2^n ; n = počet cyklov) počtu kópii vybraného úseku DNA.

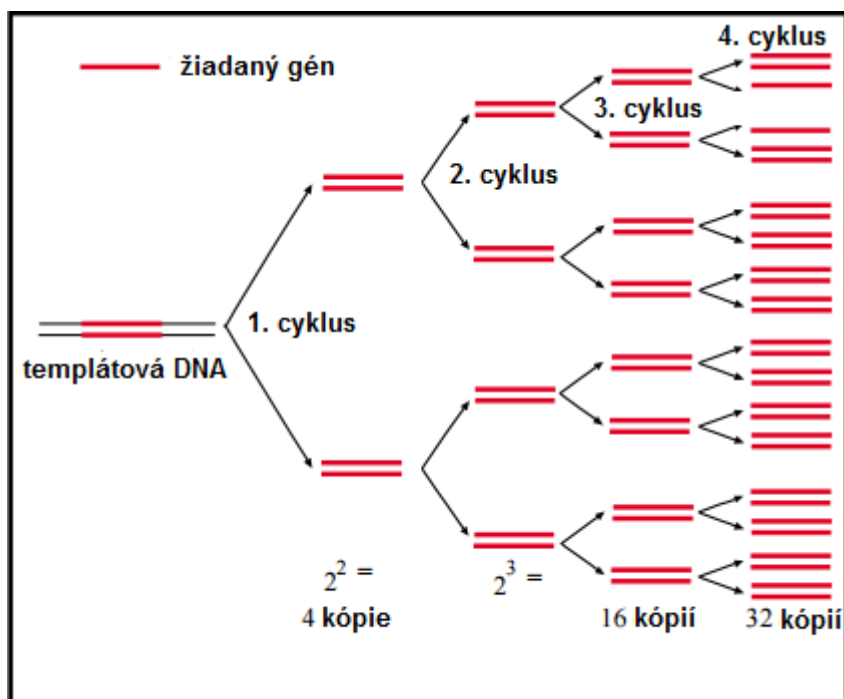
Tab. 1 Príklad exponenciálneho vzrastu ampikonov v reakcii PCR

Číslo cyklu	Počet syntetizovaných molekúl produktu
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8

6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1 024
13	2 048
14	4 096
15	8 192
16	16 384
17	32 768
18	65 536
19	131 072
20	262 144
21	524 288
22	1 048 576
23	2 097 152
24	4 194 304
25	8 388 608
26	16 777 216
27	33 554 432
28	67 108 864
29	134 217 728
30	268 435 456
31	536 870 912

Jednotlivé kroky PCR:

1. Denaturácia dvojreťazcovej DNA (dsDNA – „double stranded“)
2. Nasadnutie primerov na denaturované jednoreťazcové DNA (ssDNA – „single stranded“)
3. Nasadnutie DNA polymerázy a následná amplifikácia nových reťazcov



Obr. 1 Názorná ukážka exponenciálneho nárastu ampliconov v PCR (prevzaté z Somma 2006; online)

Kompletná denaturácia dsDNA prebehne počas 2-5 min pri teplote 94-97 °C.

Nasleduje zníženie teploty a nasadenie primerov na ssDNA, ktoré sa navrhujú v dvojiciach ako priamy (fw-„forward“) a spätný primer (rev-„revers“). Dôvodom je syntéza nových reťazcov prebiehajúca vždy v smere od 5' konca po 3' koniec DNA, preto je potrebné navrhnuť pre každý protiahlý reťazec dsDNA osobitný primer tak, aby syntéza mohla prebiehať v určenom smere. Ich T_m (teplota nasadenia primerov na ssDNA reťazec) sa pohybuje od 30-72 °C no u jednotlivých primerov sa líši. Vzhľadom na to, ako aj vzhľadom na rozličnú dĺžku trvania tohto kroku pohybujúcu sa od 0-60 sekund, je nutná optimalizácia.

Po tomto kroku začne prebiehať samotná syntéza nových reťazcov. Denaturačná teplota dsDNA je príliš vysoká, preto sa na syntézu musí využívať špeciálna termostabilná polymeráza izolovaná z termofilných mikroorganizmov, ktorá je schopná tolerancie vyšších teplôt po dlhšiu dobu ako ostatné enzýmy. Najčastejšie ide o DNA-polymerázu z aeróbnej gramnegatívnej baktérie *Thermus aquaticus*. Syntéza nových reťazcov DNA prebieha pri teplote 68-72 °C rýchlosťou 60 bazi/s., pre ktorú sú potrebné 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) Tie sa pridávajú do reakčnej zmesi spolu s horečnatými iónmi Mg^{2+} , ktoré slúžia ako kofaktor tvoriaci rozpustné komplexy s dNTP. Tie sú následne rozpoznávané DNA-polymerázou.

Počet cyklov sa pohybuje v rozmedzí 25-40 cyklov. Veľmi veľký počet cyklov môže zapríčiniť zvýšenie počtu nešpecifických amplifikácií a nechcených mutácií.

Produktom PCR sú amplikony, primerami ohraničené úseky DNA, ktoré sa pomocou elektroforézy v agarózovom prípadne polyakrylamidovom geli, dokazujú stanovením ich veľkosti na základe porovnania s hmotnostným štandardom o definovanej veľkosti. (Šmarda a kol. 2005)

PCR je využívaná od základného výskumu až po prax, takže je vskutku neoceniteľnou metódou v molekulárnej biológii.

Tab. 2 Príklady využitia PCR v rôznych oboroch (prevzaté z Šmarda a kol. 2005)

Základný výskum	Aplikovaný genetický výskum	Klinické disciplíny	Ostatné
izolácia génov alebo ich častí	prenatárna diagnostika dedičných chorôb	detekcia patogénnych baktérií, vírov, prvokov a hub	archeológia
sekvencovanie DNA	detekcia mutácií v génoch	typizácia patogénnych mikroorganizmov	súdnicstvo
mutagenéza in vitro, modifikácia koncov DNA	štúdium polymorfizmu	identifikácia onkogénov	kriminálna polícia
analýza génov z génových knižníc	populačná genetika	typizácia nádorov	
príprava značených sond		stanovenie pohlavia	

2.5.2 Druhy PCR

Dôvod tak rozsiahleho využitia PCR je hlavne v možnosti modifikácii klasickej verzii PCR. Dnes existuje nespočet variácií, z ktorých uvediem len tie najdôležitejšie.

2.5.2.1 PCR-RFLP

Modifikáciou PCR je napríklad polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov. Účelom tejto modifikácie PCR je typizácia určitého genu, ktorý môže obsahovať sekvenčný polymorfizmus. Výsledkom PCR, prevádzanej pri prísnych podmienkach, sú amplikony o dĺžke až 5 kb, ktoré sú následne štiepené restričnou endonukleázou a analyzované elektroforézou. Mutácie v restričných miestach spôsobujú, že ich endonukleáza nerozozná a nerozštiepený fragment tak bude väčšej veľkosti. Táto metóda sa používa pri diagnostike chorôb, kde porovnávame elektroforézy mutantného a zdravého génu. (Meyer a kol., 1995)

2.5.2.2 Multiplex PCR

Pri Multiplex PCR nazývanej aj mnohonásobná PCR sa do reakčnej zmesi pridáva väčšie množstvo párov primerov čo nám umožňuje analyzovať viac génov naraz, poprípade

viac exónov jedného génu. Vzhľadom na väčšie množstvo primerov je nutné optimalizovať podmienky reakcie. Táto metóda sa využíva napríklad na detekciu deletovných exónov. (Markoulatos a kol., 2002)

2.5.2.3 Nested PCR

Pri veľkom množstve DNA je možnosť amplifikácie nesprávneho úseku veľmi veľká, vysokú špecifitu amplifikácie zabezpečujú nested primery. Sú to dve dvojice primerov, takzvané vonkajšie a vnútorné. V prvej reakcii sa používajú vonkajšie primery, ohraničujúce úsek DNA, ktorý sa použije ako templát pre druhú reakciu. V druhej reakcii sa používajú vnútorné primery, ktoré ohraničujú nami žiadany úsek DNA, čím sa predchádza vzniku nešpecifických amplifikácií. (Šmarda a kol., 2005)

2.5.2.4 PCR kolónií

Táto metóda sa používa na potvrdenie prítomnosti rekombinantnej DNA v baktériách. spolu s tým, môžeme overiť aj veľkosť a orientáciu génu vloženého do plazmidu. Transformované baktérie alebo kvasinky sa dávajú priamo do reakčnej zmesi, kde lyzujú pri počiatocnom zahriatí alebo osobitne vo vode pri zvýšenej teplote. Tým sa ich plazmidová DNA dostáva do reakčnej zmesi a slúži ako templát pre PCR. Ak sú primery navrhnuté priamo na vloženú DNA slúži PCR na potvrdenie vloženého génu. Ak sú univerzálne, komplementárne k vektorovým sekvenciám slúži PCR na určenie veľkosti inzertu. Overenie správnej orientácie inzertu sa uskutočňuje pri použití kombinácie primerov, kedy jeden primer nasadá na inzert a druhý na vektor. (Bergkessel a Guthrie, 2013)

2.5.2.5 Obrátená alebo inverzná PCR (IPCR)

Výhodou pri tejto modifikácii je možnosť amplifikácie úsekov len s jednou známou sekvenciou. Zahrňuje fragmentáciu a následnú ligáciu DNA. Prvým krokom je rozštiepenie gDNA (genomická DNA) vhodnou restričnou endonukleázou tak, aby stredný úsek restričného fragmentu obsahoval známu sekvenciu s restričným miestom. Druhý krok zahŕňa ligáciu a cirkuláciu fragmentu, ktorý sa následne linearizuje rozštiepením v restričnom mieste v známej sekvencii čím sa vytvorí linearizovaná DNA na ktorej koncoch sa nachádza známa sekvencia. Primery sú navrhované priamo na túto známu sekvenciu takže výsledkom sú amplikony neznámej DNA. Využíva sa napríklad v genetike na rýchle určenie inzercie mobilných genetických elementov. (Ochman, 1988)

2.5.2.6 Alelovo špecifická PCR (AS-PCR)

Alelovo špecifická PCR slúži na detekciu bodových mutácií nazývaných aj jednoducholeukleotidové polymorfizmy (SNP; single nucleotide polymorphism). Sú to paralelné reakcie, pri ktorých sa najprv použije prvý primer komplementárny ku normálnej sekvencii a v ďalšej reakcii ku polymorfnej sekvencii. Druhý primer je u oboch reakcií rovnaký. Amplifikácia nastáva ak sú primery komplementárne, takže pri homozygotných líniách dochádza k amplifikácii len v jednej reakcii. (Gaudet a kol., 2009)

2.5.2.7 Reverzná PCR (RT-PCR)

Pri reverznej PCR sa využíva retrovirová reverzná transkriptáza prevádzajúca RNA úsek, ktorý nie je možné použiť ako templát pre PCR, na cDNA (komplementárna DNA). cDNA sa ďalej použije ako templán pri bežnej PCR. Vzhľadom na termickú nestabilitu reverznej transkriptázy sa dnes využíva termostabilná Tth DNA polymeráza z gramnegatívnej baktérie *Thermus thermophilus* vykazujúca za prítomnosti Mg^{2+} iónov RNA-dependentnú DNA-polymerázovú aktivitu. Táto metóda sa využíva hlavne na stanovenie expresie RNA a dnes má už, ako bežná PCR, množstvo modifikácií. (Šmarda a kol., 2005)

2.5.2.8 Kvantitatívna PCR (Real-time PCR)

Má rovnako ako reverzná PCR dnes už množstvo vlastných modifikácií. Jej podstatou je, že umožňuje kvantifikáciu sledovaného úseku DNA v reálnom čase. Sledovanie amplifikácie je možné na základe fluorescenčných sond viažúcich sa na amplifikované DNA. Aplikácie tejto metódy sú rozsiahle. Využíva sa na detekciu GMO, na diagnostické účely pri diagnóze mnohých chorôb ako aj v základnom výskume. (Šmarda a kol., 2005)

2.5.2.9 Iné príklady

Iné príklady modifikácií PCR: Rýchla amplifikácia koncov cDNA (RACE), Asymetrická PCR, PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP-PCR), Degenerovaná PCR (D-PCR), In situ PCR, Amplifikácia vnútorných prepisovaných mezerníkov (ITS-PCR), Polymorfizmus dĺžky jednoduchých repetitívnych sekvencií (SSLP-PCR), Náhodná PCR (AP-PCR) alebo náhodná amplifikácia polymorfnej DNA (RAPD). (Šmarda a kol., 2005)

3. Arábkovka Thalova

Arabidopsis thaliana, na Slovensku známejší pod názvom Arábkovka Thalova je ako burina nechcený, no v laboratóriách predstavuje jednu z najviac študovaných rastlín vôbec, pretože reprezentuje krytosemenné rastliny a vystupuje teda ako modelová rastlina.

Arabidopsis thaliana patrí do čeľade kapustovitých. Jej výška sa pohybuje od 5 do 30 cm. Stonka je na vrchu lisá, olistená a poväčšine rozvetvená. Mierne chlípky sa nachádzajú v spodnej časti stonky. Kvety sú biele (Obr. 2), kališné lístky žltozelené. Plodom je šesťuľa.



Obr. 2 Kvet *Arabidopsis Thaliana* (prevzaté z Bowman a kol., 1989)

Je rozšírená na väčšine územia Európy, v strednej Ázii a severnej aj východnej Afrike.

Je to jednoročná alebo ozimná bylina s malým jadrovým genómom. Od vyklíčenia semena po získanie zrelých semien stačí 6 týždňov, takže jej životný cyklus je veľmi rýchly.

Ďalšou z nemála výhod je efektívna transformácia pomocou Agrobakteria a preto aj vysoký počet vytvorených mutantných línii. V neposlednom rade je skromná a nenáročná čiže ideálna na pestovanie.

Roku 2000 sa stala historicky prvou rastlinou s kompletne prečítaným genómom, ktorý je organizovaný do 5 chromozómov obsahujúcich zhruba 26 000 génov. Tie kódujú približne 11 000 rodín proteínov. (Meinkle a kol., 1998; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)

Výskum tejto rastliny je enormný. Podieľajú sa na ňom vedecké tímy z celého sveta a poskytuje množstvo informácií o bunečnej a molekulárejši biológii krytosemenných rastlín.

Informácie z tak rozsiahleho výskumu sa uskladňujú na mieste zvanom TAIR databáza („The Arabidopsis Information Resource“), ktorá zhromažďuje genetické

a molekulárno biologické dáta o modelovej rastline *Arabidopsis thaliana*. Obsahuje kompletne genómové sekvencie, génové štruktúry, informácie o produktoch a expresii daných génov, genómové mapy a genetické markery. Poskytuje DNA, semená, publikácie a informácie o výskumnom tíme Arabidopsis.

