

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Lenart GIRANDON

**EKSPRESIJA, ČIŠČENJE IN KARAKTERIZACIJA
PRVE RASTLINSKE MULTISUBSTRATNE
DEOKSIRIBONUKLEOZIDNE KINAZE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Lenart GIRANDON

**EKSPRESIJA, ČIŠČENJE IN KARAKTERIZACIJA PRVE
RASTLINSKE MULTISUBSTRATNE DEOKSIRIBONUKLEOZIDNE
KINAZE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF
THE FIRST PLANT MULTISUBSTRATE
DEOXYRIBONUCLEOSIDE KINASE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za celično in organizemsko biologijo Univerze v Lundu (Cell and organism biology, University of Lund).

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za metorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Ines Mandić Mulec, za somentorja prof. dr. Jureta Piškurja, in za recenzenta prof. dr. Gregorja Anderluha.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić Mulec, univ. dipl. biol.

Somentor: prof. dr. Jure Piškur, univ. dipl. biol

Recenzent: prof.dr. Gregor Anderluh, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep, dr. vet. med.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Ines Mandić Mulec, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Jure Piškur, univ. dipl. biol.

University of Lund, Cell and organism biology

Član: prof. dr. Gregor Andreluh, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Lenart Girandon

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.151: 581.17: 582.683.2 (043) = 863
KG	Encimi/deoksiribonukleozidne kinaze/ <i>Arabidopsis thaliana</i> /multisubstratni encim/dACGK/reciklažna pot zagotavljanja deoksiribonukleozidov v rastlinah/Michaelis-Menten kinetika
AV	GIRANDON, Lenart
SA	MANDIĆ MULEC, Ines (mentor) / PIŠKUR, Jure (somentor) / ANDERLUH, Gregor (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	EKSPRESIJA, ČIŠČENJE IN KARAKTERIZACIJA PRVE RASTLINSKE MULTISUBSTRATNE DEOKSIRIBONUKLEOZIDNE KINAZE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 66 str., 6 pregl., 34 sl., 2 pril., 50 vir.
IJ	Sl
Jl	sl/en
AI	Deoksiribonukleozidne kinaze so ključni encimi reciklažne poti zagotavljanja deoksiribonukleotidov za podvojevanje in popravilo celične DNK. Poleg jedrne DNK in DNK mitohondrijev imajo rastline še DNK kloroplastov, zato morajo zagotoviti gradnike v treh organelih. V tem delu smo izmerili aktivnosti reciklažne poti z radioaktivno označenimi substrati v rastlini <i>Arabidopsis thaliana</i> . To rastlino ponavadi uporabljajo kot modelni organizem, saj je izjemno primerna in enostavna za gojenje. Ugotovili smo, da so deoksiribonukleozidne kinaze v rastlinah aktivne že kmalu po začetku razvoja rastline in ostanejo aktivne tudi v odrasli rastlini. Rastlinske celice fosforilirajo purine nekoliko bolje kot pirimidine, kar ni pogosto, saj ponavadi ozkospecifična timidinska kinaza (TK) prevladuje v celicah in je zato aktivnost s dThd najvišja. Ugotovili smo tudi, da sta obe rastlinski deoksiribonukleozidni kinazi, TK in dACGK, prisotni v mitohondrijih rastlin. Opisali smo tudi lastnosti ene od deoksiribonukleozidnih kinaz, dACGK. Ugotovili smo, da je multisubstratni encim, saj lahko fosforilira dAdo, dCyd, dGuo, dUrd, BVDU, dFdC ter da substrati med seboj tekmujejo za isto vezavno mesto in so zato reverzibilni kompetitivni inhibitorji drug drugemu. Encim lahko kot donorja fosfatne skupine uporabi širok spekter trifosfatov, od katerih sta najboljša CTP in ATP. Z večino substratov kaže encim klasično Michaelis-Mentnovo kinetiko, s substratoma dCyd in dGuo pa kaže pozitivno kooperativnost vezave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 577.151: 581.17: 582.683.2 (043) = 863
CX	Enzymes/deoxyribonucleoside kinases/ <i>Arabidopsis thaliana</i> /multisubstrate enzyme/dACGK/salvage pathway in plants/Michaelis-Menten kinetics
AU	GIRANDON, Lenart
AA	MANDIĆ MULEC, Ines (supervisor) / PIŠKUR, Jure (co-advisor) / ANDERLUH, Gregor (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2007
TI	EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF THE FIRST PLANT MULTISUBSTRATE DEOXYRIBONUCLEOSIDE KINASE
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XII, 66 p., 6 tab., 34 fig., 2 app., 50 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Deoxyribonucleoside kinases are key enzymes in salvage pathway of supplying precursors for replication and repair of DNK in cells. Besides DNA in nucleus and mitochondria, plants have also DNA in chloroplasts. Therefore they have to supply three compartments with precursors for DNA. In this work we measured the activity of salvage pathway with radioactively labeled substrates in the plant <i>Arabidopsis thaliana</i> . This plant is often used as a model plant because of simplicity to work with it. Deoksiribonucleoside kinases were active already in the first days of development of the plant, but are also active in mature plant. Plants phosphorylate purines somewhat better than pyrimidines. We showed that both plant deoxyribonucleoside kinases are located in the mitochondria. We also characterised one of the plant deoxyribonucleoside kinases, dACGK. It is a multisubstrate enzyme, which can take dAdo, dCyd, dGuo, dUrd, BVDU and dFdC. The substrates compete with each other for the same binding site on the enzyme and are thus reversible competitive inhibitors to each other. The enzyme can take as phosphate donor large spectrum of triphosphates, from which CTP and ATP are the best ones. With most of the substrates dACGK shows classic Michaelis-Menten kinetics. With dCyd and dGuo, however, the binding is positive cooperative.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE.....	IV
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 UVOD.....	3
2.2 SINTEZA NUKLEOTIDOV.....	3
2.2.1 Biosintezna pot.....	3
2.2.2 Reciklažna pot.....	4
2.3 DEOKSIRIBONUKLEOZIDNE KINAZE V RAZLIČNIH CELICAH.....	5
2.3.1 CELICE SESALCEV.....	5
2.3.1.1 Deoksicitidin kinaza (dCK).....	6
2.3.1.2 Timidinska kinaza 1 (TK1)	7
2.3.1.3 Timidinska kinaza 2 (TK2)	8
2.3.1.4 Deoksiguanozinska kinaza (dGK).....	8
2.3.2 RASTLINSKA CELICA.....	9
2.3.2.1 TK1 podobne rastlinske dNK.....	9
2.3.2.2 Deoksiribonukleozidne kinaze, ki niso podobne TK1	10
2.3.3 ŽUŽELČJA CELICA	11
2.3.4 ENOCELIČNI EVKARIONTI.....	13
2.3.5 BAKTERIJSKA CELICA.....	14
2.4 NUKLEOZIDNI ANALOGI.....	15
2.4.1 2,2-diflorodeoksicitidin (dFdC).....	16

2.4.2	3-azido-2,3-deoksitimidin (AZT)	16
2.4.3	5-bromovinildeoksiuridin (BVDU)	17
2.5	MODELNI ORGANIZEM: <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.6	ENCIMSKA KINETIKA	18
2.6.1	Inhibicija	21
2.6.2	Alosterični encimi	22
3	MATERIAL IN METODE	24
3.1	MATERIALI	24
3.2	METODE	24
3.2.1	Gojenje rastlinskih celičnih kultur	24
3.2.2	Gojenje rastlinskih semen	24
3.2.3	Liza rastlinskih listov, vršičkov in semen	24
3.2.4	Liza celične kulture LER	25
3.2.5	Izolacija različnih organelov rastlinske celice	25
3.2.6	Test encimske aktivnosti mitohondrijskega markerja izocitratne dehidrogenaze (ICDH)	26
3.2.6.1	Prvi delovni protokol	26
3.2.6.2	Drugi delovni protokol	27
3.2.7	Test encimske aktivnosti mitohondrijskega markerja Citokrom c oksidaze	27
3.2.8	Kompetentne celice bakterij vrste <i>E. coli</i>	27
3.2.9	Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i>	28
3.2.10	Spodbuditev prekomernega izražanja proteinov	28
3.2.11	Liza celic <i>E. coli</i>	28
3.2.12	Čiščenje proteina	29
3.2.13	Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)	29
3.2.14	Določevanje koncentracije proteinov	31
3.2.15	Merjenje aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz	31
4	REZULTATI	33

4.1	AKTIVNOSTI DEOKSIRIBONUKLEOZIDNIH KINAZ V RASTLINAH	33
4.2	AKTIVNOST V RAZLIČNIH PREDELIH CELICE.....	38
4.3	REKOMBINANTNI ENCIM	43
4.3.1	Stabilizacija aktivnosti rekombinantne <i>AtdAGCK</i>.....	43
4.3.2	Čiščenje rekombinantnega proteina	44
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	UVOD.....	52
5.2	ANALIZA REZULTATOV	53
5.3	SKLEPI.....	58
6	POVZETEK.....	59
7	VIRI	60

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Aktivnosti deoksiribonukleotidnih kinaz v ekstraktih KY895, v katere so transformirali rastlinske dCK/dGK gene (Knecht in sod., 2005).	10
Preglednica 2: Različni plazmidi vplivajo različno na občutljivost bakterij za deoksicitozinski analog dFdC (Knecht in sod., 2005).	11
Preglednica 3: Nekatero deoksiribonukleozidne kinaze in njihove substratne specifičnosti	15
Preglednica 4: Koncentracije proteinov v različnih frakcijah rastlinskih celic	41
Preglednica 5: Kinetične lastnosti iz dveh nepovezanih poizkusov.....	48
Preglednica 6: Merjenje kompeticije za encim <i>AtdAGCK</i>	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Biosintezna in reciklažna pot v organizmu <i>Ureoplasma urealitycum</i> (Carnrot in sod., 2003).....	4
Slika 2: Struktura človeške TK1 (Welin in sod., 2004).....	8
Slika 3: Dimerna struktura <i>DmdNK</i> (Johansson in sod., 2001).	12
Slika 4: Strukturna formula gemcitabina.....	16
Slika 5: Strukturna formula AZT	16
Slika 6: Strukturna formula BVDU	17
Slika 7: LER celična kultura ter klijjoča semena rastline <i>A. thaliana</i>	18
Slika 8: Hiperbolična krivulja za encim, ki sledi Michaelis-Mentnovi kinetiki (Berg in sod., 2002).....	19
Slika 9: Lineweaver-Burkova grafa, ki razlikujeta med kompetitivno in nekompetitivno inhibicijo (Berg in sod., 2002).....	22
Slika 10: Graf Hilllove enačbe (Munch-Petersen, 1996).	23
Slika 11: dNK aktivnosti z različnimi substrati v listkih in vršičkih.....	34
Slika 12: Pregled vseh merjenih dNK aktivnosti v kalečih semenih.....	34
Slika 13: Primerjava dThd aktivnosti z njegovima analogoma dUrd in AZT v kalečih semenih iz slike 11.	35
Slika 14: Primerjava dCyd aktivnosti z njegovim analogom dFdC v kalečih semenih iz slike 11.	36
Slika 15: dNK aktivnosti z različnimi substrati v celični kulturi LER.....	37
Slika 16: Primerjava dThd aktivnosti z njegovima analogoma dUrd in AZT celični kulturi LER iz slike 14.	37
Slika 17: Primerjava dCyd aktivnosti z njegovim analogom dFdC v celični kulturi LER iz slike 14.	38
Slika 18: Aktivnosti na miligram proteinov v različnih frakcijah rastlinske celice	39
Slika 19: Meritev aktivnosti mitohondrijskega markerja ICDH v mitohondrijski frakciji po prvem delovnem protokolu.....	39
Slika 20: Meritev aktivnosti mitohondrijskega markerja ICDH v krompirjevih mitohondrijih po prvem delovnem protokolu.....	40

Slika 21: Meritev aktivnosti mitohondrijskega markerja ICDH v mitohondrijski frakciji po drugem delovnem protokolu.....	40
Slika 22: Meritev aktivnosti mitohondrijskega markerja ICDH v krompirjevih mitohondrijih po drugem delovnem protokolu.....	41
Slika 23: Western blot analiza z 28kDa membransko vezanim mitohondrijskim markerjem NAD9	42
Slika 24: Aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz v krompirjevih mitohondrijih.....	43
Slika 25: Aktivnost rekombinantne dAGCK z dAdo v različnih pufrih za lizo.....	44
Slika 26: SDS gel čiščenja rekombinantne dAGC kinaze.....	45
Slika 27: Kinetične lastnosti rekombinantnega encima dAGCK z dAdo.....	46
Slika 28: Kinetične lastnosti rekombinantnega encima dAGCK z dCyd.....	46
Slika 29: Kinetične lastnosti rekombinantnega encima dAGCK z dGuo.....	47
Slika 30: Kinetične lastnosti rekombinantnega encima dAGCK z dFdC.....	47
Slika 31: Kinetične lastnosti rekombinantnega encima dAGCK z BVDU.	48
Slika 32: Vmax/Km za dAGCK z različnimi substrati.....	49
Slika 33: Meritve za najboljšega donorja fosfatne skupine.....	51
Slika 34: Aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz z 200 μ M dAdo in dThd v različnih delih rastlinske celice.....	3

KAZALO PRILOG

Priloga A: Štiri nepovezane meritve dAdo in dThd aktivnosti v frakcijah celic (pmol/min/mg)	2
Priloga B: Meritev aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz.....	3

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Amp ^r	odpornost proti antibiotiku Ampicilinu
Ara-C	arabinofuranozil citozin (citarabin)
Ara-T	arabinofuranozil timidin
ATP	adenozin trifosfat
AZT	azidodideoksitimidin
BSA	goveji serumski albumin (angl. Bovine Serum Albumin)
BVDU	bromovinildeoksiuridin
CHAPS	3-((3chlamidopropyl)dimethylammino)-1-propylsolfonic acid
CTP	citozin trifosfat
D4T	didehidrodideoksitimidin
dAdo	deoksiadenozin
dAGCK	deoksigvanozinska, deoksiadenozinska in deoksicitozinska kinaza
dCK	deoksicitidinska kinaza
dCyd	deoksicitidin
ddCyd	dideoksicitidin (zalcitabine)
dFdC	difluorodeoksicitidin (gemcitabine)
dGK	deoksigvanozinska kinaza
dGuo	deoksigvanozin
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNK	deoksiribonukleozidna kinaza
DTT	ditiotreitol
dUrd	deoksiuridin
F-araA	β -D-arabinofuranozil fluoroadenin (fludarabin)
GSH	glutation sefaroza
GST	glutation S transferaza
GTP	gvanozin trifosfat
[I]	koncentracija inhibitorja
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
K _i	Konstanta inhibicije

K_m	Michelis Mentnova konstanta
MOPS	3-(N-morpholino)propenesulfonic acid
pGEX-2T	vektor za ekspresijo proteinov z GST repom
RNK	ribonukleinska kislina
[S]	koncentracija substrata
SDS-PAGE	denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza
Thd	timidin
TK1	timidinska kinaza 1
TK2	timidinska kinaza 2
TTP	timidin trifosfat
U	enota encimske aktivnosti(1 U fosforilira 1 μ mol nukleozida v 1 minuti)
UTP	uridin trifosfat
V_0	začetna hitrost
V_{max}	maksimalna hitrost

1 UVOD

Celice imajo gene zapisane na deoksiribonukleinski kislini (DNK). Za podvojevanje in popravilo te molekule potrebujejo veliko število gradnikov DNK. Za zagotavljanje teh gradnikov obstajata dve poti, biosintezna (angl. *de novo* pathway) in reciklažna pot (angl. *salvage pathway*). V reciklažni poti so najožje grlo deoksiribonukleozidne kinaze, ki fosforilirajo deoksiribonukleozide. Deoksiribonukleozidne kinaze lahko fosforilirajo tudi nekatera neaktivna nukleozidna zdravila, s čimer jih aktivirajo in tako povzročijo specifično delovanje znotraj celice. Deoksiribonukleozidne kinaze uporabljamo pri protivirusnih in protirakavih terapijah.

Odkrili in opisali so že veliko deoksiribonukleozidnih kinaz iz različnih organizmov.

Sesalčje celice morajo gradnike za DNK zagotoviti v jedru in v mitohondriju, zato sta dve od štirih deoksiribonukleozidnih kinaz prisotni v mitohondriju. Tako je mitohondrijska sinteza DNK popolnoma odvisna od reciklažne poti.

Pri rastlinah na tem področju niso veliko raziskovali. So pa rastline še bolj zanimive, saj morajo zagotoviti gradnike DNK v jedru, mitohondriju in kloroplastu.

Z diplomsko nalogo smo hoteli ugotoviti ali imajo rastlinske celice reciklažno pot, kdaj v razvoju rastline je ta pot najbolj aktivna in kje se v rastlinski celici deoksiribonukleozidne kinaze nahajajo.

Predvidevali smo, da bo reciklažna pot v rastlinah najbolj aktivna v razvijajočih se predelih rastline ter da bomo encime reciklažne poti našli tako v kloroplastih, kakor tudi v mitohondrijih. Predvidevali smo tudi, da bo dACGK (deoksiadenozinska, deoksicitidinska in deoksigvanozinska kinaza) multisubstratni encim, vendar da ne bo mogel fosforilirati timidina in njegovega naravnega derivata uridina ter umetno narejenih zdravil BVDU (bromovinildeoksiuridin) in AZT (azidodideoksitimidin).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bilo raziskati aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz v rastlinah. Kot modelni organizem smo izbrali vrsto *Arabidopsis thaliana*. Najprej smo hoteli ugotoviti, če lahko v rastlinski celici zaznamo vse štiri aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz. Hoteli smo tudi ugotoviti v katerih organelih so te kinaze izražene.

Predhodno so deoksiribonukleozidno kinazo iz rastline *Arabidopsis thaliana*, imenovano dCK/dGK, izrazili v bakteriji *Escherichia coli* ter ugotovili, da so imeli ekstrakti zaznavno deoksiribonukleozidno aktivnost z dAdo, dCyd in dGuo (Knecht *et al.* 2005). Zato smo v drugem delu raziskave želeli kinazo izraziti v mutanti *E. coli*, ki ima odstranjen gen za deoksiribonukleozidno kinazo, jo očistiti in opisati substratno specifičnost in kinetične lastnosti rekombinantnega proteina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 UVOD

Genetski material vseh poznanih organizmov in mnogih virusov je deoksiribonukleinska kislina, DNK. Nekateri virusi imajo drugačno nukleinsko kislino, ribonukleinsko kislino, RNK.

Osnovni sestavni deli nukleinskih kislin so nukleotidi. Nukleotidi imajo tri dele, dušikovo bazo, sladkorni del in fosfatni del. Dušikova baza ima lahko purinski ali pirimidinski obroč. Nukleinske kisline se imenujejo po vrsti sladkorja, ki ga vsebujejo. DNK ima 2`-deoksiriboza, RNA pa ima namesto nje ribozo.

Purina, bazi adenin (A) in gvanin (G), sta prisotna v obeh nukleinskih kislinah, DNK in RNK. Pirimidina v DNK sta citozin (C) in timin (T), v RNK pa timin zamenja uracil (U).

Ogrodje nukleinskih kislin je polinukleotidna veriga. Nastane tako, da se funkcionalne skupine na 5` mestu sladkornega obroča povežejo s funkcionalnimi skupinami na 3` mestu sladkornega obroča naslednjega nukleotida preko fosfatne skupine (Lewin, 2004). Zaradi tega je izredno pomembno da je v celici vedno dovolj gradnikov, nukleotidov, za izgradnjo in popravilo genetskega materiala, saj le tako lahko organizem preživi.

Za zagotavljanje zadostne količine nukleotidov obstajata dve poti: biosintezna pot in reciklažna pot.

2.2 SINTEZA NUKLEOTIDOV

2.2.1 Biosintezna pot

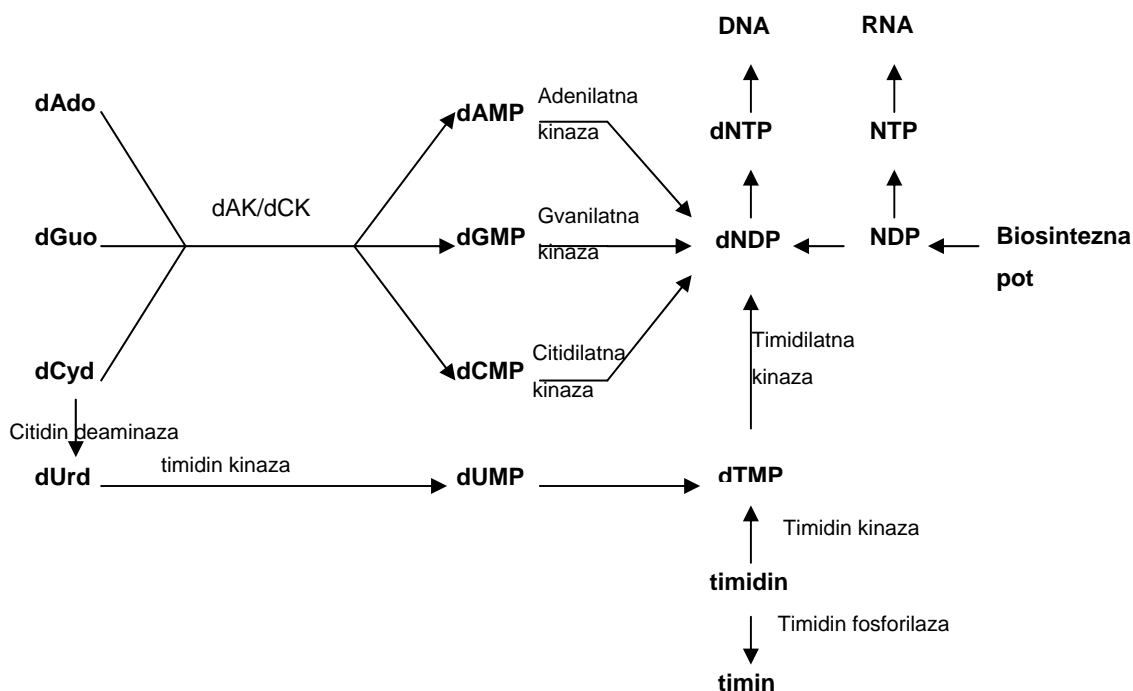
Po biosintezni poti deoksiribonukleotidi nastanejo iz obstoječih organskih in anorganskih molekul preko številnih kompleksnih reakcij. Ključni encim v tej poti je ribonukleotidna reduktaza, ki reducira 2`-hidroksilno skupino ribonukleotida. Encim je sestavljen iz dveh

različnih dimernih podenot, R1 in R2, in je regulirana s celičnim ciklom (Thelander in Reichard, 1979, cit. po Engström in sod., 1985).

