

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Izolace sulfitoxidasy a inhibice hrachové aminoxidasy

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Autor: | Bc. Pavlína Halamková |
| Studijní program: | N1406 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | prof. Mgr. Marek Šebela, Dr. |
| Termín odevzdání práce: | 26. duben 2011 |

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 26. dubna 2011

Pavλίna Halamková

Poděkování:

Děkuji tímto vedoucímu své diplomové práce, Prof. Mgr. Markovi Šebelovi, Dr., za odborné vedení a poskytování konzultací v průběhu vypracování diplomové práce.

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Pavlína Halamková |
| Název práce | Izolace sulfitoxidasy a inhibice hrachové aminoxidasy |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce | Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr. |
| Rok obhajoby práce | 2011 |

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na izolaci a charakterizaci sulfitoxidasy (EC 1.8.3.1). Uvedený enzym hraje důležitou roli v metabolismu síry v organismech, fyziologicky nezbytné přeměně siřičitanů na sírany. SUOD patří do rodiny enzymů obsahujících molybdopterinový kofaktor. Enzym se vyskytuje u rostlin, živočichů i bakterií.

Výchozím materiálem pro izolaci sulfitoxidasy v této práci byla zvolena zmrazená kuřecí játra. Izolace enzymu zahrnovala tvorbu acetonového prášku a jeho extrakci, precipitaci síranem amonným, denaturaci zahříváním a dialýzu. Následovala purifikace pomocí iontově výměnné chromatografie (Macro-Prep High Q, Resource Q) a gelové permeační chromatografie (Superdex 200 HR). Identifikace sulfitoxidasy spolu s ostatními proteiny z SDS-PAGE gelu proběhla za pomoci MALDI-TOF peptidového mapování. U získaného enzymu byla stanovena hodnota Michaelisovy konstanty, pH optima a teplotní stability.

Další část práce je věnována enzymu, který se podílí na oxidativní degradaci polyaminů, aminoxidase. Jsou známy dvě základní třídy aminoxidas: chinoproteinové diaminoxidasy, které mají v aktivním místě měď a flavovoproteinové polyaminoxidasy. Enzym byl identifikován u mnoha organismů, kde je zodpovědný za podstatné fyziologické procesy.

Experimentální část je zaměřena na testování inhibičních účinků vybraných sloučenin na aminoxidasu. Enzym byl pro tyto účely izolován ze zmrazených etiolovaných semenáčků hrachu setého. Kroky izolace byly následující: homogenizace, dvojstupňová precipitace síranem amonným, denaturace zahříváním a dialýza. Chromatografická purifikace probíhala na kolonách s DEAE-celulosou, hydroxyapatitem a sephacrylem

S 300. Na získaném enzymu byly vyzkoušeny inhibiční účinky derivátů oximů, pyridinpropanaly a purinové aldehydy. Výsledky měření ukázaly, že všechny uvedené sloučeniny mají pouze slabé inhibiční účinky nekompetitivního charakteru na aminoxidasu.

| | |
|---------------|---|
| Klíčová slova | Sulfitoxidasa, siřičitany, kuřecí játra, purifikace proteinu, aminoxidasa, putrescin, inhibitory, hrách setý. |
| Počet stran | 81 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|--------------------------------|--|
| Autor's first name and surname | Bc. Pavlína Halamková |
| Title | Isolation of sulfite oxidase and inhibition of pea amine oxidase |
| Type of thesis | Master |
| Department | Department of biochemistry |
| Supervisor | Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr. |
| The year of presentation | 2011 |

Abstract This diploma thesis is focused on isolation and characterization of sulfite oxidase (EC 1.8.3.1). Mentioned enzyme plays the main role in sulfur metabolism in organisms, physiologically necessary to convert sulphite to sulphate. SUOD belongs to a family of enzymes containing molybdopterin cofactor. The enzyme occurs in plants, animals and bacteria.

The starting material for sulfite oxidase isolation in this study were selected frozen chicken livers. Isolation of an enzyme involved the creation of acetone powder and extraction, ammonium sulfate precipitation, heat denaturation and dialysis. The purification using ion exchange chromatography (Macro-Prep High Q, Resource Q) and gel permeation chromatography (Superdex 200 HR) followed. Sulfite oxidase with other proteins from SDS-PAGE gel were identified by MALDI-TOF peptide mapping. The value of Michaelis constant, pH optimum and temperature stability was determined by enzyme obtained. Next chapter is devoted to an enzyme involved in oxidative degradation of polyamines, amine oxidase. There are two basic classes of known amine oxidases: quinoprotein diamine oxidases, having copper in the active site and flavoprotein polyamine oxidases. The enzyme was identified in many organisms, in which is responsible for important physiological processes.

The experimental part is focused on the test of inhibitory effects of selected compounds on amine oxidase.

The enzyme was isolated for this purposes from etiolated frozen pea seedlings. Isolation steps were as follows: homogenization, two-step ammonium sulfate precipitation, denaturation by heating and dialysis. Chromatographic purification proceeded on columns with DEAE-cellulose, hydroxyapatite and sephacryle S 300. The enzyme obtained was tested in the inhibitory effects of derivates of oximes, pyridine propanales and purine aldehydes. The measurement results showed that these compounds have only weak inhibitory effects, with uncompetitive effect on amine oxidase.

| | |
|----------------------|--|
| Keywords | Sulfite oxidase, sulfite, chicken liver, protein purification, amine oxidase, putrescine, inhibitors, pea. |
| Number of pages | 81 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

OBSAH

1. Úvod

2. Cíle práce

3. Teoretická část

3.1 Siřičitany

3.1.2 Metabolismus siřičitanů

3.1.2 Význam siřičitanů a metody jejich stanovení

3.2 Sulfitoxidasa

3.2.1 Pojem, výskyt, lokalizace a vlastnosti sulfitoxidasy

3.2.2 Krystalová struktura sulfitoxidasy

3.2.3 Reakční mechanismus sulfitoxidasy

3.2.4 Deficit sulfitoxidasy a dalších Moco enzymů v lidském organismu

3.3 Polyaminy

3.3.1. Výskyt a význam polyaminů

3.3.2. Biosyntéza polyaminů

3.4 Aminoxidasy

3.4.1 Aminoxidasy a degradace biogenních polyaminů

3.4.2 Charakteristika a reakční mechanismus CAO

3.4.3 Výskyt a klasifikace CAO

3.4.4 Polyaminoxidasy obsahující FAD

3.4.5 Inhibice CAO a PAO aminoxidas

4. Experimentální část

4.1 Chemikálie

4.2 Přístrojové vybavení

4.3 Použité metody

4.3.1 Příprava rostlinného materiálu - etiolovaných semenáčků hrachu setého

4.3.2 Izolace enzymů

4.3.2.1 První kroky izolace sulfitoxidasy z kuřecích jater

4.3.2.2 Chromatografická purifikace kuřecí sulfitoxidasy

4.3.2.3 První kroky izolace aminoxidasy z hrachu setého

4.3.2.4 Chromatografická purifikace hrachové aminoxidasy

4.3.3 Stanovení obsahu proteinů

4.3.4 Stanovení enzymové aktivity

4.3.4.1 Stanovení aktivity sulfitoxidasy

4.3.4.2 Stanovení aktivity hrachové aminoxidasy

4.3.4.3 Měření s inhibitory aminoxidasy

4.3.5 Stanovení pH optima a teplotní stability sulfitoxidasy

4.3.6 SDS-PAGE

4.3.7 MALDI - TOF peptidové mapování

5. Dosažené výsledky

5.1 Sulfitoxidasa

5.1.1 Izolace sulfitoxidasy z kuřecích jater

5.1.2 Identifikace proteinů v extraktu z kuřecích jater pomocí MS

5.1.3 Stanovení hodnoty K_m

5.1.4 Stanovení teplotní stability sulfitoxidasy

5.1.5 Stanovení pH optima sulfitoxidasy

5.2 Aminoxidasa

5.2.1 Výsledky izolace aminoxidasy z hrachu setého

5.2.2 Testování inhibičních účinků vybraných sloučenin na hrachovou aminoxidasu

6. Diskuse

7. Závěr

8. Literatura

9. Seznam použitých zkratek

1. ÚVOD

Kyselý déšť, který obsahuje siřičitany spolu s dalšími sloučeninami síry a dusíku, patří mezi jeden z největších současných problémů životního prostředí. Obsah sirných sloučenin ničí život ve vodě, škodí půdě a rostlinám. Z tohoto důvodu je nutné kontrolovat množství siřičitanů, které cirkulují v životním prostředí. V potravinářství našly siřičitany uplatnění jako tzv. přídavné látky, které zamezují hnědnutí potravin. Dále se používají jako antioxidanty, redukční a bělicí prostředky, inhibují mikrobiální růst. Také v potravinářském průmyslu je nezbytné kontrolovat koncentraci siřičitanů, neboť tyto látky mohou být pro některé citlivější osoby nebezpečné.

K analýze siřičitanů se běžně používají rozličné analytické metody. V posledních letech však vzrostl zájem o detekci siřičitanů za pomoci biosenzorů. Jedna z možností konstrukce tohoto biosenzoru spočívá v imobilizaci enzymu sulfioxidasy (EC 1.8.3.1) na povrchu kyslíkové elektrody, kde by koncentrace siřičitanů byla zjišťována spotřebou kyslíku.

Potřeba získání enzymu pro případné bioanalytické aplikace vedla ke vzniku hlavního tématu této diplomové práce, izolaci sulfioxidasy. Uvedený enzym byl popsán u rostlin, živočichů i některých mikroorganismů. Jeho hlavní význam přitom spočívá v přeměně siřičitanů na sírany.

Dalším tématem této diplomové práce je inhibice hrachové aminoxidasy. Výzkumem aminoxidasy se již delší dobu zabývá Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Aminoxidasy katalyzují odbourávání aminů cestou oxidační deaminace. Výskyt aminoxidasy byl zaznamenán zejména u bobovitých rostlin, ale také u živočichů a nižších organismů. V této práci byla aminoxidasa izolována ze semenáčků hrachu setého. Vybrané syntetické sloučeniny byly poté studovány jako její inhibitory.

2. CÍLE PRÁCE

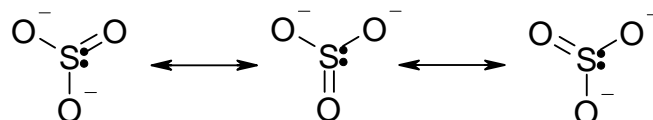
- Vypracovat literární rešerši se zaměřením na enzym sulfitoxidasu a její substrát siřičitany
- Izolace sulfitoxidasy z kuřecích jater
- Charakterizace sulfitoxidasy:
 - určení molekulové hmotnosti a potvrzení čistoty enzymu
 - stanovení hodnoty Michaelisovy konstanty
 - určení teplotní stability, pH optima
- Vypracovat literární rešerši se zaměřením na enzym účastnící se katabolismu polyaminů, aminoxidasu
- Izolace aminoxidasy z etiolovaných klíčků hrachu setého (*Pisum sativum*)
- Stanovení K_i a typu inhibice u vybraných potencionálních inhibitorů aminoxidasy

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Siřičitany

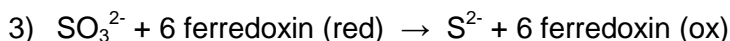
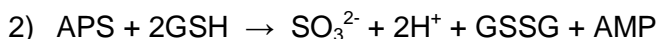
3.1.1 Metabolismus siřičitanů

Siřičitany (sulfity) jsou anorganické soli, jejichž strukturu lze vyjádřit pomocí tří rovnocenných rezonančních struktur:

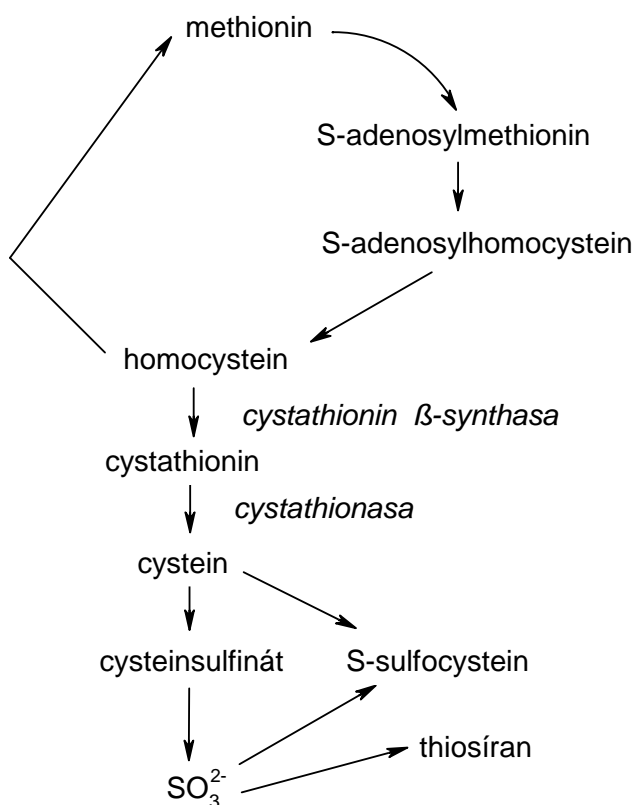


U rostlin vznikají během procesu asimilace síry. Hlavním zdrojem síry a zároveň výchozí sloučeninou pro tvorbu siřičitanů jsou sírany (sulfáty), které jsou rostlinou přijímány z rhizosféry. Dalším zdrojem je oxid siřičitý či imise přijímané z ovzduší pomocí průduchů.

V rostlině je síranový ion postupně redukován na siřičitan v několika po sobě jdoucích reakčních krocích, které se odehrávají v chloroplastech. Nejprve je metabolicky inertní síranový ion aktivován adenylační reakcí 1), která je zprostředkována ATP sulfurylasou (sulfátadenylyltransferasa, EC 2.7.7.4), za vzniku adenylylsulfátu (APS). Poté umožňuje APS reduktasa (EC 1.8.4.9) přenos dvou elektronů z glutathionu na APS za vzniku siřičitanů 2). Siřičitany jsou nakonec redukovány prostřednictvím sulfitreduktasy (1.8.7.1) na sulfidy 3). Donorem elektronů je v tomto redukčním kroku ferredoxin. Následně jsou sulfidy začleněny sledem několika dalších reakcí do sirných aminokyselin (Lee & Leustek, 1998; Schiffmann & Schwenn, 1994; Lillig et al., 2001; Nowak et al., 2004).



Siřičitany se vyskytují i u živočichů, kde vznikají běžnou katabolickou přeměnou sloučenin obsahujících síru, především aminokyselin methioninu a cysteinu (Tan et al., 2005):



Obr. 1: Odbourávání sirných aminokyselin (Tan et al., 2005)

Zatímco redukce siřičitanů u rostlin probíhá v chloroplastech, opačný proces, jejich oxidace probíhá v peroxisomech (Eilers et al., 2001). Přeměnu siřičitanů na sírany katalyzuje sulfitoxidasa (EC 1.8.3.1). Netoxický produkt této reakce, síran, může rostlina uložit do vakuoly nebo využít při asimilačním procesu (Kaiser et al., 1989; Leustek & Saito, 1999). U živočichů se enzym nachází v mezimembránovém prostoru mitochondrií (Cohen et al., 1972).



3.1.2 Význam siřičitanů a metody jejich stanovení

Pro své vlastnosti našly siřičitany uplatnění již v dávných dobách a dodnes se hojně používají zejména v potravinářství. V potravinářském průmyslu se siřičitany uvádějí jako přídatné látky, tzv. „éčka“. Tato aditiva se běžně přidávají do potravin za účelem prodloužení doby jejich trvanlivosti, úpravy a zvýraznění jejich chuti a barvy. Siřičitany patří do skupiny potravinových aditiv zahrnujících oxid siřičitý a anorganické soli, které je povolují, s mezinárodním označením E220- E228 (www.agronavigator.cz, 15.3. 2010).

Tab. 1: Přehled siřičitanů s E-kódem

| Označení | Název sloučeniny |
|----------|----------------------------|
| E220 | oxid siřičitý |
| E221 | siřičitan sodný |
| E222 | hydrogensiřičitan sodný |
| E223 | disiřičitan sodný |
| E224 | disiřičitan draselný |
| E226 | siřičitan vápenatý |
| E227 | hydrogensiřičitan vápenatý |
| E228 | hydrogensiřičitan draselný |

Siřičitany zabraňují enzymovému i neenzymovému tmavnutí potravin, proto se používají při konzervaci ovoce a zeleniny, dále jako antioxidanty, redukční a bělicí prostředky nebo jako inhibitory mikrobiálního růstu. Při sušení ovoce a zeleniny zamezují změně barvy, používají se rovněž k inhibici nežádoucích mikroorganismů při výrobě vína a k vybělování potravinářských škrobů. Ve farmacii se používají ke stabilizaci některých léků (Sapers, 1993; Taylor et al., 1986; Knodel, 1997; Papazian, 1996)

Siřičitany mohou reagovat se složkami potravin (cukry, bílkovinami a lipidy) za vzniku žádoucích i nežádoucích produktů. U vratných reakcí dochází k tvorbě sloučenin, které jsou dočasnou zásobárnou volného siřičitanu, zatímco nevratné reakce vedou k trvalému snížení volného oxidu siřičitého. Poměr volného a vázaného siřičitanu určuje pravděpodobnost, která potravina je schopna vyvolávat nežádoucí reakci.

Aplikace siřičitanů na některé potraviny bohaté na vitaminy, jako je například čerstvá zelenina a ovoce či maso, je nevhodná, neboť siřičitany s některými vitaminy reagují a zapříčiňují tak jejich ztráty (www.agronavigator.cz, 15.3. 2010).

Podle Food and Drug Administration (FDA) se mohou siřičitany, jako zdraví bezpečné látky, používat do pokrmů. Pro citlivější osoby však mohou být siřičitany nebezpečné. Citlivost na siřičitany je většinou vrozená, ale nejsou výjimkou případy, kdy ji osoby během života získají. Reakce lidského organismu na siřičitany jsou různé, od slabé odezvy až po ohrožení života. Mezi projevy sensitivity patří řada dermatologických, plicních, gastrointestinálních a kardiovaskulárních příznaků. Nejohroženější skupinou lidí jsou astmatici (zejména ti, kteří užívají léky na bázi steroidních hormonů); (Lester, 1995). V souvislosti se senzitivitou na siřičitany byly zaznamenány další zdravotní problémy jako např.: bronchoplazma, zánět kožních cév,

nevolnost, křeče žaludku a průjmy. U neastmatiků se zdravotní problémy spojené s citlivostí na siřičitany vyskytují jen ojediněle (Knodel, 1997).

Přesný mechanismus sensitivní odezvy na siřičitany nebyl zcela objasněn. Předpokládá se, že by mohl souviset s nedostatkem mitochondriálního enzymu - sulfioxidasy; cholinergní odezvou indukovanou siřičitany či reakcí zprostředkovanou IgE (imunitní odpověď zprostředkovanou IgE), (www.agronavigator.cz, 20.3. 2010).

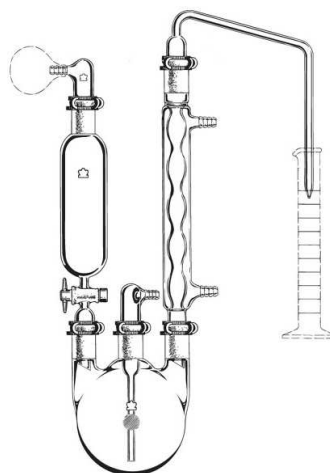
V současné době je kladen důraz na značení přítomnosti siřičitanů v potravinách v množství od 10 mg/kg. Tento limit vyplývá z možností analytického stanovení. Prahové dávky však mohou být pro citlivé osoby mnohem nižší (www.agronavigator.cz, 20.3. 2010).

Pro životní prostředí představují siřičitany hrozbu v podobě kyselých dešťů, které vznikají reakcí oxidů síry a dusíku se vzdušnou vlhkostí. Oxid siřičitý může být utvářen několika způsoby. K uvolňování tohoto plynu dochází například při sopečné činnosti či působením mikroorganismů, závažným problémem týkajícím se především průmyslových zemí je spalování fosilních paliv, při němž se tento bezbarvý znečišťovatel uvolňuje.

Siřičitany kontaminují veškeré podoby hydrosféry - déšť, řeky i moře. Negativní důsledek kyselých dešťů spočívá v tom, že ohrožují rostliny i živočichy, podzemní i povrchové vody, stavby, vedou ke korozi kovů, zvýšení eroze skal, poškozování lesů, okyselování půdy apod. Zvýšená kyselost půdy napomáhá vyluhování těžkých kovů a dalších prvků v půdách. (<http://ekologie.uhk.cz>, 27.3.2010)

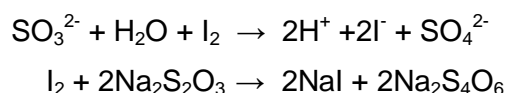
Z výše uvedených důvodů je nutné kontrolovat množství siřičitanů jak v životním prostředí, tak i v potravinách. Kontrola obsahu siřičitanů se provádí pomocí běžných analytických technik.

Osvědčenou metodou pro stanovení siřičitanů v potravinách je Monnier-Williamsova destilace. Varem vzorku obsahujícím siřičitan s kyselinou dochází k uvolnění oxidu siřičitého. Plyn je poté jímán do roztoku peroxidu vodíku a oxidován na kyselinu sírovou, která je titrována s hydroxidem (Svitel et al., 1998; <http://www.starch.dk>, 25.3. 2010).



Obr. 2: Aparatura pro Monnier-Williamsovu destilaci (<http://kimblechase.thomasnet-navigator.com>, 25.3. 2010)

Rychlejší stanovení siřičitanů umožňuje metoda jodometrická, při které v kyselém prostředí dochází k oxidaci siřičitanu jodem za vzniku síranu. Přebytek jodu je poté stanoven titrací roztokem thiosíranu sodného (Svitel et al., 1998)

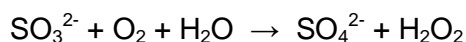


Dále lze analyzovat siřičitany pararosnilinovou metodou (Svitel et al., 1998).

Analytické techniky mohou být dále vylepšeny například s využitím FIA (Flow Injection Analysis); (Davies & Fogg, 1995).

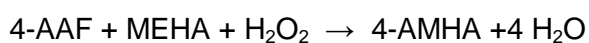
Jiným způsobem stanovení siřičitanů jsou chromatografické metody jako například iontoměničová chromatografie či HPLC na obrácené fázemi (Svitel et al., 1998). K detekci siřičitanů se využívají i enzymové metody se spektrofotometrickou detekcí (Svitel et al., 1998).

V minulých letech vzrostl zájem o detekci siřičitanů pomocí biosenzorů. Výraznou předností biosenzorů je velká selektivita odezvy, které u abiotických senzorů nelze dosáhnout. Tato technika dnes napomáhá stanovit obsah siřičitanů v potravinách, ale také v životním prostředí. Biosenzory jsou tvořeny kyslíkovou elektrodou na jejímž povrchu může být zachycena nylonová membrána s imobilizovaným enzymem. V případě biosenzorů pro stanovení siřičitanů je na povrchu zachycen enzym sulfioxidasa (EC 1.8.3.1), jenž katalyzuje následující reakci (Svitel et al., 1998):



U takto zkonstruovaných biosenzorů je koncentrace siřičitanů zjišťována spotřebou kyslíku. Přímý přenos elektronů z enzymu na povrch elektrody není příliš efektivní, a proto se musí používat mediátory, jako je např. cytochrom c, ferrikyanid, kyslík či methylenová modř, které jsou primárními akceptory elektronů (Svitel et al., 1998).

Pro konstrukci siřičitanového biosenzoru se kromě sulfitoxidasy, využívá také peroxidasa, jež je imobilizovaná na skleněných kuličkách. Peroxidasa zde zprostředkovává oxidativní kondenzaci 3-methyl-*N*-ethyl-*N'*-(β-hydroxyethyl)anilínu (MEHA) s 4-aminofenazonem (4-AAF) v prostředí peroxidu vodíku za vzniku derivátu anilínu (AMHA). K detekci lze použít optický detektor.



Iontový sensor pro detekci siřičitanových iontů může na svém povrchu obsahovat i imobilizované organely či mikroorganismy, např. *Thiobacillus thiooxidans*, které jsou schopné oxidovat siřičitany na sírany za spotřeby kyslíku (Svitel et al., 1998).

3.2 Sulfitoxidasa

3.2.1 Pojem, výskyt, lokalizace a vlastnosti sulfitoxidasy

Sulfitoxidasa (SUOD; EC 1.8.3.1) je enzym oxidující siřičitany. Patří mezi molybdenové proteiny, které hrají důležitou roli v sírném metabolismu živých organismů. Její význam spočívá ve fyziologicky nezbytné přeměně siřičitanů na sírany:



Dalším enzymem oxidujícím siřičitany je pak sulfitdehydrogenasa (SDH; EC 1.8.2.1), která se nachází v baktériích.

Výskyt sulfitoxidasy byl zaznamenán u mnoha druhů živých organismů. Ze zástupců živočišné říše byla úspěšně izolována například z hovězích (Cabré et al., 1991) a kuřecích jater (Kessler & Rajagopalan, 1972).

U savců je největší množství uvedeného enzymu koncentrováno v životně důležitých orgánech jako jsou právě játra, ledviny a srdce. Enzym je lokalizován v mezimembránovém prostoru mitochondrií (Cohen et al., 1972; <http://en.wikipedia.org/>, 20.3.2010).

Živočišná sulfitoxidasa je dimerní protein, který je tvořen ze dvou rovnocenných podjednotek. Každá z nich se skládá ze dvou funkčně odlišných domén s různými elektronovými akceptory. N-koncová doména představuje cytochrom typu *b₅*, ve kterém se nachází nekovalentně vázaný hemový kofaktor, zatímco druhá C-koncová doména váže molybdopterinový kofaktor. Velmi podobnou strukturu má rovněž bakteriální SDH. Tento enzym se nachází v periplasmě (Feng et al., 2007).

U živočichů SUOD katalyzuje koncovou reakci oxidativní degradace sirných aminokyselin a dále pak membránových komponent jako jsou např. sulfatidy. Vzniklý oxidační produkt, sírany, jsou následně vyloučeny v moči (Johnson & Rajagopalan, 1979).