Informácie pochádzajú z najnovších článkov a sú aktualizované každý týždeň.

Semiačka *Arabidopsis thaliana* sa objednávajú z Arabidopsis Biological Resource Center, ktoré sa nachádza na štátnej Univerzite v Ohio. Toto výskumne centrum má za úlohu uskladňovať, reprodukovať, uchovávať a distribuovať semiačka a DNA a je s TAIR databázou úplne prepojené. (Rhee a kol., 2003)

4. Nukleotid pyrofosfatázy/fosfodiesterázy

4.1 Základná charakterizácia NPP

Nukleotid pyrofosfatázy/fosfodiesterázy (NPP) sú membránové alebo sekretované enzýmy, (Pintus a kol., 2009) vyskytujúce sa od prokaryotov, (Gijsbers a kol., 2010) nižšie eukaryoty, (Kennedy a kol., 2005) až po ľudí. (Zalatan a kol., 2006)

Ich ústrednou úlohou je metabolizmus a recyklácia extracelulárnych nukleotidov a kontrola hladiny nukleotidov spojená s glykosyláciou a sulfatáciou. (Kaneko a kol., 2013). Ich hydrolýzou ovplyvňujú vskutku ohromné množstvo bunčných procesov, čo nie je prekvapením, keďže nukleotidy patria ku najstarším biologickým molekulám vôbec. (Rossi a kol., 2012) Organizmy ich preto už od samých počiatkov využívali na rôznorodé účely. Medzi ne patrí aj intracelulárna nukleotidová signalizácia, ktorej sa skrz ich reguláciu, zúčastňujú aj NPP (Joye a kol., 2010)

Hydrolýzou extracelulárnych nukleotidov sa zapájajú aj do metabolizmu fosfolipidov. (Kawaguchi a kol., 2011) Vystupujú aj ako upratovacia čata a pomáhajú odstraňovať extracelulárne nukleotidové cukry (Nanjo a kol., 2006). Vo fyziologických procesoch sa zapájajú napríklad do mineralizácii kostí a chrupaviek. (Kawaguchi a kol., 2011)

Niekedy sa označujú aj skratkou E-NPP, kde „E“ značí „ektoenzýmy“. Tento prívlastok si získali na základe orientácie ich aktívneho centra, ktoré sa nachádza na extracelulárnej strane bunčnej membrány. (Bollen a kol., 2000; Gijsbers a kol., 2001) Z hľadiska klasifikácie sú zaradzované do podtriedy ektonukleotidáz. Ďalšie podtriedy tvoria ektonukleosid trifosfát difosfohydrolázy, ekto-5'-nukleotidázy a alkalické fosfatázy. (Zimmermann a kol., 2012)

4.1.1 Funkcia NPP

NPP pri katalýze rozoznávajú malé molekuly, ktoré obsahujú fosfodiesterové alebo pyrofosfátové väzby (Perez, 2006). Ako už z názvu vyplýva, ich katalytická aktivita spočíva v hydrolytickom štiepení týchto väzieb, čím uvoľňujú nukleosid-5-monofosfáty zo širokej škály nukleotid di- (Salvucci a Crafts-Brandner, 1995) trifosfátov (Salvucci a Crafts-Brandner, 1995; Joye a kol., 2011) a ich derivátov. (Sakagami a kol., 2005)

4.1.1.1 Pyrofosfátová väzba

Pyrofosfátovú väzbu štiepia v nukleosidoch na 5'-OH rovnako ako na 3'-OH skupine. (Bartkiewicz a kol., 1984) Napríklad ATP sa štiepi v α - β fosfoanhydridovej väzbe za odštiepenia AMP a P_i, FAD sa štiepi na FMN a AMP, ADP-riboza na AMP a fosforibózu, diadenosin difosfát na dve AMP, ADP na AMP a P_i a podobne (Pintus a kol., 2009)

Nukleotid pyrofosfátová aktivita sa bežne analyzuje pomocou thymidin-5'(p-nitrofenylfosfátu) (Zan-Kowalczevska, 1977; Joye a kol., 2010) na základe metódy Razzela a Khorana. Jedna jednotka nukleotid pyrofosfatázy je definovaná ako množstvo enzýmu, ktoré odštiepi 1 pmol p-nitrofenolu z thymidin 5'(p-nitrofenylfosfátu) za 1 min pri 37°C. (Zan-Kowalczevska, 1977)

4.1.1.2 Fosfodiesterová väzba

Fosfodiesterovú väzbu štiepia v substrátoch ako sú aryl estery nukleosid 3'a 5'fosfáty a cyklické nukleosid 2',3' a 3',5' fosfáty (Bartkiewicz a kol., 1984), u ktorých rýchlosť hydrolyzy závisí na konkrétnej NPP, vzhľadom na stérickú zábranu cyklickej fosfodiesterovej väzby substrátu (Pintus a kol. 2009). Preferujú diestery s thymidinovou R skupinou pred fenylovými R skupinami. (Pintus a kol. 2009; Spanò a kol., 2011).

Enzýmovou kinetikou bolo dokázané, že enzýmy rozlišujú ako medzi rôznymi bázami tak aj medzi ich internukleotidovými väzbami (Bartkiewicz a kol., 1984) a vykazujú vyššiu katalytickú aktivitu voči redukovaným koenzýmom ako voči oxidovaným formám. (Joye a kol., 2010)

Hydrolytickú aktivitu nevykazujú proti fosfomonoesterovým väzbám ako napríklad v cukerných fosfátoch alebo nukleosid monofosfátoch (Kaneko a kol., 2013) no najmä proti dlhým reťazcom nukleových kyselín ako jedno alebo dvojvláknovej cirkulárnej aj lineárnej DNA. (Salvucci a Crafts-Brandner, 1995; Spanò a kol., 2011)

4.1.2 Substrátová špecificita NPP

NPP1 hydrolyzuje nukleotidy ako ATP (Kawaguchi a kol., 2011)

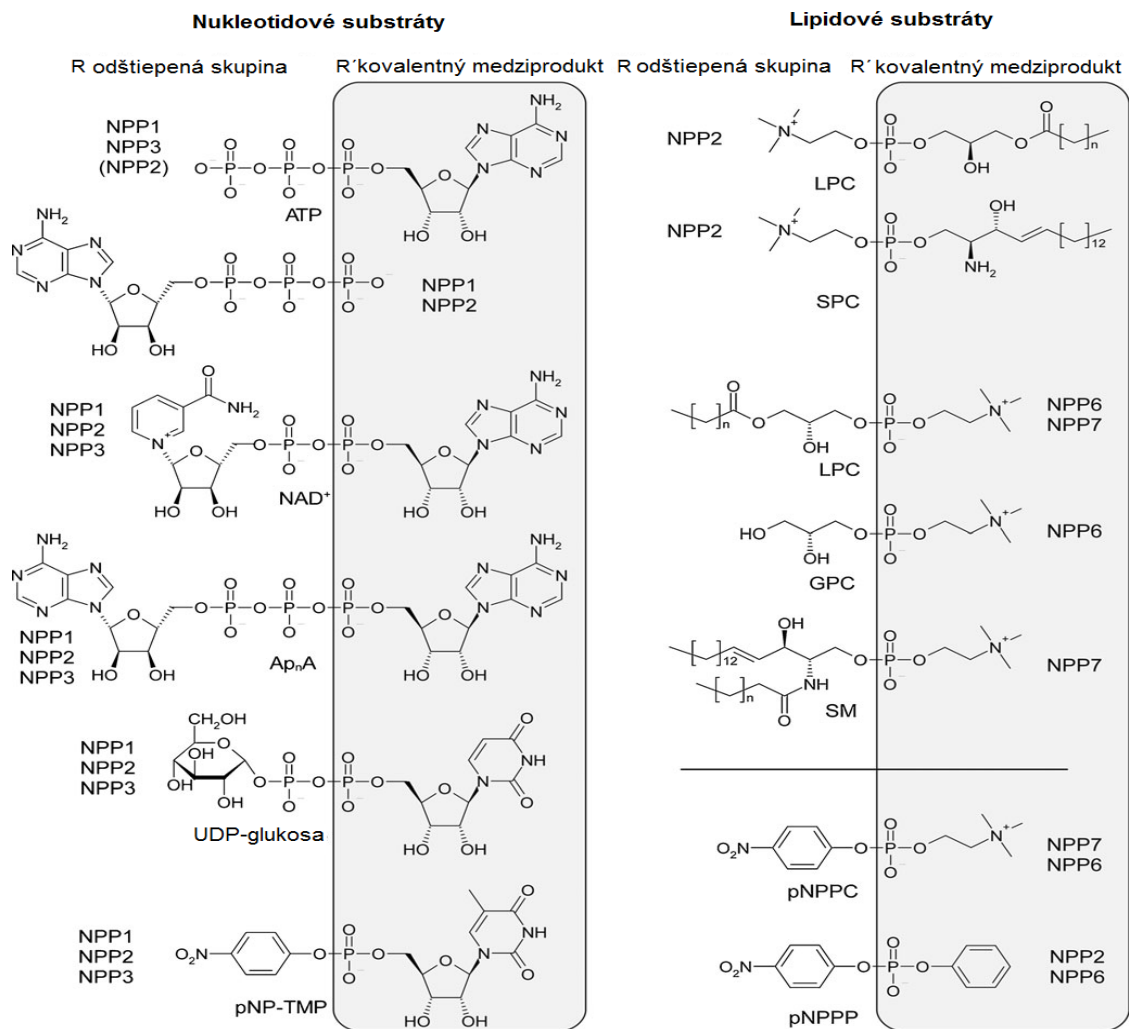
NPP2 má za substráty lysofosfatidilcholin (LPC) a iné lysofosfolipidy necholínovej povahy ako lysofosfatidylethanolamin (LPE) a lysofosfatidylserin (LPS) (Pécsi a kol., 2010)

NPP3 preferuje v hydrolyze nukleotidové cukry. (Pécsi a kol., 2010)

NPP6 hydrolyzuje cholin-obsahujúce glycerofosfodiesterý ako glycerofosforylcholin (GPC). (Kawaguchi a kol., 2011)

NPP7 sa taktiež zameriava na fosfolipidy ako sfingomyelin (Kawaguchi a kol., 2011)

Bližšie priblíženie substrátových špecifít jednotlivých izoenzýmov poskytuje *Obr. 3*.



Obr. 3 Príklady substrátovej špecifity zvieracích NPP (prevzaté zo Zimmerman a kol., 2012)

4.1.3 Evolúcia NPP

Štruktúry a funkcie NPP sa vyvíjali postupne a majú za sebou vskutku dlhú a nezvyčajnú históriu. Z evolučného hľadiska patria do odvodenej skupiny proteínov vyšších rastlín lokalizovaných v plastidoch. Pomocou fylogenetických analýz sa zistilo, že tieto proteíny majú eukaryotický a nie cyanobakteriálny pôvod. Vesikulárny transport týchto proteínov do

primárných plastidov sa vyvinul dlho po endosymbióze syníc, aby bola umožnená ich glykosylácia a/alebo ich transport do viacerých bunecných kompartmentov. (Gagat a kol., 2013)

4.2 Zvieracie NPP

Výskum diskutovaných ektoenzýmov je zväčša orientovaný na cicavčie NPP (Bollen a kol., 2000; Zalatan a kol., 2006). Charakterizovaných a popísaných bolo celkom sedem izoenzýmov. Očíslované boli na základe ich postupných objavov NPP1 – NPP7. Nedostatok informácií a tým nemožnosť ich jednoznačného zaradenia na začiatkoch výskumu, priniesla do nomenklatúry menšie zmätky. (Joye a kol., 2010) Preto sa pre niektoré izoenzýmy používajú ich pôvodné názvy. Pre NPP1 je to PC-1, pre NPP2 autotaxin, PD-I a pre NPP3 je to B10. (Lazarowski a kol., 2003)

Jednotlivé typy môžu byť rozlíšené na základe ich štruktúry, substrátovej špecificity no v prvom rade na základe ich aminokyselinovej sekvencie. (Joye a kol., 2010)

Čo sa týka ľudských NPP, je známych 5 génov. Z nich najlepšie popísaný je izoenzým NPP1. (Bollen a kol., 2000)

4.2.1 Funkcia zvieracích NPP

Jednotlivé izoenzýmy vykonávajú na základe rozličných substrátových špecifít rozličné funkcie. Tie sú presne opísané pri isoenzýmoch NPP1, NPP2 a NPP6, pri ostatných nie sú dostatočne objasnené.

NPP1 hrá vo fyziologických procesoch rolu negatívneho regulátora pri mineralizácii kostí a chrupaviek. Skrz hydrolyzu ATP generuje AMP a pyrofosfát, ktorý inhibuje začlenenie anorganického fosfátu do kryštálov hydroxyapatitu. (Kato a kol., 2012)

Spolu s inými enzýmami sa podieľa aj na regulácii nadmernej kalcifikácie. Jedným z dôsledkov poruchy činnosti NPP1 je hypermineralizácia. (Harmey a kol., 2004) Hydrolyzou ďalších nukleotidov sa NPP1 zapája aj do signalizácie pomocou inzulínových receptorov. (Kawaguchi a kol., 2011)

NPP2 sa uplatňuje hlavne pri generácii lipidového mediátora lysosfosfatidovej kyseliny (LPA) z lysophosphatidocholinu (van Meeteren a kol., 2005). LPA sa ďalej uplatňuje vo viacerých signálnych dráhach (Pécsi a kol., 2011). Odozvy sú veľmi rôznorodé od mitogenézy, chemotaxie (Pécsi a kol., 2011), angiogenézy (Kawaguchi a kol., 2011) po prestavbu nervov a aktiváciu iónových kanálov. (Nam a kol., 2001) V nádorových bunkách

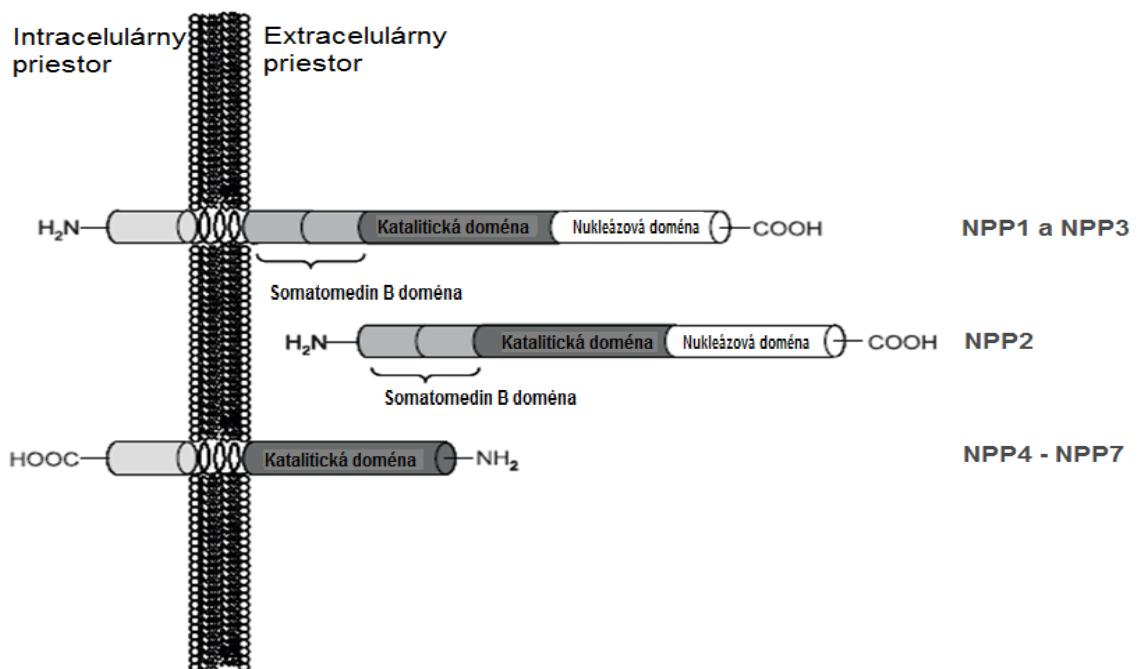
(v melanóme) stimuluje ich migráciu (Stracke a kol., 1991) a dokonca spôsobuje celkové znásobenie tumorovej aktivity. (Nam a kol., 2001)

NPP6 ako cholin-špecifická glycerolfosfodiester fosfodiesteraza je dôležitá v spätnej absorpcii fyziologicky esenciálneho cholinu v pečeni rovnako ako pri vývoju mozgu. (Kawaguchi a kol., 2011)

4.2.2 Štruktúra zvieracích NPP

Pozostávajú z krátkych intracelulárnych, krátkych transmembránových a dlhších extracelulárnych domén (*Obr. 4*). (Joye a kol., 2010).