2.2.2 Reciklažna pot

Reciklažna pot je alternativa biosintezi. Celica absorbira deoksiribonukleozide iz okolja, iz zalog hrane ali razgradnje DNK preko prenašalnega proteina za nukleozide. Poleg naravnih nukleozidov lahko ta protein prenese v celico tudi nukleozidne analoge, ki jih uporabljamo pri protivirusnem ali protirakavem zdravljenju (Plagemann in sod., 1988, cit. po Elias in Eriksson, 1995).

Naslednji korak v reciklažni poti, fosforilacija nukleozidov v nukleozidne monofosfate je ključni regulatorni korak v tej poti, saj so fosforilirani nukleozidi ujeti v celici zaradi njihove negativne nabitosti. Ta korak izvajajo deoksiribonukleozidne kinaze (dNK) (Elias in Eriksson, 1995) (Slika 1).



Slika 1: Biosintezna in reciklažna pot v organizmu *Ureoplasma urealitycum* (Carnrot in sod., 2003). Deoksiribonukleozidne kinaze (dNK) v človeku so dGK (deoksigvanozinska kinaza), dCK (deoksicitidinska kinaza), TK1 (timidinska kinaza 1) in TK2 (timidinska kinaza 2). V organizmu *U. urealitycum* sta le dve dNK, dAK/dCK (deoksiadenozinska in deoksigvanozinska kinaza) ter timidinska kinaza.

Nukleozidni monofosfati so še naprej fosforilirani do bifosfatov preko deoksiribonukleozidne monofosfatne kinaze (adenilatna, gvanilatna, citidilatna in timidilatna kinaza) in do trifosfatov z deoksiribonukleotidno difosfatno kinazo, ki ponavadi ni omejujoč dejavnik v tej poti (Van Rompay in sod., 2000; Gilles in sod., 1991).

Reciklažna pot ni nujna za preživetje celice, saj lahko biosintezna pot priskrbi vse gradnike DNK za celično rast. Vseeno reciklažna pot pomaga vzdrževati uravnotežene koncentracije deoksiribonukleozidov v celici, oskrbuje mitohondrije z gradniki DNK in je edini vir gradnikov za popravilo poškodb v DNK v ne delečih se celicah (Elias in Eriksson, 1995).

Otroci, ki se rodijo z genetsko napako, homozigotno poškodbo deoksigvanozinsko kinazo (dGK) ali timidinsko kinazo 2 (TK2), navadno ne preživijo četrtega leta starosti in večina umre že pred rojstvom (Munch-Petersen in Piškur, 2006).

Deoksiribonukleozidne kinaze v reciklažni poti fosforilirajo tudi deoksiribonukleozidne analoge (neaktivna zdravila) in jih s tem aktivirajo za zdravljenje raka ali virusnih bolezni v okuženi celici (Munch-Petersen in Piškur, 2006).

2.3 DEOKSIRIBONUKLEOZIDNE KINAZE V RAZLIČNIH CELICAH

2.3.1 CELICE SESALCEV

Pri sesalcih poznamo štiri deoksiribonukleozidne kinaze: timidinska kinaza 1 (TK1), timidinska kinaza 2 (TK2), deoksicitozinska kinaza (dCK) in deoksigvanozinska kinaza (dGK). Takšno število kinaz je verjetno posledica genskih podvojitvev. Genske podvojitve predstavljajo glavni vir novih genov. Geni se podvojujejo konstantno. Usoda novih podvojenih genov pa je različna. Ponavadi se en od podvojenih genov kasneje izgubi. Če pa eden od genov, zaradi mutacij pridobi novo funkcijo ali če si kopiji razdelita funkcijo predhodnega gena, se v genomu obdržita obe kopiji (Munch-Petersen in Piškur, 2006).

Sesalčje deoksiribonukleozidne kinaze so primer genske podvojitve, kjer se je substratna specifičnost predhodnega gena razdelila med štiri encime. Munch-Petersen in Piškur (Munch-Petersen in Piškur, 2006) predlagata, da je verjetno imela prva

deoksiribonukleozidna kinaza široko substratno specifičnost, vendar se je genska podvojitvev zgodila že pred delitvijo bakterij in evkariontov. Poleg tega predlagata, da je prvi evkariont imel kinazo, podobno TK1 ter dCK/dGK/TK2 kinazo. Slednja naj bi bila prednik in naj bi se z podvojitvijo in specializacijo razvila v današnje dCK, dGK in TK2 kinaze. Drugačen izvor TK1 od ostalih sesalčjih kinaz so potrdili s filogenetsko primerjavo TK1 in ostalih treh sesalčjih kinaz (Sandrini in Piškur, 2005) ter tudi s 3D strukturami (Welin in sod., 2004). Edini del 3D strukture, ki je podoben med TK1 in ostalimi sesalčjimi deoksiribonukleozidnimi kinazami, je N-terminalni del s P obratom (angl., P-loop), ki veže fosfatni donor. Vsa ostala 3D struktura se med TK1 in ostalimi sesalčjimi deoksiribonukleozidnimi kinazami razlikuje.

Zato so deoksiribonukleozidne kinaze razdeljene v dve družini, družino TK1 podobnih kinaz in družino kinaz, ki TK1 kinazi niso podobne (dCK/dGK/TK2) (Sandrini in Piškur, 2005). Dve sesalčji deoksiribonukleozidni kinazi sta prisotni v mitohondriju in sicer TK2 in dGK. Ker do sedaj še niso odkrili ribonukleotidne reduktazne aktivnosti v mitohondriju, je verjetno reciklažna pot edina pot sesalčjih celic za zagotavljanje gradnikov mitohondrialne DNK (Munch-Petersen in Piškur, 2006).

2.3.1.1 Deoksicitidin kinaza (dCK)

Človeška dCK je 60 kilo Daltonov (kDa) velik dimer, sestavljen iz dveh identičnih 30 kDa velikih podenot in katalizira fosforilacijo z zelo kompleksno kinetiko. Za aktivnost ta encim potrebuje vsaj nizke koncentracije Mg^{2+} ionov. Odgovoren je za fosforilacijo deoksicitozina, a lahko učinkovito kot substrat uporabi tudi deoksigvanozin in deoksiadenozin, deoksitimidin pa fosforilira zelo slabo. Substrati med seboj tekmujejo s kompetitivno inhibicijo, torej ima verjetno skupno nukleozidno vezavno mesto za vse substrate (Bohman in Eriksson, 1988). Encim lahko uporabi širok spekter fosfatnih donorjev (Datta in sod., 1989), vendar je verjetno glavni donor fosfatne skupine v celici UTP (uracil trifosfat) (Krawiec in sod., 1995). dCK je z negativno povratno zanko zavirana z dCTP in ostalimi produkti (Bohman in Eriksson, 1988). Datta in sodelavci (Datta in sod., 1989) so pokazali, da dCK najprej veže deoksinukleozid in šele nato donorja fosfatne skupine. dCK se sintetizira nespremenljivo skozi celični cikel, vendar je njena sinteza

izrazito povečana v rakavih celicah. Ponavadi je od 3 do 5 kratna razlika med rakavo in normalno celico (Bohman in Eriksson, 1988).

Najprej so mislili, da je dCK prisotna v citoplazmi (Cheng in sod., 1977), vendar so kasneje Johansson in sodelavci (Johansson in sod., 1997) dokazali, da je prisotna tudi v celičnem jedru. Danes je znano, da je običajno ta encim večinsko prisoten v citoplazmi, vendar se ob prekomerni sintezi glavna aktivnosti pojavi v celičnem jedru (Hatzis in sod., 1998).

2.3.1.2 Timidinska kinaza 1 (TK1)

Človeška TK1 je 25.5 kDa velik encim, ki ima najbolj ozko specifičnost od vseh štirih deoksiribonukleozidnih kinaz v sesalčjih celicah. Fosforilira lahko le naravna nukleozida deoksitimidin in uridin. Deoksitimidin uporablja z večjo učinkovitostjo kot uridin. Timidinske analoge, kot je azidotimidin (AZT, ki su uporablja za zdravljenje okužbe s človeškim virusom imunske pomanjkljivosti, virusom HIV), lahko uporabi kot substrat z skoraj polovično učinkovitostjo od tiste z deoksitimidinom (Munch-Petersen in sod., 1991). Welin in sodelavci (Welin in sod., 2004) so predlagali, da je razlog ozke specifičnosti timidinske kinaze 1 v majhnem vezavnem mestu na encimu za sprejemnike fosfatne skupine (Slika 2). Najboljša donorja fosfatne skupine sta ATP (adenozin trifosfat) in dATP, poleg tega pa lahko kot donorji delujejo tudi dGTP, dCTP in dUTP (Munch-Petersen in sod., 1991). dTTP deluje kot močan inhibitor preko negativne povratne zanke (Lee in Cheng, 1976).

TK1 je regulirana s celičnim ciklom na več ravneh in je najbolj aktivna v delečih se celicah (Sherley in Kelly, 1988). Poleg tega je regulirana tudi na encimskem nivoju. Lahko obstaja v dimerni obliki z nizko afiniteto do deoksitimidina ali v tetramerni obliki z visoko afiniteto do deoksitimidina. Ta proces je reguliran preko koncentracije glavnega donorja fosfatne skupine, ATP (Munch-Petersen in sod., 1993). TK1 katalizira reakcijo šele ko sta nanjo vezana oba substrata, po reakciji pa oba substrata encim tudi zapustita. Poleg tega encim potrebuje prisotnost Mg^{2+} ionov (Lee in Cheng, 1976).



Slika 2: Struktura človeške TK1 (Welin in sod., 2004). Človeška TK1 spada v popolnoma drugo filogenetsko družino deoksiribonukleozidnih kinaz kot ostale človeške deoksiribonukleozidne kinaze.

2.3.1.3 Timidinska kinaza 2 (TK2)

TK2 je konstitutivno izražena in je 29 kDa velik encim, s širšo substratno specifičnostjo kot TK1. Kot substrat lahko uporabi deoksitimidin, uridin in citidin, vendar je V_{\max} za citidin dvakrat višji od V_{\max} za deoksitimidin. Kaže kompleksno negativno kooperativno kinetiko s deoksitimidinom, čeprav z ostalima naravnima substratoma kaže klasično Mihaelis-Mentnovo kinetiko. Za donorje fosfatne skupine lahko uporabi ATP in CTP, pri čemer je ATP rahlo bolj učinkovit (Munch-Petersen in sod., 1991).

TK2 je z negativno kooperativno zanko inhibirana z dTTP in je z negativno kooperativnostjo inhibirana z dCTP. Mehanizem reakcije je "ping-pong", kar pomeni da encim najprej veže en substrat, potem se prvi substrat odcepi in šele nato encim veže drugi substrat in katalizira reakcijo (Lee in Cheng, 1976). Je mitohondrijski encim (Wang in Eriksson, 2000).

2.3.1.4 Deoksigvanozinska kinaza (dGK)

dGK je dimer s 58 kDa, sestavljen iz dveh 29 kDa velikih podenot. Fosforilira purina deoksiadenozin in deoksigvanozin, pri čemer je deoksigvanozin boljši substrat (Wang in sod., 1993). Poleg tega lahko fosforilira tudi nekaj deoksiribonukleozidnih analogov, AraG in CdA celo z višjo učinkovitostjo kot deoksiadenozin (Sjöberg in sod., 1998). Nizko aktivnost kaže celo s deoksicitozinom. Kot donorje fosfatne skupine lahko uporabi veliko

donorjev, najbolj učinkovita sta ATP in UTP. dATP in dGTP pa sta inhibitorja preko negativne povratne zanke. dGK ni regulirana s celičnim ciklom (Munch-Petersen in Piškur, 2006). Je mitohondrijski encim (Jüllig in Eriksson, 2000).

2.3.2 RASTLINSKA CELICA

Znanje o rastlinskih deoksiribonukleozidnih kinazah je izredno omejeno. Do sedaj so aktivnosti encimov reciklažne poti poročali le v nekaj rastlinah, in sicer v patentih, ki tudi ščitita pravice do uporabe rastlinskih deoksiribonukleotidnih kinaz. Knecht in sodelavci (Knecht in sod., 2003; Knecht in sod., 2005) so v patentih izmerili aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz v rastlinah ter zaščitili deoksiribonukleozidne kinaze in njihovo uporabo v genski terapiji.

2.3.2.1 TK1 podobne rastlinske dNK

Raziskovalci so deoksiribonukleozidne kinaze v rastlinskih celicah iskali tako, da so rastlinski genom primerjali z nukleotidnim zaporedjem poznane in dobro opisane človeške TK1. Takšno zaporedje so našli v paradižniku in rižu ter dve homologni zaporedji v rastlini *A. thaliana* (Knecht in sod., 2003a). Ko so zaporedji iz *A. thaliana* primerjali, so ugotovili nedavno podvojitev gena za TK1 v tej rastlini. Drugi gen je imel na N-terminalnem koncu kratek signalni peptid, ki sicer zmanjša aktivnost tega encima, izraženega v bakteriji *E. coli*, ampak je možno, da je signalni peptid za prenos tega encima v mitohondrij.

Najdene rastlinske kinaze so izrazili v bakteriji *E. coli*, jih očistili in karakterizirali. Kot človeška TK1 so imeli tudi ti proteini izredno ozko substratno specifičnost in so vsi uporabljali deoksitimidin bolje kot ostale naravne deoksiribonukleozide. TK1 iz paradižnika in druga TK1 iz *A. thaliana* sta fosforilirali tudi deoksicitozin, čeprav slabo. Rekombinantni proteini pa so fosforilirali timidinski analog AZT celo bolj učinkovito kot deoksitimidin (k_{cat}/K_m vrednost je bila višja za AZT, kot za naravni substrat deoksitimidin) (Knecht in sod., 2003).

2.3.2.2 Deoksiribonukleozidne kinaze, ki niso podobne TK1

Ko so rastlinske genome primerjali z multisubstratno kinazo iz vinske mušice (*Drosophila melanogaster* NK), so Knecht in sodelavci (Knecht in sod., 2005) našli homologna zaporedja v *A. thaliana* in paradižniku (*Lycopersicon esculentum*). Paradižnikovo zaporedje so nato uporabili za iskanje homolognih zaporedij tudi v koruzi, rižu in boru (*Pinus taeda*). Te gene so nato klonirali v bakterijske plazmide in naredili njihove N- in C-terminalno skrajšane mutante. Encim, ki so ga našli v *A. thaliana* so poimenovali *AtdCK/dGK*. Gena za ta encim in za encim iz paradižnika so prenesli v *E. coli* sev KY895, spodbudili sintezo ter testirali aktivnosti deoksiribonukleozidne kinaze v ekstraktih *E. coli*. Kinaze v ekstraktih so fosforilirale deoksiadenozin, deoksigvanozin, deoksicitozin, vendar ne deoksitimidina (Preglednica 1).

Preglednica 1: Aktivnosti deoksiribonukleotidnih kinaz v ekstraktih KY895, v katere so transformirali rastlinske dCK/dGK gene (Knecht in sod., 2005).

Transformanta	Relativna aktivnost encima			
	dThd	dAdo	dGuo	dCyd
pGEX-2T	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pGEX-2T-TOM-dCK/dGK	n.d.	94	100	68
pGEX-2T-TOM-ANdCK/dGK	n.d.	82	100	69
pGEX-2T-TOM-dCK/dGKAC	100	64	74	50
pGEX-2T-TOM-ANdCK/dGKAC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pGEX-2T-AT-dCK/dGK	n.d.	100	91	77

n.d.: ni zaznavne aktivnosti

Številke kažejo relativne specifične aktivnosti kinaz. Aktivnost encima z najboljšim substratom je 100%, slabši substrati so izraženi kot procent najboljšega. pGEX-2T je vektor brez vstavljene kinaze, TOM-dCK/dGK je dCK/dGK iz paradižnika, TOM-ANdCK/dGK je N-terminalno skrajšana mutanta, TOM-dCK/dGKAC je C-terminalno skrajšana mutanta, TOM-ANdCK/dGKAC je N- in C-terminalno skrajšana mutanta in AT-dCK/dGK je gen za *A. thaliana* dCK/dGK.

Aktivnost *AtdCK/dGK* je bila najvišja z deoksiadenozinom, aktivnost paradižnikove dCK/dGK pa je bila najvišja z deoksigvanozinom. Ko so paradižnikovo kinazo skrajšali v njenem C-terminalnem delu, je ta spremenila substratno specifičnost, zaradi česar je bil deoksitimidin najboljši substrat (Knecht in sod., 2005). Kasnejša prizadevanja, da bi

očistili *AtdCK/dGK* so spodleteli zaradi izredne nestabilnosti encima med procesom čiščenja.

Knecht je s sodelavci (Knecht in sod., 2005) izmeril, da so celice KY897, ki izražajo rastlinske deoksiribonukleozidne kinaze, 10.000 krat bolj občutljive kot tiste, ki so imele prazen plazmid ali vstavljen gen za TK virusa *Herpes simplex* 1 (Preglednica 2).

Preglednica 2: Različni plazmidi vplivajo različno na občutljivost bakterij za deoksicitozinski analog dFdC. LD100 (koncentracija analoga, ki povzroči smrt vseh bakterij) vrednosti za celice KY895, transformirane z rastlinskimi deoksiribonukleozidnimi kinazami, z dFdC (Knecht in sod., 2005).

Transformanta	dFdC (nM)
pGEX-2T	100
pGEX-2T-TOM-dCK/dGK	10
pGEX-2T-TOM-ANdCK/dGK	10
pGEX-2T-TOM-dCK/dGKAC	100
pGEX-2T-TOM-ANdCK/dGKAC	100
pGEX-2T-AT-dCK/dGK	0,1
pGEX-2T-HSV-TK	100

pGEX-2T je vektor brez vstavljenega kinaze, TOM-dCK/dGK je dCK/dGK iz paradižnika, TOM-ANdCK/dGK je N-terminalno skrajšana mutanta, TOM-dCK/dGKAC je C-terminalno skrajšana mutanta, TOM-ANdCK/dGKAC je N- in C-terminalno skrajšana mutanta, AT-dCK/dGK je gen za *A. thaliana* dCK/dGK in HSV-TK je timidinska kinaza virusa *Herpes simplex*.

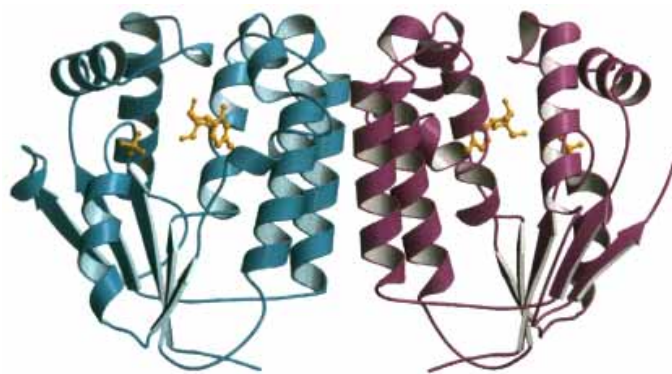
Ko so gen za *AtdCK/dGK* s transdukcijo prenesli v gliomsko celično linijo (U-118-MG), je bila celična linija 20 krat bolj občutljiva na analog dFdC (Knecht in sod., 2005).

2.3.3 ŽUŽELČJA CELICA

Vinska mušica (*Drosophila melanogaster*) je eden najbolj opisanih organizmov. Munch-Petersen in sodelavci (Munch-Petersen in sod., 1998) so v tem modelnem organizmu našli le eno deoksiribonukleozidno kinazo. To kinazo so očistili in pri proučevanju ugotovili, da gre za izjemno učinkovit multisubstratni encim, ki lahko uporabi vseh pet naravnih deoksiribonukleozidnih substratov s klasično Michaelis-Mentnovo kinetiko. Encim ima visok V_{max} (maksimalna hitrost pretvorbe substrata v produkt) in v istem območju za vseh pet naravnih substratov, vendar različne K_m (koncentracija, pri kateri je hitrost reakcije

enaka polovici maksimalne hitrosti reakcije) vrednosti. To je bilo prvo poročilo o multisubstratni dNK v kateremkoli organizmu. Protein je velik 30 kDa in so ga poimenovali *Dm*-dNK. *Dm*-dNK lahko fosforilira tudi analoge, ki lahko delujejo kot zdravila. Fosforilira lahko FdUrd enako učinkovito kot deoksiuridin, ostale (D4T, FddThd, AZT, Ara-T, Ara-C, ddCyd) pa fosforilira manj učinkovito. *Dm*-dNK naj bi uporabljala reakcijski mehanizem, kjer obvezno tvori prehodni kompleks z donorjem in prejemnikom fosfatne skupine. Presenetljivo ta encim uporablja CTP kot donorja fosfatne skupine bolj učinkovito kot ATP. Vsi substrati tega multisubstratnega encima med seboj tekmujejo za vezavno mesto, kar pomeni da je vezavno mesto na encimu enako za vse. k_{cat} (koeficient katalitične aktivnosti) vrednosti so 15 s^{-1} za deoksicitozin in deoksitimidin in $18\text{--}19\text{ s}^{-1}$ za deoksiadenozin in deoksigvanozin, torej mnogo višje kot pri sesalčjih dNK. Poleg tega je tudi konstanta specifičnosti, k_{cat}/K_m , veliko višja v primeravi s sesalčjimi (Munch-Petersen in sod., 1998).

DmdNK je bila tudi prva dNK, ki so ji uspeli določiti strukturo in je tako služila kot model za določitev strukture človeški dGK (Slika 3) (Johansson in sod., 2001).



Slika 3: Dimerna struktura *DmdNK* (Johansson in sod., 2001). Struktura se močno razlikuje od strukture TK1.

Dolgo je veljalo da je *Dm*-dNK prednik vseh dNK, a je kasneje Piškur s sodelavci (Piškur in sod., 2004) predlagal, da je verjetneje današnja oblika *Dm*-dNK nastala z retrogradno evolucijo iz specializirane, kinazi TK2 podobne kinaze, v encim s široko substratno specifičnostjo. Postavili so hipotezo, da so insekti izgubili vse dNK, razen TK2, ki se je kasneje, pod evolucijskim pritiskom, spremenila v multisubstratni encim.

