

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

VLIV PYRIDOXALISONIKOTINOYLHYDRAZONU NA SPEKTRÁLNÍ VLASTNOSTI  
ALANINAMINOTRANSFERASY

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce:  
Hradec Králové 2008

Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.  
Mgr. Kamila Vančurová

Za pomoc a užitečné rady při vypracování rigorózní práce vděčím zejména svému školiteli prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc. Zároveň bych chtěla poděkovat paní Boženě Navrátilové za praktické rady a ochotu při dlouhodobé spolupráci. Mgr. Ivě Boušové, Ph.D. děkuji za pomoc při zpracování výsledků a tvorbě spekter. Za změření spekter cirkulárního dichroismu v Praze na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky děkuji Ing. Heleně Dlouhé a za pomoc při jejich interpretaci Ing. Petru Maloňovi, CSc.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem a že jsem ji vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje informací, ze kterých jsem při vypracování čerpala, jsem uvedla v seznamu literatury a v práci řádně citovala.“

Mgr. Kamila Vančurová

## OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY.....	8
2. 1. CIRKULÁRNÍ DICHROISMUS .....	8
2. 1. 1. PRINCIP METODY.....	9
2. 1. 2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ CD.....	11
2. 1. 3. JEDNOTKY MĚŘENÍ CD.....	12
2. 1. 4. MNOŽSTVÍ VZORKU POTŘEBNÉ PRO MĚŘENÍ CD.....	13
2. 1. 5. CHARAKTERISTIKA METODY.....	13
2. 1. 6. CD VYUŽÍVAJÍCÍ SYNCHROTRONOVÉ ZÁŘENÍ.....	15
2. 1. 7. CHROMOFORY SLEDOVANÉ V CD STUDIÍCH PROTEINŮ.....	15
2. 1. 7. 1. Peptidová vazba.....	16
2. 1. 7. 2. Postranní řetězce aromatických aminokyselin.....	17
2. 1. 7. 3. Disulfidická vazba.....	18
2. 1. 7. 4. Nепroteinové chromofory.....	18
2. 1. 7. 5. Chromofory nukleových kyselin.....	21
2. 1. 8. TYPY PROBLÉMŮ ŘEŠITELNÉ POMOCÍ SPEKTER CD.....	21
2. 1. 8. 1. Sekundární struktura peptidů a proteinů.....	21
2. 1. 8. 2. Konformační změny v proteinech.....	23
2. 1. 8. 3. Nové uspořádání („refolding“) proteinů a peptidů.....	24
2. 1. 8. 4. Navrhování proteinů a peptidů.....	26
2. 1. 8. 5. Membránové proteiny.....	27
2. 1. 8. 6. Interakce mezi doménami v proteinech.....	28
2. 1. 8. 7. Vazba ligandů a hledání nových léčiv.....	29
2. 1. 9. SOUHRN O METODĚ.....	30
2. 2. TRANSAMINASY.....	30
2. 2. 1. PRŮBĚH TRANSAMINACE.....	31
2. 2. 2. HISTORIE TRANSAMINAS A TRANSAMINAČNÍCH REAKCÍ.....	31
2. 2. 3. BIOLOGICKÝ VÝZNAM TRANSAMINAČNÍCH REAKCÍ.....	33
2. 2. 4. SPEKTRÁLNÍ VLASTNOSTI PLP JAKO KOENZYMU VÁZANÉHO V TRANSAMINASACH (AST, ALT).....	34
2. 2. 4. 1. Absorpční spektra.....	36
2. 2. 4. 2. Cirkulární dichroismus.....	37