NPP2 a NPP3 boli objavené ako glykoproteiny, hoci 4-10 zhodných sekvencií (Asn-X-Ser/Thr) pre *N*-glycosyláciu nachádzame u ľudí pri všetkých známych izoenzýmoch NPP. Presnú biologickú funkciu glykosylácie sa ale zatiaľ nepodarilo potvrdiť. (Bollen a kol., 2000)



Obr. 4 Štruktúra jednotlivých nukleotid pyrofosfatáz/fosfodiesteráz (prevzaté z Joye a kol., 2010)

4.2.2.1 Membránové formy

NPP1-3 sa vyskytujú ako modálne proteíny (Joye a kol., 2010) a homodimery spojené disulfidovými mostíkmi. Pozostávajú z krátkych N-koncových intracelulárnych domén, takže ich orientácia je druhého typu (Bollen a kol., 2000), ktoré hrajú rolu v cielení proteínu, a „inside-out“ signalizácii (Joye a kol., 2010) a z krátkej transmembránovej domény (Bollen a kol., 2000), ktorá zabezpečuje hydrofobicitu (Goding, 2000) a takisto nesie informácie o targetingu. (Joye a kol., 2010) (*Obr. 4*)

NPP1 sa po exprexií transportuje na bazoterálne membrány buniek, čomu nasvedčuje fakt, že ich určité frakcie sa nachádzajú na endoplazmatickom retikulu ako aj ich dileucinový motív v cytoplazmatickom chvostíku (Joye a kol., 2010) NPP3 sa naopak vyskytujú na apikálnych buncných povrchoch (Bollen a kol., 2000)

NPP2 sa na rozdiel od NPP1 a NPP3 vyskytuje len ako rozpustný proteín sekretovaný ľudskými bunkami melanómu. (Bollen a kol., 2000) Výskumy ale naznačujú, že proteolytickým štiepením transmembránových foriem sa s najväčšou pravdepodobnosťou tvoria rozpustné a sekretované formy všetkých izoenzýmov NPP. (Bollen a kol., 2000; Joye a kol., 2010)

NPP4-5 sa od NPP1-3 odlišujú v orientácií, ktorá je prvého typu, čo značí C-zakončenie intracelulárnej domény. (*Obr. 4*)

NPP6 -7 vykazujú podobné charakteristiky ako NPP4 a NPP5 (Pintus a kol., 2009)

4.2.2.2 Cytoplazmatické domény

Cytoplazmatické domény sa a u každého jednolivého izoenzýmu líšia. (Bollen a kol., 2000)

4.2.2.3 Extracelulárne domény

Extracelulárne domény sa skladajú z dvoch somatomedin B domén, katalytickej domény a nukleázovej domény (Pintus a kol., 2009). U cicavčích NPP4-7 a NPP nižších eukaryot a baktérii sa somatomedin B a nukleasové domény nenachádzajú. (*Obr. 4*)

Somatomedin B domény u NPP1-NPP3 pozostávajú z dvoch somatomedine B domén, ktoré oddeľujú katalytickú doménu od membrány. Sú veľmi bohaté na cystein, pomocou ktorého tvoria disulfidové väzby (Bollen a kol., 2000; Joye a kol., 2010) čím sprostredkovávajú dimerizáciu (Bollen a kol., 2000) prípadne oligomerizáciu. Takisto prispievajú k správne mu fungovaniu a skladaniu proteínu. (Joye a kol., 2010)

Katalytické domény sú v rodine alkalických fosfatáz konzervované. Ich sekundárna štruktúra spočíva v β -skladaných listoch uložených medzi α -hélixmi. Identické balenie si zachovávajú aj NPP rovnako ako identické usporiadanie šiestich aminokyselinových zbytkov koordinujúcich dva kovy. (Bollen a kol., 2000)

V katalytických doménach NPP1 a NPP3 sa nachádza sekvencia GXGXXG, ktorá napovedá naviazaniu dinukleotidov. (Bossemeyer, 1994) Ich mutáciou a následnou nemožnosťou katalýzy sa potvrdzuje táto predikcia. U NPP2, ktorá štiepi lipidové

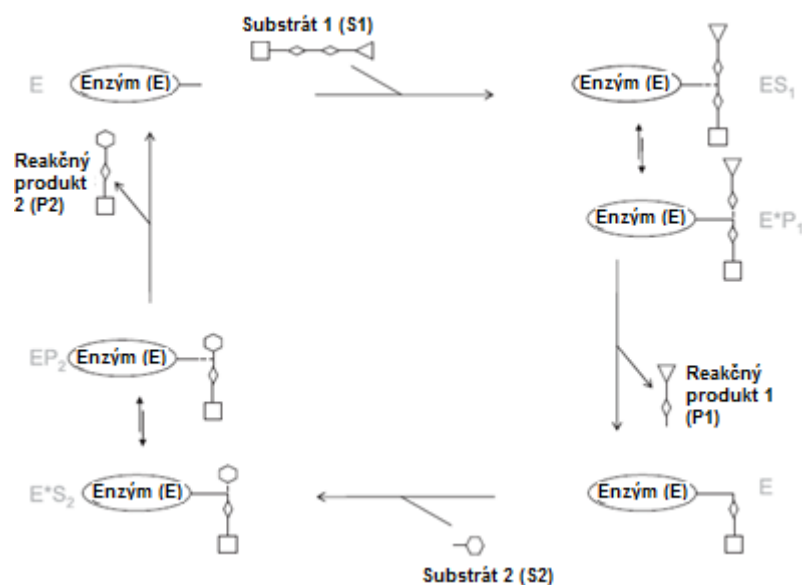
nukleotidy, tento motív nenachádzame. Oproti tomu sa jedná o enzým, u ktorého sa katalytické domény vyvinuli do hydrofóbných kavít viažúcich lipidy. Acylové reťazce LPA si v kavite uchovávajú stálu konformáciu, zatiaľ čo samotné aktívne centrum vykazuje určitú plasticitu. (Pécsi a kol., 2010)


Nukleázové domény u NPP1-3 sú identické doménam v endo-nukleázach. Pozostávajú z β -skladaných listov uloženými medzi α -hélixmi a dvomi prekríženými reťazcami. Vzhľadom na fakt, že diskutované izoenzyémy nekatalyzujú endo-nukleázové reakcie sa ich funkcia predpokladá čisto ako doména slúžiaca na rozoznanie substrátu. (Bollen a kol., 2000)

4.2.4 Katalýza zvieracích NPP

Nakoľko sú podobnosti NPP s alkalickými fosfatázami jasné, bude rovnako zjavný aj analogický mechanizmus katalýzy.

V katalytickom mieste sa nachádzajú 2 esenciálne kovy, ktoré sprostredkovávajú dvojkrokový ping-pongový mechanizmus katalýzy. V prvom kroku kov 2 aktivuje threoninový hydroxyl, ktorý následne napadá fosfát substrátu a vytvára tak kovalentne viazaný nukleotidylovaný medziprodukt. V druhom kroku sa regeneruje hydroxylová skupina threoninu tak, že druhý kov aktivuje molekulu vody, ktorá sa chová ako nukleofil. Napadá reakčný produkt stále prítomný v katalytickom mieste ako kovalentne viazaný medziprodukt, čím ho odštiepuje ako nukleosid 5'-monofosfát. Popísaný mechanizmus predpokladá, že alkalické pH spôsobuje ionizáciu prvého kovu, ktorý koordinuje druhý substrát. Ním je zvyčajne voda.



Obr. 5 Hydrolyza katalyzovaná NPP enzýmom, kde ping-pongový mechanizmus nasvedčuje substrát obsahujúci pyrofosfátovú väzbu (). Prvý reakčný produkt je uvoľnený pred interakciou druhého substrátu. (prevzaté z Joye a kol., 2010)

AMP ako reakčný produkt inhibuje fosfodiesterázovú aktivitu, na rozdiel od reakčného produktu nikotinamid mononukleotidu (NMN), vznikajúceho štiepením NAD(H). Predpokladá sa, že NMN je rapídne uvoľnený behom prvého kroku hydrolyzy, pokým AMP plní rolu druhého reakčného produktu a uvoľňuje sa až na konci druhého reakčného kroku.

Predchádzajúce štúdie dokonca potvrdili vyššiu afinitu cicavčích NPP k AMP ako k samotným substrátom (Moe a Butler, 1983). Rovnako zaujímavá je aj ich autofosforylácia zaznamenaná len pri nízkych koncentráciách nukleotidov, ktorou enzým pozastavuje vlastnú katalytickú aktivitu. Obe skutočnosti môžu naznačovať ich schopnosť autoregulácie, ktorá predchádza nekontrolovateľnému rozkladu nukleotidov. (Joye a kol., 2010)

Pri vysokých koncentráciách substrátu, Michaelis-Mentenová kinetika nebola dokázaná, čo svedčí na alosterický typ enzýmu, čiže väzba prvého substrátu na prvú subjednotku oligomeru, ovplyvní väzbu druhej molekuly substrátu na druhú podjednotku. (Joye a kol., 2010)

4.3 Rastlinné NPP

Na rozdiel od väčšieho počtu izolovaných a popísaných živočíšnych NPP, bolo charakterizovaných len zopár rastlinných (Nanjo a kol., 2006). Takže množstvo faktov a informácií zatiaľ čaká na objavenie. Z doposiaľ získaných informácií môžeme tvrdiť, že v určitých bunčných procesoch rastlín hrajú nezastupiteľnú rolu.

Informácie o NPP získavame najčastejšie z transgenných rastlín, v ktorých bola zvýšená expresia daného enzýmu. U takýchto rastlín bola zistená zvýšená ADP-Glc hydrolytická aktivita (Nanjo a kol. 2006), vysoká koncentrácia rozpustných cukrov ako glukózy, fruktózy, glukózy-6-fosfát, nízka koncentrácia škrobu a polysacharidov bunecnej steny a zvýšená rezistencia proti vysokým koncentráciám soli a teplotám (Perez, 2006)

4.3.1 Procesy, ktorých sa rastlinné NPP zúčastňujú

4.3.1.1 Dozrievanie ovocia

Jednou z najdôležitejších úloh je účasť rastlinných NPP na dozrievaní ovocia. To potvrdzuje zvýšená enzýmová aktivita pozorovaná v plodoch opuncie (*Opuntia*, čeľaď kaktusovité) pri dozrievaní od zeleného do červeného štádia plodu, rovnako ako znížená enzýmová aktivita pri prezretých plodoch. (Spanò a kol., 2011)

Toto tvrdenie podporuje vysoká katalytická efektívnosť NPP voči NAD(P)(H), v porovnaní s ostatnými substrátmi, čím sa predpokladá schopnosť NPP regulovať aktivitu niektorých dehydrogenáz. NADH dehydrogenázový komplex sa zúčastňuje elektrón transportného dýchacieho reťazca a je veľmi dôležitý pri začiatkoch dozrievania plodov. (Guéra a Sabater, 2002) Vzhľadom na jeho detegovanú zníženú aktivitu a fakt, že NPP preferuje ako substrát NAD(P)H nad NAD(P), čím reguluje intracelulárny pomer NAD(P)H/NAD(P), môžeme predpokladať, že zvýšená aktivita enzýmu NPP indikuje hydrolýzu dehydrogenázového kofaktora a tým ovplyvňuje dozrievanie ovocia (Spanò a kol., 2011).

4.3.1.2 Regulácia syntézy glykoproteínov

Iný proces regulácie, do ktorého sú rastlinné NPP zahrnuté je regulácia syntézy glykoproteínov, ktorá bola dokázaná pri NPP zo sóji. Po odstránení plodov, totiž nastávajú pre rastlinu nevšedné podmienky, pri ktorých môžeme pozorovať akumuláciu menej bežných proteínov.

Odstránením kvetov a luskov sa naruší normálne dozrievanie listov elimináciou častí rastlín, ktoré absorbujú živiny na úkor zreých listov, čím sa metabolizmus listu začne pripravovať na novú rolu zásobného pletiva. Odozvou na tento stav je pozastavenie remobilizácie dusíku, degradácia listových enzýmov a následná syntéza novosyntetizovaných zásobných glykoproteínov z uvoľňovaných aminokyselín. Vzhľadom na to, že predpokladaná funkcia u cicavčieho NPP1 je regulácia syntézy glykoproteínov, pomocou zmeny dostupnosti substrátu pre glykosyltransferázu sa predpokladá, že v listoch rastlín bude mať rovnakú funkciu, ak uvažíme obrovský nárast syntézy glykoproteínov. (Salvucci a Crafts-Brandner, 1995)

4.3.1.3 Iné procesy

Ďalšou nemenej zaujímavou a dôležitou úlohou je presmerovanie toku uhlíku z biosyntézy škrobu a polysacharidov v bunečnej stene do iných metabolických dráh (Pintus a kol. 2009).

