UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Exprese a charakterizace předpokládané rostlinné adenosindeaminasy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Petr Dvořák
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Lenka Dzurová, Ph.D.
Rok:	2014

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

V Olomouci dne

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucí bakalářské práce RNDr. Lence Dzurové, Ph.D. za její čas, cenné rady, vstřícný přístup a odborné vedení bakalářské práce.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Renému Lenobelovi, Ph.D. za změření vzorků a diskusi výsledků, Mgr. Radimu Simerskému, Ph.D., Mgr. Jaromíru Kábrtovi a Mgr. Vendule Kajnarové za cenné rady a vstřícné jednání.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petr Dvořák
Název práce	Exprese a charakterizace předpokládané rostlinné adenosindeaminasy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	RNDr. Lenka Dzurová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	Adenosindeaminasy jsou enzymy, které byly nalezeny u prokaryot a některých druhů eukaryot (hmyz, nižší obratlovci, ryby, savci). Existují však pouze omezené informace o těchto enzymech v rostlinách. I když studium v genomových databázích <i>Arabidopsis thaliana</i> a dalších rostlin ukazují přítomnost domnělých genů, nebyly dosud odpovídající proteiny a ani jejich aktivita (deaminace adenosinu) prokázány. Tahle bakalářská práce navazuje na článek Pospíšilová et al., 2008, kde již byla popsána exprese a charakterizace genu At4g04880 z <i>Arabidopsis thaliana</i> kódující domnělou adenosindeaminasu. Výtěžek proteinu však po expresi a následné purifikaci byl velmi nízký. Proto byla experimentální část této práce zaměřena na zvýšení exprese adenosindeaminasy prostřednictvím nalezení optimálních podmínek exprese s následnou kvalitativní purifikací s nízkými ztrátami. Vyřešení těchto podmínek je nevyhnutelné pro získání adenosindeaminasy o vysoké čistotě pro její následnou krystalizaci.
Klíčová slova	Metabolismus nukleotidů, adenosindeaminasa, možnosti zvýšení exprese, expresní podmínky, purifikace proteinů, SUMO proteasa.
Počet stran	73
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Abstract

Autor's first name and surname	Petr Dvořák
Title	Expression and characterization of putative plant adenosine deaminase
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	RNDr. Lenka Dzurová, Ph.D.
The year of presentation	2014

Adenosine deaminases are enzymes which have been found in prokaryotes and in some eukaryotes (insects, lower vertebrates, fish, mammals), but there are just few reports about these enzymes in plants. The studies in the completed genome databases of *Arabidopsis thaliana* and other plants show the presence of putative genes, but there were not found corresponding proteins and also their activity (deamination of adenosine) was not demonstrated.

The aim of this research is connected very close with the article of Pospíšilová et al., 2008, where the expression and characterization of the gene At4g04880 from *Arabidopsis thaliana*, which codes a putative adenosine deaminase, was described. The experimental part of this thesis was focused on the increase of the adenosine deaminase expression due to previous very low expression yield. For this reason different possibilities were investigated to find the optimal conditions for expression, qualitative purification and decrease of the protein loss. The finding of these conditions is necessary for getting the pure protein, which will be used for the future crystallization.

Keywords	Metabolism of nucleotides, adenosine deaminase,
	possibility of increasing the expression, express
	conditions, protein purification, SUMO protease.
Number of pages	73

Number of appendices0LanguageCzech

OBSAH

OBSAH
Cíle práce
1 ÚVOD9
2 TEORETICKÁ ČÁST10
2.1 Metabolismus purinů a pyrimidinů u rostlin10
2.1.1 <i>De novo</i> biosyntéza12
2.1.1.1 <i>De novo</i> biosyntéza purinů12
2.1.1.2 <i>De novo</i> biosyntéza pyrimidinů14
2.1.2 Recyklace purinů a pyrimidinů16
2.1.2.1 Recyklace purinů16
2.1.2.2 Recyklace pyrimidinů17
2.1.3 Katabolismus purinů a pyrimidinů
2.1.3.1 Katabolismus purinů19
2.1.3.2 Katabolismus pyrimidinů
2.2 Adenosindeaminasy
2.2.1 Charakterizace adenosindeaminas
2.2.2 Substráty, aktivující látky a inhibitory adenosindeaminas24
2.2.3 Proteinová struktura skotu, myšší a dalších adenosindeaminas25
2.2.4 Porovnání lidské a rostlinné adenosindeaminasy
2.2.5 Předchozí provedené práce s rostlinnou ADA
2.3 Zvýšení exprese rekombinantních proteinů
2.3.1 Možnosti a obecné informace o expresi rekombinantních proteinů
2.3.2 Faktory ovlivňující rozpustnost a výtěžek exprese rekombinantního proteinu
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST
3.1 Materiál
3.1.1 Použité mikroorganizmy a plazmidové konstrukty
3.1.2 Přístrojové vybavení
3.1.3 Použitý materiál
3.2 Metody
3.2.1 Příprava zásobních roztoků, kultivačního LB média a agarových selekčních LB ploten
3.2.2 Inokulum <i>Escherichia coli</i> 40

3.2.3 Izolace plazmidové DNA	40
3.2.4 Restrikce plazmidové DNA	41
3.2.5 Elekroforetická separace izolované plazmidové DNA	42
3.2.6 Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction, PCR)	42
3.2.7 Transformace E.coli BL21 StarTM (DE3) tepelným šokem "Heat shock"	43
3.2.8 Kultivační a expresní podmínky	43
3.2.9 Lýze buněk E. coli BL21StarTM (DE3) pCIOX::At4g04880	44
3.2.10 Eletroforéza v polyakrylamidovém gelu s přítomností SDS (SDS-Page)	45
3.2.11 Obarvení gelu pomocí Coomassie Briliant Blue R-250	46
3.2.12 Purifikace pomocí Ni-NTA agarosy	46
3.2.13 Dialýza a zakoncetrování proteinu	47
3.2.14 Stanovení koncentrace rekombinantní adenosindeaminasy metodou BCA.	47
3.2.15 Příprava vzorků pro identifikaci proteinů pomocí LC-ESI-QTOF	48
3.2.16 Štěpení SUMO Tagu SUMO proteasou	50
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	52
4.1 Příprava konstruktu <i>pCIOX::At4g04880</i> pro následnou transformaci do <i>E.coli</i>	50
$BL21 \text{ StarTM} (DE3) \dots (1 - 1 - (-1))$	52
4.2 Optimalizace expression podminek	55
4.3 Purifikace rekombinantního proteinu His-SUMO-ADA	59
4.4 Identifikace jednotlivých proteinů pomocí LC-ESI-QTOF	60
4.5 Optimalizace štěpení rekombinantní ADA SUMO proteasou	63
5 ZÁVĚR	.64
6 LITERATURA	.65
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	.72

Cíle práce

- Literární rešerše na téma: metabolismu nukleotidů u rostlin se zaměřením na metabolismus purinů, enzym adenosindeaminasa akční v něm a možnosti zvýšení exprese proteinů.
- Optimalizace expresních podmínek pro gen At4g04880 z rostliny Arabidopsis thaliana, za účelem zvýšení výtěžku exprese.
- Získání čisté ADA vhodnou purifikační metodou.
- Optimalizace odštěpení SUMO Tagu z rekombinantní ADA.

1 ÚVOD

Nukleové báze, jakožto nezbytná součást nukleových kyselin, patří mezi nejdůležitější látky v organizmech. Jejich výskyt je velmi pestrý i mimo DNA a jejich metabolismus je velmi intenzivně studován. U vyšších rostlin dosud nebyly zcela objasněny všechny kroky metabolismu těchto látek. Stále se věnuje pozornost popisu a charakterizaci enzymů akčním v něm. Jedním z mála neprostudovaných enzymů u rostlin je právě adenosindeaminasa, která by měla být přítomna v takzvané recyklační dráze, kde by společně s adenindeaminasou mohly hrát významnou roli. Tyto enzymy se vyznačují specifickými rysy, které jsou společné pro celou skupinu enzymů jím podobných. Mnoho těchto enzymů z různých organizmů bylo získáno v rekombinantní podobě a byla u nich vyřešena jejich struktura. V odborných článcích však dosud nebyly nalezeny zprávy o kvantitativní expresi a následné purifikaci rostlinné adenosindeaminasy s úmyslem krystalizace tohoto proteinu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Metabolismus purinů a pyrimidinů u rostlin

Dusíkaté deriváty patří mezi jedny z nejdůležitějších látek obsažených v živých organizmech. Nejznámější deriváty jsou právě purinové (guanin, xantin, hypoxantin, guanin) a pyrimidinové báze (uracil a thymin), (Obr. 1), které zajišťují ukládání genetické informace v podobě molekul DNA v jádře buňky a dalších organelách, případně v jejích transkriptech mRNA a tRNA.

Nukleotidy patří také mezi základní prekurzory pro syntézu vitamínu B – riboflavinu, thiaminu a kyseliny listové (Hanson and Gregory, 2002; Herz et al., 2000). Jsou také součástí mnoha koenzymů (např. nikotinamidadenindinuklotid (NAD), flavinadenindinuklotid (FAD), S-adenosylmethionin (SAM) či acetylkoenzym A (acetyl-CoA). Velmi významnou roli v energetickém metabolismu všech organismů hraje adenosintrifosfát (ATP). Tato makroergní sloučenina představuje zdroj energie pro buněčné pochody. Vytváří se při respiraci a fotosyntéze, kdy vzniká z volného fosfátu a ADP (adenosindinofosfát). Taktéž slouží jako prekurzor pro vznik mnoha makromolekul, jako jsou AMP-aktivované aminokyseliny (adenosinmonofosfát), potřebné pro syntézu proteinů, ADP-glukosa pro syntézu škrobu, a další aktivované monosacharidy pro vznik jiných polysacharidů.









Hypoxantin

Adenin

NH2

NH

Cytosin







Uracil

Obrázek 1 – Nukleové báze

Některé nukleotidy jsou spojeny s tvorbou fytohormonů, tzv. cytokininů, které regulují vývoj rostliny a zajišťují environmentální odpovědi (Miller et al., 1955; Taya et al., 1978). V signálních drahách může být přítomný cyklický nukleotid, jakožto druhotný posel (např. cAMP (cyklický AMP) nebo také AMP-ribosa), (Scheel, 1998).

Puriny a pyrimidiny jsou také zapojeny do vytváření druhotných produktů, jako je například kofein (Ashihara and Crozier, 1999) a představují také regulátory syntézy aminokyselin, fosfolipidů, glykolipidů, cukrů a polysacharidů.

Zastoupení jednotlivých nukleotidů v rostlinné buňce není rovnoměrné. Nejvíce převažuje adenin v podobě ATP, ADP a AMP. Druhým nejčastějším nukleotidem je uracil. Společně jsou součástí energetického a sacharidového metabolismu (Wagner and Backer, 1992). V porovnání s adeninem přibližně 10-25% představuje guanin a nejmenší podíl v rostlinné buňce zaujímá cytosin. Obsah volných nukleosidů a volných nukleových bází bývá většinou malý (Stasolla et al., 2003).

Metabolismus nukleotidů se obecně skládá ze čtyř hlavních procesů: *de novo* syntéza, recyklační dráha, reakce fosfotranferás mezi purinovými a pyrimidinovými nukleotidy a katabolismus nukleotidů (Zalkin and Nygaard, 1996; Bolt et al., 2003). Jedná se o metabolické dráhy, mající pro organismus limitující význam. Enzymy biosyntetických drah jsou přítomny ve všech buňkách minimálně v nízkých hladinách, jelikož jsou řazeny mezi základ buněčné aktivity. Konkrétně *de novo* syntéza je lokalizována pravděpodobně v plastidech a recyklační dráha v cytoplasmě. Tvorba nových nukleotidů je zahájena v obou případech vznikem 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátem (PRPP) z jednoduchých molekul jako je CO₂, aminokyselina a 10-formyltetrahydrofolát (10F-THF). Tento druh syntézy je však velmi energeticky náročný, což dokazuje spotřeba až 7 molekul ATP nebo GTP (guanosintrifosfát) na syntézu jednoho nukleotidu. Oproti tomu recyklační dráha vyžaduje pouze hydrolýzu jedné molekuly ATP (Moffatt and Ashihara, 2002).

Kroky jednotlivých drah jsou popsány již delší dobu, avšak jejich regulace nebyla ještě zcela objasněna. Genetici a molekulární biologové se v poslední době snaží popsat regulaci metabolických drah jednotlivými jejími enzymy (Stasolla et al., 2003). U regulace syntézy nukleotidů vyšších rostlin se předpokládá, že je značně podobná té u bakterií, kvasinek a zvířat, u kterých již byla provedena modelová studie metabolismu. Nejčastěji se jedná o alosterickou inhibici klíčových enzymů jednotlivých drah nebo regulace na úrovni transkripce jednotlivých proteinů, což souvisí s rozdílnou

11

subcelulární lokalizací enzymů daných metabolických pochodů (Zalkin and Nygaard, 1996; Henderson and Patison, 1973; Zrenner et al., 2006).

2.1.1 De novo biosyntéza

2.1.1.1 De novo biosyntéza purinů

Lokalizace *de novo* syntézy v prvních deseti krocích, kdy vzniká inosinmonofosfát (IMP), je s největší pravděpodobností v plastidech, což bylo pro některé enzymy experimentálně dokázáno (Hung et al., 2004). Potvrzuje to i N-terminální transitní sekvence, obsažená v genech kódující tyto proteiny (Smith and Atkins, 2002). U guanosinmonofosfátu (GMP) tyto sekvence nalezeny nebyly. Z tohoto důvodu se předpokládá, že *de novo* syntéza xantinmonofosfátu (XMP) a GMP probíhá v cytosolu (Van der Graff at al., 2004; Cao a Schubert, 2001).

V rostlině *de novo* syntéza probíhá hlavně v pletivech se zvýšenou mitotickou aktivitou, tedy u buněk intenzivně se dělících, kde je velká spotřeba nukleotidů (Zrenner et al., 2006). Mezi základní stavební jednotky *de novo* syntézy purinových nukleotidů se řadí glycin, aspartát, glutamin, ribosa 5-fosfát, PRPP, hydrogen uhličitanový aniont a10-formyltetrahydrofolát.

Začátek syntézy je katalyzován enzymem amidofosforibosyltransferasa (EC 2.4.2.14), který převádí amidovou skupinu glutaminu na PRPP za vzniku fosforibosylaminu (phosphoribosylamine, PRA). Tento krok je součástí jak de novo syntézy, tak recyklační dráhy purinových i pyrimidinových nukleotidů. PRPP se využívá pro syntézu NAD, histidinu a tryptofanu a jeho hladina ovlivňuje velké množství metabolických drah. PRPP představuje esenciální látku a každý živý organismus obsahuje alespoň jeden gen kódující enzym PRPP-synthetasu (EC 2.7.6.1), (Krath and Hove-Jensen, 1999). Další reakcí je vytvoření amidové vazby PRA s glycinem za vzniku glycinaminoribonukleotidu (GAR) a současné hydrolýzy ATP, která je katalyzována enzymem GAR-synthetasa (EC 6.3.4.13). GAR-formyltransferasa (EC 2.1.2.2) následně umožňuje přeměnu GAR na formylglycinamid-ribonukleotid (FGAR) přenosem aldehydické skupiny z 10F-THF za vzniku tetrahydroxyfolátu. Navazuje na ni reakce, která je katalyzována enzymem FGAM-synthetasou (EC6.3.5.3), kdy dochází k přenosu amidové skupiny z glutaminu na FGAR za spotřeby jedné molekuly ATP, přičemž vzniká formylglycinamidinribonukleotid (FGAM). Působením enzymu AIR-synthetasa (EC 6.3.3.1) dochází k odtržení molekuly za současné

12

hydrolýzy ATP a za vzniku 5-amidoimidazol-ribonukleotidu (AIR), který je následně karboxylován díky HCO₃⁻ aniontu a enzymu AIR-karboxylasy (EC 4.1.1.21) na 4karboxyaminoimidazol-ribonukleotid (CAIR). SAICAR-synthetasa (EC 6.3.2.6) na vzniklý produkt připojí aspartát za současné hydrolýzy molekuly ATP. Výsledný produkt této reakce je N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamid (SAICAR), z kterého se poté odštěpuje fumarát v katalyzované reakci adenylosukcinátlyasou (EC 4.3.2.2), což má za následek vznik 5-amidoimidazo-4-karbaxamid-ribonukleotidu (AICAR), (Obr. 2).



Obrázek 2 – Schématické znázornění de novo syntézy purinových nukleotidů.