U rostlin byla SUOD identifikována například v mladých listech tabáku, špenátu, jabloně či huseníčku (Eilers et al., 2001; Jolivet et al., 1995). Enzym se u rostlin nachází v peroxisomech, a také ve svých jedinečných vlastnostech se rostlinná sulfitoxidasa odlišuje od živočišné (Eilers et al., 2001). Ve své struktuře obsahuje pouze molybdenovou doménu. Mezi eukaryoty tak vytváří jednoduchý Moco enzym pouze s jedním redoxním centrem. Úloha enzymu v rostlinách rovněž spočívá v tom, že snižuje nadbytek siřičitanů, které vznikají během asimilace síry, degradace sirných sloučenin nebo jako následek znečištění ovzduší (Herber & Hüve, 1998; Schrader et al., 2003).

Tab. 2: Přehled vlastností enzymů oxidujících siřičitany (upraveno podle Feng et al., 2007)

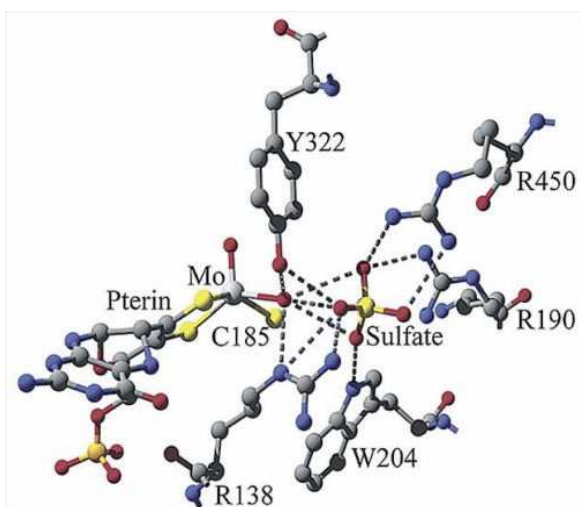
| Enzymy oxidující siřičitany | Lokalizace | Typ | Molekulová hmotnost | Redoxní centra |
|---|-------------------------------------|---|---|--|
| Živočišná sulfitoxidasa | Mezimembránový prostor mitochondrií | Homodimer (2 α podjednotky) | ~110 kDa (dimer) | Molybdenový kofaktor a hem typ <i>b</i> na podjednotku |
| Rostlinná sulfitoxidasa (<i>A.thaliana</i>) | Peroxisomy | Homodimer (2 α podjednotky) | ~ 90 kDa (dimer) | Molybdenový kofaktor |
| Bakteriální sulfitdehydrogenasa (<i>S. Novella</i>) | Periplasma | Heterodimer (α,β podjednotky) | 41 kDa α -podj.; 8,8 kDa β -podj. | 1 molybdenový kofaktor a 1 hem C_{550} |

3.2.2 Krystalová struktura sulfitoxidasy

Pro bližší porozumění mechanismu funkce sulfitoxidasy je nezbytné objasnění její struktury, což má význam zejména v lékařství, neboť nedostatek tohoto enzymu u člověka vede k neurologickým abnormalitám a předčasně smrti (Shih et al., 1977).

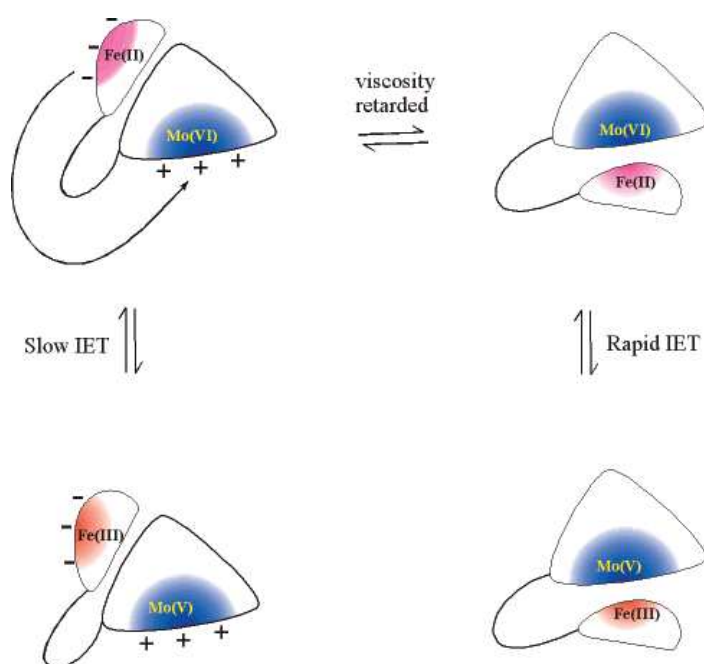
Jako první byla určena krystalová struktura kuřecí sulfitoxidasy. Tato struktura se zároveň stala první strukturou eukaryotního enzymu obsahujícího molybdenový kofaktor. SUOD stejně jako většina eukaryotních Moco enzymů vytváří homodimerní strukturu, jejíž molekulová hmotnost se pohybuje okolo 100 kDa (Johnson & Rajagopalan, 1979).

Kuřecí SUOD je typickým zástupcem tohoto enzymu u vyšších obratlovců. Struktura proteinu je tvořena dvěma identickými podjednotkami, přičemž molekulová hmotnost každé z nich je okolo 51,5 kDa. Obě podjednotky se dále skládají ze dvou funkčně odlišných domén. N-koncová část je menší s molekulovou hmotností přibližně 10 kDa (Sullivan et al., 1993; Johnson & Rajagopalan, 1977). Tato doména obsahuje cytochrom typu b_5 obsahující nekovalentně vázaný hem s přilehlými antiparalelními β -skládanými listy a α -helixy. Další C-koncová doména o molekulové hmotnosti okolo 42 kDa váže molybdopterinový kofaktor, který je rovněž obklopený β -skládanými listy a α -helixy (Feng et al., 2007; Karakas & Kisker, 2005). V krystalové struktuře kuřecí SUOD je Mo(VI) atom koordinovaný pěti ligandy s čtvercovou pyramidovou geometrií. Bližším zkoumáním krystalové struktury se zjistilo, že je v blízkosti C-koncové domény ještě další oddělená doména. Tato doména byla nazvána dimerizační doménou, neboť zprostředkovává tvorbu dimeru. Aktivní místo enzymu, do kterého se váže substrát je kladně nabitě a obsahuje tři argininové zbytky (R138, R190 a R450), tryptofan W204 a tyrosin Y322 (Feng et al., 2007; Schrader et al., 2003).



Obr. 3: Aktivní místo kuřecí SUOD (www.cbc.arizona.edu, 25.3. 2011)

Zajímavým zjištěním bylo, že jsou v krystalové struktuře kuřecího enzymu redoxní centra od sebe zřetelně oddělena, přičemž vzdálenost domény cytochromu b_5 od molybdenové domény je 32 Å (Kisker et al., 1997; Pacheco et al., 1999). Uvedená vzdálenost redoxních partnerů ovšem neodpovídala zjištěné rychlosti elektronového přenosu, která by měla být mnohem nižší. Z toho lze dovodit, že pozice a vzájemná orientace daných elektronových akceptorů ve struktuře enzymu není optimální pro přenos elektronů. Možné vysvětlení této nesrovnalosti by mohlo spočívat v tom, že konformace enzymu je během přenosu elektronů v roztoku oproti krystalové struktuře pozměněna (Feng et al., 2002).



Obr. 4: Pohyb redoxních center během konformační změny sulfitoxidasy (Feng et al., 2002).

Další studie přinesly bližší informace cestě přenosu elektronů mezi doménami. Obě redoxní centra jsou propojena flexibilní smyčkou, která je tvořena deseti aminokyselinovými zbytky. Význam tohoto uskupení nespočívá pouze v tom, že spojuje molybdopterinovou a hemovou doménu, ale zejména v jeho pohyblivosti. Tato aminokyselinová páteř svým přeuspořádáním umožňuje nezbytný elektrostatický kontakt negativního povrchu hemové domény s opačně nabitou částí domény molybdopterinové. K této teorii přispívá také fakt, že krystalová struktura hemových domén v dimeru nezabírá identickou pozici, což naznačuje, že by mohly být pohyblivé (Kisker et al., 1997; Feng et al., 2002).

Výskyt a strukturní vlastnosti enzymu byly prozkoumány také u dalších živočichů. Krystalová struktura byla popsána i pro SUOD izolované z krysích a

lidských jater (Johnson & Rajagopalan, 1977; Schrader et al., 2003). Všechny tyto proteiny vykazují vysokou podobnost v aminokyselinové sekvenci.

Bakteriální sulfitdehydrogenasa je heterodimerní protein, který se skládá velké podjednotky obsahující molybdenové centrum a malé hemové podjednotky. Na rozdíl od kuřecí sulfitoxidasy jsou v bakteriálním enzymu redoxní centra umístěna blízko u sebe bez propojení smyčkou aminokyselin. Vzdálenost Mo a Fe center je přibližně 16 Å. Tato malá vzdálenost je významná pro udržení enzymové integrity (Kappler et al., 2000; Kappler & Bailey, 2005).

Rychlostní konstanta intermolekulárního přenosu elektronu v SDH činí 120 s^{-1} , zatímco u kuřecí SUOD 1400 s^{-1} (Pacheco et al. 1999). Hodnota pro kuřecí enzym však neodpovídá teoretickým výpočtům, které by měly pro tento proces dávat ve výsledku kolem 100 s^{-1} (Feng et al., 2003; Page et al., 1999). Tato skutečnost potvrzuje přítomnost spojovací smyčky u kuřecí SUOD. U bakteriální SDH rychlost elektronového přenosu není ovlivněna viskozitou rozpouštědla či přítomností síranu. Elektronový transport probíhá přímo ve středu proteinu, a proto zde nemusí být přítomna uvedená smyčka, která umožňuje přiblížení redoxních center. Předpokládá se, že vazba síranu blízko Mo centra v kuřecí SUOD snižuje kladný náboj na povrchu Mo domény, čímž zpomaluje pohyb hemové domény k Mo doméně. Jelikož se u bakteriální SUOD domény při reakci nepohybují směrem k sobě, nepředstavuje síran v jejím případě překážku přenosu elektronu (Schrader et al., 2003; Feng et al., 2007).

Získané informace o krystalové struktuře kuřecí sulfitoxidasy byly využity při izolaci, ale zejména při identifikaci enzymu z rostliny *Arabidopsis thaliana*. Tento enzym izolovaný z huseníčku je prvním rostlinným Moco enzymem, u kterého byla popsána struktura. Později byla SUOD takto charakterizována i u mnoha dalších druhů bylin a dřevin (Schrader et al., 2003; Eilers et al., 2001).

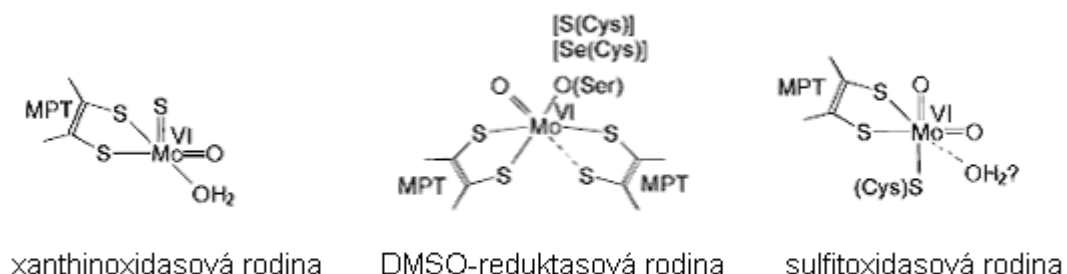
Rostlinný enzym je homodimer, který je částečně homologní s živočišným enzymem. Od živočišné SUOD se liší nejen svou lokalizací v peroxisomech, ale částečně také svou stavbou, neboť rostlinná SUOD obsahuje pouze molybdenovou doménu bez dalšího redoxního centra. Krystalové struktury všech tří zástupců enzymů nezbytných pro oxidaci siřičitanů (kuřecí SUOD, *Arabidopsis thaliana* SUOD, a *S. novella* SDH) vytvářejí čtvercově pyramidální uspořádání kolem atomu molybdenu, avšak jejich celkové struktury se liší a zároveň jsou v nich přítomny rozdílné kofaktory (Schrader et al., 2003; Kappler & Bailey; 2005; Kisker et al., 1997).

Při porovnání povrchu a rozdělení náboje mezi rostlinným a živočišným enzymem byly zjištěny další rozdíly. Tyto rozdíly vyplývají z odlišností mezi oběma doménami a v uspořádání monomerů v dimery. Z povrchu obou proteinů je vedena

pozitivně nabitá část nálevkovitého tvaru k molybdenu nacházejícímu se v aktivním místě. Následkem odlišností v elektronových akceptorech rostlinného enzymu oproti živočišnému enzymu je v okolí výše uvedené pozitivně nabitě nálevky výrazné rozložení pozitivního náboje napříč celým proteinem. Jak již bylo dříve uvedeno, u živočišného enzymu jsou redoxní centra propojena flexibilní smyčkou, která mezi nimi zprostředkovává přenos elektronů. Při přenosu elektronů dochází k interakci negativně nabitých okrajů domény s cytochromem b_5 s pozitivně nabitou částí na Moco doméně, která slouží jako vstup pro substrát (Kisker et al., 1997; Schrader et al., 2003).

3.2.3 Reakční mechanismus SUOD

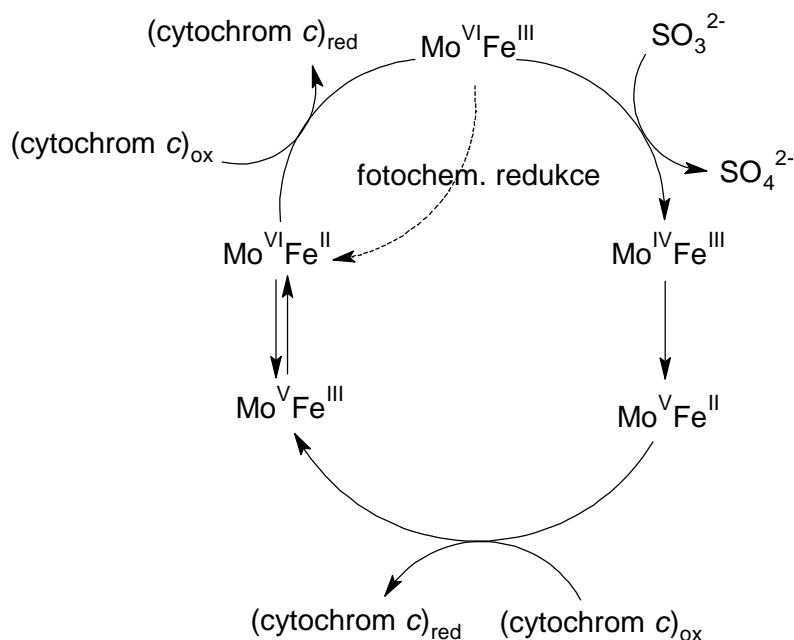
Sulfitoxidasa patří mezi metaloenzymy obsahující molybdenový kofaktor a hemovou skupinu. Je známo přes padesát molybdoenzymů, které katalyzují oxidačně-redukční reakce významné pro metabolismus uhlíku, dusíku a síry (Hille, 1996). Enzymy obsahující v aktivním místě molybden řadíme do tří skupin - xanthinoxidasová, DMSO-reduktasová, a sulfitoxidasa rodina. Rodina sulfitoxidas zahrnuje rostlinné asimilační nitrátreduktasy (NR) a enzymy oxidující siřičitany, které jsou přítomny u zvířat, rostlin a bakterií. Společným znakem enzymů této rodiny je obsah molybdenu v aktivním místě, který je koordinován dvěma oxoskupinami a dithiolenovou částí molybdopterinu (MPT); (Garton et al., 1997).



Obr. 5: Struktury aktivních míst molybdopterinových enzymů (podle Garton et al., 1997)

Z obrázku č. 5 je patrné, že aktivní místo xanthinoxidasy je tvořeno jedním molybdopterinem, jehož centrální atom molybdenu je obklopen kyslíkem, atomy síry a koncovou hydroxidovou skupinou. Oproti ostatním uvedeným Moco enzymům neváže atom molybdenu proteinovou část. U DMSO-reduktas je molybden umístěn mezi dvěma pteriny, váže kyslík a proteinovou část. Pro rodinu sulfitoxidas je typická přítomnost dioxomolybdenových center. Mo zde váže tři atomy síry, dva z nich pocházejí z MPT a jeden z cysteinu.

Hlavní úloha sulfitoxidasy spočívá v přeměně siřičitanů na sírany. Katalytický cyklus u mitochondriální SUOD začíná vazbou substrátu do aktivního místa enzymu. Siřičitan váže kyslík pocházející z vody za vzniku síranu. Při tomto procesu dochází k přenosu dvou elektronů na molybden, který je redukován z oxidačního stavu 6 na 4. Elektrony jsou následně transportovány na druhé redoxní centrum, hem. Zde dochází k redukci trojmocného železa na dvojmocné. Fe centrum je reoxidováno přenosem elektronů na cytochrom c. Tento fyziologický akceptor elektronů se podílí na přenosu elektronů do elektronového transportního řetězce, jenž umožňuje generování energie ve formě ATP. Nyní se enzym nachází ve stavu $\text{Mo}^{\text{VI}}\text{Fe}^{\text{III}}$, který částečně přechází do $\text{Mo}^{\text{VI}}\text{Fe}^{\text{II}}$. Druhý ekvivalent cytochromu c navrácí enzym do klidového stavu (Feng et al., 2002; Hille, 2002; Sullivan et al., 1993; Pacheco et al., 1999).

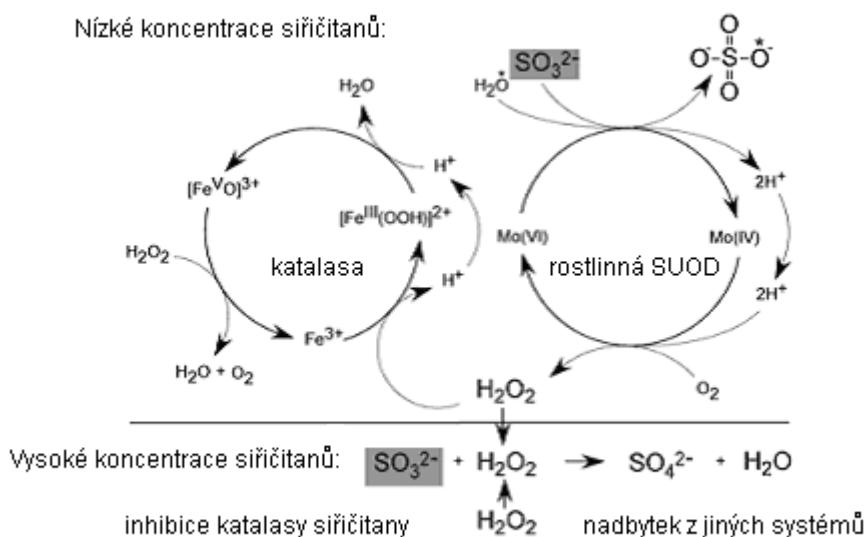


Obr. 6: Změny oxidačních stavů redoxních center SUOD během katalytického cyklu (upraveno podle Feng et al., 2002).

Rozdíly ve stavbě a lokalizaci a rostlinného a živočišného enzymu ovlivňují vlastní katalytický cyklus, ale také komponenty, které se ho účastní. Koncentrace rostlinné SUOD v peroxisomech není náhodná, neboť pouze zde je dostupný její substrát a vzniklý reakční produkt zde může být dále metabolizován (přeměňován). Tyto orgány jsou známy tím, že produkují reaktivní kyslík, který byl zjištěn jako koncový elektronový akceptor sulfitoxidasy. Z tohoto důvodu je rostlinný enzym označen podle EC nomenklatury jako siřičitan: kyslík oxidoreduktasa. Oproti tomu

živočišný enzym, jak již bylo uvedeno, využívá jako koncový akceptor elektronů cytochrom c, a proto je řazen do třídy siřičitan: cytochrom-c-oxidoreduktasa.

Katalytický cyklus SUOD v peroxisomech začíná obdobně jako v mitochondriích. Rostlinná SUOD katalyzuje oxidaci siřičitanů na sírany. Během tohoto procesu je molybden, který je součástí jejího jediného molybdopterinového redoxního centra, redukován z oxidačního stavu 6 na 4. Klidový stav Mo(VI) je obnoven transportem elektronů na jedinečný rostlinný elektronový akceptor, kyslík. Molekula vody, která je na počátku cyklu donorem kyslíku pro siřičitan, poskytuje rovněž dva protony k tvorbě peroxidu vodíku. Při nízkých koncentracích siřičitanu je veškerý peroxid v peroxisomech degradován katalasou. Vysoké koncentrace siřičitanu inhibují katalasu. Peroxid vodíku generovaný sulfitoxidasou při oxidaci siřičitanů slouží k neenzymatické oxidaci dalších molekul siřičitanu (Hänsch et al., 2006).



Obr. 7: Katalytický cyklus sulfitoxidasy v peroxisomech a její interakce s katalasou (upraveno podle Hänsch et al., 2006)

3.2.4 Deficit SUOD a dalších Moco enzymů v lidském organismu

Molybdenový kofaktor je základní složkou molybdoenzymů. Z důvodu podobnosti kuřecího enzymu k enzymu lidskému je používán jako model k pochopení funkce a struktury lidské sulfitoxidasy, což je významné pro léčbu onemocnění souvisejících s jejím deficitem. V 70. letech dvacátého století byla u některých pacientů zjištěna nízká hladina molybdenového kofaktoru. Jeho nepřítomnost má přitom za následek neschopnost organismu syntetizovat enzymy, jejichž základním stavebním kamenem je právě molybden (Duran, 1978).

Mezi enzymy nacházející se u lidí, které pro svou funkci tento kofaktor potřebují, patří zejména xanthinoxidasa, sulfitoxidasa a aldehydoxidasa. Přítomnost sulfitoxidasy u člověka byla zjištěna v játrech, ledvinách, srdci, kosterním svalstvu, placentě ale i v mozkové kůře (Woo et al., 2003). Tento enzym je nepostradatelný, neboť odstraňuje siřičitany, které mohou být pro organismus toxické. Xanthinoxidasa převádí hypoxanthin na xanthin a kyselinu močovou. Enzym se u savců nachází v játrech a lemu tenkého střeva. V hydroxylaci hypoxanthinu na xanthin je také zapojen enzym aldehydoxidasa (Duran & Johnson, 2001; Tan et al., 2005; Griffith 1987).

Nedostatek molybdenového kofaktoru způsobuje kombinovaný deficit těchto molybdoenzymů, jejichž substráty nejsou přeměňovány na produkty a jejich hromadění v organismu je pro organismus nebezpečné, neboť důsledkem mohou být různé neurologické abnormality, mentální retardace nebo např. dislokace očních čoček v kombinaci s xanthinurií (Johnson et al., 1988). Např. hromadění toxického siřičitanu, který je silným nukleofilem, může vést k jeho reakci s mnoha buněčnými komponenty. Bylo zjištěno, že siřičitan reaguje s proteinovými disulfidy za tvorby sulfonovaných derivátů cysteinu. Narušení disulfidových vazeb, nezbytných pro strukturu a funkci enzymu, může vyústit v závažné buněčné změny. Nedostatek kofaktoru se často vyskytuje již v ranném dětském věku a způsobuje úmrtí. Deficit molybdenového kofaktoru je autozomálně recesivně dědičný, tedy vyskytující se převážně přes jednu následující generaci (Shalata et al., 2000; Kisker et al., 1997; Salman et al., 2002)

V současné době se intenzivně hledají způsoby účinné léčby těchto onemocnění a možnosti doplnění molybdenového kofaktoru. Jelikož je však kofaktor extrémně nestabilní, jeho přímé doplnění je téměř nemožné. Pokud jde o biosyntetickou cestu doplnění kofaktoru, zásadní roli zde bude mít nalezení vhodných prekurzorů. Další výzkum by se měl soustředit zejména na geny MOCS, kódující výše uvedené enzymy. Většina pacientů, kteří trpí nedostatkem kofaktoru, je zasažena mutacemi genu MOCS1, které zamezují tvorbě prekurzoru, nebo mutacemi genu MOCS2, které zabrání přeměně prekurzoru na molybdopterin (Reiss et al., 2001).

U dalších pacientů se symptomy typickými pro nedostatek molybdenového kofaktoru bylo zjištěno, že u nich chybí gen pro gephyrin (GEPH). Biochemickými studiemi s fibroblasty pak u pacientů bylo zjištěno, že gephyrin katalyzuje vložení molybdenu do molybdopterinu a že nedostatek Moco by mohl být v těchto případech řešen doplněním molybdenanu (Reiss et al., 2001). Další studie objevily 4 možnosti mutací, spojených s nedostatkem sulfitoxidasy, přičemž dvě mutace jsou blízko vazebného místa síranu, zatímco další mutace se vyskytují uvnitř dimerizační domény (Kisker et al., 1997).

Onemocnění může být rozpoznáno prenatální analýzou aktivity enzymů v buňkách plodového obalu (Reiss et al., 1999; Johnson et al., 1988). Dalšími projevy nedostatku molybdenového kofaktoru spojenými s deficitem enzymu sulfitoxidasy jsou zvýšené hodnoty siřičitanu v moči. Vysoké koncentrace siřičitanu souvisí se zvýšenými hladinami S - sulfocysteinu a thiosíranu, jejichž přítomnost je rovněž zjištělná v moči. Dále je toto onemocnění doprovázeno sníženými hodnotami homocysteinu a cysteinu a zvýšenými hodnotami S-sulfocysteinu v plasmě (Tan et al., 2005).