Knecht in sodelavci (Knecht in sod., 2003) so karakterizirali tudi dNK iz celic komarjev in dokazali, da ima tudi komar le eno, multisubstratno, kinazo. Podobno velja tudi za ostale insekte (Piškur in sod., 2004).

2.3.4 ENOCELICNI EVKARIONTI

V vrsti *Dictyostelium discoideum* so trije geni za dNK, imenovani DdTK1 (30 kDa), DddAK (26 kDa) in DddGK (30 kDa).

Prvi encim je prava evkariontska TK, zelo sorodna sesalčjim kinazam, ki spadajo v TK1 družino in fosforilira predvsem deoksitimidin.

DddAK lahko tudi fosforilira deoksitimidin, vendar je najboljši substrat deoksiadenozin. Uporabi lahko tudi F-araA z enako učinkovitostjo kot njegov naravni analog, deoksiadenozin. DddGK lahko fosforilira deoksigvanozin in v manjši meri tudi deoksiadenozin. Oba zadnja encima sta veliko bolj podobna bakterijskim kinazam, ki niso podobne TK1, kot evkariontskim deoksiribonukleozidnim kinazam.

Vsi trije encimi so visoko učinkoviti le za en substrat in kaže, da ne obstaja nobena kinaza, ki bi lahko fosforilirala deoksicitozin (Sandrini in sod., 2007). Zelo zanimivo pri tem organizmu je to, da ima visok procent A-T baznih parov v njegovi DNK. Zaradi tega je potreba po teh dveh nukleotidih za DNK sintezo in popravilo višja kot po ostalih dveh. To je vidno v hitro rastočih celicah, saj je fosforilacijska zmožnost za deoksi adenozin in deoksitimidin veliko višja kot tista za deoksicitozin in deoksigvanozin (Sandrini in sod., 2007).

2.3.5 BAKTERIJSKA CELICA

Bakterije imajo različno število deoksiribonukleozidnih kinaz. Nekatere vrste jih sploh nimajo (na primer *Pseudomonas aeruginosa* in *Helicobacter pylori*). V vseh ostalih lahko najdemo tako deoksiribonukleozidne kinaze podobne TK1 in od TK1 različne kinaze.

V večini bakterij, tako po Gramu pozitivnih, kot po Gramu negativnih, lahko najdemo kinaze, ki so podobne TK1. Od TK1-različne kinaze pa najdemo predvsem v po Gramu pozitivnih bakterijah.

Sandrini in sodelavci (Sandrini in sod., 2006a) so pokazali, da lahko prokariontske TK razvrstimo v dve skupini. V prvi skupini so deoksiribonukleozidne kinaze, ki so sorodne evkariontski TK1. Najdemo jih v po Gramu pozitivnih bakterijah. V drugi skupini so tako imenovane prave bakterijske TK, ki so prisotne večinoma v po Gramu negativnih bakterijah. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah lahko najdemo več deoksiribonukleozidnih kinaz, naprimer dAK in dTK (*C. perfringens* in *L. monocytogenes*) ali dTK, dAK in dGK (*B. cereus*) (Sandrini in sod., 2006b).

DNK sinteza in popravilo bakterije *Lactobacillus acidophilus* sta odvisni izključno od reciklažne poti. Zato ima ta bakterija vse štiri deoksiribonukleozidne kinaze (Ives in Ikeda, 1998, cit. po Sandrini in sod., 2006b). Zaradi različnih zmožnosti fosforilacije različnih nukleozidov, bi lahko z nukleozidnimi analogi zdravili bakterijske infekcije vrstno specifično (Sandrini in sod., 2006b).

Preglednica 3: Nekatere deoksiribonukleozidne kinaze in njihove substratne specifičnosti

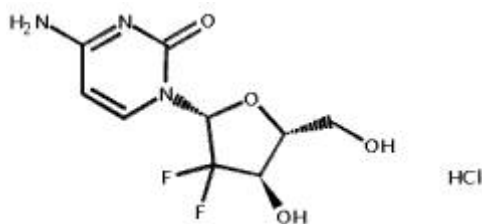
Deoksiribonukleozidne kinaze	Substratna specifičnost	Filogenetska družina
Človeška TK1	dThd, dUrd	TK1-podobne
Človeška TK2	dThd, dUrd, dCyd	Od TK1različne
Človeška dCK	dCyd, dGuo, dAdo, (dThd)	Od TK1različne
Človeška dGK	dAdo, dGuo, (dCyd)	Od TK1različne
DmNK	dAdo, dGuo, dCyd, dThd, dUrd	Od TK1različne
DdTK1	dThd	TK1-podobne
DddAK	dAdo, (dThd),	Od TK1različne
DddGK	dGuo, dAdo	Od TK1različne

2.4 NUKLEOZIDNI ANALOGI

Nukleozidni analogi so derivati naravnih nukleozidov, ki jih uporabljamo v genskih terapijah, saj jih je celica sposobna vnesti preko celične membrane. Zaradi tega, ker gre za analoge in ne naravne nukleozide, imajo le ti na tarčno celico navadno negativen učinek. V celico vnesemo neaktivirane nukleozidne analoge. Le te celica aktivira in sproži toksičen učinek. Za aktivacijo so odgovorne deoksiribonukleozidne kinaze, ki nukleozidne analoge fosforilirajo. Na tarčno celico lahko nukleozidni analogi delujejo na različne načine: a) vgradijo se v DNK in ustavijo podaljševanje DNK verige ter razmnoževanje, b) vežejo se na virusno ali celično DNK polimerazo, c) inhibirajo »*de novo*« sintezo dNTP z zaviranjem ribonukleozidne reduktaze (Munch-Petersen in Piškur, 2006).

2.4.1 2,2-diflorodeoksicitidin (dFdC)

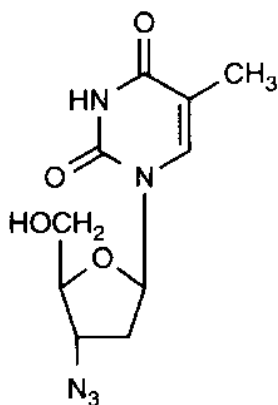
Gemcitabin je farmacevtsko ime za učinkovino dFdC (angl., 2,2-difluorodeoxycytidine), ki jo uspešno uporabljamo v proti-rakavi terapiji (Slika 4). Na tarčno celico ima učinkovina dvojen vpliv. Lahko zavira ribonukleozidne reduktaze in s tem »*de novo*«
sintezo dNTPjev. Zavirajoče vpliva tudi na sintezo DNK (Plunkett, 1995).



Slika 4: Strukturna formula gemcitabina

2.4.2 3-azido-2,3-deoksitimidin (AZT)

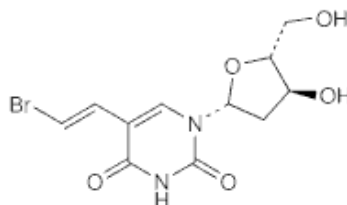
AZT (angl., 3-azido-2,3-dideoxithymidine) je protiretrovirusna učinkovina, ki jo uporabljamo pri zdravljenju okužbe z virusom HIV (Slika 5). V fosforilirani obliki zavira virusno reverzno transkripcijo in s tem prepreči razmnoževanje virusa HIV v okuženi celici (Mitsuya in sod., 1985).



Slika 5: Strukturna formula AZT

2.4.3 5-bromovinildeoksiuridin (BVDU)

BVDU (angl., 5-bromovinyaldeoxyuridine) je učinkovina, ki jo uporabljamo pri zdravljenju okužb s humanimi herpesvirusi (Slika 6) (De Clercq, 1979).



Slika 6: Strukturna formula BVDU

2.5 MODELNI ORGANIZEM: *Arabidopsis thaliana* (Navadni Repnjakovec)

Rastlina *A. thaliana* (Slika 7) spada med majhen plevel iz družine *Brassicaceae*. Velja za modelni poskusni organizem v rastlinski molekularni genetiki. Izbrali so jo zaradi: 1) hitrega in učinkovitega razmnoževanja, saj po 4 do 6 tednih izloči 10.000 semen, 2) ker je majhna, 3) izredno prilagodljiva (tudi po gojenju v celični kulturi so uspeli iz nje vzgojiti celo rastlino), 4) se oplojuje sama (mutacije, ki jih vnesemo se lahko obdržijo v naslednjih generacijah še vedno homozigotno), 5) je občutljiva za okužbo z bakterijo *A. tumefaciens*, ki jo najpogosteje uporabljamo za prenos genov v rastlino in 6) ima relativno kratek genom (167 milijonov baznih parov, 25.706 genov) (Raven in sod., 2005).

Pri nas Navadni Repnjakovec raste skoraj povsod in jo obravnavamo kot plevel. Listi te rastline rastejo čisto pri tleh, navzven od stebela, deblo s cvetovi pa se dvigne do 30 cm nad zemljo. Listki so podolgovati, cvet pa je bel.



Slika 7: LER celična kultura ter klijočča semena rastline *A. thaliana*.

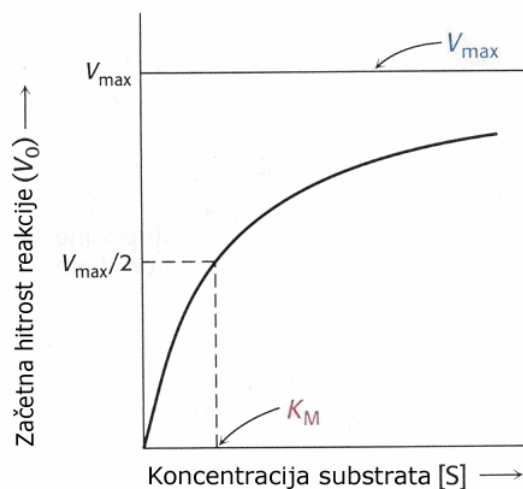
2.6 ENCIMSKA KINETIKA

Katalitične lastnosti encima ponavadi merimo z merjenjem začetne hitrosti (v) v odvisnosti od koncentracije substrata (S), kjer je hitrost reakcije v nasprotno smer, v smer reaktantov, zanemarljiva zaradi nizke koncentracije produktov reakcije. V večini primerov se ta lastnost kaže kot hiperbolična krivulja (Slika 8), ki je matematično opisana z Michaelis-Mentnovo enačbo:

$$v = V_{max} * [S] / (K_m + [S]) \quad \dots(1)$$

v kateri je v začetna hitrost, V_{max} je maksimalna hitrost, torej hitrost pri koncentraciji substrata, ki popolnoma zapolni reaktivna mesta na encimu, S je začetna koncentracija substrata in K_m je Michaelisova konstanta, ki je enaka koncentraciji substrata, kjer je začetna hitrost enaka polovici maksimalne hitrosti.

K_m torej nakazuje kako močno afiniteto ima encim do določenega substrata na začetku reakcije, ko je disociacija kompleksa encim-substrat še zanemarljiva.



Slika 8: Hiperbolična krivulja za encim, ki sledi Michaelis-Mentnovi kinetiki (Berg in sod., 2002)

V_{\max} in K_m vrednosti lahko določimo z meritvijo začetne hitrosti reakcije pri različnih koncentracijah substrata. Približek teh dveh števil dobimo z uporabo računalniških programov, ki eksperimentalno pridobljenim krivuljam določijo matematično enačbo, ki se najbolj približa tej krivulji ali z linearizacijo podatkov (graf Hofstee, ki kaže v v odvisnosti od v/S ali z Lineweaver-Burkovim grafom (dvojni recipročni graf), ki kaže $1/v$ v odvisnosti od $1/S$).

Če preuredimo enačbo 1 tako, da izrazimo hitrost encimske pretvorbe, dobimo enačbo:

$$k_{cat} = V_{max} / [E]_T \quad \dots(2)$$

kjer je vrednost k_{cat} hitrost encimske pretvorbe in je $[E]_T$ celotna koncentracija encima. Hitrost encimske pretvorbe nam pove število molekul substrata, ki jih encim pretvori v produkt na enoto časa pri najbolj ugodnih pogojih in je s tem enaka hitrosti reakcije pri visoki koncentraciji substrata in so zato zasedena vsa aktivna mesta na encimu. Vsaka molekula je tako pretvorjena v produkt v času $1/k_{cat}$. Ta vrednost uporabljamo tudi za primerjavo encimov med seboj.

V *in vivo* pogojih encim ni popolnoma zaseden s substratom, saj je koncentracija substrata ponavadi mnogo nižja od K_m . Ko v enačbo 1 vnesemo vredost V_{max} iz enačbe 2, dobimo enačbo 3

$$v = (k_{cat} * E_T / K_m) * S \quad \dots(3)$$

Pri nizki koncentraciji substrata je torej hitrost odvisna od koncentracije substrata. Da pa bi prišli še bližje fiziološkim pogojem pa moramo upoštevati še eno vrednost, ki jo dobimo iz enačbe:

$$v = (k_{cat} / K_m) * [S] [E]_T \quad \dots(4)$$

k_{cat}/K_m vrednost je konstanta pretvorbe pri stiku encima s substratom in jo uporabljamo kot merilo učinkovitosti reakcije. Tako lahko primerjamo prednost encima za določene substrate s primerjavo konstante pretvorbe za različne substrate. Najvišja vrednost k_{cat}/K_m je omejena s hitrostjo difuzije. Encimi, ki jim konstanto pretvorbe omejuje difuzija (10^7 - 10^8 s^{-1}) imenujemo kinetično popolne. Pri deoksiribonukleozidnih kinazah ima Dm-dNK najvišjo konstanto pretvorbe in je skoraj kinetično popolna.

Michaelis-Mentnovo enačbo lahko lineariziramo na Lineweaver-Burkovem grafu (dvojni recipročni graf, $1/v$ v odvisnosti od $1/[S]$) z enačbo:

$$1/v = 1/V_{max} + K_m/V_{max} * 1/[S] \quad \dots(5)$$

pri čemer je vrednost na stičišču grafa z y osjo enaka $1/V_{max}$ in je vrednost na stičišču grafa z x osjo enak $-1/K_m$ (Berg in sod., 2002).

2.6.1 Inhibicija

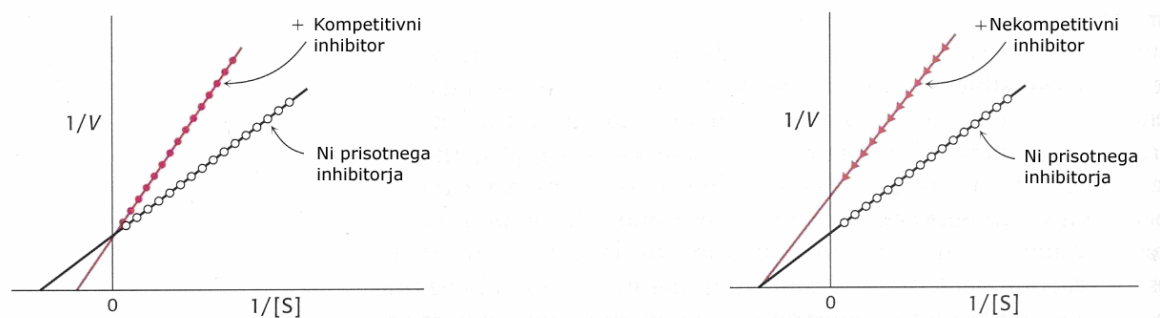
Encime lahko zavirajo določene molekule na različne načine. Inhibicija je lahko reverzibilna ali ireverzibilna. Reverzibilna inhibicija je lahko kompetitivna ali nekompetitivna. Ti dve vrsti inhibicije lahko ločimo tudi na podlagi encimske kinetike.

Kompetitivna inhibicija pomeni, da inhibitor in substrat tekmujeta med seboj za isto vezavno mesto na encimu. Prisotnost kompetitivnih inhibitorjev se kaže v višji vrednosti za K_m , V_{max} pa lahko še vedno vzdržujemo enako z visokimi koncentracijami substrata, ko je substrata veliko več od inhibitorja, zaradi česar inhibitor ni več konkurenčen substratu. Konstanta disociacije inhibicije, K_i , dobimo iz enačbe:

$$K_i = [E][I] / [EI] \quad \dots(6)$$

[E] koncentracija encima, [I] koncentracija inhibitorja, K_i predstavlja koncentracijo inhibitorja, ki povzroči, da se naklon grafa $1/v$ v odvisnosti od $1/[S]$ podvoji. To pomeni da nižja, kot je ta vrednost, močnejši je inhibitor in je višja stopnja inhibicije pri kateri koli koncentraciji substrata ali inhibitorja. Ko govorimo o multisubstratnih encimih morajo substrati velikokrat tekrovati med seboj za isto aktivno mesto na encimu in so tako eden drugemu inhibitorji.

Pri nekompetitivni inhibiciji se inhibitor veže na encim na drugo mesto na encimu, s čimer substratu še vedno omogoča vezavo na kompleks encim-inhibitor, vendar ga encim ne more pretvoriti v produkt. S tem inhibitor zmanjša koncentracijo aktivnega encima, kar pomeni da vrednosti V_{max} ne moremo obdržati niti z visoko koncentracijo substrata. Ostali encimi, ki pa nimajo vezanega inhibitorja, se še vedno obnašajo kot sam encim, brez prisotnega inhibitorja, zaradi česar se K_m vrednost ne spremeni. Obe inhibiciji lahko ločimo na Lineweaver-Burkovem grafu (**Slika 9**) (Berg in sod., 2002).



Slika 9: Lineweaver-Burkova grafa, ki razlikujeta med kompetitivno in nekompetitivno inhibicijo (Berg in sod., 2002)

2.6.2 Alosterični encimi

Vsi encimi ne sledijo enostavni Michaelis-Mentenovi kinetiki, pri kateri vezava enega substrata nima učinka na vezavo naslednjega. Če vezava enega substrata povzroči spremembo v strukturi ali naboju encima, lahko to povzroči spremembo afinitete za naslednje substrate, zato krivulja začetnih hitrosti ne sledi Michaelis-Mentenovi kinetiki. Tak encim imenujemo alosterični encim.

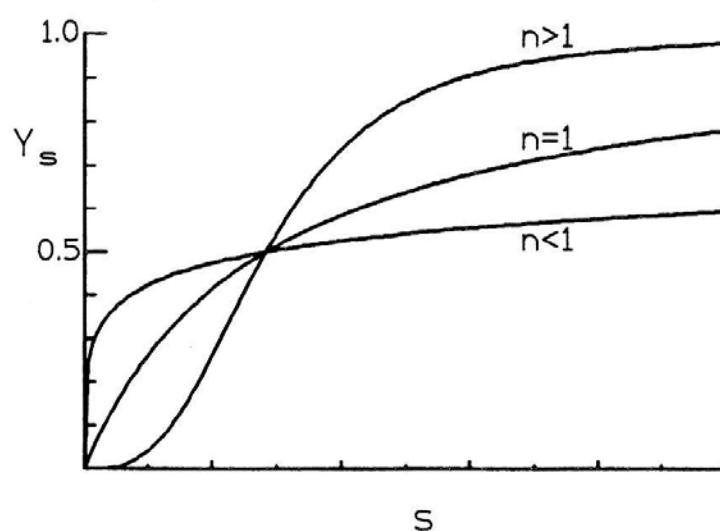
Encim ima lahko take lastnosti zaradi dveh razlogov. Pri histeričnih encimih vezava enega substrata spremeni konformacijo tako, da ima nova oblika drugačno afiniteto, pretvorba v začetno stanje pa je izredno počasna. Druga možnost pa je, da ima encim več kot eno vezavno mesto, pri čemer različna vezavna mesta vplivajo drug na drugega. To se zgodi, kadar ima sama molekula encima več vezavnih mest ali ko je encim sestavljen iz več podenot in vezava na eno podenoto vpliva na vezavo substrata na ostale podenote. Takrat govorimo o kooperativnosti substrata.

Kooperativnost lahko opišemo z uporabo Hillove enačbe:

$$v/V_{max} = [S]^n / ([S]_{0.5}^n + [S]^n) \quad \dots(7)$$

kjer je v/V_{max} ponavadi specifična hitrost (označena tudi kot Y_s), $S_{0.5}$ je koncentracija substrata pri polovici maksimalne hitrosti in n je Hillov koeficient. Hillov koeficient nam

kaže, kako močno različna vezavna mesta vplivajo eden na drugega. Če vezava prvega substrata nima vpliva na vezavo naslednjih je Hillov koeficient 1, zaradi česar se enačba 7 spremeni v enačbo 1 in encim sledi Michaelis-Mentenovi kinetiki. Ko pa je Hillov koeficient večji od ena ali manjši od ena vezava prvega substrata na encim spremeni afiniteto encima do naslednjih molekul substrata. Bolj kot se Hillov koeficient razlikuje od ena, večji vpliv ima vezava prve molekule substrata na vezavo ostalih (Segel, 1993) (Slika 10).



Slika 10: Graf Hillove enačbe za klasično Michaelis-Mentenovo kinetiko ($n=1$), za pozitivno kooperativnost ($n>1$) in za negativno kooperativnost ($n<1$) (Munch-Petersen, 1996).

Vezava enega substrata na alosterični encim lahko vezavo naslednje molekule substrata olajša s povišanjem afinitete encima do substrata, čemur rečemo pozitivna kooperativnost. Pozitivno kooperativnost opazimo kot spremembo grafa $Y_s/[S]$ v sigmoidno obliko (Slika 10) in odklon dvojnega recipročnega grafa navzgor. Lahko pa vezava enega substrata afiniteto do naslednje molekule zniža, čemur rečemo negativna kooperativnost in jo vidimo kot potlačen graf $Y_s/[S]$ (Slika 10) in odklon premice na dvojnem recipročnem grafu ($1/v$ v odvisnosti od $1/[S]$) navzdol.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

Semena in tkiva rastlin smo uporabili od vrste *Arabidopsis thaliana*, ekotipa Columbia-0. Zelena celična kultura LER je *A. thaliana* ekotip Landsbergs Erecta. Sev bakterije *E. coli*, ki smo jo uporabljali je bil *E. coli* K12, sev KY895 (F-, tdk-1, ilv-) (Igarashi in sod., 1967).