1) amidofosforibosyltransferasa; 2) GAR-synthetasa; 3) GAR-formyltransferasa; 4) FGAMsynthetasa; 5) AIR-synthetasa; 6) AIR-karboxylasa; 7) SAICAR-synthetasa; 8) adenylosukcinátlyasa; 9) AICAR-transformylasa; 10) IMP-cyklohydrolasa; 11) adenylosukcinátsynthetasa; 12) IPM-dehydrogenasa a 13) GMP-synthetasa (převzato a upraveno podle Stasolla et al., 2003). Poslední dva společné kroky pro *de novo* syntézu purinů jsou katalyzovány jedním bifunkčním enzymem AICAR-transformylasou/IMP-cyklohydrolasou (EC 2.1.2.3, EC 3.5.4.10), (Zalkin and Nygaard, 1996). V prvním kroku dochází k přenosu aldehydické skupiny z další molekuly 10F-THF na AICAR za tvorby 5-formanoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotidu (FAICAR), z kterého je v posledním společném kroku uvolněna voda, přičemž se spojí kruh za vzniku IMP. Z IMP mohou být vytvářeny dvě různé finální struktury a to AMP nebo GMP. Tvorba AMP probíhá připojením amidové skupiny aspartátu na IMP za hydrolýzy GTP a enzymatické katalýzy adenylosukcinátsynthetasy (EC 6.3.4.4), přičemž vzniká sloučenina adenylosukcinát (SAMP). Oddělením fumarátu ze SAMP pomocí adenylosukcinátlyasy (EC 4.3.2.2) je vytvořen požadovaný AMP. Enzym IPM-dehydrogenasa (EC 1.1.1.205) katalyzuje přeměnu IMP na xantinmonofosfát (XMP), který je současně oxidován NAD⁺. Poslední reakcí syntézy GMP je přenos amidové skupiny glutaminu na XMP za hydrolýzy ATP a katalýzy GMP-synthetasy (EC 6.3.5.2).

2.1.1.2 De novo biosyntéza pyrimidinů

Biosyntéza pyrimidinů je označována taktéž jako orotátová dráha a obvykle je definována jako vytváření uridinmonofosfátu (UMP) z karbamoylfosfátu. Na základě N-terminální tranzitní sekvence se předpokládá, že *de novo* syntéza je lokalizována na různých místech. První tři kroky probíhají v plastidech, čtvrtý krok na vnitřní mitochondriální membráně, kde je spojen s dýchacím řetězcem. Lokalizace posledních dvou kroků nebyla ještě stanovena, ale předpokládá se plastidová nebo cytosolická lokalizace (Zrenner et al., 2006).

Jednotlivé reakce biosyntézy pyrimidinových nukleotidů v rostlinách se zásadně neliší od živočišných a mikrobiálních (Wagner and Baker, 1992), avšak organizace, kontrolní mechanizmus a subcelulární lokalizace enzymů je u rostlin odlišná. *De novo* syntéza UMP se skládá ze šesti kroků. V dalších třech krocích však dochází k proměně UMP na cytosintrifosfát (CTP). U savců a některých eukaryot jsou první tři enzymy potřebné k syntéze spojeny v multifunkční aparát zvaný CAD protein, podle svých počátečních písmen: karbamoylfosfátsynthetasa (EC 6.3.5.5), aspartáttranskarbamoylasa (EC 6.3.5.5) a dihydroorotasa (EC 3.5.2.3), (Christopherson and Szabados, 1997). Nicméně tento komplex nebyl pozorován u rostlin (Moffatt and Ashihara, 2002). Stejně tak u nich byly popsány dva typy karbamoylfosfátsynthetas, poskytující substráty pro biosyntézu pyrimidinů a argininu. U vyšších rostlin byl identifikován pouze jeden enzym, který má nejspíš bifunkční charakter (Wagner and Baker, 1992).

Mezi základní látky, potřebné k syntéze pyrimidinových nukleotidů, patří aspartát, glutamin, HCO₃, PRPP a energie v podobě ATP. První reakci *de novo* syntézy vznik karbamoylfosfátu z HCO₃představuje а glutaminu katalýzy za karbamoylfosfátsynthetasou a současné hydrolýzy 2 molekul ATP. Výsledný produkt je následně konjugován s aspartátem díky aspartáttranskarbamoylase, za vzniku karbamoylaspartátu, který je hned v další fázi cyklizován dihydroorotasou na dihydroorotát. Ten je přeměněn dihydroorotátdehydrogenasou (EC 3.5.2.3) na orotát a současné redukce NAD⁺. Pátým krokem syntézy je připojení PRPP na orotát za vzniku orotidin-5-fosfátu (OMP) pomocí orotát-fosforibosyltransferasy (EC 2.4.2.10). OMP dále podléhá dekarboxylaci enzymem orotidylátdekarboxylasa (EC 4.1.1.24), který vytváří uridinmonofosfát. Z UMP může být dále vytvořen pomocí tří enzymů UMP kinasy (EC 2.7.4.22), nukleosiddifosfát kinasy (EC 2.7.4.6) a CTP synthetasy (EC 6.3.4.2) CTP, kdy nejprve dojde k připojení dvou fosfátů za vzniku UTP a následným přidáním aminoskupininy z glutaminu vzniká CTP (Obr. 3).



Obrázek 3 – Schématické znázornění de novo syntézy purinových nukleotidů.

1) karbamoylfosfátsynthetasa; 2) aspartáttranskarbamoylasa; 3) dihydroorotasa; 4) dihydroorotátdehydrogenasa; 5) orotát-fosforibosyltransferasa; 6) orotidylátdekarboxylasa; 7) UMP kinasa; 8) nukleosiddifosfát kinasa a 9) CTP synthetasa (převzato a upraveno podle Stasolla et al., 2003).

2.1.2 Recyklace purinů a pyrimidinů

Recyklační dráha vykazuje výraznější změny v mechanizmech a regulaci u prokaryot a eukaryot, zatímco u *de novo* syntézy jsou si mechanismy velmi podobné (Moffatt and Ashihara, 2002; Kaferet al., 2004). Navíc je recyklační dráha využívána mnohem více než *de novo* syntéza, a to nejen z energetických důvodů, kdy na obnovu AMP, GMP a dalších je spotřebována pouze jedna molekula ATP, ale také snižuje hladinu purinových bází a nukleosidů, které by mohly sloužit jako inhibitory v různých metabolických cestách (Moffatt and Ashihara, 2002). Při recyklaci jsou využívány samotné báze, nukleotidy a nukleosidy, které jsou vyloučeny jako vedlejší produkt katabolismu nukleových kyselin nebo buněčného metabolismu (metioninový cyklus, atd.). Například v období germinace rostliny jsou uvolňovány báze a nukleosidy ze zásobních orgánů a jsou recyklovány, což výrazně podporuje rychlost růstu rostliny (Ashihaara and Crozier, 1999). Nejvíce je recyklační dráha využívána ve stálých pletivech, kde je téměř neaktivní *de novo* syntéza (Zrenner et al., 2006).

2.1.2.1 Recyklace purinů

Výskyt většiny enzymů recyklační dráhy je předpokládán v cytosolu (Allen et al.,2002), avšak některé enzymy byly lokalizovány v mitochondriích (Hirose and Ashihara, 1983) a plastidech (Ashihara and Ukaji, 1985). Adenin, guanin a hypoxantin mohou být přímo převedeny na AMP, GMP a IMP v katalyzované reakci pomocí adeninfosforibosyltransferasy (EC 2.4.2.7) a hypoxantin/guaninfosforibosyltransferasy (EC 2.4.2.8) za přítomnosti PRPP.

Nukleosidy jsou přeměněny na AMP, GMP, IMP pomocí enzymů adenosinkinasa (EC 2.7.1.20) nebo inosin/guanosinkinasa (EC 2.7.1.73) za hydrolýzy ATP. Tuto reakci také provádí i nespecifická nukleosidfosfotransferasa (EC 2.7.1.77), která přenáší fosfát z jiných nukleosidmonofosfátů. Zpětná tvorba nukleosidů je zprostředkována pomocí enzymů adenosinfosforylasa (EC 2.4.2.-) a inosin/guanosinfosforylasa, které katalyzují reakci s volnou bází s aktivovanou ribosou-1-P (Obr. 4). Tato cesta však není rostlinami moc využívána oproti živočichům. Aktivita enzymů je velmi nízká, a proto tato dráha výrazně nezasahuje do recyklace purinů (Moffatt et al., 2000; Ashihara and Crozier, 1999; Wagner and Backer, 1992).



Obrázek 4 - Schématické znázornění recyklační dráhy purinových nukleotidů. 1) adeninfosforibosyltransferasa; 2) hypoxantin/guaninfosforibosyltransferasa; 3) adenosinfosforylasa; 4) adenosindhydrolasa; 5) adenosinkinasa; 6) nespecifická nukleosidfosfotransferasa; 7) inosin/guanosinkinasa; 8) inosin/guanosinfosforylasa a 9) inosin/guanosinhydrolasa (převzato a upraveno podle Stasolla et al., 2003).

Rostliny mají schopnost recyklovat nebo degradovat jak nukleosidy, tak nukleové báze. Klíčovými enzymy, řídícími poměr mezi recyklací nukleosidů nebo jejich dalším rozkladem, jsou právě nukleosidhydrolasy (Zrenner et al., 2006). Tyto enzymy hydrolyzují N-glykosidickou vazbu nukleosidů za vzniku volné báze a ribosy. Volné báze mohou dále podléhat katalytickým reakcím. Nukleosidhydrolasy byly již popsány u prvoků a kvasinek (Magni et al., 1975; Shi et al., 1999) a v poslední době také u rostlin (Jung et al., 2009). Katalytickou reakcí pomocí guonosindeaminasy (EC 3.5.4.15) nebo adenosindeaminasy (EC 3.5.4.4) je možné získat z guanosinu nebo adenosinu produkty, jako jsou xanthosin a inosin. Experimentálně byla prokázána v rostlinách zatím jen guonosindeaminasa. Adenosindeaminasy obecně v rostlinách prokázány nebyly, avšak v genové databázi *Arabidopsis thaliana* byl nalezen gen (At4g04880), který sdílí velkou sekvenční homologii s rodinou adenosindeaminas (Pospíšilová and Frébort., 2007).

2.1.2.2 Recyklace pyrimidinů

Předpokládaný výskyt těchto enzymů je v cytoplazmě nebo v plastidech, avšak experimentálně to nebylo dokázáno (Schmid et al., 2005). U pyrimidinů jako jediný uracil může být převeden přímo na UMP pomocí enzymu uracilfosforibosyltransferasa (EC 2.4.2.9) za spotřeby jedné molekuly PRPP.



Obrázek 5 - Schématické znázornění recyklační dráhy pyrimidinových nukleotidů. 1) uracilfosforibosyltransferasa; 2) uridinkinasa; 3) nespecifická nukleosidfosfotransferasa; 4) uridinfosforylasa a 5) uridinhydrolasa (převzato a upraveno podle Stasolla et al., 2003).

Pro cytosin nebyla podobná reakce u rostlin prokázána (Moffatt and Ashihara, 2002). Avšak u některých mikroorganizmů může být cytosin převeden na uracil pomocí cytosindeaminasy (EC 3.5.4.1) nebo až na UMP (Ipata et al., 1971; Katsuragi et al., 1986).

Pyrimidinové nukleosidy uridin, cytidin, a thymidin mohou být přeměněny na jejich příslušné nukleotidy UMP, CMP, a dTMP pomocí enzymů uridin/cytidinkinasa (EC 2.7.1.48), thimidinkinasa (EC 2.7.1.21) nebo pomocí nespecifických nukleosidfosfotransferas (Obr. 5).

2.1.3 Katabolismus purinů a pyrimidinů

Jelikož jsou rostliny během svého života odkázány na příjem živin obsažených v jejich stálém stanovišti, které je určitým způsobem nutričně vybaveno, musí hospodařit s dostupnými látkami zcela jinak, než jak je to třeba u živočichů a dalších organizmů. Limitujícím prvkem pro vývoj rostliny je dusík, a proto i jeho metabolické dráhy budou uzpůsobeny tak, aby se jím co nejvíce šetřilo. Například u živočichů je výsledným produktem katabolismu purinů kyselina močová. U rostlin je však dále degradována na alantoin, kyselinu allantoovou a močovinu. Tyto látky mohou být ukládány v různých orgánech (např. kořeny) a následně translokovány do jiných orgánových částí rostliny, kde jsou kompletně degradovány na CO₂, NH₃ a glyoxalát. U bobovitých rostlin jsou tyto meziprodukty zásobní formy dusíku (Smith and Atkins, 2002).

2.1.3.1 Katabolismus purinů

Základní společnou sloučeninou, na kterou se musí všechny purinové báze nejprve přeměnit, aby mohlo dojít k jejich další degradaci, je xantin. AMP je nejdříve štěpen na IMP pomocí enzymu AMP-deaminasa (EC 3.5.4.6), kdy dochází k deaminaci na purinovém kruhu. IMP může být následně odbourán dvěma cestami, a to buď zrušením N-glykosidické vazby mezi purinovým kruhem a ribosa-1P enzymem 5' nukleosidasou (EC 3.1.3.5) či fosfatasami (EC 3.1.3.-) za vzniku inosinu nebo může být IMP katalyticky převeden na XMP enzymem IMP-dehydrogenasou (EC 1.1.1.205). XMP je zbaven ribosa-1-P díky 5'nukleosidase nebo nespecifickým fosfatasam za vzniku xantosinu, který je dále inosin/guanosinnukleosidasou (EC 3.2.2.2) přeměněn na hypoxantin a následně na xantin xantindehydrogenasou (EC 1.1.1.204), (Obr. 6).

Poslední purinová báze v podobě GMP začíná být metabolizována enzymem 5' nukleosidasou nebo fosfatásou, což jsou stejné enzymy jakou u prvního kroku degradace IMP a XMP na guanosin. V rostlinách dochází k přeměně guanosinu buď na xantosin díky guanosindeaminase (EC 3.5.4.15), nebo je dále degradován již zmiňovanými enzymy (Obr. 6) na guanin, který je díky dalšímu rostlinnému enzymu guanindeaminasa (EC 3.5.4.3) přímo převeden na požadovaný xantin (Ashihara et al., 1997). Enzymy adenosindeaminasa a adenindeaminasa u degradace AMP v rostlinách přítomny nejsou, a proto je hlavním regulátorem degradace AMP aktivita AMPdeaminasy (Moffatt et al., 2000).

Další osud xantinu je řízen enzymem xantindehydrogenasou, při němž vzniká oxidativní činností kyselina močová, která je ihned přeměněna urikasou (EC 1.7.3.3) na allantoin. Ten je následně degradován na allantoát pomocí allantoinasy (EC 3.5.2.5). Allantoát může být dále odbouráván dvěma způsoby, z nichž jeden je pouze hypotetický. První je katalyzovaná reakce s allantoicasou (EC 3.5.3.4) za vzniku močoviny a ureidoglykolátu, který je dále degradován na glykolát enzymem ureidoglycolatlyasa (EC 4.3.2.3). Druhou předpokládanou variantou je vznik CO₂, NH₃ a ureidoglycinu z allantoátu díky allantoindeaminase. Ureidoglycolát.



Obrázek 6 - Schématické znázornění katabolické degradace purinových nukleotidů. 1) AMP-deaminasa; 2) IMP-dehydrogenasa; 3) 5' nukleosidasa nebo fosfatasa; 4) inosin/guanosinnukleosidasa; 5) guanosindeaminasa; 6) guanindeaminasa; 7) xantindehydrogenasa; 8) urikasa; 9) allantoinasa; 10) allantoicasa; 11) ureidoglycolatlyasa; 12) ureasa; 13) allantoindeaminasa; 14) ureidoglycinaminohydrolasa a 15) ureidogylkoláthydrolasa (převzato a upraveno podle Stasolla et al., 2003).

Poslední reakcí je degradace této látky na CO₂, NH₃ a glykolát katalýzou ureidogylkoláthydrolasou. Uvolňované látky mohou být však znovu fixovány (Stasolla et al., 2003).

Předpokládaná lokalizace enzymů katabolismu purinů na kyselinu močovou je v cytosolu, jelikož nebyly nalezeny žádné transitní sekvence, které by specificky enzymy odváděly do jiných částí buňky (Hesberg et al., 2004). Enzymy převádějící močovinu až na allantoát mají N-terminální transportní sekvenci směřující enzymy do peroxisomu a endoplazmatického retikula. V poslední době několik studií poukazuje na to, že po vytvoření alantoinu v peroxisomu pokračuje degradace rostlinných purinů v endoplazmatickém retikulu (Werner et al, 2008; Serventi et al, 2010).

2.1.3.2 Katabolismus pyrimidinů

Degradace pyrimidinových nukleotidů za vzniku jejich nukleových bází se děje prostřednictvím nukleosidů. Všechny nukleotidy jsou nejprve převedeny na jejich příslušný nukleosid pomocí enzymů 5' nukleosidasy nebo nespecifickými fosfatasami stejně jako u purinů. Cytidin je deaminován prostřednictvím cytidindeaminasy (EC 3.5.4.5) na uridin. Tato reakce je nezbytná k dalšímu pokračovaní pyrimidinového skeletu, jelikož v rostlinách není přítomna cytosindeaminasa, která by metabolizovala vzniklý cytosin. Vzniklý uridin je podroben katalýze uridinnukleosidasou (EC 3.2.2.3),

která vytváří uracil. Ten je redukován díky nikotinamiduadenindinukleotidfosfátu (NADPH) a dihydrouracildehydronasou (EC 1.3.1.2) za uvolnění dihydrouracilu. Předposledním krokem je tvorba 5,6-dihydrouracilu dihydropyriminasou (EC 3.5.2.2). Závěrečnou reakcí je pak vznik β -alaninu, CO₂ a NH₃ pomocí enzymu β ureidopropionasy. Přepokládá se, že degradace uracilu je důležitým zdrojem alaninu jako prekurzoru pro pantothenát, který je součástí koenzymu A (Katahira a Ashihara, 2002). Thymidin je stejně tak degradován jako uridin, kdy je štěpen nukleosidasou a dalšími enzymy jako u cytidinu až na výsledné produkty 2-methyl- β -alanin, CO₂ a NH₃ (Obr. 7).