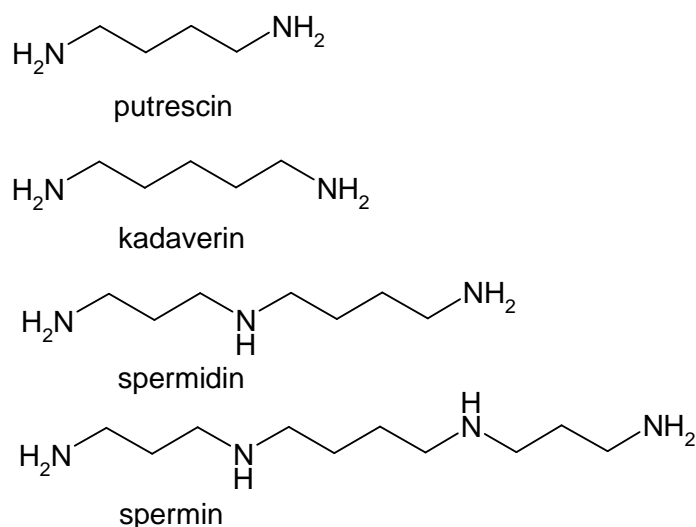
3.3 Polyaminy

3.3.1 Výskyt a význam polyaminů

Polyaminy patří mezi nízkomolekulární látky, které se nacházejí v podstatě ve všech živých organismech, a to ve formě alifatických polykationtů. Díky svému pozitivnímu náboji jsou schopny elektrostatickými vazbami vázat v buňce negativně nabitě makromolekuly, jako např. DNA, RNA, proteiny a membránové fosfolipidy, což ovlivňuje jejich stabilizaci.

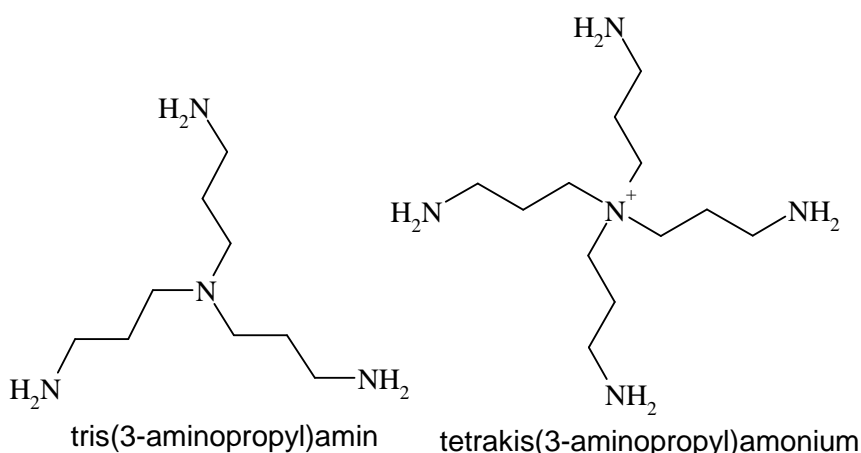
Polyaminy hrají významnou roli při nejrůznějších procesech, např. při regulaci genové exprese, translaci, buněčném růstu a signalizaci buňky, a dále ovlivňují apoptózu (Tabor & Tabor, 1984; Igarashi & Kashiwagi, 2000; Thomas & Thomas, 2001).

Mezi přirozeně se vyskytující polyaminy se řadí zejména spermin, který byl objeven již koncem 17. století, dále spermidin, putrescin a kadaverin (van Leeuwenhoek 1678).



Obr. 8: Struktury některých polyaminů vyskytujících se v živých organismech (Cohen, 1998)

U bakterií se z polyaminů vyskytují nejčastěji spermidin a putrescin, a v menším množství také kadaverin. Putrescin a kadaverin vznikají při rozkladu svalové tkáně a někdy se označují jako tzv. mrtvolné jedy. Bakteriální polyaminy jsou součástí vnější membrány gramnegativních bakterií a hrají roli v signalizaci buněčné diferenciaci. Termofilní bakterie obsahují ještě dva další typy polyaminů, a to polyaminy s delšími řetězci, kterými jsou kaldopentamin a dohexamin a větvené polyaminy, jimiž jsou tris(3-aminopropyl)amin a tetrakis(3-aminopropyl)amonium (Hamana et al., 1998; Oshima 2007).



Obr. 9: Struktury vybraných zástupců polyaminů termofilních bakterií (Oshima 2007)

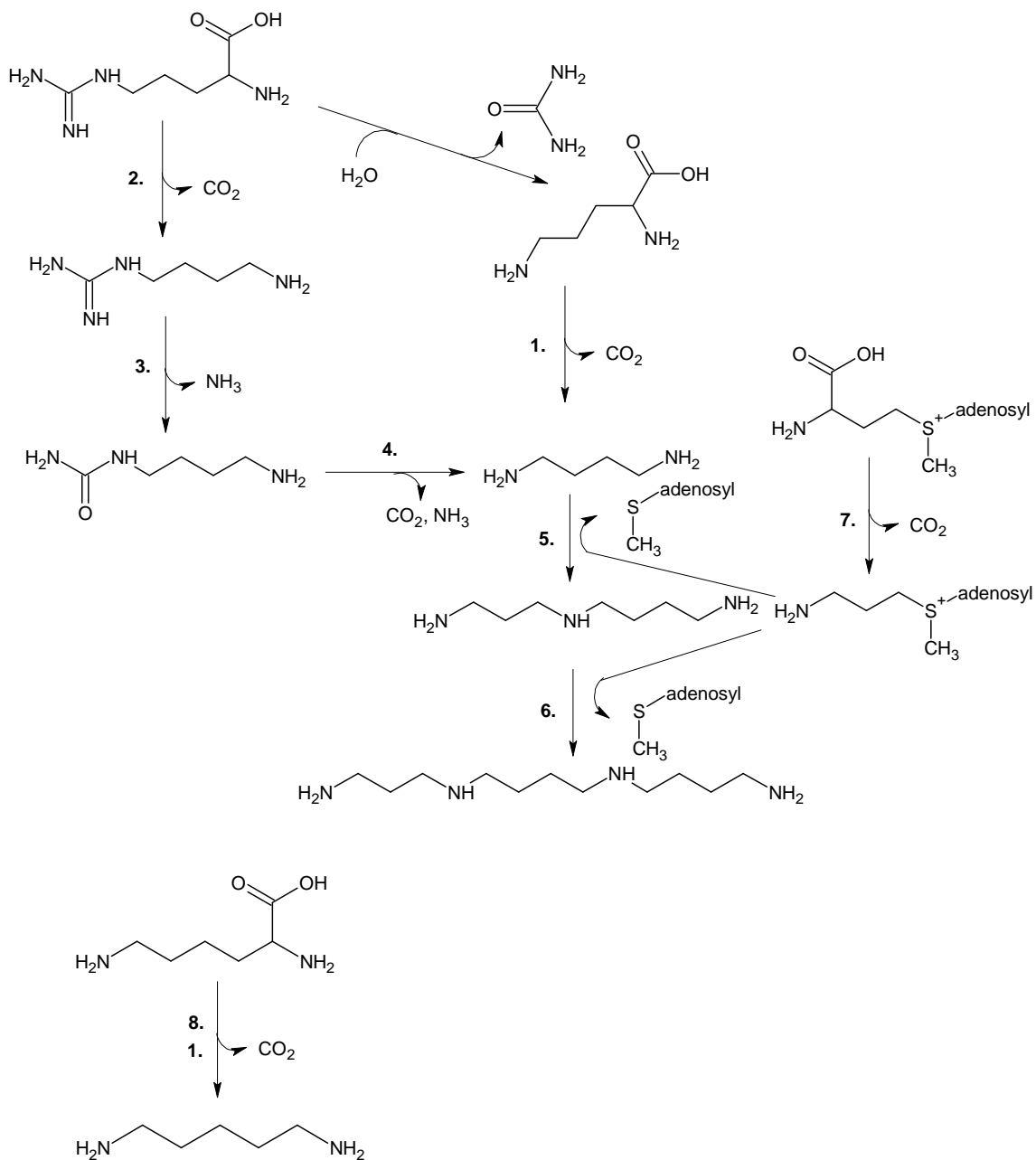
Výzkum polyaminů u savců ukázal, že stejně jako u bakterií se i zde polyaminy významně podílejí na regulaci buněčných procesů, buněčného růstu a genové transkripce a translace (Thomas & Thomas 2003; Childs et al., 2003; Umekage & Ueda 2006). U savců jsou přítomny v mozku, kde se pravděpodobně podílejí na patofyziologických procesech, které způsobují mozkovou ischemii (Li et al., 2007). Pozitivně se naopak podílejí na správném fungování stře a jejich regeneraci v případě poranění. Porozumění metabolickým drahám polyaminů je důležité mj. pro vývoj léčiv proti rakovině (Seiler & Raul, 2007; Saunder & Wallace, 2007; Casero & Marton, 2007).

U rostlin se z polyaminů vyskytují spermin, spermidin a putrescin, v luštěninách je dále přítomen i kadaverin. Předpokládá se, že tyto polyaminy u rostlin hrají důležitou roli mj. v buněčné embryogenezi, tvorbě a vývoji květů a plodů, senescenci a odpovědi na biotický a abiotický stres (Kumar et al., 1997; Walden et al., 1997; Malmberg et al., 1998; Bouchereau et al., 1999; Liu et al., 2000; Alcázar et al., 2006; Groppa & Benavides, 2007; Kusano et al., 2007). Dále mají hospodářský význam, neboť ovlivňují nutriční hodnotu rostlin (Mehta et al., 2002; Matto et al., 2006).

3.3.2 Biosyntéza polyaminů

Biosyntéza polyaminů je u mnoha organismů, zahrnujících bakterie, živočichy a rostliny, zahájena tvorbou putrescinu. Tento diamin zde může vznikat dvěma metabolickými cestami, a to jednak přímo z ornithinu a nebo nepřímo přes několik meziproductů z argininu. Tvorbu putrescinu z ornithinu umožňuje enzym **1.** ornithindekarboxylasa (ODC, EC 4.1.1.17). Druhý způsob tvorby putrescinu z argininu začíná dekarboxylací této aminokyseliny **2.** arginindekarboxylasou (ADC; EC 4.1.1.19) za vzniku agmatinu. Agmatin je v dalších dvou po sobě jdoucích krocích postupně přeměňován pomocí **3.** agmatin iminohydrolasy a **4.** *N*-karbamoylputrescin amidohydrolasy až na putrescin. Rostliny a bakterie využívají při tvorbě putrescinu oba uvedené způsoby, zatímco živočichové pouze cestu dekarboxylace výchozí sloučeniny, ornithinu (Walters, 2003).

Z diaminu putrescinu mohou dále vznikat polyaminy, spermidin a nepřímo spermin. Aminopropylaci putrescinu za vzniku spermidinu katalyzuje enzym **5.** spermidinsynthasa (EC 2.5.1.16). V dalším kroku katalyzuje jiná aminopropyltransferasa, **6.** sperminsynthasa (EC 2.5.1.22), připojení aminopropylové skupiny k spermidinu za vzniku sperminu. Aminopropylové skupiny, jež jsou nezbytné pro předchozí reakce, vznikají dekarboxylací *S*-adenosylmethioninu, kterou katalyzuje enzym **7.** *S*-adenosylmethionindekarboxylasa (AdoMetDC; EC: 4.1.1.50). Diamin kadaverin vzniká dekarboxylací lysinu, kterou katalyzuje buď **8.** lysindekarboxylasa (LDC; EC 4.1.1.18) nebo **1.** ornithindekarboxylasa (ODC, 4.1.1.17), která je taktéž potřebná k tvorbě putrescinu (Kusano et al., 2008; Walters 2003).



Obr. 10: Biosyntéza polyaminů (upraveno podle Kusano et al., 2008)

3.4 Aminoxidasy

3.4.1 Aminoxidasy a degradace biogenních polyaminů

Polyaminy jsou v živých organismech odbourávány cestou oxidativní degradace, působením aminoxidas. Podle prostetické skupiny lze tyto enzymy řadit do

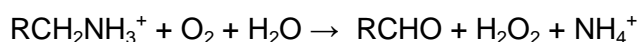
dvou významných tříd na flavin-adenin dinukleotid (FAD) dependentní aminoxidasy a aminoxidasy, které FAD neobsahují.

K oxidativní deaminaci polyaminů přitom může docházet buď na primární a nebo na sekundární aminoskupině. Flavoproteinové polyaminoxidasy (PAO; EC 1.5.3.11) katalyzují oxidaci sekundárních aminoskupin, zatímco chinoproteinové aminoxidasy (CAO; diaminoxidasy; EC 1.4.3.22) působí na primární aminoskupiny diaminů a polyaminů (Cona et al., 2006; Strolin Benedeti, 2001; Walters 2003; Šebela et al., 2007).

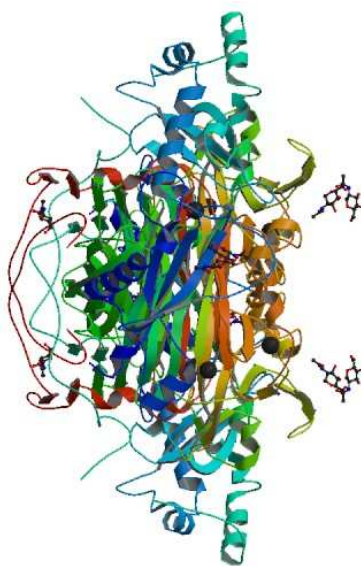
Klasifikace byla v nedávné době změněna (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/4/3/22.html>), původní EC číslo v Enzymovém katalogu bylo 1.4.3.6.

3.4.2 Charakteristika a reakční mechanismus CAO

Jak bylo zmíněno výše, koncentrace biogenních aminů v organismech je regulována prostřednictvím aminoxidas. CAO katalyzují oxidativní odbourávání aminů a polyaminů za vzniku odpovídajících aldehydů a amoniaku. Během této reakce zároveň dochází k dvouelektronové redukci kyslíku na peroxid vodíku:



Drtivá většina CAO se v nativním stavu skládá ze dvou totožných podjednotek, přičemž každá z nich obsahuje v aktivní místě chinonový kofaktor a měďnatý kationt (Šebela et al., 2003). Molekulová hmotnost CAO proteinů se pohybuje okolo 150-200 kDa.



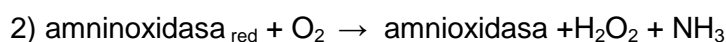
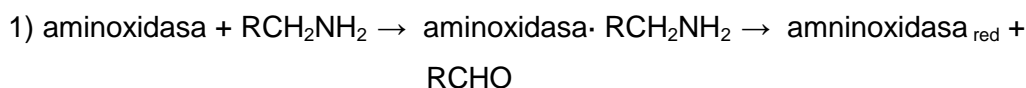
Obr. 11: Trojrozměrná struktura lidské Cu-aminoxidasy

(<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3K5T>, 25.3.2011)

Pomocí spektroskopických studií byly získány další informace o Cu-komplexu v aminoxidasách. Atom mědi je v čtvercově pyramidálním uspořádání koordinován v ekvatoriální rovině pomocí tří atomů dusíku z histidinových zbytků proteinu a molekulou vody, která je zároveň ligandem axiálním. Přímý přenos elektronů mezi prostetickými skupinami je umožněn vzdáleností mezi kationem mědi a kyslíky topachinonu. Předpokládá se, že hlavní význam mědi v aktivním místě enzymu spočívá ve vytvoření příznivých podmínek pro vazbu substrátu tím, že napomáhá udržovat vhodnou strukturu enzymu (Šebela et al., 1998).

Na konci dvacátého století byla prokázána přítomnost topachinonu v aktivním místě CAO získané z hovězího séra (Janes et al., 1990). Tento chinonový kofaktor vzniká v aktivním místě enzymu postranslační modifikací tyrosinu.

Enzymová reakce katalyzovaná aminoxidasou probíhá bi-ter ping-pongovým mechanismem lze ji vyjádřit ve dvou krocích (Frébort & Adachi, 1995):



Na počátku uvedené reakce dochází k interakci topachinonu, jenž se nachází v aktivním místě s primární aminoskupinou polyaminu za vzniku chinonketiminu. Chinonketiminový karbocation následně přechází v aldimin. Poté co je produkt z aktivního místa uvolněn, dochází k tvorbě redukováného kofaktoru, aminokatecholu, který je v rovnováze se semichinolaminem. Na konci reakce je chinonový kofaktor, který je nyní ve formě radikálu Cu(I)-semichinonu, reoxidován molekulárním kyslíkem (Šebela et al., 1998; Frébort & Adachi, 1995).

3.4.3 Výskyt a klasifikace CAO

Prvotní rozdělení těchto enzymů bylo podle počtu aminoskupin substrátu, jež tyto enzymy přeměňují, na monoaminoxidas, diaminoxidas a polyaminoxidas. Vzhledem k rozsáhlé substrátové specifičnosti enzymu se však toto rozdělení nezdálo zcela správné, a proto bylo později pozměněno (Šebela et al., 1998).

Přítomnost chinonových aminoxidas byla popsána u mnoha druhů organismů z živočišné i rostlinné říše, ale také u organismů, jež nelze pozorovat pouhým okem, jako jsou bakterie a kvasinky. Podle rozdílné lokalizace a substrátové specifity aminoxidas, lze tyto enzymy nově klasifikovat do čtyř základních skupin (Frébort & Adachi, 1995).

U savců se jedná o plasmové aminoxidas, jenž preferují jako substráty polyaminy spermidin a spermin, ale také monoamin benzylamin. Ze savčích plazmových enzymů byly významně popsány zejména aminoxidas z hovězí, vepřové ale i králíčí, ovčí a koňské plasmy (Šebela et al., 1998).

Oproti tomu vnitrobuněčné savčí diaminoxidas přeměňují zejména diaminy putrescin a kadaverin, ale také histamin (Jeon et al., 2003). Tyto enzymy byly izolovány např. z lidských a vepřových ledvin, lidské placenty či tlustého střeva krys.

Odbourávání diaminů putrescinu a kadaverinu probíhá také u rostlin, pomocí rostlinných diaminoxidas. Bylo zjištěno, že dobrým substrátem rostlinných diaminoxidas je také spermidin. Nejlepším materiálem určeným pro izolaci tohoto enzymu ve vysokém množství se jeví etiolované semenáčky či mladé listy rostlin z čeledi bobovitých (Medda et al., 1995).

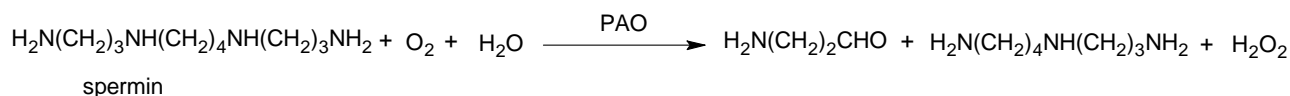
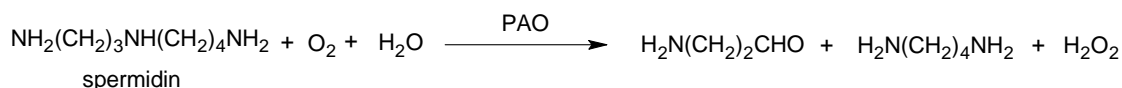
Poslední skupina CAO byla identifikována u mikroorganismů. Mikrobiální aminoxidas přeměňují arylalkylaminy jako je např. benzylamin, fenethylamin, tyramin či histamin. Významnými zástupci mikroorganismů, ze kterých byl tento enzym izolován jsou např. plíseň *Aspergillus niger*, kvasinky *Pichia pastoris* či bakterie *Escherichia coli* (Šebela et al., 2007; Šebela et al., 1998; Frébort & Adachi, 1995).

3.4.4 Polyaminoxidas obsahující FAD

PAO byly identifikovány u rostlin, hub i živočichů, přičemž u těchto zástupců mají PAO velmi podobné strukturní vlastnosti. Polyaminoxidas jsou monomerní proteiny, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje okolo 53 kDa. Další odlišnost oproti CAO spočívá v rozdílném kofaktoru. U polyaminoxidas je přítomna jedna prostetická skupina, flavin-adenin dinukleotid. Tato prostetická skupina je často uložena uvnitř proteinové struktury, kde je poutána nekovalentní vazbou (Binda et al., 1999).

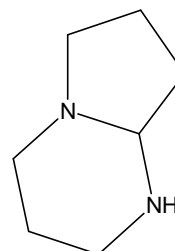
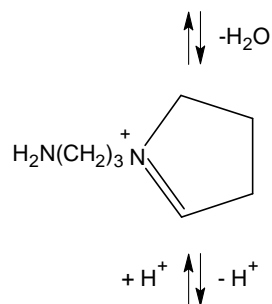
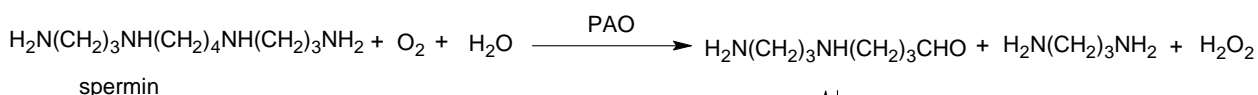
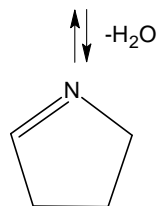
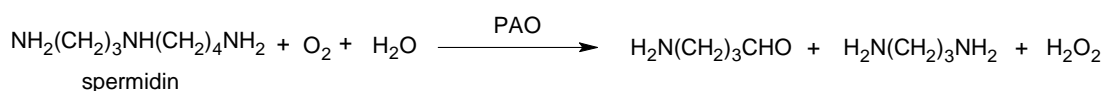
Jak již název napovídá, polyaminoxidas umožňují oxidativní přeměnu polyaminů, sperminu a spermidinu. Na rozdíl od CAO, PAO katalyzuje oxidativní degradaci na sekundární aminoskupině výchozí sloučeniny. Povaha reakčních produktů přitom závisí na typu organismu, ze kterého získaný enzym pochází (Federico & Angelini, 1991; Šebela et al., 2001).

Savčí polyaminoxidas katalyzují přeměnu spermidinu na putrescin a sperminu na spermidin. V obou případech dále vzniká 3-aminopropanal a peroxid vodíku.



Obr. 12: Schéma reakce katalyzované živočišnou PAO (Šebela et al., 2001)

U rostlin a bakterií tento enzym přeměňuje stejné výchozí sloučeniny za vzniku rozdílných produktů. Spermidin je polyaminoxidasami oxidován na 4-aminobutanal a propan-1,3-diamin, spermin pak na N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal a propan-1,3-diamin. Stejně jako u živočichů zde vzniká vedlejší produkt peroxid vodíku. Produkty rostlinných polyaminoxidas, 4-aminobutanal a N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal okamžitě cyklizují za vzniku 1-pyrrolinu a 1-(3-aminopropyl)pyrrolinia. Monocyklická sloučenina 1-(3-aminopropyl)pyrrolinium poté může ještě přecházet v bicyklickou formu (Smith et al., 1986; Šebela et al., 2001; Binda et al., 1999).



Obr. 13: Schéma reakce katalyzované rostlinnou PAO (Šebela et al., 2001)

Z výše uvedených reakcí je patrné, že působením PAO stejně jako CAO na polyaminy vznikají příslušné aldehydy a vedlejší produkt, peroxid vodíku. V případě PAO však nevzniká amoniak (Federico & Angelini, 1991; Medda et al., 1995).

Obdobně jako u CAO probíhá zmíněná reakce ve dvou fázích. V první části této oxidoredukční reakce, kterou flavinové aminosidasy zprostředkovávají, dochází k redukci prostetické skupiny, flavinu za současné oxidace výchozí sloučeniny. V dalším kroku je pak redukovaný flavin-adenin dinukleotid reoxidován molekulou kyslíku, aby mohl být využit pro další reakce. Meziprodukt této reakce, iminosloučenina, je hydrolyzována za vzniku konečného produktu (Seiler 1995; Binda et al., 1999).

3.4.5 Inhibice CAO a PAO aminosidas

Inhibice patří mezi regulační prvky v organismu, jež negativně ovlivňují enzymovou aktivitu. Rozlišujeme dva základní typy inhibice, vratnou a nevratnou. U nevratné inhibice (irreverzibilní) dochází vzniku pevné vazby inhibitoru na enzym, což vede k nevratné blokaci enzymové aktivity. V případě vratné (reverzibilní) inhibice může být inhibitor z vazby na enzym odstraněn a enzym se tak vrací do své původní aktivity. U vratných inhibic lze dále rozlišovat inhibice kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní (Macholán et al., 1983).

V této práci byly měřeny inhibice aminosidasy získané z etiolovaných semenáčků hrachu setého. Z tohoto důvodu je v teoretické části uvedena tato kapitola, která má přiblížit problematiku inhibice aminosidas, zejména pak CAO a PAO.

První práce zabývající se aktivitou aminosidasy v rostlinných extraktech pocházejí z padesátých let dvacátého století. Od této doby byla popsána přítomnost aminosidasy u mnoha rostlinných druhů, z některých byl enzym purifikován a dále charakterizován (Medda et al., 1995).

Měď obsahující aminosidasy (CAO) jsou zpravidla homodimerní proteiny, jež mají v každé ze svých podjednotek aktivní místo s topachinonovým kofaktorem a měďnatým iontem. Přístupnost topachinonového kofaktoru závisí na strukturním uspořádání enzymu. Aktivní místo enzymu je přístupné pouze pro strukturně vhodné látky (Šebela et al., 2007).

V literatuře je uvedeno mnoho sloučenin, jež negativně ovlivňují aktivitu CAO aminosidas. Mezi nekompetitivní inhibitory rostlinných CAO patří chelatační činidla (Medda et al., 1995). Nekompetitivními inhibitory hrachové CAO jsou diethylentriamin a triethyltetramin (Peč & Frébort, 1992) či azadiaminy (Šebela et al., 2007). V odborné práci (Stránská et al., 2007) jsou popsány inhibiční účinky kompetitivního

charakteru na hrachovou CAO u *N,N'*-bis(pyridin-2-ylmethyl)diaminů se 2-8 methylenovými skupinami.

Oproti předchozím CAO jsou polyaminoxidasy (PAO) monomerními proteiny. V rozhraní mezi dvěma doménami se nachází tunel ve tvaru U. Centrum katalytického místa se nachází v tunelu, kde je umístěn i flavinový kruh FAD. Tunel je lemován aromatickými postranními řetězci, karbonylovými a karboxylátovými kyslíky, které umožňují kontakt s ligandy v aktivním místě (Šebela et al., 2007). Změny v struktuře enzymu se odrážejí také v preferenci substrátů a inhibitorů.