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje rastlinskih celičnih kultur

Divji tip celične kulture smo ohranjali s tedenskim prenašanjem dela kulture v gojišče, ki je vseboval 1x Murashige in Skoog soli, 1x Gamborg's vitamine B5, 3 % saharoze. pH smo uravnali na 5.7, in po avtoklaviranju dodali 0.5 mg/l naftalenske očetne kisline in 0.05 mg/l N⁶ benzil adenina. 6 ml en teden stare kulture smo prenesli v 250 ml svežega medija in inkubirali s stresanjem s hitrostjo 120 obratov na minuto (angl., rpm) pri 22 °C s 16 urami svetlobe na dan.

3.2.2 Gojenje rastlinskih semen

Semena rastlin smo sterilizirali v 70 % etanolu za 1 minuto, 5 minut v 50 % varikini z dodanim 10 µl/ml detergenta Tween. Dodali smo 0.1 % agarozo in jih prenesli v gojišče ANM (*Arabidopsis* nutrient medium – 2.151 g/l MS gojišče, 2 % saharoze, pH 5.8). Semena so nato kalila pri 120 rpm pri 22 °C s 16 urami svetlobe na dan (dnevna praksa v laboratoriju Erika Andreassona).

3.2.3 Liza rastlinskih listov, vršičkov in semen

Ko smo obirali listke in vršičke rastlin smo jih zamrznili v tekočem dušiku v manj kot 5 minutah po začetku vsakega obiranja, saj se v rastlinah programirana celična smrt, apoptoza, začne takoj. Za lizo celic smo vse stvari, ki so prišle v stik s celicami, ohladili s tekočim dušikom, celicam pa smo dodali ledeno hladen pufer za lizo rastlinskih tkiv (1x PBS, 5 mM ditiotreitrol (DTT), 0,1 % detergent Triton X-100, 6 mM NaF, 2 mM ATP, 2

mM MnCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 % glicerol, 0,2 mM PMSF, 0,01 mM Leupeptin, 1 nM calikulin, 0,5 % polivinilpirolidon (PVP 40)) in jih zmleli v pestiču s sterilnim peskom. Nato smo to inkubirali pri 4 °C s počasnim mešanjem in centrifugirali 5 min pri 13.000 rpm pri 4 °C. Deoksiribonukleozidno kinazno aktivnost smo izmerili takoj. Če to ni bilo mogoče smo vzorce zamrznili pri -80 °C.

3.2.4 Liza celične kulture LER

Celično kulturo LER smo prefiltrirali preko 30 µm najlonskega filtra, dodali pufer za lizo rastlinskih tkiv ter jih trikrat odtalili v ultrasonični kopeli in jih zopet zamrznili v tekočem dušiku. Deoksiribonukleozidno kinazno aktivnost smo izmerili takoj. Če to ni bilo mogoče smo vzorce zamrznili pri -80 °C.

3.2.5 Izolacija različnih organelov rastlinske celice

Osnova izolacije različnih organelov je bila različna gostota rastlinskih mitohondrijev in kloroplastov, zaradi česar potujeta različno daleč v perkolovem gradientu (Kruft in sod., 2001).

Vse smo delali v hladni sobi, pri 4 °C. 500 ml 5 dni stare celične kulture LER smo prefiltrirali preko 30 µm najlonskega filtra, celice sprali z deionizirano vodo, jih ponovno pomešali v 0,6 l pufru za izolacijo (0,25 M saharoza, 1,5 mM EDTA, 15mM MOPS, 100 mM askorbinske kisline, nato nastavili pH na 7,4 z 2 M KOH, potem pa dodali še 0,2% BSA, 0,6% PVP-40, 10 mM DTT, 0,2 mM PMSF). Celice smo nato razbili s homogeniziranjem v kuhinjskem mikserju 3 krat po 15 s. Po tem smo ekstrakt centrifugirali 5 min pri 2200 g z zaustavljanjem 1 min. Supernatant smo dalje centrifugirali 10 min pri 17.000 g z zaustavljanjem 1 min. Supernatant smo vzeli kot citosolno frakcijo. Usedlino smo raztopili v 4 ml gradientnega pufru (0,3 M saharoza, 10 mM MOPS (pH 7,2) 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% BSA) ter ponovno homogenizirali v steklenem homogenizatorju, ki deluje na celice s strižnimi silami. Homogenizat smo 2 min centrifugirali v epruveh pri 3000 rpm in nanegli supernatant direktno na predhodno narejeni gradient z dvema fazama (2,5 ml 40% in 6,5 ml 23% perkolov gradient v 1x gradientnem pufru), centrifugirali 20 min pri 20.000 g s časom pospeševanja 2 min in ustavljanja 3 min. Zelena lisa na vrhu področja s 23% perkolom je frakcija s kloroplasti,

rumenkasto rjava lisa na stičišču delov s 23 % in 40 % perkolom pa je z mitohondriji bogata frakcija.

Frakcije smo oprali dvakrat s tem da smo jih raztopili v 100 ml spiralnega medija (0.6 M saharoza, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS pH 7.2) in centrifugiranjem 10 min pri 12.000 g. Na koncu smo usedlino raztopili v 60 μ l pufra za spiranje, dodali 5% DMSO in zamrznili pri -80 °C. Pred merjenjem encimske aktivnosti z visoko specifičnima, z izotopom ^3H označenima, dAdo in dThd (aktivnost encimov dAGCK in dTK), smo dodali 0.025% Triton-X-100 in vorteksirali, da so se organeli razbili.

3.2.6 Test encimske aktivnosti mitohondrijskega markerja izocitratne dehidrogenaze (ICDH)

Od NAD^+ odvisna izocitratna dehidrogenaza je izključno mitohondrijski encim, ki katalizira reakcijo:



Reakcijo zaznamo s spremembo absorbcije svetlobe valovne dolžine 340 nm.

Aktivnost ICDH smo merili 3 minute ter spremljali nastanek NADH pri 340 nm z in brez dodatka Triton-X-100, ki raztopi membrane organelov in s tem omogoči mitohondrijskemu markerju dostop do substrata. Za določevanje aktivnosti ICDH smo uporabili dva pufra.

3.2.6.1 Prvi delovni protokol

Frakcijo rastlinske celice (1-5 μ g proteina) smo dodali v en mililiter ICDH pufra (20 mM MOPS, 5 mM MgSO_4 , 5 mM 2-merkaptoetanol, 1 mM NAD^+ , pH 7.5, 10 mM izocitrat). Po eni minuti smo dodali 0.025 % detergenta Triton-X-100 in merili absorbanco še dodatni dve minuti (Behal in Oliver, 1998).

3.2.6.2 Drugi delovni protokol

Poteka enako kot prvi delovni protokol, vendar z 1 ml ICDH2 pufra (0.3 M saharoza, 50 mM Tes (pH 7.4), 5 mM DL-izocitrat, 1 mM MgSO₄, 200 ng/ml antimicin A, 1 mM NAD⁺) (Rasmusson in Møller, 1990).

3.2.7 Test encimske aktivnosti mitohondrijskega markerja Citokrom c oksidaze

Aktivnost citokrom c oksidaze smo določili s spremljanjem absorbance pri 550 nm, z in brez dodanega Triton-X-100. Pufer (0.3 M saharoza, 50 mM Tris-acetat, 100 mM KCl, 45 µM citokroma c, pH 7.2) smo najprej reducirali z dodajanjem ditionita (da smo dosegli A₅₅₀ približno 1.1), potem smo pufer pustili za 20 minut, da se je oksidiral (A₅₅₀ okoli 0.9). Frakcijo rastlinske celice (1-5 µg protein) smo dodali 1 ml pufra za merjenje citokrom c oksidaze. Po eni minuti smo dodali 0.025 % detergenta Triton-X-100 in merili absorbcijo še nadaljni dve minuti (dnevna praksa v laboratoriju Allana Rasmussona).

3.2.8 Kompetentne celice bakterij vrste *E. coli*

Kompetentne celice bakterij vrste *E. coli* in njihova transformacija s tujo DNK so predhodno opisali Sambrook in sodelavci (Sambrook in Russell, 2001). Osnova transformacije je spodbuditev prenosa tuje DNK v celico z elektičnim tokom.

LB gojišče (10 g/l pepton, 5 g/l ekstrakt kvasovk in 10 g/l of NaCl, pH 7.4) smo inokulirali s celicami KY 895 in ploščo inkubirali čez noč na 37 °C. Eno kolonijo smo naslednji dan prenesli v 5 ml gojišče LB in ponovno inkubirali čez noč na 37 °C s stresanjem. Tretji dan smo 5 ml kulture prenesli v 200 ml LB gojišče, inkubirali kulturo do OD₆₀₀=0.4, pustili na ledu 15-30 min in centrifugirali pri 1000 g 15 min. Usedlino smo raztopili v 200 ml ledeno hladne vode, centrifugirali pri 1000 g 20 min, raztopili usedlino v 100 ml ledeno hladnega 10% glicerola, centrifugirali pri 1000 g 20 min, raztopili usedlino v 4 ml ledeno hladnega 10% glicerola in centrifugirali pri 1000 g 20 min. 2ml supernatanta smo zavrgli ter raztopili usedlino v ostanku supernatanta. Kompetentne celice smo nato razdelili po 50 µl in jih zamrznili pri -80 °C.

3.2.9 Transformacija kompetentnih celic *E. coli*

1 μ l plazmida smo zmešali s 50 μ l kompetentnih celic. Mešanico smo prenesli v predhodno ohlajeno elektro kiveto in celice izpostavili toku s 2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω . Mešanici smo dodali 500 μ l gojišča LB, premešali, inkubirali 30 min pri 37 °C ter po 50 μ l mešanice razmazali na plošče z gojiščem LB z dodanim antibiotikom ampicilinom (0.1 mg/ml Amp) (LB Amp). Plošče smo preko noči inkubirali pri 37 °C (Sambrook in Russell, 2001).

3.2.10 Spodbuditev prekomernega izražanja proteinov

50 μ l kompetentnih celic *E. coli* K12, sev KY895 (*F*, *tdk-1*, *ilv-*) (Igarashi in sod., 1967) smo transformirali s plazmidom P605 (*Arabidopsis thaliana* dAGCK, klonirana v EcoRI/BamHI mesto vektorja pGEX-2T za X2-1 celice), ki nosi odpornost proti antibiotiku ampicilinu ter gen za *AtdAGCK* vezan na rep z GST ter jih razmazali na LB Amp plošče ter inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo eno kolonijo prenesli v 5 ml LB Amp, inkubirali za približno 6h pri 37 °C z mešanjem. Kulturo smo nato prenesli v 100 ml LB Amp in inkubirali preko noči na 37 °C z mešanjem. Naslednji dan smo dodali 300 ml LB Amp ter inkubirali pri 37 °C z mešanjem. Po 6 h smo dali v vsako od 4 velikih erlenmajeric 100 ml kulture in dodali 900 ml LB Amp. Kulture smo inkubirali pri 37 °C z mešanjem do $OD_{600}=0.6$, jih ohladili na ledu do 25 °C in jim dodali IPTG do končne koncentracije 0.1 mM. Inkubirali smo za 10 h pri 25 °C. Naslednji dan smo kulturo centrifugirali pri 6000 g 10 min. Usedline smo zamrznili pri -80 °C.

3.2.11 Liza celic *E. coli*

Bakterijske celice, ki smo jim vnesli gen za deoksiribonukleozidno kinazo smo lizirali z uporabo naprave French press, ki deluje na principu lize celic zaradi strižnih sil, ki se pojavijo ob nenadnem zmanjšanju tlaka, kar povzroči da se celice prehitro razširijo in počijo.

Raztopili smo usedlino celic, ki smo jim spodbudili prekomerno sintezo vnesenega gena v 100 ml pufra za lizo celic (PBS, 5mM DTT, 10% glicerol, 0.1% triton X 100, 0.2 mM PMSF, 1x Roche protein inhibitors, 2mM ATP, 2mM $MnCl_2$, 2mM $MgCl_2$) ter kulturo obdelali trikrat s pripravo French press (3 x 1000 psi), centrifugirali pri 13000 rpm pri 5 °C za 30 min, ter supernatant precedili preko filtra z velikostjo por 0.45 μ m.

3.2.12 Čiščenje proteina

Teoretični princip afinitetne kromatografije z Glutathion Sepharose 4 Fast Flow (Amersham biosciences, New Jersey, USA) je vezava proteinov z GST (glutation S-transferaza) repom na GSH (glutation sepharozo). S spiranjem kolone se znebimo vseh proteinov, ki se na GSH niso vezali, z encimom trombinom pa ločimo protein od GST repa.

Homogenat smo nanесли na kolono s sefarozo Glutathion sepharoseTM (Amersham biosciences, New Jersey, USA) s tokom 0.1 ml/min pri 4 °C. Kolono smo spirali s 6 volumni kolone pufru A (PBS, 5 mM DTT, 0.1 % triton X 100, 2 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 10% glicerol) pri 4 °C. Za tem smo kolono prenesli na sobno temperaturo in omogočili pufru A z dodanimi 50 u/ml trombina, da je krožil čez kolono preko noči, nakar smo pufer zamenjali in pustili krožiti še naslednje 3 ure.

3.2.13 Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (angl., Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) omogoča določevanje relativne molekulske mase proteinov. Ko vzorce denaturiramo v prisotnosti naneševalnega pufru, SDS reagira s proteini, zaradi česar denaturirani proteini potujejo po gelu glede na število negativnih nabojev SDS molekul, ki so vezane na protein, kar pa je odvisno od dolžine proteina. β -merkaptetanol reducira disulfidne mostičke proteinov, s čimer uniči 3D strukturo proteinov. Bromofenol modro omogoči zaznavanje kako daleč so vzorci pripotovali med elektroforezo. Glicerol poveča gostoto vzorca in nam tako olajša nanašanje vzorcev na gel (Sambrook in Russell, 2001).

Poliakrilamidni gel je sestavljen iz polimeriziranih akrilamidnih verig, ki so prečno povezane na bisakrilamid. Amonijev perisulfat (APS) prispeva proste radikale za polimerizacijo, TEMED (N-N-N-N-tetrametiletildiamin) pa pospeši polimerizacijo.

Po elektroforezi moramo gel obarvati z barvilom Commassie Blue, da vidimo proteine. Poleg barvila ima raztopina za obarvanje še etanol in očetno kislino, ki proteine močnejše vežeta na gel. Razbarvanje nato odstrani ozadje, s čimer je ločljivost večja. Med obarvanjem in razbarvanjem smo raztopine vedno segreli na približno 65 °C za povečanje učinka.

Priprava SDS-PAGE gela:

12% ločevalni gel:

- 6 ml vode
- 1.8 ml separacijski pufer (1.5 M Tris/HCl, pH 8.8)
- 0.15 ml 10% SDS
- 2.4 ml 2% bisakrilamid
- 4.5 ml 40% akrilamid
- 75 µl 10% APS
- 20 µl TEMED

4% pripravljalni gel:

- 2.9 ml vode
- 1.25 ml pripravljalnega pufra (0.5 M Tris/HCl, pH 6.8)
- 0.5 µl 10% SDS
- 260 µl 2% bisakrilamid
- 500 µl 40% akrilamid
- 75 µl 10% APS
- 20 µl TEMED

Določevanje molekulskih mas proteinov

Velikosti vzorcev smo primerjali s proteinsko lestvico BenchMark Protein Ladder (Invitrogen Life Technologies™, Carsbald, Kalifornija, ZDA), ki ima 15 rekombinantnih proteinov z molekulskimi masami: 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 in 220 kDa.

Pogoji elektroforeze

Po mešanju približno 1ng vzorcev s 4x nanašalnim pufrom (200 mM TrisHCl (pH 6.8), 400 mM DTT, 8 % SDS, 0.4 % bromfenol modro, 40 % glicerol) smo vzorce zavreli na 94 °C za 4 min. Tako denaturirane vzorce smo nanесли na gel ter začeli elektroforezo v elektroforetskem pufu za SDS (25 mM Tris, 190 mM glicine, 3.5 mM SDS) pri 80 V da smo videli le eno liso, nakar smo pri 150 V pustili elektroforezo teči do zelene ločljivosti lis.

Barvalna raztopina

- 1 g Commassie Brilliant Blue
- 450 ml 96 % etanol
- 100 ml očetne kisline
- Voda do 1 l

Razbarvalna raztopina

- 75 ml 96 % etanol
- 100 ml očetne kisline
- Voda do 1 l

3.2.14 Določevanje koncentracije proteinov

Koncentracije proteinov smo določili z Bradfordovo metodo (Bradford, 1976). Barvilo Commassie Brilliant Blue G-250 v reagentu tvori komplekse s proteini s tem, da se v kislem pH območju veže na NH_3^+ skupino, kar lahko zaznamo kot povišanje absorpcije pri 595 nm.

Bradfordov reagent

- 100 mg Commassie Brilliant Blue G-25
- 50 ml 96 % etanol
- 100 ml 85 % fosforna acid
- Voda do 1 l.

Zmešali smo 1 ml Bradfordovega reagenta z 0.1 ml različnih razredčitev proteina, mešanico premešali ter izmerili absorbanco pri 595 nm.

3.2.15 Merjenje aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz

Aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz smo določili z merjenjem fosforilacije radioaktivno označenega substrata. Merjenje začetne hitrosti temelji na meritvah vzorcev v štirih različnih časih od začetka reakcije z tritijem (^3H) označenimi substrati, ki se po

fosforilaciji vežejo na filterne papirje DE-81 (Munch-Petersen in sod., 1991). Standardni reakcijski pogoji so bili: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM CHAPS, 3 mg/ml govejega serumskega albumina, 2.5 mM ATP, and 100 μM radioaktivno označenega substrata.

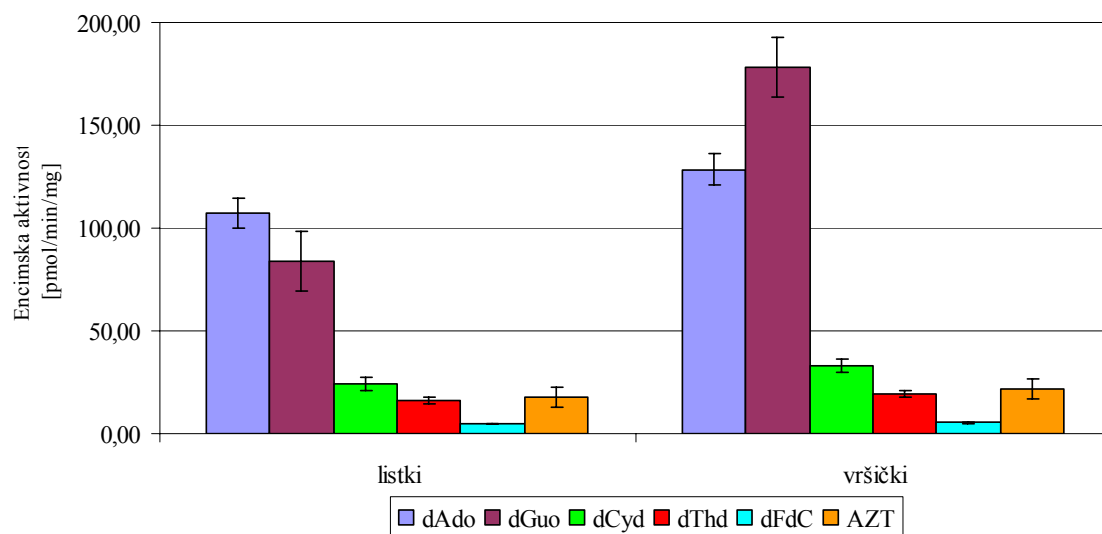
Reakcijo smo začeli z mešanjem 10 μl vzorca s 40 μl predhodno pripravljene reakcijske mešanice, ki zagotavljajo standardne reakcijske pogoje in nanašanjem 10 μl te raztopine na filtre. Označen nukleozidni substrat se je fosforiliriral v monofosfatno obliko, dobil je negativen naboj in se zato vezal na pozitivno nabiti filter. Nefosforiliran substrat smo sprali s filtra s trikratnim spiranjem po 5 minut s 5 mM amonijevim formatom in enkratnim spiranjem z vodo. Uporabili smo dCyd ali njegove analoge, zato smo namesto s 5 mM amonijevim formatom spirali z 1 mM, s čimer smo zaščitili razgradnjo deoksicitidinskega monofosfata. Zadnjič smo filtre sprali v 96 % etanolu, da so bili mehansko odpornejši in je bilo delo z njimi zato olajšano. Radioaktivni produkt, ki se je vezal na filter smo sprali v raztopino z raztopino 0,1 M HCl in 0,2 M KCl in izmerili radioaktivnost raztopine v scintilacijskem aparatu z Ultima Gold scintilacijsko tekočino (Perkin Elmer, Foster City, ZDA). Ena enota (u) encima je definirana kot količina encima, ki fosforilira 1 μmol radioaktivno označenega substrata na minuto pri standardnih reakcijskih pogojih. Ena velika enota (U) je 1000 u. V grafu hitrosti v odvisnosti od koncentracije substrata smo vsako točko določili tako, da smo pri konstantni koncentraciji substrata spremljali reakcijo v odvisnosti od časa čim bolj na začetku reakcije in iz začetnega naklona izračunali začetno hitrost. Vrednosti teh hitrosti smo nato obdelali z računalniškimi programi Prisme in SigmaPlot in dobili matematično enačbo, ki se je najbolj prilegala krivulji začetnih hitrosti.