Katabolismus je lokalizován v cytosolu, jelikož nebyly nalezeny tranzitní sekvence pro chloroplasty nebo mitochondrie. Exprese genů pro katabolické enzymy je koordinována s expresí genů kódující *de novo* syntézu a recyklační dráhy. Homeostáza pyrimidinů je v rostlině udržována v závislost s měnícími se nároky jejich metabolických drah (Zrenner et al., 2009).



Obrázek 7 - Schématické znázornění katabolické degradace pyrimidinových nukleotidů. 1) 5' nukleosidasa nebo nespecifická fosfatasa; 2) cytidindeaminasa; 3) uridinnukleosidasou; 4) dihydrouracildehydronasa; 5) dihydropyriminasa; 6) β -ureidopropionasa a 7) thyminnukleosidasa (převzato a upraveno podle Stasolla et al., 2003).

2.2 Adenosindeaminasy

2.2.1 Charakterizace adenosindeaminas

Adenosindeaminasy patří mezi takzvané amidohydrolasy (EC 3.5.4.-), které se vyznačují několika specifickými rysy. Nejzákladnějším rysem je přítomnost specifického centra, které obsahuje binukleární nebo mononukleární místo pro kov, s typickou " α/β -barelovou" strukturou. Ta je například u myší adenosin deaminasy (ADA, EC 3.5.4.4), tvořena osmi centrálními β -skládanými listy a osmi periferními α -helixy. Jak již bylo naznačeno, všechny amidohydrolasy, včetně ADA, jsou metaloenzymy, které ke své enzymatické aktivitě vyžadují přítomnost atomu kovu. Aktivní místo ADA obsahuje jeden dvojmocný atom zinku a je lokalizováno v dutině β -barelu na C-terminálním konci (Pospíšilová et al., 2008).

ADA katalyzuje ireverzibilní deaminaci adenosinu a 2'-deoxyadenosinu na výsledné produkty inosin nebo deoxyinosin za uvolnění amoniaku a spotřeby jedné molekuly vody (Obr. 8). Tato reakce je exergonická a není zde zapotřebí hydrolýzy ATP. Reakce by bez katalýzy sama neproběhla, jelikož aminoskupina adeninu v poloze 6 přispívá k celkové stabilitě této látky (Brändén, 1991). Prvním krokem přeměny je nukleofilní přiblížení polarizované molekuly vody pomocí atomu Zn²⁺ do polohy 6C adenosinu za tvorby tetraedrického intermediánu. Následně je aminoskupina adenosinu protonována a odštěpena jako volný NH₃, za současného rozpadu vzniklého přechodného stavu. Poté je uvolňován inosin z aktivního místa enzymu a dochází k další polarizaci zinku nově příchozí molekulou vody (Obr. 9). Katalýze napomáhají taktéž aktivní rezidua aminokyselin specifických pro danou ADA, které interagují se substrátem a tím snižují výslednou energii potřebnou k vytvoření tranzitního stavu a dalším přeměnám substrátu.







Obrázek 9 – Schématické znázornění jednotlivých kroků reakčního mechanismu deaminace adenosinu enzymem ADA (převzato od Sideraki et al., 1996).

Adenindeaminasa (ADE) a AMP-deaminasa jsou enzymy, které mají velmi podobný enzymatický mechanismus jako ADA. ADE katalyzuje přeměnu adeninu na hypoxantin a AMP-deaminasa tvorbu IMP z AMP. Společně jsou tyto tři enzymy aktivní v metabolismu purinových nukleotidů. Konkrétně ADA a ADE v recyklační dráze a AMP deaminasa je nejvíce aktivní v katabolismu nukleotidů (viz kapitola 2.1.2.1), kde celkově udržuje hladinu adeninových nukleotidů v eukaryotních buňkách (Chapman et al., 1973).

Nedávná fylogenetická analýza aminokyselinových sekvencí různých genových produktů podporuje vznik adenyl-deaminasové rodiny, do které patří ADA, AMP deaminasa, ADE, ADA podobné proteiny (ADAL, ADA-like) a růstové faktory podobné ADA (ADGF, ADA-related growth factor), které se vyskytují u bezobratlých. Proteiny patřící do této skupiny se vyznačují novým strukturním motivem označovaným MPKG, který se skládá z methioninu (leucinu nebo isoleucinu), prolinu, lysinu a

glycinu. Taktéž ve všech pěti subrodinách jsou zachována stejná katalyticky aktivní rezidua (Maier et al., 2005).

ADA byla nalezena v široké škále prokaryot a eukaryot (hmyz, nižší obratlovci, ryby, savci či rostliny). Dosud bylo popsáno několik podtříd těchto enzymů a se znalostí plných genomových sekvencí se dají identifikovat geny kódující tyto enzymy (Maier et al., 2005). Některé proteiny vyskytující se u těchto organizmů vykazují podobnou aktivitu jako ADA, avšak nepatří do třídy klasických ADA (EC 3.5.4.4). Mohou to být ADA regulační proteiny (pouze u prokaryot) s rozdílnými konzervovanými doménami (EC 2.1.1.63) a tRNA specifické adenosindeaminasy (ADAT), (Pospíšilová and Frébort, 2007). ADAT byly první RNA upravující enzymy, které byly identifikované v *Escherichia coli* (Wolf et al., 2002). ADAR (ADA působící na RNA) má schopnost přímo deaminovat adenosiny v řetězci RNA a převést je na inosin. Tyto enzymy se vyskytují pouze u zvířat, v jiných organizmech nejsou známy (Keegan et al., 2004).

2.2.2 Substráty, aktivující látky a inhibitory adenosindeaminas

Přirozenými substráty pro ADA jsou adenosin (Ataie et al., 2004) a adenin (Nygaard, 1978). Dokáží však metabolizovat i deriváty přirozených substrátu, jako jsou 2'- deoxyadenosin (Tsukada and Yoshino, 1980), 2', 3'- deoxyadenosin (Iwaki-Egawa and Watanabe, 2002), 3'-deoxyadenosin (Nygaard, 1978), adeninarabinosid (Ling et al., 1991), isopropylidenadenosin (Pickard, 1975), 5'- AMP (Jun et al., 1994), 2'-dAMP (Rosinová et al., 1978). ADA také katalyzují přeměnu adenosin-3'-monofosfátu (Jun et al., 1991), cAMP (Jun et al., 1991), ADP a ATP (Jun et al., 1994), dvouřetězcové RNA (Hough and Bass, 1994) či tRNA (Keegan et al., 2000). Taktéž bylo dokázáno, že ADA jsou schopné metabolizovat 6-chlorosubstitované deriváty jako 2-amino-6chloropurinribosid (Pickard, 1975) a 6-chloropurinribosid (Lupidi, 1998) nebo jiné purinové sloučeniny, například 6-methoxypurinribosid (Lupidi, 1998), 6methylaminopurinribonukleosid (Nygaard, 1978) a formycin A (Tsukada and Yoshino, 1980).

Pro správnou činnost některých ADA různých organizmů je zapotřebí přítomnost iontů kovu v rozmezí určitých koncentrací. Například u *Aspergillus terricola* se mnohonásobně zvětší aktivita ADA, po přidání MgCl₂ a CoSO₄ (Abu-Shady et al., 1994). Nepřítomnost amonného a draselného kationtu má negativní vliv na aktivitu ADA z *Bacillus cereus*, které mohou vyústit až v nevratnou ztrátu aktivity tohoto

24

enzymu. Naopak v optimálních koncentracích tyto kationty stabilizují činnost této ADA (Gabellieri et al., 1986). Dále bylo zjištěno, že ionty Fe³⁺ a Sn²⁺ podporují enzymatické reakce ADA u *Nocardioides sp.* J-326TK (Jun et al., 1994) a *Streptomyces sp.* (Jun et al., 1991). I u dalších organizmů byly popsány látky podporující aktivitu ADA, například u *Argopecten irradians concentricus* jsou to chlorid amonný a síran amonný (Harbison and Fisher, 1973), u *Candida albicans* jsou to 8-aza-adenin, adenin, AMP, ATP, IMP, *N*-acetyl-D-glukosamin a inosin (Challa et al., 1999) a u *Mus musculus* byl prokázán vliv dibutyryl-cAMP (Singh and Sharma, 2000).

Hodnoty pH a teploty pro optimální aktivitu různých ADA se výrazně liší u různých organizmů. Většinou se hodnoty pH liší v rozmezí 5-8 (Pospíšilová and Frébort., 2007). Rozsah pH, při němž byla ještě zachována enzymatická aktivita, byl zkoumán pro ADA z *Bos taurus* a odpovídal hodnotám pH 5-9. Taktéž u *Candida albicans* byla hodnota stanovena v rozmezí pH 4-8 (Challa et al., 1999) a u *Streptomyces sp.* na 3,5-5,5 (Jun et al., 1991). Teplotní optimum se nachází mezi 25°C u *Camelus dromedaries* až 55°C po rozdíl jednoho stupně u *Streptomyces sp.* (Jun et al., 1991).

Pro ADA bylo popsáno také velmi široké spektrum inhibitorů. Například u ADA z kvasinky Candida albicans byly prokázány inhibiční účinky1-methyl-adenosinnem, AMP. p-chloromercuriobenzoátem, p-hydroxymercuribenzoovou kyselinou а theofylinem (Challa et al., 1999). Inhibice ADA z Plasmodium falciparum, který způsobuje malárii, je prokázána 2,6-diaminopurinem, 6-methylaminem, 6-ribosidem a kordycepinem (Daddona et al., 1984). Inhibiční účinky vůči lidským i dalším ADA byly prokázány pro látky jako 1,6-dihydro-6-(hydroxymethyl)purinribosid a koformycin, které způsobují změnu konformace proteinu (Pospíšilová and Frébort, 2007) či 2'deoxykoformycin (DFC) a erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin hydrochlorid (Iwaki-Egawa and Watanabe, 2002). Koformycin i DCF jsou přirozeně se vyskytující inhibitory, které se velmi silně vážou na ADA, přičemž tahle interakce je téměř nevratná a dochází při ní k napodobování přechodného stavu ADA, a proto se jedná o analogy přechodového stavu (Agarwal et al., 1977).

2.2.3 Proteinová struktura skotu, myšší a dalších adenosindeaminas

Krystalová struktura byla vyřešena pomocí rentgenostrukturní analýzy pouze u ADA ze skotu a myší ADA (Obr. 10, 11), (Kinoshita et al., 2003; Wilson et al., 1991).

Sekvenční homologie aminokyselinové sekvence skotu a myší ADA je přibližně 85% u skotu a lidské ADA 91% a nejméně si je podobná myší a lidská ADA 83%. Zejména jsou zachovány rezidua aminokyselin v okolí aktivního místa ze skotu a lidské ADA, což znamená, že jsou si funkčně velmi podobné a zaměnitelné. Naopak aktivní místo myší ADA, oproti těmto dvou relativně identickým enzymům, je strukturně odlišné díky jedné mutaci, která se nachází ve strukturně důležitém místě, konkrétně na konci pohyblivé části aktivního místa tvořící uzavíratelnou záklopku chránící navázaný substrát.



Obrázek 10 – Trojrozměrné znázornění struktury rekombinantní myší ADA se substrátem 6-hydroxy-7,8-dihydropurinnukleosid navázaným v aktivním místě (převzato od Wilson et al., 1991).



Obrázek 11 – Trojrozměrné znázornění struktury rekombinantní ADA ze skotu se substrátem 6-hydroxy-7,8-dihydropurinnukleosid (HDPR) navázaným v aktivním místě (převzato z PDB, zkratka 1KRM).

Myší ADA je vytvářena jako monomer, skládající se z α/β -barelů. Ty jsou složeny z osmi centrálních β -listů a osmi okrajových α -šroubovic. Celková hmotnost enzymu je 40 kDa. Sekundární struktura zahrnuje dalších 5 α -helixů, z nichž tři jsou umístěny na C-terminálním konci α/β barelu mezi β_1 a α_1 . Další dva helixy tvoří antiparalelní smyčku na opačném konci α/β barelu (Sharff et al., 1992; Wilson et al., 1991). Aktivní místo obsahuje zinkový kofaktor, který se nachází v dutině β -barelu na C-terminálním konci. Po navázání substrátu dochází k uzavření záklopky, která brání přístupu rozpouštědla a dalšího substrátu. Terciální struktura ADA se označuje termínem TIM-barel a byla pojmenovaná podle první nalezené struktury, která se vyskytuje u trifosfătisomerasy. Všechny tzv. "TIM-barel enzymy" mají aktivní místo v β -řetězci na C-terminálním konci a mnoho z nich má flexibilní β/α smyčky pro přikrytí aktivního místa (Wierenga et al., 2001). Bylo dokázáno, že tyto struktury dávají přednost negativně nabitým substrátům (Copley and Bork, 2000).

Iont zinku je koordinován čtyřmi aminokyselinovými rezidui: His15, His17, His214 a Asp295 (Obr. 12, 13). Při navázání substrátu dochází k polarizaci molekuly vody za účasti iontu zinku a Asp295 a následně k deaminaci adenosinu (viz kapitola 2.2.1). Jakákoliv mutace, která naruší koordinaci výše uvedených aminokyselinových reziduí, vede ke ztrátě aktivity, a tedy nefunkčnosti enzymu (Raychaudhuri et al., 1997; Wilson et al., 1991).



Obrázek 12 – Znázornění aktivního místa myší ADA s navázaným substrátem HDPR (převzato od Wilson et al., 1991).



Obrázek 13 – Znázornění tetraedrální koordinace zinku v myší ADA (převzato od Wilson et al., 1991).

Při modelování proteinové struktury ADA ze skotu se vycházelo z již kompletní struktury myší ADA. Použití této struktury však nevedlo k dokonalému vyřešení struktury ADA ze skotu, což bylo pravděpodobně způsobeno malými rozdíly ve sbalení krystalů, které vedou ke značným konformačním změnám. Hlavní strukturní motiv zůstal stejný jako u myší ADA, a to tzv. TIM barel. Zinek je v této struktuře taktéž koordinován čtyřmi aminokyselinami His12, His15, His211, Asp292. Aktivní místo zkoumané u obou typů vykazuje v komplexu s 6-hydroxy-1,6-dihydropurinoribosidem velikou podobnost (Obr. 14). Jediná zaznamenaná změna byla přítomnost víka tvořeným dvěma leuciny (Leu55, Leu59), které mění své konformace vzhledem k probíhajícím reakcím a tím chrání nebo uvolňují již přeměněný substrát (Kinoshita et al., 2003).



Obrázek 14 - Znázornění aktivního místa ADA skotu s navázaným substrátem HDPR (převzato od Kinoshita et al., 2003).

2.2.4 Porovnání lidské a rostlinné adenosindeaminasy

U savců je ADA distribuována ve většině tkání, kde zastává důležitou funkci v metabolismu purinů a je důležitou součástí imunitního systému. Jsou známy dva různé izoenzymy ADA1 a ADA2, které jsou kódovány rozdílnými geny. U lidí je téměř veškerá aktivita přičítána ADA1, jelikož ADA2 se nachází ve velmi malých množstvích v séru a může být produkována monocyty (Zavialov et al., 2005). Největší aktivita ADA1 byla detekována v brzlíku a dvanáctníku (Aronow et al., 1992). Nedostatek tohoto enzymu se může u lidí projevovat jako těžká kombinovaná imunodeficience (SCID – Severe Combined Immunodeficiency Diseases). Ta je způsobena tím, že hromadící se látky působí toxicky na vývoj T a B lymfocytů. U jedinců trpících touto nemocí se vyskytují opakované infekce. Celkově jejich organismus neprospívá, což má často za následek úmrtí okolo jednoho roku života, není-li tato autozomálně recesivní choroba zavčas diagnostikována a léčena (Gaspar et al., 2006). Mutace vedoucí k nadměrné expresi ADA1 mohou způsobovat hemolytickou anémii. Některé práce ukazují, že mutace na druhé alele (ADA2) mohou vést k autismu (Persico et al., 2000).

Gen kodující ADA1 je tvořen celkem 32213 bp a 11 introny. Je přítomen na 20. chromozomu (20q12-q13.11) a přibližně 4,53% tvoří kódující sekvence z kompletního genu. ADA2 je lokalizována na chromozomu 22 (22q11.2) a je tvořena 40795 bp. Tyto proteiny náleží do metalo-dependentní hydrolázové nadčeledi adenosindeaminas a sdílí taktéž jejich typickou konzervovanou doménu cd01320 (Pospíšilová and Frébort, 2007).

Existuje jen velmi málo informací o rostlinné ADA. V genomové databázi *Arabidopsis thaliana* a i jiných rostlin jsou přítomny domnělé kódující geny tohoto enzymu. U většiny z nich však nebyly získány odpovídající proteiny a taktéž nebyla prověřena jejich aktivita vůči adenosinu a dalším substrátům Některé články spekulují, zda je u rostlin vůbec přítomna ADA (Gowda et al., 2007; Xu et al., 2005) nebo shledávají její aktivitu příliš nízkou a za hlavní enzym recyklační dráhy v rostlinách považují adenosinkinasu (Moffatt and Ashihara, 2002). Hypotetické produkty rostlinných genů odpovídají adenosinovým/adenosinmonofosfátnovým konzervovaným cd00443 doménám, které jsou odlišné od cd01320 prezentovaným v jiných ADA, přítomným například u některých prokaryotických a eukaryotických enzymů anotovaných jako ADA, ADE, AMP deaminasa nebo ADA podobné proteiny.