4.3.2 Výskyt rastlinných NPP

Veľkým prínosom pre študovanie enzýmov sú informácie o ich výskyte, ktoré nám predpovedajú možné enzýmové funkcie. Výskyt NPP v bunke bol potvrdený imunocytochemickou analýzou v endomembránových systémoch, vo vakuolách (Nanjo a kol. 2006) a v plastidoch. Na stanovenie ich presnej subcelulárnej lokalizácie boli zhotovené mutantné bunky ryže, v ktorých bola NPP exprimovaná ako NPP-GFP čiže

s naviazaným fluorescenčným proteínom GFP („*Green fluorescent protein*“; zelený fluorescenčný proteín). Väčšina izoenzýmu NPP-GFP (neskôr pomenovaný ako izoenzým NPP3) bola distribuovaná do extrachloroplastových kompartmentoch v endomembránovom systéme bunky (Kaneko a kol., 2011, Nanjo a kol., 2006). Taktiež sa podarilo objasniť transportnú cestu z ER/Golgi systému do chloroplastov (viď nižšie; Nanjo a kol. 2006)

4.3.3 Izolácia rastlinných NPP

Izolácia študovaných proteínov je neoddeliteľnou súčasťou výskumu. Je potrebná pri študovaní ich kinetiky a štruktúry. Izolácia proteínov či rôznych bunecných kompartmentov môže spôsobovať nemalé problémy. To platí aj pri NPP, kvôli ich extrémne vysokej afinity ku bentonitu. Tá sa spája s ich tendenciou absorbovať sa na pevné povrchy ako sklo alebo dializačné membrány a tvoriť agregáty. Táto schopnosť tak neumožňuje ich jednoduchú a bezproblémovú izoláciu a vyúsťuje v malé výtázky a nehomogenitu prvých izolácií (Zan-Kowalczevska, 1977). Najväčším problémom pri NPP je ich podobnosť s rôznymi inými proteínmi, čím sa izolácia stáva ešte ťažším orieškom.

Vyizolovať NPP sa podarilo z jedno aj dvojdeložných rastlín, no ich celkový počet zostáva nedostačujúci, z čoho vyplýva aj nedostačujúce množstvo informácií, ktoré o nich zatiaľ máme. (Nanjo a kol., 2006)

4.3.4 Vyizolované NPP z rastlín

4.3.4.1 NPP z ryže

Vyizolovať a najlepšie popísať sa podarilo NPP z ryže (*Oryza sativa*), v ktorej bolo identifikovaných ďalších päť génov pre NPP. Vyizolovaný enzým bol označený ako NPP1, ďalšie ako NPP2 – NPP6. (Nanjo a kol. 2006; Kaneko a kol. 2011) Z čoho jasne vyplýva, že sa vyskytujú vo viacerých izoformách. (Perez, 2006)

4.3.4.2 NPP z ľuľka zemiakového

Purifikovaná NPP z hľúz ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum*), bola porovnávaná s fosfodiesterázou nachádzajúcou sa v hadom jede, ktorá slúži ako analytický porovnávací prostriedok pre štruktúrnu charakterizáciu nukleotidových zlúčenín. (Agudo a kol., 1998) Z dôvodu veľkej podobnosti nukleotid pyrofosfatáz a cyklických nukleotid fosfodiesterázam z hľúz zemiakov, bola purifikácia nemohogénna. To si vynútilo obmenu postupu s konečnou vyššou čistotou enzýmu. Následne sa opätovne potvrdili ich vlastnosti a funkcie (Zan-Kowalczevska, 1977, Bartkiewicz a kol., 1984)

4.3.4.3 NPP z pšenice

Za použitia EST sa podarilo zložiť gén NPP z pšenice (*Triticum*; TaNPP), ktorá bola následne exprimovaná v kvasinke (*Pichia pastoris*). Endogenný proteín bol ďalej vyzisťovaný a vyčistený. (Joye a kol., 2010)

4.3.4.4 Ostatné NPP

NPP boli purifikované aj z jačmeňa (*Hordeum vulgare*; Nanjo a kol., 2006) a sóji (*Glycine*). (Salvucci a Crafts-Brandner, 1995) Z mungo fazole (*Phaseolus aureus*) bola NPP izolovaná v kryštalickej a homogénnej forme ako dimer. (Balakrishnan a kol., 1977) Z latexu mliečniku (*Euphorbia characias*; Pintus a kol. 2009) a opuncie (*Opuntia ficus indica*; Spanò a kol., 2011) bola purifikovaná rozpustná forma NPP.

Tieto výsledky dokazujú, že v rastlinnej ríši sú prítomné rozličné NPP, čo je dôležité z dôvodu pokrytia širokej škály substrátov a vlastností. (Joye a kol., 2010)

4.3.5 Štruktúra rastlinných NPP

Na základe ich aminokyselinovej sekvencie sú zaradzované do skupiny transmembránových proteínov druhej triedy. (Joye a kol. 2010, 2011; Nanjo a kol., 2006) Patria do veľkej skupiny štruktúrne podobných nukleotid hydroláz a ich izofomy nachádzame v rozličných častiach rastlín. Ich vlastnosti ako odolnosť voči vysokým teplotám (Joye a kol., 2010), väzba na concanavalin A, vysoká rezistentnosť na SDS denaturáciu (Perez, 2006) a ich pomalá migrácia v SDS page sú typické charakteristiky N-glykosylovaných proteínov s disulfidovými mostíkmi. (Nanjo a kol., 2006; Joye a kol., 2010)

Stavba rastlinných NPP sa príliš neodlišuje od stavby živočíšnych izoenzýmov (Obr. 3). Pozostávajú z krátkych intracelulárnych a transmembránových domén a dlhších extracelulárnych domén. (Joye a kol., 2010)

NPP sú vo všeobecnosti charakterizované ako metalové proteíny, čiže pri katalýze využívajú kov, ktorý je pre hydrolýzu esenciálny. Najčastejšie nachádzané kovové katióny u rastlinných NPP sú Mg^{2+} a Ca^{2+} . (Pintus a kol., 2009)

4.3.5.1 Štruktúra NPP z latexu mliečniku

Proteín izolovaný z latexu mliečnika (ELNPP) sa skladal z dvoch identických podjednotiek, z toho každá obsahovala 1 Ca^{2+} , ktorý sa dal jednoducho odstrániť s použitím EDTA a 1 Mg^{2+} katión pevne viazaný ku enzýmu. Kompletná inaktivácia nastala už po odstránení Ca^{2+} . Aktivita bola plne obnovená inkubáciou ELNPP s Ca^{2+} iónmi. Obsah

metalových iónov bol stanovený atómovou absorpčnou spektrometriou na 0,11% Ca^{2+} a 0,07% Mg^{2+} (Pintus a kol., 2009)

4.3.5.2 Štruktúra NPP z opuncie

NPP z plodu opuncie (*Opuntia ficus indica*; ONPP) bola zložená z dvoch identických polypeptidových reťazcov a každý obsahoval 0,075% Ca^{2+} a 0,05% Mg^{2+} . (Spanò a kol., 2011)

4.3.5.3 Štruktúra NPP z pšenice

Na rozdiel od vyššie zmienených NPP sa enzým z pšenice (TaNPP) na základe aminokyselinovej sekvencie približuje cicavčím NPP doposiaľ s najväčšou mierou. V katalytickom mieste obsahuje vysoko konzervovaný katalytický zbytok threoninu a ďalšie aminokyseliny viažuce sa na kovový ión a substráty, ktoré sú pre rodinu cicavčích NPP charakteristické (Joye a kol., 2011). Popri rovnakom katalytickom mieste majú s cicavčím izoenzýmami NPP 1-3 identickú aj väčšinu vlastností ako napríklad substrátovú špecifitu. Avšak modulárna štruktúra TaNPP viac odpovedá cicavčím izoenzýmom NPP 4-7, vzhľadom na to, že je nepomerne jednoduchšia a neobsahuje somatomedin B a nukleázové domény, ktoré sa u NPP1-3 nachádzajú.

Všetky mutantné TaNPP exprimované v kvasinkách (*Pichia pastoris*) preferovali oligomernú formu, no niektoré sa po purifikácii vyskytovali aj ako monomery. Z toho sa usúdilo, že prirodzená forma enzýmu pripojeného na membránu, je oligomerná. (Joye a kol., 2011) DTT (dithiothreitol) kompletne ruší enzýmovú aktivitu TaNPP, zjavne kvôli redukcii disulfidovej väzby, ktorá je potrebná pre správnu konformáciu a poskladanie enzýmu.

V generovanej 3D štruktúre (Schwede a kol., 2003) TaNPP založenej na známej 3D štruktúre NPP z baktérie *Xanthomanoas axonpodis* (Zalatan a Herschlag, 2006) sa štyri cysteinové zbytky tvoriace dva páry nachádzajú na povrchu 3D modelu blízko pri sebe, preto sú s najväčšou pravdepodobnosťou zahrnuté v oligomerizácii, rovnako ako v prípade NPP1 (PC-1) z človeka (Belli a kol., 1995).

TaNPP sú podľa všetkého dopravované do bazolaterálnej membrány buniek, vďaka ich di-leucinovému motívu a signálnej sekvencii v ich transmembránovej oblasti. Bola ale zaznamenaná aj skrátená forma TaNPP, čo môže svedčiť na vo vode rozpustnú formu enzýmu (extracelulárnu alebo cytosolickú). Extracelulárne formy sú tvorené hydrolytickým štiepením z membrány. (Joye a kol., 2011).

U TaNPP rovnako ako u väčšiny doposiaľ vyizolovaných NPP, EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) znižuje enzýmovú aktivitu, čo dokazuje potrebu metalových

iónov pri katalytickej aktivite. Pretože EDTA odstraňuje esenciálne metalové ióny z katalytických miest, reverzibilne pozastavuje enzýmovú aktivitu. Pri adícii Zn^{2+} iónov sa aktivita obnovuje, čím sa predpokladá prítomnosť týchto iónov v katalytickom centre TaNPP (Joye a kol., 2011) ako sa to už skôr potvrdilo. (Zalatan a kol., 2006)

4.3.5.4 Štruktúra NPP z mungo fazuli

Čo sa týka kvartérnej štruktúry je veľmi zaujímavá NPP z mungo fazuli, ktorá bola purifikovaná ako dimér skladajúci sa z rovnakých podjednotiek, no pri ošetrení s p-hydroxymercuribenzoatom disociovala na monomérnu formu a pri ošetrení s AMP sa premenila na tetramér. Výsledky ukázali, že monomér je síce prekvapivo najviac aktívna forma NPP, no zároveň najmenej stabilná, čo naznačuje, že jej aktivita je regulovaná cez asociačno-disociačný jav (Balakrishnan a kol., 1977)

4.3.5.5 Výnimky

Výnimku z pravidla tvoria práve NPP z ryži, jačmeňa a sóji, ktoré patria medzi najlepšie charakterizované rastlinné NPP. Tie pri katalýze nevyužívajú kov a tým pádom sa odlišujú aj v mechanizme katalýzy.

Izoformy z ryži a jačmeňa sa od ostatných NPP charakterizovaných doposiaľ (Bessman a kol., 1996; Bollen a kol., 2000) odlišovali aj v optimálnom pH, molekulárnej váhe a intertnosi ku redukujúcim činidlám. (Baroja-Fernandez a kol. 2004) Ich najjednoduchšie izolovateľná izoforma bola rozpustná forma, ťažšie izolovateľná bola pevne pripevnená k škrobovým granulám. (Perez, 2006)

NPP z jačmeňa sa vyskytovala ako monomer a homopolymer.

NPP z ryži bolo potvrdených 6 izoforiem enzýmu: NPP1-NPP6. (Kaneko a kol., 2011). Bolo dokázané, že NPP1 sa akumuluje v chloroplastoch rovnako ako homopolymer a obsahuje 4 N-glykosylované miesta. Takže pre správne zbalenie a plnú enzymatickú aktivitu je potrebná glykolyzácia daného proteínu. Doposiaľ sa predpokladalo, že N-glykosylácia prebieha len v ER-Golgi systéme, preto bolo na mieste preveriť, či sa izoenzým transportuje cez tento systém. Ako predpokladaný signálny peptid smerujúci enzým do ER, bola považovaná N-terminálna odštiepiteľná hydrofóbna signálna sekvencia. Zvláštnosťou bolo, že táto sekvencia nesúhlasila s N-koncovou sekvenciou zrelého proteínu. Výsledky potvrdili predpovedanú funkciu tejto sekvencie rovnako ako vezikulárnu dráhu cez ER-Golgi systém. (Nanjo a kol., 2006) Prekursorová sekvencia NPP1 obsahuje okrem signálneho peptidu aj extra-peptid, ktorý sa štípi posttranslačne v sekrečnej dráhe. Čím vzišiel

predpoklad, že N-terminálny extra peptid slúži na dopravenie NPP1 do plastidov. Výsledky toto očakávanie vyvrátili a oblasť zodpovednú za transport NPP1 do plastidov určili v mieste od 308 do 478 v aminokyselinovej sekvencii.