Kukuřičná aminoxidas, jako jeden ze zástupců polyaminoxidas, je kompetitivně inhibována 1,4 bis(3-aminopropyl)piperazinem (Šebela et al., 2003). Sloučenina 1,10-bis(2-pyridinylmethyl)-4,7-dioxa-1,10-diazadekan je řazena mezi kompetitivní inhibitory CAO i PAO (Šebela et al., 2007). Diaminy lze kompetitivně inhibovat polyaminoxidasu z vodního hyacintu a z lilie (Šebela et al., 2001).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

- čistota uvedených chemikálií byla minimálně p.a.

| | |
|--|-------------------------------|
| aceton | Lach-Ner, ČR |
| akrylamid | Serva, Německo |
| BCA roztok | Sigma-Aldrich Chemie, Německo |
| bisakrylamid | Serva, Německo |
| <i>n</i> -butanol | Fluka, Švýcarsko |
| Coomassie Brilliant Blue R 250 | Serva, Německo |
| cytochrom <i>c</i> (z koňského srdce) | MP Biomedicals, USA |
| dihydrochlorid putrescinu | Merck, USA |
| dihydrogenfosforečnan draselný | Lachema, ČR |
| dodecylsulfát sodný | Fluka, Švýcarsko |
| EDTA | Sigma-Aldrich Chemie, Německo |
| ethanol | Lach-Ner, ČR |
| glycin | Fluka, Švýcarsko |
| guajakol | Sigma-Aldrich Chemie, USA |
| hovězí sérový albumin | Sigma-Aldrich Chemie, USA |
| hydrogenfosforečnan draselný, značka Fluka | Sigma-Aldrich Chemie, Německo |
| hydrogenuhličitan amonný | Lachema, ČR |
| hydrogenuhličitan sodný | Lachema, ČR |
| chlorid sodný | Lach-Ner, ČR |

chromatografický materiál:

| | |
|--|-------------------------------|
| DEAE-celulosa | Sigma-Aldrich Chemie, Německo |
| Hydroxyapatit | Bio-Rad, USA |
| Sephacryl S-300 HR | Pharmacia Biotech, Švédsko |
| Macro-Prep High Q | Bio-Rad, USA |
| Resource Q | Amersham, Švédsko |
| Superdex 200 HR | Amersham, Švédsko |
| křenová peroxidasa | Fluka, Švýcarsko |
| kyselina chlorovodíková, koncentrovaná | Lach-Ner, ČR |
| kyselina octová | Lachema, ČR |

| | |
|---|-------------------------------|
| MES | |
| (2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina) | Sigma-Aldrich Chemie, Německo |
| methanol | Lachema, ČR |
| molybdenan sodný dihydrát | Sigma-Aldrich Chemie, Německo |
| MOPS | |
| (3-(N-morpholino)propansulfonová kyselina) | Sigma-Aldrich Chemie, Německo |
| pentahydrát síranu měďnatého | Lachema, ČR |
| peptidové standardy pro hmotnostní spektrometrii | |
| MALDI-TOF | Bruker Daltonik GmbH, Německo |
| peroxidisíran amonný | Sigma-Aldrich Chemie, USA |
| proteinové standardy pro gelovou permeační chromatografii | Bio-Rad, USA |
| proteinové standardy pro SDS-PAGE | Bio-Rad, USA |
| síran amonný | Lachema, ČR |
| siřičitan sodný | Sigma-Aldrich Chemie, Německo |
| N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin | Fluka, Švýcarsko |
| tris(hydroxymethyl)aminomethan tj. Tris | MP Biomedicals, USA |
| uhličitan sodný | Lachema, ČR |
| vzorkový pufr (0,375 mol.l-1 Tris-HCl, 5 % CBB G-250, 10 % SDS, 5 % β- merkaptoethanol) | Bio-Rad, USA |

Nekomerční syntetické chemikálie:

(1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]ethanon oxim

(1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]propan-1-on oxim

(1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]butan-1-on oxim

- byly získány od Dr. M. Mojzycha z Univerzity v Siedlcích, Polsko

3-pyridin-2-ylpropanal

3-pyridin-3-ylpropanal

3-pyridin-4-ylpropanal

3-(9H-purin-6-ylamino)propanal

4-(9H-purin-6-ylamino)butanal

- byly získány od RNDr. M. Sourala, Ph.D. z KOCH Univerzity Palackého v Olomouci

4.2 Přístrojové vybavení

| | |
|--|--------------------------------------|
| analytické váhy | Sartorius, Německo |
| centrifuga 6K15 | Sigma, Německo |
| centrifuga 5415R | Eppendorf, Německo |
| centrifuga CL31R | Thermo Jouan, Francie |
| digitální pH metr | Multical WTW, Německo |
| digitální předvážky | KERN, Německo |
| elektroforetická komůrka | Bio-Rad, USA |
| elektromagnetická míchačka | IKA, Německo |
| homogenizátor Ultra- Turrax T50 | IKA, Německo |
| chromatograf nízkotlaký s pumpou P-1, řídící jednotkou UV-1, dvoukanálovým zapisovačem REC-112 a sběračem frakcí Frac-920 | Amersham Biosciences, Švédsko |
| chromatograf střednětlaký BioLogic DuoFlow | Bio-Rad, USA |
| MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Microflex LRF20 | Bruker Daltonik, Německo |
| pipety 5000, 1000, 200, 100, 20, 10 µl skalpel | Eppendorf, Německo Braun, Německo |
| spektrofotometr Biochrom WPA Lightwave II UV/Vis | Biochrom Ltd, UK |
| termoblok | Grand Boekel, USA |
| ultrafiltrační zařízení Amicon | Millipore, USA |
| vodní lázeň | Grant, UK |
| vortex SA8 | Stuart Scientific, UK |

Další laboratorní vybavení:

baňky, Büchnerova nálevka, filtrační papír, hodinová skla, kádinky, kyvety do centrifugy, latexové rukavice, lžičky, magnetická míchadla, mísa s ledovou tříští, nylonová tkanina, odměrné válce, plastové vidličky, skleněná kyveta do spektrofotometru, stříčka s destilovanou vodou a ethanolem, špachtle, špičky na pipety, třecí miska s tloučkem, vaříč, váženky keramické, zkumavky.

4.3 Použité metody

4.3.1 Příprava rostlinného materiálu - etiolovaných klíčků hrachu setého

Semena hrachu setého (*Pisum sativum*) byla namočena 1 den v destilované vodě. Po nabobtnání byla vyseta na vrstvu agroperlitu, kde klíčila po dobu 10 dnů ve tmě při teplotě 23 °C. Semenáčky byly sklizeny, zmrazeny a následně použity k izolaci aminoxidasy.

4.3.2 Izolace enzymů

4.3.2.1 První kroky izolace sulfitoxidasy z kuřecích jater (upraveno dle Kipke et al, 1989)

Výchozím materiálem pro izolaci sulfitoxidasy byla zmrazená kuřecí játra získaná v obchodě s potravinami.

Nejprve byl z jater připraven acetonový prášek (Cohen & Fridovich, 1971). Množství 500 g rozmrazených kuřecích jater bylo nakrájeno na malé kousky, které byly následně homogenizovány laboratorním homogenizátorem ve 2 litrech vymrazeného acetonu (-20 °C). Homogenát byl přefiltrován přes Büchnerovu nálevku a promyt vymrazeným acetonem. Acetonový prášek (retentát v Büchnerově nálevce) byl na filtračních papírech vysušen přes noc mezi hodinovými skly v lednici a poté zmrazen. Aceton, který byl převážnou součástí filtrátu spolu s odpadem tvořeným zejména jaterním tukem, byl recyklován pro opakované použití na rotační vakuové odparce. Všechny následující kroky probíhaly při teplotě 0-4 °C. Nejprve byla provedena extrakce acetonového prášku pufrům: množství 120 g bylo homogenizováno laboratorním homogenizátorem v 1,5 litru 10 mmol.l⁻¹ K⁺-fosfátového pufru (pH 7.8) obsahujícím 0,1 mmol.l⁻¹ EDTA. Homogenní směs byla dále ještě za stálého chlazení 45 minut míchána. Poté následovala centrifugace roztoku při 17000 g po dobu 20 minut při teplotě 4 °C.

Získaný tmavě červený supernatant byl následně podroben dvoustupňové frakcionaci síranem amonným. Vysolování probíhalo za stálého míchání a chlazení. Nejprve byl k supernatantu přidán síran amonný do 20 % nasycení, a po posledním přidávku soli byl ještě 30 minut za stálého chlazení míchán. Následně byl roztok zahřát ve vodní lázni a udržován při 56 °C po dobu 1 minuty. Po prudkém ochlazení roztoku v ledové tříšti s vodou následovala centrifugace při 17000 g po dobu 15 minut při 4 °C. Červenohnědý supernatant byl dále dosycen síranem amonným do 50 % nasycení (189 g.l⁻¹) a po přidání veškeré soli ještě 30 minut míchán. Po centrifugaci při 4000 g po dobu 15 minut (4 °C) byl precipitát zmrazen.

Tento precipitát byl pak rozpuštěn v 60 ml 25 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 8,0) obsahujícím 0,1 mmol.l⁻¹ EDTA. Centrifugací roztoku po dobu 15 minut při 17000 g (4 °C) byl získán červenohnědý supernatant, který byl dále přes noc dialyzován proti 6 litrům 25 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 8,0) obsahujícímu 0,1 mmol.l⁻¹ EDTA a 2,5 mmol.l⁻¹ molybdenan sodný.

4.3.2.2 Chromatografická purifikace kuřecí sulfitoxidasy (inspirováno Kipke et al., 1989)

Po zmíněné předchozí dialýze následovala iontově výměnná chromatografie. Enzymový roztok byl při průtokové rychlosti 2 ml.min⁻¹ nanesen na kolonu s médiem Macro-Prep High Q (2,5 x 20 cm) ekvilibrovanou 25 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pufrém (pH 8,0). Eluce byla provedena lineárním gradientem (50 ml) 0-1 mol.l⁻¹ NaCl v ekvilibračním pufru. Frakce s nejvyšší enzymovou aktivitou byly spojeny a následně zahuštěny ultrafiltrací na Amiconu s filtrem pro zadržování proteinů s molekulovou hmotností nad 10 kDa. Poté byl enzymový roztok dialyzován proti 25 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 8,0) obsahujícímu 0,1 mmol.l⁻¹ EDTA a 2,5 mmol.l⁻¹ molybdenan sodný.

Dále následovalo přečištění enzymového roztoku pomocí iontově výměnné chromatografie na koloně Resource Q, která byla připojena k střednětlakému chromatografu. Proteiny byly detekovány při 280 nm. Druhá detekční vlnová délka 405 nm odpovídala absorpci hemu, který je součástí sulfitoxidasy. Průtoková rychlost mobilní fáze činila 1 ml.min⁻¹. Uvedená kolona byla ekvilibrována 25 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pufrém (pH 8,0). Eluce enzymu byla provedena programovaným segmentovým gradientem elučního pufru tj. 25 mmol.l⁻¹ Tris-HCl obsahujícího 1 mol.l⁻¹ NaCl. Vzorek byl na kolonu nanášen v alikvotech o objemu 2 ml. Pak protékal kolonou ekvilibrační pufr po dobu 8 min, následoval nárůst koncentrace elučního pufru z 0 na 20% v intervalu 5 min, z 20 na 45% v intervalu 9 min, ze 45 na 100% v intervalu 3 min, dále isokratický krok při 100% elučního pufru po dobu 3 min, gradient ze 100 na 0% elučního pufru v intervalu 3 min a konečně isokratický krok s ekvilibračním pufrém po dobu 13 min. Celkem jeden separační běh trval 46 min. Frakce s nejvyšší enzymovou aktivitou byly spojeny a zahuštěny ultrafiltrací na Amiconu jak je uvedeno výše.

Enzymový roztok byl na závěr přečištěn pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 HR, která byla připojena ke střednětlakému chromatografu. Jako mobilní fáze byl zvolen 25 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pufr (pH 8,0) obsahující 2,5 mmol.l⁻¹ molybdenan sodný. Průtoková rychlost činila 0,7 ml min⁻¹ a eluát byl monitorován při 280 a 405 nm (viz výše). Vzorek byl na kolonu nanášen v alikvotech o objemu 1 ml, celkem jeden separační běh trval 40 min. K sestrojení kalibrační křivky pro určení molekulové hmotnosti byly použity proteinové standardy

pro gelovou chromatografii (Tab. 3). Přečištěný enzym byl po zahuštění ultrafiltrací uchováván v alikvotech při -80 °C.

Tab. 3: Seznam použitých standardů pro gelovou permeační chromatografii

| Standardy | Molekulová hmotnost (Da) |
|----------------------------|--------------------------|
| Hovězí thyroglobulin | 670 000 |
| Hovězí γ -globulin | 158 000 |
| Kuřecí ovalbumin | 44 000 |
| Myoglobin z koňského srdce | 17 000 |
| Vitamín B12 | 1 350 |

Pomocí této separační techniky byly získány 2 frakce obsahující studovaný enzym. Tato metoda rovněž poskytla důležité informace o molekulové hmotnosti enzymu.

4.3.2.3 První kroky izolace aminoxidasy z hrachu setého (upraveno dle Šebela et al., 1997)

Rostlinným materiálem pro purifikaci aminoxidasy bylo 2,1 kg desetidenních etiolovaných semenáčků hrachu setého (*Pisum sativum*). Všechny následující kroky byly provedeny při teplotě 0-4 °C.

Zmrazené hrachové semenáčky byly homogenizovány laboratorním homogenizátorem ve dvojnásobném hmotnostním množství 0,1 mol.l⁻¹ K⁺-fosfátového pufru, pH 7,0. Homogenát byl přefiltrován přes nylonovou tkaninu a filtrát centrifugován při 4000 g po dobu 20 minut při teplotě 4 °C.

Supernatant byl následně podroben dvojestupňové precipitaci práškovým síranem amonným za stálého míchání a chlazení (ledová tříšť s vodou). Enzymový roztok byl nejprve doplněn síranem amonným do 30 % nasycení (přídavek 176 g.l⁻¹) a po přidání veškeré soli ještě 30 minut míchán. Vysrážené proteiny byly odděleny centrifugací při 4000 g po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. Koncentrace síranu amonného v supernatantu byla zvýšena na 70 % (přídavek 273 g.l⁻¹), vzniklá suspenze 30 minut míchána a poté opět centrifugována. Sediment byl rozpuštěn v minimálním množství 0,1 mol.l⁻¹ K⁺-fosfátového pufru (pH 7,0), proti kterému byl vzniklý roztok přes noc dialyzován (4 x 3 l). Po skončení dialýzy následovala centrifugace. Enzymový roztok byl pak rychle vyhřát na vodní lázni na teplotu 55 °C, a poté udržován za stálého míchání ve vodní lázni termostatu po dobu 5 minut při teplotě 60 °C. Na závěr byl roztok prudce ochlazen v ledové tříšti s vodou, a poté opět centrifugován 20 minut

při 15000 g. Supernatant byl dialyzován přes noc proti 0,02 mol.l⁻¹ K⁺-fosfátovému pufru, pH 7,0 (4 x 3 l).

4.3.2.4 Chromatografická purifikace hrachové aminoxidasy (inspirováno Šebela et al., 1997)

Po předchozí dialýze byl enzymový roztok nanesen na kolonu plněnou DEAE-celulosou (2,5 x 20 cm), jež byla ekvilibrována 0,02 mol.l⁻¹ K⁺-fosfátovým puftrem, pH 7,0. Tato kolona byla současně propojena s hydroxyapatitovou kolonou (2,5 x 20 cm) ekvilibrovanou stejným puftrem. Enzymový roztok byl nanášen při průtokové rychlosti 2 ml min⁻¹. Aminoxidasa v příslušném pH neinteraguje s DEAE-celulosou, kde se zachycuje řada balastních proteinů, je však zadržena na hydroxyapatitu. Eluce aminoxidasy z hydroxyapatitové kolony byla po rozpojení tandemové sestavy kolon provedena lineárním gradientem (50 ml) 0,02-0,75 mol.l⁻¹ K⁺-fosfátového pufru, pH 7,0. Spojené frakce s enzymovou aktivitou byly zahuštěny na konečný objem 11 ml na ultrafiltračním zařízení Amicon s filtrem zadržujícím proteiny s molekulovou hmotností nad 10 kDa. Zahuštěný enzymový roztok (5 ml) byl následně nanesen na kolonu s gelovým materiálem Sephacryl S 300 HR (2,5 x 50 cm), jež byla ekvilibrována 0,02 mol.l⁻¹ K⁺-fosfátovým puftrem, pH 7,0. Separace na základě velikosti částic byla provedena při průtokové rychlosti 1 ml.min⁻¹, frakce s aminoxidasou byla určena na základě měření enzymové aktivity eluátu. Proteinový roztok byl následně opět zahuštěn ultrafiltrací na Amiconu.

4.3.3 Stanovení obsahu proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky s využitím metody s kyselinou bicinchoninovou. Princip této metody spočívá v tvorbě komplexu Cu²⁺ iontů s proteiny a jejich následné alkalické redukci na ionty Cu⁺. Měďné ionty jsou následně chelátovány kyselinou bicinchoninovou za vzniku modrofialového zbarvení, které lze měřit při 562 nm (Smith et al., 1985).

Pracovní roztok pro měření obsahu proteinů byl připraven smícháním činidla A a B v poměru 50:1. Roztok A obsahoval 26 mmol.l⁻¹ dvojsodnou sůl 4,4'-dikarboxy-2,2'-bichinolinu, dvojsodná sůl kyseliny bicinchoninové; 0,16 mol.l⁻¹ Na₂CO₃ .H₂O, 7 mmol.l⁻¹ vinan sodný, 0,1 mol.l⁻¹ NaOH, 0,11 mol.l⁻¹ NaHCO₃ a vodu. Činidlo B se skládalo z 16 mmol.l⁻¹ CuSO₄.5H₂O a vody.

Kalibrační řada byla sestavena s použitím standardu - hovězího sérového albuminu v množství 5-60 µg. 2 ml pracovního roztoku byly smíchány se standardem BSA (zásobní roztok 1 mg.ml⁻¹) a poté inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 30

minut. Absorbance byla měřena při 562 nm. Jako blank byl použit samotný pracovní roztok.

4.3.4 Stanovení aktivity

Aktivitu enzymu lze získat z následujícího vztahu:

$$\frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} * \frac{V}{\epsilon * l}$$

($\Delta n / \Delta t$) – aktivita enzymu (katal)

A – absorbance

t – časový interval (s)

V – objem reakční směsi (l)

ϵ – molární absorpční koeficient ($l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

l – délka optické dráhy (cm)

Jednotka enzymové aktivity katal vyjadřuje jaké množství enzymu přemění 1 mol substrátu za sekundu.

4.3.4.1 Stanovení aktivity sulfitoxidasy

Metoda použitá pro stanovení aktivity sulfitoxidasy je založená na redukcí elektronového akceptoru, cytochromu c (Cohen & Fridovich, 1971). Přechod cytochromu c z oxidované formy na redukovanou je sledován spektrofotometricky při vlnové délce 550 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu je $19,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Rocha et al., 2003).

Tab. 4: Složení roztoků v kyvetě

| Použité roztoky | Pipetovaný objem (ml) |
|---|-----------------------|
| 0,1 mol.l ⁻¹ Tris HCl (pH 8,5) | 1,55 |
| + 1.10 ⁻⁴ mol.l ⁻¹ EDTA | |
| 4 mmol.l ⁻¹ cytochrom c | 0,01 |
| Sulfitoxidasa | 0,02 |
| Na ₂ SO ₃ | 0,02 |

Složení reakční směsi v kyvetě je uvedeno v tab. 4. Pufr 0,1 mol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,5) obsahující 1.10⁻⁴ mol.l⁻¹ EDTA byl vyhříván na teplotu 25 °C. Enzymová reakce byla startována přidávkem Na₂SO₃. Koncentrace zásobního roztoku Na₂SO₃ byla 10 mmol.l⁻¹. Pro stanovení hodnoty K_m byla připravena sada roztoků Na₂SO₃,

kteře byly získaány ředěním uvedeného zásobního roztoku. Nárůst absorbaance při 550 nm byl sledován po dobu 3 minut.

4.3.4.2 Stanovení aktivity hrachové aminosidasy

Při reakci katalyzované aminosidasou vzniká jako vedlejší produkt peroxid vodíku, který je ve spřažené reakci využit peroxidasou k oxidaci guajakolu za vzniku 3,3'-dimethoxyfenyl-4,4'-bifenočinonu. Žlutohnědé zbarvení lze měřit spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu je 4500 l.mol⁻¹.cm⁻¹ (Frébort & Adachi, 1995; Doerge et al., 1997)

Tab. 5: Složení roztoků v kyvetě

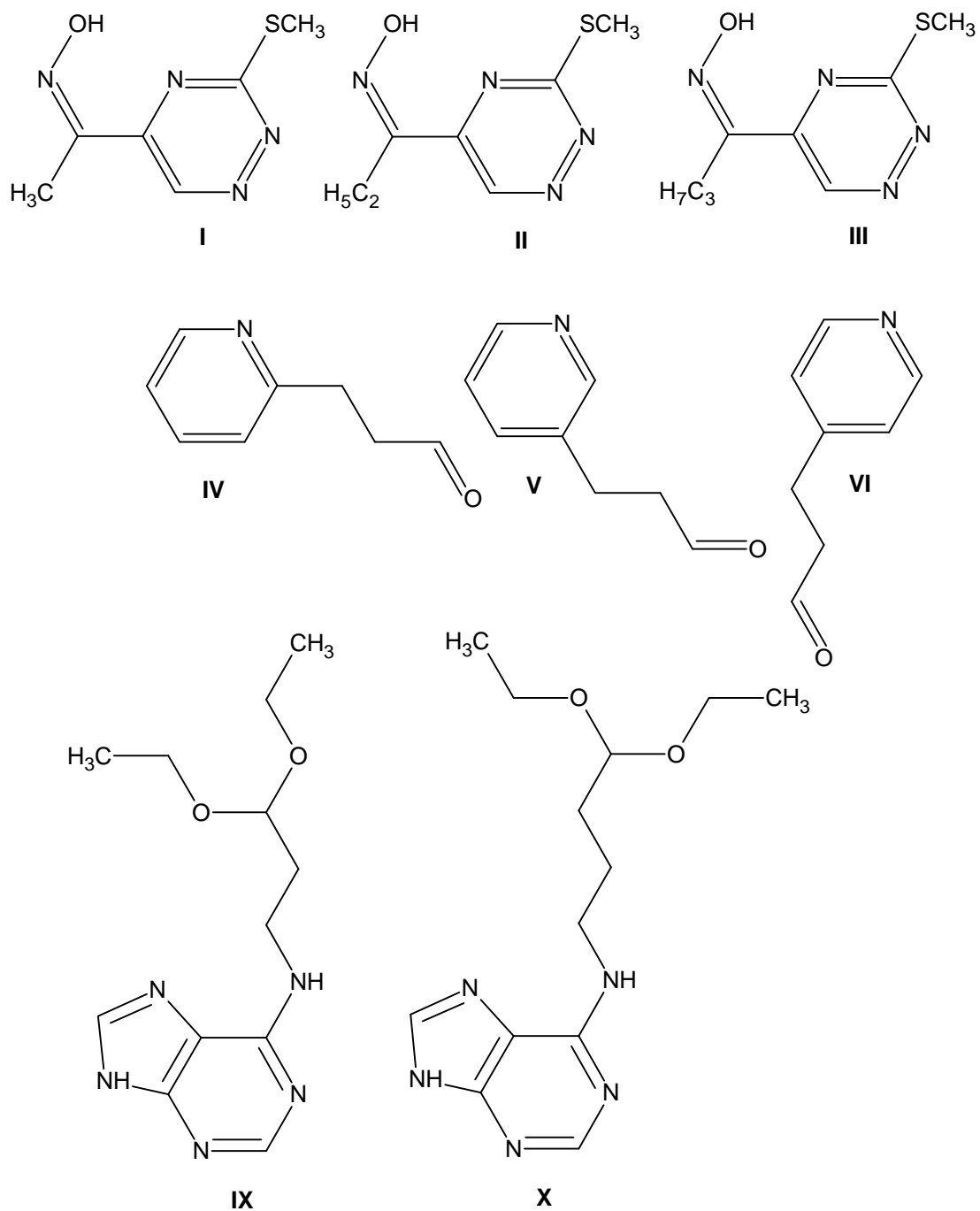
| Použitě roztoky | Pipetovaný objem (ml) |
|----------------------------|-----------------------|
| Reakční směs | 1,55 |
| Enzym + voda + [inhibitor] | 0,15 |
| Putrescin | 0,05 |

Reakční směs skládající se z 30 ml 0,117 mol.l⁻¹ K⁺-fosfátového pufru (pH 7,0); 0,5 ml 0,035 mol.l⁻¹ guajakolu a 0,5 ml 0,01% křenové peroxidasy byla v termostatu vyhřívána na 30 °C. Do spektrofotometrické kyvety byla reakční směs pipetována spolu s enzymem jak je uvedeno v tab.5. Pro stanovení hodnoty K_m byla připravena sada roztoků putrescinu, které byly získaány ředěním zásobního roztoku, jehož koncentrace byla 87,5 mmol.l⁻¹. Enzymová reakce byla pak startována přídavkem putrescinu o výsledné koncentraci v kyvetě v rozmezí 0,14 – 2,5 mmol.l⁻¹. Nárůst absorbaance při 436 nm byl sledován po dobu 3 minut.

4.3.4.3 Měření s inhibitory aminosidasy

Měření aktivity aminosidasy byly stanoveny inhibiční konstanty K_i pro jednotlivé inhibitory.

Do stejné reakční směsi, která byla použita u měření aktivity aminosidasy je přidáván na úkor vody příslušný inhibitor. Poté je roztok promíchán a spektrofotometr vynulován. Hodnota K_i byla přitom vždy vypočtena z rovnic lineárních regresí sekundárních grafů dvojité reciprokého vynesení 1/A na 1/[S] podle Lineweavera a Burka (Macholán et al., 1983). K měření byly použity organické sloučeniny rozličných struktur (obr. 14), jež byly před měřením nejprve rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle na požadovanou zásobní koncentraci.