Obrázek 15 – Porovnání aminokyselinové sekvence mezi jednotlivými organismy (převzato od Pospíšilová and Frébort, 2007).

Na úrovni aminokyselinové sekvence ukazují domnělé rostlinné enzymy úzký vztah mezi sebou, přičemž se poměrně liší od ADA jiného původu, a to zejména od těch z mikroorganizmů (Pospíšilová and Frébort, 2007), (Obr. 15).

2.2.5 Předchozí provedené práce s rostlinnou ADA

Jak již bylo uvedeno, o rostlinných ADA není publikováno mnoho vědeckých prací, i přes výskyt genů kódujících tyto domnělé enzymy. Dříve se již danou problematikou zabývala Mgr. Hana Pospíšilová Ph.D., která vybrala z genomové databáze *Arabidopsis thaliana* zkoumaný gen At4g04880, který je zaznamenán jako domnělá ADA. Tento gen byl amplifikován a klonován do vektorů pDrive, pET100/D-TOPO a pET151/D-TOPO. Pro expresi byly použity bakterie *E. coli* BL21(DE3 StarTM), do nichž byly vektory transformovány. Získaný protein byl zhodnocen pomocí metody SDS-Page a pro následné ověření identity pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) a purifikován pomocí Ni-NTA agarosy. Po získání čistého proteinu byla měřena jeho aktivita, kdy byl hledán přirozený substrát s největší afinitou a taktéž byla zkoušena hypotéza štěpení některých cytokininů (např. kinetin, m-topolin, trans-zeatin, olomoucin a další), které obsahují ve své struktuře adenin jakožto jeden ze substrátů pro ADA. Ze získaných výsledků byla provedena biochemická charakterizace proteinu (Tab. 1, 2).

Molekulová hmotnost	39 947	
pH optimum	6,7 *‡	
Teplotní optimum (°C)	30	
Specifická aktivita (nkat/mg)	0,12‡§	
Km (μM)	-	
\mathbf{k}_{cat} (s ⁻¹)	0,005†	
k _{cat} /Km	-	

Tabulka 1 – Biochemická charakterizace předpokládané rostlinné ADA (převzato a upraveno z Pospíšilová et al., 2008).

*Prováděno v 0,2 M fosfátovém pufru, při teplotním optimu

‡ Prováděno v 0,2 M fosfátovém pufru při pH optimu

§ Prováděno s 0,033 mM adenosinem a v 0,2 M fosfátovém pufru (pH 6,7) při 30°C

** Adenosin byl použit jako substrát, prováděno v 0,2 M fosfátovém pufru (pH 7,0) při 37°C

Spolu s tímto rostlinným genem byly taktéž zkoumány dva geny kvasinkových ADE (*Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe*). Proměřena byla taktéž substrátová specifita lidské ADA1 (Pospíšilová et al., 2008).

Výtěžnost exprese s následnou purifikací byl poměrně malý a purifikovaný protein, který vykazoval velmi nízkou aktivitu, a to bez zjevné preference ke zkoumaným substrátům. Dá se tedy říci, že oproti získaným kvasinkovým enzymům, které vykazovaly zjevnou substrátovou specifitu, byla rekombinantní ADA neaktivní. Má práce navazuje na tento vědecký článek s úkolem zvýšení exprese a nalezení optimálních podmínek pro expresi tohoto proteinu, který bude následně krystalizován.

Tabulka 2 – Relativní reakční rychlost rostlinné ADA (převzato a upraveno z Pospíšilová et al., 2008).

Substráty	Relativní reakční rychlost v %
Adenin	100
Adenosin	30
AMP	56
ATP	68

[†] Adenin byl použit jako substrát

2.3 Zvýšení exprese rekombinantních proteinů

2.3.1 Možnosti a obecné informace o expresi rekombinantních proteinů

Je známo mnoho proteinů, které se uplatňují jak v klinické, tak průmyslové sféře, avšak jejich přirozený výskyt je velmi nízký. Produkce rozpustných rekombinantních proteinů je důležitá pro strukturně-funkční analýzu a terapeutickou aplikaci. Pro farmaceutické účely musí být u proteinu kvantitativní exprese s následnou kvalitativní purifikací, přičemž protein musí mít požadované farmakokinetické a fyzikálně-chemické vlastnosti (Casteleijn et al., 2013). Mezi biologicky důležité vlastnosti se počítá enzymatická aktivita, navázání ligandu, proteinové interakce a další *in vivo* funkce. Pokroky v genetickém inženýrství vedly k vývoji expresních systému zejména v *E. coli* (nejčastěji používaná bakterie pro expresi), které jsou schopny vyprodukovat velké množství proteinů z klonovaných genů (Kane et al., 1988).

Mezi dva základní problémy těchto expresí patří buď nízká exprese proteinu nebo nesprávné složení exprimovaného proteinu do nerozpustných agregátů, tzv. inkluzních tělísek (Malhotra, 2009). Nerozpustnost proteinů je jedním ze základních problémů strukturní genomiky a enzymologického výzkumu. Více jak 30% rekombinantních proteinů z *E. coli* jsou nerozpustné (Leibly et al., 2012).

Úspěšnost exprese a rozpustnost daného proteinu záleží na složení aminokyselinových sekvencí, kdy pomocí primární sekvenční analýzy může být navržen a vybrán vhodný expresní systém (Benita et al., 2006). Už jenom malý rozdíl v určené aminokyselinové sekvenci nebo v délce konstruktu může způsobit chybu při expresi (Musteli et al., 2005; Savchenko et al., 2003).

V ideálním případě je rekombinantní protein exprimován za použití silného promotoru. Získaný protein je vysoce rozpustný a je dosaženo vysokého výtěžku i aktivity proteinu.

Obecně platí, že exprese a rozpustnost může být optimalizována změnou expresních podmínek, jako je například teplota exprese, změna kultivačního média, zvolení jiného druhu *E. coli*, vektoru či Tagu v něm. Při snaze zvýšit rozpustnost proteinu nebo při nízkých teplotách exprese se mohou proteiny koexprimovat v přítomnosti chaperonů (Ventura et al., 2006; Vasina et al., 1997). Nejčastěji se optimalizace podmínek provádí metodou pokus a omyl, kdy se zkouší varianta všech proměnných.

32

2.3.2 Faktory ovlivňující rozpustnost a výtěžek exprese rekombinantního proteinu

• Složení kultivačního media

Optimalizace složení kultivačního média bývá jednou z prvních metodik pro dosažení vyšší exprese i rozpustnosti proteinu, jelikož je tato varianta jedna z nejlevnějších a nejlehčích a byl dokázán pozitivní vliv na rozpustnost některých proteinů (Vincentelli et al., 2003; Chambers et al., 2009). Přidáním některých látek, zejména solí, peptonu a kvasničného extraktu, do kultivačního média je možné zvýšit koncentraci rekombinantního proteinu (Larentis et al., 2011). Některé články uvádí, že složení kultivačních médií (SB, 2YT, TB) není hlavním faktorem pro rozpustnost prokaryotických a eukaryotických proteinů (Vincentelli et al., 2011). Přídavek látky, která je součásti proteinu jako kofaktor nebo prostetická skupina a je nezbytná ke správnému složení proteinu, může zvýšit rozpustnost zabráněním tvorby inkluzních tělísek a celkově zvýšit expresi daného proteinu (Georgiou et al., 1996).

Agregaci proteinů v periplazmatickém prostoru může být zamezeno přidáním vyšších koncentrací polyolů (sorbitol) nebo přidáním sacharidů (sacharosy a dalších), které přímo nemetabolizuje *E. coli*. Tyto látky v buňce zvýší osmotický tlak, což vede k nahromadění osmoprotektních látek (glycin, betain, trehalosa), které následně mohou stabilizovat strukturu nativního proteinu (Georgiou et al., 1996).

Na rozpustnost a expresi proteinu mohou mít vliv i další látky, jako je například etanol, který indukuje expresi, tzv. heat-shock proteinů (proteiny reagující na stresovou odpověď buňky při vysokých teplotách), chlorid sodný, nízkomolekulární thioly a disulfidy, které mají pro změnu vliv na redoxní stav periplazmatického prostoru, čímž ovlivňují tvorbu disulfidické vazby (Chopra et al., 1994).

• Volba expresních hostitelů

Kmen a genetická výbava pro expresi rekombinantních proteinů je velmi důležitá. Je známá celá řada expresních hostitelů, avšak nejčastěji používanou bakterií je stále *E. coli*, u které bylo popsáno mnoho různých expresních druhů. Kmen BL21 je ideální organismus pro rutinní exprese proteinu, jelikož tento druh a od něho dále modifikované organismy mají menší podíl lon a OmpT proteas díky genetické modifikaci, která je zodpovědná za větší stabilitu proteinů (Shaw et al., 1967). Některé další druhy *E. coli*

usnadňují expresi membránových proteinů (Miroux et al., 1996), proteinů se vzácnými kodony (Brinkmann et al., 1989) i disulfidickými vazbami (Prinz et al., 1997) a proteinů, které jsou normálně pro buňky toxické. Tedy použití různých vektorů v různých hostitelských buňkách může výrazně zvýšit produkci daného proteinu, od jehož charakteru by se dané prostředky měli volit.

• Fúzní Tagy

Změna expresních podmínek vždy nevyřeší problém s rozpustností. Lze však jako alternativní nástroj pro vyřešení tohoto problému využít fúzní Tagy, které mohou zvýšit rozpustnost a identifikaci exprimovaných proteinů a mohou mít také vliv na nativní proteinové interakce a na buněčnou lokalizaci rekombinantního proteinu. Velmi často jsou užívány k následné afinitní purifikaci (Young et al., 2012) a bylo dokázáno, že některé Tagy zvyšují výtěžek exprese, dokonce podporují správné sbalení proteinů (Nallamsetty et al., 2007). Je známo mnoho expresních vektorů (pET, pBAD, pCIOX), které obsahují více tagů, jako například His-tag, maltosu vázající protein, ovládané v rámci různých promotorů (T7, TCR a dalších). Volba vhodných Tagů opět závisí na vlastnostech proteinu, které se přizpůsobí maximálnímu účinku exprese.

Nejčastěji používaným afinitním Tagem je již zmíněný His-Tag. Ten je využíván při purifikaci proteinu, kdy dochází ke tvorbě vazby mezi chelatovaným iontem kovu a histidiny daného Tagu. Protein je následně přečištěn a eluován roztoky o různých koncentracích imidazolu, jež kompetituje s histidiny o vazebné místo (Porath, 1992). Existuje i řada dalších afinitních Tagů, jejichž komplexní přehled byl publikován v článku Young et al. z roku 2012.

Načasování indukce

Provedení indukce může sehrát důležitou roli v tvorbě potřebných proteinů. Indukce se nejčastěji provádí ve středu exponenciální fáze růstu buněk, avšak některé publikace hovoří i o pozdní exponenciální fázi (Galloway et al., 2003) nebo dokonce o fázi stacionární (Ou et al., 2004).

• Teplota a doba trvání exprese

Teplota a doba trvání indukce patří mezi dva z nejdůležitějších faktorů podílejících se na vlastnostech konečného produktu. Tvorba inkluzních tělísek bývá většinou spojená s rychle se exprimujícími se proteiny, a proto snížení teploty exprese a tím i snížení rychlosti exprese může zvýšit rozpustnost proteinu. Tato strategie byla účinná u řady složitých proteinů (Hammarstrom et al., 2002). Vysoká teplota sice podporuje růst buněk, avšak má negativní účinky na expresi proteinu, jelikož vyšší míra růstu může vést k vyšší pravděpodobnosti ztrátě plasmidu nebo k chybnému překladu genetické informace expresního vektoru, a to bez ohledu na expresi rekombinantního proteinu.

K agregaci dochází převážně při vyšších teplotách v důsledku velké teplotní závislosti hydrofobních interakcí, které předurčují tento proces (Kiefhaber et al., 1991). V bakteriích jsou přítomny některé proteiny preferující pomalejší a delší indukci, která vyžaduje nízkou teplotu. Pokud daný protein snadno agreguje, ale nemůže být nadměrně exprimován v krátkém čase, pak musí být snížena teplota (Schein et al., 1988). Avšak optimální podmínky pro teplotu a délku exprese je stále zatím potřeba ověřit metodou zkoušení všech proměnných.

• Koncentrace induktoru

Další faktorem ovlivňujícím množství exprimovaného proteinu může být koncentrace induktoru. Jeho nízká koncentrace může vést k neefektivní indukci a tím i k nízkým výtěžkům. Avšak vysoká koncentrace induktoru nemusí být také efektivní. Dochází při ní k plýtvání poměrně drahou látkou, kdy vysoká koncentrace induktoru může mít za následek negativní účinek buďto na buněčný růst, nebo koncentraci rekombinantního proteinu (Ramirez et al., 1994). Optimální koncentrace induktoru je tedy taková, kdy je jen o málo vyšší než kritická koncentrace, která odpovídá minimální koncentraci, při níž se výnos rekombinantního proteinu stává funkcí induktoru (Pananeophytou et al., 2013).

• Lyzační pufry a jiné přísady

Během samotné purifikace proteinu může docházet k tvorbě agregátů a tím může být ovlivněna rozpustnost proteinu (Leibly et al., 2012). Proteiny jsou poměrně citlivé na přítomnost různých koncentrací solí v roztoku. Při vyšších koncentracích může docházet ke vzniku agregátů. Naopak někdy změna koncentrací rozpuštěných solí v tlumícím pufru může přispět k rozpustnosti proteinu (Bondos et al., 2003).

Existuje celá řada proteinových stabilizátorů, které podporují rozpustnost proteinů. Například přidání osmolytů napomáhá k chemickému složení chaperoninů a stabilizaci proteinů. Tyto látky pomáhají čelit mnohým stresovým situacím působícím na daný organizmus (Jain et al., 2009). Nedávno byla vydána publikace, ve které byl testován vliv 141 různých látek na rozpustnost 41 různých rekombinantních proteinů z *E. coli*. Jedenáct těchto látek (např. L-arginin, mannitol, trehalosa, CuCl₂, prolin, xylitol, a další) vykazují schopnosti zvýšit rozpustnost více než 1 z celkových 41 proteinů. U 33 z 41 proteinů byla prokázána zvýšená rozpustnost po přidání některé ze zkoumaných látek při porovnání s kontrolami bez jejich přítomnosti (Leibly et al., 2012).
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité mikroorganizmy a plazmidové konstrukty

Escherichia coli TOP10 - Invitrogen (Carlsbad, USA) *Escherichia coli* BL21 StarTM (DE3) - Invitrogen (Carlsbad, USA) Vektor pCIOX (Obr. 16) - Andrea Mattevi (Univerzita v Pavii, Itálie) Gen At4g04880 z *Arabidopsis thaliana*



Obrázek 16 – Mapa vektoru pCIOX (převzato z www.addgene.org/51300, 25.4.2014).

3.1.2 Přístrojové vybavení

Autokláv MLS 3020 - Sanyo (Mnichov, Německo) Centrifuga Mikro200R - Hettich (Kirchlengern, Německo) Centrifuga Rotanta 460R - Hettich (Kirchlengern, Německo) Centrifuga CL 31R - Multispeed (Thermo elektron corporation, USA) Elektroforéza proteiny Mini-PROTEAN 3 Cell - BIO-RAD (Kalifornie, USA) French press FA-078A-E - Thermo Fischer Scientific (Ascheville, USA) Míchačka magnetická RTC basic - IKAMAG (Praha, ČR) Micro-spektrofotometr ACTGene NAS-99 -INYDIA (Madrid, Španělsko) Kapalinová chromatografie BioLogic LP Systém - BIO-RAD (Kalifornie, USA) pH metr Jenway 3505 Jenway (Staffordshire, UK) Rotační vakuová odparka Concentrato plus - Eppendorf (Německo) Rotační třepačka Kühner Shaker (Birsfelden, Švýcarsko) Spektrofotometr 8453 UV-VIS - Agilent (Santa Clara, USA) Termoblok AccuBlockTM digital Dry Baths - Labnet (New York, USA) Termocykler T - gradient - Biometra (Goettingen, Německo) Termomixer comfort - Eppendorf (Německo) Transiluminátor s bílým světlem TW-200 - Alpha Ingotech (Kalifornie, USA) Váhy Boeco (Hamburg, Německo) Zdroj Standard power Pack P25 - Biometra (Goettingen, Německo) Zdroj Power PAC300 - BIO-RAD (Kalifornie, USA)

3.1.3 Použitý materiál

• *Použity enzymy*

Trypsin - MP Biomedical (Francie), Phusion DNA polymerase - Finnzymes (Vantaa, Finsko), SUMO protease - Invitrogen (Kalifornie, USA), Restrikční endonukleasy: *Hind*III - Neb (Carlow Court, Kanada), *Xho*I - Takara (Shiga, Japonsko).

• Software

Pro ovládání kapalinové chromatografie BioLogicTM Chromatography systems -LP Data View Software 1.03 (California, USA) a pro ovládání spektrometru UV-visible Chemstation Software Agilent (Santa Clara, USA).

• Komerční kit:

Pro stanovení koncentrace proteinu PierceTM BCA protein Assay kit (Rockford, USA). Použité chemikálie jsou uvedeny v Tab. 3.