Rovnako ako NPP1 aj NPP3 obsahuje N-koncovú štiepiteľnú signálnu sekvenciu v prekurzorovej forme. Izoenzým NPP3 ale nevykazuje hydrolytickú aktivitu voči ADP-glukóze a schopnosť dopravy do plastidov, napriek 70% zhode v aminokyselinovej sekvencii, ktorá je u NPP1 zodpovedná za transport do plastidov. Najpodstatnejší rozdiel v sekvencii spočíva v zámene negatívne nabitých skupiny Asp336 v NPP3 za kladne nabitú skupinu Lys319, čo v konečnom dôsledku neumožňuje NPP3 dopravu do plastidov. (Kaneko a kol., 2011)

NPP zo sóji bol charakterizovaný ako rozpustný holoenzým NPP, ktorý sa sekvenciou najviac približoval izoenzýmu NPP1 z ryže, preto bol rovnako označený ako NPP1. (Salvucci a Crafts-Brandner 1995) Jeho N-koncovou sekvenciou, substrátovou špecifitou a mechanizmom katalýzy sa úplne odlišuje od membránových cicavčích NPP1 (Evans a kol., 1973;), ostatných rastlinných NPP1 (Balakrishnan a kol., 1977; Bartkiewicz a kol., 1984) a zbytku proteínov, ktoré si sója uchováva vo vegetačnom stave. Molekulová hmotnosť rozpustného holoenzýmu NPP1 (560 kD) indikovala oktamerickú formu. (Salvucci a Crafts-Brandner 1995)

4.3.6. Špecifická substrátová špecifita u NPP zo sóji a zemiakov

NPP1 zo sóji sa výrazne odlišuje od rastlinných NPP. Čo koreluje so zistením, že štiepi aj anorganický pyrofosfát a dvakrát rýchlejšie štiepi pyrimidinové nukleotidy, UDP-Glc a CDP-Glc ako purinové nukleotidy. (Salvucci a Crafts-Brandner, 1995)

U NPP z hl'úzu ľuľku zemiakového sa po homogennej preparácii potvrdila nová hydrolytická aktivita u dinukleotid polyfosfátu, ktorej rýchlosť sa s postupujúcim predlžovaním reťazca znižovala. (Bartkiewicz a kol., 1984) Najvýznamnejším potvrdením bolo odstránenie 7-metylguanozínu (m7GMP) z čiapočky na 5'konci mRNA, ktorá sa doposiaľ pripisovala cyklickým nukleotid fosfodiesterázam prítomným v nehomogénnych izoláciách. (Kole a kol. 1976) Za zmienku stojí aj skutočnosť, že NPP z ľuľku zemiakového sa mimoriadne podobá na NPP z tabaku, u ktorej bola dokázaná rovnaká schopnosť štiepenia m7GMP z mRNA. (Zan-Kowalczewska, 1977)

4.3.7 Mechanizmus katalýzy rastlinných NPP

Mechanizmus katalýzy u väčšiny rastlinných NPP nie je presne známy. No ako už bolo spomínané, mechanizmy sa líšia podľa potreby metalového iónu pri katalýze. Tým pádom sa

odlišujú aj v aminokyselinových sekvenciách a optimálnych hodnotách pH enzýmových aktivít.

Jednoznačne popísaný je mechanizmus TaNPP, ktorý je analogický s alkalickými fosfatázami a cicavčím NPP, s ktorými zdieľa najväčšiu podobnosť. Spomedzi rastlinných NPP sa podobnému mechanizmu približuje aj ELNPP. (Obr. 5)

4.3.8 Úlohy jednotlivých aminokyselín v aktívnom centre

Relevantnosť jednotlivých aminokyselín v aktívnom centre a ich jednotlivé úlohy pri mechanizme katalýzy sa najčastejšie potvrdzujú ich mutáciami, čiže zámenami jednotlivých aminokyselín za iné. Identifikovaná a charakterizovaná TaNPP bola vybraná na mutácie, ktoré boli zvolené na základe aminokyselinových sekvencií NPP z iných organizmov so známym mechanizmom. (Joye a kol., 2010)

Na overenie významu vysoko konzervovaného zbytku threonínu, ktorý vystupuje ako kľúčová aminokyselina pri katalýze u cicavčích NPP (Belli a kol., 1995) sa Thr132 u TaNPP nahradil Ala a Ser. Ako sa predpokladalo, alanín inaktivoval enzým voči väčšine substrátom a potvrdil tak nepostrádateľnosť threonínu. Veľkým prekvapením boli ale NAD(H) a NADPH ktoré tvorili výnimku v pravidle. Namerala sa u nich 5 až 10x vyššia hydrolytická aktivita, ktorej dôvodom bude zjavne rozvoľnenie štruktúry menšou aminokyselinou a vytvorenie priestoru pre objemnejšie substráty. Serín je naopak nevyhnutný pri katalýze u rodiny enzýmov blízkej NPP a to u alkalických fosfatáz. (Schwartz a kol., 1963) Napriek tomu sa jeho nahradením nezvýšila fosfatázová aktivita, naopak sa celá úplne pozastavila a to nielen voči pyrofosfatázovým ale aj fosfodiesterázovým substrátom. Mutantné TaNPP boli ale schopné katalyzovať prvý krok hydrolýzy ping-pongového mechanizmu. Práve neprítomnosť serínu u NPP sa pokladá za príčinu ich neschopnosti katalyzovať monofosfáty.

His255 u NPP je vysoko konzervovaný u rôznych organizmov. Jeho úloha tkvie vo väzbe kovového ionu (Zalatan a kol., 2006) a správneho nastavenia polohy kyslíkového atomu, ktorý premoštuje nukleotidovú časť substrátu a uvoľňujúcu sa skupinu. Takisto koordinuje vodu vystupujúcu ako druhý substrát enzýmovej katalýzy. Mutáciou tejto skupiny za menšiu, nepolárnu skupinu alanínu sa rovnako ako v prípade Thr132 zvýšila aktivita 5-10x voči NAD(H) a NADPH napriek výraznému zníženiu aktivity voči ostatným substrátom.

Asn153 zohráva podobnú úlohu ako His255 (Zalatan a kol., 2006) plus stabilizuje tranzitný stav. Náhradou Asn153 za objemnejšiu bazickú skupinu arginínu nastali zásadné zmeny štruktúry a tým zmeny hydrolytickej aktivity voči všetkým testovaným substrátom.

Asn165, Phe194 a Glu199 sú lokalizované veľmi blízko miesta naviazania nukleotidu a nie sú tak striktné konzervované. Mutácia Asn165 na serin, ktorý sa vyskytuje v iných NPP spôsobila výrazné zvýšenie aktivity voči všetkým testovaným fosfodiesterovým substrátom. (Joye a kol., 2011)

4.3.9 Problémy vyskytujúce sa u rastlinných NPP

Vzhľadom na jasné rozdielnosti medzi niektorými enzýmami NPP je možné, že niektoré z nich boli klasifikované nesprávne. Pri veľkom počte izoenzýmov s rozličnými substrátovými špecifitami môže ľahko dochádzať k nesprávnej identifikácii. Častou zámienou u NPP je zámiena za PAP („purple acid“ fosfatázy). Rozdielne vlastnosti niektorých NPP napríklad z ryži a jačmeňa, môžu byť preto dôsledkom zámieny týchto dvoch enzýmov.

PRAKTICKÁ ČASŤ

5. Materiál a prístroje

5.1 Chemikálie

EtOH (Lach-Ner, Česko), NaClO (Sigma-Aldrich, Česko) MS medium basalt salt mix (Duchefa, Holandsko), sacharóza (Lach-Ner, Česko), MES hydrát (Duchefa, Holandsko), phytigel (Sigma-Aldrich, Česko), chloroform-isoamylalkohol (Sigma-Aldrich, Česko), GelRed Nucleic Acid Stain (PHENIX research, USA), QIAquick PCR (Qiagen, Nemecko)

5.2 Biologický materiál

Použité enzýmy: Taq DNA polymeráza pripravená Lenkou Dzurovou (Šmehliová 2004), komerčný enzým Go Taq Polymeráza (Promega, USA)

Semená *Arabidopsis thaliana*: knock-outované línie *Arabidopsis thaliana*, dodané z European Arabidopsis stock center (UK; línie SALK, SAIL, GK), z Institut Jean Pierre Bourgin (Versailles Arabidopsis Stock center, Francúzsko; línia FLAG) a z New Spring Cold Harbor Lab (línia ET7718)

Sekvence použitéch primerov:

Primery	Sekvencia
Gén pre aktín	
ARAact_fw	GCCATCCAAGCTGTTCTCTC
ARAact_rev	GGTGGTGCAACGACCTTAAT
Línie s umlčanými NPP	
SALK_089106_LP	GCCTAGTAACGAAATCCCGAG
SALK_089106_RP	ATCAAATTTGAAGGCGATTTG
SALK_040308C_LP	TCTTGATTCTCGAATTCGACG
SALK_040308C_RP	TATAGTCCGGTGCTAGCGATG
SALK_024541_LP	TCTTGATTCTCGAATTCGACG
SALK_024541_RP	AGCTCAGGGAAAGTAGCCAAC
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGG

SAIL_694_C05_LP	ACGTCGAATTCGAGAATCAAG
SAIL_694_C05_RP	TGTGTGATTGTCGAGAAGTGCAAC
FLAG_390C03_LP	TGATCAAAATGGCTCAAGACC
FLAG_390C03_RP	TTTTTCACAAACTGCCATAACG
Ds3-2	CGATTACCGTATTTATCCCGTTC
Ds3-4	CCGTCCCGCAAGTTAAATATG
At4g29700_2_fw	GTCACCACGAAAGGATCGGA
At4g29700_2_rev	AGCCTGGCCAAAAGTAGGTC
GK_078G06_LP	GCATCGGGTTCAACATCTTCC
GK_078G06_RP	CCTCCATCATCGCAGGTACT
GK_078G06_NPP_LP	CACTGGGCTAGGCCCATAAA
GK_078G06_NPP_RP	GCTGGGTATAGACCTGTGACG
pDAP101_LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
pDAP101_LB3	TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC
pAC161_o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC
LB4	-
ET7718_LP	-
ET7718_RP	-

5.3 Prístroje

Centrifuga stolná (Eppendorf, ČR)

Digestor (Forlab, ČR)

Flowbox

Termocykler T-personal (Biometra, Nemecko)

Termocykler T-gradient (Biometra, Nemecko)

guľový mlynček

elektroforéza

5.4 Zloženie roztokov

TAE tlmivý roztok – 70 mM Tris/kyselina octová, 1 mM EDTA, pH 8

1/2 MSO médium - 2,3 g MS basal salt mix, 10 g agaru na rastliny, 30 g sacharózy, doplnené destilovanou vodou na objem 1 l, po autoklavovaní 1 ml 1000x roztok Gamborgových B-5 vitamínov

Lyzačný roztok – 2,92 g NaCl, 1,202 g Tris, 0,501 g hydrogensiričitanu sodného, 1,88 g EDTA, 0,1g kyseliny askorbovej, 100 µl merkaptoetanolu doplniť destilovanou vodou na objem 100 ml

G-DNA Extrakčný tlmivý roztok pre izoláciu genomickej DNA – 1 M Tris HCl, 0,5 M EDTA, 4 M NaCl, 10% dodecylsírán sodný (SDS)

6. Metódy:

6.1 Sterilizácia semiačok

Do 1,5 ml mikroskúmavky sa nasypalo požadované množstvo semien. Pridal sa 1 ml 70% EtOH a takto sa pretrepávali po dobu 3 min. Semená sa pomocou centrifúgy nechali zosadnúť na dno mikroskúmavky a etanol sa odpipetoval. Následne sa pridala 1 ml roztoku 5% NaClO + 0,1% Triton X-100 a pretrepávalo sa ďalšie 3 min. Opäť sa nechali semiačka pomocou centrifúgy zosadnúť na dno mikroskúmavky a roztok sa odpipetoval. V ďalších krokoch sa semiačka premývali už len čistou sterilizovanou vodou 5-6 krát.

6.2 Selekcia transgenných rastlín

Sterilizované semená SALK_040308C, FLAG_390C03 a ET7718 boli selektované na médiu obsahujúcom antibiotikum kanamycin. Pre kontrolu klíčivosti sa vysadili mutantné línie aj na médiu bez antibiotika. Ako kontrola účinnosti antibiotika slúžili WT rastliny na médiu s kanamycinom. Petriho misky sa ponechali vo fytotrone a po dvoch týždňoch sa spomedzi WT rastlín vyberali transgenné rastliny, ktoré sa zasadili do hliny. Ako kontrola sa popri transgenných rastlín vysadili aj WT. Rastlinky boli takto pestované v skleníku pri 30°C. Ostatné línie rastlín s umlčenými génmi pre NPP boli vysadené rovno do hliny a pestované pri rovnakých podmienkach.

6.3 Izolácia genomickej DNA

6.3.1 Postup č. 1

Najskôr bola použitá metóda so systémom MagMax. Vzorky rastlín *Arabidopsis thaliana* boli homogenizované v guľovom mlynčeku. Lyzačný tlmivý roztok bol pridaný ku

zhomogenizovanému materiálu. Vzorky boli inkubované po 45 min pri teplote 65°C. Do 100 µl lyzátu bolo pridaných 2,5 µl magnetických guličiek a 70 µl 100% isopropyl alkoholu. Vzorky sa nechali inkubovať 5 min a následne boli na ďalších päť min postavené na magnetický stojan. Po 5 min sa na stenách vytvoril prstenec z magnetických guličiek. Supernatant bol odpipetovaný a guličky premyté minimálne trikrát v 200 µl 70% EtOH. Nakoniec bol etanol kompletne odpipetovaný a magnetické guličky sa ponechali 20 min na stojane vyschnúť. Do každého vzorku sa pridalo 40 µl RNase-free sterilnej vody a do doby ďalšieho používania sa nechali zamraziť na -20°C

6.3.2 Postup č. 2

Pre lacnejšie spracovanie veľkého množstva vzorkov sa prešlo na nový postup.

Do safe-lock mikroskúmavky sa vložila jedna wolframova gulička. Pinzetou sa vložili 2-4 lístky *Arabidopsis thaliana* a pridalo sa 420 µl gDNA Extrakčného tlmivého roztoku a 160 µl CIA (Chloroform isoamylalkohol 24:1). Mikroskúmavky sa vložili do guľového mlynčeka a nechali trepať (25 rps, 1,5 min), zmenila sa orientácia a postup sa opakoval. Následne sa mikroskúmavky ponechali na centrifuge 3 min pri 21 000 g. Vrchná fáza obsahujúca supernatant s DNA sa prepipetovala do bežnej mikroskúmavky. Po pridaní 900 µl 96% EtOH sa prevrátením mikroskúmviek obsah premiešal a pre zvýšenie účinnosti izolácie gDNA ponechal v mraze. Po 5-10 min sa vzorky opäť zcentrifugovali pri 21 000 g po dobu 7 min. Celý obsah sa vylial a zbytok odstránil pipetou. Po rozpustení usadeniny v 200 µl TE sa pridalo 50 µl CIA a po premiešaní pomocou prevrátenia sa vzorky opäť nechali na centrifúge pri 21 000 g po 2 minuty. Vrchná fáza sa prepipetovala do novej mikroskúmavky, ktorá už obsahovala 10 µl 4 M NaOH a pridalo sa 380 µl 96% EtOH. Premiešali sa prevrátením a ponechaním na centrifuge pri rovnakých otáčkach 5-10 min. Supernatant sa úplne odstránil a zrazenina na stenách sa premyla 100 µl 70% EtOH. Posledná centrifugácia prebehla pri rovnakých otáčkach 1-3 min. Obsah sa opäť celý odstránil a DNA pelet na stenách nechal vysušiť. Po odparení všetkého EtOH, sa zrazenina DNA rozpustila podľa potreby v 30 µl alebo 60 µl TE a vzorky nechali do doby ďalšieho používania zamraziť na -20 °C

6.4 Polymerázová reťazová reakcia

Optimalizácia PCR metódy a genotypizácia rastlín *Arabidopsis thaliana* sa uskutočnila za použitia Taq DNA polymerázy pripravenej Lenkou Dzurovou (Šmehliová 2004), prípadne komerčnej GoTaq Polymerázy.

