



**UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**OXIDASOVÁ AKTIVITA DIAFORASY A  
LIPOAMIDDEHYDROGENASY**

**Bakalářská práce**

**Jaromír Zahrádka**

Školitel: Prof.RNDr. Gustav Entlicher, CSc.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Gustava Entlichera, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne, 1.6. 2006

*Jaromír Zahradka*

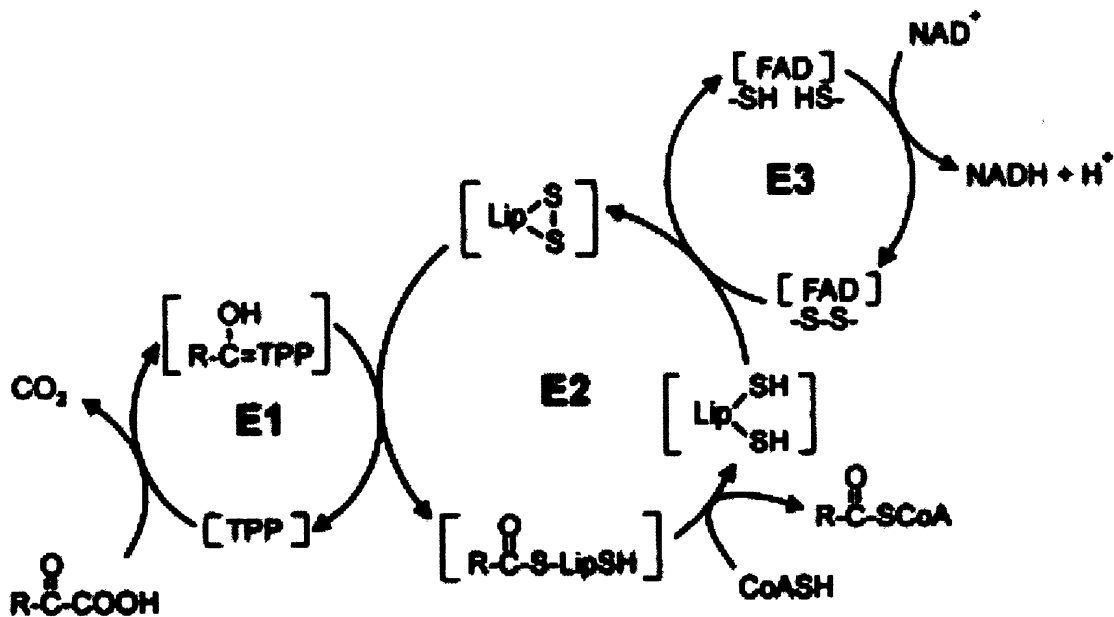
Rád bych poděkoval svému školiteli, Prof. RNDr. Gustavu Entlicherovi, CSc., za výběr a zadání vhodného a zajímavého tématu bakalářské práce, za jeho vlídný a trpělivý přístup, a také za čas, jež věnoval mně a mé práci. Dále bych rád poděkoval paní laborantce Marcele Špundové, která se vždy obětavě starala o technické zázemí experimentální části mé práce.

<b>Obsah:</b>	<b>strana:</b>
<b>1. Teoretický úvod</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Dihydrolipoyldehydrogenasa (EC 1.8.1.4 )</b>	<b>5</b>
<b>1.2. DP z <i>Clostridium kluyverri</i></b>	<b>7</b>
<b>1.3. LAD izolovaná z prasečího srdce</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Superoxidový anion-radikál</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Leukocyty jako hlavní producent 'O<sub>2</sub>'</b>	<b>8</b>
<b>1.6. Fysiologický význam 'O<sub>2</sub>'</b>	<b>9</b>
<b>1.7. Eliminace 'O<sub>2</sub>' v organismu</b>	<b>11</b>
<b>1.8. Oxid dusnatý v organismu</b>	<b>11</b>
<b>1.9. Význam DP, LAD a 'O<sub>2</sub>' pro vznik 'NO</b>	<b>13</b>
<b>1.10. NAD(P)H-oxidasová aktivita DP a LAD</b>	<b>14</b>
<b>1.11. Možnosti měření 'O<sub>2</sub>'</b>	<b>16</b>
<b>2. Cíl práce</b>	<b>18</b>
<b>3. Materiály a přístroje</b>	<b>19</b>
<b>4. Použité metody</b>	<b>20</b>
<b>5. Výsledky</b>	<b>22</b>
<b>6. Diskuse</b>	<b>30</b>
<b>7. Závěr</b>	<b>32</b>
<b>8. Použitá literatura</b>	<b>33</b>
<b>9. Seznam použitých zkratk</b>	<b>36</b>

## 1. Teoretický úvod

### 1.1. Dihydrolipoyldehydrogenasa (EC 1.8.1.4) [12,14,19]

Diaforasa(DP) a lipoamiddehydrogenasa(LAD) je označení pro fyziologicky velice významný enzym, který lze v databázi enzymů nalézt pod kódem EC 1.8.1.4 a názvem dihydrolipoyldehydrogenasa (DLD) = ( $E_3$ ). Enzym je jednou ze složek multienzymového komplexu pyruvátdekarboxylasy (PDC) společně s pyruvátdehydrogenasou (PDH) = ( $E_1$ ) a dihydrolipoyltransacetylase (DLTA) = ( $E_2$ ). Tento enzymový komplex hraje velice významnou roli v energetickém metabolismu, jelikož katalyzuje přeměnu pyruvátu na acetylkoenzym A, (Obr.1.) (reakce 13,14). Význam vzniku velkého enzymatického komplexu je právě v jeho struktuře, která obsahuje 24 jednotek PDH, 24 jednotek DLTA a 12 jednotek DLD ve vhodném kubickém uspořádání, to způsobuje, že přeměna pyruvátu zde probíhá mnohem rychleji než, kdyby tyto enzymy byly v roztoku odděleně, protože si navzájem přímo předávají substrát. To také minimalizuje průběh vedlejších reakcí.



Obr. 1.: Schématické znázornění reakcí probíhajících při přeměně pyruvátu na acetyl-CoA pomocí pyruvátdekarboxylasového komplexu (PDC).

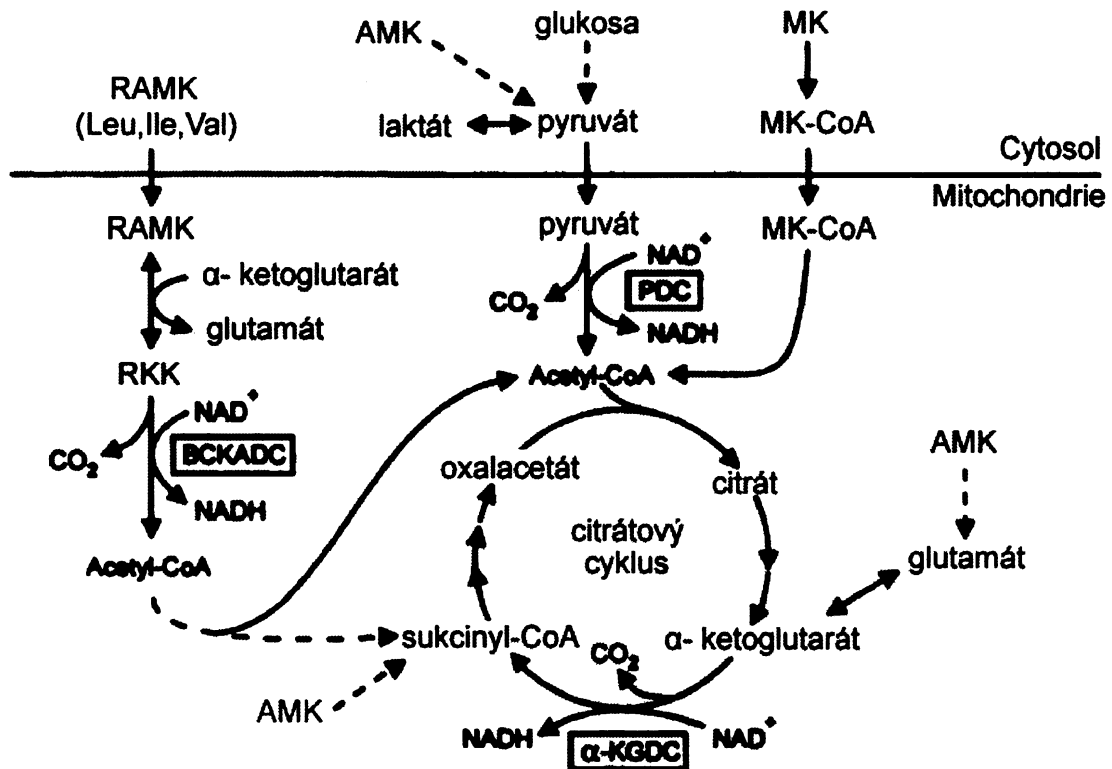
$E_1$  = pyruvátdehydrogenasa,  $E_2$  = dihydrolipoyltransacetylasa,

$E_3$  = Dihydrolipoyldehydrogenasa = DLD, TPP = thiaminpyrofosfát,

Lip. = kyselina lipoová, obrázek převzat z cit.[15]

DLD se vyskytuje také i v dalších významných enzymových komplexech jako jsou  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenasový komplex ( $\alpha$ -KGDC) a dehydrogenasový komplex

rozvětvených  $\alpha$ -ketokyselin (BCKADC = branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex)(Obr.2.). Všechny tyto mitochondriální komplexy lze označit jako multienzymový komplex dehydrogenas 2-oxokyselin. Strukturou i velikostí se enzym DLD může u jednotlivých organismů lišit. Obecně lze říci, že se jedná o flavoprotein vyskytující se nejčastěji jako homodimer, kromě pevně vázaného flavinového kofaktoru jsou zde také dvě pevně vázané -SH skupiny schopné tvořit společně disulfidový můstek.[14,19]



Obr.2.: Umístění multienzymových komplexů dehydrogenas 2-oxokyselin v buňce a jejich funkce v metabolických dějích. PDC = komplex pyruvátdekarboxylasy, BCKADC = dehydrogenasový komplex rozvětvených  $\alpha$ -ketokyselin,  $\alpha$ -KGDC =  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenasový komplex, AMK = aminokyseliny, RAMK = rozvětvené aminokyseliny, RKK = rozvětvené ketokyseliny, MK = mastné kyseliny (upraveno z [15]).

DLD se řadí mezi oxidasy, označení diaforasa (DP) a lipoamiddehydrogenasa (LAD) pro daný enzym se podle katalogu SIGMA liší podle svého původu. Komerčně dodávaný enzym pod názvem diaforasa je získáván z *Clostridium kluyverri* (C.k.), zatímco enzym pod názvem lipoamiddehydrogenasa je získávána z prasečího srdce. Obecně lze říci, že označení diaforasa je volně přiřazováno skupině enzymům, která katalyzuje přenos elektronů z donoru (např. NADH) na akceptor jakým je například methylenová modř [17].

Enzym DLD byl popsán F.B. Straubem v roce 1939 [12], ten zkoumal formu izolovanou z prasečího srdce, která byla NADH specifická a vykazovala i lipoamiddehydrogenasovou aktivitu. K poznatkům o tomto enzymu přispěl V. Massey [12] domněnkou, že DP je nejspíš denaturovaná forma LAD. V souladu s tímto tvrzením je pozorované snížení lipoamiddehydrogenasové aktivity a zvýšení NADH-diaforasové aktivity, jež následuje po inkubaci tohoto enzymu v prostředí  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Tento efekt byl pozorován pouze u enzymu izolovaného z prasečího srdce, u formy pocházející z *C.k.* a kvasinkových forem byl neznatelný. Poměr lipoamiddehydrogenasové a diaforasové aktivity dnes může sloužit k vyjádření míry denaturace tohoto enzymu.