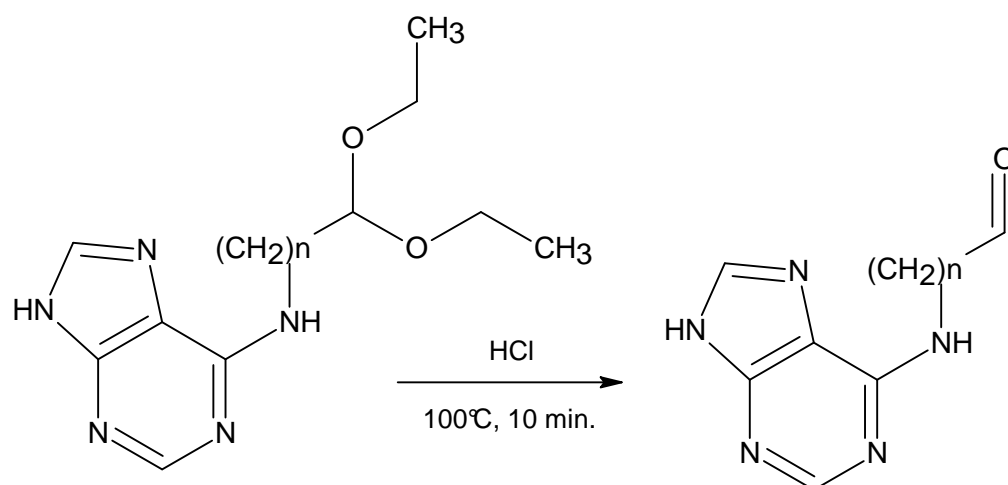
Obr. 14: Syntetické sloučeniny studované jako inhibitory aminoxidasy: oximy (I - III), pyridinopropanaly (IV - VI) a purinové aldehydy (zde ve formě acetalů, IX - X).

Tab. 6: Příprava zásobních roztoků organických sloučenin

| | Název sloučeniny | Mr | Rozpouštědlo | Výsledná koncentrace zásobního roztoku (mmol.l ⁻¹) |
|-----|--|--------|--------------------|--|
| I | (1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]ethanon oxim | 184,22 | CH ₃ OH | 50 |
| II | (1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]propan-1-on oxim | 198,25 | CH ₃ OH | 50 |
| III | (1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]butan-1-on oxim | 212,27 | CH ₃ OH | 50 |
| IV | 3-pyridin-2-ylpropanal | 135,17 | H ₂ O | 50 |
| V | 3-pyridin-3-ylpropanal | 135,17 | H ₂ O | 50 |
| VI | 3-pyridin-4-ylpropanal | 135,17 | H ₂ O | 50 |
| IX | N-(3,3-diethoxypropyl)-9H-purin-6-amin | 265,32 | 0,2 mol/l HCl | 100 |
| X | N-(4,4-diethoxybutyl)-9H-purin-6-amin | 279,34 | 0,2 mol/l HCl | 100 |

Vzorky pyridinpropanalů (IV, V, VI), jakožto potenciálních inhibitorů aminoxidasy, byly připraveny rozpuštěním příslušného aldehydu v destilované vodě.

Sloučeniny, které se nacházely ve formě acetalů (IX, X) byly před měřením nejprve převedeny kyselou hydrolyzou na odpovídající aldehydy (VII, VIII). Příslušný acetal byl vždy smíchan s 0,2 mol.l⁻¹ roztokem HCl, a poté na termobloku po dobu 10 minut povařen. Vzniklý roztok obsahující požadovaný aldehyd o koncentraci 0,1 mol.l⁻¹ byl následně ochlazen na ledové lázni, na které byl uchován i po dobu měření.



Obr. 15: Tvorba aldehydů kyselou hydrolyzou acetalů (n = 2, 3)

Vzorky oximů (I, II, III) byly rozpuštěny v methanolu. Také pufr, který byl k měření použit ($0,117 \text{ mol.l}^{-1} \text{ K}^+$ -fosfátový pufr pH 7,0), obsahoval v tomto případě 5% methanol.

Při měření byly použity různé výsledné koncentrace inhibitoru v kyvetě. Aktivita aminoxidasy byla měřena způsobem, který je již uveden výše. Inhibitor byl inkubován s enzymem při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut v kyvetě, která dále obsahovala reakční směs a potřebné množství vody. Reakce byla startována přidávkem putrescinu, jehož výsledná koncentrace v kyvetě byla v rozmezí $0,14 - 2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$.

4.3.5 Stanovení pH optima a teplotní stability sulfitoxidasy

Pro stanovení pH optima i teplotní stability sulfitoxidasy byla použita metoda měření aktivity enzymu, jak je popsáno výše. Enzymová reakce byla startována přidávkem $20 \text{ } \mu\text{l}$ 8 mmol.l^{-1} siřičitanu sodného, jehož konečná koncentrace v kyvetě byla $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Hodnota pH optima pro reakci katalyzovanou sulfitoxidasou byla určena měřením aktivity enzymu v 50 mmol.l^{-1} MES pufru pro rozmezí pH 6,0 – 7,0; 50 mmol.l^{-1} MOPS pufru pro rozmezí pH 6,5 – 8,0; $50 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NH}_4\text{HCO}_3$ o pH 8,3 a $50 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ v pufráčním rozmezí pH 9,2 – 10,9.

Při stanovení teplotní stability enzymu byl vzorek sulfitoxidasy před vlastním měřením inkubován při různých teplotách (v rozmezí $25 - 60 \text{ }^\circ\text{C}$) po dobu 30 minut, a poté ochlazen na ledu. Následně byla změřena zbytková aktivita a určena hodnota T_{50} , při které se sníží aktivita enzymu na polovinu.

4.3.6 SDS-PAGE

Elektromigrační metoda SDS-PAGE se běžně v biochemii používá pro separaci proteinů. Diskontinuální polyakrylamidový gel, gelové pufr i elektrodový pufr obsahují anionogenní detergent dodecylsírán sodný. Látka dodává separovaným proteinovým molekulám jednotný záporný náboj, a ty se pak v gelu pohybují pouze na základě rozdílů v jejich molekulové hmotnosti.

Laemmliho pufr ($62,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ Tris/HCl, pH 6,8; 25 % w/v glycerol; 2 % w/v SDS; 0,01 % w/v bromfenolová modř) byl smíchán s merkptoethanolem v objemovém poměru 19:1. Poté byl tento modřofialový roztok smíchán se vzorkem proteinu v objemovém poměru 1:1. Uvedená směs byla povařena na termobloku při $100 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut (Laemmli, 1970).

Tab. 7: Složení separačního a zaostřovacího gelu

| | Separací gel 10 % (spodní) | Zaostřovací gel 4 % (horní) |
|--|---------------------------------------|--|
| AA / BIS (30 % / 0,8 %) | 3,4 ml | 0,65 ml |
| 1,5 mol.l ⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8 | 2,5 ml | - |
| 0,5 mol.l ⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8 | - | 1,25 ml |
| Destilovaná voda | 3,8 ml | 2,95 ml |
| 10 % SDS | 0,1 ml | 0,1 ml |
| 10 % TEMED | 0,01 ml | 0,01 ml |
| 10 % APS | 0,05 ml | 0,06 ml |

Mezi skla upevněná ve stojanu byl nalit polymerující roztok separačního gelu a následně převrstven *n*-butanolem. Po 45 minutách byl *n*-butanol ze ztuhlého gelu odstraněn a separační gel byl převrstven roztokem zaostřovacího gelu, do kterého byl vložen hřebínek. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl hřebínek odstraněn. Skla vyplněná gelem byla vložena do nádoby, ve které měla vlastní elektroforéza probíhat. Poté byl do nádoby přidán elektroodový pufr (0,025 mol.l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 mol.l⁻¹ glycin; 0,1 % SDS (pH 8,3), se kterým byly postupně propláchnuty i jamky, aby z nich byly odstraněny případné vzduchové bubliny. Do jamek bylo nanášeno 5 µl standardu a potřebné množství vzorku (dávkování vzorků je uvedeno v kapitole výsledky). Nakonec byla aparatura připojena ke zdroji s konstantním elektrickým napětím (120 V). Elektroforéza proběhla po dobu migrace bromfenolové modři (obsažena v Laemmliho pufru) k spodnímu okraji gelu.

Separované proteiny byly následně zviditelněny barvicím roztokem (0,1 % CBB R-250, 45 % methanol, 15 % kys. octová). Barvicí roztok byl poté odstraněn a nahrazen roztokem odbarvovacím (40 % methanol, 10% kyselina octová). Gel byl ještě nakonec několikrát promyt destilovanou vodou.

4.3.7 MALDI-TOF peptidové mapování

K identifikaci neznámých proteinů a k potvrzení přítomnosti studovaného proteinu se používá metoda MALDI-TOF peptidové mapování. Vzorek s proteinem je nejprve podroben proteolytickému štěpení. Získané peptidové fragmenty jsou posléze analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Na závěr je získané spektrum peptidů vyhodnoceno za pomoci software a porovnáno s teoretickými hodnotami v databázi.

Proteinové pásy vizualizované barvivem Coomasie byly vyříznuty z SDS-PAGE gelu. Následné štěpení probíhalo podle standardního postupu zahrnujícího

redukci a alkylaci proteinů (Havliš et al., 2003). Štěpení proteinů bylo provedeno 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ trypsinem. Peptidové mapování bylo provedeno na Microflex LRF20 MALDI-TOF hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) s microScout iontovým zdrojem a 337 nm dusíkovým laserem (20 Hz) v refletronovém režimu pro kladně nabitě ionty. Roztok peptidů (digest) (0,6 μl) byl pipetován na MSP AnchorChip™ 600/96 terčik (Bruker Daltonik) a převrstven 0,6 μl matrice (5mg α -kyano-4-hydroxykyselin v 0,33 ml 2,5% (v/v) TFA) a 0,66 ml acetonitrilu) a vysušen na vzduchu. Působením laserových paprsků byla získána hmotnostní spektra. Směs peptidů (Bruker Daltonik) byla použita pro vnější kalibraci. Získaná spektra byla zpracována za pomoci počítačového programu flexAnalysis 2,4 a Biotools 3,0 databázovým software (Bruker Daltonik). Hledání v databázi bylo uskutečněno proti Swiss-Prot a NCBI nr (15.12. 2009) databázím za využití programu Mascot (Matrix Science, London, UK; <http://matrixscience.com>).

5. DOSAŽENÉ VÝSLEDKY

5.1 Sulfitoxidasa

5.1.1 Izolace sulfitoxidasy z kuřecích jater

Jako výchozí materiál pro izolaci sulfitoxidasy bylo použito 500 g zmrazených kuřecích jater. V následující tabulce jsou uvedeny výsledky, jež byly postupně získány při izolaci sulfitoxidasy.

Tab. 8: Purifikace sulfitoxidasy z 500g kuřecích jater

| Purifikační krok | Celkový objem (ml) | Aktivita (nkat.ml ⁻¹) | Celková aktivita (nkat) | Bílkoviny (mg.ml ⁻¹) | Celkové bílkoviny (mg) | Specifická aktivita (nkat.mg ⁻¹) |
|---|--------------------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|------------------------|--|
| dialyzát získaný po precipitaci (NH ₄) ₂ SO ₄ | 110 | 88,4 | 9724 | 15,1 | 1660 | 5,9 |
| Macro-Prep High Q | 10 ^a | 515 | 5153 | 40,6 | 405,8 | 12,7 |
| Resource Q | 4 ^a | 870,7 | 3483 | 41 | 164 | 21,2 |
| Superdex 200 HR | | | | | | |
| frakce I: | 8 | 98 | 784 | 3,8 | 30,4 | 25,8 |
| frakce II: | 7 | 79 | 553 | 3,3 | 23,1 | 24 |

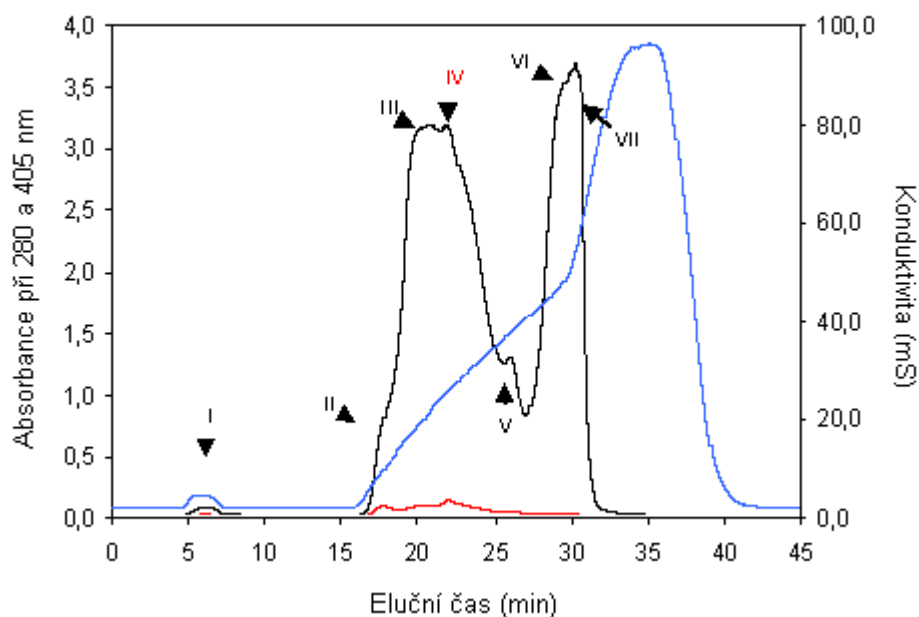
^a Objem enzymového roztoku po ultrafiltraci

Purifikací z 500 g zmrazených kuřecích jater bylo získáno 8 a 7 ml enzymového roztoku o specifické aktivitě 25,8 a 24 nkat.mg⁻¹. Tyto dvě frakce byly získány po gelové permeační chromatografii na kolonce Superdex 200 HR obr. . V tabulce není uveden hrubý extrakt, neboť u roztoku nebylo možné měřit aktivitu.

Postup izolace sulfitoxidasy z kuřecích jater je detailně popsán v kapitole Použité metody. Dialyzát, získaný po precipitaci hrubého extraktu s (NH₄)₂SO₄, byl částečně přečištěn pomocí nízko-tlaké iontové výměnné chromatografie na kolonce Macro-Prep High Q. Průtoková rychlost mobilní fáze činila 2 ml.min⁻¹. Eluce byla provedena lineárním gradientem 0-1 mol.l⁻¹ NaCl v ekvilibračním pufru (25 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0).

V ekvilibračním pufru byl eluován roztok s proteiny, které se nezachytily na koloně Macro-Prep High Q. Poté následovala eluce gradientem NaCl. Ve vrcholu 1. píku z gradientové eluce nebyla naměřena žádná aktivita. Přítomnost enzymu byla potvrzena měřením aktivity enzymu až v chvostu píku, což znamenalo, že bude nutné

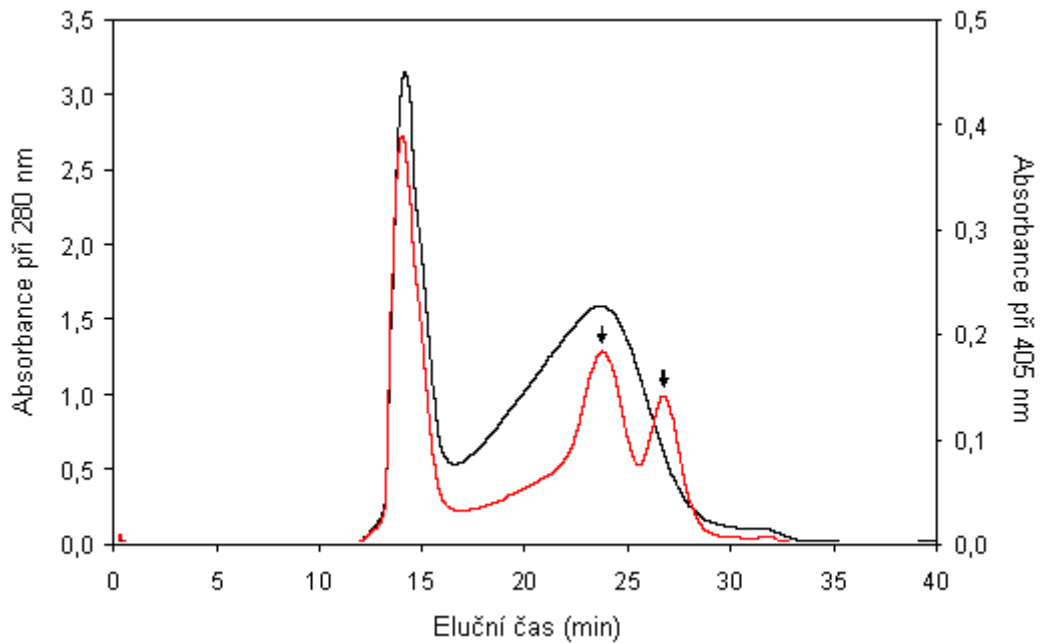
provést další purifikaci. Enzymový roztok byl před dalším přečištěním dialyzován proti 25 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 8,0) obsahujícímu 0,1 mmol.l⁻¹ EDTA a 2,5 mmol.l⁻¹ molybdenan sodný. Po tomto purifikačním kroku následovala separace sulfitoxidasy pomocí iontově výměnné chromatografie na koloně Resource Q.



Obr. 16: Ionově výměnná chromatografie kuřecí sulfitoxidasy na kolonce Resource Q.

Průtoková rychlost mobilní fáze činila 1 ml.min⁻¹. Kolona byla ekvilibrována 25 mmol.l⁻¹ Tris puftrem (pH 8,0). Eluce byla provedena lineárním gradientem 1mol.l⁻¹ NaCl v ekvilibračním pufru. Při vlnové délce 280 nm byly detekovány proteiny. Při vlnové délce 405 nm byl detekován hem. Postupným měřením aktivity v jednotlivých sbíraných frakcích eluátu, které jsou označeny římskými čísly I – VII, byla zjištěna nejvyšší aktivita hledaného enzymu v píku označeným číslem IV.

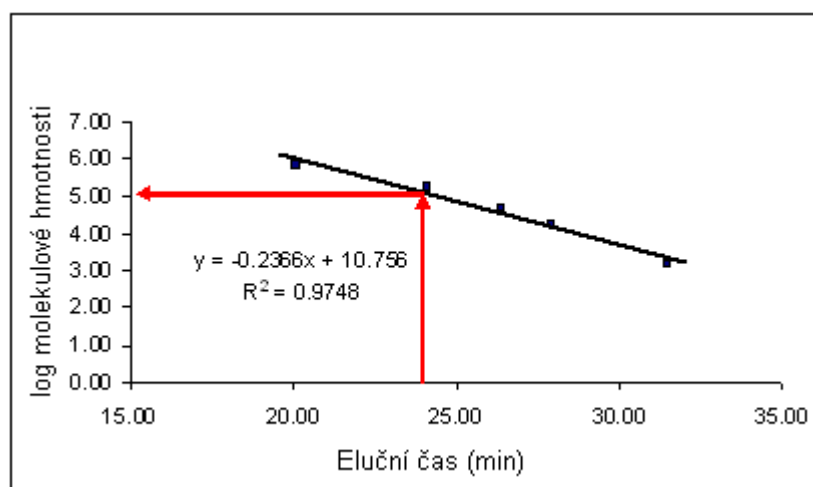
Na závěr byly frakce s nejvyšší enzymovou aktivitou po předchozí ultrafiltraci podrobeny poslednímu purifikačnímu kroku, gelové permeační chromatografii, na koloně Superdex 200 HR obr.17.



Obr. 17: Gelová permeační chromatografie kuřecí sulfitoxidasu na Superdexu 200 HR 10/30

25 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pufr (pH 8,0) obsahující 2,5 mmol.l⁻¹ molybdenan sodný sloužil jako mobilní fáze. Průtoková rychlost činila 0,7 ml.min⁻¹. K monitorování eluátu byly opět jako u předchozí chromatografie zvoleny vlnové délky 280 a 405 nm.

Píky s maximem při 280 nm, které jsou na obr. 17 označeny šipkami, odpovídají frakcím, které byly sesbírány v elučním čase okolo 24 minut, za předpokladu, že by se mohlo jednat o sulfitoxidasu. Přítomnost enzymu v těchto frakcích byla potvrzena naměřením aktivity.

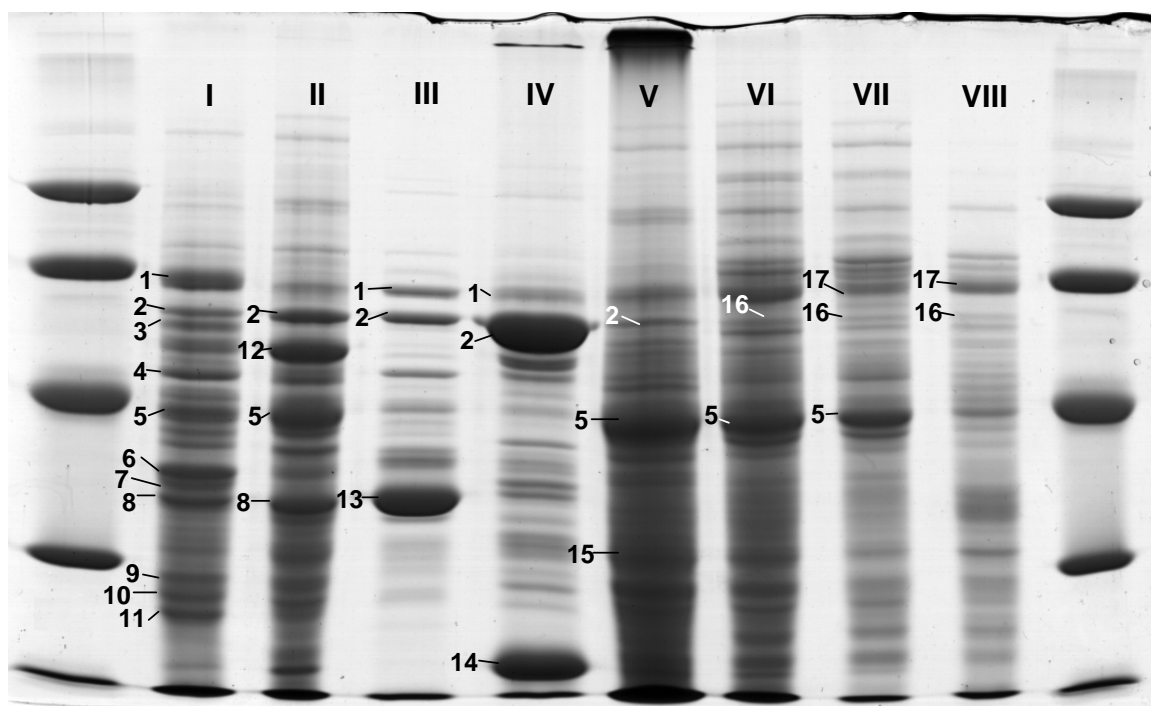


Obr. 18: Kalibrační křivka pro gelovou permeační chromatografii

K určení molekulové hmotnosti proteinu byla sestrojena kalibrační křivka za využití proteinových standardů o rozdílných molekulových hmotnostech: thyroglobulin (670 000 Da), χ -globulin (158 000 Da), ovalbumin (44 000 Da), myoglobin (17 000 Da), vitamín B12 (1 350 Da). Molekulová hmotnost studovaného enzymu, jenž byl eluován okolo 24 minuty byla přibližně 120 kDa.

5.1.2 Identifikace proteinů v extraktu z kuřecích jater pomocí MS

Jednotlivé frakce získané při izolaci sulfitoxidasy z kuřecích jater byly smíchány s Leammliho vzorkovým puřrem v poměru 1:1 a následně povařeny. Poté byly roztoky nanoseny na SDS-polyakrylamidový gel a podrobeny separaci. Na následujícím obrázku je uvedena fotografie gelu se separovanými proteiny. Majoritní proteinové pásy, jež jsou na fotografii označeny číslicemi 1-17 byly následně podrobeny analýze pomocí MALDI-TOF.



Obr.19: Separace proteinů metodou SDS-PAGE ve vzorcích získaných během purifikace sulfitoxidasy z kuřecích jater

V levé a v pravé krajní dráze jsou pásy, jež patří proteinovým standardům o molekulové hmotnosti shora 97,4; 66,2; 45,0; 31,0 a 20,1 kDa. Římskými číslicemi jsou označeny vzorky odebrané během purifikace: I – hrubý extrakt (nanášeno 30 μ g proteinu na jamku) , II - dialyzát po precipitaci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (23 μ g), III – proteiny nezachycené na koloně Macro-Prep High Q po 1. chromatografii (10 μ g), IV – 1. pík

eluovaný z Macro-Prep High Q (10 µg), V – 2. pík eluovaný z Macro-Prep High Q (30 µg), VI – frakce eluovaná z Resource Q, u které byla naměřena aktivita sulfitoxidas (30 µg); VI – aktivní frakce č. 4 Superdex 200 HR (10 µg) , VI – aktivní frakce č. 5 Superdex 200 HR (8 µg). Gel byl obarven pomocí Bio-Safe Coomassie.