Typické nastavenie PCR je uvedené v *Tab.3* a typické zloženie reakcií v *Tab. 4*

a Tab. 5. Jednotlivé zmeny v nastaveniach alebo podmienkach budú uvedené pri jednotlivých reakciách.

Tab. 3 Reakčné podmienky PCR na optimalizáciu a genotypizáciu rastlín *Arabidopsis thaliana*

Jednotlivé cykly	T (°C)	t (min)	Počet cyklov
Začiatková denaturácia	95	3/2 min*	1
Denaturácia	95	30 s	35
Nasadnutie primerov	optimalizované	30 s	
Elongácia	72	2 min-WT; 1min -KO	
Záverečná elongácia	72	10/5 min*	1
Ochladenie	16	1 s	1

*V prípade použitia Taq DNA polymerázy trvala denaturácia 3 minúty a záverečná elongácia bola 10 min, v prípade použitia Go Taq polymerázy trvala denaturácia 2 min a záverečná elongácia trvala 5 min.

Tab. 4 Zloženie reakčnej zmesi na optimalizáciu a genotypizáciu rastlín *Arabidopsis thaliana* za použitia DNA polymerázy

Zloženie premixu	Koncentrácia	Objem(μl)	Výsledná koncentrácia
Taq Polymeraza	-	0,15	-
Tlmivý roztok	10x	1,00	1x
dNTP	10 μM	0,20	0,2 μM
Mix primerov	10 μM	optimalizované	0,1 μM – 0,6 μM
Templát (gDNA)	-	2,00	-
H ₂ O		doplnené do objemu 10	
Σ		10,00	

Tab. 5 Zloženie reakčnej zmesi PCR na optimalizáciu a genotypizáciu rastlín *Arabidopsis thaliana* za použitia komerčného enzýmu GoTaq

Zloženie premixu	Koncentrácia	Objem(μl)	Výsledná koncentrácia
GoTaq Polymeraza		0,05	
Tlmivý roztok- Green Go Tag			
FlexiBuffer	5x	2,00	1x
MgCl ₂	25mM	1,00	
dNTP	10 μM	2,00	2

<i>R</i> -primery	10 µM	optimalizované	0,1 µM – 0,6 µM
<i>L</i> -primery	10 µM	optimalizované	0,1 µM – 0,6 µM
Templát (gDNA)	-	1,00	-
H ₂ O	doplnené do objemu 10		
Σ	10,00		

6.5 Nested PCR

Nested PCR ako modifikácia bežnej PCR, ktorá zabezpečuje mnohonásobnejšiu špecifitu amplifikácie daných úsekov, bola použitá pri línii ET7718, u ktorej sa nepodarilo optimalizovať podmienky. Typické nastavenie PCR je uvedené v *Tab. 3* a zloženie reakčnej zmesi sa nachádza v *Tab.6*. Prvá reakcia prebiehala za použitia vonkajších primerov, po ktorej sa prečistená DNA pomocou kitu QIAquick PCR Purification Kit, použila ako templát pre druhú reakciu, za použitia vnútorných primerov.

Tab.6 Zloženie reakčnej zmesi pre reakciu Nested PCR. Zloženie reakčnej zmesi druhej reakcie Nested PCR sa líšilo v objeme templátu, ktorý predstavoval 0,5 µl.

Zloženie premixu	Koncentrácia	Objem(µl)	Výsledná koncentrácia
<i>GoTaq Polymeraza</i>	-	0,1	-
<i>Tlmivý roztok- Green Go Tag</i>			
<i>FlexiBuffer</i>	5x	5,00	
<i>MgCl₂</i>	25mM	1,50	1,5 mM
<i>dNTP</i>	10 µM	0,50	0,2 µM
<i>Mix-primery(vonkajšie/vnútorné)</i>	10 µM	2,00	0,8 µM
Templát (gDNA)	-	5,00	-
H ₂ O		10,90	
Σ		25,00	

6.6 Prečisťovanie DNA

Na prečisťovanie DNA medzi prvým a druhým krokom nested PCR bol použitý kit QIAquick PCR. Templát z prvej reakcie sa prepipetoval do mikroskúmavky. Pridal sa 5x objem PB tlmivého roztoku a celý objem sa prepipetoval do QIAquick mikroskúmaviek na naviazanie DNA. Tie sa centrifugovali pri 17 900 g po dobu 1 minuty. Prefiltrovaný roztok sa vylial a pridalo sa 750 µl PE tlmivého roztoku. Po následnej centrifugácii pri 17 900 g po

dobu 1 minúty sa roztok znovu vylial a QIAquick mikroskúmavky sa opätovne centrifugovali po dobu 1 minúty, z dôvodu úplného odstránenia PE tlmivého roztoku. QIAquick mikroskúmavky sa tak preložili do čistej mikroskúmavky a pridalo sa 50 µl EB tlmivého roztoku. Po 1 minúte státia a 1 minúte na centrifuge pri 17 900 g, sa takto prečistená DNA použila na druhú reakciu nested PCR.

6.7 Elektroforéza v agarózovom geli

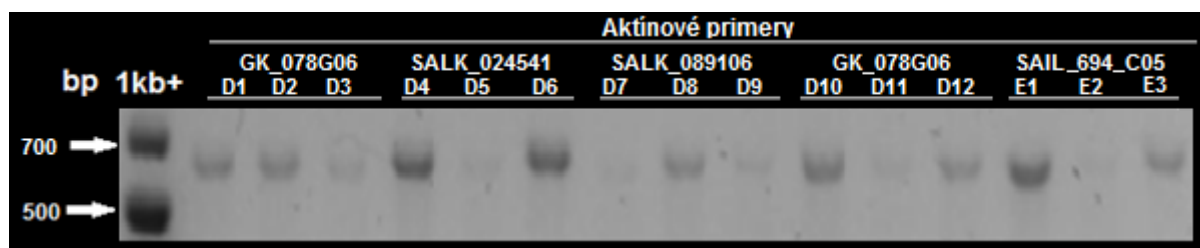
Na kontrolu úsekov vytvorených behom PCR sa použila elektroforéza v agarózovom geli. Amplikony boli vizualizované pomocou farbiva GelRed alebo pomocou ethidium bromidu a ich veľkosti stanovené porovnaním s hmotnostným štandardom o definovanej veľkosti jednotlivých fragmentov. (1 kb Plus „DNA Ladder“; DNA rebrík)

Na gel bola použitá 1% agaróza zmiešaná v 1x TAE tlmivom roztoku s farbivom. Elektroforéza bežala od 20 do 30 minút pri napätí 120 V.

7. Výsledky a diskusia

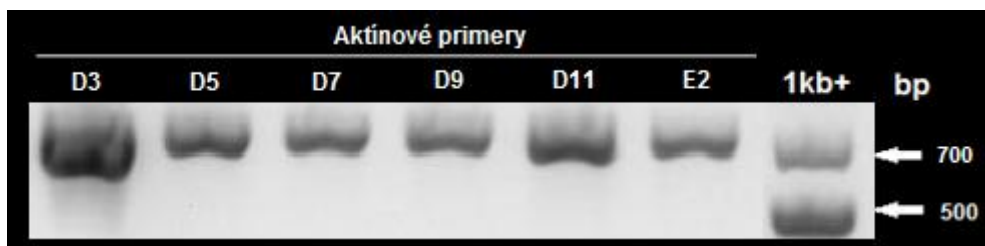
Začiatocné experimenty sa uskutočnili pomocou PCR za použitia Taq DNA polymerázy pripravenej Lenkou Dzurovou (Šmešliová 2004). Po určitom čase sme zistili, že výsledky nie sú reprodukovateľné, vzhľadom k čomu sa zvolila nová metóda za použitia komerčnej GoTaq Polymerázy.

Najskôr bola u všetkých vzorkách potvrdená prítomnosť vyizolovanej gDNA amplifikáciou génu pre aktín. Zmena v nastavení PCR podmienok nastala v počte cyklov, ktorý bol znížený na 30. Podľa intenzity signálu v elektroforéze bola pri jednotlivých vzorkách zvýšená alebo znížená koncentrácia DNA oproti bežnému zloženiu reakčnej zmesi PCR, pomocou čoho sa upravili jednotlivé koncentrácie DNA na približne rovnakú hodnotu. Príklad amplifikácie génu pre aktín s následným zvýšením koncentrácie je uvedený na *Obr. 6* a *Obr. 7*.



Obr.6 PCR reakcia na overenie prítomnosti vyizolovanej gDNA amplifikáciou génu pre aktín u vybraných línií. Dĺžka amplikonu, činiaca približne 610 bp odpovedala aktínovému génu. Pri

vzorkách D3, D5, D7, D9, D11 a E2, u ktorých nenastala dostatočná amplifikácia, sa reakcia opakovala.



Obr.7 Príklad opakovanej PCR reakcie pre aktín u vybraných vzoriek. Objem templátu sa podľa veľkosti signálu v prvej reakcii zvýšil z 2 μ l na 3-4 μ l, pri použití bežnej DNA Polymerázy.

Následne prebehla u všetkých líní optimalizácia podmienok PCR na WT alely a KO alely. Ako templát boli vybrané jedna až dve vzorky z línie. Genotypizácia prebehla u každej vzorky z línie s umlčaným génom.

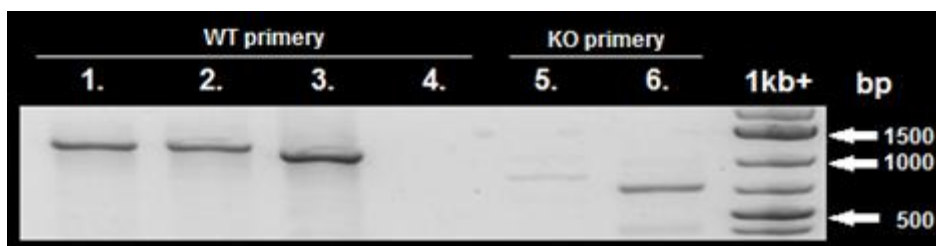
7.1 Optimalizácia podmienok pre PCR

7.1.1 Rôzne kombinácie primerov

Z dôvodu úplnej nefunkčnosti určitých primerov, prípadne ich nízkej účinnosti v pôvodnom páre sa vytvorili nové kombinácie s primerami, u ktorých to bolo možné, vzhľadom na podobné miesto ich nasadnutia. (*Tab. 7, 8, 9*) Vybrané kombinácie sa používali pri ďalších optimalizáciách. (*Obr. 8, 9, 10*) Zmena reakčných podmienok oproti pôvodnému nastaveniu PCR, nastala u koncentrácii primerov, ktorá činila 2 μ M.

Tab. 7 Rôzne kombinácie primerov pre líniu SALK_024541 a SALK_040308C

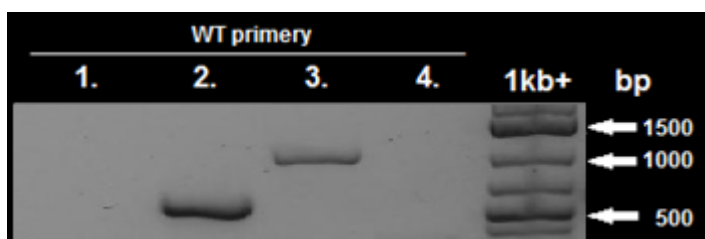
Primery		Dĺžka
fw primery	rev primery	amplikonu
1. SALK_040308C_RP	SALK_040308C_LP	1121 kb
2. SALK_040308C_RP	SALK_024541_LP	1022 kb
3. SALK_024541_RP	SALK_040308C_LP	1022 kb
4. SALK_024541_RP	SALK_024541_LP	1022 kb
5. SALK_040308C_RP	LBb1	795 kb
6. SALK_024541_RP	LBb1	738 kb



Obr. 8 Vzorky 1. – 6. odpovedajú rôznym kombináciám primerov uvedených v Tab 7. PCR prevádzaná pomocou DNA polymerázy, kde teplota nasadenia primerov bola zvolená na 62°C. Pre ďalšie experimenty sa vybrala kombinácia č. 3: 02R+04L pre WT alelu a č. 6: 02R+LBb13 pre KO alelu.

Tab. 8 Rôzne kombinácie primerov pre líniu SAIL_694_C05 a GK_NPP

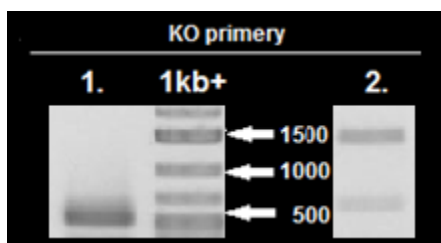
Primery		Dĺžka
fw primery	rev primery	amplikonu
1. SAIL_694_C05_RP	SAIL_694_C05_LP	936 kb
2. SAIL_694_C05_RP	GK_NPP_LP	520 kb
3. GK_NPP_RP	GK_NPP_LP	912 kb
4. GK_NPP_RP	SAIL_694_C05_LP	1328 kb



Obr. 9 Vzorky 1. – 4. odpovedajú rôznym kombináciám primerov uvedených v Tab. 8. PCR prevádzaná pomocou GoTaq, teplota nasadenia primerov bola zvolená na 60°C. Pre ďalšie experimenty sa z dôvodu nefunkčnosti primeru SAIL_694_C05_LP vybrala kombinácia č. 2: 05-R + GK_NPP-L pre líniu SAIL_694_C05.

Tab. 9 Rôzne kombinácie primerov pre líniu SAIL 05

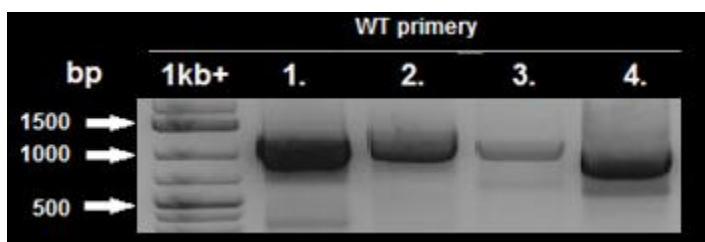
Primery		Dĺžka
fw primery	rev primery	amplikonu
1. SAIL_694_C05_RP	pDAP1	528 kb
2. GK_NPP_RP	pDAP1	826 kb
3. SAIL_694_C05_RP	pDAP3	–
4. GK_NPP_RP	pDAP3	–



Obr. 10 Vzorky 1. a 2. odpovedajú rôznym kombináciám primerov uvedených v Tab. 9. PCR prevádzaná pomocou GoTaq, teplota nasadenia primerov bola zvolená na 60°C. Nakoľko neprebehla žiadna amplifikácia pri použití rev primeru pDAP3 a kombinácia číslo dva neodpovedala veľkosti amplikonu vybrala sa pre ďalšie experimenty kombinácia č.1 05-R + pDAP1.