### 1.2. DP z *Clostridium kluyverri* (*C.k.*) [8]

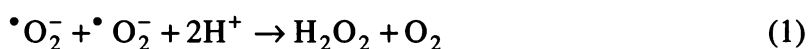
Tento enzym patří mezi diaforasy, pro svou schopnost přenášet elektrony na různé akceptory. Jak bylo řečeno, je i DP z *C.k.* flavoprotein, tudíž obsahuje pevně vázaný flavinový kofaktor, to lze odtušit již ze žlutého zabarvení krystalu tohoto enzymu. Na rozdíl od LAD z prasečího srdce obsahuje však FMN a ne FAD. Tato skutečnost může hrát velice významnou roli při vzájemném porovnávání DP a LAD. Relativní molekulová hmotnost tohoto enzymu byla naměřena jako 24 kDa a každý mol obsahuje právě jeden mol FMN [8]. Podle Kaplana a spol.[8] není pro funkci tohoto enzymu nutný žádný iont kovu jako kofaktor. Na rozdíl od jiných NAD(P)H specifických enzymů, nebyl pozorován výrazný rozdíl v aktivitě při použití NADPH místo NADH. Také bylo prokázáno, že zvýšená koncentrace volných molekul FMN, NADH či NADPH v roztoku DP pomáhají zvýšit odolnost tohoto enzymu proti denaturaci jak chemické (močovina), tak fyzikální (teplota), zatímco FAD, NAD(P)<sup>+</sup> a na denaturaci nemají vliv.

### 1.3. LAD izolovaná z prasečího srdce [15, 19]

LAD z prasečího srdce patří mezi typické DLD eukaryotických organismů. Vyskytuje se ve formě homodimerního FAD-flavoproteinu a relativní molekulová hmotnost jedné podjednotky byla stanovena na 55 kDa. Jak bylo řečeno, je součástí různých multienzymových komplexů a bývá také označován  $E_3$ . Na rozdíl od variací ostatních enzymů různých komplexů je enzym DLD téměř stejný pro všechny tyto komplexy téhož organismu ale i různých eukaryot.[15,19] (Obr. 6.)

#### 1.4. Superoxidový anion-radikál ( $\text{O}_2^-$ ) [1, 2, 7]

Superoxidový anion-radikál ( $\text{O}_2^-$ ) je poměrně reaktivní částicí, která vzniká při redukci kyslíku pouhým jedním elektronem. [7] Radikál  $\text{O}_2^-$  vzniká velice snadno díky spinovým vlastnostem molekuly kyslíku, je známo mnoho příkladů samovolného i enzymového vzniku  $\text{O}_2^-$ . Transport tohoto iontu přes membrány probíhá díky svému náboji pouze prostřednictvím iontových kanálů. Za fyziologického pH se  $\text{O}_2^-$  samovolně přeměňuje na mnohem reaktivnější peroxid vodíku (reakce 1), který může volně difundovat přes membrány, ale má mnohem menší dosah účinku. [1, 2]



V organismech je tvořeno obrovské množství  $\text{O}_2^-$  (asi 10 kg na dospělého člověka za rok) [4] a existuje mnoho regulačních systémů jeho vzniku. Tento radikál se tvoří také během enzymatického aerobního metabolismu a jeho vznik je katalyzován např. xanthinoxidasou, cytochromem c, nebo také NO-synthasou a dalšími enzymy řadícími se do rodiny cytochromů P450. Bylo zjištěno, že celá 2% redukce kyslíku normálních buněk probíhá univalentním mechanismem. Majoritním producentem  $\text{O}_2^-$  jsou membránové NADH-oxidasy fagocytujících buněk. [1]

#### 1.5. Leukocyty jako hlavní producent $\text{O}_2^-$ [1, 2, 23]

Jak bylo řečeno, hlavním producentem  $\text{O}_2^-$  se ukázaly být neutrofilny [10] a další fagocytcké buňky (např. makrofágy), které byly předtím vystaveny působení některého z mnoha možných aktivačních faktorů. Výsledkem této interakce je aktivace NAD(P)H-dependentních oxidas v membránách těchto buněk. To vede k sekreci velkého množství  $\text{O}_2^-$  do vznikajícího fagosomu na úkor spotřeby intracelulárního NAD(P)H a zvýšené spotřeby kyslíku, tzv. respirační vzplanutí (respiratory burst) [10]. Tato sekrece má mnoho společného s produkcí oxidu dusnatého ( $\text{NO}$ ) pomocí iNOS (viz. [1]). Regulace vzniku  $\text{NO}$  a  $\text{O}_2^-$  je nezávislá, v buňkách pak dochází k reakci těchto dvou radikálů za vzniku ONOO $\cdot$  a následně vzniku vysoce toxického  $\cdot\text{OH}$ . Poměr produkovaných reaktivních forem kyslíku (ROS = reactive oxygen species) ku  $\text{NO}$  (ROS : NO) je velice důležitý pro správné zrání a funkci fagocytujících buněk, jako účinné bariéry imunitního systému. [1,2] Celkové působení  $\text{O}_2^-$  v organismu závisí na koncentraci v které je produkován, podobně

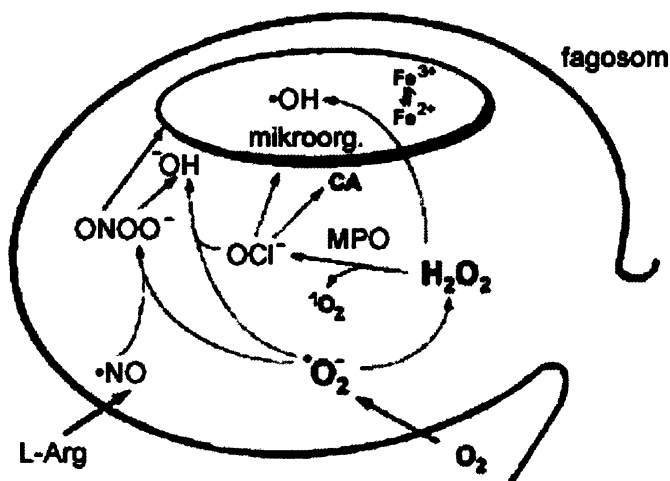


jako pro  $\cdot\text{NO}$  platí i zde, že zvýšená i snížená produkce je známkou nerovnováhy a může způsobit vážné narušení funkce, či poškození buněk.

## 1.6. Fysiologický význam $\cdot\text{O}_2$ [1-4, 7, 23]

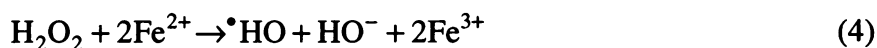
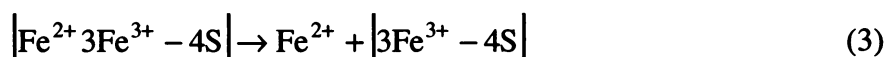
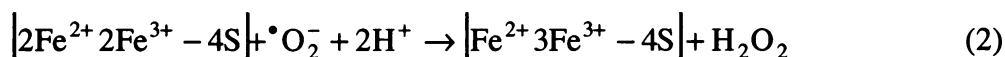
Analogii pro konstitutivní NOS (viz dále) v buňkách jsou pro tvorbu  $\cdot\text{O}_2$  v nefagocytujících buňkách zvláštní typy NAD(P)H-oxidasy, které produkují mnohem menší množství  $\cdot\text{O}_2$ . Funkce těchto oxidas souvisí s intracelulární a extracelulární regulací buněčných pochodů. Obdobně k  $\cdot\text{NO}$  je i efekt způsobený  $\cdot\text{O}_2$  závislý na koncentraci tohoto radikálu, která výrazně ovlivňuje životní funkce buňky. Jak bylo zmíněno, v těle se vyskytují i další enzymy schopné produkovat menší množství ROS (xanthinoxidasa, cytochromy P450, ...). Narušení mechanismů regulace vzniku ROS se může projevit jako zvýšení oxidačního stresu organismu, to je první příznak infekce či narušení rovnováhy v organismu [1].

Ačkoli je  $\cdot\text{O}_2$  značně reaktivní částice, vzhledem k ostatním reaktivním formám kyslíku (ROS) je mnohem stálejší. Nejvýraznějším efektem  $\cdot\text{O}_2$  v organismu je toxicita. Přímá toxicita samotného  $\cdot\text{O}_2$  se projevuje pouze inaktivací některých enzymů, které obsahují [4Fe-4S] klastry (akonitasa, 6-fosfoglukonátdehydratasa, ferritin, ...),  $\cdot\text{O}_2$  zde uvolňuje železnaté ionty (reakce 2,3). Hlavní účinek z hlediska cytotoxicity je spíše nepřímý, prostřednictvím Haberovy-Weissovy reakce (reakce 4,5) za přítomnosti katalyticky aktivního železa, či reakce s  $\cdot\text{NO}$  (reakce 6) a s jinými radikály či ionty.[1-4] Výsledkem těchto, ale i dalších reakcí a přeměn  $\cdot\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  je vznik mnohem toxičtějších molekul, kterými jsou hydroxylový radikál ( $\cdot\text{HO}$ ), hypohalové kyseliny (HOX) vznikající za působení myeloperoxidasy (MPO) (reakce 9) (obr. 3.). [10], či peroxynitritový anion ( $\text{ONOO}^-$ ) vznikající reakcí  $\cdot\text{OH}$  a  $\cdot\text{NO}$  (reakce 6). Pro  $\text{ONOO}^-$  platí, že toxická je pouze konformace trans- $\text{ONOO}^-$  [1], ta manifestuje svou toxicitu opět pomocí přeměny na  $\cdot\text{HO}$  (reakce 7 a 8), tentokrát bez nutnosti přítomnosti železa (viz. obr. 4.). Tyto vysoce nestabilní látky způsobují oxidaci velkého množství biomolekul, včetně DNA, proteinů a lipidů. Také mohou působit na cizorodé látky v organismu, které mohou přeměňovat na další vysoce toxické látky.



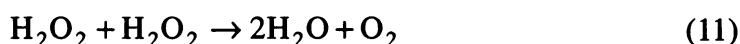
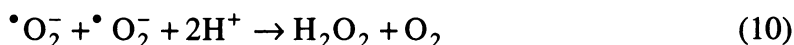
Obr.3.: Přehled reakcí ve fagosomu vedoucích k oxidačnímu zabíjení mikroorganismů. Výsledkem všech cest je toxický •OH radikál. MPO = myeloperoxidasa, CA = chloraminy. (převzato z [2])

V souhrnu působí tyto volné radikály (ve vyšších koncentracích) jako mutageny, onkogeny, inhibitory významných enzymů, a zapříčiňují patologické změny v integritě membrán. •O<sub>2</sub><sup>-</sup> zde působí jako substrát pro vznik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ačkoli tento může vznikat také enzymatickou cestou přímo), ale jeho hlavním toxickým efektem je regenerace železitých iontů (reakce 5). K tomuto přispívá také již zmíněné působení •O<sub>2</sub><sup>-</sup> na [4Fe-4S] klastry některých proteinů, z nichž jsou uvolňovány železnaté ionty (reakce 3), čím se zvyšuje množství železa použitelného v reakcích při vzniku toxického •OH. [1-3, 7]



## 1.7. Eliminace $\cdot\text{O}_2^-$ v organismu, [1]

Vzhledem k mechanismu toxického účinku  $\cdot\text{O}_2^-$  se u buněk objevilo mnoho velice komplikovaných systémů, pro zmírnění dopadů produkce  $\cdot\text{O}_2^-$ , ve skutečnosti vzniká tento radikál ve všech buňkách obdobně jako  $\cdot\text{NO}$ . Toxicita je zde regulována společným působením několika enzymů. Superoxiddismutasa (SOD) přeměňuje  $\cdot\text{O}_2^-$  na peroxid vodíku (reakce 10), ten je dále přeměněn katalasou (reakce 11) nebo peroxidasou (reakce 12) na netoxické produkty, nebo za určitých okolností dochází ke vzniku netoxické cis-formy ONOO $^-$  reakcí s  $\cdot\text{NO}$ .