2. 2. 5. PYRIDOXALFOSFÁT (PLP).....	39
2. 2. 5. 1. Mechanismus působení koenzymu pyridoxalfosfátu.....	41
2. 3. PYRIDOXALISONIKOTINOYLHYDRAZON (PIH).....	42
3. CÍL PRÁCE.....	46
4. MATERIÁL A METODIKY.....	47
4. 1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	47
4. 1. 1. SUBSTRÁT.....	47
4. 1. 2. CHEMIKÁLIE PRO PŘÍPRAVU PUFŘŮ.....	47
4. 1. 3. CHEMIKÁLIE PRO PŘÍPRAVU ROZTOKŮ.....	47
4. 2. ENZYM.....	47
4. 2. 1. POSTUP PŘÍPRAVY ENZYMU.....	47
4. 3. PYRIDOXALISONIKOTINOYLHYDRAZON.....	48
4. 3. 1. PŘÍPRAVA ROZTOKU PIH.....	48
4. 3. 2. POSTUP PŘÍPRAVY ROZTOKU PIH.....	48
4. 4. DIALYZAČNÍ TRUBICE.....	48
4. 5. PŘÍSTROJE.....	49
4. 6. UV-VIS SPEKRA.....	49
4. 6. 1. POSTUP PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO MĚŘENÍ UV-VIS SPEKTER.....	49
4. 6. 2. MĚŘENÍ UV-VIS SPEKTER.....	50
4. 7. SPEKTRA CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU.....	51
4. 7. 1. POSTUP PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO MĚŘENÍ SPEKTER CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU.....	51
4. 7. 2. MĚŘENÍ SPEKTER CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU.....	52
5. VÝSLEDKY.....	54
5. 1. VÝSLEDKY MĚŘENÍ UV-VIS SPEKTER.....	54
5. 1. 1. ABSORPČNÍ SPEKTRUM ALT.....	54
5. 1. 2. ABSORPČNÍ SPEKTRUM ALT V OBLASTI ABSORPCE KOENZYMU.....	55
5. 1. 3. SROVNÁNÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER PŮVODNÍCH VZORKŮ, VZORKŮ PO SEDMIDENNÍ INKUBACI A INKUBOVANÝCH A NÁSLEDNĚ DIALYZOVANÝCH VZORKŮ.....	56
5. 1. 4. ABSORPČNÍ SPEKTRUM PIH.....	59
5. 2. VÝSLEDKY MĚŘENÍ SPEKTER CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU (A UV-VIS SPEKTER).....	59

5. 2. 1. CD A ABSORPČNÍ SPEKTRUM BÍLKOVINNÉ ČÁSTI.....	60
5. 2. 2. CD A ABSORPČNÍ SPEKTRUM ALT V OBLASTI ABSORPCE KOENZYMU.....	61
5. 2. 3. CD SPEKTRA VZORKŮ INKUBOVANÝCH 6 DNÍ.....	63
5. 2. 4. CD SPEKTRA VZORKŮ 6 DNÍ INKUBOVANÝCH A NÁSLEDNĚ DIALYZOVANÝCH.....	65
5. 2. 5. SROVNÁNÍ ABSORBANCE PŮVODNÍCH VZORKŮ, VZORKŮ PO ŠESTIDENNÍ INKUBACI A INKUBOVANÝCH A NÁSLEDNĚ DIALYZOVANÝCH VZORKŮ.....	68
5. 2. 6. SROVNÁNÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER PŮVODNÍCH VZORKŮ (NEINKUBOVANÝCH, NEDIALYZOVANÝCH).....	71
5. 2. 7. SROVNÁNÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER VZORKŮ PO ŠESTIDENNÍ INKUBACI.....	72
5. 2. 8. SROVNÁNÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER INKUBOVANÝCH A NÁSLEDNĚ DIALYZOVANÝCH VZORKŮ.....	73
5. 2. 9. SROVNÁNÍ CD SPEKTER PŮVODNÍCH, INKUBOVANÝCH A INKUBOVANÝCH A DIALYZOVANÝCH VZORKŮ.....	74
6. DISKUSE.....	77
7. SOUHRN.....	81
8. ZÁVĚR.....	82
9. SEZNAM LITERATURY.....	83
10. ABSTRACT.....	93

## 1. ÚVOD

Práce do jisté míry navazuje na diplomovou práci (Vančurová 2006), jejíž hlavním cílem bylo ověřit předpoklad interakce pyridoxalisonikotinoylhydrazonu s pyridoxalovým enzymem, dekarboxylasou aromatických aminokyselin (EC 4. 1. 1. 28), získanou z jater potkana. Pokusy byly prováděny se substráty tyrosinem a dopou značenými na karboxylovém uhlíku  $^{14}\text{C}$  radiometrickou metodou (Dršata a Hais, 1973). Byla zjištěna inhibice enzymu PIHem, pro substrát tyrosin byla inhibice kompetitivní, pro dopu formálně akompetitivní. Nešlo však o inhibici kompetitivní s koenzymem pyridoxalfosfátem. Bylo možno konstatovat, že v případě terapeutického využití PIH nelze vyloučit jeho interakci s DAAK vzhledem k tomu, že předpokládané plazmatické koncentrace PIH se blíží hodnotám zjištěných inhibičních konstant.