Tab. 10 Rôzne kombinácie primerov pre líniu FLAG a ET7718

Primery		Dĺžka
fw primery	rev primery	amplikonu
1. 700 fw	700 rev	1266 kb
2. 700 fw	FLAG_LP	1374 kb
3. FLAG_RP	FLAG_LP	1201 kb
4. FLAG_RP	700 rev	1093 kb

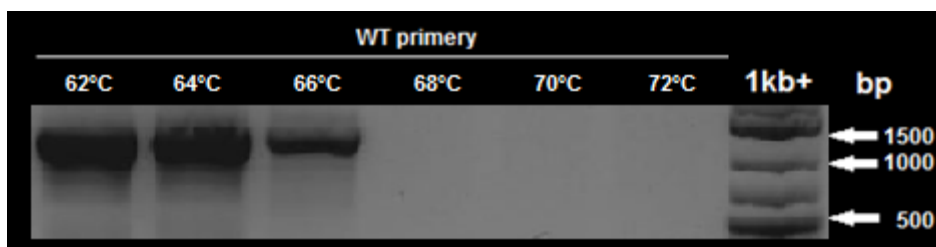


Obr. 11 Vzorky 1. – 4. odpovedajú rôznym kombináciám primerov uvedených v Tab. 10. PCR prevádzaná pomocou GoTaq, teplota nasadenia primerov bola zvolená na 60°C. Pre ďalšie experimenty sa vybrali koncentrácie 1: 700 fw + 700 rev, 2: 700 fw + FLAG_LP a 3: FLAG_RP + FLAG_LP.

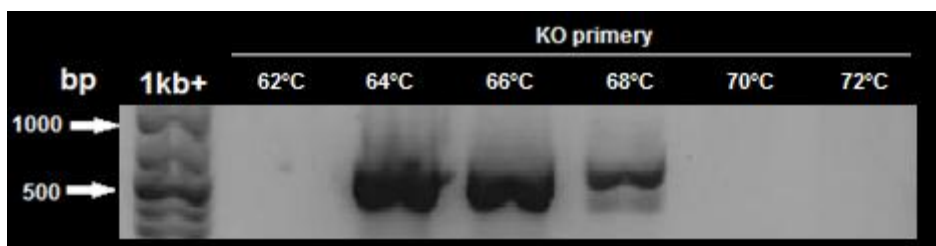
7.1.2 Optimalizácia pomocou gradientu teploty

U línii SALK_089106, FLAG_390C03 a ET7718, ktoré vykazovali rôzne anomálie, ako nešpecifické amplifikácie, bola optimalizovaná teplota nasadenia primerov pomocou gradientu teploty v rozsahu 56°C – 72°C., Najnižšia teplota sa volila na základe T_m teploty jednotlivých primerov, zatiaľ čo najvyššia bola zvolená tak, aby nenastala žiadna amplifikácia.

U línii FLAG_390C03 bola teplota stanovená na 66°C, u línii SALK_089106 na 58°C. U línii ET7718 nenastala opakovane žiadna amplifikácia. Príklad gradientu teploty je uvedený na línii FLAG_390C03 na Obr. 12 a Obr. 13.



Obr. 12 Gradient teploty línii FLAG_390C03 pre WT alelu. PCR prevádzaná pomocou GoTaq. Pre ďalšie experimenty bola zvolená teplota nasadenia WT primerov na 66°C.



Obr. 13 Gradient teploty línii FLAG_390C03 pre KO alelu. PCR prevádzaná pomocou GoTaq. Pre ďalšie experimenty bola zvolená teplota nasadenia KO primerov na 66°C.

7.1.3 Rôzne koncentrácie Mg^{2+} iónov

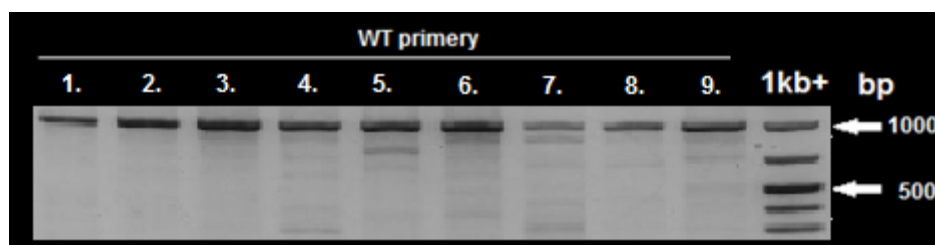
Pri línii SALK_089106, pri ktorej sa nedarilo reprodukovať výsledky a pri línii ET7718, pri ktorej sa nepodarilo optimalizovať podmienky, sa pristúpilo aj na optimalizáciu koncentrácie Mg^{2+} iónov, ktorá dosahovala hodnôt od 1 mM do 3,5 mM. Výsledky potvrdili zaužívanú koncentráciu Mg^{2+} iónov, a to 2 mM u línii SALK_089106. U línii ET7718 nenastala žiadna amplifikácia.

7.1.4 Rôzne koncentrácie primerov

Po overení funkčnosti primerov, poprípade nájdení ich výhodnejších kombinácií a teploty ich nasadenia sa optimalizovali ich jednotlivé koncentrácie. Optimalizácia sa uskutočnila pomocou všetkých kombinácií troch až štyroch rôznych koncentrácií primerov, ktoré dosahovali hodnôt od 0,1 μ M do 0,6 μ M. V prvom kroku sa urobila PCR s menším množstvom reakcií, čiže s väčšími rozstupmi medzi koncentraciami. Pri neuspokojivých výsledkoch bola následne urobená PCR s menšími rozstupmi. Vybrali sa tie kombinácie, ktoré nevykazovali nešpecifické amplifikácie a signál bol dostatočne silný. Výsledky jednotlivých reakcií sa nachádzajú v Tab. 12 a Tab. 13. Príklad optimalizácie koncentrácií primerov je uvedený v Tab. 11 a na Obr. 14.

Tab. 11 Príklad rôznych kombinácií koncentrácií primerov uvedený na línii GK_078G06

Línia GK_078G06	Rôzne kombinácie koncentrácií primerov (μM)								
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
<i>GK_078G06_NPP_LP</i>	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,6
<i>GK_078G06_NPP_RP</i>	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6



Obr.14 Príklad optimalizácie koncentrácií primerov uvedený na línii GK_078G06. Jednotlivé vzorky predstavujú rôzne kombinácie primerov *GK_078G06_NPP_LP* a *GK_078G06_NPP_RP* uvedených v Tab. 11 Ako výsledná kombinácia sa vybrala kombinácia číslo 3.

Tab. 12 Optimalizácia primerov na WT alelu. U WT primerov na línii SALK_024541 a SALK_040308C bola použitá DNA Polymeráza, u ostatných línii GoTaq.

Línia	Primery na WT alelu				Teplota nasadenia primerov ($^{\circ}\text{C}$)
	primer fw	c (μM)	primer rev	c (μM)	
<i>SALK_024541</i>	SALK_040308C_LP	0,4	SALK_024541_RP	0,3	62
<i>SALK_04030C</i>	SALK_040308C_LP	0,4	SALK_024541_RP	0,3	62
<i>SALK_089106</i>	SALK_089106_LP	0,1	SALK_089106_RP	0,5	60
<i>SAIL_694_C05</i>	GK_NPP L	0,5	SAIL_694_C05_RP	0,1	60
<i>FLAG_390C03</i>	FLAG_390C03_LP	0,5	fw700	0,3	66
<i>ET7718</i>	FLAG_390C03_LP	0,5	fw700	0,3	60
<i>GK</i>	GK L	0,1	GK R	0,1	60
<i>GK_NPP</i>	GK_NPP L	0,6	GK_NPP R	0,4	60

Tab. 13 Optimalizácia primerov na KO alelu. U KO primerov na línii SALK_024541 a SALK_040308C bola použitá DNA Polymeráza, u ostatných línii GoTaq.

Línia	Primery na KO alelu				Teplota nasadenia primerov ($^{\circ}\text{C}$)
	primer fw	c (μM)	primer rev	c (μM)	
<i>SALK_024541</i>	SALK_024541_RP	0,3	LBb1.3	0,3	62
<i>SALK_040308C</i>	SALK_024541_RP	0,3	LBb1.3	0,3	62
<i>SALK_089106</i>	SALK_089106_RP	0,3	LBb1.3	0,5	58
<i>SAIL_694_C05</i>	05R	0,4	pDAP1	0,4	60
<i>FLAG_390C03</i>	fw700	0,5	LB4	0,4	60

GK	GK R	0,5	pAC	0,3	60
GK-NPP	GK_NPP R	0,1	pAC	0,5	60

U línii ET7718 sa nepodarilo odstrániť množstvo nešpecifických amplifikácií, ktoré vznikali pri KO primeroch, ani po znížení počtu cyklov a znížení koncentrácie DNA.

7.1.5 Nested PCR

Z dôvodu značných komplikácií bola použitá u jedinej línii ET7718 metóda nested PCR, pomocou ktorej sa odsraňujú nešpecifické amplifikácie. Ako vonkajšie primery bol použitý pár Ds3-4 s fw700 a ako vnútorné primery bol použitý pár Ds3-2 s FLAG_390C03_RP. Napriek zvýšenej citlivosti metódy nenastala žiadna amplifikácia.

7.2 Genotypizácia rastlín s knock-outovaným génom

Po optimalizovaní podmienok sa podrobili genotypizácii všetky 3 vysadené rastliny z každej línii, ako kontrola boli použité 3 rastliny „divokého typu“. U línii GK_078G06 bolo vysadených viacero rastlín z dôvodu knock-outovaného génu izoenzýmu NPP na druhom chromozóme, pre ktorý sa používali rev primery GK_078G06_RP a pre knock-outovaný gén nami študovaného izoenzýmu na štvrtom chromozóme sa používali rev primery GK_078G06_NPP_RP.

Pri línii SALK_024541 a SALK_089106 boli dve vzorky určené ako WT a jedna ako heterozygot. Pri línii SALK_040308C boli všetky tri vzorky stanovené ako homozygoti, no nakoľko boli výsledky ťažko reprodukovateľné, museli sa vysadiť nové vzorky danej línii, pri ktorých sa homozygotnosť rastlín definitívne potvrdila. Anomálie vykazovala aj línia FLAG_390C0, u ktorej sa rovnako vysádzovali nové vzorky. Následne bol u vzoriek potvrdený jeden homozygot a 6 heterozygotov. Heterozygotnosť bola potvrdená u všetkých vzorkách línie SAIL_694_C05. U línii GK_078G06 bolo potvrdených 5 heterozygotov nami študovaný izoenzým NPP.

Línia ET7718 predsavovala najväčšie obtiaže, ktoré sa nepodarilo prekonať. Buď vykazovala v reakciách nešpecifické amplifikácie alebo v reakcii neprebehla žiadna amplifikácia. Genotypizácia tak nebola u knock-outovaných línii možná.

8. Záver

V teoretickej časti bola vypracovaná rešerše na téma genetické modifikácie organizmov s dôrazom na transgenózu rastlín a modelovú rastlinu *Arabidopsis thaliana*. Rešerše zahrňovala aj metódy genetických modifikácií a biochemické metódy ako PCR. Podstatná časť teoretickej časti bola venovaná nukleotid pyrofosfatázam/fosfodiesterázam so zameraním na rastlinné NPP a mechanizmus ich katalýzy.

V praktickej časti bola optimalizovaná metóda PCR na charakterizáciu rastlín *Arabidopsis thaliana* s umlčanými génmi pre nukleotid pyrofosfatázu/fosfodiesterázu. Línie rastlín s umlčaným génom boli: SALK_024541, SALK_04030C, SALK_089106, SAIL_694_C05, ET7718, FLAG_390C03 a GK_078G06.

Úspešne optimalizovať podmienky sa podarilo u všetkých línií okrem ET7718. Ostatné línie podstúpili genotypizáciu jednotlivých rastlín. U línií SALK_040308C bola potvrdená homozygotnosť línie. Jedného homozygota sa podarilo charakterizovať aj u línií FLAG_390C03. Ostatné kvietky boli charakterizované ako heterozygoti prípadne ako „divoké typy“

Selektované homozygotné rastliny s umlčaným génom pre nukleotid pyrofosfatázu/fosfodiesterázu umožnia štúdium daného enzýmu. Potomstvo z heterozygotných rastlín rovnako podstúpi genotypizáciu bez potreby optimalizácií podmienok. Tieto rastliny budú rovnako vybrané na štúdium daného enzýmu.

9. Zoznam použitých skratiek

2,4-D - 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina	ONPP - NPP z plodu opuncie
ADP - Adenozíndifosfát	PAP - „purple acid“ fosfatázy
ADP-glc - ADP-glukóza	PCR - polymerázová reťazová reakcia
Ala - alanin	Phe - Fenyylalanin
AMP - Adenozínmonofosfát	Pi - anorganický Fosfát
ApnA - diadenosin n-fosfát	pNP-TMP - p-nitrofenyl-thymidin-monofosfát
Asn - asparagin	pNPPC - p-nitrofenylfosforylcholin
Asp - Kyselina asparagová	PPi - anorganický Pyrofosfát
ATP - Adenozíntrifosfát	rDNA - rekombinantná DNA
bp - párov báz	rev primer - spätný primer
cDNA - komplementárna DNA	Ser - serin
dNTP - 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfát	SPC - sfingosylfosforylcholin
dsDNA - dvojreťazcová DNA	ssDNA - jednoreťazcová DNA
DTT - dithiothreitol	TaNPP - NPP z pšenice
EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová	Thr - threonin
ELNPP - NPP z latexu mliečnika	T _m - teplota nasadenia primerov
ER - endoplazmatické retikulum	UDP - uridindifosfát
EST - expressed sequence tag	WT - divoký typ
EtOH - Etanol	
FAD - Flavinadenindinukleotid	
FMN - Flavinmononukleotid	
fw primer - priamy primer	
Glu - kyselina glutamová	
GM - geneticky modifikované	
GMO - geneticky modifikované organizmy	
GPC - glycerofosforylcholin	
His - histidin	
LPC - lysofosfatidilcholin	
LPE - lysofosfatidylethanolamin	
LPS - lysofosfatidylserin	
Lys - lysin	
m7GMP - 7-metyl-guanosin-5'-monofosfat	
mRNA - mediátorová RNA	
NaClO - Chlórnan sodný	
NAD - nikotinamidadenindinukleotid	
NADH - nikotinamidadenindinukleotid redukovaná forma	
NADP - Nikotinamidadenindinukleotidfosfát	
NADPH - Nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaná forma	
NMN - nikotinamid mononukleotidu (NMN)	
NPP - nukleotid pyrofosfatázy/fosfodiesterázy	