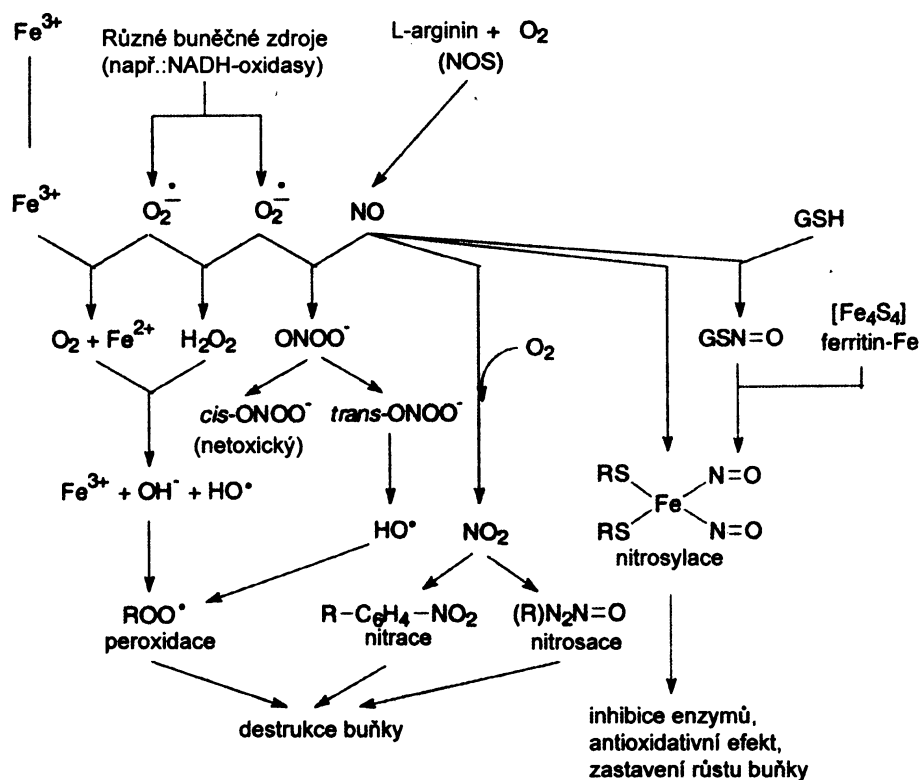


Odstraněním  $\cdot\text{O}_2^-$  se zabraňuje cyklické redukci železitých iontů a nedochází tedy ke vzniku hydroxidového radikálu. Jsou známy i další strategie používané především mikroorganismy jako obrana proti vysoké koncentraci  $\cdot\text{O}_2^-$  ve fagosomu během fagocytózy. Tyto buněčné mechanismy mikroorganismů produkují velké množství látek, které vycytávají volné radikály, ale také produkují velké množství toxických látek, aby zabily hostitele dříve než on je, nebo produkují inhibitory oxidas hostitele.

## 1.8. $\cdot\text{NO}$ v organismu [1, 9]

Ačkoli je  $\cdot\text{NO}$  v plynném stavu velice nestabilní, dráždivý plyn, je jeho fyziologický význam v živých organismech obrovský. Je považován za klíčovou molekulu při vasodilataci a kontrole krevního tlaku, ale je také mimo jiné regulačním agens při imunitních obraných reakcích, apoptóze, nádorovém bujení, hraje významnou úlohu v centrální i periferní nervové soustavě a jeho koncentrace je velice důležitá i pro správnou činnost reprodukčních orgánů. Je to právě koncentrace  $\cdot\text{NO}$  která musí být v dokonalé rovnováze, aby docházelo k pozitivnímu účinku a neprojevovali se toxické účinky tohoto radikálu tam kde to není zapotřebí. Toxicita  $\cdot\text{NO}$  se projevuje jak již bylo zmíněno právě reakcí s  $\cdot\text{O}_2^-$ , nebo podobně jako u  $\cdot\text{O}_2^-$  dohází po působení  $\cdot\text{NO}$  k deaktivaci, či inhibici určitých enzymů.

V organismu existuje několik základních zdrojů tohoto plynu. V první řadě jsou hlavní producenti NO: NO-synthasy (NOS). Tyto oxidasy katalyzují dvě následné monooxidační reakce, za vzniku NO a L-citrulinu (s meziproduktem N<sup>G</sup>-hydroxy-L-argininem = OH-L-Arg) (obr. 5). Výchozím substrátem je přitom L-arginin a NADH. Pro první reakci je NOS považována za jediný enzym schopný katalyzovat tuto reakci, zatímco druhá reakce může probíhat i bez přítomnosti NOS (viz.dále). NOS dělíme podle způsobu regulace, umístění a množství produkovaného NO na indukibilní a konstitutivní. Konstitutivní jsou řízeny Ca<sup>2+</sup> / kalmodulinovým systémem a produkují mnohem menší koncentrace oxidu dusnatého. Tyto enzymy (eNOS) lze označit jako tzv. „house keeping“ enzymy, které šetrně regulují např. zmíněné roztahování hladkého svalstva cév a tím právě i krevní tlak. Inducibilní NOS (iNOS) se liší transkripční úrovní regulace svého vzniku, impulzem pro vznik NO jsou zde cytokiny, lipopolisacharidy, či jiné látky a následně jsou iNOS syntetizovány de novo. Tím vzniká mnohem větší množství NO nezávisle na koncentraci intracelulárního vápníku. Zde se využívá toxicity tohoto radikálu k zabíjení patogenních buněk v organismu, přispívá k tomu i již zmíněná reakce s O<sub>2</sub><sup>-•</sup>. Na obrázku 4. (obr.4.) je možné vidět schéma některých reakcí O<sub>2</sub><sup>-•</sup> a NO v organismu, které jsou důležité pro manifestaci efektu těchto dvou reaktivních molekul.



Obr.4.: Schematické znázornění možných interakcí mezi supeoxidovým anionem (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>), oxidem dusnatým (NO), thioley (GSH) a železitými ionty v organismu. (převzato a upraveno z [1])

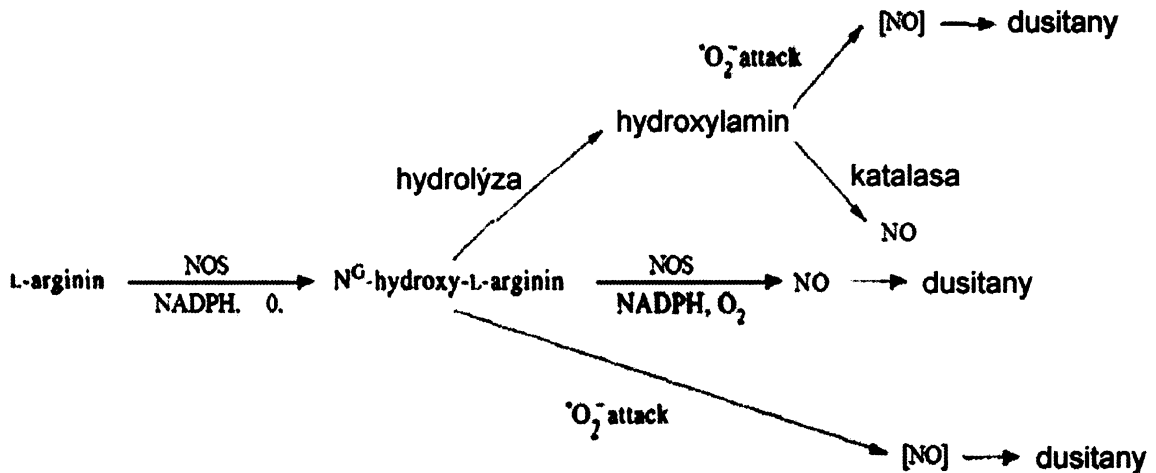
Při disbalanci těchto složitých regulačních systému v organismu dochází často k velice závažným onemocněním, jsou proto tedy zkoumány možnosti umělého dodávání  $\text{NO}$  do organismu. Jedná se o tzv. alternativní cesty vzniku  $\text{NO}$ . Donorem je zde dusíkatá látka, která působením určitých enzymů, či neenzymaticky uvolňuje  $\text{NO}$ .

### 1.9. Význam DP, LAD a $\text{O}_2^-$ pro vznik $\text{NO}$ [9], [20]

Oba tyto enzymy (DP z *C.k.* i LAD z prasečího srdce) jsou studovány jako možné participující enzymy při vzniku oxidu dusnatého z některých látek způsobujících vasodilataci [20]. V přítomnosti NAD(P)H je diaforasa schopna katalyzovat přeměnu některých donorů  $\text{NO}$  (glyceroltrinitrát GTN, formaldoxim FAL) za vzniku dusitanů a dusičnanů s  $\text{NO}$  jako meziproductem. Tato aktivita je inhibována difenyleniodoniem (DPI) - typickým inhibitorem pro NADPH-dependentní flavoproteinové oxidoreduktasy. Zatímco tradiční inhibitor  $\text{NO}$ -synthas  $\text{N}^G$ -nitro-L-argininmethylester na tento enzym nemá žádný vliv. Tvzení, že  $\text{NO}$  se zde opravdu tvoří jako meziproduct, je podpořeno výsledky měření EPR spektroskopie. Důležitá je také schopnost diaforasy redukovat 2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (PTIO), a tak eliminovat schopnost této látky eliminovat molekuly  $\text{NO}$ . Tato aktivita diaforasy je opět inhibována DPI. Přidání enzymu superoxidodismutázy (SOD) do reakční směsi se aktivita diaforasy v přítomnosti FAL a NADH výrazně snížila. Příčinou tohoto efektu může být právě oxidasová aktivita diaforasy, při které by se spotřeboval NADH při tvorbě  $\text{O}_2^-$ . SOD by zde svou aktivitou výrazně posouvala chemickou rovnováhu ve prospěch tvorby tohoto anion-radikálu. (viz.[20])

Jak již bylo řečeno druhá z oxidačních reakcí NOS může probíhat také bez přítomnosti tohoto enzymu, objevují se hypotézy, které předpokládají vznik  $\text{NO}$  vlivem působení  $\text{O}_2^-$  na OH-L-Arg, meziproduct při běžném vzniku  $\text{NO}$  z L-argininu.[9]  $\text{O}_2^-$  zde přímo atakuje tento meziproduct, či jeho derivát hydroxylamin, který by mohl vznikat hydrolyzou OH-L-Arg, a dochází ke vzniku  $\text{NO}$  neenzymatickou cestou.(obr.5.) Pravdivost tohoto tvrzení podporují výsledky, podle kterých vznikají jako konečné produkty L-citrulin a  $\text{NO}_x$  (dusitany), typické konečné produkty syntézy  $\text{NO}$ , ačkoli zatím nebyl prokázán vznik oxidu dusnatého jako přímého produktu reakce. Tento mechanismus slouží nejspíše ke zvyšování produkce  $\text{NO}$  a dalších reaktivních částic (viz. výše) při

infekci, protože endotoxiny a další zánětlivé faktory iniciují vznik OH-L-Arg a zároveň  $\cdot\text{O}_2^-$ . Výsledkem je pak navýšení koncentrace a tím i účinku NO například při zabíjení patogenních bakterií.