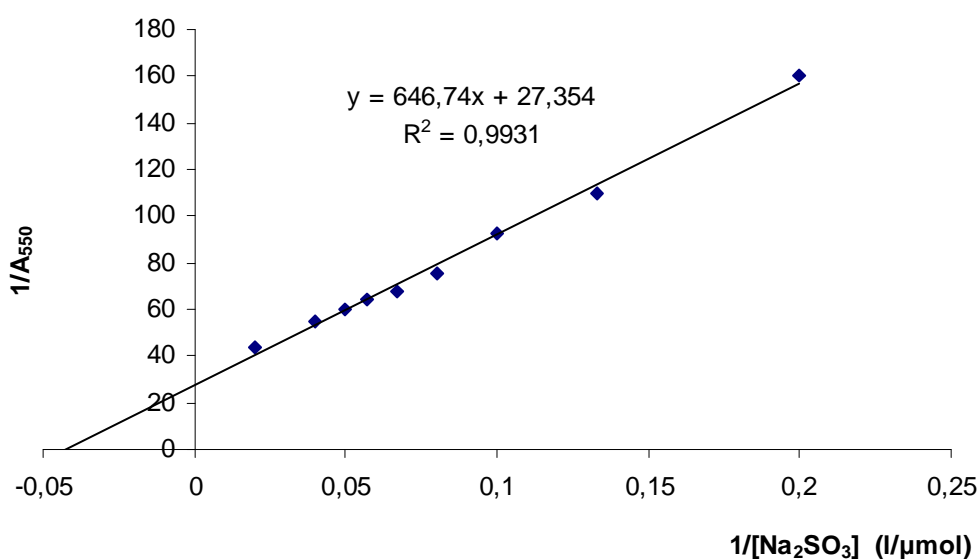
Tab. 9: Výsledky identifikace majoritních proteinů metodou MALDI-TOF peptidového mapování

| Pás | Protein |
|------------|---|
| 1 | IMP-cyklohydrolasa (gi 53778215) + sérový albumin (gi 45383974) |
| 2 | katalasa |
| 3 | kalretikulin (gi 44969651) |
| 4 | enolasa 1 (gi 46048768) |
| 5 | podoba s betain-homocystein methyltransferasou (gi 50755288) |
| 6 | aldolasa B (gi 157951672) |
| 7 | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (gi 46048961) |
| 8 | malát dehydrogenasa 2 (gi 50758110) |
| 9 | fosfoglycerát mutasa |
| 10 | triosafosfát isomerasa (gi 230359) |
| 11 | glutathion S-transferasa (gi 2981970) |
| 12 | glutamát dehydrogenasa (gi 118092411) |
| 13 | L-laktát dehydrogenasa B a A (gi 45383766) a (gi 45384208) |
| 14 | ferritin (gi 45384172) |
| 15 | IgY-Fc 3-4 fragment (gi 220702235) |
| 16 | sulfitoxidas (gi 73536180), (gi 3212610) |
| 17 | albumin (gi 45383974) |

V předchozí tabulce jsou uvedeny proteiny, které se podařilo pomocí proteinové databáze NCBI nr a vyhledávacího programu Mascot identifikovat. Hmotnostní spektra ostatních proteinů nebyla ve shodě s teoretickými hodnotami molekulových hmotností peptidů získaných ze sekvencí v databázi, a proto je nebylo možné jednoznačně určit.

5.1.3 Stanovení hodnoty K_m

Kinetické parametry sulfitoxidasy byly stanoveny pomocí spektrofotometrické metody založené na redukci cytochromu c (Kipke et al., 1971). Z rovnice lineární regrese sekundárních grafů dvojité reciprokého vynesení $1/A_{550}$ na $1/[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ byla získána hodnota Michaelisovy konstanty pro siřičitan. Měřením bylo zjištěno, že průměrná hodnota K_m pro siřičitan činí $24 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Koncentrace substrátu v květetě se pohybovala v rozmezí od 5 do $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Naměřená data byla zpracována v programu Microsoft Excel.

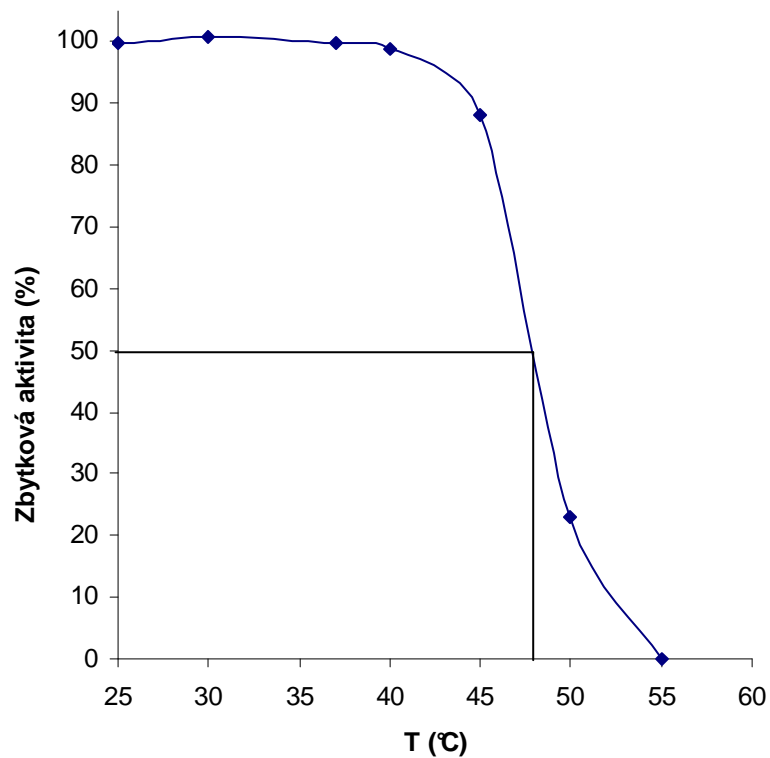


Obr. 20: Dvojitě reciproké vynesení závislosti $1/A$ na $1/[S]$

5.1.4 Stanovení teplotní stability sulfitoxidasy

Pro bližší charakterizaci a určení co neoptimálnějších podmínek měření byla stanovena teplotní stabilita enzymu. Teplotní stabilita enzymu byla sledována v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ Tris-HCl pufru obsahujícím $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ EDTA, pH 8,5. Profil teplotní stability byl určen v rozmezí teplot 25 – 55 °C. Vynesením závislost i zbytkové aktivity (%) na teplotě inkubace enzymu (°C) byla určena hodnota T_{50} . Při této teplotě enzym ztrácí 50% počáteční aktivity po předchozí inkubaci při různých teplotách po dobu 30 minut. $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ Na_2SO_3 byl použit jako substrát pro měření aktivity enzymu.

Měřením bylo zjištěno, že sulfitoxidasa vykazuje teplotní stabilitu do 45 °C. Vyšší teploty vedou k výraznému poklesu aktivity. Hodnota T_{50} odpovídala 48 °C.

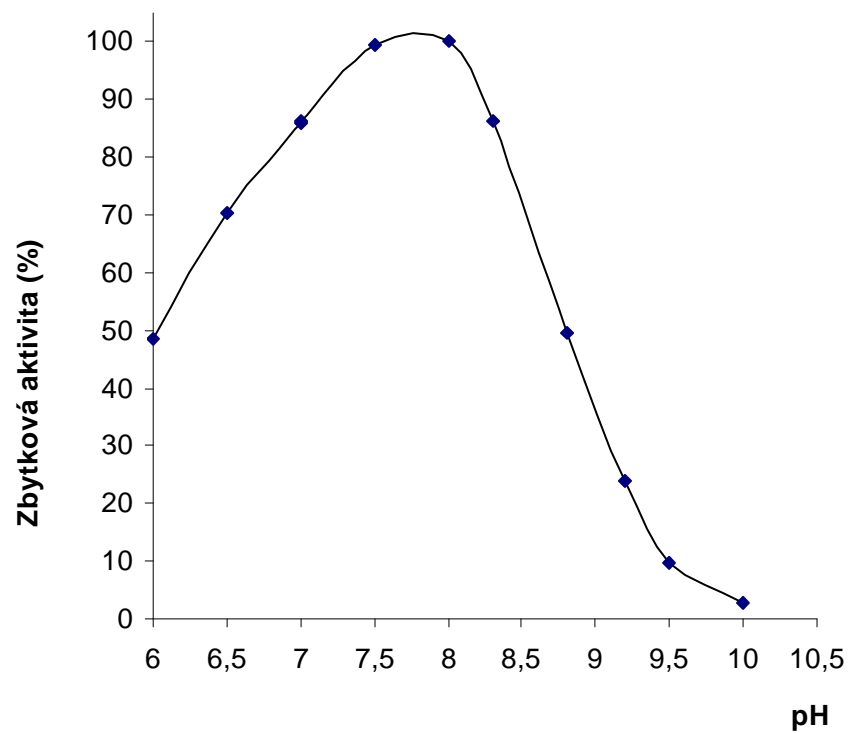


Obr. 21: Teplotní stabilita kuřecí sulfitoxidasý v prostředí 0,1mol.l⁻¹ Tris-HCl pufru obsahujícím 1. 10⁻⁴ mol.l⁻¹ EDTA, pH 8,5.

5.1.5 Stanovení pH optima sulfitoxidasý

pH optimum enzymu bylo sledováno v prostředí 50 mmol.l⁻¹ MES pufru pro rozmezí pH 6,0 – 7,0; 50 mmol.l⁻¹ MOPS pufru pro rozmezí pH 6,5 – 8,0; 50 mmol.l⁻¹ NH₄HCO₃ o pH 8,3 a 50 mmol.l⁻¹ Na₂CO₃/ NaHCO₃ s pufráčním rozmezím pH 9,2 – 10,9. Aktivita sulfitoxidasý byla měřena se substrátem Na₂SO₃, jehož koncentrace v kyvetě byla 100 μmol.l⁻¹.

Vynesení závislosti zbytkové aktivity enzymu na pH ukázalo, že pH optimum kuřecí sulfitoxidasý je mezi 7,5 a 8,0 (obr. 22).



Obr. 22: Vliv pH na aktivitu kuřecí sulfitoxidasy v prostředí MES pufru (6,0 – 7,0), MOPS pufru (6,5 – 8,0), NH_4HCO_3 (8,3), $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (9,2 – 10,9).

5.2 Aminoxidasa

5.2.1 Výsledky izolace aminoxidasy z hrachu setého

Výsledky některých vybraných kroků purifikace aminoxidasy z etiolovaných 10ti denních semenáčků hrachu setého jsou uvedeny v následující tabulce. Na obr. 23 je pak zobrazen výřez SDS-PAGE gelu s proteinovými standardy a vzorkem izolované aminoxidasy.

Tab. 10: Purifikace aminoxidasy z etiolovaných semenáčků hrachu setého

| Purifikační krok | Celkový objem (ml) | Aktivita (nkat.ml ⁻¹) | Celková aktivita (nkat) | Proteiny (mg.ml ⁻¹) | Celkové proteiny (mg) | Specifická aktivita (nkat.mg ⁻¹) |
|------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|--|
| DEAE-celulosa, Hydroxyapatit | 5 | 2061 | 92745 | 2,5 | 112,5 | 824,4 |
| Sephacryl S 300 | 5 ^a | 4686,1 | 23430,6 | 3,5 | 17,5 | 1338,9 |

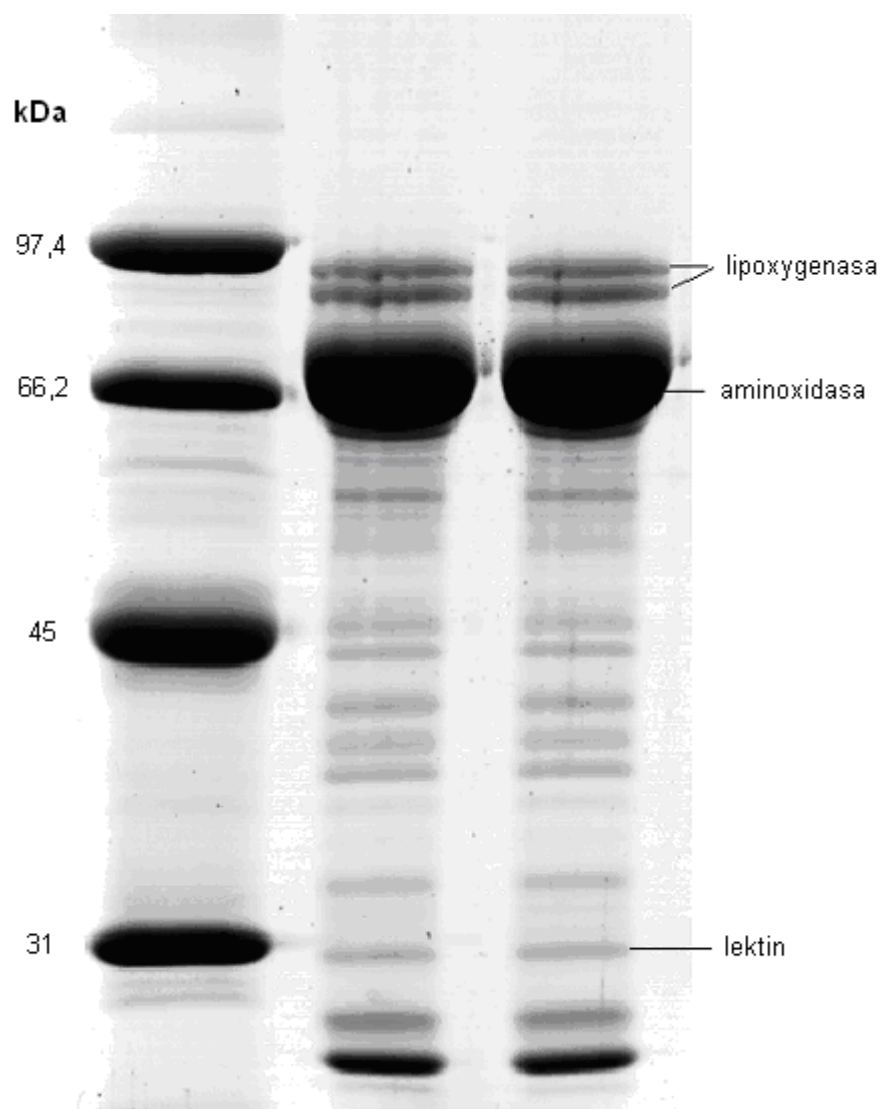
^a Objem enzymového roztoku po ultrafiltraci

Aminoxidasa byla izolována z 2,1 kg etiolovaných hrachových klíčků. Po přečištění na hydroxyapatitu a následné ultrafiltraci bylo z 11 ml enzymového preparátu 6 ml zmrazeno a pro další purifikaci bylo použito jen 5 ml, neboť toto množství bylo pro následné měření s inhibitory postačující.

Z etiolovaných semenáčků hrachu setého bylo získáno celkem 5 ml enzymového roztoku, jenž obsahoval 3,5 mg.ml⁻¹ proteinu, specifická aktivita byla 1338,9 nkat.mg⁻¹.

Chromatograficky přečištěný proteinový extrakt z desetidenních semenáčků hrachu setého byl podroben elektroforetické separaci podle Laemmliho, jejíž postup je popsán kapitole použité metody. Výsledek separace proteinů pomocí SDS-PAGE je zobrazen na následující fotografii SDS-PAGE gelu.

Pomocí metody MALDI-TOF peptidového mapování byla následně v získaných proteinových pásech na SDS-polyakrylamidovém gelu potvrzena aminoxidasa. Spolu s ní byla v extraktu z hrachu setého identifikována i lipoxygenasa a lektin P16270 (Swiss-Prot).

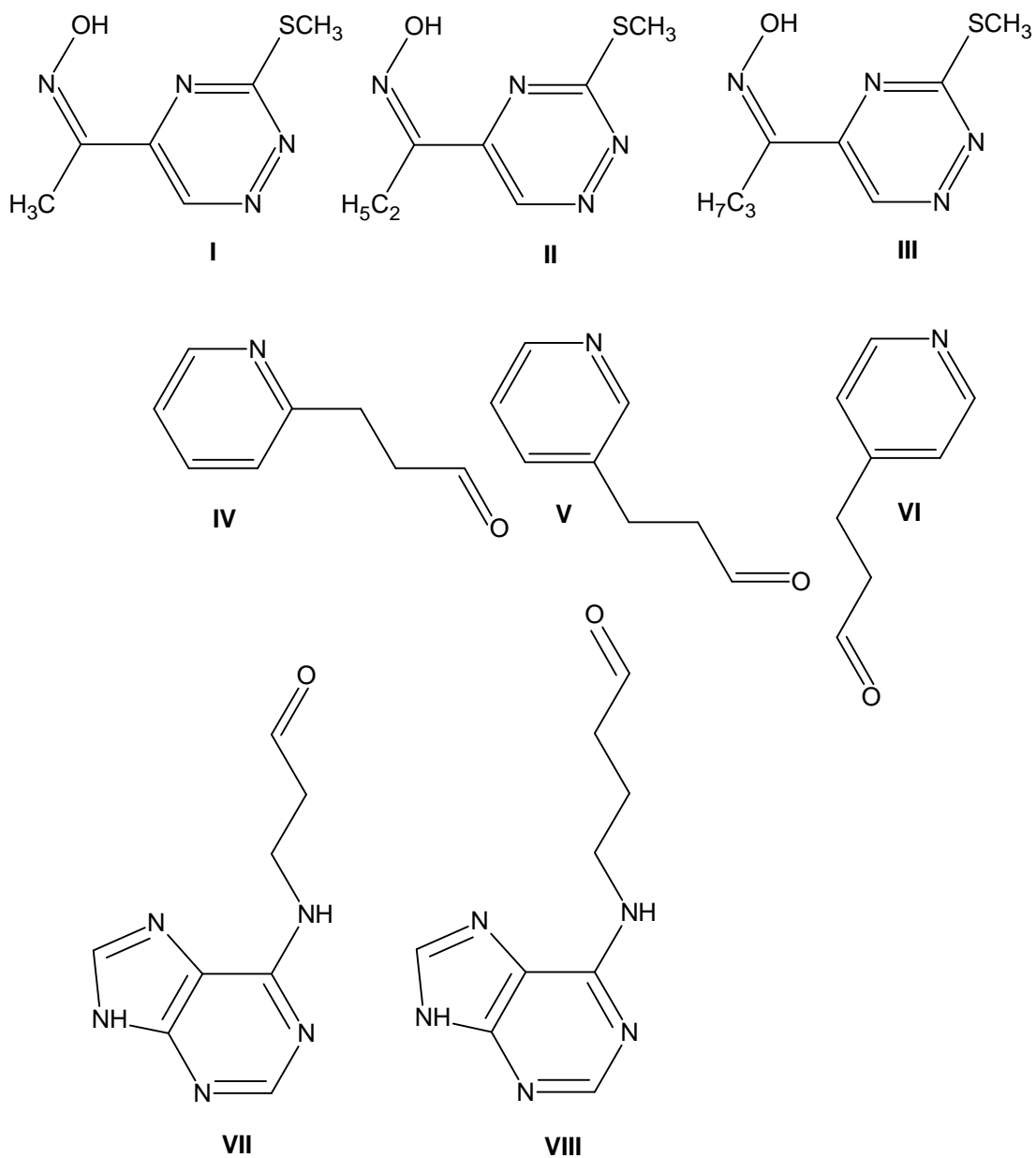


Obr. 23: Proteiny z extraktu desetidenních semenáčků hrachu setého separované SDS-PAGE.

Enzymový preparát (uprostřed a vpravo) byl nanesen na gel v množství 3 μ l na jamku. V levé dráze se pak nacházejí separované proteinové standardy o molekulových hmotnostech: 97,4; 66,2; 45,0 a 31,0 kDa

5.2.2 Testování inhibičních účinků vybraných sloučenin na hrachovou aminoxidasu

Ke zkoumání inhibičního účinku na hrachovou aminoxidasu byly vybrány následující organické sloučeniny, které lze rozdělit podle jejich struktury do tří skupin:

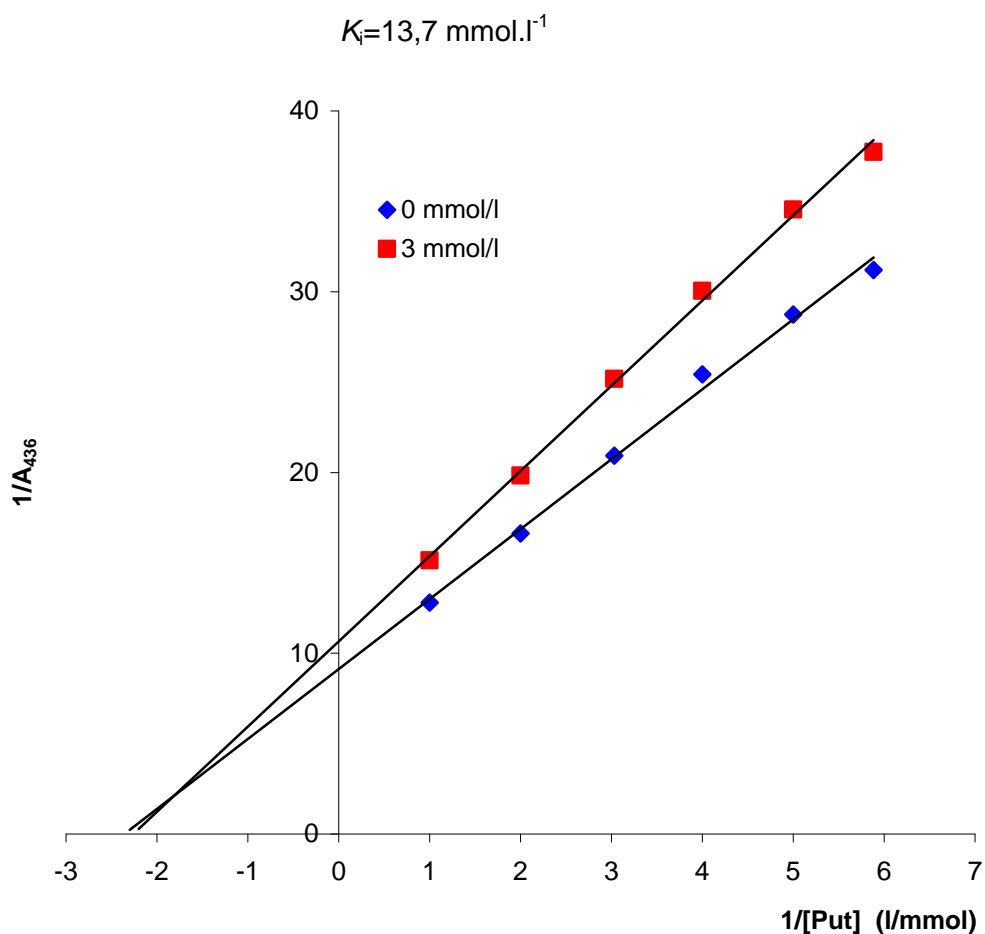


Obr. 24: Struktury derivátů odvozených od oximů (I), (II), (III) ; pyridinopropanaly (IV), (V), (VI) a purinylaminoaldehydy (VII), (VIII)

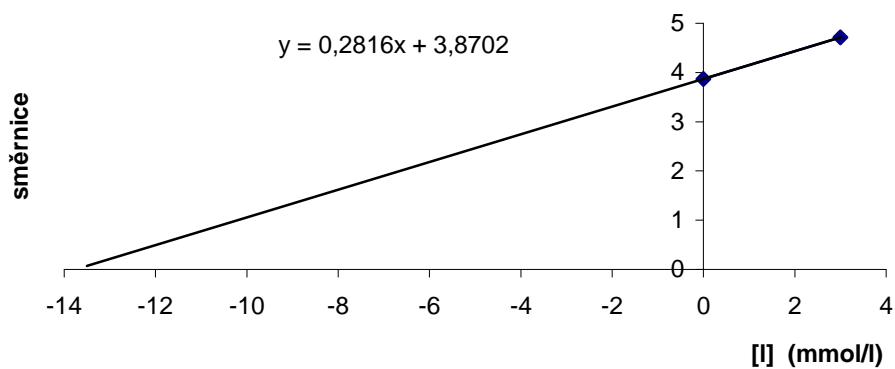
Za účelem získání co nejpřesnějších výsledků byla před každým měřením ověřena hodnota Michaelisovy konstanty aminoxidasy pro putrescin. Průměrná hodnota K_m pro putrescin byla $0,36 \text{ mmol.l}^{-1}$. Koncentrace substrátu v kyvetě se pohybovala v rozmezí od $0,14$ do $2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$.

Z rovnic lineárních regresí sekundárních grafů dvojitě reciprokého vynesení $1/A_{436}$ na $1/[\text{Put}]$ byly získány hodnoty inhibičních konstant u vybraných inhibitorů aminoxidasy. Naměřená data byla zpracována v programu Microsoft Excel.

(1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]ethanon oxim (I), PSAO

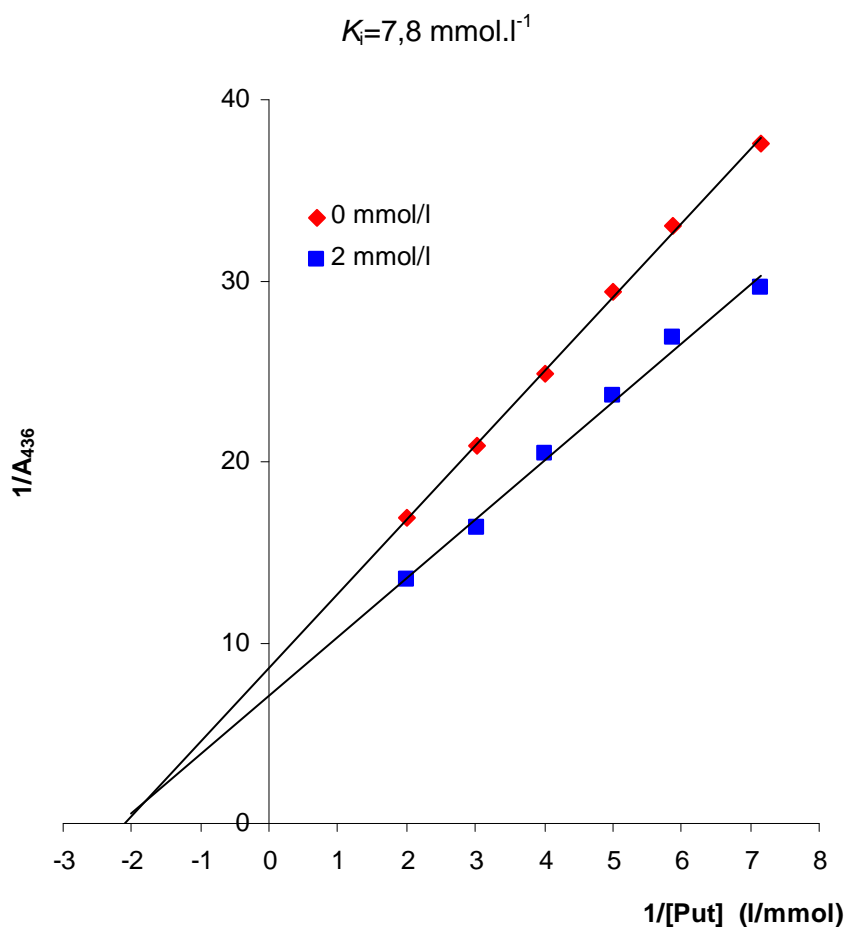


Obr. 25: Dvojitě reciproké vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy (1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]ethanon oximem (podle Lineweavera a Burka). Měřeno v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ K}^+$ -fosfátovém pufru pH 7,0 při teplotě 30°C . Použité koncentrace inhibitoru jsou uvedeny v grafu.