4 REZULTATI

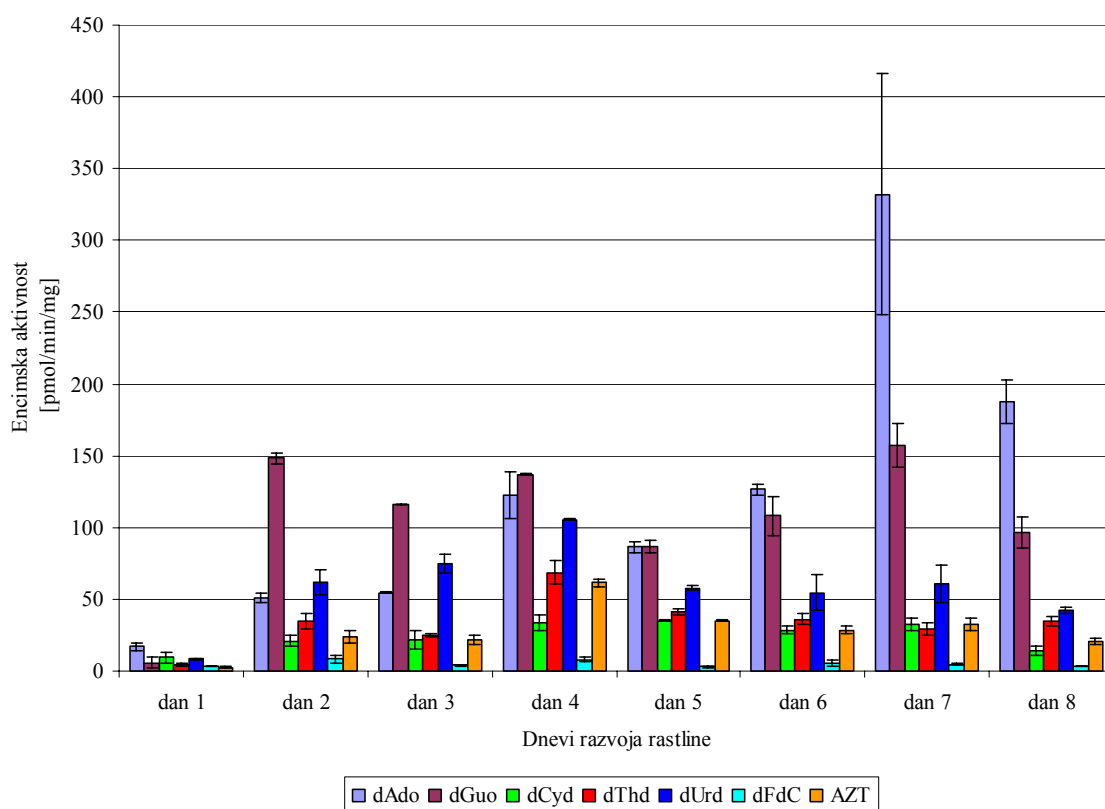
Deoksiribonukleozidne kinaze izolirane iz rastlin so v literaturi slabo opisane. Kot modelni organizem smo uporabili rastlino *Arabidopsis thaliana*, ki je tudi pri drugih raziskovalcih največkrat uporabljena modelna rastlina. Do sedaj so v tej rastlini opisali le TK (Knecht in sod., 2003a). S primerjavo nukleotidnih zaporedij so v rastlini *A. thaliana* našli še eno, multisubstratno kinazo dACGK (Knecht in sod., 2005). Naš cilj je bil raziskati reciklažno pot sinteze nukleotidov in izmeriti aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz z radioaktivno označenimi substrati.

4.1 AKTIVNOSTI DEOKSIRIBONUKLEOZIDNIH KINAZ V RASTLINAH

Zanimalo nas je ali v rastlinskih tkivih zaznamo aktivnost deoksiribonukleozidnih kinaz ter ali se aktivnosti v listkih in vršičkih mladih rastlin kaj razlikujejo. Skušali smo ugotoviti tudi ali je aktivnost večja v novih in hitro rastočih celicah rastline (vršički) ali v delih rastline, ki so že dozoreli (listki). Ugotovili smo, da so aktivnosti malce višje v vršičkih kot v listkih (Slika 11). Aktivnosti s substratoma dThd in AZT se nista razlikovali. Zanimivo je, da v obeh rastlinskih delih deoksiribonukleozidne kinaze fosforilirajo AZT učinkoviteje kot njegov naravni analog, dThd, saj ponavadi encimi učinkoviteje izrabijo naravni substrat, kar se vidi iz razlike med dCyd in dFdC aktivnostjo. Najvišjo aktivnost smo dobili v vršičkih z dGuo. Aktivnost z dvema naravnima pirimidinoma (dThd in dCyd) je bila precej nižja od aktivnosti encima v prisotnosti obeh purinov.

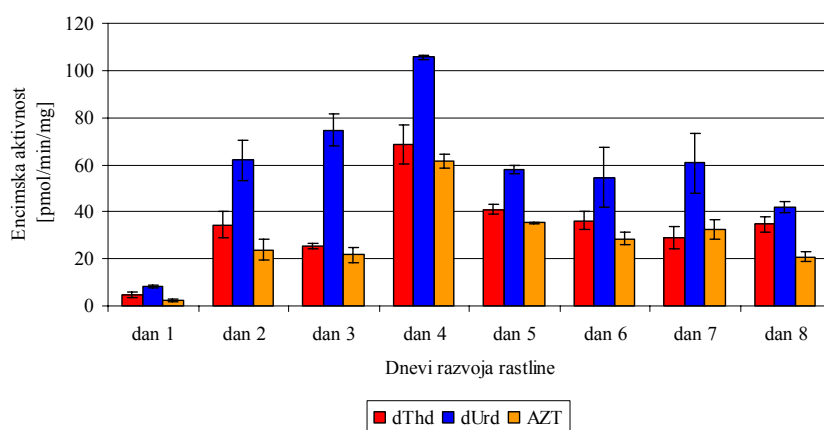


Slika 11: dNK aktivnosti z različnimi substrati v listkih in vršičkih 1 mesec stare rastline, merjene z 200 μ M substrati. Prikazan je en poskus z dvojnim merjenjem s standardnim odklonom.



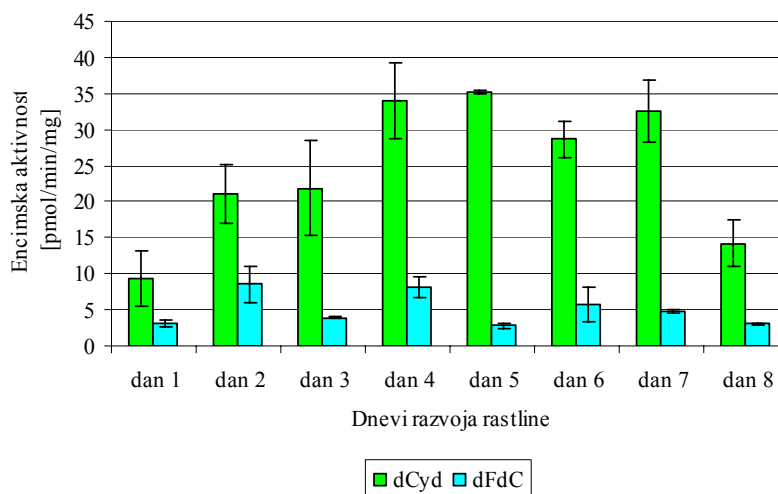
Slika 12: Pregled vseh merjenih dNK aktivnosti v kalečih semenih rastline vrste *A. thaliana*, ekotip Columbia-0 v prvih 8 dneh razvoja z 200 μ M substrati. Prikazan je en poskus rasti z dvojnim merjenjem s standardnim odklonom. dAdo aktivnost narašča, ostale aktivnosti so skoraj konstantne.

Ker je bila aktivnost deoksiribonukleozidnih kinaz v hitro rastočih celicah višja, smo izmerili aktivnost v prvih osmih dneh razvoja rastline iz semena v tekočem gojišču (Slika 12). Prvi dan semena niso kalila, zato so vse aktivnosti nizke. V naslednjih dneh smo izmerili skoraj konstantne dGuo, dCyd, dThd, dUrd, dFdC in AZT aktivnosti. Vseeno bi lahko rekli, da je višek vseh aktivnosti nekje četrty dan kaljenja, dAdo aktivnost pa je, za razliko od ostalih, med razvojem semena v rastlino naraščala vse do konca.



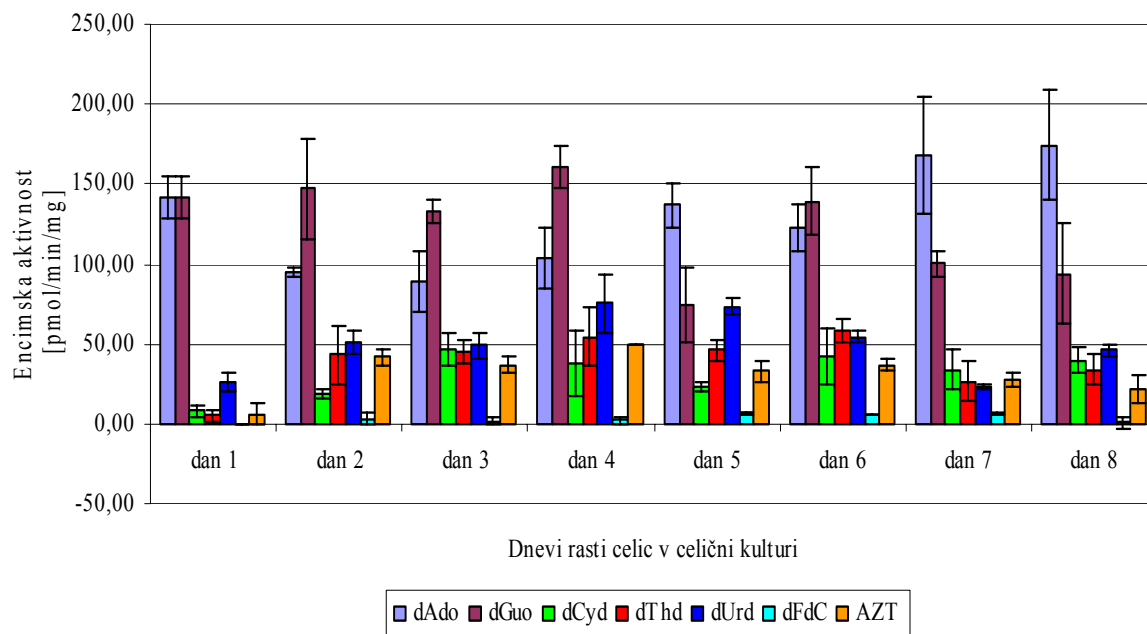
Slika 13: Primerjava dThd aktivnosti z njegovima analogoma dUrd in AZT v kalečih semenih iz slike 11. Substrati so 200 μ M. Prikazan je en poizkus z dvojnimi merjenjem in standardnim odklonom. dUrd je najboljši in AZT najslabši substrat.

Ko smo spet primerjali aktivnost dThd z njegovim analogom AZT, vidimo, da je aktivnost z dUrd višja od tiste s dThd, z drugim analogom, AZT, pa približno enaka ali malce nižja od dThd aktivnosti (Slika 13). Podoben vzorec, kot za AZT lahko vidimo, ko primerjamo dCyd z dFdC, kjer je naravni substrat očitno boljši od njegovega analoga (Slika 14).

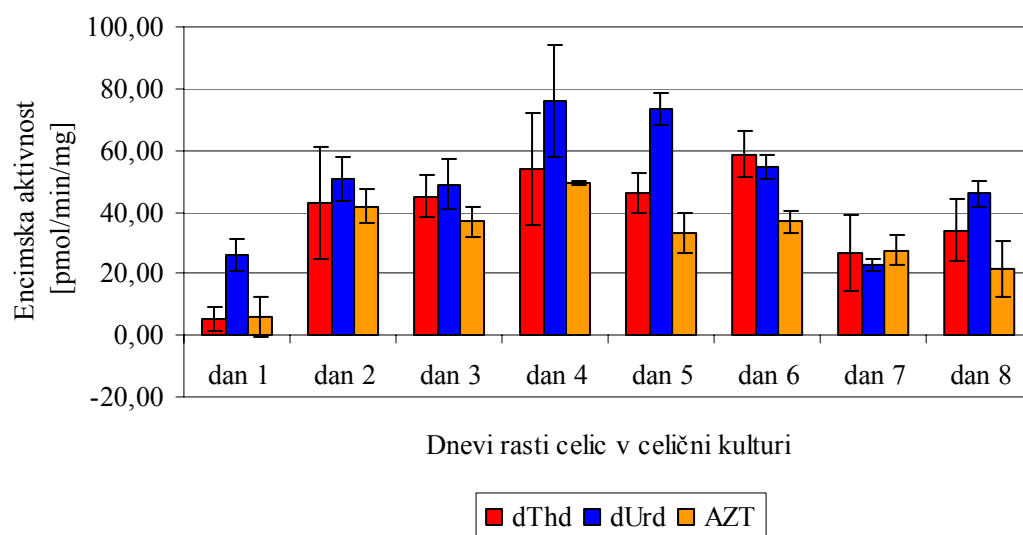


Slika 14: Primerjava dCyd aktivnosti z njegovim analogom dFdC v kalečih semenih iz slike 11. Substrati so 200 μ M. Prikazan je en poizkus z dvojnim merjenjem in standardnim odklonom. dCyd je boljši substrat.

Zanimalo nas je, če bi podoben vzorec dobili tudi v prvih dneh razvoja celične kulture. Zato smo izmerili aktivnosti v prvih osmih dneh tudi v rastlinski celični kulturi LER. Že prvi dan smo izmerili visoki aktivnosti s substratoma dAdo in dGuo, drugače pa smo dobili zelo podoben vzorec kot pri semenih, saj aktivnost z dAdo raste in je najvišja v sedmem in osmem dnevu (Slika 15), ostale aktivnosti pa so bolj kot ne konstantne z vrhuncem okoli dneva 4.

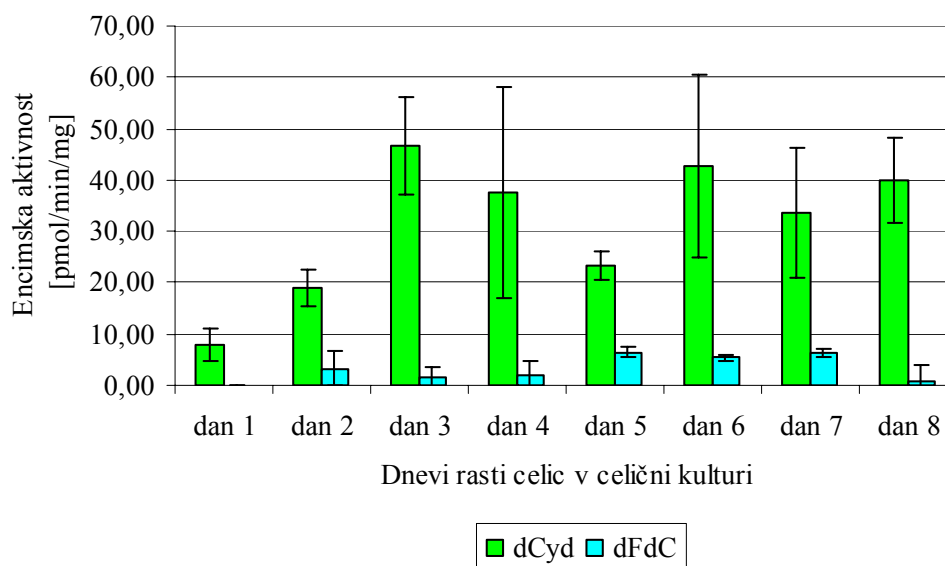


Slika 15: dNTP aktivnosti z različnimi substrati v celični kulturi LER v prvih 8 dneh rasti z 200 μ M substrati. Prikazan je en poizkus rasti z dvojnimi merjenjem s standardnim odklonom. dAdo in dGuo aktivnosti sta visoki že prvi dan, dAdo narašča, ostale aktivnosti so konstantne.



Slika 16: Primerjava dThd aktivnosti z njegovima analogoma dUrd in AZT v celični kulturi LER iz slike 14. Substrati so 200 μ M. Prikazan je en poizkus z dvojnimi merjenjem in standardnim odklonom. dUrd je tudi tu najboljši in AZT najslabši substrat.

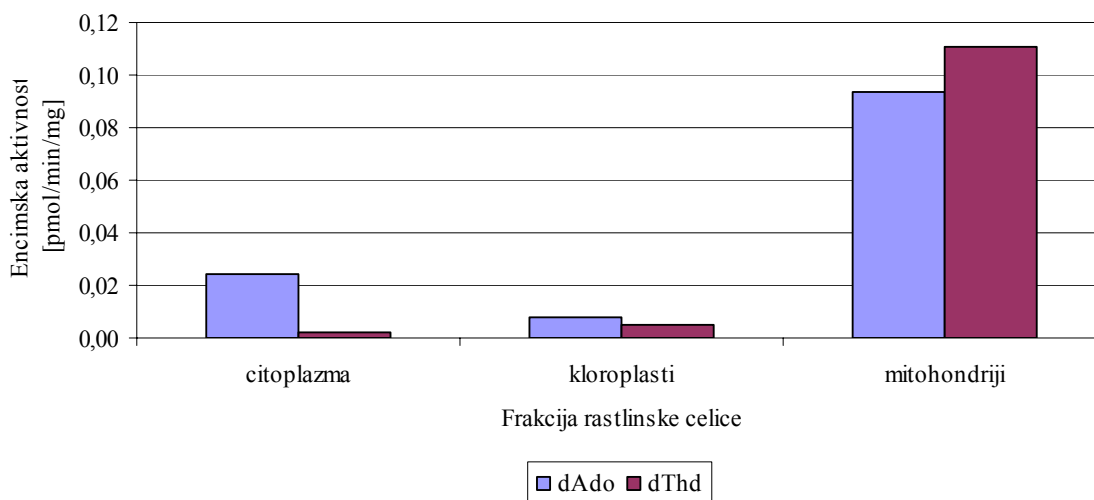
AZT je bil tudi tu skoraj tako dober substrat kot dThd, dUrd pa je bil spet najboljši med derivati dThd (Slika 16), aktivnost z dFdC pa je bila spet nižja od tiste z dCyd (Slika 17).



Slika 17: Primerjava dCyd aktivnosti z njegovim analogom dFdC v celični kulturi LER iz slike 14. Substrati so 200 μ M. Prikazan je en poizkus z dvojnim merjenjem in standardnim odklonom. dCyd je tudi tu boljši substrat.

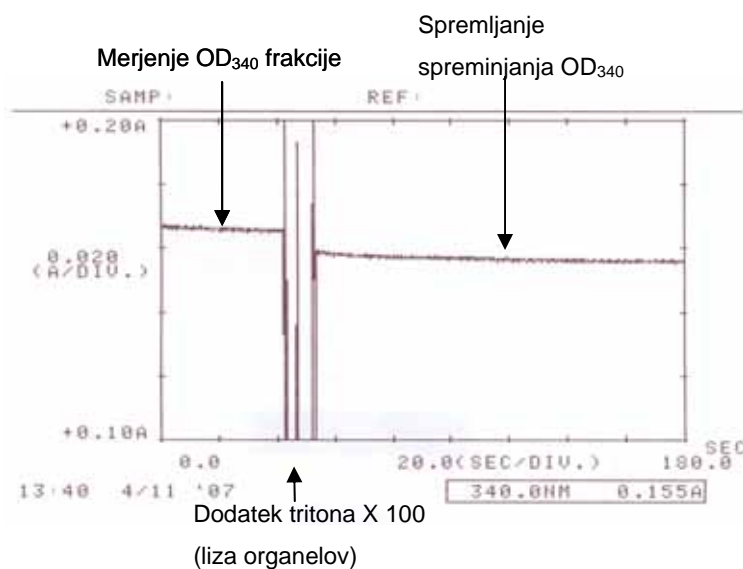
4.2 AKTIVNOST V RAZLIČNIH PREDELIH CELICE

Ker so Knecht in sodelavci (Knecht in sod., 2005) nakazali, da imajo rastline dve deoksiribonukleozidni kinazi, nas je zanimalo kje v rastlinski celici se ti dve kinazi nahajata. Po razdelitvi rastlinske celice in osamitvi citosolne, kloroplastne in mitohondrijske frakcije, smo izmerili aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz v frakcijah s substratoma za obe kinazi (dAdo za dAGCK in dThd za TK). Najvišja aktivnost obeh kinaz je bila v mitohondrijski frakciji (Slika 18 in Priloga B).

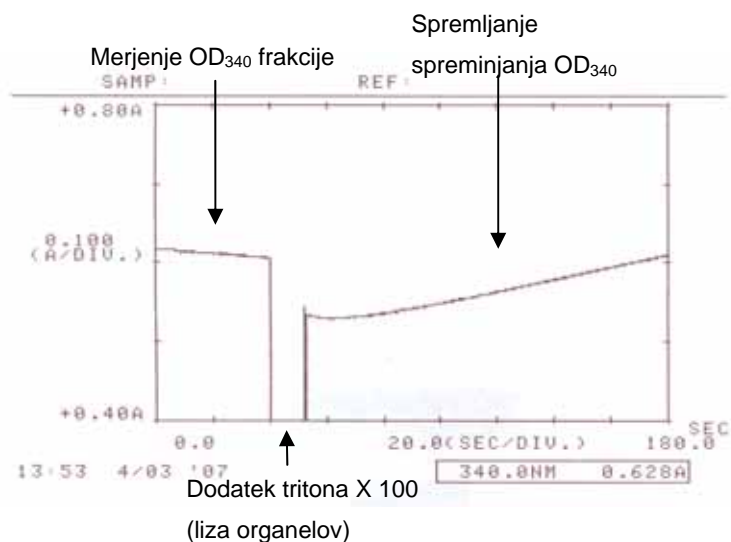


Slika 18: Aktivnosti na miligram proteinov v različnih frakcijah rastlinske celice, merjene z 200 μ M substratoma. Prikazan je en eksperiment. Aktivnost je najvišja v mitohondrijski frakciji.

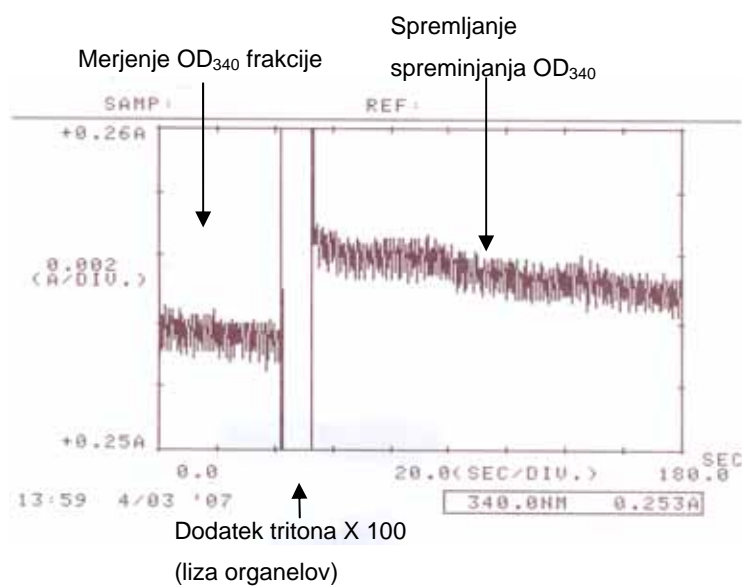
Ko smo poskušali dokazati mitohondrije v mitohondrijski frakciji z mitohondrijskima markerjema citokrom c oksidazo in ICDH (Slika 19 in Slika 21) nismo zaznali nobene aktivnosti markerskih encimov v nobeni frakciji.