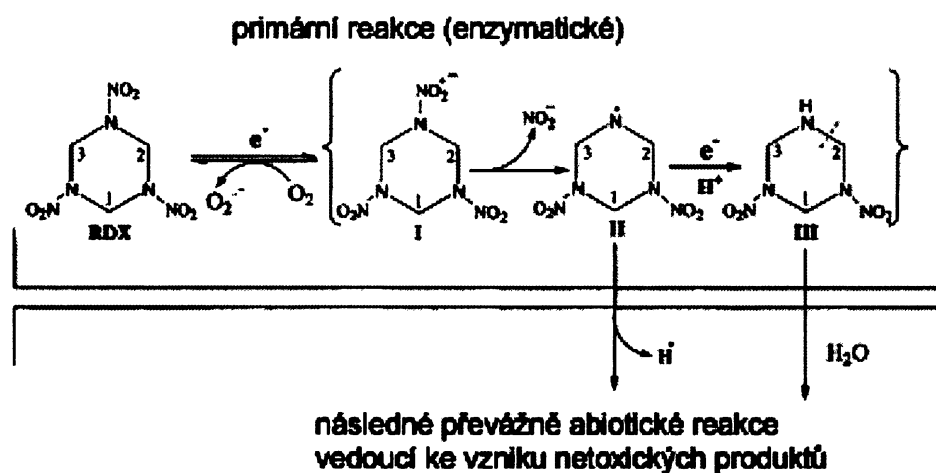


Obr.5.: Porovnání klasické cesty vzniku NO z L-argininu a předpokládaných alternativních cest zahrnujících přímou přeměnu OH-L-Arg pomocí superoxidu i hydrolyzu OH-L-Arg na hydroxylamin a následnou přeměnu na NO prostřednictvím Katalasy nebo neenzymaticky po reakci se superoxidem. (převzato a upraveno z [9])

#### 1.10. NAD(P)H-oxidase aktivita DP a LAD [4-5, 11, 16, 18]

Jedná se o oxidačně redukční reakci, dochází k přenosu elektronu z donoru (zde NAD(P)H) na kyslík. Tato aktivita je pozorována nejen u hlavních produkčních enzymů  $\cdot\text{O}_2^-$  (membránovými NADH-oxidasami) [5], ale také u spousty dalších enzymů, kde hraje spíše roli vedlejší reakce pro vyrovnání poměru NADH/NAD<sup>+</sup>, či po zablokování hlavní reakce. Průvodním znakem této aktivity je její nárůst po přidání SOD, či při inhibici hlavní reakce za dostatečného přísunu redukčních potenciálů. Dalším důkazem této aktivity je uvolňování železa z [4Fe-4S] klastrů enzymů v přítomnosti daného enzymu.[11], jak již bylo řečeno, je to spojené právě se vznikem  $\cdot\text{O}_2^-$ . Tato aktivita byla pozorována a popsána u LAD, ale u DP se zdroje zásadně liší. Ačkoli autoři Sarker a spol. [18] mluví ve své práci o využití oxidase aktivity DP z *C.k.* jako alternativním enzymovém stanovení substrátů dehydrogenas. Dochází zde ke stanovení vznikajícího  $\cdot\text{O}_2^-$  jeho reakcí s WST-1 = (4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonát sodný) za vzniku WST-1-formazanu se změnou v absorbanci při 438

nm. Možnost přímého enzymatického vzniku  $\cdot\text{O}_2^-$  prostřednictvím DP z *C.k.* však zásadně popírá práce autorů Bhushana a spol.[6]. Tito autoři se zabývají možností biologického odbourávání toxického RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin) pomocí DP z *C.k.* Zde byla pozorována silná inhibice tohoto procesu za aerobních podmínek přičítaná právě vzniku  $\cdot\text{O}_2^-$ . Byla zde ale navržena hypotéza nepřímé cesty vzniku  $\cdot\text{O}_2^-$ . Podle autorů vzdušný kyslík zpětně deaktivuje aktivovaný  $\cdot\text{RDX}^-$  tím, že z této částice odčerpává elektrony za vzniku  $\cdot\text{O}_2^-$ . Následně pak nemůže docházet k biotransformaci.(obr. 6). Toto pozorování je ve shodě s tvrzením Kaplana a spol.[8], že přečištěná (chromatografie na Sephadexu) komerčně dodávaná DP z *C.k.* není schopná transportovat elektron z NADH/NADPH na vzdušný kyslík. Podle těchto autorů probíhá tento proces pouze v přítomnost volného FMN, které je v komerčním preparátu DP z *C.k.* přítomen, protože zvyšuje stabilitu tohoto enzymu (viz.výše). Mechanismus vzniku  $\cdot\text{O}_2^-$  je nejspíše obdobný jako při inhibici transformace RDX, takže bude vznikat prostřednictvím volného FMN. Podle těchto poznatků by tedy neměla existovat enzymatická závislost rychlosti vzniku  $\cdot\text{O}_2^-$  na koncentraci substrátu, tedy NADH. Toto tvrzení by mělo snadno potvrdit měření oxidasové aktivity DP po dialýze, protože dialýzou by se mělo odstranit volné FAD.

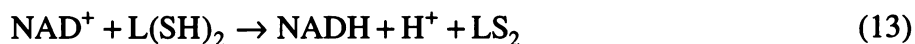


**Obr.6.: Předpokládaný mechanismus inhibice biotransformace RDX pomocí vzdušného kyslíku. Vzdušný kyslík odebírá elektron aktivované částici, tím brání dalším degradačním reakcím. (převzato a upraveno z [4])**

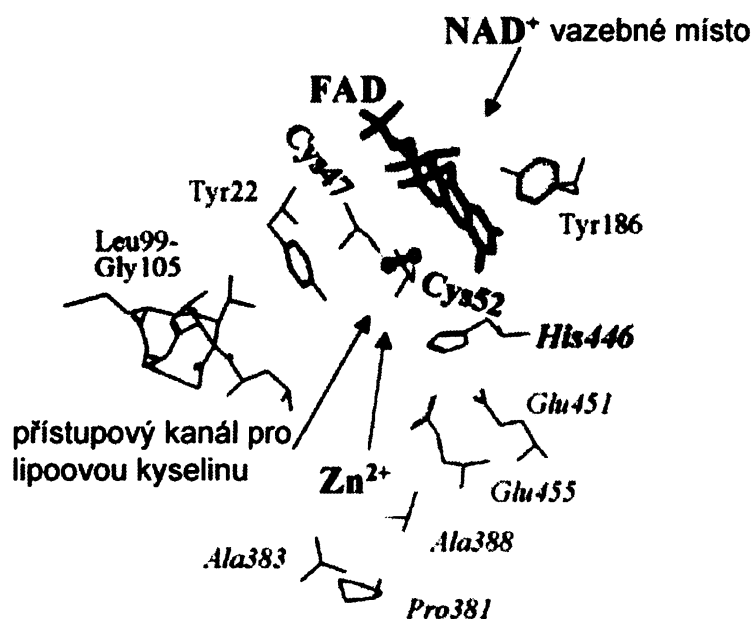
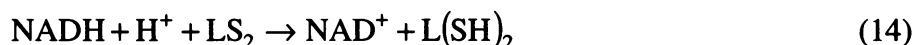
Pro LAD byla NAD(P)H-oxidasová aktivita prokázána i bez přítomnosti dalších látek [16,22], tato aktivita je zde brána jako postraní reakce, která je značně urychlována v případě inhibice hlavní (reakce 13) i zpětné (reakce 14). Tuto inhibici zapříčiňují například zinečnaté ionty, které vstupují do hydrofobního kanálu, kterým přichází kyselina

lipoová do aktivního centra. Jak již bylo řečeno, aktivní LAD je homodimer a kanál pro přístup kys. lipoové je tvořen aminokyselinami obou monomerů. (obr. 7) [16] ( $L(SH)_2$  = reduk. forma kys. lipoové,  $LS_2$  = oxid. forma kys. lipoové)

Hlavní reakce LAD:



Zpětná reakce LAD:



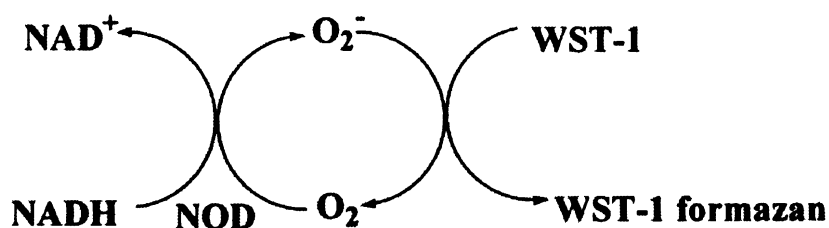
Obr.7.: Schématické znázornění aktivního centra LAD se znázorněným hydrofóbním kanálem, kudy přistupuje kyselina lipoová do aktivního centra. Je znázorněno také místo inhibice znečtatými ionty. Klíčové AMK jsou vyznačeny tučně. (kryst. struktura LAD z *Bacilus stearotherophilus*, viz. [16])

### 1.11. Možnosti měření $^{\bullet}O_2$ [7, 18]

Měření aktivit enzymů při vzniku tak reaktivních částic jako je  $^{\bullet}O_2$  je značně problematické. Poločas života tohoto radikálu je velice krátký a v organismu vzniká mnoho vedlejších produktů a není vždy jasné, zda vzniká volný  $^{\bullet}O_2$ , či dochází k přeměně na další reaktivní částice přímo prostřednictvím produkujícího enzymu. V této otázce se jeví jako jediný způsob detekce měření EPR [7]. Před měřením musí ovšem dojít k fixaci vzniklého  $^{\bullet}O_2$  na vhodné médium, pro spektrofotometrické stanovení byla vyvinuta také metoda postavená na použití vhodného činidla, které bude reagovat právě s  $^{\bullet}O_2$  (bude



redukováno) a bude výrazný rozdíl v absorbanci redukované a neredukované formy. Jedná se o použití zmíněného WST-1. Jak bylo zmíněno po reakci s  $\text{O}_2^-$  dochází ke vzniku WST-1-formazanu, který na rozdíl od neredukované formy absorbuje při 438 nm. Na rozdíl od jiných podobných je sůl WST-1 velice dobře rozpustná ve vodě[18](obr.8). Nejjednodušším stanovením se zde však jeví měření spotřeby jednoho ze substrátů, a to NADH. NADH na rozdíl od oxidovaného kofaktoru  $\text{NAD}^+$  silně absorbuje při 340 nm. Pro toto stanovení jsme se rozhodli právě pro jeho jednoduchost, ačkoli nemá žádnou výpovědní hodnotu o primárních produktech reakce. Měření je nepřímé, protože se měří pouze úbytek substrátu a ne přímý produkt.