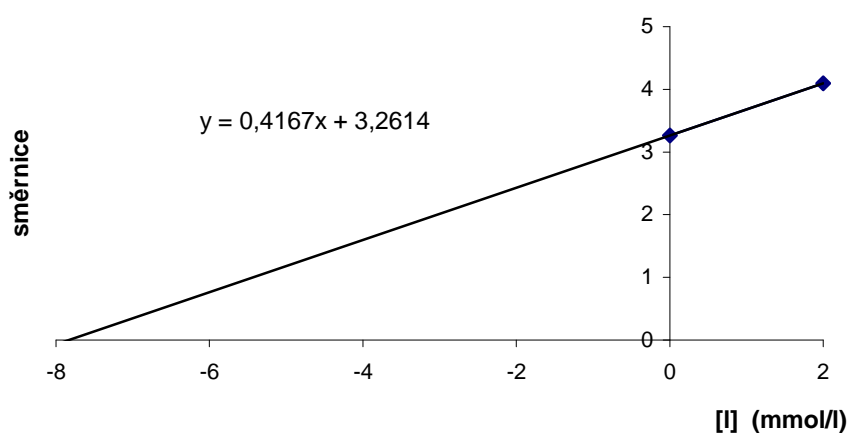


Obr. 26: Sekundární graf sestavený ze směrnic dvojitě reciprokého vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy (1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]ethanon oximem.

(1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]propan-1-on oxim (II), PSAO



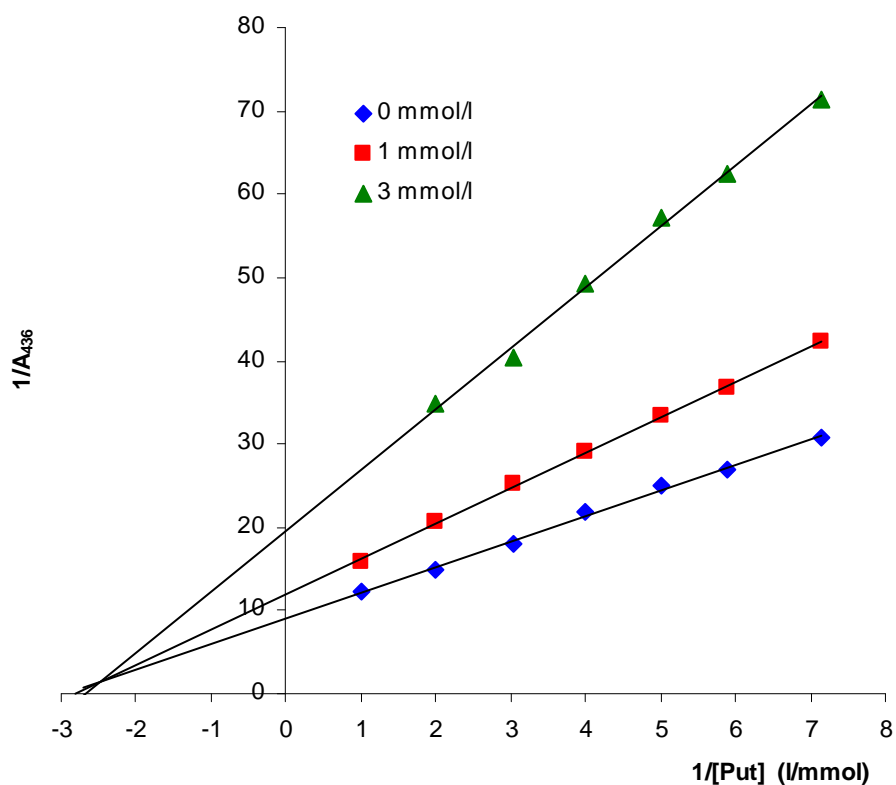
Obr. 27: Dvojitě reciproké vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy (1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]propan-1-on oximem (podle Lineweavera a Burka). Měřeno v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ K^+ -fosfátovém pufru pH 7,0 při teplotě 30°C . Použité koncentrace inhibitoru jsou uvedeny v grafu.



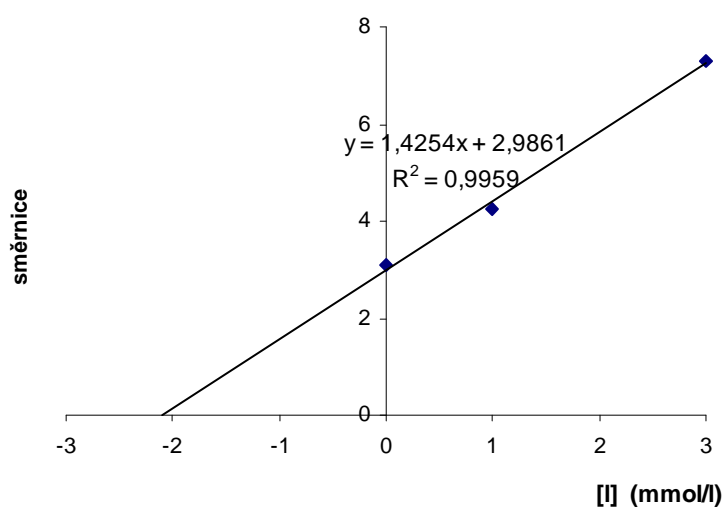
Obr. 28: Sekundární graf sestavený ze směrnic dvojitě reciprokého vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy (1Z)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]propan-1-on oximem.

3-pyridin-2-ylpropanal (IV), PSAO

$$K_i = 2,1 \text{ mmol.l}^{-1}$$



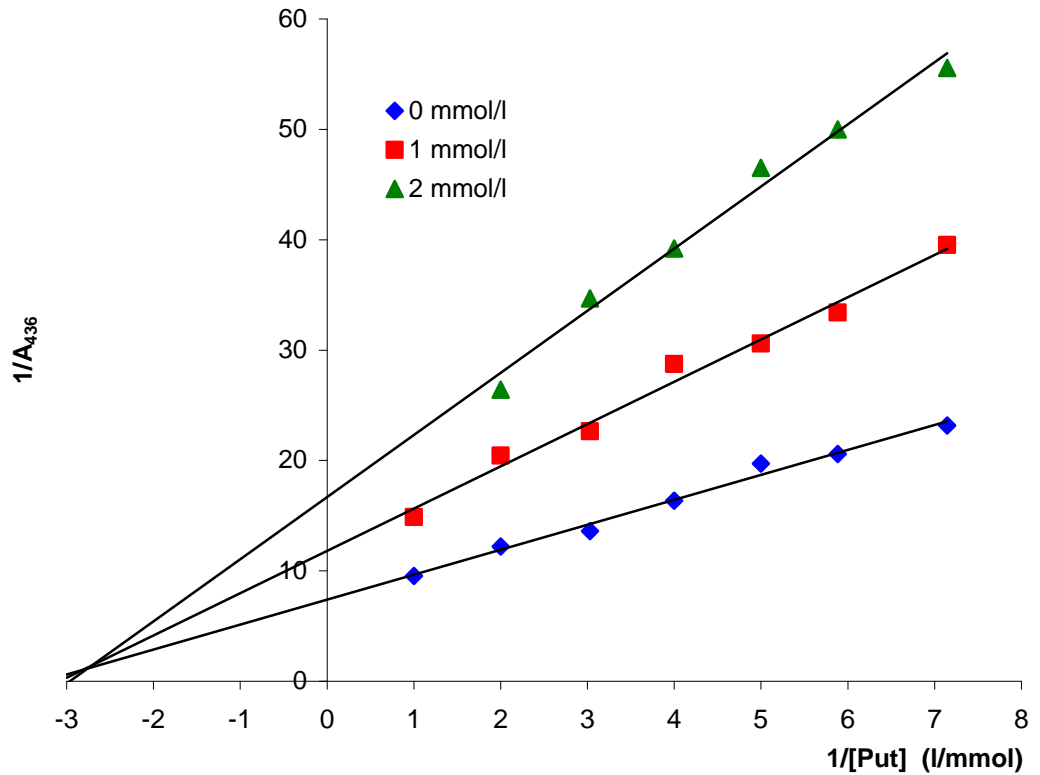
Obr. 29: Dvojitě reciproké vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy 3-pyridin-2-ylpropanalem (podle Lineweavera a Burka). Měřeno v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ K^+ -fosfátovém pufru pH 7,0 při teplotě 30°C . Použité koncentrace inhibitoru jsou uvedeny v grafu.



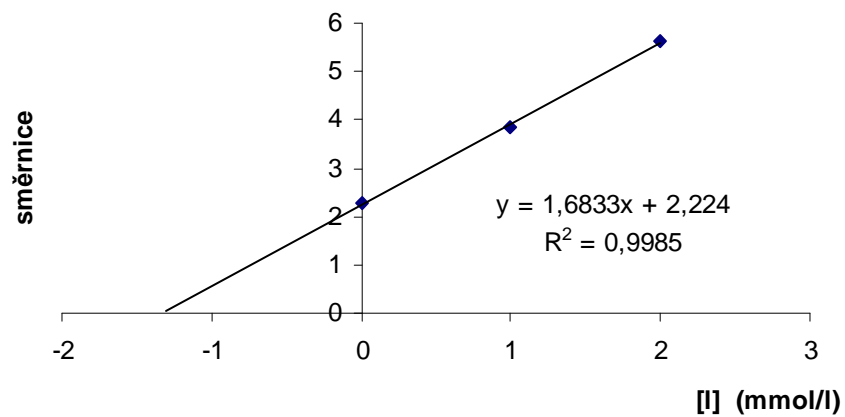
Obr. 30: Sekundární graf sestavený ze směrnic dvojitě reciprokého vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy 3-pyridin-2-ylpropanalem.

3-pyridin-3-ylpropanal (V), PSAO

$$K_i = 1,3 \text{ mmol.l}^{-1}$$

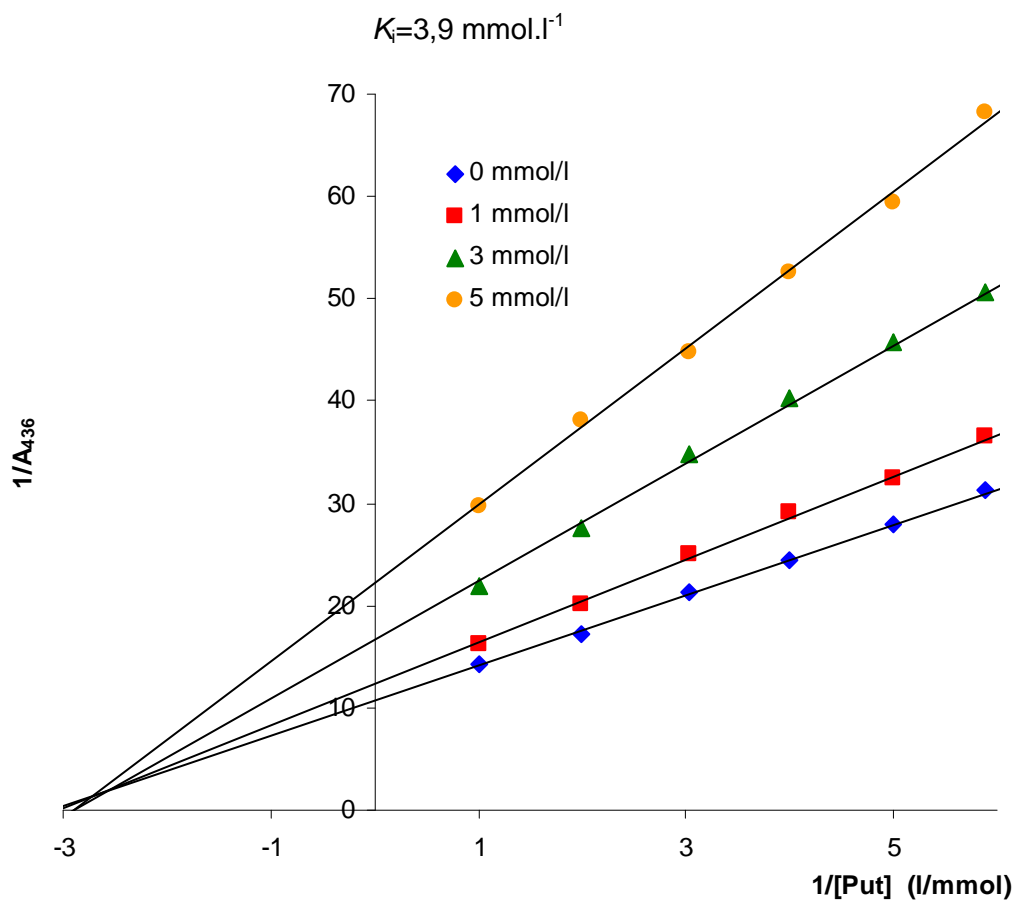


Obr. 31: Dvojitě reciproké vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy 3-pyridin-3-ylpropanalem (podle Lineweavera a Burka). Měřeno v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ K^+ -fosfátovém pufru pH 7,0 při teplotě 30°C . Použité koncentrace inhibitoru jsou uvedeny v grafu.

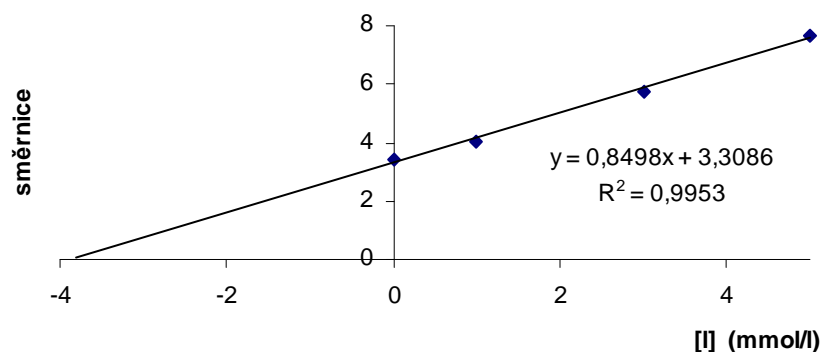


Obr. 32: Sekundární graf sestavený ze směrnic dvojitě reciprokého vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy aminoxidasou 3-pyridin-3-ylpropanalem.

3-(9H-purin-6-ylamino)propanal (VII), PSAO

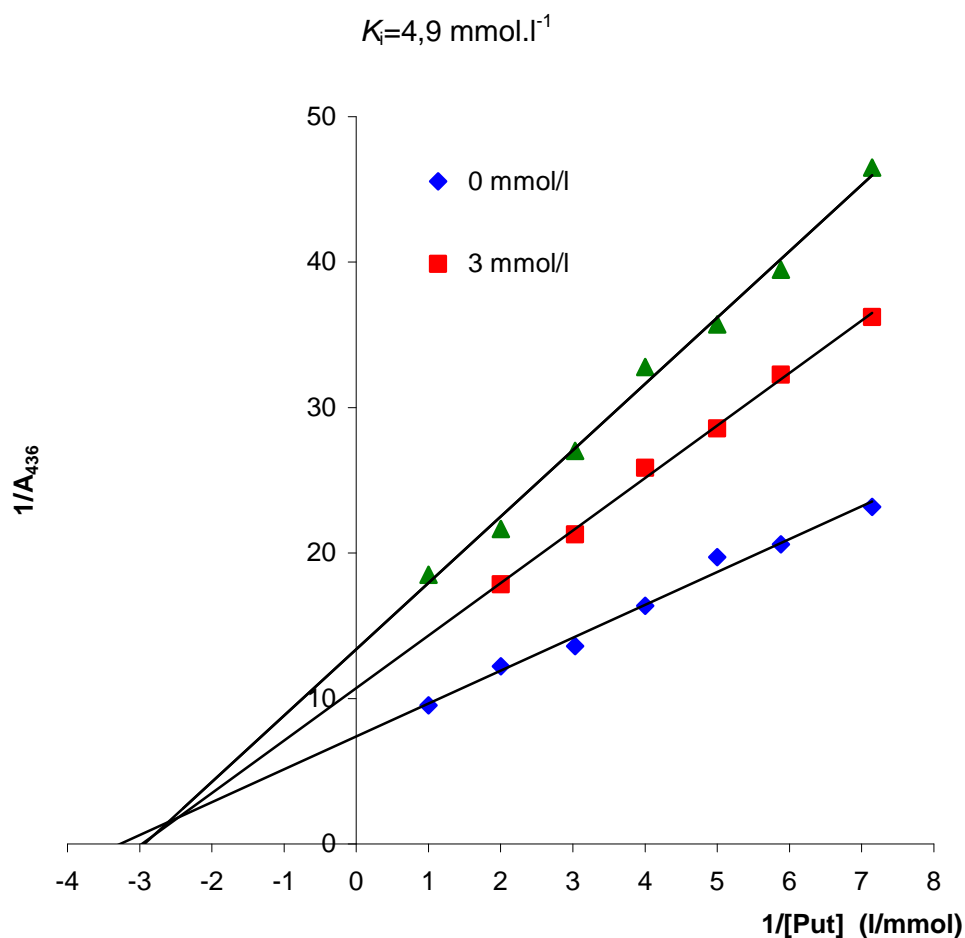


Obr. 33: Dvojitě reciproké vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy 3-(9H-purin-6-ylamino)propanalem (podle Lineweavera a Burka). Měřeno v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ K^+ -fosfátovém pufru pH 7,0 při teplotě 30°C . Použité koncentrace inhibitoru jsou uvedeny v grafu.

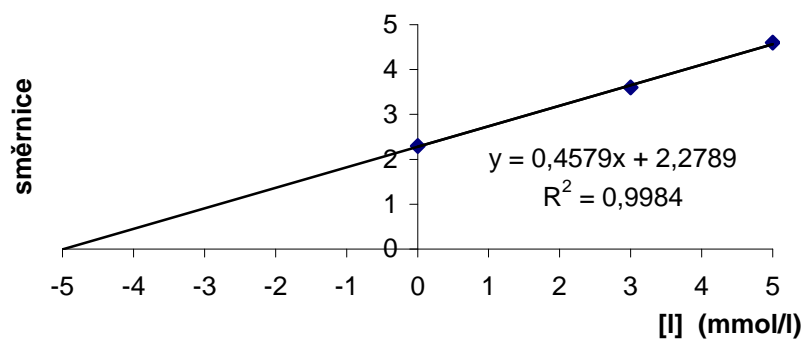


Obr. 34: Sekundární graf sestavený ze směrnic dvojitě reciprokého vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy 3-(9H-purin-6-ylamino)propanalem.

4-(9*H*-purin-6-ylamino)butanal (VIII), PSAO



Obr. 35: Dvojitě reciproké vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy 4-(9*H*-purin-6-ylamino)butanalem (podle Lineweavera a Burka). Měřeno v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ K^+ -fosfátovém pufru pH 7,0 při teplotě 30°C . Použité koncentrace inhibitoru jsou uvedeny v grafu.



Obr. 36: Sekundární graf sestavený ze směrnic dvojitě reciprokého vynesení $1/A$ na $1/[S]$ inhibice hrachové aminoxidasy 4-(9*H*-purin-6-ylamino)butanolem.

Tab. 11: Inhibiční konstanty vybraných organických sloučenin

| | Název sloučeniny | K_i (mmol.l⁻¹) |
|-------------|---|---|
| I | (1 <i>Z</i>)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]ethanon oxim | 13,7 |
| II | (1 <i>Z</i>)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]propan-1-on oxim | 7,8 |
| III | (1 <i>Z</i>)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]butan-1-on oxim | - |
| IV | 3-pyridin-2-ylpropanal | 2,1 |
| V | 3-pyridin-3-ylpropanal | 1,3 |
| VI | 3-pyridin-4-ylpropanal | - |
| VII | 3-(9 <i>H</i> -purin-6-ylamino)propanal | 3,9 |
| VIII | 4-(9 <i>H</i> -purin-6-ylamino)butanal | 4,9 |

V případě sloučeniny (III) (1*Z*)-1-[3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5-yl]butan-1-on oximu nebylo možné provést měření, neboť se již při 2 mmol.l⁻¹ koncentraci sloučeniny v kyvetě tvoří sraženina.

3-pyridin-4-ylpropanal (VI) nebylo rovněž možné proměřit, protože se ji v podmínkách, při kterých byly rozpuštěny ostatní deriváty (IV, V), nepodařilo rozpustit. Sloučeninu (VI) se nepodařilo rozpustit ani po okyselení roztoku pomocí HCl, či po přidavku methanolu.

6. DISKUSE

Hlavním tématem této diplomové práce byla izolace sulfitoxidasy. V odborné literatuře je uvedena její izolace z rostlin, živočichů i bakterií. Jelikož výsledky prvotní izolace uvedeného enzymu z mladých lístků špenátu a tabáku podle dostupné literatury nebyly uspokojivé, byla provedena další izolace sulfitoxidasy z živočišného materiálu, kuřecích jater, jejíž úspěšný postup je detailně popsán v této práci. Molekulová hmotnost enzymu byla zjištěna za pomoci SDS-PAGE a gelové permeační chromatografie, po které následovala identifikace sulfitoxidasy metodou peptidového mapování. Enzym byl poté charakterizován určením kinetických parametrů. Dále byly za pomoci měření získány informace o jeho teplotní stabilitě či pH optimu sulfitoxidasy.

V literatuře je popsána řada různě starých odborných prací se zaměřením na izolaci sulfitoxidasy z jater živočichů. Tyto purifikační postupy využívají rozličné extrakční procesy a chromatografické techniky (Kessler & Rajagopalan, 1972; Kipke et al., 1989; Cohen & Fridovich, 1971, Cabré et al., 1991). Izolace sulfitoxidasy uvedená v této diplomové práci byla inspirována purifikačním protokolem (Kipke et al., 1989). Uvedený protokol zahrnuje nezbytné izolační kroky jako je tvorba acetonového prášku, precipitace síranem amonným, denaturace zahříváním, dialýzu a chromatografické techniky – např. iontově výměnná a gelová chromatografie.

Pro izolaci sulfitoxidasy bylo zakoupeno 500 g zmrazených kuřecích jater. Velkou výhodou je, že se jedná o levný a snadno dostupný výchozí materiál. Rozmrazená játra byla nejprve homogenizována ve vychlazeném acetonu za účelem odstranění lipidů. Po odstranění filtrátu byl acetonový prášek sušen mezi hodinovými skly při 4°C. Acetonový prášek byl ihned zamrazen, aby se zamezilo případné ztrátě enzymu.

Po homogenizaci acetonového prášku ve fosfátovém pufru následovala dvojnásobná precipitace síranem amonným a zahřívání roztoku na vodní lázni. U hrubého extraktu, který byl nasycen síranem amonným však nebylo možné sledovat aktivitu, neboť při jejím měření s cytochromem c jako elektronovým akceptorem byla aktivita nepatrná.

Po centrifugaci byl získaný precipitát rozpuštěn a dialyzován v pufru obsahujícím molybdenan. Teprve v tomto kroku, po odstranění síranu amonného z enzymového roztoku dialýzou, bylo možné proměřit aktivitu. Kipke et al., zdůrazňuje nezbytnost molybdenanu v pufru během dialýzy, neboť se předpokládá, že by se tímto měl obnovit jeho deficit v molekule enzymu. V tabulce, jež je uvedena v kapitole výsledky, je zapsána hodnota zjištěné specifické aktivity 5,9 nkat.mg⁻¹.

Enzymový preparát byl po předchozí dialýze podroben iontově výměnné chromatografii (Macro-Prep High Q). Eluce byla provedena lineárním gradientem NaCl v ekvilibračním pufru. Po dialýze proběhla další separace na kolonce Resource Q (obr. 16). Eluce frakcí s proteiny byla monitorována při vlnových délkách 280 a 405 nm. Nejvyšší hodnota aktivity byla zjištěna ve frakci označené římskou číslicí IV. Z obrázku lze vyčíst, že hodnota elučního času píku, jenž odpovídá frakci se sulfitoxidasou, je okolo 23 minut. Ve stejném okamžiku dochází rovněž k nárůstu absorbance při vlnové délce 405 nm, při které absorbuje hem. Tento pík tedy odpovídá cytochromové doméně sulfitoxidasy obsahující hem.

Posledním purifikačním krokem byla separace pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 HR. Aktivita sulfitoxidasy byla demonstrována píkem s maximem v elučním čase okolo 24 minut. V tomto okamžiku byl monitorován nárůst absorbance při 405 nm. Molekulová hmotnost enzymu přitom činila přibližně 120 kDa, což odpovídá hodnotě molekulové hmotnosti sulfitoxidasy (Feng et al., 2007; Sullivan et al., 1993).

Ve 27 minutě byla sebrána ještě jedna frakce. Z kalibrační křivky sestavené pomocí standardů byla odečtena molekulová hmotnost i tohoto proteinu. Molekulová hmotnost proteinu byla 24 kDa. Lze uvažovat, že by se mohlo jednat pouze o část enzymu, protože hodnota molekulové hmotnosti je příliš nízká.

Průběh purifikace byl sledován postupným proměřováním vzorků, jenž byly odebírány v jednotlivých krocích purifikace. Získané výsledky jsou pak uvedeny v purifikační tabulce č. 8.

Vzorky byly rovněž podrobeny separaci pomocí SDS – PAGE. Touto metodou byly separovány proteiny obsažené ve frakcích z jednotlivých purifikačních kroků. Z fotografie gelu a purifikační tabulky je zřejmé, že během purifikace postupně docházelo k snížení obsahu proteinů ve vzorku a zároveň navýšení specifické aktivity. V posledním purifikačním kroku po chromatografii na kolonce Superdex 200 HR bylo získáno 8 a 7 ml enzymového roztoku o specifické aktivitě 25,8 a 24 nkat.mg⁻¹. Na SDS-PAGE gelu jsou tyto frakce označeny římskými čísly VII a VIII. Po separaci pomocí SDS-PAGE následovala identifikace majoritních proteinů za pomoci MALDI-TOF peptidového mapování. Porovnáním získaných dat s databází byl utvořen seznam proteinů, které se nacházely spolu se sulfitoxidasou v jednotlivých vzorcích získaných z kuřecích jater.