Výrobce, město a krajina	Chemikálie
původu	
Duchefa (Haarlem, Holansko)	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosidu (IPTG),
	kanamycin, trypton
Fluka (Basel, Švýcarsko)	amoniumperoxodisulfát (APS), Coomassie
	Brilliant Blue R-250, (NH ₄)HCO ₃
Fermentas (Ontario, Kanada)	dNTP Mix, Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder,
	Page Ruler unstained Protein Ladder,
	tetraethylmethylendiamid (TEMED)
Himedia (Indie)	agar
Invitrogen (Carlsbad, USA)	SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard
Lach-Ner (ČR)	CH ₃ COOH, ethanol, glukosa, KCl, KH ₂ PO ₄ ,
	K ₂ HPO ₄ , methanol, NaCl,
Merck (New York, USA)	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O
NeoLab (Heidelberg, Německo)	ethidiumbromid
Penta (Chrudim, ČR)	EDTA-Na ₂ .2H ₂ O, glycerol, NaOH,
Qiagen (Hilden, Německo)	Ni-NTA agarosa
Roth (Karlsruhe, Německo)	Imidazol
Serva (Heidelberg, Německo)	TRIS
Sigma-Aldrich (Německo)	acetonitril (ACN), akrylamid, bromfenolová
	modř, CaCl ₂ , jodacetamid, mercaptoethanol,
	Triton X-100, yeast extract

Tab. 3 - Seznam použitých chemikálií

3.2 Metody

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

Zásobní roztoky o koncentraci 100 mg/ml nebo 50 mg/ml byly připraveny rozpuštěním pevného kanamycinu v destilované vodě. Následně byly roztoky přefiltrovány pomocí sterilní stříkačky a filtru Ophthalsart (0,2 μm) v laminárním boxu (Safe Fast Classic, Faster, Ferrara, Itálie). Stejně tak byl připraven zásobní roztok 20% glukosy, kdy bylo rozpuštěno 100 g glukosy v 500 ml destilované vody.

Pro přípravu 1 litru kultivačního Luria-Bertani (LB) média bylo použito 10 g NaCl, 10 g Tryptonu a 5 g kvasničného extraktu. Následně byla provedena úprava pH pomocí NaOH na výslednou hodnotu 7,0. Získané médium bylo sterilizováno při 121°C po dobu 20 minut. Při kultivaci bakterií, obsahujících rezistenci proti antibiotiku, byl do kultivačního média přidán kanamycin o výsledné koncentraci 50 µg/ml. Taktéž bylo připraveno LB médium s obsahem 2% glukosy přidáním 100 ml 20% glukosy k 900 ml sterilního LB media.

Selekční plotny byly připraveny stejným způsobem, akorát byl přidán do LB média agar o výsledném obsahu 2%. Sterilizovaný roztok byl ochlazen přibližně na 50°C a po přidání kanamycinu o výsledné koncentraci 50 µg/ml byl roztok naléván do plastových Petriho misek.

Veškerá práce se sterilizovanými roztoky a plotnami byla prováděna v laminárním boxu za přísně sterilních podmínek.

3.2.2 Inokulum Escherichia coli

Práce s veškerým bakteriálním materiálem byla prováděna v laminárním boxu za přísně sterilních podmínek. Bakterie *E. coli* BL21 StarTM (DE3) a TOP10 s plasmidem *pCIOX::At4g04880* byly vždy nasazeny vypíchnutím sterilní špičkou pipety ze zamražené kultury při -80°C nebo sterilním párátkem z Petriho misek. Následně byly přeneseny do 2-50 ml (podle potřeby množství další kultivace) LB media s obsahem kanamycinu o koncentraci 50 μg/ml a inkubovány přes noc při 37°C a 160 rpm v orbitálním inkubátoru (Ecotron, Infors HT, Bottmingen, Švýcarsko).

3.2.3 Izolace plazmidové DNA

Bakterie *E. coli* TOP10, inkubované přes noc ve 2 ml média, byly přeneseny do mikrozkumavek a centrifugovány při 5.000 g a 4°C po dobu 3 min, přičemž byl supernatant odlit.

Následně bylo přidáno 0,3 ml roztoku P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM Na₂EDTA, 0,1 mg/ml RNAasy, pH 8,0) a bakteriální pelet byl suspendován pomocí vortexu (Scientific industries vertex-genie 2, New York, USA). Ke směsi bylo napipetováno 0,3 ml roztoku P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS). Mikrozkumavka byla 4x promíchána převrácením v ruce a následně ponechána 5 min při laboratorní teplotě.

Dále bylo přidáno 0,3 ml roztoku P3 (3 M KCH₂COOH, pH 5,5), který byl 5x promíchán převrácením v ruce a ponechán 5 min na ledu.

Po proběhnutí inkubace byla směs centrifugována při 10.000 g, 4°C, po dobu 10 min, kdy byl supernatant přelit do nových mikrozkumavek.

Následně bylo přidáno 0,6 ml isopropanolu a směs byla centrifugována při maximálních otáčkách 14.000 g, 4°C a 10 min.

Supernatant byl odlit. Sraženina DNA byla promyta 0,5 ml 70% ethanolu (-20°C) a centrifugována při 14.000 g, 5 min a 4°C. Supernatant byl odlit, jeho zbytky byly odstředěny na dno mikrozkumavky a odpipetovány. DNA byla ponechána sušit 10 min v digestoři (Merci M 1200, Brno, ČR). Vysušená sraženina plazmidové DNA byla finálně resuspedována v 0,03 ml TE pufru (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) a její koncentrace byla stanovena pomocí NanoDropu (ACTGene, NAS-99 – INYDIA, Madrid, Španělsko).

3.2.4 Restrikce plazmidové DNA

Použití restrikčních enzymů (Tab. 4) sloužilo ke kontrole připraveného konstruktu a správnosti provedení transformace. Restrikční endonukleasy jsou vysoce sekvenčně specifické enzymy, které štěpí většinou krátký úsek 4-7 nukleotidové sekvence dvouřetězcové DNA za tvorby tupých nebo kohezních konců (*Hind*III 5'A^{*}AGCTT 3' a *Xho*I 5'C^{*}TCGAG 3')

Štěpení restrikční směsi (0,53 µl *Xho*I, 0,2 µl *Hind*III, 2 µl plazmidové DNA, 4 µl 10x Tango pufru a 13,27 µl PCR vody), kdy koncentrace plazmidové DNA byla v rozmezí 10-20 µg/µl, bylo provedeno podle manuálu výrobce při 37°C v inkubátoru přes noc. Následně byl výsledek restrikční analýzy vyhodnocen pomocí elektroforetické separace.

Tabulka 4 – Seznam použitých restrikčních endonukleas

Restrikční enzym	Teplota	Pufr
XhoI	37°C	10x Tango
HindIII	37°C	10x Tango

3.2.5 Elekroforetická separace izolované plazmidové DNA

50-55 ml rozpuštěné 1% agarosy v 1x TAE pufru (40 mM Tris-acetát, 1mM EDTA, pH 8,0) bylo nalito do horizontální elektroforetické komůrky (Casting System Compact Biometra, Goettingen, Německo). Dále bylo připipetováno a zamícháno použitou špičkou 5µl ethidiumbromidu o koncentraci 0,5 µg/ml. Do gelu byl zasazen hřebínek a byl ponechán 30 minut tuhnout.

Po odstranění hřebínku a postranní plastové desky byla komůrka vložena do elektroforetické cely čelem ke katodě (záporná) a zalita přibližně 500 ml elektrodového pufru 1x TAE (40 mM Tris-acetát, 1mM EDTA, pH 8,0) tak, aby hladina byla nad agarosovým gelem.

K 20 μl vzorku bylo připipetováno 5 μl 6x koncentrovaného vzorkovacího pufru a jako standard byl použit Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder o objemu 5 μl.

Vzorky a standard byly naneseny do jednotlivých jamek a jejich pozice byla zaznamenána pro následnou identifikaci. Poté byla cela zakryta bezpečnostním víkem a připojena ke zdroji, kde bylo nastaveno napětí 120 V po dobu 30-40 minut. DNA fragmenty s inkorporovaným ethidiumbromidem byly následně vizualizovány pomocí UV transluminátoru a vyfoceny digitálním fotoaparátem (Lumix DMC-TZ6, Osaka, Japonsko).

3.2.6 Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction, PCR)

Metoda sloužící k rychlému zmnožení daného úseku DNA, která využívá vlastností DNA-polymerásy *in vitro*. Krátké oligonukleotidy tzv. primery nasedají na úseky DNA, které mají být zmnoženy vždy každý z jedné strany, původního dvouvláknového řetězce.

Jako templát pro polymerázovou reakci byla použita izolovaná plazmidová DNA obsahující gen At4g04880.

Podmínky pro reakci PCR:

- 1. Počáteční denaturace 98°C / 30 s
- 2. Denaturace 28 °C / 7 s
- 3. Nasazení primerů 64°C / 25 s
- 4. Elongace $72^{\circ}C / 30 \text{ s}$

Body 1-4 se cyklicky opakují 24x

5. Závěrečná elongace 72°C / 10 min

Složení reakční směsi (20 μl)
1 μl vzorku
4 μl 5x High Fidelity PCR Buffer
0,2 μl Phusion DNA polymerase
0,2 μl 50mM forward primeru 5'-AAGCTTTAATGGAATGGATACAATCACTG-3'
0,2 μl 50mM reverse primeru 5'- CTCGAGCTAAACGTGCTCTGGCGA- 3'
14 μl PCR vody
0,4 μl 10mM dNTP mix

3.2.7 Transformace E.coli BL21 StarTM (DE3) tepelným šokem "Heat shock"

K 50 µl chemicky kompetentních buněk v mikrozkumavce umístěných na ledu bylo přidáno 5 µl plazmidové DNA. Směs se nechala inkubovat na ledu po dobu 10-15 minut. Poté byla mikrozkumavka přemístěna do předem vyhřátého termobloku (AccuBlockTM digital Dry Baths, Labnet, New York, USA) na 42°C po dobu 60 s. Po teplotním šoku byla zkumavka přenesena zpět na led, kde proběhla inkubace další 2-3 minuty. Ke kultuře bylo přidáno 300 µl SOC (2% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 9,95 mM MgCl₂, 20 mM glukosa) media a následně byla regenerována při 37°C po dobu 1 hod v rotačním inkubátoru.

Po inkubaci byla transformovaná kultura rozetřena pomocí sterilní hokejky na Petriho misky s LB agarem (2%) obsahující kanamycin o koncentraci 50 µg/ml a inkubována při 37°C do druhého dne ve statickém inkubátoru.

3.2.8 Kultivační a expresní podmínky

Kultivována byla expresní bakterie *E. coli* BL21StarTM (DE3) obsahující plazmid *pCIOX::At4g04880*, kdy byl z narostlého inokula odebrán 1ml kultury pro další kultivaci. Ta probíhala vždy v 50 ml LB media s kanamicinem (50 mg/ml), popřípadě s 2% glukosou v Erlenmayerových baňkách při 37°C v rotační inkubátoru o 160 rpm. Nárůst buněk byl sledován pomocí měření optické hustoty při 600 nm do dosáhnutí hodnot 0,4; 0,6; 0,8; 1. Ke kultuře bylo následně přidáváno indukční činidlo isopropyl

β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) o různých koncentracích (0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 1,0 mM), čímž byla zahájena exprese proteinu. Erlenmayerovy baňky s kulturou byly přemístěny do třepací místnosti při otáčkách 160 rpm a různých expresních teplotách (17°C, 18°C, 20°C), kde byly kultivovány po dobu 18 hodin. Následně byly kultury centrifugovány při 4.500 g při 4°C po dobu 15-20 minut. Supernatant byl odlit a pelety byly buďto hned zpracovány nebo zamraženy při - 80°C.

3.2.9 Lýze buněk E. coli BL21StarTM (DE3) pCIOX::At4g04880

Lýze buněk byla provedena dvojím způsobem. Při nižších množstvích určených k optimalizaci expresních podmínek byla využita lýze buněk tepelným šokem. Při expresi většího množství kultury, určeného k získání daného proteinu, byl použit přístroj French Press.

• <u>Lýze buněk pomocí tepelného šoku:</u>

Bakteriální pelet v mikrozkumavkách byl rozsuspendován v lyzačním pufru (50 mM KH₂PO₄, 50 mM K₂HPO₄, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glycerol, 0,5% Triton X-100, 10 mM imidazol, při optimalizaci exprese dle manuálu pETSUMO). Následně byly mikrozkumavky ponořeny do tekutého dusíku na dobu 1-2 minut. Poté byly pomocí pinzety vyndány z tekutého dusíku a vloženy do předem předehřátého termobloku na 42°C, vždy po dobu úplného rozpuštění. Tento proces byl opakován 3x a následně byly vloženy mikrozkumavky do centrifugy na 15-20 min při 14.000 g a 4°C. Supernatant byl přenesen do sterilních popsaných mikrozkumavek, které byly zamraženy při -20°C.

• <u>Lýze buněk pomocí přístroje French Press:</u>

Jednotlivé části tohoto zařízení byly umístěny na led, aby se nachladily. Následně byla sestavena celá souprava French Pressu a celý přístroj byl promyt 3x destilovanou vodou. Poté následovala samotná lýze, kdy byl pelet rozpuštěný v lyzačním pufru (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.0, při expresi většího množství pro následnou purifikaci na Ni-NTA agarosové koloně dle manuálu), odstátý 30 min na ledě a následně byl nasát do přístroje. Tento krok se opakoval 3x při tlaku 25 000 PSI. Získaný lyzát byl centrifugován při 12.000 g, 4°C po dobu 40 min. Supernatant byl odebrán do nových zkumavek a skladován při 4°C. Přístroj byl poté promyt 3x destilovanou vodou a v posledním kroku napuštěn 2% incidurem po dobu 30 minut. Po vypuštění dezinfekce a rozložení přístroje byly všechny součástky umyty destilovanou vodou a ethanolem.

3.2.10 Eletroforéza v polyakrylamidovém gelu s přítomností SDS (SDS-Page)

SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza slouží k separaci proteinů na základě jejich velikosti (molekulové hmotnosti). Při zahřátí vzorku dochází k jeho denaturaci a navázání molekul SDS (dodecylsulfátu sodného), který udělí proteinu vysoký záporný náboj přímo úměrný jeho hmotnosti. Po nanesení vzorku (proteinu) na gel a umístění gelu do elektrického pole dochází k migraci proteinů ke kladné elektrodě (anodě).

• Postup provedení SDS-Page:

Prvním krokem byla příprava gelů pro následnou separaci. Formovací skla byla vložena do speciálního stojánku a jako první byla nalita vrstva separačního roztoku (Tab. 5). Hladina separačního roztoku byla překryta vrstvou n-butanolu tak, aby nedošlo k přístupu kyslíku. Roztok tuhnul přibližně 30 minut a poté byla slita vrstva n-butanolu. Následně byl již vzniklý gel převrstven koncentračním roztokem (Tab. 5), do kterého byl vložen hřebínek, který vytvořil potřebné jamky. Vytvořené gely byly vloženy do elektroforetické vaničky a byl jim opatrně odejmut hřebínek tak, aby se vytvořené jamky nepoškodily. Do vaničky a mezi přiložená skla s gelem byl přilit elektrodový pufr (50 mM Tris-HCl, 384 mM glycin, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, pH 8,3). Do jedné z jamek byl vždy nanesen standard a do ostatních byly naneseny vzorky smíchané v poměru 3:1 se vzorkovacím pufrem (0,05 mol/l Tris-HCl, 2 mmol/l EDTA, 2% SDS, 10% glycerol, 0,2% bromfenolová modř, 6% merkaptoethanol, pH 6,8), které byly denaturovány 5 min při 99 °C.

Po upevnění elektrodového krytu byla elektroforéza zapnuta při 100 V po dobu přibližně 25-30 min, dokud se vzorky nezakoncentrovaly. Následně bylo zvýšeno napětí na 120 V a elektroforéza běžela potřebnou dobu pro doputování vzorku na konec gelu cca 1,5 hodiny.

Tabulka 5 – Jednotlivé přísady pro tvorbu SDS-Page gelu

SEPARAČNÍ GEL 10% (na přípravu dvou gelů)

7,26 ml destilovaná voda 5 ml 30% akrylamidový roztok (29,2% akrylamidu, 0,8% N,N-bis-methylen-akrylamidu) 2,5 ml separační pufr (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8) 0.15 ml 10% SDS 0,75 ml 10% persíran amonný 0,015 ml TEMED

× /

	KONCENTRAČNÍ GEL 5% (na přípravu dvou gelů)				
-	5,13 ml destilovaná voda				
	1 ml 30% akrylamidový roztok (29,2% akrylamidu, 0,8% N,N-bis-methylen-akrylamidu)				
	1,25 ml koncentrační pufr (1 M Tris-HCl, pH 6,8)				
	0,75 ml 10% SDS				
	0,05 ml 10% persíran amonný				
	0.01 ml TEMED				

3.2.11 Obarvení gelu pomocí Coomassie Briliant Blue R-250

Pro vyhodnocení výsledků z SDS-Page byl vždy gel obarven pomocí barvicího roztoku (0,025% Coomassie Briliant Blue R-250, 50% methanol, 10% kyselina octová) po dobu minimálně 30 minut. Poté byl roztok vyměněn za odbarvovací (40% methanol, 10% kyselina octová a destilovaná voda) a inkubovaný přibližně 10-15 minut. Takto připravený gel byl oskenován pomocí scanneru (Image Scanner PoverLook 1120 USG, AP Czech, ČR). Gel byl uchováván při 4°C ve vodě po potřebnou dobu.