Obr.8.: Schématické znázornění možnosti stanovení množství vzniklého supeoxidového anion-radikálu spektrofotometricky při 438 nm pomocí organické soli WST-1. NAD(P)H-oxidasa (NOD) (upraveno z [18])

## 2. Cíl práce

Cílem této práce je získat a sjednotit nové doposud známé informace týkající se  $\cdot\text{O}_2^-$  a NAD(P)H-oxidasové aktivity diaforasy a lipoamiddehydrogenasy. A dále prověřit enzymovou závislost vzniku  $\cdot\text{O}_2^-$  pro tyto enzymy, tím získat informace o rychlosti a možnostech vzniku tohoto radikálu v souvislosti s významem reakce jako jedné z možných bočních reakcí těchto enzymů, která by mohla odčerpávat substrát (NAD(P)H) během měření dalších předpokládaných aktivit těchto enzymů.

### **3. Materiály a přístroje:**

#### Chemikálie a pomůcky:

Diaforasa(DP) z *Clostridium kluyverri*, lipoamiddehydrogenasa z prasečího srdce (LAD), NADH, pufr Trizma base = 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol o koncentraci  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 7,5 - upraveno pomocí HCl (TRIS-HCl) a fosfátový pufr o koncentraci  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  a pH 7,5 a dialyzační trubice. Všechn tento materiál byl vyroben firmou Sigma-Aldrich. K měření byly použity plastové mikrokyvety vhodné pro měření v UV oblasti spektra vyrobené firmou Brand.

#### Přístroje:

Spektrofotometr ULTROSPEC 1000 (Pharmacia Biotech)

#### 4. Použité metody:

Pro měření oxidasové aktivity LAD a DP bylo použito nepřímé metody: spektrofotometrické stanovení koncentrace NADH při 340 nm. K výpočtům byl použit absorpční koeficient NADH  $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [13]. Absorbance byla měřena po dobu 10 minut s krokem 1 minuta.

##### NAD(P)H oxidasová aktivita DP v pufru TRIS-HCl:

Nejdříve byl připraven 1 ml roztoku DP o koncentraci  $17 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  v pufru TRIS-HCl o pH 7,5 a koncentraci  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (DP o aktivitě 1 U přemění 1  $\mu\text{mol}$  NAD(P)H na NAD(P)<sup>+</sup> za minutu při pH 7,5 a teplotě 25°C [12]). Ve stejném pufru byl také připraven 1 ml zásobního roztoku NADH koncentraci  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ten byl dále použit na přípravu roztoků o koncentracích :  $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Každého roztoku bylo připraveno 200  $\mu\text{l}$ . Po přidání každého roztoku byla směs vždy důkladně promíchána.

Reakční směs byla vždy míchána přímo do kyvety a to v pořadí 400  $\mu\text{l}$  pufru, 50  $\mu\text{l}$  DP a 50  $\mu\text{l}$  roztoku NADH. Po přidání každého roztoku byla směs vždy důkladně promíchána a byla ihned měřena absorbance při 340 nm po dobu 10 minut s krokem 1 minuta. Na závěr byla měřena i absorbance samotného NADH v TRIS-HCl a samotné DP v pufru TRIS-HCl při 340 nm.

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku tedy byly:

DP :  $1,7 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$

NADH :  $0,025 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

##### NAD(P)H oxidasová aktivita DP ve fosfátovém pufru:

Stejný postup byl použit i při měření aktivity diaforasy ve fosfátovém pufru o pH 7,5 a koncentraci  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Výsledné koncentrace ve vzorku byly zvoleny:  $1,7 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  DP a koncentrace NADH byly:  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

##### NAD(P)H oxidasová aktivita LAD v pufru TRIS-HCl:

Také aktivita LAD o koncentraci  $1,7 \text{ U}$  byla měřena stejným způsobem v pufru TRIS-HCl o pH 7,5 a koncentraci  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . (LAD o aktivitě 1 U přemění 1  $\mu\text{mol}$

redukované formy kyseliny lipoové na oxidovanou formu za minutu při pH 6,5 a teplotě 25°C [12])

Výsledné koncentrace tedy byly v tomto případě:

LAD: 1,7 U.ml<sup>-1</sup>

NADH: 0,05 mmol.l<sup>-1</sup>, 0,1 mmol.l<sup>-1</sup>, 0,25 mmol.l<sup>-1</sup>.

NAD(P)H oxidasová aktivita DP v TRIS-HCl po dialýze proti 2 x 200 ml TRIS-HCl:

Pro toto měření bylo připraveno 0,5 ml roztoku DP v TRIS-HCl o aktivitě 17 U, roztok byl pipetou přenesen do dialyzační trubice, jež byla po těsném uzavření ponořena do 200 ml čistého pufru TRIS-HCl. Dialýza byla provedena při 4°C dvakrát po asi 7 hodinách v 200 ml pufru TRIS-HCl, který byl promícháván během celého procesu pomocí magnetické míchačky. Po dokončení procesu byla měřena aktivita DP stejným způsobem jako v předchozích případech. Měřeny byly tyto koncentrace NADH: 0,05 mmol.l<sup>-1</sup>, 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> a 0,25 mmol.l<sup>-1</sup>.

Celkové koncentrace v měřeném vzorku tedy byly:

DP : 1,7 U.ml<sup>-1</sup>

NADH : 0,05 mmol.l<sup>-1</sup>, 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> a 0,25 mmol.l<sup>-1</sup>

Ke zpracování výsledků bylo použito softwaru Microsoft Office 2000.

## 5. Výsledky

### NAD(P)H oxidasová aktivita DP v pufru TRIS-HCl:

**Tab.1.:** Hodnoty absorbance při měření oxidasové aktivity DP(1,7 U) v pufru TRIS-HCl pro koncentrace NADH: 0,025 mmol.l<sup>-1</sup> a 0,05 mmol.l<sup>-1</sup>.

c(NADH)	0,025 mmol.l <sup>-1</sup> NADH			0,05 mmol.l <sup>-1</sup> NADH		
	měření č.:			měření č.:		
t [min]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]
0	0,179	0,200	0,190	0,361	0,341	0,351
1	0,149	0,162	0,156	0,316	0,302	0,309
2	0,109	0,121	0,115	0,273	0,261	0,267
3	0,070	0,081	0,076	0,229	0,220	0,225
4	0,063	0,071	0,067	0,188	0,180	0,184
5	0,063	0,071	0,067	0,149	0,140	0,145
6	0,063	0,071	0,067	0,109	0,102	0,106
7	0,063	0,071	0,067	0,074	0,067	0,071
8				0,067	0,061	0,064
9				0,067	0,061	0,064
10				0,068	0,062	0,065

DP o koncentraci 1,7 U byla nejprve měřena v prostředí 0,05 mol.l<sup>-1</sup> pufru TRIS-HCl o pH 7,5. Měřena byla absorbance při 340 nm pro NADH o koncentracích: 0,025 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.1.-vlevo), 0,05 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.1.-vpravo), 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.2.-vlevo), 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.2.-vpravo) a 0,25 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.3.-vlevo).

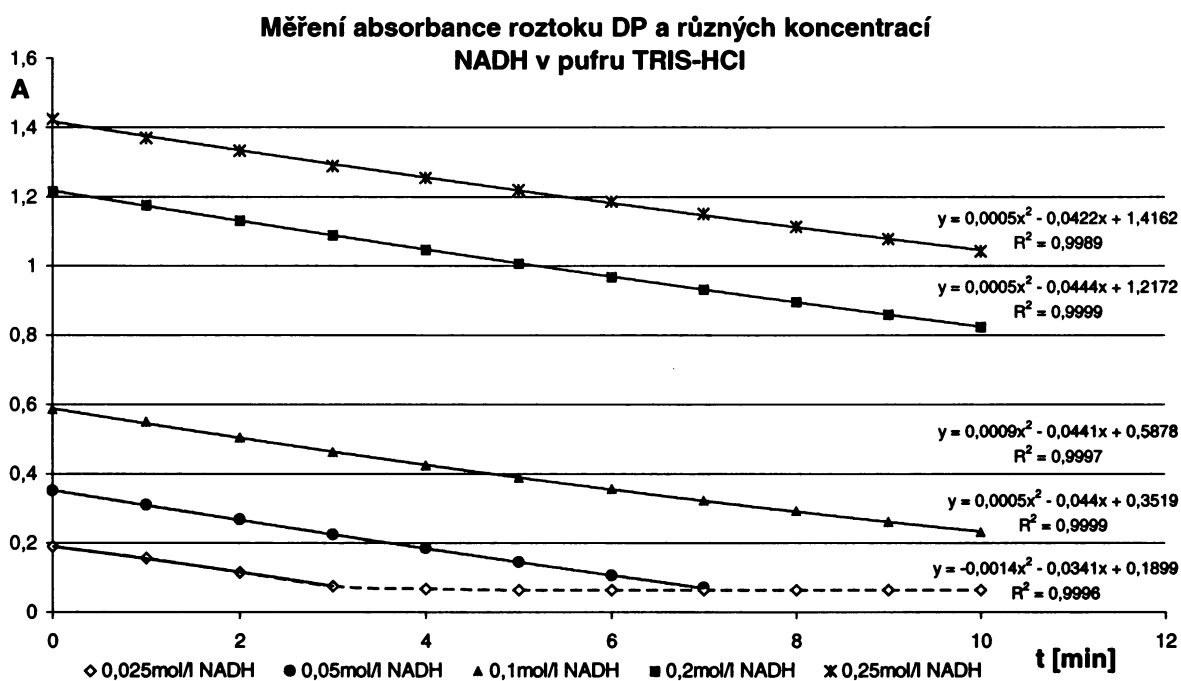
**Tab.2.:** Hodnoty absorbance při měření oxidasové aktivity DP(1,7 U) v pufru TRIS-HCl pro koncentrace NADH: 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> a 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>.

c(NADH)	0,1 mmol.l <sup>-1</sup> NADH			0,2 mmol.l <sup>-1</sup> NADH		
	měření č.:			měření č.:		
t [min]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]
0	0,563	0,608	0,586	1,191	1,240	1,216
1	0,512	0,587	0,550	1,165	1,185	1,175
2	0,468	0,537	0,503	1,121	1,142	1,132
3	0,429	0,494	0,462	1,080	1,098	1,089
4	0,391	0,456	0,424	1,040	1,054	1,047
5	0,356	0,420	0,388	1,002	1,012	1,007
6	0,324	0,385	0,355	0,967	0,970	0,969
7	0,292	0,352	0,322	0,932	0,931	0,932
8	0,263	0,321	0,292	0,900	0,891	0,896
9	0,233	0,288	0,261	0,867	0,852	0,860
10	0,206	0,257	0,232	0,834	0,814	0,824

**Tab.3.:** Hodnoty absorbance při měření oxidasové aktivity DP(1,7 U) v pufru TRIS-HCl po přidání 0,25 mmol.l<sup>-1</sup> NADH a závislost počáteční rychlosti na koncentraci NADH.

c(NADH)	0,25 mmol.l <sup>-1</sup> NADH			c(NADH) [mmol]	poč. rychlost [μmol.l <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
	měření č.:				
t [min]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]		
0	1,401	1,446	1,424	0,025	5,4127
1	1,334	1,404	1,369	0,05	6,9841
2	1,327	1,338	1,333	0,1	7,0000
3	1,285	1,292	1,289	0,2	7,0476
4	1,254	1,255	1,255	0,25	6,6984
5	1,218	1,219	1,219		
6	1,186	1,186	1,186		
7	1,152	1,148	1,150		
8	1,113	1,113	1,113		
9	1,074	1,082	1,078		
10	1,034	1,051	1,043		

Z naměřených hodnot byl vytvořen graf(obr.9.), hodnoty byly proloženy regresními křivkami a z nich byly vypočítány počáteční rychlosti reakcí a k nim byly přiřazeny odpovídající koncentrace (Tab.3. - vpravo). K výpočtu byl použit molární absorpční koeficient  $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [13]. Samotné NADH nejevilo v pufru TRIS-HCl žádnou změnu absorbance v čase, stejně jako DP, která měla stálou absorbanci 0,064.