U purifikované sulfitoxidasy byla určena hodnota Michaelisovy konstanty. Aktivita enzymu byla stanovena podle článku (Cohen & Fridovich, 1971). Za pomoci měření bylo zjištěno, že hodnota K_m pro siřičitan činí 24 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Profil teplotní stability enzymu byl určen v rozmezí teplot 25 – 55 °C. Z grafu (obr. 21) je zřejmé, že sulfitoxidasa vykazuje teplotní stabilitu do 45 °C. Při vyšších teplotách dochází k výraznému poklesu aktivity. Hodnota T_{50} odpovídala 48 °C.

pH optimum kuřecí sulfitoxidasy bylo sledováno v prostředí pufrů s různými rozmezími hodnot pH (6-10,9). Z výsledků měření vyplývá, že pH optimum kuřecí sulfitoxidasy je mezi 7,5 a 8,0 (obr. 22).

Počáteční pokusy o izolaci sulfitoxidasy potvrdily domněnku, že získání tohoto enzymu nebude snadné. Z tohoto důvodu bylo hlavní téma diplomové práce, izolace sulfitoxidasy, rozšířeno o studium interakce aminoxidasy z hrachu setého s vybranými potencionálními inhibitory. Studium enzymů, jenž hrají důležitou roli v metabolismu aminů, zejména aminoxidasami, se již několik let zabývá Katedra biochemie PŘF UP v Olomouci. V této práci byla tradičním postupem izolována aminoxidasas z hrachu setého. S organickými sloučeninami byly následně testovány jejich inhibiční účinky na hrachovou aminoxidasu.

Aminoxidasas byla izolována z desetidenních etiolovaných semenáčků hrachu setého. Klíčky byly sklizeny po době deseti dnů, kdy jejich vrůst i aktivita enzymu byla dostačující. Izolace enzymu zahrnovala kroky jako homogenizaci klíčků v K^+ -fosfátovém pufru, vysolení síranem amonným do 30% a následně 70% nasycení. Poté byl rozpuštěný precipitát odsolen dialýzou. Enzymový roztok byl nanesen na kolonu s DEAE-celulosou. DEAE-celulosa byla propojena s kolonou plněnou hydroxyapatitem, na kterém zůstal enzym navázán. Tento způsob purifikace využívající zapojení dvou kolon za sebou byl zvolen proto, aby nedocházelo k nepříznivým ztrátám enzymu. Další výhodou je urychlení izolace enzymu a tím i omezení zráty jeho aktivity. Ultrafiltrací zakoncentrovaný enzymový roztok byl dále přečištěn na Sephacrylu S 300. Aktivita aminoxidasy byla monitorována pomocí spektrofotometrické metody s guajakolem a křenovou peroxidasou.

Pro kontrolu průběhu izolace byla vytvořena purifikační tabulka s výsledky vybraných kroků izolace aminoxidasy. Porovnáním hodnoty specifické aktivity po prvním purifikačním kroku (DEAE-celulosa, hydroxyapatit) a druhém purifikačním kroku (Sephacryl S 300) je zřejmý její nárůst. Z etiolovaných semenáčků hrachu setého bylo na závěr získáno 5 ml enzymového roztoku o specifické aktivitě 1338,9 nkat.mg⁻¹.

Získaný enzymový preparát byl podroben SDS-PAGE elektroforéze. Po vizualizaci proteinů barvením se na gelu objevil band odpovídající aminoxidase. Molekulová hmotnost aminoxidasy odpovídala hodnotě uvedené v literatuře (72 kDa) ; (Medda et al., 1995). Metodou MALDI-TOF peptidového mapování byla v extraktu z etiolovaných klíčků semenáčků hrachu setého identifikována i lipoxygenasa a lektin

(obr. 23). Z výše uvedených výsledků lze říci, že aminoxidasa byla získána v čistém stavu.

Sloučeniny zvolené pro testování jejich případných inhibičních účinků na hrachovou aminoxidasu jsou odlišných struktur. Jedná se o deriváty oximů, pyridinyl propanaly a purinylamino aldehydy.

V případě oximů bylo měření komplikováno jejich omezenou rozpustností. Oximy byly rozpuštěny v methanolu, avšak během měření při vyšších koncentracích sloučenina precipitovala. Přídavek methanolu do pufru sice částečně pomohl, ale nebyl natolik dostačující, aby mohly být proměřeny všechny potřebné koncentrace inhibitoru. Při vysokých koncentracích methanolu v pufru hrozila ztráta aktivity enzymu. Z tohoto důvodu byly u látek zvoleny pouze nízké koncentrace.

Další skupinu látek tvořily pyridinyl propanaly, které se lišily umístěním propanalu (ploha 2, 3 nebo 4) na pyridinovém heterocyklu. V případě 3-pyridin-4-ylpropanalu byla jeho rozpustnost oproti ostatním dvěma strukturálně podobným sloučeninám ve vodě pouze částečná. Snahy o protonizaci pyridinu v prostředí HCl a případné zahřívání nehomogenního roztoku byly rovněž bezúspěšné. Lze usuzovat, že během skladování došlo ke změně struktury sloučeniny a spolu s tím i vlastností.

Poslední skupina látek, acetalu, byly před měřením převedeny kyselou hydrolyzou na aldehydy. Purinový skelet byl v tomto případě substituován propanalem či butanalem.

Z výsledků měření se všemi výše uvedenými sloučeninami lze konstatovat, že se jedná o velmi slabé nekompetitivní inhibitory. Hodnoty inhibičních konstant se ve všech případech pohybovaly v řádech mmol.l^{-1} . Jak již bylo v teoretické části uvedeno, CAO aminoxidasa může být inhibována sloučeninami různých struktur. V literatuře jsou popsány inhibice hrachové aminoxidasy především kompetitivního a nekompetitivního charakteru. Hodnoty inhibičních konstant se často pohybují v řádech $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

7. ZÁVĚR

V teoretické části této práce byla provedena rešerše literatury se zaměřením na charakterizaci sulfitoxidasy a její substrát siřičitany. Dále byla vypracována literární rešerše se zaměřením na charakterizaci aminoxidasy, interakci aminoxidasy s některými inhibitory a metabolismus polyaminů.

V praktické části byla úspěšně provedena purifikace sulfitoxidasy z kuřecích jater. Pomocí SDS-PAGE elektroforézy byla určena čistota proteinového vzorku. Identifikace kuřecí sulfitoxidasy byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie. Enzym byl dále charakterizován stanovením hodnoty Michaelisovy konstanty, pH optima a teplotní stability.

Výběrem vhodné metody se podařilo sulfitoxidasu úspěšně izolovat. Pro případné bioanalytické využití tohoto enzymu, jako je například jeho využití ke konstrukci biosenzoru, je však třeba zvýšit jeho čistotu dalším přečištěním.

Izolace aminoxidasy z etiolovaných semenáčků hrachu setého, které byla věnována druhá pasáž praktické části, proběhla rovněž úspěšně. SDS-PAGE elektroforéza potvrdila vysokou čistotu proteinu. Metodou hmotnostní spektrometrie byla aminoxidasa identifikována v získaném enzymovém roztoku. Na závěr byly testovány případné inhibiční účinky vybraných sloučenin na aminoxidasu. Z výsledků měření je patrné, že všechny vybrané látky vykazovaly pouze velmi slabé inhibiční účinky nekompetitivního charakteru.

8. LITERATURA

- Alcázar R., Marco F., Cuevas J.C., Patron M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A.F., Altabella T. (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol Lett* **28**, 1867 - 1876.
- Binda C., Coda A., Angelini R., Federico R., Ascenzi P., Mattevi A. (1999) A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase *Structure* **7**, 265 - 276.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* **140**, 103 - 125.
- Cabré F., Cascante M., Canela E.I. (1991) An improved purification procedure for sulfite oxidase from bovine liver. *Preparative Biochemistry* **21**, 53 - 61.
- Casero R.A.Jr., Marton L.J. (2007) Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 373 - 390.
- Childs A.C., Metha D.J., Gerner E.W. (2003) Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1394 - 1406.
- Cohen H.J., Betcher-Lange S., Kessler D.L., Rajagopalan K.V. (1972) Hepatic sulfite oxidase. Congruency in mitochondria of prosthetic groups and activity. *J. Biol. Chem.* **247**, 7759 - 7766.
- Cohen H.J., Fridovich I. (1971) Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties. *J.Biol.Chem.* **246**, 359 - 366.
- Cohen S.S. (1998) A guide to the polyamines. Oxford University Press, New York
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci* **11**, 80 - 88.
- Davies A.E., Fogg A.G. (1995) Flow injection sandwich technique applied to indirect visible spectrophotometric determinations. bromimetric and iodimetric determination of sulphite. *Analytica Chimica Acta* **318**, 55 - 62.
- Doerge D.L., Divi R.I., Churchwell M.I. (1997) Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases. *Anal. Biochem.* **250**, 10 - 17.
- Duran M., Beemer F.A., van der Heiden C., Korteland J., deBree P.K., Brink M., Wadman S.K. (1978) Combined deficiency of xanthine oxidase and sulphite oxidase: a defect of molybdenum metabolism or transport. *J. Inherited Metab. Dis.* **1**, 175 - 178.
- Duran M., Johnson J.L. (2001) Molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. In: Scriver C., Beaudet A., Sly W. Valle D., editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill; New York 2001. p. 3163 - 3177.

- Eilers T., Schwarz G., Brinkmann H., Witt, C., Richter T., Nieder J., Koch B., Hille R., Hansch R., and Mendel R.R. (2001). Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism. *J. Biol. Chem.* **276**, 46989 - 46994.
- Feng C., Kedia R.V., Hazzard J.T., Hurley J.K., Tollin G., Enemark J.H. (2002) Effect of solution viscosity on intramolecular electron transfer in sulfite oxidase. *Biochemistry* **41**, 5816 - 5821.
- Feng C., Tollin G., Enemark J.H. (2007) Sulfite oxidizing enzymes *Biochim Biophys Acta.* **1774**, 527 - 539.
- Feng C., Wilson H.L., Hurley J.K., Hazzard J.T., Tollin G., Rajagopalan K.V., Enemark J.H. (2003) Role of conserved tyrosine 343 in intramolecular electron transfer in human sulfite oxidase. *J. Biol. Chem.* **278**, 2913 - 2920.
- Frébort I., Adachi O. (1995) Copper / Quinone-Containing Amine Oxidases, an Exciting Class of Ubiquitous Enzymes *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 625 - 635.
- Federico R., Angelini R. (1991) Polyamine catabolism. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, 41 - 56.
- Garton S.D., Garrett R.M., Rajagopalan K.V., Johnson M.K. (1997) Resonance raman characterization of the molybdenum center in sulfite oxidase-identification of Mo=O stretching modes. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 2590 - 2591.
- Griffith O.W. (1987) Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview. *Methods Enzymol.* **143**, 366 - 376.
- Groppa M.D., Benavides M. P. (2007) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* **34**, 35 - 45.
- Hamana K., Niitsu M., Samejima K., Itoh T., Hamana H., Shinozawa T. (1998) Polyamines of thermophilic eubacteria belonging to the genera *Thermotoga*, *Thermodesulfobivrio*, *Thermoleophilum*, *Thermus*, *Rhodothermus* and *Meiothermus*, and the thermophilic archeobacteria belonging to the genera *Aeropyrum*, *Picrophilus*, *Methanobacterium* and *Methanococcus*. *Microbios* **94**, 7 - 21.
- Hänsch R., Lang C., Riebeseel E., Lindigkeit R., Gessler A., Rennenberg H., Mendel R.R. (2006) Plant Sulfite Oxidase as Novel Producer of H₂O₂. Combination of Enzyme Catalysis with Subsequent Non-enzymatic Reaction Step. *J. Biol. Chem.* **281**, 6884 - 6888.
- Havliš J., Thomas H., Šebela M., Shevchenko A. (2003) Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal. Chem.* **75**, 1300 - 1306.

- Herber U., Hüve K. (1998) Action of SO₂ on plants and metabolic detoxification of SO₂. *Int. Rev. Cytol.* **177**, 255 - 286.
- Hille R. (1996) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **96**, 2757 - 2816.
- Hille, R. (2002). Molybdenum enzymes containing the pyranopterin cofactor: an overview. *Met. Ions Biol. Syst.* **39**, 187 - 226.
- Igarashi K., Kashiwagi K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 559 - 564.
- Janes S.M., Mu D., Wemmer D., Smith A.J., Kaur S., Maltby D., Burlingame A.L., Klinman J.P. (1990) A new redox cofactor in eukaryotic enzymes: 6-hydroxydopa at the active site of bovine serum amine oxidase. *Science* **248**, 981 - 987.
- Jeon H.B., Lee Y., Qiao C., Huang H., Sayre L.M. (2003) Inhibition of bovine plasma amine oxidase by 1,4-diamino-2-butenes and -2-butyne. *Bioorg Med Chem* **11**, 4631 - 4641.
- Johnson, J. L.; Rajagopalan, K. V. (1977) Tryptic cleavage of rat liver sulfite oxidase. Isolation and characterization of molybdenum and heme domains. *J. Biol. Chem.* **252**, 2017 - 2025.
- Johnson J.L., Rajagopalan K.V. (1979) The oxidation of sulphite in animals systems. *Ciba Found. Symp.* **72**, 119 - 133.
- Johnson, J. L., Wuebbens M.M., Mandell R., Shih V.E. (1988) Molybdenum Cofactor Biosynthesis in Humans. Identification of Two Complementation Groups of Cofactor-deficient. Patients and Preliminary Characterization of a Diffusible Molybdopterin Precursor. *J. Clin. Invest.* **83**, 897 - 903.
- Jolivet P., Bergeron E., Meunier J.C. (1995) Evidence for sulphite oxidase activity in spinach leaves. *Phytochemistry* **40**, 667 - 672.
- Kaiser, G., Martinoia, E., Schroppelmeier, G., and Heber, U. (1989). Active-transport of sulfate into the vacuole of plant cells provides halotolerance and can detoxify SO₂. *J. Plant Physiol.* **133**, 756 - 763.
- Kappler U., Bailey S. (2005) Molecular basis of intramolecular electron transfer in sulfite-oxidizing enzymes is revealed by high resolution structure of a heterodimeric complex of the catalytic molybdopterin subunit and a c-type cytochrome subunit. *J Biol Chem* **280**, 24999 - 25007.
- Kappler U., Bennett B., Rethmeier J., Schwarz G., Deutzmann R., McEwan A.G., Dahl C. (2000) Sulfite : Cytochrome c oxidoreductase from *Thiobacillus novellus*. Purification, characterization, and molecular biology of a heterodimeric member of the sulfite oxidase family. *J. Biol. Chem.* **275**, 13202 - 13212.
- Karakas E, Kisker C (2005). Structural analysis of missense mutations causing isolated sulfite oxidase deficiency. *Dalton Trans* **21**, 3459–63.

- Kessler D.L., Rajagopalan K.V. (1972) Purification and properties of sulfite oxidase from chicken liver. Presence of molybdenum in sulfite oxidase from diverse sources. *J. Biol. Chem.* **247**, 6566 - 6573.
- Kipke C.A., Enemark J.H., Sunde R.A. (1989) Purification of prosthetically intact sulfite oxidase from chicken liver using a modified procedure. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 383 – 390.
- Kisker C., Schindelin H., Pacheco A., Wehbi W.A., Garrett R.M., Rajagopalan K.V., Enemark J.H., Rees D.C. (1997) Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* **91**, 973 - 983.
- Knodel L.C. (1997) Current Issues in Drug Toxicity; Potential health hazards of sulfites. *Toxic. Subst. Mech.* **16**, 309 - 311.
- Kumar A., Altabella T., Taylor M., Tiburcio A.F. (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci* **2**, 124 - 130.
- Kusano T., Yamaguchi K., Breberich T., Takahashi Y. (2007) The polyamine spermine rescues *Arabidopsis* from salinity and drought stresses. *Plant Signal Behav* **2**, 250 - 251.
- Kusano T., Breberich T., Tateda C., Takahashi Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**, 367 - 381.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 - 685.
- Lee S., Leustek T. (1998) APS kinase from *Arabidopsis Thaliana*, genomic organization, expression, and kinetic analysis of the recombinant enzyme. *Biochem Biophys Res Comm* **247**, 171 - 175.
- Lester M.R. (1995) Sulfite sensitivity: Significance in human health. *J. Am. Coll. Nutr.* **14**, 229 - 232.
- Leustek T., Saito K. (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.* **120**, 637 - 644.
- Li J., Doyle K.M., Tatlisumak T. (2007) Polyamines in the brain: distribution, biological interactions, and their potential therapeutic role in brain ischaemia. *Curr Med Chem* **14**, 1804 - 1813.
- Lillig C.H., Schiffmann S., Berndt C., Berken A., Tischka R., Schwenn J.D. (2001) Molecular and catalytic properties of *Arabidopsis Thaliana* adenylyl sulfate (APS)-kinase. *Arch Biochem Biophys* **392**, 303 - 310.
- Liu K., Fu H., Bei Q., Luan S. (2000) Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol* **124**, 1315 - 1326.

- Macholán L., Barthová J., Kučera I. (1983) *Enzymologie*, pp. 51-79, vydavatelství MU, Brno, ČR.
- Malmberg R.L., Watson M.B., Galloway G.L., Yu W. (1998) Molecular genetic analyses of plant polyamines. *Crit Rev Plant Sci* **17**, 199 - 224.
- Matto A.K., Sobolev A.P., Neelam A., Goyal R.K., Handa A.K., Segre A.L. (2006) Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolite profiling of transgenic tomato fruit engineered to accumulate spermidine and spermine reveals enhanced anabolic and nitrogen-carbon interactions. *Plant Physiol* **142**, 1759 - 1770.
- Medda R., Padiglia A., Floris G. (1995) Plant copper-amine oxidases *Phytochemistry* **39**, 1 - 9.
- Mehta R.A., Cassol T., Li N., Ali N., Handa A.K., Matto A.K. (2002) Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nat Biotechnol* **20**, 613 - 618.
- Nowak K., Luniak N., Witt C., Wustefeld Y., Wachter A., Mendel R., Hansch R. (2004) Peroxisomal localization of sulfite oxidase separates it from chloroplast-based sulfur assimilation. *Plant Cell Physiol* **45**, 1889 - 1894.
- Oshima T. (2007) Unique polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Amino Acids* **33**, 367 - 372.
- Pacheco A., Hazzard J.T., Tollin G., Enemark J.H. (1999) The pH dependence of intramolecular electron transfer rates in sulfite oxidase at high and low anion concentrations. *J Biol Inorg Chem* **4**, 390 - 401.
- Page C.C., Moser C.C., Chen X., Dutton P.L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**, 47 - 52.
- Papazian R. (1996) Sulfites: Safe for most, dangerous for some. *FDA Consumer Magazine* 30.
- Peč P., Frébort I. (1992) Some amines as inhibitors of pea diamine oxidase. *J. Enzym. Inhib.* **5**, 323 - 329.
- Reiss J., Christensen E., Dorche C. (1999) Molybdenum cofactor deficiency: First prenatal genetic analysis. *Prenatal Diagnosis* **19**, 386 - 388.
- Reiss J., Gross-Hardt S., Christensen E., Schmidt P., Mendel R.R., Schwarz G. (2001) A Mutation in the Gene for the Neurotransmitter Receptor-Clustering Protein Gephyrin Causes a Novel Form of Molybdenum Cofactor Deficiency. *Am.J.Hum.Genet.* **68**, 208 - 213.
- Rocha M.J., Rocha E., Resende A. D., Lobo-da-Cunha A. (2003) Measurement of peroxisomal enzyme activities in the liver of brown trout (*Salmo trutta*), using spectrophotometric methods *BMC Biochemistry* **4**, 1471-2091.

- Salman M.S., Ackerley C., Senger C., Becker L. (2002) New insights into the neuropathogenesis of molybdenum cofactor deficiency. *Canadian Journal of Neurological Sciences* **29**, 91 - 96.
- Sapers G.M. (1993) Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. *Food Technol.* **47**, 75 - 84.
- Saunders F.R., Wallace H.M. (2007) Polyamine metabolism and cancer prevention. *Biochem Soc Trans* **35**, 364 - 368.
- Schiffmann S., Schwenn J.D. (1994) APS-sulfotransferase activity is identical to higher plant APS-kinase (EC 2.7.1.25) *FEBS Lett.* **355**, 229 - 232.
- Schrader N., Fischer K., Theis K., Mendel R.R., Schwarz G., Kisker C. (2003) The Crystal Structure of Plant Sulfite Oxidase Provides Insights into Sulfite Oxidation in Plants and Animals. *Structure* **11**, 1251 - 1263.
- Seiler N. (1995) Polyamine oxidase, properties and functions. *Prog. Brain Res.* **106**, 333 - 344.
- Seiler N., Raul F. (2007) Polyamines and the intestinal tract. *Crit Rev Clin Lab Sci* **44**, 365 - 411.
- Shalata A., Mandel H., Dorche C., Zobot M. T., Shalev S., Hageirat Y., Arieh D., Ronit Z., Reiss J., Anbinder Y., Cohen N. (2000) Prenatal diagnosis and carrier detection for molybdenum cofactor deficiency type A in northern Israel using polymorphic DNA markers, *Prenat.Diagn.* **20**, 7 - 11.
- Shih V.E., Abroms I.F., Johnson J.L., Carney M., Mandell R., Robb R.M., Cloherty J.P., Rajagopalan K.V. (1977). Sulfite oxidase deficiency. Biochemical and clinical investigations of a hereditary metabolic disorder in sulfur metabolism. *N. Engl. J. Med.* **297**, 1022 - 1028.
- Sullivan E.P., Hazzard J. T., Tollin G., Enemark J. H. (1993) Electron Transfer in Sulfite Oxidase: Effects of pH and Anions on Transient Kinetics. *Biochemistry* **32**, 12465 - 12470.
- Smith T.A., Croker J.S., Loeffler R.S.T. (1986) Occurrence in higher plants of 1-(3-aminopropyl)pyrrolinium and pyrroline: products of polyamine oxidation *Phytochemistry* **25**, 683 - 689.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., F. H. Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Stránská J., Šebela M., Tarkowski P., Řehulka P., Chmelík J., Popa I., Peč P. (2007) Inhibition of plant amine oxidases by a novel series of diamine derivatives. *Biochimie* **89**, 135 - 144.

- Strolin Benedeti M. (2001) Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases. *Fundam Clin Pharmacol* **15**, 75 - 84.
- Svitel J., Stredansky M., Pizzariello, Miertus S. (1998) Composite biosensor for sulfite assay: Use of water-insoluble hexacyanoferrate(III) salts as electron-transfer mediators. *Electroanalysis* **10**, 591-596.
- Šebela M., Frébort I., Peč P. (1998) Nové poznatky o kofaktorech Cu-aminoxidas jako příspěvek k biochemii proteinů. *Chem. Listy* **92**, 698 - 710.
- Šebela M., Lamplot Z., Petřivalský M., Kopečný D., Lemr K., Frébort I., Peč P. (2003) Recent news related to substrates and inhibitors of plant amine oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1647**, 355 – 360.
- Šebela M., Luhová L., Frébort I., Hirota S., Faulhammer H.G., Stučka V., Peč P. (1997) Confirmation of the presence of a Cu(II)/topa quinone active site in the amine oxidase from fenugreek seedlings. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1897-1907.
- Šebela M., Radová A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001) FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**, 197 – 207.
- Šebela M., Tylichová M., Peč P. (2007) Inhibition of diamine oxidases and polyamine oxidases by diamine-based compounds. *J. Neural. Transm.* **114**, 793 - 798.
- Tabor C.W., Tabor H. (1984) Polyamines. *Annual Review of Biochemistry* **53**, 749 - 790.
- Tan W.H., Eichler F.S., Hoda S., Lee M.S., Baris H., Hanley C.A., Grant P.E., Krishnamoorthy K.S., Shih V.E. (2005) Isolated sulfite oxidase deficiency: a case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics* **116**, 757 - 766.
- Taylor S.L., Higley N.A., Bush R.K. (1986) Sulfites in foods: Uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Adv. Food Res.* **30**, 1 - 76.
- Thomas T., Thomas T.J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* **58**, 244 - 258.
- Thomas T., Thomas T.J. (2003) Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med* **7**, 113 - 126.
- Umekage S., Ueda T. (2006) Spermidine inhibits transient and stable ribosome subunit dissociation. *FEBS Lett* **580**, 1222 - 1226.
- van Leeuwenhoek A. (1678) Observationes D. Anthonii Leeuwenhoek, de natis e semine genitali animalculis. *Philos Trans R Soc Lond* **12**, 1040 - 1043.

Walden R., Cordeiro A., Tiburcio A.F. (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in growth and development. *Plant Physiol* **113**, 1009 - 1013.

Walters D.R. (2003) Polyamines and plant disease *Phytochemistry* **64**, 97 - 107.

Woo W.H., Yang H., Wong K.P., Halliwell B. (2003) Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 619 - 623.

Další použité prameny:

<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92107>

http://ekologie.uhk.cz/page.aspx?page_id=38&mode=1&letter=12

<http://www.starch.dk/isi/methods/20so2.htm>

<http://kimblechase.thomasnet-navigator.com/item/ms-sulfites-distillation-apparatus-component-par-2/monier-williams-sulfites-distillation-apparatus-2/513800-0000>

http://en.wikipedia.org/wiki/Sulfite_oxidase

http://cbc.arizona.edu/faculty_profile/enem/new/images/sulfite-oxidase-active-site-500w.jpg

<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3K5T>

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|----------|---|
| 4-AAF | 4-aminofenazon |
| ADC | arginin dekarboxylasa |
| AdoMetDC | adenosylmethionin dekarboxylasa |
| APS | persíran amonný |
| BCA | kyselina bicinchoninová |
| BSA | hovězí sérový albumin |
| CAO | aminoxidasa obsahující měď |
| DEAE | diethylaminoethyl |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| FAD | flavin-adenin dinukleotid |
| FDA | Food and Drug Administration |
| MEHA | 3-methyl- <i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(β -hydroxyethyl)anilin |
| MES | 2-(<i>N</i> -morpholino)ethansulfonová kyselina |
| Moco | molybdenový kofaktor |
| MOPS | 3-(<i>N</i> -morpholino)propansulfonová kyselina |
| ODC | ornithindekarboxylasa |
| PAO | polyaminoxidasa |
| PSAO | hrachová aminoxidasa |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| SDH | sulfitdehydrogenasa |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného |
| SUOD | sulfitoxidasa |