3.2.12 Purifikace pomocí Ni-NTA agarosy

Ve vektoru pCIOX je obsažen 8x His Tag, který umožňuje afinitní purifikaci fúzního proteinu prostřednictvím vazby na niklové ionty. Následně je protein obsahující tento Tag eluován z kolony různými koncentracemi imidazolu, který kompetituje o vazebné místo s proteinem. Jednotlivé frakce byly jímány do zkumavek a zhodnoceny pomocí SDS-Page.

<u>Postup byl následující:</u>

Kolona byla nejprve ekvilibrována pomocí roztoku (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0), a to tak, aby byl promyt objem kolony minimálně 10x průtokem 1 ml/min při 4°C.

Následně byl supernatant, který byl získán lýzí exprimovaných buněk a následnou centrifugací, nanášen na kolonu přes noc průtokem 0,25 ml/min při 4°C. Druhý den byly nenavázané proteiny vymyty promývacím roztokem (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0) a průtok kolony byl zvýšen na 0,75-1 ml/min při 4°C. Frakce byly jímány do jednotlivých zkumavek. Po ustálení hodnot konduktivity a UV následovala samotná eluce proteinu z kolony za použití elučních roztoků se stoupající koncentrací imidazolu (1. 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 120 mM imidazol, pH 8,0; 2. 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0; 3. 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 600 mM imidazol, pH 8,0).

Regenerace kolony byla provedena promytím 0,5 M NaOH a destilovanou vodou, opět 10 objemů kolony. Následně byla kolona uskladněna v 20% etanolu.

3.2.13 Dialýza a zakoncetrování proteinu

Na základě elektroforetické analýzy jednotlivých frakcí byla frakce, která obsahovala náš protein, dialyzována pomocí dialyzační membrány ve 2 L roztoku (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5% glycerol, pH 8,0) na magnetické míchačce přes noc při 4°C. Část dialyzovaného roztoku byla poté přelita do speciální koncentrační zkumavky s filtrem (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, 10 000 MWCO), kdy byl vždy po zahuštění určitého podílu proteinu přidán zbývající roztok a opět centrifugován při 4.000 g a 4°C. Zakoncetrovaný protein byl následně přepipetován do označených mikrozkumavek a uschován při -20°C.

3.2.14 Stanovení koncentrace rekombinantní adenosindeaminasy metodou BCA

Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí bicinchoninové metody (BCA, PierceTM BCA protein Assay kit), která je založená na alkalické redukci mědnatého iontu na měďný protein, a následné chelataci měďného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku červeného zbarvení.

<u>Pracovní postup:</u>

50 μl vzorku bylo napipetováno do mikrozkumavky a následně byl přidán 1 ml pracovního roztoku (získán smícháním reaktantu A s reaktantem B v poměru 50:1, součást kitu). Taktéž k 50 μl 9 připravených standardů byl připipetován 1 ml pracovního roztoku.

Připravené roztoky byly promíchány na vortexu a inkubovány při 37°C po dobu 30 minut.

Vzorky byly proměřeny při 562 nm a jako blank sloužil 1 ml pracovního roztoku s 50 µl vody taktéž inkubován za stejných podmínek. Standardy obsahovaly naředěný zásobní BSA (hovězí sérový albumin, bovine serum albumine, koncentrace 2 mg/ml) v rozmezí od 25-2000 µg/ml. Koncentrace byla určena pomocí kalibrační křivky standardů.

3.2.15 Příprava vzorků pro identifikaci proteinů pomocí LC-ESI-QTOF

Při přípravě jednotlivých vzorků se musí postupovat velice opatrně, a to již od chvíle samotné přípravy gelu a provedení SDS-Page s následným uskladněním vzorku. Při špatném zacházení a uskladnění může docházet ke kontaminaci gelu a vzorků keratinem, který následně brání přesnému analyzování. Proto byla práce se vzorkem prováděna vždy v rukavicích a laminárním boxu. Upravený metodický postup štěpení vycházel z protokolu publikovaného skupinou A. Shevchenko et al., 1996 a postup odsolování (Tab. 6) podle protokolu publikovaného J. Rappsilberem et al., 2007.

<u>Vyřezávání a štěpení jednotlivých vzorků:</u>

Vybrané vzorky, umístěné v separačním gelu uloženém ve vodě, byly přeneseny do laminárního boxu, kde byl gel položen na navlhčené sklo. Pomocí skalpelu byly vyříznuty vybrané pásy a ty byly následně rozřezány na přibližně 1x1 mm kostičky, které byly přemístěny do označené 1,5 ml mikrozkumavky.

Kousky gelu byly následně promyty pomocí 600 μ l roztoku 30% acetonitrilem (ACN) a 70% 100 mmol/l roztoku NH₄HCO₃. Poté byly vzorky umístěny do thermomixéru, kde byly inkubovány po dobu 30 min. Následně byl odpipetován odbarvovací roztok a ke kostkám bylo přidáno 600 μ l 100% ACN. Po 10 min byl ACN odpipetován a otevřené mikrozkumavky byly ponechány v laminárním boxu po dobu 15 min.

Ke vzorkům v mikrozkumavkách bylo připipetováno 50 μl redukčního činidla (10 mmol/l DTT v 100 mmol/l roztoku NH₄HCO₃) a následně byly vzorky inkubovány při 56 °C 30 minut. Po uplynutí této doby byl redukční roztok odpipetován.

Následně bylo ke vzorům přidáno 50 μ l připraveného alkylačního činidla (jodacetamid o koncentraci 55 mmol/l v 100 mmol/l roztoku NH₄HCO₃). Vzorky byly krátce promíchány a inkubovány 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Poté byl alkylační roztok odpipetován a vzorky byly promyty 600 μ l 20 mmol/l roztoku NH₄HCO₃ 15 min při laboratorní teplotě. Na závěr byly vzorky opět promyty 600 μ l 100% ACN a sušeny v laminárním boxu.

Do mikrozkumavek, obsahujících kousky gelu, bylo napipetováno 50 μ l trypsinu (15 ng/ μ l) v 20 mmol/l NH₄HCO₃ a 1 mmol/l CaCl₂ a byly inkubovány v laminárním boxu v termomixéru po dobu 20 minut. Následně byl ještě přidán roztok trypsinu tak, aby kostičky gelu byly ponořeny v roztoku. Štěpení probíhalo přes noc při 37°C.

Ráno byla provedena extrakce z kousků gelu pomocí 100 μl 5% kyseliny mravenčí (formic acid, FA) a 30% ACN. Směs byla za stálého míchání inkubována 15 minut při 37 °C. Poté byl gel reextrahován při stejných podmínkách. Následně byly vzorky odpařeny ve vakuové odparce a rozpuštěny v 50 μl 5% FA.

<u>Odsolování vzorků:</u>

Vytvořené SPE (extrakce tuhou fází) mikrokolonky z pipetovacích špiček 20-200 µl a sorbentu C18, který byl do špiček zatlačen pomocí kovové hamiltonky, byly vloženy do víček mikrozkumavek a umístěny do centrifugy. Sorbent byl aktivován pomocí 50 µl isopropanolu (iPrOH) celkem dvakrát a následně dvakrát ekvilibrován 50 µl 5% FA.

Špičky se sorbentem byly přemístěny do předem označených mikrozkumavek a byly naneseny vzorky, které byly poté promyty 50 µl a 5 µl 5% FA. Mikrozkumavky obsahující protečený roztok byly zaparafilmovány, zamraženy při -80°C a kolonky přeneseny do nových mikrozkumavek.

Eluce vzorků probíhala pomocí 50 µl roztoku 50% MeOH s 2,5% FA celkově dvakrát (Tab. 6). Eluáty byly přepipetovány do čistých mikrozkumavek a odpařeny ve vakuové odparce při 30°C. Vzorky byly zamraženy při -80°C.

49

Tabulka 6 – Postup při odsolení vzorků peptidů

Aktivace a ekvilibrace kolony C18						
Krok	Roztok	Objem (µl)	Otáčky (rfc)	Čas (min)		
1	iPrOH	50	4.000	2,5		
2	iPrOH	50	4.000	2,5		
3	5% FA	50	2.000	2,5		
4	5% FA	50	2.000	2,5		
	Nan	esení a promytí vz	orku			
Krok	Roztok	Objem (µl)	Otáčky (rfc)	Čas (min)		
1	vzorek	50	1.250-1.500	7,5		
2	5%FA	50	2.000	2,5		
3	5% FA	5	2.000	2,5		
Eluce vzorku						
Krok	Roztok	Objem (µl)	Otáčky (rfc)	Čas (min)		
1	50% MeOH	50	1.500	5		
2	50% MeOH	50	1.500	5		

3.2.16 Štěpení SUMO Tagu SUMO proteasou

Získaný rekombinantní protein obsahoval tzv. SUMO Tag vložený ve vektoru pCIOX. SUMO Tag je sekvence obsažená těsně před sekvencí kódující samotný protein, což umožňuje lepší identifikaci a purifikaci rekombinantnímu proteinu. Jelikož je sekvence aminokyselin SUMO Tagu rozpoznána enzymem SUMO proteasou, který tento Tag odštěpuje, můžeme následně získat čistý protein.

• <u>Postup optimalizace štěpení:</u>

Po zjištění koncentrace purifikovaného a zahuštěného proteinu byl vypočítán jeho podíl pro přípravu směsi (Tab. 7) štěpené SUMO proteasou. Byly připraveny čtyři směsi, které byly inkubovány při 4°C, 16°C, 21°C, 30°C po dobu 1, 2, 3, 6, hodin a přes noc. Po uplynutí jednotlivých časových intervalů bylo vždy odebráno 20 µl z každé mikrozkumavky, které byly následně zhodnoceny pomocí metody SDS-Page. Po vyhodnocení dílčích výsledků, byly nejlépe vypadající hodnoty přiřazeny k sobě a opět zhodnoceny metodou SDS-Page.

Tabulka 7 – Složení směsi pro optimalizaci štěpení SUMO proteasy

His-SUMO-ADA	20 µg (objem dle koncentrace proteinu)
10x SUMO proteasový pufr	20 µl
Voda do celkového objemu 190 µl	Nutno dopočítat
SUMO proteasa	10 µl
Celkový objem	200 µl

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato bakalářská práce vycházela z článku Pospíšilová et al., 2008, kde již byla popsána exprese a charakterizace genu At4g04880 z *Arabidopsis thaliana* kódující domnělou adenosindeaminasu. Výtěžek proteinu po expresi a následnou purifikaci byl velmi nízký. Proto experimentální část této práce byla zaměřena na zvýšení exprese adenosindeaminasy prostřednictvím nalezení optimálních podmínek exprese s následnou kvalitativní purifikaci s nízkými ztrátami. Vyřešení těchto podmínek je nezbytné pro získání adenosindeaminasy o vysoké čistotě pro její následnou krystalizaci.

4.1 Příprava konstruktu *pCIOX::At4g04880* pro následnou transformaci do *E.coli* BL21 StarTM (DE3)

Samotné transformaci plazmidu *pCIOX::At4g04880* do expresních buněk předcházela transformace tohoto plazmidu do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10 tepelným šokem. Transformované buňky *E. coli* byly poté vyselektovány na LB agarových plotnách s kanamycinem, přičemž narostlo nespočetné množství kolonií. Z těchto transformantů byla posléze izolována plazmidová DNA, která byla podrobena restrikční analýze enzymy *Hind*III a *Xho*I (Obr. 17).



Obrázek 17 – Výsledek restrikční analýzy vektoru *pCIOX::At4g04880* z bakterií *E. coli* **TOP10** (A-B). Velikost prázdného vektoru pCIOX je 5698 bp, velikost samotného genu At4g04880 je 1068 bp, a tedy vektor s vloženým genem At4g04880 je velký 6766 bp.

Jen u 20% izolových plazmidových DNA, byl pozitivní nález genu At4g04880 z *Arabidopsis thaliana*. Výsledky byly poměrně slabě patrné, proto bylo rozhodnuto o namnožení pozitivních výsledků pomocí metody PCR (Obr. 18). Správnost sekvence našeho genu byla také potvrzena specializovanou firmou (SEQme), kam byl vektor s genem zaslán na osekvencování.



Obrázek 18 – Výsledek namnožení pozitivních nálezů metodou PCR. Velikost genu je1068 bp.

Tímto byla potvrzena přítomnost požadovaného genu ve vektoru. Rekombinantní plazmid *pCIOX::At4g04880* byl následně transformován tepelným šokem do expresních bakterií *E. coli* BL21 StarTM (DE3). Bakterie obsahující plazmid byly selektovány na LB agarových plotnách obsahujících kanamycin. Z narostlých kolonií bylo nasazeno inokulum. Z něho bylo odebráno 0,5 ml kultury, ke které se přidalo 0,5 ml 50% glycerolu, a kultura byla zamražena při -80°C pro následnou optimalizaci expresních podmínek a expresi většího množství bakterií.

4.2 Optimalizace expresních podmínek

Optimalizace expresních podmínek fúzního proteinu byla provedena prověřením všech proměnných, které by mohly pozitivně ovlivnit výtěžek exprese. Konkrétně se jednalo o koncentraci induktoru, teplotu exprese, bakteriální nárůst do určité optické hustota před indukcí.

Transformované bakterie *E. coli* BL21 StarTM (DE3) a bakterie neobsahující připravený plasmid (kontrola) byly kultivovány v 50 ml LB media s obsahem kanamycinu 50 μg/ml nebo s obsahem kanamycinu 50 μg/ml a 2% glukosy (Obr. 19-

25). V obou případech byly bakterie kultivovány do dosažení rozdílných optických hustot OD_{600nm} (0,4; 0,6; 0,8; 1). Indukce byla následně provedena přidáním IPTG o koncentracích: 0,2 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 1mM. Dalším testovaným faktorem byla teplota exprese, a to 17°C; 18°C nebo 20°C po dobu 18 hodin. Jako druhá kontrola byly použity bakterie *E. coli* BL21 StarTM (DE3) obsahující plazmid *pCIOX::At4g04880*, ke kterým nebylo přidáváno indukční činidlo (Obr. 19-21, vzorek 5 a Obr. 22-23, vzorek 2). Po proběhnutí exprese a následné lýze buněk (viz kapitola 3.2.9) byly výsledky zhodnoceny pomocí metody SDS-Page. Molekulová hmotnost exprimovaného proteinu His-SUMO-ADA byla vypočtena pomocí programu BioEdit na základě aminokyselinové sekvence a odpovídá přibližně 55 kDa. Tato hodnota nám poskytuje možnost orientace mezi pásy získanými pomocí SDS-Page.



Obrázek 19 – Výsledky exprese při 17°C. A) $OD_{600nm} = 0,4$; B) $OD_{600nm} = 0,6$; C) $OD_{600nm} = 0,8$ a D) $OD_{600nm} = 1$. Vzorky 1-5 jsou kontroly, 1-4 jsou expresní bakterie bez plasmidu. Vzorek 5 obsahuje plasmid. Vzorky 6-9 indukované bakterie s plastidem. Indukce vzorků 1) 0,2 mM; 2) 0,4 mM; 3) 0,6 mM; 4) 1 mM; 5) 0 mM; 6) 0,2 mM; 7) 0,4 mM; 8) 0,6 mM a 9) 1 mM.



Obrázek 20 – Výsledky exprese při 18°C. A) $OD_{600nm} = 0,4$; B) $OD_{600nm} = 0,6$; C) $OD_{600nm} = 0,8$ a D) $OD_{600nm} = 1$. Vzorky 1-5 jsou kontroly, 1-4 jsou expresní bakterie bez plasmidu. Vzorek 5 obsahuje plasmid. Vzorky 6-9 indukované bakterie s plastidem. Indukce vzorků 1) 0,2 mM; **2**) 0,4 mM; **3**) 0,6 mM; **4**) 1 mM; **5**) 0 mM; **6**) 0,2 mM; **7**) 0,4 mM; **8**) 0,6 mM a **9**) 1 mM.



Obrázek 21 – Výsledky exprese při 20°C A) $OD_{600nm} = 0,4$; B) $OD_{600nm} = 0,6$; C) $OD_{600nm} = 0,8$ a D) $OD_{600nm} = 1$. Vzorky 1-5 jsou kontroly, 1-4 jsou expresní bakterie bez plasmidu. Vzorek 5 obsahuje plasmid. Vzorky 6-9 indukované bakterie s plastidem. Indukce vzorků 1) 0,2 mM; 2) 0,4 mM; 3) 0,6 mM; 4) 1 mM; 5) 0 mM; 6) 0,2 mM; 7) 0,4 mM; 8) 0,6 mM a 9) 1 mM.

Po tomto prvotním testování bylo zjištěno, že bakterie *E. coli* BL21 StarTM (DE3) bez transformovaného vektoru neprodukují žádný protein ve zvýšeném množství, jehož molekulová hmotnost odpovídá ADA. Také bylo zjištěno, že bakterie obsahující tento plazmid, u nichž neproběhla indukce IPTG, samovolně cílový protein neprodukují. Bakterie nesoucí plazmid *pCIOX::At4g04880*, u kterých byla provedena indukce, produkují poměrně velké množství žádaného proteinu.