**Obr.9.:** Graf závislosti absorbance na koncentraci NADH při měření DP v pufru TRIS-HCl.

NAD(P)H oxidasová aktivita DP ve fosfátovém pufru:

**Tab.4.:** Hodnoty absorbance při měření oxidasové aktivity DP(1,7 U) ve fosfátovém pufru pro koncentrace NADH: 0,05 mmol.l<sup>-1</sup> a 0,1 mmol.l<sup>-1</sup>.

c(NADH)	0,05 mmol.l <sup>-1</sup> NADH			0,1 mmol.l <sup>-1</sup> NADH		
	měření č.:			měření č.:		
t [min]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]
0	0,197	0,196	0,197	0,335	0,316	0,326
1	0,155	0,155	0,155	0,292	0,277	0,285
2	0,116	0,114	0,115	0,252	0,239	0,246
3	0,094	0,086	0,090	0,219	0,204	0,212
4	0,090	0,081	0,086	0,191	0,172	0,182
5	0,088	0,079	0,084	0,165	0,144	0,155
6	0,087	0,077	0,082	0,141	0,117	0,129
7	0,086	0,077	0,082	0,119	0,101	0,110
8	0,086	0,077	0,082	0,100	0,095	0,098
9	0,086	0,077	0,082	0,093	0,091	0,092
10	0,086	0,077	0,082	0,088	0,089	0,089

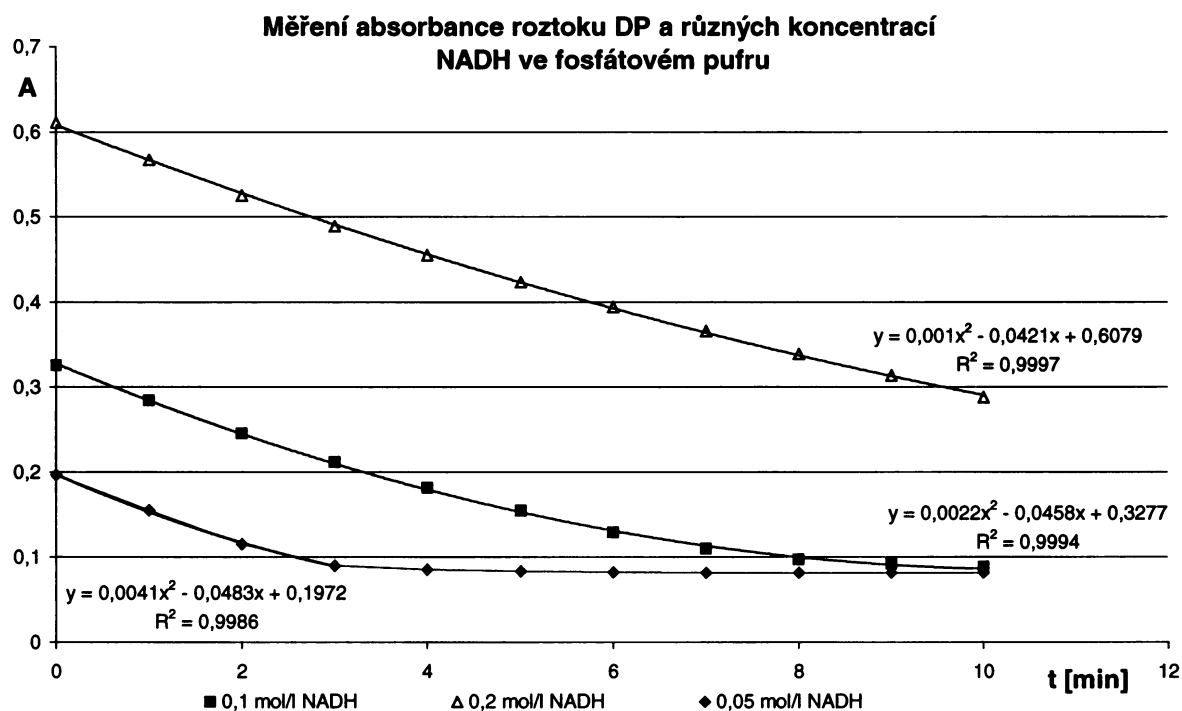
V tabulce 4. a 5. jsou zaznamenány absorbance naměřené při 340 nm pro DP o koncentraci 1,7 U a NADH o koncentracích: 0,05 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.4.-vlevo), 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.4.-vpravo) a 0,25 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.5.-vlevo) v 0,05 mol.l<sup>-1</sup> fosfátovém pufru o pH 7,5.

**Tab.5.:** Hodnoty absorbance při měření oxidasové aktivity DP(1,7 U) ve fosfátovém pufru po přidání 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> NADH a závislost počáteční rychlosti na koncentraci NADH.

c(NADH)	0,2 mmol.l <sup>-1</sup> NADH			c(NADH) [mmol]	poč. rychlost [μmol.l <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
	měření č.:				
t [min]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]		
0	0,638	0,573	0,606	0,05	7,667
1	0,595	0,539	0,567	0,1	7,270
2	0,551	0,499	0,525	0,2	6,683
3	0,517	0,461	0,489		
4	0,483	0,427	0,455		
5	0,451	0,396	0,424		
6	0,422	0,367	0,395		
7	0,394	0,338	0,366		
8	0,367	0,311	0,339		
9	0,342	0,285	0,314		
10	0,317	0,259	0,288		



Z naměřených hodnot byl vytvořen graf (obr.10.) a hodnoty byly proloženy regresními křivkami a z jejich rovnic byly vypočítány počáteční rychlosti reakcí a k nim byly přiřazeny odpovídající koncentrace (Tab.5. - vpravo) . K výpočtu byl použit molární absorpční koeficient  $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  [13]. Ve fosfátovém pufru byla naměřena pro DP naměřena v čase stálá absorbance 0,078 při 340 nm.



**Obr.10.:** Graf závislosti absorbance na koncentraci NADH při měření DP ve fosfátovém pufru.

NAD(P)H oxidasová aktivita DP v pufru TRIS-HCl po dialýze:

Po dialýze DP proti 2 x 200 ml TRIS-HCl byla měřena absorbance při 340 nm pro NADH o koncentracích: 0,05 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.6.-vlevo), 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.6.-vpravo) a 0,25 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.7.-vlevo). Měření bylo prováděno také po dobu 10 minut s krokem 1 minuta.

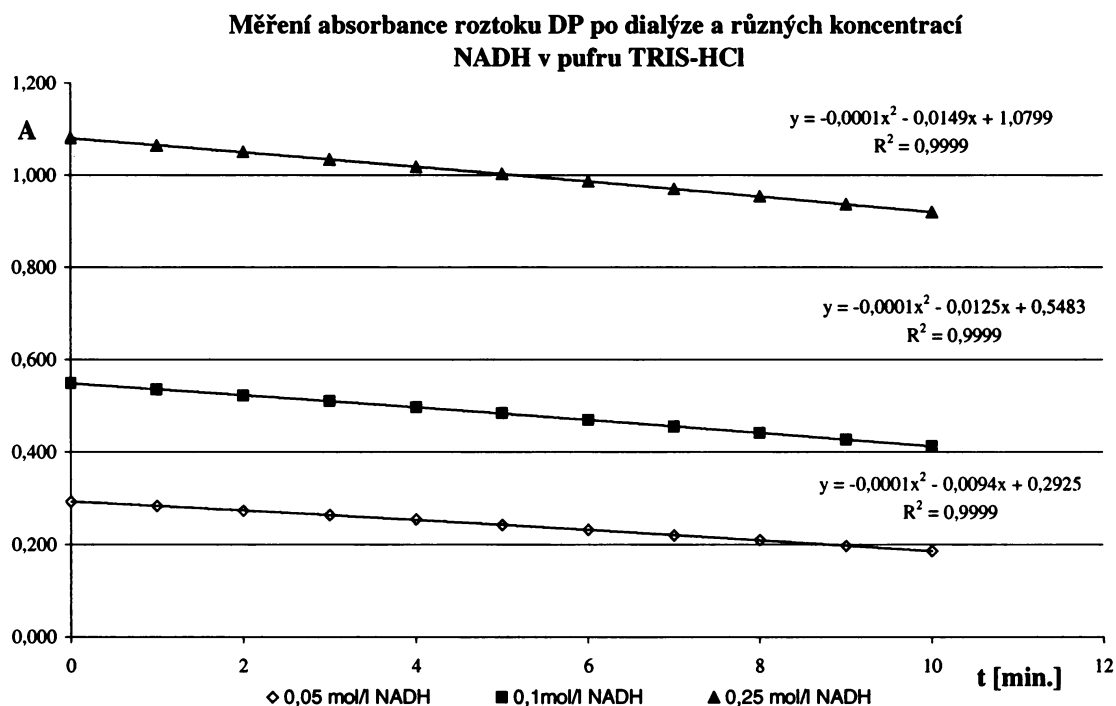
**Tab.6.:** Hodnoty absorbance při měření oxidasové aktivity DP(1,7 U) po dialýze v pufru TRIS-HCl pro koncentrace NADH: 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> a 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>.

c(NADH)	0,05 mmol.l <sup>-1</sup> NADH			0,1 mmol.l <sup>-1</sup> NADH		
	měření č.:			měření č.:		
t [min]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]
0	0,293	0,292	0,293	0,557	0,541	0,549
1	0,285	0,281	0,283	0,547	0,523	0,535
2	0,276	0,270	0,273	0,536	0,508	0,522
3	0,267	0,260	0,264	0,526	0,495	0,511
4	0,258	0,249	0,254	0,512	0,482	0,497
5	0,247	0,237	0,242	0,499	0,468	0,484
6	0,237	0,226	0,232	0,485	0,453	0,469
7	0,226	0,214	0,220	0,471	0,439	0,455
8	0,216	0,202	0,209	0,458	0,424	0,441
9	0,205	0,189	0,197	0,444	0,409	0,427
10	0,194	0,177	0,186	0,430	0,394	0,412