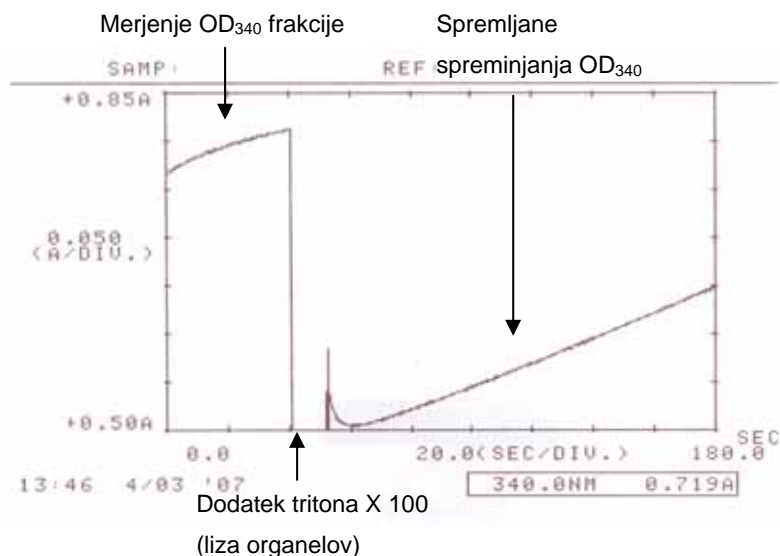
Slika 19: Meritev aktivnosti mitohondrijskega markerja ICDH v mitohondrijski frakciji po prvem delovnem protokolu. Ni zaznavne aktivnosti.



Slika 20: Meritev aktivnosti mitohondrijskega markerja ICDH v krompirjevih mitohondrijih po prvem delovnem protokolu. Zaznavna aktivnost markerskega encima.



Slika 21: Meritev aktivnosti mitohondrijskega markerja ICDH v mitohondrijski frakciji po drugem delovnem protokolu. Ni zaznavne aktivnosti.



Slika 22: Meritev aktivnosti mitohondrijskega markerja ICDH v krompirjevih mitohondrijih po drugem delovnem protokolu. Zaznavna aktivnost markerskega encima.

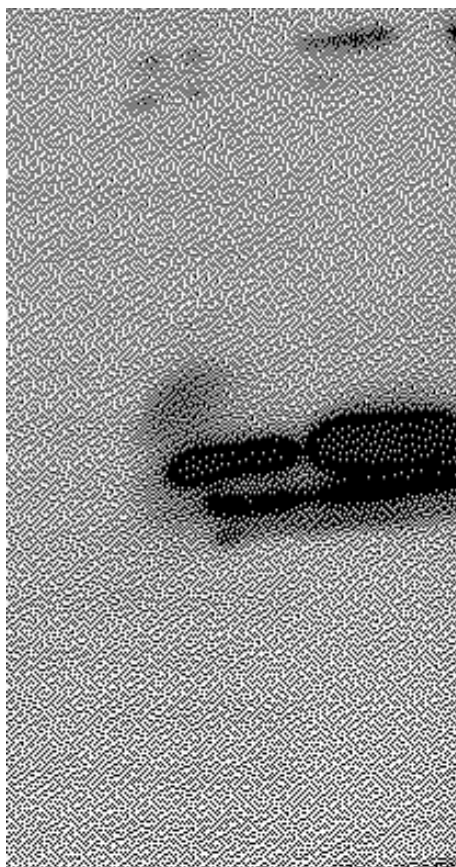
Aktivnost ICDH smo izmerili tudi v pozitivni kontroli, izoliranih mitohondrijev iz krompirjevih celic, da bi se prepričali, da meritev potek delovnega protokola pravilen. Dobili smo pozitiven rezultat (Slika 20 in Slika 22), vendar smo opazili, da je koncentracija proteinov krompirjevih mitohondrijih 140 krat višja od naše mitohondrijske frakcije (Preglednica 4).

Preglednica 4: Koncentracije proteinov v različnih frakcijah rastlinskih celic. Koncentracija naše mitohondrijske frakcije je 140 krat nižja od mitohondrijev izoliranih iz krompirja.

Frakcija	Koncentracije proteinov
Citoplazma	4.3 mg/ml
Kloroplasti	9.6 mg/ml
Mitohondriji	0.14 mg/ml
Mitohondriji iz krompirja (Daniela Geisler)	20.2 mg/ml

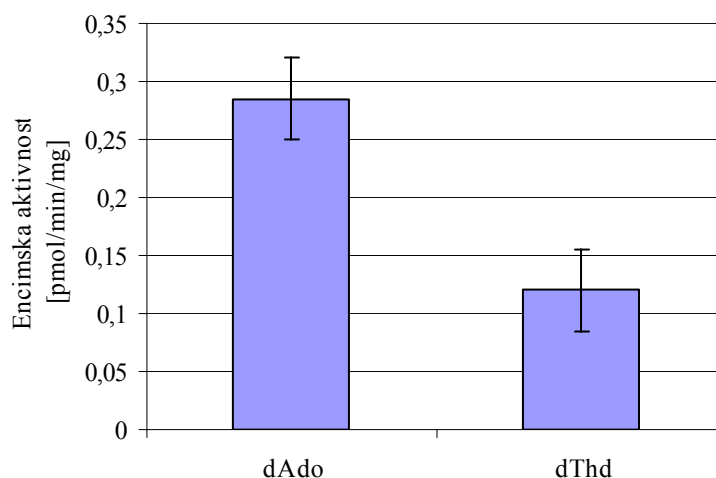
Z Western blot analizo smo skušali dokazati drug mitohondrijski marker, NAD9, ki je podenota kompleksa I v respiratorni verigi. Dokazali smo prisotnost mitohondrijskega markerja v mitohondrijski frakciji. Na žalost pa smo, zaradi membranske vezanosti markerja, imeli enako močno označeno tudi frakcijo s kloroplasti, kjer so ponavadi tudi poškodovani mitohondriji (Slika 23).

1 2 3



Slika 23: Western blot analiza z 28kDa membransko vezanim mitohondrijskim markerjem NAD9 v citosolni (1), mitohondrijski (2) in kloroplastni frakciji (3). Na gel smo nanegli enake količine proteinov (0.14 mg/ml). V citosolni frakciji ni zaznavnega NAD9, v mitohondrijski frakciji je prisoten, prisoten pa je tudi v kloroplastni frakciji, kjer je veliko poškodovanih mitohondrijev.

Ker smo že dokazali deoksiribonukleozidno kinazne aktivnosti v mitohondrijih *A. thaliana*, nas je zanimalo, če je enako visoka aktivnost tudi v krompirjevih mitohondrijih. V krompirjevih mitohondrijih smo aktivnosti tudi dokazali. Aktivnosti so bile, merjeno na miligram proteina, celo rahlo višje kot tiste v mitohondrijih iz *A. thaliana* (Slika 24).

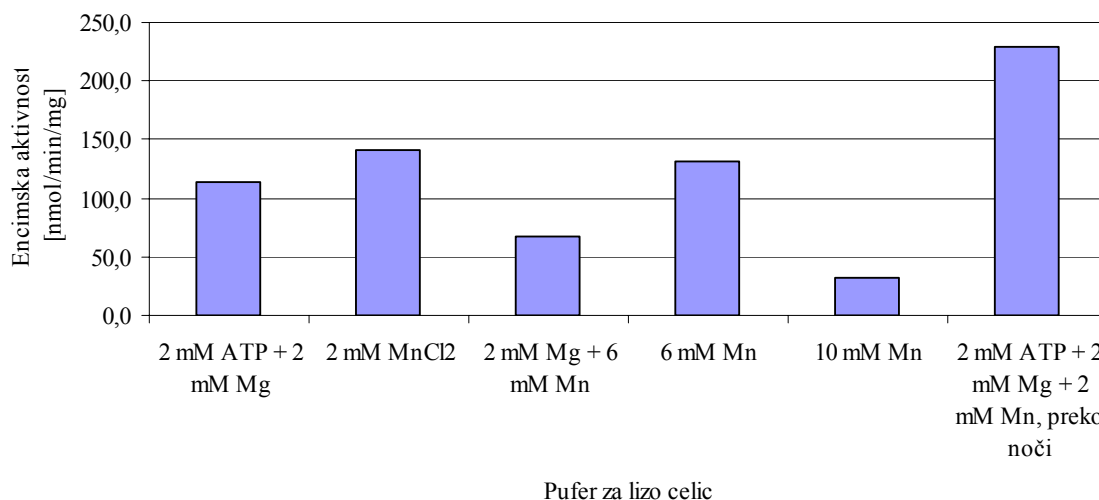


Slika 24: Aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz v krompirjevih mitohondrijih, merjeno z 200 μ M substrati. Prikazan je en poizkus z dvojnim merjenjem in standardnim odklonom. V krompirjevih mitohondrijih smo zaznali aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz.

4.3 REKOMBINANTNI ENCIM

4.3.1 Stabilizacija aktivnosti rekombinantne *AtdAGCK*

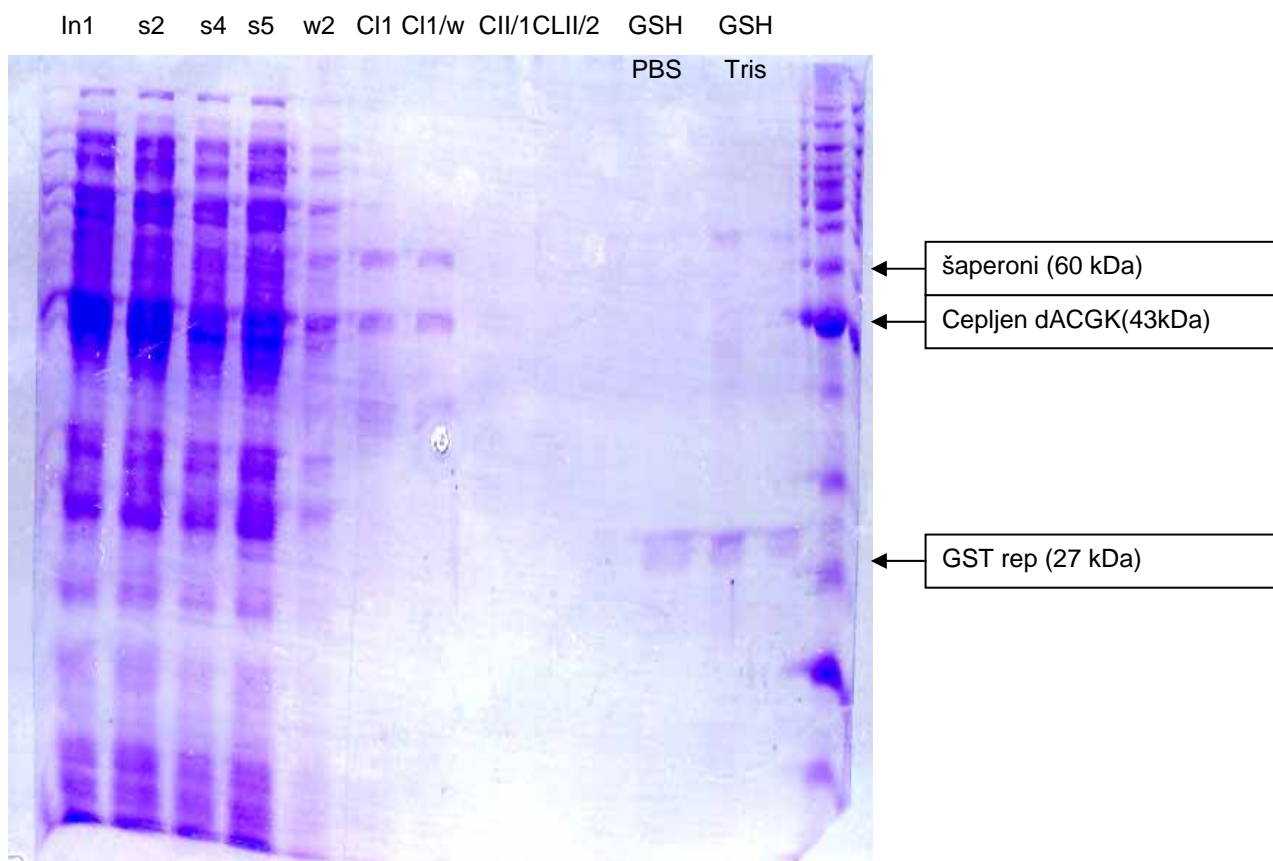
Preučiti smo hoteli še neproučeno rekombinantno *AtdAGCK*. Rekombinanten sev smo pripravili s transformacijo plazmida P605 v *E. coli* K12, sev KY895. Transformanto smo gojili do $OD_{600}=0.6$ in prekomerno sintezo spodbudili z IPTG. Testirali smo optimalne čase stimulacij prekomernega izražanja proteina. Najboljši čas je bil okoli 10 ur. Po 10 urah smo celice lizirali in začeli z izolacijo. Proučevanje tega proteina je bilo zaradi izredne nestabilnosti nemogoče, zaradi česar smo poskušali v pufre dodajati različne snovi, ki naj bi kinazo stabilizirali. Ugotovili smo, da moramo za stabilizacijo encima dodati v pufer donor fosfatne skupine (substrat ATP) ter manganove ione Mn^{2+} ($MnCl_2$) (Slika 25). Tako smo imeli v vseh poizkusih z rekombinantnim proteinom v pufru ti dve molekuli prisotni. Pri teh pogojih je bila kinaza stabilna pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vsaj pol leta.



Slika 25: Aktivnost rekombinantne dAGCK z dAdo v različnih puferih za lizo. Za vsak pufer smo naredili en eksperiment z eno časovno meritvijo. Pufer, ki je vseboval standardni pufer za lizo z dodatkom 2 mM ATP, 2 mM Mg in 2 mM Mn se je izkazal za najboljšega.

4.3.2 Čiščenje rekombinantnega proteina

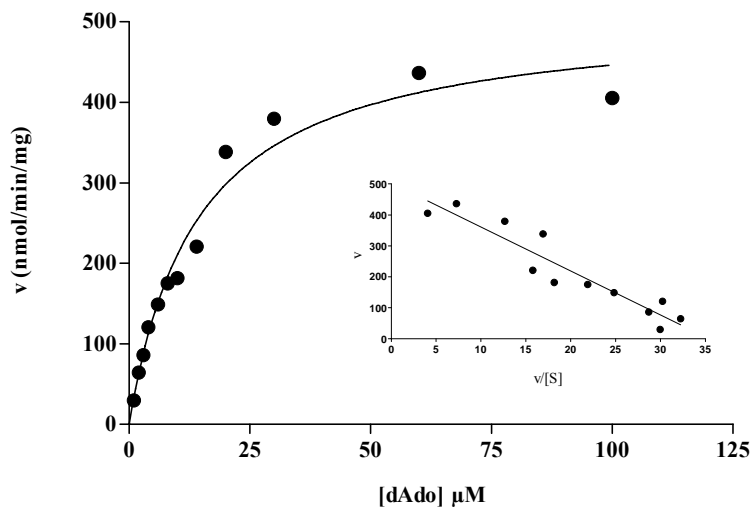
Po stabilizaciji rekombinantne dAGCK smo skušali protein očistiti. Uspelo nam je, čeprav le delno, odcepiti dAGCK od njegovega GST repa, ki se je držal na koloni z vezanim GSH. Vendar smo na SDS-PAGE gelu opazili še eno liso, veliko okoli 60 kDa (Slika 26), za katero smo, na podlagi predhodnih rezultatov čiščenja Dm-dNK, predvidevali, da je šaperon (Munch-Petersen in sod., 2000). Šaperon smo sprali z ATP pufrom (10 mM ATP v pufru A), vendar je to povzročilo inhibicijo cepljenja dAGCK z GST repa. Zato smo cepitev poskusili z in brez kalcijevih ionov Ca^{2+} na 4, 25 in 37 °C ter z izredno visoko koncentracijo trombina (od 5 do 50 krat več kot normalno, 2500 u/ml), vendar nam ni uspelo cepiti dAGCK od GST repa.



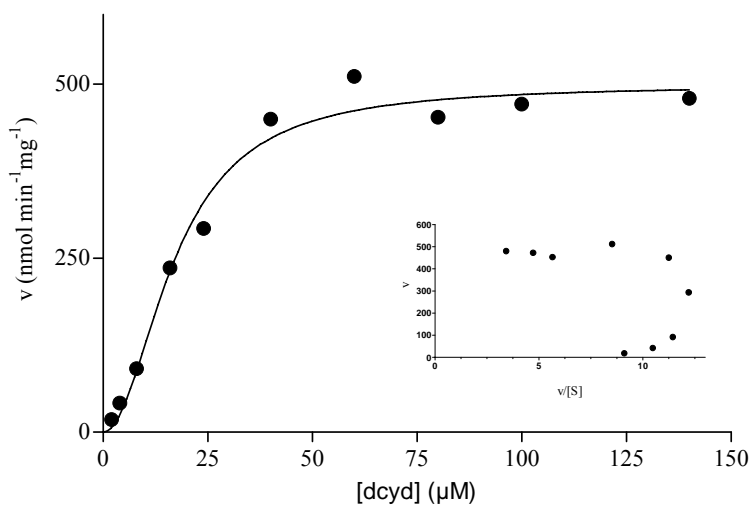
Slika 26: SDS gel čiščenja rekombinantne dAGC kinaze. Poleg lise pri 43 kDa (dAGCK) je bila vidna še lisa, velika 60 kDa (šaperoni). In1 je celotna frakcija, s2, 4, 5 so nevezane frakcije, w2 je izpirek s pufrom A, C11 je cepljena frakcija, C11/w je izpirek po cepljenju, CII/1 in CII/2 sta drugo cepljenje GSH PBS in GSH Tris sta izpiranje GST repa iz kolone v PBS pufru in v Tris pufru.

Po kar nekaj neuspešnih poskusih cepitve proteina od GST repa smo se odločili poskusiti izraziti paradižnikovo dAGCK s C-terminalno vezanim His repom (pASK 75 s TOMK-His). Lizo celic smo izvedli kot v predhodnem eksperimentu, v enakem pufru za lizo celic. Tudi to nam ni uspelo, saj nismo dobili zaznavne aktivnosti, zato smo se odločili, da bomo za nadaljnje poizkuse uporabili dAGCK z vezanimi šaperoni.

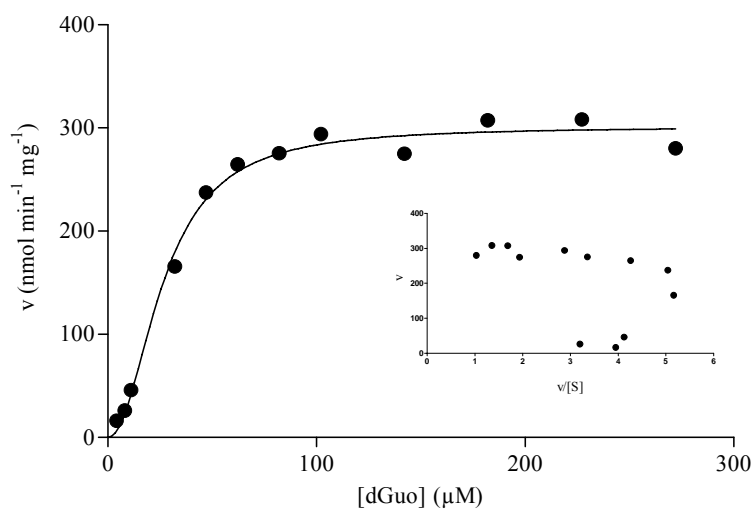
Kinetične lastnosti encima dACGK smo proučevali tako ob prisotnosti šaperonov.



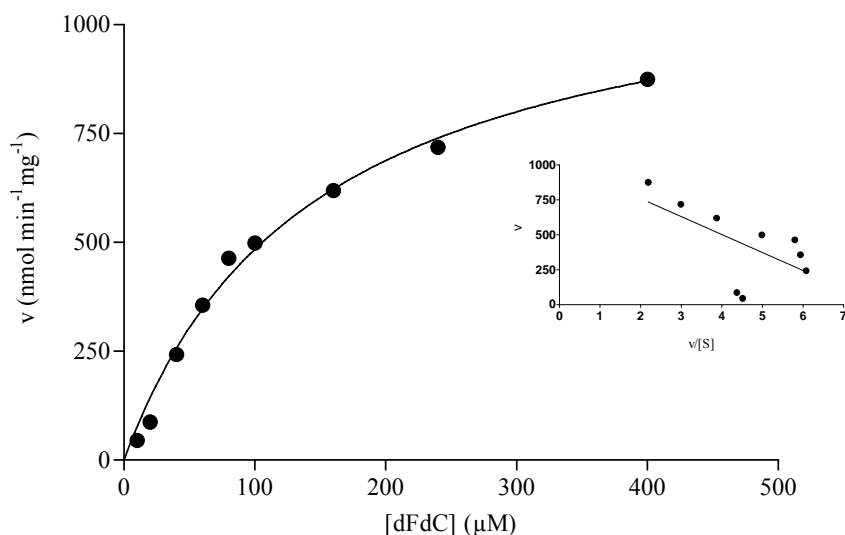
Slika 27: Kinetične lastnosti rekombinantnega encima dAGCK z dAdo. Krivulja kaže klasično Michaelis-Mentenovo kinetiko. Prikazan je en poizkus. Mali graf predstavlja Woolf-Hofstee graf, ki prikazuje hitrost reakcije v odvisnosti od razmerja hitrosti reakcije in koncentracije substrata. Ker je kinetika klasična Michaelis-Mentenova je ta graf linearen.