Dále byl zkoumán vliv glukosy na expresi rekombinantního proteinu. Na základě výše provedené analýzy byla zhodnocena výtěžnost exprese, a jako nejlépe vypadající podmínky byly vybrány teploty 18°C a 20°C při OD_{600nm} 0,4 a 0,6, pro které se provedla exprese v přítomnosti 2% glukosy (Obr. 22, 23).

56



Obrázek 22 – Výsledky exprese při různých podmínkách s přidanou 2% glukosou při 18°C. OD_{600nm} jednotlivých bakterii před indukcí A) 0,4; B) 0,6. Indukce jednotlivých vzorků **1**) 0,4 mM; **2**) 0 mM; **3**) 0,2 mM; **4**) 0,4 mM; **5**) 0,6 mM a **6**) 1 mM.



Obrázek 23 – Výsledky exprese při různých podmínkách s přidanou 2% glukosou při 20°C. OD_{600nm} jednotlivých bakterií před indukcí A) 0,4 B) 0,6. Indukce jednotlivých vzorků **1**) 0,4 mM; **2**) 0 mM; **3**) 0,2 mM; **4**) 0,4 mM; **5**) 0,6 mM a **6**) 1 mM.

Z výsledků bylo patrné, že přidáním glukosy do kultivačního média nebylo dosaženo zvýšení exprese, naopak exprese proteinu byla menší než v kultivačním médiu bez glukosy. Následně byly vybrány podmínky, u kterých byla pozorována vyšší míra exprese His-SUMO-ADA, a ty byly přiřazeny k sobě pomocí metody SDS-Page (Obr. 24, 25).



Obrázek 24 – Výsledky exprese vybraných nejvhodnějších podmínek přiřazených k sobě při OD_{600nm} **0,4. 1**) $c_{(IPTG)} = 0,2 \text{ mM a } 18^{\circ}\text{C}; 2$) $c_{(IPTG)} = 0,2 \text{ mM a } 20^{\circ}\text{C}; 3$) $c_{(IPTG)} = 0,4 \text{ mM a } 18^{\circ}\text{C}; 4$) $c_{(IPTG)} = 0,4 \text{ mM a } 20^{\circ}\text{C}; 5$) $c_{(IPTG)} = 0,6 \text{ mM a } 18^{\circ}\text{C}; 6$) $c_{(IPTG)} = 0,6 \text{ mM a } 20^{\circ}\text{C}; 7$) $c_{(IPTG)} = 1 \text{ mM a } 18^{\circ}\text{C } a 8$) $c_{(IPTG)} = 1 \text{ mM a } 20^{\circ}\text{C}.$



Obrázek 25 – Výsledky exprese vybraných nejvhodnějších podmínek přiřazených k sobě při OD_{600nm} **0,6. 1**) $c_{(IPTG)} = 0,2 \text{ mM a } 18^{\circ}\text{C};$ **2**) $c_{(IPTG)} = 0,2 \text{ mM a } 20^{\circ}\text{C};$ **3**) $c_{(IPTG)} = 0,4 \text{ mM a } 18^{\circ}\text{C};$ **4**) $c_{(IPTG)} = 0,4 \text{ mM a } 20^{\circ}\text{C};$ **5**) $c_{(IPTG)} = 0,6 \text{ mM a } 18^{\circ}\text{C};$ **6**) $c_{(IPTG)} = 0,6 \text{ mM a } 20^{\circ}\text{C};$ **7**) $c_{(IPTG)} = 1 \text{ mM a } 18^{\circ}\text{C } a$ **8**) $c_{(IPTG)} = 1 \text{ mM a } 20^{\circ}\text{C}.$

Na základě porovnávání výše uvedených podmínek byly zvoleny optimální podmínky pro expresi rekombinantního proteinu His-SUMO-ADA. Jedná se o variantu kultivace *E. coli* BL21 StarTM (DE3) v LB médiu s obsahem kanamycinu 50 µg/ml. Samotná indukce exprese bude probíhat při optické hustotě 0,4 s přídavkem 0,6 mM IPTG při teplote 18°C po dobu 18 hodin (Obr. 24; řada 5). Následně byl připraven 1 L kultury za daných podmínek a byla zahájena purifikace proteinu.

4.3 Purifikace rekombinantního proteinu His-SUMO-ADA

Exprimovaný rekombinantní protein His-SUMO-ADA byl purifikován pomocí Ni-NTA agarosové kolony. Po lýzi buněk pomocí French Pressu a centrifugaci byl supernatant obsahující fúzní ADA nanášen přes noc na kolonu. Po promytí kolony, byl protein eluován pomocí roztoků o různých koncentrací imidazolu (Obr. 26). Jednotlivé frakce byly jímány do zkumavek a pomocí SDS-Page byl zjišťován největší podíl ADA v dané frakci (Obr. 27). Největší obsah měl být dle protokolu v oblasti 250 mM imidazolu.



Obrázek 26 – **Chromatogram eluce His-SUMO-ADA. 1**) promývací roztok (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0); **2**) eluční roztok (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 120 mM imidazol, pH 8,0); **3**) eluční roztok (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0) a **4**) eluční roztok (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 600 mM imidazol, pH 8,0).



Obrázek 27 – Výsledky purifikace pomocí Ni-NTA agarosy vizualizované pomocí SDS-Page. 1) po lýzi peletu; **2**) supernatan po centrifugaci; **3**) průplach kolony I.; **4**) průplach kolony II.; **5**) eluce 120 mM imidazolem; **6**) eluce 250 mM imidazolem a **7**) eluce 600 mM imidazolem.

Z výsledků je patrné, že největší podíl byl eluován právě 250 mM imidazolem a jen malá část proteinu byla přítomna v jiných frakcích. Následně byl získaný roztok dialyzován přes noc a poté zahuštěn pomocí speciální zkumavky s filtrem (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, 10 000 MWCO). Koncentrace byla měřena metodou BCA, kdy byla po sestrojení kalibrační křivky pomocí standardů stanovena koncentrace rekombinantního proteinu na **2,123 mg/ml.**

4.4 Identifikace jednotlivých proteinů pomocí LC-ESI-QTOF

Z SDS-Page gelu byly vyříznuty dva pásy odpovídající molekulové hmotnosti 55 kDa (Obr. 27, 6 řádek) a ~ 40 kDa (Obr. 33, 1 řádek), které byly dále upraveny dle protokolu (viz kapitola 3.2.15) pro následnou analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie. Zpracované vzorky byly analyzovány na oddělení biochemie proteinu a proteomiky (Obr. 28- 31).

1	MGSSHHHHHH	HHGSGLVPRG	SASMSDSEVN	QEAKPEVKPE	VKPETHINLK	1
51	VSDGSSEIFF	K IKKTTPLR R	LMEAFAK RQG	KEMDSLR fly	DGIRIQADQT	-
101	PEDLDMEDND	IIEAHREQIG	GRGSEFELRR	QALMEWIQSL	PKIELHAHLN	
151	GSIRDSTLLE	LAR VLGEK GV	IVFADVEHVI	QKNDRSLVEV	FKLFDLIHKL	
201	TTDHKTVTRI	TR EVVEDFAL	ENVVY LELRT	TPKRSDSIGM	SK RSYMEAVI	
251	QGLRSVSEVD	IDFVTASDSQ	KLHNAGDGIG	R KKIYVR LLL	SIDRRETTES	
301	AMETVKLALE	MRDVGVVGID	LSGNPLVGEW	STF LPALQYA	KDNDLHITLH	
351	CGEVPNPK EI	QAMLDFKPHR	IGHACFFKDE	DWTKLKSFRI	PVEICLTSNI	
401	VTKSISSIDI	HHFADLYNAK	HPLILCTDDF	GVFSTSLSNE	YALAVR SLGL	
451	SKSETFALAR	AAIDATFAED	EVKQQLR			

Obrázek 28 – Výsledky analýzy neznámého proteinu o molekulové hmotnosti ~ 55 kDa pomocí LC-ESI-QTOF. Proteinová sekvence byla pokryta ze 76%. Červeně jsou označeny peptidy neznámého proteinu, které jsou identické s částí proteinové sekvence **His-SUMO-ADA**.

Data získaná z prvního pásu o molekulové hmotnosti 55 kDa identifikovala His-SUMO-ADA protein, a to s pravděpodobnostním skóre (Mascot score) 3952, s počtem přiřazených peptidů 170 a s 76% pokrytím sekvence His-SUMO-ADA identifikovanými peptidy.



Obrázek 29 – Hmotnostní spektrum získaného fragmentu číslo 1. žlutě označeného na Obr. 28.

1	MGSSHHHHHH	HHGSGLVPRG	SASMSDSEVN	QEAKPEVKPE	VKPETHINLK	
51	VSDGSSEIFF	K IKKTTPLRR	LMEAFAKRQG	KEMDSLRFLY	DGIRIQADQT	
101	PEDLDMEDND	IIEAHREQIG	GRGSEFELRR	QALMEWIQSL	PKIELHAHLN	
151	GSIRDSTLLE	LARVLGEKGV	IVFADVEHVI	QKNDRSLVEV	FKLFDLIHKL	
201	TTDHKTVTRI	TR EVVEDFAL	ENVVYLELRT	TPKRSDSIGM	SKRSYMEAVI	
251	QGLR SVSEVD	IDFVTASDSQ	K LHNAGDGIG	RKKIYVR ll	SIDRRETTES	1
301	AMETVKLALE	MRDVGVVGID	LSGNPL VGEW	STF LPALQYA	KDNDLHITLH	
351	CGEVPNPKEI	QAML DFKPHR	IGHACFFKDE	DWTKLKSFRI	PVEICLTSNI	
401	VTKSISSIDI	HHFADLYNAK	HPLILCTDDF	GVFSTSLSNE	YALAVRSLGL	
451	sksetf alar	AAIDATFAED	EVKQQLR			

Obrázek 30 – Výsledky analýzy neznámého proteinu o molekulové hmotnosti ~ 40 kDa pomocí LC-ESI-QTOF po štěpení SUMO proteasou. Proteinová sekvence byla pokryta ze 66%. Červeně jsou označeny peptidy neznámého proteinu, které jsou identické s částí proteinové sekvence **ADA**.

Získaná data druhého pásu o molekulové hmotnosti 40kDa identifikovala ADA bez His-SUMO Tagu, a to s pravděpodobnostním skorém (Mascot score) 3687, s počtem přiřazených peptidů 336 a s 66% pokrytím sekvence ADA identifikovanými peptidy. Podařilo se tedy identifikovat, jak štěpenou, tak neštěpenou ADA, což potvrdilo schopnost SUMO proteasy odštěpit Sumo Tag a získat tak samotnou ADA. Také jsme tímto potvrdili správnost předpokládaných výsledků z SDS-Page.



Obrázek 31 – Hmotnostní spektrum získaného fragmentu. Číslo 1. žlutě označené na Obr. 30.

4.5 Optimalizace štěpení rekombinantní ADA SUMO proteasou

Cílem optimalizace bylo najít vhodné podmínky pro štěpení rekombinantní ADA SUMO proteasou tak, aby došlo ke kvantitativnímu odštěpení SUMO Tagu a tím minimálním ztrátám proteinu po následné purifikaci na Ni-NTA agarosové koloně. Byly kombinované různé teploty a také délka inkubace reakční směsi. Výsledky byly následně vizualizovány pomocí SDS-Page (Obr. 32, 33), přičemž molekulová hmotnost exprimovaného proteinu His-SUMO-ADA odpovídá přibližně 55 kDa, u odštěpeného SUMO Tagu je to přibližně 15 kDa a u samostatné ADA 40 kDa.



Obrázek 32 – Optimalizace štěpení His-SUMO-ADA SUMO proteasou vizualizované metodou SDS-Page. Obrázek A 1) 1h, 4°C; 2) 1h, 16°C; 3) 1h 21°C; 4) 1h, 30°C; 5) 2h, 4°C; 6) 2h, 16°C; 7) 2h, 21°C; 8) 2h, 30°C a 9) kontrola His-SUMO-ADA. Obrázek B 1) 3h, 4°C; 2) 3h, 16°C; 3) 3h 21°C; 4) 3h, 30°C; 5) přes noc, 4°C; 6) přes noc, 16°C; 7) přes noc, 21°C; 8) přes noc, 30°C a 9) kontrola His-SUMO-ADA.



Obrázek 33 – Optimalizace štěpení-SUMO proteasou vizualizované metodou SDS-Page. 1) 6h, 4°C; **2**) 6h, 16°C; **3**) 6h 21°C; **4**) 6h, 30°C a **5**) kontrola His-SUMO-ADA.

Jako optimální podmínky pro štěpení SUMO proteasou byly vybrány podmínky 16°C a 21°C při štěpení přes noc.

5 ZÁVĚR

V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma metabolismus nukleotidů u rostlin s cílem poukázat na funkci enzymu adenosindeaminasy v něm. Také byla věnovaná pozornost charakterizaci skupiny adenosindeaminas a možnostem zvýšení exprese proteinů pomocí modifikací podmínek exprese.

Cílem této práce bylo navázat na již provedenou práci skupiny vědců kolem Mgr. Hany Pospíšilové Ph.D. (Pospíšilová et al., 2008). Dané téma bylo znovu otevřeno, jelikož dosud nebyla objasněna struktura žádné rostlinné ADA, čemuž předchází krystalizace proteinu. Mým úkolem tedy bylo zvýšit a optimalizovat expresní podmínky pro rekombinantní ADA s následnou optimalizací purifikačních podmínek a štěpení rekombinantní ADA pomocí enzymu SUMO proteasa. Podařilo se nám zvýšit výtěžek exprese pomocí vektoru pCIOX a naleznout optimální podmínky exprese u bakterie *E. coli* BL21 StarTM (DE3) nesoucí plazmid *pCIOX::At4g04880* kultivované v LB médiu s kanamycinem (50 µg/ml), indukci exprese při optické hustotě 0,4 s přídavkem indukčního činidla IPTG o výsledné koncentraci 0,6 mM a teplotě 18°C. Optimální podmínky pro purifikaci proteinu nebyly dosud nalezeny. Protein byl purifikován jen částečně pomocí Ni-NTA agarosy a jeho další purifikace bude předmětem dalšího zkoumání až do naleznutí optimálních podmínek. Taktéž se nám podařilo naleznout optimální podmínky pro štěpení částečně purifikované ADA SUMO proteasou při 16°C nebo 21°C přes noc.

Dále je plánováno dokončení optimalizace purifikačních podmínek a kvantitativní štěpení His-SUMO-ADA proteinu za využití nové SUMO proteasy, díky které by byl získán větší podíl štěpené ADA, a tím by se minimalizovaly ztráty čistého proteinu. Následně bude protein krystalizován s ambicí vyřešit jeho strukturu.

6 LITERATURA

- Abu-Shady M.R., Elshafei A.M., el-Beih F.M., Mohamed L.A. (1994) Properties of adenosine deaminase in extracts of Aspergillus terricola. Acta Microbiol. Pol. 43, 305-311.
- Agarwal R.P., Spector T., Parks R.E. Jr. (1977) Tight-binding inhibitors IV. inhibition of adenosine deaminases by various inhibitors. *Biochem. Pharm.* **26**, 359-367.
- Allen M., Qin W.S., Moreau F., Moffatt B. (2002) Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of Arabidopsis and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiol. Plant.* **115**, 56-68.
- Aronow B.J., Silbiger R.N., Dusing M.R., Stock J.L., Yager K.L., Potter S.S., Hutton J.J., Wiginton D.A. (1992) Functional analysis of the human adenosine deaminase gene thymic regulatory region and its ability to generate positionindependent transgene expression. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4170-4185.
- Ashihara H., Crozier A. (1999) Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. *Adv.Bot.Res.* **30**, 117-205.
- Ashihara H., Ukaji T. (1986) Inorganic phosphate absorption and its effect on adenosine 5'triphosphate level in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. J Plant Physiol 124, 77-85.
- Ataie G., Safarian S., Divsalar A., Saboury A.A., Moosavi-Movahedi A.A., Ranjbar B., Cristalli G., Mardanian S. (2004) Kinetic and structural analysis of the inhibition of adenosine deaminase by acetaminophen. J. Enzyme. Inhib. Med. 19, 71-78.
- Benita Y., Wise M.J., Lok M.C., Humphery-Smith I., Oosting R.S. (2006) Analysis of high throughput protein expression in *Escherichia coli*. Mol. Cell Proteomics **5**, 1567-1580.
- Boldt R., Zrenner R. (2002) Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. *Psysiologia Plantarum* **117**, 297-304.
- Bondos S.E., Bicknell A. (2003) Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal. Biochem.* **316**, 223-231.
- Brändén C. (1991). The tim barrel-The most frequently occurring folding motif in proteins. *Curr. Op. Struc. Biol.* **1**, 978-983.
- Brinkmann U., Mattes R.E., Buckel P. (1989) High-Level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY geneproduct. *Gene* **85**, 109-114.
- Cao Y.J., Schubert K.R. (2001) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding soybean nodule IMP dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expression* 1520, 242-246.
- Copley R., Bork P. (2000). Homology among (β/α) 8 barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. *J. Mol. Biol.* **303**, 627-641.