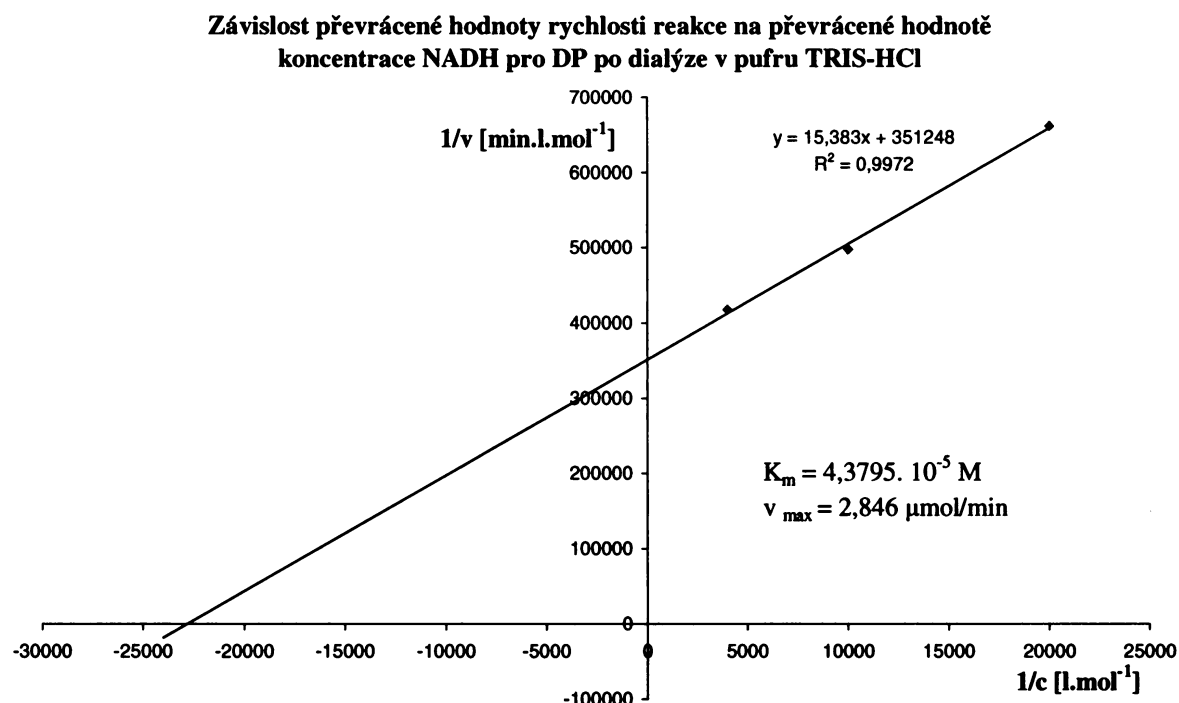
Z naměřených hodnot byl vytvořen graf (obr.11.) a hodnoty byly proloženy regresními křivkami a z jejich rovnic byly vypočítány počáteční rychlosti reakcí a k nim byly přiřazeny odpovídající koncentrace (Tab.7.-vpravo). V tomto případě bylo možné vypočítat hodnotu Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti (obr.12.). Tyto hodnoty jsou také vypsány v tabulce 7. (Tab.7.-vpravo). K výpočtu byl použit molární absorpční koeficient  $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  [13].

**Tab.7.:** Hodnoty měření oxidasové aktivity DP(1,7 U) v pufru TRIS-HCl po dialýze a přidání 0,25 mmol.l<sup>-1</sup> NADH a závislost počáteční rychlosti na koncentraci NADH a z toho vypočtené hodnoty Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti.

c(NADH)	0,25 mmol.l <sup>-1</sup> NADH			c(NADH) [mmol]	poč. rychlost [ $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ]
	měření č.:				
t [min]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]		
0	0,929	1,231	1,080	0,05	1,492
1	0,912	1,216	1,064	0,1	1,984
2	0,9	1,201	1,051	0,2	2,365
3	0,885	1,184	1,035		
4	0,87	1,166	1,018		
5	0,854	1,151	1,003		
6	0,838	1,134	0,986	Michaelisova konst. [mol.l <sup>-1</sup> ]	
7	0,822	1,118	0,970	<b>Km</b>	<b>4,380 · 10<sup>-5</sup></b>
8	0,806	1,101	0,954	Max. rychlost [mol.l <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]	
9	0,789	1,085	0,937	<b>v max</b>	<b>2,847 · 10<sup>-6</sup></b>
10	0,772	1,067	0,920		



**Obr.11.:** Graf závislosti absorbance na koncentraci NADH při měření DP po dialýze v pufru TRIS-HCl.



**Obr.12.:** Graf závislosti převrácené hodnoty rychlosti reakce na převrácené hodnotě koncentrace NADH. Změřeno pro DP po dialýze v pufru TRIS-HCl.

NAD(P)H oxidasová aktivita LAD v pufru TRIS-HCl:

**Tab.8.:** Hodnoty absorbance při měření oxidasové aktivity LAD(1,7 U) v pufru

TRIS-HCl pro koncentrace NADH: 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> a 0,2 mmol.l<sup>-1</sup>.

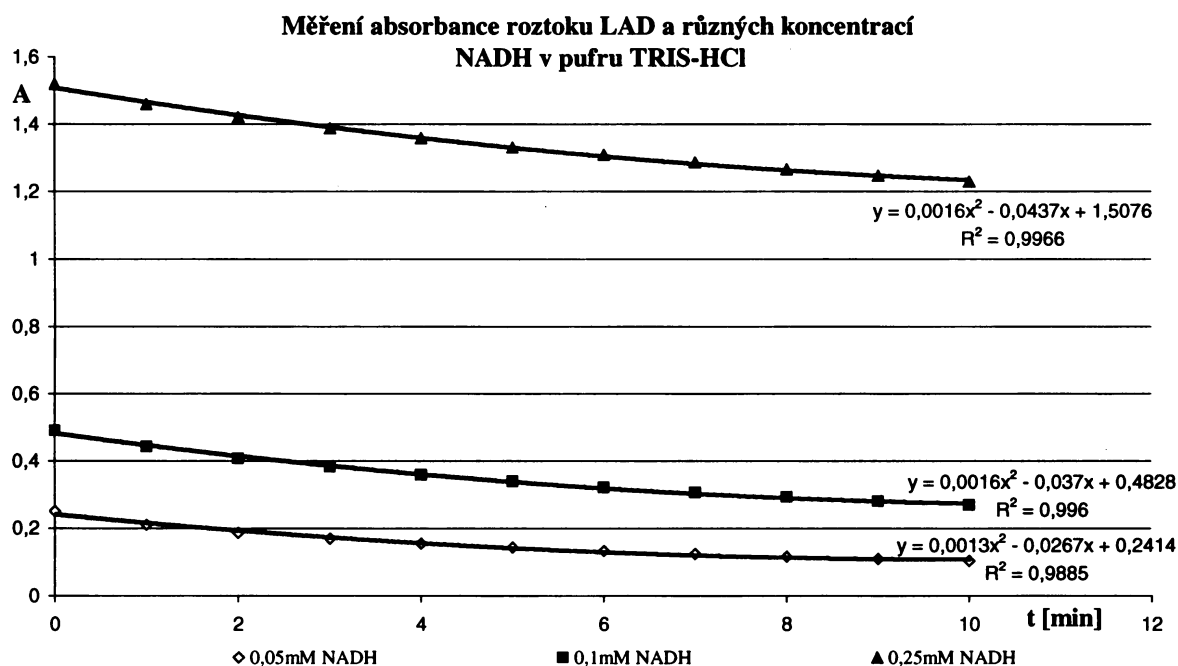
c(NADH)	0,05 mmol.l <sup>-1</sup> NADH			0,1 mmol.l <sup>-1</sup> NADH		
	měření č.:			měření č.:		
t [min]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]
0	0,260	0,242	0,251	0,475	0,507	0,491
1	0,213	0,207	0,210	0,428	0,459	0,444
2	0,188	0,186	0,187	0,394	0,423	0,409
3	0,169	0,170	0,170	0,370	0,396	0,383
4	0,154	0,156	0,155	0,345	0,373	0,359
5	0,141	0,145	0,143	0,326	0,353	0,340
6	0,131	0,135	0,133	0,309	0,335	0,322
7	0,121	0,126	0,124	0,294	0,319	0,307
8	0,113	0,119	0,116	0,281	0,305	0,293
9	0,106	0,112	0,109	0,269	0,293	0,281
10	0,100	0,106	0,103	0,257	0,281	0,269

Také pro LAD byli zvoleny stejné podmínky měření jako pro DP. Absorbance při 340 nm v prostředí pufru TRIS-HCl, byl použit enzym LAD o koncentraci 1,7 U a NADH o koncentracích: 0,05 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.8.- vlevo), 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.8.– vpravo) a 0,25 mmol.l<sup>-1</sup> (Tab.9.-vlevo).

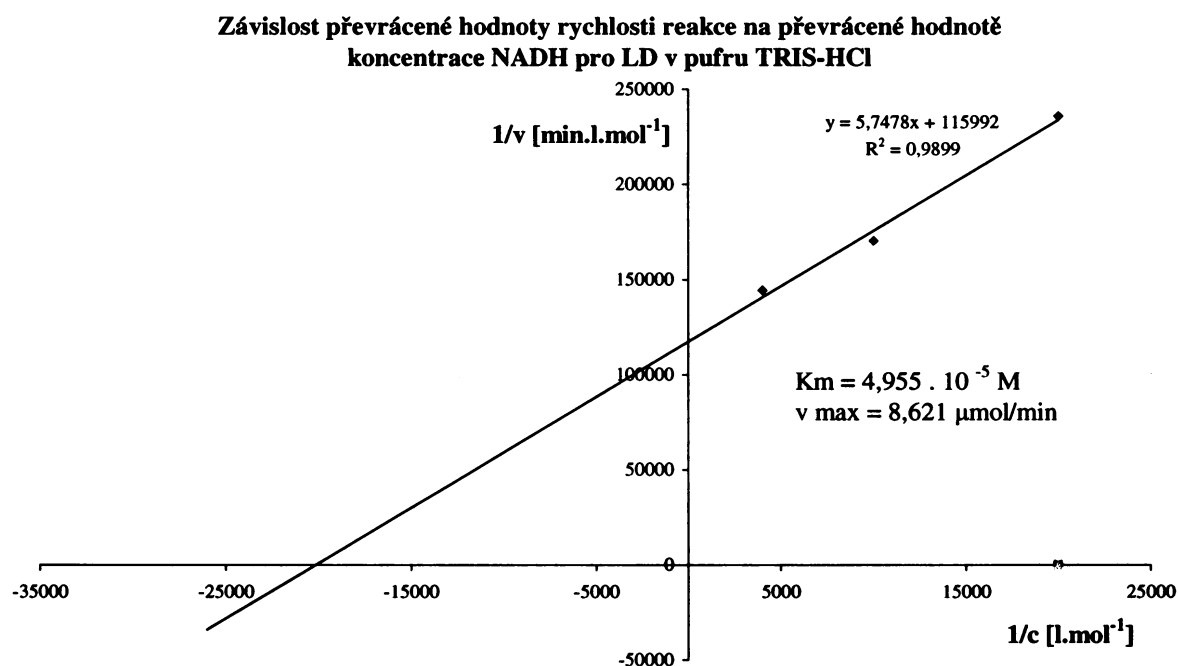
**Tab.9.:** Hodnoty měření oxidasové aktivity LAD(1,7 U) v pufru TRIS-HCl po přidání 0,25 mmol.l<sup>-1</sup> NADH a závislost počáteční rychlosti na koncentraci NADH a z toho vypočtené hodnoty Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti.

c(NADH)	0,25 mmol.l <sup>-1</sup> NADH			c(NADH) [mmol]	poč. rychlost [μmol.l <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
	měření č.:				
t [min]	I. [A]	II. [A]	průměr[A]		
0	1,525	1,511	1,518	0,05	4,238
1	1,467	1,451	1,459	0,1	5,873
2	1,429	1,411	1,420	0,2	6,937
3	1,397	1,377	1,387		
4	1,368	1,348	1,358		
5	1,340	1,322	1,331		Michaelisova konst. [mol.l <sup>-1</sup> ]
6	1,318	1,299	1,309	<b>Km</b>	<b>4,955 . 10<sup>-5</sup></b>
7	1,295	1,277	1,286		
8	1,275	1,257	1,266		Max. rychlost [mol.l <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
9	1,255	1,238	1,247	<b>v max</b>	<b>8,621 . 10<sup>-6</sup></b>
10	1,238	1,220	1,229		

Z naměřených hodnot byl vytvořen graf (obr.13.), hodnoty byly proloženy regresními křivkami a z jejich rovnic byly vypočítány počáteční rychlosti reakcí. (Tab.9.-vpravo). I zde byla vypočítána hodnota Michaelisovy konst. a max. rychlosti (obr.14.). Tyto hodnoty jsou také vypsány v tabulce 9.(Tab.9.-vpravo). K výpočtu byl použit molární absorpční koeficient  $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  [13].