10. Literatúra

- Agudo A., Ribeiro J. M., Canales J., Cameselle J. C. (1998) Use of Potato Tuber Nucleotide Pyrophosphatase to Synthesize Adenosine 5*-Monophosphate Methyl Ester: Evidence That the Solvolytic Preferences of the Enzyme Are Regulated by pH and Temperature. *Biotechnol. Bioeng.* 59(1), 62-67
- Ahmad K. (2014) Molecular Farming: Strategies, Expression Systems and Bio-Safety Considerations. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 50(1), 1-10
- Al-Babili S., Beyer P. (2005) Golden Rice – five years on the road – five years to go? *Trends. Plant. Sci.* 10(12), 565-573.
- Balakrishnan C. V., Vaidyanathan C. S. a Rao N. A. (1977) Studies on Nucleotidases in Plants Isolation and Properties of the Monomeric Form of the Crystalline and Homogeneous Mung Bean Nucleotide Pyrophosphatase. *Eur. J. Biochem.* 78, 95-102
- Baroja-Fernández E., Munoz F. J., Zanduetta-Criado A., Moran-Zorzano M. T., Viale A. M., Alonso-Casajus N. a Pozueta-Romero J. (2004) Most of ADP-glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 13080-13085
- Bartkiewicz M., Sierakowska H. a Shugar D. (1984) Nucleotide pyrophosphatase from potato tubers Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 143, 419-426
- Belli S.I., Mercuri F.A., Sali A. a Goding J.W. (1995) Autophosphorylation of PC-1(alkaline phosphodiesterase-I nucleotide pyrophosphatase) and analysis of the active site. *Eur. J. Biochem.* 228, 669-676.
- Bergkessel M. a Guthrie C. (2013) Colony PCR. *Methods Enzymol.* 529, 299-309
- Bollen M., Gijssbers R., Ceulemans H., Stalmans W. a Stefan C. (2000) Nucleotide Pyrophosphatases/Phosphodiesterases on the Move. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35(6), 393-432
- Bossemeyer D. (1994) The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element. *Trends Biochem. Sci.* 19(5), 201-205
- Bourzac K. (2015) Microbes Engineered to Prevent Obesity [online], *MIT Technology Review*, prečítané 26.4. 2015, dostupné z: <http://www.technologyreview.com/news/536376/microbes-engineered-to-prevent-obesity/>
- Bowman J. L., Smyth D. R. a Meyerowitz E. M. (1989) Genes Directing Flower Development in Arabidopsis. *Plant Cell.* 1, 37-52
- Cai W., Gonsalves C., Tennant P., Fermin G., Souza M. J., Sarindu N., Jan F., Zhu H.-Y., Gonsalves D. (1999) A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 35(1), 61-69

- Cannon R. J. C. (2000) Bt Transgenic Crops: Risks and Benefits. *Integrated Pest Manag Rev.* 5(3), 151-173
- Chen R., (2012) Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. *Biotech. Adv.* 30, 1102-1107
- Christou P. (1992) Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J.* 2(3), 275-281
- Egan J. F., Maxwell B. D., Mortensen D. A., Ryan M. R. a Smith R. G. (2011) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)–resistant crops and the potential for evolution of 2,4-D–resistant weeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(11), E37
- Evans W. H., Hood D. O. a Gurd J. W. (1973) Purification and properties of a mouse liver plasma-membrane glycoprotein hydrolysing nucleotide pyrophosphate and phosphodiester bonds. *J Biol. Chem.* 135, 819-826
- Fischer R., Hoffmann K., Schillberg S., Emans N. (2000) Antibody production by molecular farming in plants. *J Biol Regul Homeost Agents* 14(2), 83-92
- Funke T., Han H., Healy-Fried M. L., Fischer M. a Schönbrunn E. (2006) Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(35), 13010-13015
- Gagat P., Bodył A. a Mackiewicz P. (2013) How protein targeting to primary plastids via the endomembrane system could have evolved? A new hypothesis based on phylogenetic studies. *Biol. Direct.* 8, 18
- Galli-Taliadoros L A., Sedgwick J. D., Wood S. A. a Körner H. (1995) Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods.* 181(1), 1-15
- Galuszka P. (2010) Transgenozne rostlin [online], *Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research*, přečítané 3. 3. 2015, dostupné z: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/cgi/4.pdf>
- Gaudet M., Fara A.G., Beritognolo I., Sabatti M. (2009) Allele-specific PCR in SNP genotyping. *Methods Mol. Biol.* 578, 415-424
- Geisse S., Gram H., Kleuser B. a Kocher H. P. (1996) Eukaryotic Expression Systems A Comparison. *Protein Express. Purif.* 8, 271-282
- Gijsbers R., Ceulemans H., Stalmans W., Bollen M. (2001) Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* 276(2), 1361-1368
- Gelvin S. B. (2003) *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(1), 16-37

- Harmey D., Hessle L., Narisawa S., Johnson K. A., Terkeltaub R. a Millán J. L.(2004) Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am. J. Pathol.* 164(4), 1199-1209.
- Jacobsen J. C., Bawden C. S., Rudiger S. R., McLaughlan C. J., Reid S. J., Waldvogel H. J., MacDonald M. E., Gusella J. F., Walker S. K., Kelly J. M., Webb G. C., Faull R. L. M., Mark I. Rees M. I. a Snell R. G. (2010) An ovine transgenic Huntington's disease model Human Molecular Genetics. *Hum. Mol. Genet.* 19(10), 1873-1882
- Johnston D. (2002) The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* 3(3), 176-188
- Jones L. (1999) Genetically modified foods. *BMJ.* 318(7183), 581-584
- Joye I. J., Beliën T., Brijs K., Soetaert W., Delcour J. A. (2011) Mutational analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase shows the role of six amino acids in the catalytic mechanism *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 173-180
- Joye I. J., Beliën T., Brijs K., Proost P., Soetaert W. a Delcour J. A. (2010) Characterisation of the first wheat (*Triticum aestivum* L.) nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase resembling mammalian counterparts. *J. Cereal Sci.* 51, 326-336
- Kaneko K., Inomata T., Masui T., Kosu T., Umezawa Y., Itoh K., Pozueta-Romero J. a Mitsui T. (2013) Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 Exerts a Negative Effect on Starch Accumulation and Growth in Rice Seedlings under High Temperature and CO₂ Concentration Conditions. *Plant Cell Physiol.* 55(2), 320-332
- Kastrinos A. (2014) Can GMO technology sustainably rescue threatened Florida oranges, tomatoes and papayas? [online] *Genetic Literacy Project*, prečítané 19. 3. 2015, dostupné z: <http://www.geneticliteracyproject.org/2014/12/08/can-gmo-technology-sustainably-rescue-threatened-florida-oranges-tomatoes-and-papayas/>
- Kato K., Nishimasu H., Mihara E., Ishitani R., Takagi J., Aokic J. a Nurekia O. (2012) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Enpp1*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68, 778-782
- Kawaguchi M., Okabe T., Okudaira S., Hanaoka K., Fujikawa Y., Terai T., Komatsu T., Kojima H., Aoki J. a Nagano T. (2011) Fluorescence Probe for Lysophospholipase C/NPP6 Activity and a Potent NPP6 Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 12021-12030
- Kennedy E. J., Pillus L., Ghosh G. (2005) Pho5p and Newly Identified Nucleotide Pyrophosphatases/ Phosphodiesterases Regulate Extracellular Nucleotide Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 4(11),1892-1901

- Ledford H. (2013) Transgenic salmon nears approval [online] *Nature*, prečítané 19.3.2015, dostupné z: <http://www.nature.com/news/transgenic-salmon-nears-approval-1.12903>
- Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M. (2002) Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 16(1), 47-51
- Meeteren L. A., Ruurs P., Christodoulou E., Goding J. W., Takakusa H., Kikuchi K., Perrakis A., Nagano T. a Moolenaar W. H. (2005) Inhibition of Autotaxin by Lysophosphatidic Acid and Sphingosine 1-Phosphate. *J. Biol. Chem.* 280(22), 21155-21161
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koorneef M. (1998) Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis. *Science.* 282(5389), 662-682
- Meyer R, Höfelein C., Lüthy J., Candrian U. (1995) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J. AOAC Int.* 78(6), 1542-1551
- Moe O. A. a Butler L. G. (1983) The catalytic mechanism of bovine intestinal 5'-nucleotide phosphodiesterase. pH and inhibition studies. *J. Biol. Chem.* 258(11), 6941-6946
- Nam S. W., Clair T., Kim Y. S., McMarlin A., Schiffmann E., Liotta L. A. a Stracke M. L. (2001) Autotaxin (NPP-2), a Metastasis-enhancing Motogen, Is an Angiogenic Factor. *Cancer Res.* 61(18), 6938-6944
- Nanjo Y., Oka H., Ikarashi N., Kaneko K., Kitajima A., Mitsui T., Munoz F. J., Rodríguez-López M., Baroja-Fernández E. a Pozueta-Romero J. (2006) Rice Plastidial N-Glycosylated Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Is Transported from the ER-Golgi to the Chloroplast through the Secretory Pathway. *Plant Cell.* 18, 2582–2592
- Neuhaus G. a Spangenberg G. (1990) Plant transformation by microinjection techniques. *Physiol. Plant.* 79, 213-217
- Ochman H., Gerber A. S., Hartl D. L. (1988) Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction. *Genetics.* 120(3), 621-623
- Pécsi I., Szabó J. E., Adams S. D., Simon I., Sellers J. R., Vértessy B. G a Tóth J. (2011) Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination. *PNAS.* 108(35), 14437-14442
- Perez M. (2006) Plant nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPPASE), Method of obtaining same and use of same in the production of assay devices and in the production of transgenic plants. United States. US Patent 2006/0242739 A1. 26.10.2006
- Petr J. (2010) Evropská komise schválila pěstování GM bramboru [online] *Osel*, prečítané 12. 2. 2015, dostupné z: <http://www.osel.cz/index.php?clanek=4918>
- Pintus F., Spano D., Bellelli A., Angelucci F., Floris G., Medda R. (2009) Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from Euphorbia characias latex: Purification and characterization *Plant Sci.* 177, 636–642

- Prelich G. (2012) Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. *Genetics*. 190, 841-854
- Pritchard J. B., French J. E., Davis B. J. a Haseman J. K. (2003) The role of transgenic mouse models in carcinogen identification. *Environ. Health. Perspect.* 111(4), 444-454.
- Rainieri S., Pretorius I. S. (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.* 50, 15-31
- Ramessar K., Capell T., Christou P. (2008) Molecular pharming in cereal crops. *Phytochem Rev.* 7, 579-592
- Rhee S. Y, Beavis W., Berardini T. Z, Chen G., Dixon D., Doyle A., Garcia-Hernandez M., Huala E., Lander G., Montoya M., Miller N., Mueller L. A., Mundodi S., Reiser L., Tacklind J., Weems D. C., Wu Y., Xu I., Yoo D., Yoon J. a Zhang P. (2003) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to *Arabidopsis* biology, research materials and community. *Nucleic Acids Res.* 31(1), 224–228.
- Rossi L., Salvestrini V., Ferrari D., Virgilio F. a Lemoli R. M. (2012) The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. *Blood* 120, 2365-2375
- Sakagami H., Aoki J., Natori Y., Nishikawa K., Kakehi Y., Natori Y. a Arai H. (2005) Biochemical and Molecular Characterization of a Novel Cholinespecific Glycerophosphodiester Phosphodiesterase Belonging to the Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Family. *J. Biol. Chem.* 280(24), 23084-23093
- Salvucci M. E. a Crafts-Brandner S. J. (1995) Purification and Properties of a Unique Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase I That Accumulates in Soybean Leaves in Response to Fruit Removal. *Plant Physiol.* 108, 1269-1276
- Schwartz J. H., Lipmann F. a Crestfield A. M. (1963) Amino acid sequence of a tetradecapeptide containing reactive serine in *E. coli* alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 49(5), 722-729
- Schwede T., Kopp J., Guex N. a Peitsch M. C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381-3385
- Sharif Y. a Saba Irshad (2012) Animal models for human genetic diseases. *Afr. J. Biotechnol.* 11(86), 15200-15205
- Sjögren K. (2014) Biofuel breakthrough: scientists use GMO yeast to produce fuel [online], *ScienceNordic*, prečítané 26.4. 2015, dostupné z: <http://sciencenordic.com/biofuel-breakthrough-scientists-use-gmo-yeast-produce-fuel>
- Somma M., Querci M. (2006) The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms - The Polymerase Chain Reaction (PCR) [online], World Health

- Organization, přečítané 26. 4. 2015, dostupné z: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20EN/Session06.pdf>
- Spanò D., Pintus F., Pes R., Medda R. a Floris G. (2011) Purification and characterisation of a soluble nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruits. *Food Res. Int.* 44, 2264-2270
- Stracke M. L., Krutzsch H. C., Unsworth E. J., Arestad A., Cioce V., Schiffmann E. a Liotta L. A. (1992) Identification, Purification, and Partial Sequence Analysis of Autotaxin, a Novel Motility-stimulating Protein. *J. Biol. Chem.* 267(4), 2524-2529
- Šmarda Jan a kol. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant. *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815
- Tsong T. Y. (1991) Electroporation of cell membranes. *Biophys J.* 60(2), 297-306
- Tuch B. E. (2006) Stem cells – a clinical update. *Aust. Fam. Physician.* 35(9), 719-721
- Tzfirai T. a Citovsky V. (2006) Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 147-154
- Wolf E., Braun-Reichhart C., Streckel E., Renner S. (2014) Genetically engineered pig models for diabetes research. *Transgenic. Res.* 23(1), 27-38
- Wu H., McCormac A. C., Elliott M. C., Chen D-F. (1999) *Agrobacterium*-Mediated Stable Transformation of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric.* 36, 231-234
- Zalatan J. G., Fenn T. D., Brunger A. T. a Herschlag D. (2006) Structural and Functional Comparisons of Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase and Alkaline Phosphatase: Implications for Mechanism and Evolution. *Biochemistry.* 45, 9788-9803
- Zalatan J.G., Herschlag D. (2006) Alkaline phosphatase mono- and diesterase reactions: comparative transition state analysis. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1293-1303
- Zan-Kowalczevska M., Bretner M., Sierakowska H., Szczesnat E., Filipowicz W. a Shatkin A. J. (1977) Removal of 5'-terminal m7G from eukaryotic mRNAs by potato nucleotide pyrophosphatase and its effect on translation. *Nucleic Acids Res.* 4(9), 3065-3081
- Zimmermann H., Zebisch M a Sträter N. (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic signal.* 8, 437-502
- Zyga L. (2010) Scientists breed goats that produce spider silk [online] *PhysOrg*, přečítané 19. 3. 2015, dostupné z: <http://phys.org/news194539934.html>