- Daddona P.E., Wiesmann W.P., Lambros C., Kelley W.N., Webster H.K. (1984) Human malaria parasite adenosine deaminase. Characterization in host enzyme-defi cient erythrocyte culture. J. Biol. Chem. 259:1472-1475.
- Fonne-Pfister R., Chemla P., Ward E., Girardet M., Kreuz K.E., Honzatko R.B., Fromm H.J., Schär H.-P., Grütter M.G., Cowan-Jacob S.W. (1996). The mode of action and the structure of a herbicide in complex with its target: binding of activated hydantocidin to the feedback regulativ site of adenylosuccinate synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9431-9436.
- Gabellieri E., Bernini S., Piras L., Cioni P., Balestreri E., Cercignani G., Felicioli R. (1986) Purification, stability and kinetic properties of highly purified adenosine deaminase from *Bacillus cereus* NCIB 8122. *Biochim. Biophys. Acta* 884, 490-496.
- Gaspar H.B., Bjorkegren E., Parsley K., Gilmour K.C., King D., Sinclair J., Zhang F., Giannakopoulos A., Adams S., Fairbanks L.D. et al. (2006) Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol. Ther.* 14, 505-513.
- Gasteleijn et al., 2013 Casteleijn M.G., Urtti A., Sarkhel S. (2013) Expression without boundaries: cell-free protein synthesis in pharmaceutical research, *Int. J. Pharmaceut.* **440**, 39-47.
- Georgiou G., Valax P. (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr*. *Opin. Biotech.* **7**, 190-197.
- Gowda M., Venu R.C., Li H., Jantasuriyarat C., Chen S., Bellizzi M., Pampanwar V., Kim H.R., Dean R.A., Stahlberg E. et al. (2007) *Magnaporthe grisea* infection triggers RNA variation and antisense transcript expression in rice. *Plant Physiol*. 144, 524-533.
- Hammarstrom M., Hellgren N., Van den Berg S., Berglund H., Hard T. (2002) Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*, *Protein Sci.* **11**, 313-321.
- Hanson A.D., Gregory J.F. (2002) Synthesis and turnover of folates in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 5, 244-249.
- Harbison G.R., Fisher J.R. (1973) Purification, properties and temperature dependence of the adenosine deaminase from a poikilotherm (Bay scallop). Arch. Biochem. Biophys. 154, 81-95.
- Henderson J.F. and Paterson A.R.P. (1973). Nucleotide Metabolism: An Introduction (New York, Academic Press), 1-304.
- Herz, S., Eberhard, S., Bacher A. (2000) Biosynthesis of riboflavin in plants. The ribA gene of Arabidopsis thaliana specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2butanone 4-phosphate synthase. *Phytochemistry* 53, 723-731.
- Hesberg C., Hansch R., Mendel R.R., Bittner, F. (2004) Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from Arabidopsis thaliana - Differential gene expression and enzyme activities. J. Biol. Chem. 279, 13547-13554.
- Hirose F, Ashihara H (1983) Adenine phosphoribosyltransferase of *Catharanthus roseus* cells: purification, properties and regulation. *Z Pflanzenphysiol* **110**, 135-145.

- Hough R.F., Bass B.L. (1994) Purification of the *Xenopus laevis* doublestranded RNA adenosine deaminase. J. Biol. Chem. 269, 9933-9939.
- Hung W.F., Chen L.J., Boldt R., Sun C.W., Li H.M. (2004) Characterization of Arabidopsis glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase-deficient mutants. *Plant Physiol.* 135, 1314-1323.
- Challa A., Johnson S., Robertson K., Gunasekaran M. (1999) Properties of adenosine deaminase from *Candida albicans. J. Basic Microbiol.* **39**, 97-101.
- Chambers S.P., Swalley S.E. (2009) Designing experiments for high-throughput protein expression. *Methods Mol. Biol.* **498**, 19-29.
- Chapman, A.G., Atkinson D.E., (1973) Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. *J. Biol. Chem.* **248**, 8309-8312.
- Chopra A.K., Brasier A.R., Das M., Xu X.J., Peterson J.W. (1994) Improved synthesis of Salmonella typhimurium enterotoxin using gene fusion expression systems. Gene 144, 81-85.
- Christopherson R.I., Jones, M.E. (1980). The effects of pH and inhibitors upon the catalytic activity of the dihydroorotase of multienzymatic protein pyr1-3 from mouse ehrlich ascites carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry* **255**, 3358-3370.
- Ipata P.L., Marmocchi F., Magni G., Felicioli R., Polidoro G. (1971) Baker's yeast cytosine deaminase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides. *Biochemistry* 10, 4270-4276.
- Iwaki-Egawa S., Watanabe Y. (2002) Characterization and purification of adenosine deaminace 1 from human and chicken liver. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 133, 173-182.
- Jain N.K., Roy I. (2009) Effect of trehalose on protein structure. Protein Sci. 18, 24-36.
- Jun H.K., Kim T.S., Sakai T. (1991) Purification and characterization of extracellular adenosine deaminase from a *Streptomyces* sp. J. Ferment. Bioeng. 71, 6-11.
- Jun H.K., Kim T.S., Yeeh Y. (1994) Purification and characterization of an extracellular adenosine deaminase from *Nocardioides* sp. J-326TK. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 20, 265-277.
- Jung B., Florchinger M., Kunz H.H., Traub M., Wartenberg R., Jeblick W., Neuhaus H.E., Mohlmann T. (2009) Uridine-Ribohydrolase Is a Key Regulator in the Uridine Degradation Pathway of Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 876-891.
- Kafer C., Zhou L., Santoso D., Guirgis A., Weers B., Park S., Thornburg R. (2004) Regulation of pyrimidine metabolism in plants. *Frontiers in Bioscience* **9**, 1611-1625.
- Kane J.F., Hartley D.L. (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli. Trends Biotechnol.* **6**, 95-101.
- Katahira R., Ashihara H. (2002) Profiles of pyrimidine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (Solanum tuberosum L.) tubers. *Planta*. 215, 821-828.
- Katsuragi T., Sakai T., Tonomura K. (1986) Affinity chromatography of cytosine deaminase from *Escherichia coli* with immobilized pyrimidine compounds. *Agric Biol Chem* 50, 1713-1719.

- Keegan L.P., Gerber A.P., Brindle J., Leemans R., Gallo A., Keller W., O'Connell M.A. (2000) The properties of a tRNA-specific adenosine deaminase from *Drosophila melanogaster* support an evolutionary link between pre-mRNA editing and tRNA modification. *Mol. Cell. Biol.* 20, 825-833.
- Kiefhaber T., Rudolph R., Kohler H.H., Buchner J. (1991) Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation, *Biotechnology (NY)* 9, 825-829.
- Kinoshita T., Nishio N., Nakanishi I., Sato A., Fujii T. (2003) Structure of bovine adenosine deaminace complexed with 6-hydroxy-1,6-dihydropurine riboside. *Biological Crystallography.* 59, 299-303.
- Koshiishi C., Kato A., Yama S., Crozier A., Ashihara H. (2001). A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilization of adenosine released from *S*-adenosyl-L-methionine cycle. *FEBS Lett.* **499**, 50-54.
- Larentis A.L., Argondizzo A.P.C., Esteves G.D., Jessouron E., Galler R., Medeiros M.A. (2011) Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (*pneumococcal surface adhesin A*) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein Expr. Purif.* **78**, 38-47.
- Leibly D.J., Nguyen T.N., Kao L.T., Hewitt S.N., Barrett L.K., et al. (2012) Stabilizing Additives Added during Cell Lysis Aid in the Solubilization of Recombinant Proteins. *PLoS ONE* **7**, 1-13
- Ling F., Inoue Y., Kimura A. (1991) Purification and characterization of adenosine deaminace from *Klebsiella* sp. LF 1202. J. Ferment. Bioeng.71, 89-92.
- Lupidi G., Marmocchi F., Cristalli G. (1998) Inhibition studies on membrane adenosine deaminase from human placenta. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 1071-1080.
- Magni G., Fioretti E., Ipata P.L., Natalini P. (1975) Baker's yeast uridine nucleosidase. Purification, composition, and physical and enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry* 250 9-13.
- Maier S.A., Galellis J.R., Mcdermid H.E., (2005) Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminace. J. Mol. Evol. 61, 776-794.
- Malhotra A. (2009) Tagging for protein expression, Method Enzymol. 463, 239-258.
- Miller C. O, Skoog F., von Saltza M. H., Strong F. M. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical* Society **77**, 1392-1392.
- Miroux B., Walker J. E. (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. J. Mol. Biol. 260, 289-298.
- Moffatt B. A., Wang L., Allen M. S., Stevens Y. Y., Qin W. S., Snider J., von Schwartzenberg K. (2000) Adenosine kinase of arabidopsis. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiol.* **124**, 1775-1785.
- Moffatt B. A., Ashihara H. (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. The *Arabidopsis* Book 1 published by American Society of Plant Biologists. 1-20.

- Mustelin T., Tautz L., Page R. (2005) Structure of the hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP) catalytic domain: structure of a KIM phosphatase with phosphate bound at the active site. *J. Mol. Biol.* **354**, 150-163.
- Nallamsetty S., Waugh D. S. (2007) A generic protocol for the expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* using a combinatorial His6-maltose binding protein fusion tag. *Nat. Protoc.* 2, 383-391.

Nygaard P. (1978) Adenosine deaminase from Escherichia coli. Methods Enzymol. 51, 508-512.

- Ou J.X., Wang L., Ding X.L., Du J.Y., Zhang Y., Chen H.P., Xu A.L. (2004) Stationary phase protein overproduction is a fundamental capability of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 314, 174-180.
- P. Papaneophytou Ch. P., Kontopidis G. (2013) Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein Expression and Purification* 94, 22-32.
- Persico A.M., Militerni R., Bravaccio C., Schneider C., Melmed R., Trill S., Montecchi F., Palermo M.T., Pascucci T., Puglisi-Allegra S. et al. (2000) Adenosine deaminase alleles and autistic disorder: Case-control and family-based association studies. *Am. J. Med.* Genet. 96, 784-790.
- Pickard M.A. (1975) Purification and some properties of the soluble and membrane-bound adenosine deaminases of *Micrococcus sodonensis* ATCC 11880 and their distribution within the family *Micrococcacea. Can. J. Biochem.* **53**, 344-353.
- Porath J. (1992) Immobilized metal-ion affinity-chromatography. *Protein Expr. Purif.* **3**, 263-281.
- Pospíšilová H., Frébort I., (2007) Aminohydrolases acting on adenine, adenosine and their derivatives. *Biomed. Pap.* 151, 3-10.
- Pospíšilová H., Šebela M., Novák O., Frébort I. (2008) Hydrolytic cleavage of N6-substituted adenine derivatives by eukaryotic adenine and adenosine deaminases. *Biosci. Rep.* 28, 335-347.
- Prinz W.A., Aslund F., Holmgren A., Beckwith J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272, 15661-15667.
- Ramirez O.T., Zamora R., Espinosa G., Merino E., Bolivar F., Quintero R. (1994) Kineticstudy of penicillin acylase production by recombinant Escherichia coli in batch cultures. *Process Biochem.* 29, 197-206.
- Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, prefractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* 2, 1896 – 1906.
- Raychaudhuri S., Younas F., Karplus P.A., Faerman C.H., Ripoll D.R. (1997) Backbone makes a significant contribution to the electrostatics of α/β-barrel proteins. *Protein Sci.* **6**, 1849-1857.
- Rosinová M., Zelinková E., Zelinka J. (1978) Adenosine aminohydrolase from *Streptomyces* aureofaciens. Collect. Czech. Chem. Commun. 43, 2324-2329.

- Savchenko A., Yee A., Khachatryan A., Skarina T., Evdokimova E., Pavlova M., Semesi A., Northey J., Beasley S., Lan N., Das R., Gerstein M., Arrowmith C.H., Edwards A.M. Strategies for structural proteomics of prokaryotes: quantifying the advantages of studying orthologous proteins and of using both NMR and X-ray crystallography approaches. *Proteins* 50, 392-399.
- Serventi F., Ramazzina I., Lamberto I., Puggioni V., Gatti R., Percudani R. (2010) Chemical basis of nitrogen recovery through the ureide pathway: formation and hydrolysis of Sureidoglycine in plants and bacteria. ACS Chem. Biol. 5, 203-214.
- Shi W., Schramm V. L., Almo S. C. (1999) Nucleoside hydrolase from Leishmania major. Cloning, expression, catalytic properties, transition state inhibitors, and the 2.5-AÊ crystal structure. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 21114-21120.
- Sharff A.J., Wilson D.K., Chang Z., Quiocho F.A. (1992) Refine 2.5Å structure of murine adenosine deaminase at pH 6.0. *J. Mol. Biol.* **226**, 917-921.
- Schell D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1, 305-310.
- Schein C.H., Noteborn M.H.M. (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nat. Biotechnol.* **6**, 291-294.
- Schmid M., Davison T.S., Henz S.R., Pape U.J., Demar M., Vingron M., Scholkopf B., Weigel D., Lohmann J.U. (2005) A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature Genet.* 37, 501-506.
- Singh L.S., Sharma R. (2000) Purification and characterization of intestina adenosine deaminase from mice. *Mol. Cell. Biochem.* 204, 127-134.
- Smith P.M.C., Atkins C.A. (2002) Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* 128, 793-802.
- Stasolla C., Katahira R., Thorpe T.A., Ashihara H. (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. J. Plant Physiol. 160, 1271-1295.
- Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in Dictyostelium-discoideum. *Nature* 271, 545-547.
- Tsukada T., Yoshino M. (1980) Adenosine deaminase from *Azotobacter vinelandii* purification and properties. *Arch. Microbiol.* **128**, 228-232.
- Van der Graaff E., Hooykaas P., Lein W., Lerchl J., Kunze G., Sonnewald U., Boldt R. (2004) Molecular analysis of "*de novo*" purine biosynthesis in solanaceous species and in Arabidopsis thaliana. *Front. Biosci.* 9, 1803-1816.
- Vasina J.A, Baneyx F. (1997) Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. *Protein Expr. Purif.* 9, 211-218.
- Ventura S., Villaverde A. (2006) Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* 24, 179-185.

- Vincentelli R., Bignon C., Gruez A., Canaan S., Sulzenbacher G., Tegoni M., Campanacci V., Cambillau C. (2003) Medium-scale structural genomics: strategies for protein expression and crystallization. Accounts Chem. Res. 36, 165-172.
- Vincentelli R., Cimino A., Geerlof A., Kubo A., Satou Y., Cambillau C. (2011) Highthroughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. *Methods* **55**, 65-72.
- Wagner K.G., Backer A.I. (1992) Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. *Int.Rev.Cytol.* **134**, 1-84.
- Werner A.K., Sparkes, I.A., Romeis T., Witte, C.P. (2008) Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from Arabidopsis and soybean. *Plant Physiol* **146**, 418-430.
- Wierenga R. (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* **492**, 193-198.
- Wilson D.K., Rudolph F.B., Quiocho F.A. (1991) Atomic structure of adenosine deaminace complexed with a transition state analog understanding catalysis and immunodeficiency mutations, *Science* **252**, 1278-1284.
- Wolf J., Gerber A.P., Keller W. tadA, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli. EMBO J.* **21**, 3841-51.
- Xu J., Zhang H. Y., Xie C. H., Xue H. W., Dijkhuis P., Liu C. M. (2005) Embryonic factor 1 encodes an AMP deaminase and is essential for the zygote to embryo transition in *Arabidopsis. Plant J.* 42, 743-756.
- Young C.L., Britton Z.T., Robinson A.S. (2012) Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol.* J. 7, 620-634.
- Zalkin H., Nygaard P.P. (1996) Biosynthesis of purine nucleotides F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger (Editors), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (edn 2–. American Society for Microbiology, Press Washington, 561-579.
- Zavialov, A.V., Engström A. (2005) Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem. J.* **391**, 51-57.
- Zrenner R., Stitt, M., Sonnewald U., Boldt R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. Annu. Rew. Plant Biol. 57, 805-836.
- Zrenner R., Heike R., Marquard C.R., Lange P.R., Geserick C., Bartosz C.E., Chen C.T., Slocum R.D. (2009) A functional analysis of the pyrimidine catabolic pathway in Arabidopsis. *New Phytologist*, **183**, 117-132.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

10F-THF - 10-formyltetrahydrofolát

- acetyl-CoA acetylkoenzym A
- ACN acetonitril
- ADA adenosindeaminasa
- ADAT tRNA specifické adenosindeaminasy
- ADE adenindeaminasa
- ADP adenosindifosfát
- AICAR 5-amidoimidazo-4-karbaxamid-ribonukleotid
- AIR 5-amidoimidazol-ribonukleotid
- AMP adenosinmonofosfát
- ATP adenosintrifosfát
- CAIR 4-karboxyaminoimidazol-ribonukleotid
- CTP cytosintrifosfát
- DFC 2'-deoxykoformycin
- FAD flavinadenindinuklotid
- FAICAR 5-formanoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid
- FGAM formylglycinamidinribonukleotid
- FGAR formylglycinamid-ribonukleotid
- GAR glycinaminoribonukleotid
- GMP guanosinmonofosfát
- GTP guanosintrifosfát
- HDPR 6-hydroxy-7,8-dihydropurinnukleosid
- IMP inosin-monofosfát
- iPrOH isopropanol
- NAD nikotinamidadenindinuklotid
- NADPH nikotinamiduadenindinukleotidfosfát
- OMP orotidin-5-fosfát
- PRA fosforibosylamin
- PRPP 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát
- SAICAR N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamid
- SAM S-adenosylmethionin
- SAMP adenylosukcinát
UMP - uridinmonofosfát

XMP - xantinmonofosfát