**Obr.13.:** Graf závislosti absorbance na koncentraci NADH při měření DP po dialýze v pufru TRIS-HCl.



**Obr.14.:** Graf závislosti převrácené hodnoty rychlosti reakce na převrácené hodnotě koncentrace NADH. Změřeno pro LAD v pufru TRIS-HCl.

## 6. Diskuse

Jako první byl měřen roztok DP a NADH v pufru TRIS-HCl. Výsledky měření dvou nejnižších koncentrací NADH naznačují určitou závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu, ale výsledky měření vyšších koncentrací NADH toto výrazně popírají. Ačkoli lze říct, že hodnoty absorbance, které přesahují 1 jsou zatíženy již v celku velkou chybou, z výsledků vyplývá, že ani po opakovaném zvednutí koncentrace na dvojnásobnou hodnotu (z 0,05 na 0,1 a dále na 0,2 mmol/l), nedošlo k odpovídajícímu nárůstu rychlosti reakce, rychlost zde zůstala v mezích přesnosti měření stejná. Výsledky tohoto prvního měření hovoří spíše pro nepřímý vznik  $\text{O}_2$  podobně jak to předpokládá práce autorů Bhushana a spol. [6]. Enzymovou cestou by v tom případě docházelo pouze k přenosu elektronů z NADH na určitou vhodnou molekulu (podle všeho volné FMN) a následně by tato předávala získané elektrony molekule kyslíku neenzymaticky. Pak by tedy druhým substrátem nebyl kyslík, ale molekuly FMN, které by byly kyslíkem neustále regenerovány. To koresponduje se získanými výsledky, protože po překročení určité koncentrace NADH by se množství FMN mohlo stát limitujícím faktorem rychlosti reakce, v případě že by ho nebylo dost pro saturaci všech molekul enzymu. Z této hypotézy vychází i další postup měření. DP byla dialyzována za účelem odstranění nízkomolekulárních látek včetně FMN, po tomto pročištění by rychlost měřené reakce měla klesnout na velice nízkou úroveň, či dokonce téměř na nulu. To by bylo plně v souladu s tvrzením Kaplana a spol.[8]. Měření prokázalo sice nižší rychlost reakce, ale zato zřetelnou závislost rychlosti reakce na koncentraci NADH, která vedla k výpočtu Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti. Pro srovnání byla měřena oxidasová aktivita LAD při stejných podmínkách a ukázalo se, že hodnoty Michaelisovy konstanty jsou téměř shodné, ačkoli hodnota maximální rychlosti byla asi 3 x větší pro LAD. Toto překvapivé zjištění svědčí o podobnosti obou enzymů. Vznik této enzymové závislosti je tedy v rozporu s pracemi, které tvrdí, že samotná DP tuto aktivitu nemá [6,8]. Ačkoli roztok DP po dialýze ztratil úplně své žluté zabarvení, vyvstává zde otázka do jaké míry byla DP zbavena volného FMN dialýzou a do jaké míry mohl tento proces ovlivnit funkci enzymu. Také je nutné brát v úvahu to, že Kaplan a spol. [8] přečišťovali DP na Sephadexu, tedy metodou kolonové chromatografie. Vzhledem k odlišnosti těchto metod lze tedy očekávat rozdílné výsledky. Posledním měřením bylo měření DP a NADH provedené ve fosfátovém pufru. Z grafu lze vyčíst, že změna reakčního prostředí má

bezesporu vliv na naměřené hodnoty a charakter grafů. Vypočítané hodnoty reakčních rychlostí ale ukazují, že v prostředí fosfátového pufru nejeví komerčně dodávaná DP typickou enzymovou závislost na koncentraci NADH. Dokonce se zde objevuje obrácená tendence - snižování rychlosti s rostoucí koncentrací NADH, pro kterou nemáme jiné vysvětlení, než že se jedná o chybu v měření. Pro další zkoumání aktivit těchto enzymů by bylo přínosné modifikovat parametry použité metody, měřit úbytek koncentrace po delší dobu s krokem 5 až 10 minut, popřípadě měřit i pomocí jiné vhodné metody. Tím by mohlo dojít k zpřesnění získaných dat i z nich vyvozených závěrů. Za pozornost by také stálo použití jiných purifikačních metod. V neposlední řadě by bylo vhodné věnovat větší pozornost chování DP v jiných pufrch, protože výsledky naznačují, že výsledky měření oxidasové aktivity mohou být značně ovlivněny právě reakčním prostředím.

## 7. Závěr:

Závěrem lze říci, že oxidasová aktivita komerčně dodávané DP je ovlivněna nízkomolekulární látkou, nejspíše FMN, která je součástí dodaného preparátu. Ta reakci, při které je přenášen elektron z NADH na kyslík, výrazně ovlivňuje a značně urychluje. Po přečištění dialýzou však DP vykazuje tuto aktivitu ve shodě se zákony enzymových reakcí, ačkoli jsou výsledky nejspíše závislé na použité purifikační metodě. Dalším zjištěním je podobnost v Michaelisových konstantách LAD a dialyzované DP, jež svědčí o podobnosti v aktivitách obou enzymů, ačkoli přítomnost odlišného kofaktoru (DP-FMN / LAD-FAD) může být překážkou v přímém porovnávání aktivit DP a LAD. Oxidasovou aktivitu DP také značně ovlivňuje výběr reakčního prostředí.



## 8. Použitá literatura

- [1] Vetrovsky, P., Entlicher, G.: NITROGEN(II) OXIDE (NITRIC OXIDE, NO): ITS ORIGIN, FATE AND PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE.: Collect. Czech. Chem. Commun, 62, 1355-83 (1997)
- [2] Miller, R.A., Britigan, B.E.: Role of oxidants in microbial pathophysiology.: Clin.Microbiol.Rev, 10, 1-18 (1997)
- [3] Benov L.: How superoxide radical damages the cell.: Protoplasma, 217, 33-36 (2001)
- [4] Winterbourn, C.C., Kettle, A.J.: Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity.: Biochem.Biophys.Res.Comm., 305, 729-36 (2003)
- [5] Babior, B.M.: NADPH oxidase: an update.: Blood., 93, 1464-76 (1999)
- [6] Bhushan, B., Halasz, A., Pain, J., Hawari, J.: Diaphorase catalyzed biotransformation of RDX via N-denitration mechanism.: Biochem.Biophys.Res. Commun., 296, 779-84 (2002)
- [7] Rashba-Step, J., Turro, N.J., Cederbaum, A.I.: ESR studies on the production of reactive oxygen intermediates by rat liver microsomes in the presence of NADPH or NADH.: Arch.Biochem.Biophys., 300, 391-400 (1993)
- [8] Kaplan, F., Setlow, P., Kaplan, N.O.: Purification and properties of a DPNH-TPNH diaphorase from Clostridium kluverii.: Arch.Biochem.Biophys, 132, 91-8 (1969)

- [9] Vetrovsky, P., Stoclet, J.C., Entlicher, G.: Possible mechanism of nitric oxide production from N(G)-hydroxy-L-arginine or hydroxylamine by superoxide ion.: *Int.J.Biochem.Cell.Biol.* 28, 1311-8 (1996)
- [10] Ganong, W.F.: *Přehled lékařské fyziologie.* H & H, Praha, str.131-4 (1999)
- [11] Bando, Y., Aki, K.: Superoxide-mediated release of iron from ferritin by some flavoenzymes.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 168, 389-395 (1990)
- [12] *Biochemikálie a reagentie pro výzkum „Life science“ 2004-05.:* Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, str. 628-9 a 1196 (2004)
- [13] Bergmeyer, H.,U.: The New values for the molar extinction coefficients of NADH and NADPH for the use in routine laboratories (author's transl).: *Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.*, 13, 507-8 (1975)
- [14] Voet, D., Voet, J.G.: *Biochemistry.*: 3rd edition, John Wiley and sons, inc., New York, str. 776-80 (2004)
- [15] Patel, M.S., Harris, R.A.: Mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects.: *FASEB J*, 9, 1164-72 (1995)
- [16] Gazaryan, I.G., Krasnikov, B.F., Ashby, G.A., Thorneley, R.N., Kristal, B.S., Brown, A.M.: Zinc Is a Potent Inhibitor of Thiol Oxidoreductase Activity and Stimulates Reactive Oxygen Species Production by Lipoamide Dehydrogenase.: *J.Biol.Chem.*, 277, 10064-72 (2002)
- [17] Whiteley, H.R., Ordal, E.J.: THE REDUCTION OF METHYLENE BLUE BY HYDROGENACE.: *J.Bacteriol*, 70, 608-13 (1955)

- [18] Sarker, A.K., Ukeda, H., Kawana, D., Sawamura, M.: Enzymatic assay of dehydrogenase substrate based on the detection of superoxide anion.: *Food Research International*, 34, 393-399 (2001)
- [19] Rice, J.E., Dunbar, B., Lindsay, J.G.: Sequences directing dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) binding are located on the 2-oxoglutarate dehydrogenase (E1) component of the mammalian 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme komplex.: *EMBO J.*, 11, 3229-35 (1992)
- [20] Bartik, P., Chalupsky, K., Vavruska, L., Muller, B., Stoclet, J.C., Entlicher, G.: Diaphorase can metabolize some vasorelaxants to NO and eliminate NO scavenging effect of 2-phenyl-4,4,5,5,-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO).: *Physiol.Res.*, 53, 615-20 (2004)

## 9. Použité zkratky.:

$\alpha$ -KGDC	multienzymový komplex $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenasy AMK aminokyseliny
BCKADC	(branched-chain $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex) multienzymový komplex dehydrogenasy rozvětvených $\alpha$ -ketokyselin
<i>C.k.</i>	<i>Clostridium kluyverri</i>
DLD = E <sub>3</sub>	dihydrolipoyldehydrogenasa
DLTA = E <sub>2</sub>	dihydrolipoyltransacetylasou
DP	diaforasa
DPI	difenileniodonium
ESR/EPR	elektronová spinová /paramagnetická/ resonance
FAL	formaldoxim
GSH	thioly
GTN	glyceroltrinitrát
LAD	lipoamiddehydrogenasa
LS <sub>2</sub>	oxidovaná forma kyseliny lipoové
L(SH) <sub>2</sub>	redukována forma kyseliny lipoové
MK	mastné kyseliny
MPO	myeloperoxidasa
NOD	NAD(P)H-oxidasa
NOS	NO synthasa
iNOS	inducibilní NO synthasa
eNOS	endotheliální NO synthasa(hlavní forma konstitutivní NOS)
OH-L-Arg	N <sup>G</sup> -hydroxy-L-arginin
PDC	multienzymový komplex pyruvátdekarboxilasy
PDH = E <sub>1</sub>	pyruvátdehydrogenasa
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
RAMK	rozvětvené aminokyseliny
RDX	hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin
RKK	rozvětvené ketokyseliny
ROS	(reactive oxygen species)reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutasa

TRIS-HCL	pufr Trizma base (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol) o koncentraci 0,05 mol.l <sup>-1</sup> a pH 7,5 - upraveno pomocí HCl
WST-1	4-[3-(4jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisufonát sodný

---

·HO	hydroxylový radikál
HOX	hypohalové kyseliny
NO <sub>x</sub>	směs oxidů dusíku
·NO	oxid dusnatý
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitritový anion
·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoxidový anion-radikál
U	mezinárodní jednotka enzymové aktivity: 1 U = 1 μmol/min.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

<b>Jméno a příjmení s adresou</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>