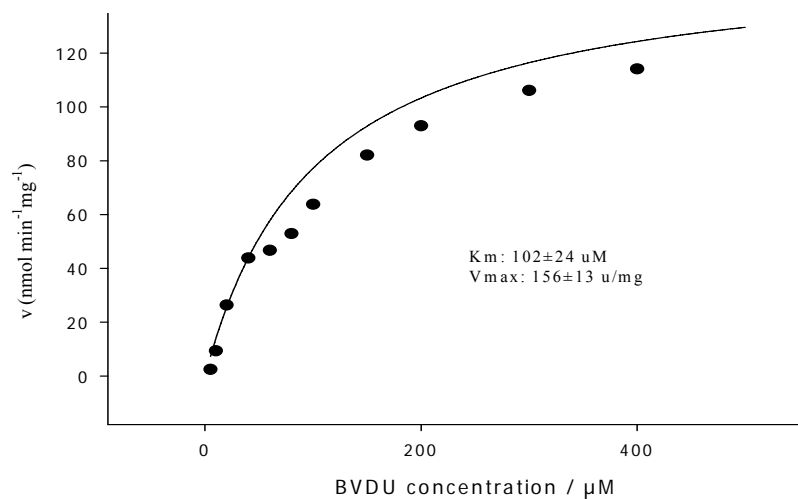
Slika 28: Kinetične lastnosti rekombinantnega encima dAGCK z dCyd. Krivulja kaže pozitivno kooperativnost. Prikazan je en poizkus. Mali graf predstavlja Woolf-Hofstee graf, ki prikazuje hitrost reakcije v odvisnosti od razmerja hitrosti reakcije in koncentracije substrata. Ker kinetika odstopa od klasične Michaelis-Mentenova je ta graf nelinearen.



Slika 29: Kinetične lastnosti rekombinantnega encima dAGCK z dGuo. Krivulja kaže pozitivno kooperativnost. Prikazan je en poizkus. Mali graf predstavlja Woolf-Hofstee graf, ki prikazuje hitrost reakcije v v odvisnosti od razmerja hitrosti reakcije in koncentracije substrata. Ker kinetika odstopa od klasične Michaelis-Mentenove je ta graf nelinearen.



Slika 30: Kinetične lastnosti rekombinantnega encima dAGCK z dFdC. Krivulja kaže klasično Michaelis-Mentenovo kinetiko. Prikazan je en poizkus. Mali graf predstavlja Woolf-Hofstee graf, ki prikazuje hitrost reakcije v v odvisnosti od razmerja hitrosti reakcije in koncentracije substrata. Ker je kinetika klasična Michaelis-Mentenova je ta graf linearen.



Slika 31: Kinetične lastnosti rekombinantnega encima dAGCK z BVDU. Krivulja kaže klasično Michaelis-Mentenovo kinetiko. Prikazan je en poizkus.

Preglednica 5: Kinetične lastnosti iz dveh nepovezanih poizkusov. Prikazana je standardna deviacija.

	K_m (μM)	V_{\max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{\max}/K_m ($\text{nmol/min mg } \mu\text{M}$)	n (Hillov koeficient)
dAdo	14.2 ± 0.7	685 ± 247	48,2	1.0
dGuo	26.3 ± 1.8	385 ± 117	14,6	2.0 ± 0.07
dCyd	16.3 ± 1.0	420 ± 99	25,7	1.9 ± 0.07
dFdC (Gemzar)	159 ± 20	1114 ± 35	7,0	1.0
BVDU:	113 ± 16	153 ± 5	1,3	1.0
dThd	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

*n.a.: ni aktivnosti

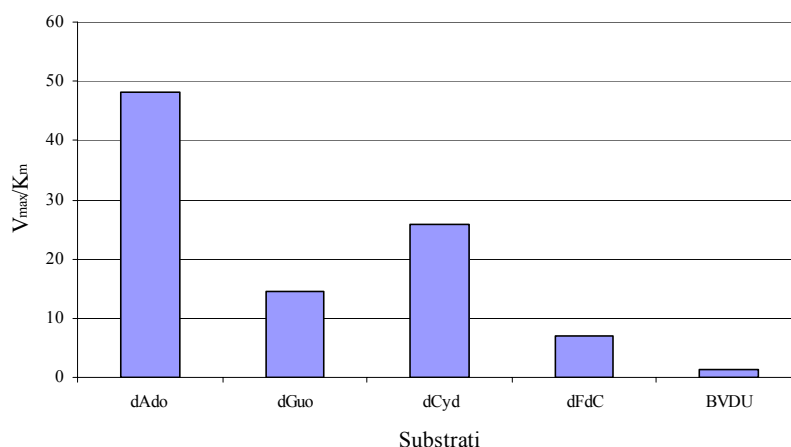
Preglednica 5 prikazuje, da je med vsemi naravnimi substrati, ki jih dAGCK sprejme, V_{\max} za dAdo največji, poleg tega je tudi K_m vrednost za ta substrat najmanjša. dGuo in dCyd

imata oba višjo vrednost K_m in nižjo V_{max} . Encim s substratoma dCyd in dGuo kaže pozitivno kooperativnost, kar se vidi tudi iz krivulj (Slika 28 in Slika 29), kjer krivulji kažeta odklon od normalne Michaelis-Mentenove kinetike s sigmoidno obliko krivulje in nelinearen graf Hoffstee. Hillov koeficient je enak 2.

Presenetljivo je, da je vrednost V_{max} za dFdC celo višji od najboljšega substrata, dAdo, za ta encim, vendar ima tudi relativno visok K_m . Torej, če gledamo vrednost V_{max}/K_m , lahko vidimo, da ni tako dober substrat, kot so naravni substrati (Slika 32). Presenetljivo je tudi dejstvo, da dAGCK ne more fosforilirati dThd, lahko pa fosforilira tako dUrd (podatki niso prikazani) kot tudi BVDU (Slika 31), oba njegova analoga, čeprav z relativno nizko vrednostjo V_{max} in visoko K_m .

V prisotnosti substrata dAdo kaže encim klasično Michaelis-Mentenovo kinetiko (Slika 27).

Preglednica 5 kaže tudi, da ima encim z dAdo najvišjo vrednost V_{max} in najnižjo K_m od vseh naravnih substratov. S tem ima tudi najvišjo vrednost V_{max}/K_m (Slika 32), torej lahko zaključimo, da je najboljši substrat za rekombinantno dAGCK. Drugi najboljši substrat je dCyd z rahlo višjim K_m in nižjim V_{max} , dGuo pa je od vseh treh najslabši substrat. dAGCK lahko fosforilira tudi dFdC (Slika 30) skoraj tako dobro kot dGuo. Poleg tega pa lahko uporabi tudi nekatere druge analoge z nizko učinkovitostjo (Slika 31).



Slika 32: V_{max}/K_m za dAGCK z različnimi substrati. Prikazan je izračun iz povprečnih vrednosti. dAdo je najboljši substrat.

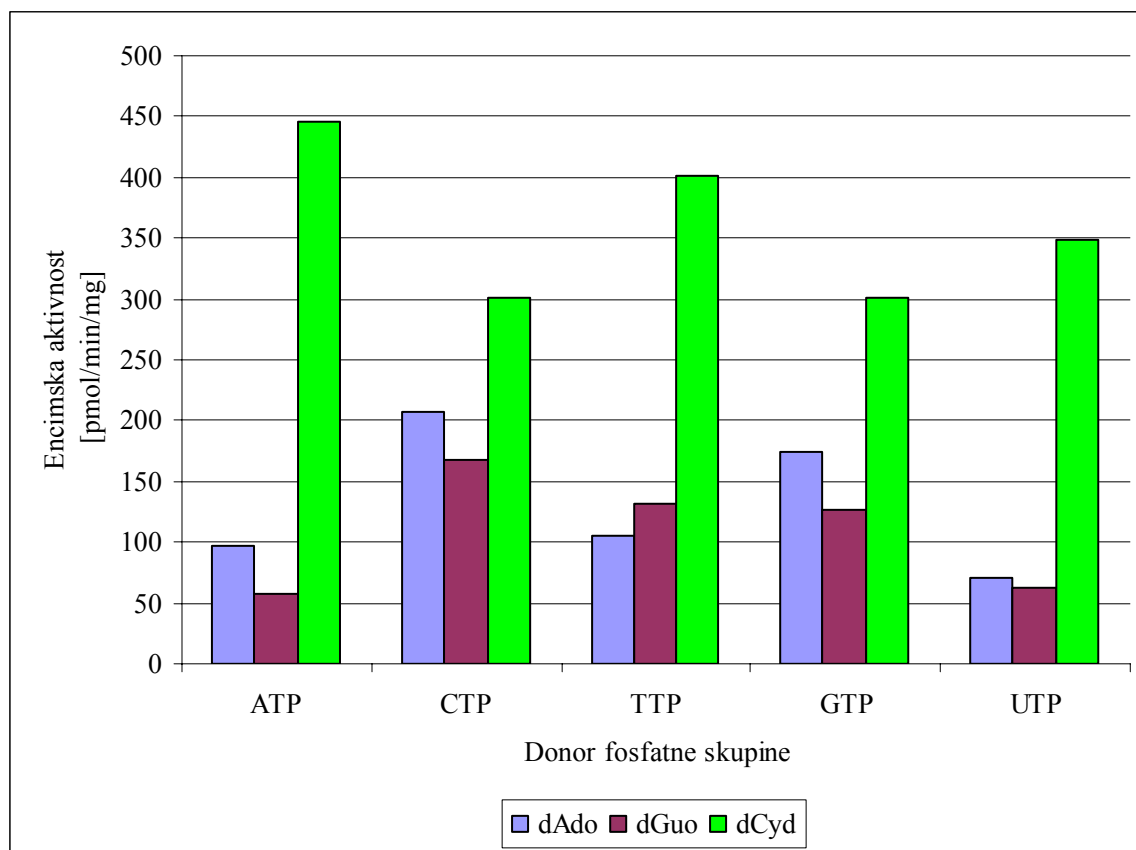
Ker smo delali z multisubstratnim encimom nas je zanimalo tudi kako vplivajo substrati drug na drugega. Merili smo fosforilacijo pri različnih koncentracijah substrata (radioaktivno označen nukleozid) in inhibitorja (neoznačen nukleozid). Najmanj se je prisotnost drugega substrata poznala dAdo, ki je bil tudi najboljši inhibitor ostalih dveh substratov. Najmanj vpliva je imela prisotnost dCyd na aktivnost z označenim dGuo. Vse inhibicije so bile reverzibilne kompetitivne inhibicije iz česar lahko zaključimo, da vsi substrati uporabljajo isto aktivno mesto na encimu.

Preglednica 6: Merjenje kompeticije za encim *AtdAGCK*. Prikazana sta dva nepovezana poizkusa s standardno deviacijo.

Substrat	Inhibitor	Ki
dA	dG	197±45
	dC	78±28
dG	dA	46±16
	dC	280±28
dC	dA	9±2
	dG	30±15

dAGCK je encim, ki za kataliziranje reakcije potrebuje dva sustrata, nukleozid, ki je sprejemnik fosfatne skupine, ter donorja fosfatne skupine. Vse kinetične lastnosti smo izmerili z ATP, kot donorjem fosfatne skupine, saj je bil že predhodno prisoten v pufrih, saj je nujen za stabilnost rekombinantnega encima. Vseeno pa nas je zanimalo kateri od donorjev fosfatne skupine je za ta encim najboljši. Ker smo že v vseh pufrih imeli prisoten ATP, smo hoteli najprej zmanjšati njegov vpliv na reakcijo. Zato smo skušali odstraniti ATP s kolono PD10 (Pharmacia) za razsoljevanje, s pufrom brez ATP. Encim je popolnoma izgubil aktivnost. Ker z razsoljevanjem nismo uspeli, smo poskušali encim razredčiti, s čimer bi dosegli koncentracijo ATP, nižjo od predvidene vrednosti K_m za ta substrat. Vendar smo s tem encim razredčili do te mere, da aktivnosti nismo uspeli več

zaznati. Vseeno smo se odločili da vsaj približno določimo najboljši donor fosfatne skupine v prisotnosti ATP (0.01 mM) z 10 mM alternativnimi donorji fosfatnih skupin. Tako nam ti podatki dajo vsaj idejo kako se encim obnaša v rastlinah, saj smo imeli okoli 1000 krat več alternativnega donorja fosfatne skupine, kot ATP. ATP očitno ni najboljši donor za vse substrate. Za substrata dAdo in dGuo je bil CTP najboljši donor, za dCyd pa je bil ATP boljši (Slika 33).



Slika 33: Meritve za najboljšega donorja fosfatne skupine s 100 μ M substrati in 10 mM donorji. Prikazan je en poizkus. Za purine je najboljši donor fosfatne skupine CTP. V vseh eksperimentih je bil še vedno prisoten 10 μ M ATP.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 UVOD

Reciklažna pot nastanka deoksiribonukleotidov organizmom zagotavlja gradnike za sintezo in popravilo DNK. Poleg tega je ta metabolna pot pomembna pri aktivaciji protivirusnih in protirakavih deoksiribonukleozidnih učinkovin.

Mnogo deoksiribonukleozidnih kinaz so že našli v organizmih in jih tudi proučili. V rastlinah to področje ni raziskano. Raziskovanje rastlin je zanimivo tudi zaradi dejstva, da nimajo le dveh organelov, kot ostali evkarionti, ampak imajo poleg jedra in mitohondrija še kloroplaste. Vsi trije organeli imajo svojo DNK, zaradi česar mora celica priskrbeti dovolj gradnikov DNK za vse tri organele.

Za razumevanje reciklažne poti v rastlinah smo si izbrali modelno rastlino *Aabidopsis thaliana*, saj to vrsto raziskovalci ponavadi uporabljajo kot model za študij molekularne genetike v rastlinah.

Dva gena za deoksiribonukleozidni kinazi sta bila že opisana v rastlinah, vendar pa encimov niso podrobno opisali (Knecht in sod., 2003a; Knecht in sod., 2005). Zato je bil namen diplomske naloge v rastlinah *in situ* določiti aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz ter proučiti rekombinantne dAGCK. Delo smo organizirali v dveh delih. V prvem smo izmerili aktivnosti v rastlinskem tkivu, kalečih semenih in rastlinskih celičnih kulturah. Poleg tega smo v prvem delu poskušali tudi razdeliti rastlinske celice na organele in izmeriti aktivnosti v teh frakcijah. V drugem delu smo plazmid z genom za rekombinantno kinazo vnesli v bakterijo *E. coli* in spodbudili prekomerno sintezo *At*dAGCK, rekombinantni protein očistili in ga kinetično preučili.

5.2 ANALIZA REZULTATOV

Delo smo začeli z zbiranjem listkov in vršičkov odraslih rastlin *A. thaliana*. Izmerili smo aktivnost (Slika 11) in s tem pokazali, da v rastlini *A. thaliana* lahko zaznamo aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz. Ko smo primerjali aktivnosti v različnih delih odrasle rastline smo ugotovili, da je aktivnost deoksiribonukleozidnih kinaz s purini presenetljivo mnogo višja kot tista s pirimidini, saj je ponavadi TK v celicah bolj učinkovita od ostalih deoksiribonukleozidnih kinaz. Opazili smo tudi razliko med mladimi, hitro rastočimi celicami ter celicami v zrelih organih rastline. Rahlo višja aktivnost v hitrorastočih celicah ni presenetljiva, saj potrebujejo hitro rastoče celice več deoksiribonukleozidov za podvojevanje DNK, zaradi česar sintetizirajo več encimov reciklažne poti. Deoksiribonukleozidne kinaze v rastlini *A. thaliana* lahko fosforilirajo AZT enako učinkovito, kot dThd, saj sta obe aktivnosti v istem obsegu. dFdC, analog dCyd ni dober substrat za dAGCK kinazo *in situ*, saj ga ta fosforilira mnogo slabše.

Prvi dnevi razvoja rastline so zagotovo polni sprememb, saj novo razvijajoče se rastline nimajo enakega izražanja genov kot zrele rastline. Zato nas je zanimalo, kako pomembna je reciklažna pot za kaleča semena. Na začetku reciklažna pot ni zelo aktivna, kar je se ujema z dejstvom, da so semena mirujoče strukture rastline in torej metabolno neaktivne. Ko začnejo kaliti celice izražajo več encimov reciklažne poti, kar smo izmerili z merjenjem aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz (Slika 12). Povečanje aktivnosti pa sovпада tudi z opazovanjem semen, saj smo okoli četrtega dne že na oko videli zelene dele rastlin. Najvišja aktivnost deoksiribonukleozidnih kinaz je bila s purini. To nas je presenetilo, saj je navadno v celicah od vseh deoksiribonukleozidnih kinaz najbolj učinkovita TK1, zaradi česar je ponavadi dThd substrat, ki je najbolj fosforiliran. Na začetku je dGuo aktivnost najvišja, dAdo pa druga najvišja. Predpostavljamo, da razvijajoča rastlina najbolj potrebuje dAdo, saj se dAdo aktivnost začne večati in kmalu postane najvišja (Slika 12).

Rastlinska celična kultura LER je vsak teden prenesena v novo gojišče, zaradi česar celice te celične kulture konstantno rastejo in se razmnožujejo. Izmerjene visoke aktivnosti rastlinskih celic celične kulture LER s substratoma dAdo in dGuo že na začetku zato niso

presenetljive, saj so celice metabolno aktivne že prvi dan (Slika 15). Drugače s celično kulturo potrdimo, da rezultati, ki smo jih dobili s kalečimi semeni, nakazujejo dejansko situacijo v rastlinskih celicah med prvimi dnevi razvoja. Vzorec aktivnosti je pri kalečih semenih in celičnih kulturah enak. V obeh primerih je prisotna tudi nizka aktivnost z obema merjenima analogoma, AZT in dFdC.

Zaradi predhodnih opazovanj, da ima ena od TK1 podobnih kinaz v *A. thaliana* signalni peptid, ki določa prenos tega encima v mitohondrij (Knecht in sod., 2003) in zaradi naše radovednosti, kako rastlina uspe zagotoviti gradnike za DNK v vseh organelih, smo razdelili rastlinske celice na mitohondrijsko, citosolno in kloroplastno frakcijo. Na žalost smo imeli pri vseh poizkusih težave z ekstremno nizkimi donosi mitohondrijev in s tem nizkimi koncentracijami proteinov v mitohondrijski frakciji (Preglednica 4). Meritev encimske aktivnosti je bila, zaradi radioaktivnega določevanja, dovolj občutljiva za zaznavanje tudi nizke aktivnosti (Slika 18). Nasprotno ni bilo nobeno določanje encimske aktivnosti mitohondrijskih markerjev dovolj občutljivo za dokaz mitohondrijev v mitohondrijski frakciji (Slika 19 in Slika 21). Z Western blot analizo smo kasneje dokazali prisotnost mitohondrijev v mitohondrijski frakciji, vendar smo hkrati zaznali približno enako močno liso tudi v kloroplastni frakciji, kar pomeni, da smo imeli približno 50 % mitohondrijev poškodovanih, zaradi česar smo jih zaznali v kloroplastni frakciji in le 50 % nepoškodovanih mitohondrijev. To sicer ni presenetljivo, saj je metoda, ki smo jo uporabili za osamitev organelov optimizirana za obogatitev mitohondrijev iz krompirjevih nezelenih delov in bi jo morali za *A. thaliana* celično kulturo dodatno optimizirati.

Brez dvoma lahko trdimo, da sta obe kinazi, dAGCK in dTK v rastlinski celici prisotni v mitohondriju (Slika 18). Enak rezultat smo dobili tudi, ko smo izmerili obogateno frakcijo krompirjevih mitohondrijev (Slika 24). Ne moremo pa zagotoviti, da sta encima prisotna izključno v mitohondriju, saj nam metoda zagotavlja obogatitev mitohondrijev, kar pa pomeni, da ni razvita za pridobitev čiste citosolne frakcije in nepoškodovanih kloroplastov. Prav tako metoda ne omogoča vzdrževanja aktivnih kloroplastov. Možno je, da smo med obogatitvenim postopkom za mitohondrije izgubili aktivnost encimov, ki je morda prisotna v citoplazmi in kloroplastu.

Dodatni eksperimenti, ki jih je izvedel Anders Clausen, so potrdili večinsko aktivnost obeh kinaz v mitohondriju. Dokazal je tudi prisotnost mitohondrijskega markerja ICDH v mitohondrijski frakciji, a ne v ostalih dveh frakcijah (Priloga B).

Zanimivo je, da sta obe rastlinski deoksiribonukleozidni kinazi prisotni v mitohondriju kljub nakazovanjem, da bi lahko ena od *AtTK* kinaz vsebovala signalni peptid za vnos v mitohondrij (Knecht in sod., 2003). Vsekakor bi bilo zanimivo videti, kako je organiziran transport, da je dovolj deoksiribonukleotidov za podvojevanje in popravilo DNK v jedru.

Encim je izgubljal aktivnost, zato smo morali vložiti kar nekaj truda, da nam je uspelo dovolj stabilizirati rekombinantno dAGCK, da smo jo lahko očistili in raziskali (Slika 26). V pufru za lizo je bil encim, shranjen pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, aktiven vsaj 6 mesecev.

Po začetnem uspehu stabilizacije encima smo poskusili encim tudi očistiti. Kljub mnogim poskusom, da bi ga očistili, nismo uspeli dobiti čistega proteina. Po prvem čiščenju je bil poleg nizke koncentracije encima dAGCK prisoten še en protein, velik 60 kDa (Slika 26). Ta drugi protein smo izprali z visoko koncentracijo ATP pri naslednjem čiščenju. Glede na predhodne rezultate in izkušnje smo zaključili, da gre za šaperon. Vendar poskusi, da bi odcepili encim stran od GST repa brez šaperonov žal niso uspeli. Zato smo morali za merjenje ostalih lastnosti encima uporabiti encim s prisotnimi šaperoni. Predvidevamo, da so šaperoni encim držali v strukturi, ki je trombinu omogočala cepitev. Ko smo šaperone odstranili se je mesto, kjer bi trombin cepil umaknilo v notranjost 3D strukture, zaradi česar cepitev ni uspela.

Knecht in sodelavci (Knecht in sod., 2003) so izmerili najvišjo aktivnost rekombinantne dAGCK v celičnih ekstraktih s substratom dAdo. Naša kinetična opazovanja so to potrdila (Slika 32), saj ima ta substrat najvišjo vrednost V_{\max}/K_m . Drugi najboljši substrat bi moral po predvidevanjih (Knecht in sod., 2003) biti dGuo, kar pa se z našimi meritvami ne sklada, saj je drugi najboljši substrat za ta encim dCyd. Verjetno je bilo v celičnih ekstraktih tako veliko dAdo, da je popolnoma zasenčil fosforilacijo dCyd, zaradi česar se

je zdel dGuo boljši substrat kot dCyd. To hipotezo potrjuje tudi dejstvo, da je dCyd aktivnost mnogo bolj občutljiva za inhibicijo z dAdo, kot dGuo aktivnost (Preglednica 6).

Aktivnost dAGCK kinaze s substratoma BVDU (Slika 31) in dUrd sta presenetljiva, saj imajo rastline aktivno dTK, ki fosforilira dThd in njegove analoge (Knecht in sod., 2003). Izgleda, da ima naš encim skoraj tako široko substratno specifičnost kot *Drosophila melanogaster* dNK.

Pri kinetičnem proučevanju rekombinantne dAGCK smo naleteli na zanimivo, vendar ne presenetljivo dejstvo. Encim kaže odklon od klasične Michaelis-Mentenove kinetike z dvema substratoma, dGuo (Slika 29) in dCyd (Slika 28). Najboljši matematični približek krivulji da vrednost Hillovega koeficienta enako 2 (Preglednica 5). To pomeni, da encim kaže pozitivno kooperativnost s tema dvema substratoma. Lahko bi zaključili, da je encim histeretični encim ali da je dimer. Vendar je encim, glede na predhodno opisane deoksiribonukleozidne kinaze (Munch-Petersen in sod., 1991; Munch-Petersen in sod., 1998), verjetno dimer. Da bi potrdili našo hipotezo bi morali narediti gelsko kromatografijo, s čimer bi dobili molekulsko maso tega proteina.

dAGCK je multisubstratni encim, kar pomeni, da mora za različne substrate imeti različna aktivna mesta, ali pa substrati med seboj tekmujejo za isto aktivno mesto na encimu. Zato smo izmerili stopnjo, s katero inhibitorji (neoznačeni substrati) omejujejo fosforilacijo substrata (radioaktivno označen substrat). Opazili smo nedvomno kompetitivno inhibicijo med substrati za aktivno mesto (Preglednica 6).

dAdo je od vseh substratov najmanj inhibiran, poleg tega pa je tudi najboljši inhibitor ostalih naravnih substratov (Preglednica 6). Opazovanje je logično in potrjuje, da je dAdo res najboljši substrat za dAGCK. Nizek vpliv prisotnosti dCyd pri fosforilaciji dGuo le kaže, da je dCyd slab inhibitor slabega substrata.

Vse inhibicije so bile reverzibilne kompetitivne inhibicije. Predhodno karakterizirane deoksiribonukleozidne kinaze so dimeri z le enim aktivnim mestom na podenoto. Substrati morajo za aktivno mesto tekrovati in so zato reverzibilni kompetitivni inhibitorji. Ker je

naša kinaza imela enak vzorec odzivanja, kot že preučevane kinaze, sklepamo, da je verjetno dimer.

Kljub temu, da smo imeli težave s prisotnostjo ATP v pufrih, smo poskušali izmeriti kateri donor fosfatne skupine je najboljši. Za najboljši donor fosfatne skupine za purine se je izkazal CTP (Slika 33), kar so za multisubstratno deoksiribonukleozidno kinazo iz vinske mušice, DmNK, pokazali že Munch-Petersen in sodelavci (Munch-Petersen in sod., 1998). Vseeno meritve niso popolnoma zanesljive, saj smo imeli v reakcijski mešanici vedno prisoten 10 μ M ATP. Da bi dejansko vedeli, kakšno je razmerje med različnimi donorji fosfatne skupine, bi morali že od začetka encim čistiti posebej za vsak fosfatni donator ter v vsak pufer dodati svoj donator fosfatne skupine namesto ATP.

5.3 SKLEPI

- V rastlinah je reciklažna pot nastanka deoksiribonukleotidov aktivna.
- Encimi reciklažne poti fosforilirajo purine bolje kot pirimidine.
- V prvih osmih dneh razvoja nove rastline se dAdo aktivnost veča, ostale aktivnosti pa so konstantne od drugega dne razvoja dalje.
- Deoksiribonukleozidni kinazi v rastlinah najdemo v mitohondrijih.
- Rekombinantni encim dACGK je aktiven le ob prisotnosti donorja fosfatne skupine ter manganovih in magnezijevih ionov.
- dACGK lahko fosforilira dAdo, dGuo, dCyd, dUrd in njihova analoga dFdC in BVDU.
- Najboljši substrat za dACGK je dAdo.
- dACGK ne more fosforilirati dThd in njegovega analoga AZT.
- dACGK kaže klasično Michaelis-Mentnovo kinetiko, le ko fosforilira dGuo in dCyd kaže pozitivno kooperativnost vezave.
- dACGK lahko kot donor fosfatne skupine vzame kateri koli trifosfat, ko so substrat purini je najboljši CTP, ko je substrat dCyd je najboljši ATP.
- Vsi substrati med seboj tekmujejo za isto vezavno mesto z reverzibilno kompetitivno inhibicijo, najboljši inhibitor je dAdo.

6 POVZETEK

Deoksiribonukleotidi so gradniki DNK, ta pa nosi zapis za lastnosti celice. Deoksiribonukleotide lahko celica zagotovi preko »*de novo*« ali preko reciklažne poti. Hitrost reciklažne poti uravnava predvsem deoksiribonukleozidne kinaze, ki fosforilirajo deoksiribonukleozide v monofosfate. Te naprej kinaze fosforilirajo v trifosfate, s čimer so pripravljene za vključitev v molekulo DNK.

Organizmi imajo različno število deoksiribonukleozidnih kinaz. Sesalci gradnike za svojo DNK v jedru zagotavljajo z obema potema, v mitohondriju pa le z reciklažno potjo, saj imajo v mitohondrijih kar dve od štirih deoksiribonukleozidnih kinaz.

Rastline morajo poleg gradnikov za jedrno in mitohondrijsko DNK zagotoviti tudi gradnike za kloroplastno DNK. Da bi ugotovili kako jim to uspe smo z radioaktivno označenimi substrati merili aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz v rastlinah in ugotovili, da imajo rastline reciklažno pot aktivno že kmalu po začetku razvoja, saj takrat potrebujejo veliko nukleotidov. Ugotovili smo tudi, da je reciklažna pot prisotna v mitohondrijih, v kloroplastih in citosolu pa aktivnosti nismo uspeli dokazati, kar nas je zelo presenetilo.

Encimi reciklažne poti v rastlinah fosforilirajo purine boljše od pirimidinov, kar ni pogosto, saj ponavadi ozkospecifična TK1 mnogo hitreje fosforilira svoj substrat dThd, kot ostale deoksiribonukleozidne kinaze ostale substrate.

Opisali smo tudi lastnosti ene od dveh deoksiribonukleozidnih kinaz v rastlinah, dACGK. Ta kinaza lahko fosforilira dAdo, dCyd, dGuo, dUrd ter njihova derivata BVDU in dFdC, ne more pa fosforilirati dThd in njegovega analoga AZT. Vsi substrati, ki jih ta encim lahko uporabi med seboj tekmujejo za isto vezavno mesto in so eden drugemu reverzibilni kompetitivni inhibitorji. Za donorje fosfatnih skupin lahko uporabi širok spekter trifosfatov, od katerih sta CTP in ATP najboljša, prvi za purine in drugi za dCyd.

7 VIRI

- Behal R.H., Oliver D.J. 1998. NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. Characterisation of two closely related subunits. *Plant Molecular Biology*, 36: 691-698
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. 2002. *Biochemistry*. 5th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 974 str
- Bohman C., Eriksson S. 1988. Deoxycytidine kinase from human leukemic spleen: Preparation and characterisation of the homogenous enzyme. *Biochemistry*, 27: 4258-4265
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Carnot C., Wehelie R., Eriksson S., Bölske G, Wang L. 2003. Molecular characterization of thymidine kinase from *Ureaplasma urealyticum*: nucleoside analogues as potent inhibitors of mycoplasma growth. *Molecular Microbiology*, 50: 771-780
- Cheng Y.C., Domin B., Lee L.S. 1977. Human deoxycytidine kinase: purification and characterisation of the cytoplasmic and mitochondrial isoenzymes derived from blast cells of acute myelocytic leukaemia patients. *Biochimica et Biophysica Acta*, 481: 481-492
- Datta N.S., Shewach D.S., Hurley M.C., Mitchell B.S., Fox I.H. 1989. Human T-lymphoblast deoxycytidine kinase: purification and properties. *Biochemistry*, 28: 114-123
- De Clercq E., Descamps J., De Somer P., Barr P.J., Jones A.S., Walker R.T. 1979. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 2947-2951

- Elias S.J.A., Eriksson S. 1995. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacology and Therapeutics*, 67: 155-186
- Engström Y., Jildevik I., Skog S., Thelander L., Tribukait B. 1985. Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 9114-9116
- Gilles A.M., Presecan E., Vonica A., Lascu I. 1991. Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 8784-8789
- Hatzis P., Said A., Jüllig M., Petrakis T.G., Eriksson S., Talianidis I. 1998. The intracellular localisation of deoxycytidine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 30239-30243
- Igarashi K., Hiraga S., Yura T. 1967. A deoxythymidine kinase deficient mutant of *Escherichia coli*. II. Mapping and transduction studies with phage Φ 80. *Genetics*, 57: 643-654
- Ives D.H., Ikeda S. 1998. Life on the salvage path: the deoxynucleoside kinase of *Lactobacillus acidophilus* R-26. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 59:205-255
- Johansson K., Ramaswamy S., Ljungcrantz C., Knecht W., Piskur J., Munch-Petersen B., Eriksson S., Eklund H. 2001. Structural basis for substrate specificities of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Nature Structural Biology*, 8: 616-620
- Johansson M., Brismar S., Karlsson A. 1997. Human deoxycytidine kinase is located in the cell nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 11941-11945
- Jüllig M., Eriksson S. 2000. Mitochondrial and submitochondrial localisation of human deoxyguanosine kinase. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5466-5472

- Knecht W., Munch-Petersen B., Piškur J. 2003a. Plant thymidine kinases and their use. WO 03/100045 A1, 53 str.
- Knecht W., Munch-Petersen B., Piškur J. 2005. Novel plant deoxyribonucleoside kinase enzymes and their use. WO 01/88106, 42 str.
- Knecht W., Petersen G.E., Sandrini M.P.B., Søndergaard L., Munch-Petersen B., Piškur J. 2003b. Mosquito has a single multisubstrate deoxyribonucleoside kinase characterised by unique substrate specificity. *Nucleic Acid Research*, 31: 1665-1672
- Krawiec K., Kierdaszuk B., Reiksson S., Munch-Petersen B., Shugar D. 1995. Nucleoside triphosphate donors for nucleoside kinases: donor properties of UTP with human deoxycytidine kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216: 42-48
- Kruft V., Eubel H., Jansch L., Werhahn W., Braun H.P. 2001. Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127: 1694-710
- Lee L.S., Cheng Y.C. 1976. Human deoxythymidine kinase II: substrate specificity and kinetic behaviour of the cytoplasmic and mitochondrial isozymes derived from blast cells of acute myelocytic leukaemia. *Biochemistry*, 15: 3686-3690
- Lewin B. 2004. *Genes VIII*. 8th ed. New York, Pearson Prentice Hall, 1027 str
- Mitsuya H., Weinhold K.J., Furman P.A., St. Clair M.H., Lehrman S.N., Gallo R.C., Bolognesi D., Barry D.W., Broder S. 1985. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 7096-7100
- Munch-Petersen B. 1996. DNA precursor pool balance and thymidine kinase isoenzymes in normal and malignant cells. Enzymatic regulation mechanisms and clinical therapeutic applications. Roskilde University Press, Roskilde, Danska, 166 str.

- Munch-Petersen B., Knecht W., Lenz C., Søndergaard L., Piskur J. 2000. Functional expression of a multisubstrate deoxyribonucleoside kinase from *Drosophila melanogaster* and its C-terminal deletion mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 6673-6679
- Munch-Petersen B., Piškur J. 2006. Deoxynucleoside kinases and their potential role in deoxynucleoside cytotoxicity. In: *Cancer drug discovery and development: Deoxynucleoside analogs in cancer therapy*. Peters G.J. (ed). Totowa, New York, Humana Press Inc.: 53-79
- Munch-Petersen B., Piskur J., Søndergaard L. 1998. Four deoxynucleoside kinase activities from *Drosophila melanogaster* are contained within a single monomeric enzyme, a new multifunctional deoxynucleoside kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 3926-3931
- Munch-Petersen B., Cloos L., Tyrsted G., Eriksson S. 1991. Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 9032-9038
- Munch-Petersen B., Tyrsted G., Cloos L. 1993. Reversible ATP-dependent transition between two forms of human cytosolic thymidine kinase with different enzymatic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 15621-15625
- Piškur J., Sandrini M.P.B., Knecht W., Munch-Petersen B. 2004. Animal deoxyribonucleoside kinases: 'forward' and 'retrograde' evolution of their substrate specificity. *FEBS letters*, 560: 3-6
- Plagemann P.G., Wohlhueter R.M., Woffendin C. 1988. Nucleoside and nucleobase transport in animal cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 947: 405-443
- Plunkett W., Huang P., Gandhi V. 1995. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs*, 6: 7-13
- Rasmusson A.G., Møller I.M. 1990. NADP-Utilising enzymes in the matrix of plant mitochondria. *Plant Physiology*, 94: 1012-1018

- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. 2005. *Biology of plants*. 7th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 686 str
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual: Vol 1.-Vol 3*. 3rd ed. New York, Cold spring Harbor Laboratory Press: loč. pag.
- Sandrini M.P.B., Söderbom F., Mikkelsen N.E., Piškur J. 2007a. *Dictiostelium discoideum* salvages purine deoxiribonucleotides by highly specific bacteria-like deoxiribonucleoside kinases. *Journal of Molecular Biology*, 369: 653-664
- Sandrini M.P.B., Clausen A.R., Munch-Petersen B., Piškur J. 2006a. Thymidine kinase diversity in bacteria. *Nucleotides, Nucleosides, and Nucleic Acids*, 25: 1153-1158
- Sandrini M.P.B., Clausen A.R., On S.L., Aarestrup F.M., Munch-Petersen B., Piškur J. 2007b. Nucleoside analogs are activated by bacterial deoxyribonucleoside kinases and can serve as species specific antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. V tisku.
- Sandrini M.P.B., Piškur J. 2005. Deoxyribonucleoside kinases: two enzyme families catalyse the same reaction. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 225-228
- Segel I.H. 1993. *Enzyme kinetics: Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. New York, John Wiley & sons, inc., 957 str
- Sherley J.L., Kelly T.J. 1988. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 8350-8358
- Sjöberg A.H., Wang L., Eriksson S. 1998. Substrate specificity of human recombinant mitochondrial deoxyguanosine kinase with cytostatic and antiviral purine and pyrimidine analogs. *Molecular Pharmacology*, 53: 270-273
- Thelander L., Reichard P. 1979. Reduction of ribonucleotides. *Annual Review of Biochemistry*, 48: 133-158.

- Van Rompay A.R., Johansson M., Karlsson A. 2000. Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacology and Therapeutics*, 87: 189-198
- Wang L., Eriksson S. 2000. Cloning and characterisation of full-length mouse thymidine kinase 2: the N terminal sequence directs import of the precursor protein into mitochondria. *Biochemical Journal*, 351: 469-476
- Wang L., Karlsson A., Arner E.S.J., Eriksson S. 1993. Substrate specificity of mitochondrial 2'-deoxyguanosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 22847-22852
- Welin M., Kosinska U., Mikkelsen N.E., Carnrot C., Zhu C., Wang L., Eriksson S., Munch-Petersen B., Eklund H. 2004. Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 17970–17975

ZAHVALA

Moje diplome sigurno ne bi bilo, če me ne bi prof. Jure Piškur povabil v svoj laboratorij na Švedsko in mi omogočil delo na popolnoma novem encimu. Poleg tega bi se mu rad zahvalil za vse teoretično znanje, za to, da sem ga vedno lahko prosil za pomoč in tudi za misije, ki jih je pripravil zame na Švedskem.

Dnevno sem delal s prof. Birgitte Munch-Petersen in sem se od nje tudi veliko naučil. Rad bi se ji zahvalil za njeno potrpežljivost, ko sem zamočil stvari, za njeno večno pripravljenost mi razlagati skrivnosti biokemije in za to, da je tako uživala pri delu v laboratoriju.

Zahvalil bi se Andersu Clausnu, za vso pomoč, ko je Birgitte odšla. Hvala Eriku Andreassonu za pomoč pri delu z rastlinskimi celičnimi kulturami in odraslimi rastlinami. Hvala Danieli Geisler za pomoč in navodila pri mojih poskusih frakcionacije rastlinskih celic.

Prav tako bi se rad zahvalil vsem, ki so od oktobra 2006 do maja 2007 raziskovali v Juretovem laboratoriju, saj so bili zabavna družba v delovnem času in so tudi poskrbeli, da ni manjkalo skupnega druženja po tem. Veliko do tega, da sem se na Švedskem tako dobro počutil, je prispevala tudi skupinica "the Gang", s katero sem preživel veliko časa.

Zahvala gre tudi moji mentorici prof. Ines Mandić-Mulec, da mi je pomagala urediti vse, da sem lahko diplomu delal na Švedskem, ter da je pregledala moje delo in mi ga pomagala narediti takšnega, kot je.

Hvala prof. Gregorju Anderluhu, da je temeljito pregledal diplomu in mi s svojimi tehtnimi popravki pomagal narediti diplomu boljšo.

Zahvalil bi se tudi štipendiji Erasmus, ki je strošek mojega bivanja na Švedskem zmanjšala.

Najlepše pa bi se zahvalil svoji družini, da me vedno podpira, da mi omogoča odlične pogoje za vse kar me veseli, da mi vedno stoji ob strani in da se lahko na njih oprem. Hvala tudi, da so na svoja pleča prevzeli večinski del stroškov mojega študija na Švedskem.

Hvala tudi moji puncu Miši, da ni obupala in me je počakala tudi, ko sem bil tako dolgo odsoten. Hvala tudi zato, da se lahko vedno zanesem nanjo.

Najlepša hvala vsem!

PRILOGA

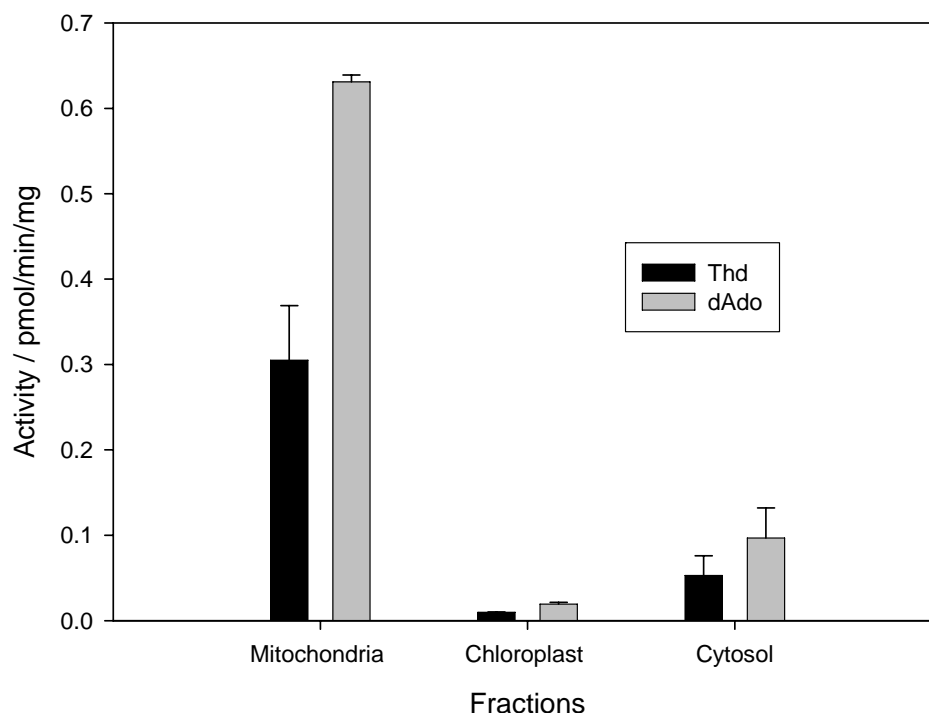
Priloga A: Štiri nepovezane meritve dAdo in dThd aktivnosti v frakcijah celic (pmol/min/mg), merjeno z 200 μ M dAdo in dThd, za vsak poizkus sta bile aktivnosti izmerjeni dvakrat. V mitohondrijski frakciji smo vedno zaznali najvišjo aktivnost (krepko).

		poskus 1		poskus 2		poskus 3		poskus 4	
dAdo	citoplazma	0,05	0,05	0,04	0,02	0,77	0,02	0,02	0,02
	kloroplast	0,03	0,02	0,01	0,00	0,36	0,01	0,02	0,00
	mitohondrij	0,15	0,39	0,12	0,04	1,73	0,09	0,09	0,57
dThd	citoplazma	0,03	0,01	-0,01	0,00	-0,02	0,00	0,00	0,00
	kloroplast	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,04	0,03
	mitohondrij	-0,37	0,06	0,23	0,01	0,07	0,11	0,28	0,15

Priloga B: Meritev aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz (meritve izvedel Anders Clausen)

Z 200 μM dAdo in dThd ter aktivnost mitohondrijskega markerja ICDH v različnih delih rastlinske celice. Meritve je izvedel Anders Clausen. Aktivnost deoksiribonukleozidnih kinaz je, kot smo že pokazali predhodno, najvišja v mitohondrijski frakciji. V mitohondriju je najvišja tudi koncentracija mitohondrijskega markerja ICDH.

	Aktivnost deoksiribonukleozidnih kinaz				Merjenje ICDH				
	dThd	SD	dAdo	SD	mA in 3 minutes	ml	Konc. prot. [mg/ml]	Mg proteina	Aktivnost ICDH
Mitochondrij	0.305	0.064	0.631	0.008	124	0.005	0.094	0.00047	87943.3
Kloroplast	0.0097	0.0004	0.0195	0.002	6.4	0.005	2.1	0.0105	203.2
Citosol	0.053	0.023	0.097	0.035	0.5	0.005	1.8	0.009	18.5



Slika 34: Aktivnosti deoksiribonukleozidnih kinaz z 200 μM dAdo in dThd v različnih delih rastlinske celice. Meritve je izvedel Anders Clausen. Mitochondria je mitohondrijska frakcija, chloroplast je kloroplastna frakcija in cytosol je citosol. Meritve so podane v enotah aktivnosti na pmol substrata in mg proteina.