Vedle změn katalytické aktivity umožňují purifikované pyridoxalové enzymy sledovat spektrální vlastnosti aktivního místa enzymu. Jako purifikovaný enzym, jehož koenzymem je pyridoxalfosfát, byla použita alaninaminotransferasa (EC 2. 6. 1. 2). V praxi je nejčastěji pro pokusy využívána aspartátaminotransferasa (EC 2. 6. 1. 1.), pro spektrální analýzu v našem případě se však nejevila jako nejvhodnější, protože hlavní absorpční maximum pyridoxalové formy AST by se překrývalo s absorpčními maximy PIH.

Obsah rigorózní práce je orientován taktéž na PIH, ale obsahuje zcela nové výsledky. Cílem práce je pozorování vlivu PIHu na alaninaminotransferasu s využitím spektrální analýzy, absorpčních spekter a spekter cirkulárního dichroismu. Hlavní výhodou cirkulárního dichroismu je fakt, že na rozdíl od absorpčních spekter, signál cirkulárního dichroismu poskytují pouze látky opticky aktivní, což umožňuje identifikaci specifických signálů koenzymu a jeho změn.

Experimentální část práce byla doplněna v přehledu stavu problematiky rešerší o cirkulárním dichroismu jako hlavní použité metodě. Dále jsem se v této části práce zaměřila na aktuální informace o PIH. Zařadila jsem také článek o transaminasach.

## 2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

V přehledu současného stavu problematiky jsem vycházela zejména ze separátů zapůjčených od školitele a z elektronické databáze Medline ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)). K čerpání informací ze starších prací jsem využívala Chemical Abstracts.

Co se týče obsahu rešerše, zaměřila jsem se zejména na problematiku cirkulárního dichroismu, aminotransferas jako pyridoxalových enzymů a pyridoxalisonikotinoylhydrazonu (PIH).

Nejrozsáhlejší část rešerše byla věnována cirkulárnímu dichroismu jako použité metodě.

Vzhledem k tomu, že rešerši o PIHu jsem věnovala prostor také v diplomové práci (Vančurová 2006), zaměřila jsem se tentokrát zejména na aktuální informace o aroylhydrazonech a potenciálních možnostech jejich využití.

V části rešerše věnované cirkulárnímu dichroismu jsem z důvodu nedostatku dostupné literatury vycházela zejména z práce Kelly a Price (2000).

### 2. 1. CIRKULÁRNÍ DICHROISMUS

Cirkulární dichroismus (kruhovou dvojbarevnost, CD) můžeme vysvětlit vznikem elipticky polarizovaného světla po interakci kruhově polarizovaného světla s opticky aktivní látkou.

Cirkulární dichroismus je metoda, která je založena na rozdílné absorpci levo- a pravotočivě cirkulárně polarizovaného záření u opticky aktivní látky v oblasti jejího absorpčního pásu (Český lékopis 2002). Za absorpci jsou zodpovědné chromofory. Dle definice uvedené na internetových stránkách VŠCHT je chromofor látka absorbující elektromagnetické záření, častěji část molekuly odpovědná za absorpci záření, často i ultrafialového (např. chromoforem hemoglobinu je hem, chromoforem bílkovin v blízkém UV oblasti (280 nm) jsou aromatické kruhy tyrosinu a tryptofanu). Chromofory mohou vykazovat vnitřní chiralitu nebo se nacházet v chirálním prostředí. Např. proteiny obsahují řadu chromoforů, proto lze při studiu jejich struktury a funkce využívat CD spektra.

Rozdíl v absorpci levo- a pravotočivého kruhově polarizovaného světla je malý, spektra lze tudíž hodnotit pouze kvalitativně. Cirkulární dichroismus se objevuje jen v té oblasti spektra, ve které vzorek absorbuje elektromagnetické záření. Tato vlastnost je výhodou u bezbarvých látek, u nichž se objevují elektronové přechody o nejnižších energiích v UV oblasti.

Analýza CD spektra ve vzdálené UV oblasti (240-180 nm) podává informace o sekundární struktuře proteinů, jako je  $\alpha$ -helix a  $\beta$ -skládaný list. CD spektrum v blízké UV oblasti (320-



260 nm) charakterizuje postranní řetězce aromatických aminokyselin a podává tudíž informace o terciární struktuře proteinů. CD signály mohou vyvolávat i chromofory nacházející se mimo strukturu proteinů, např. flavin a hem.

Vzhledem k relativní nenáročnosti metody bývá cirkulární dichroismus používán k získávání potřebných informací o struktuře proteinů, rozsahu strukturálních změn a vazbě ligandů. CD spektra slouží také ke zhodnocení struktury a stability proteinových fragmentů. Velmi užitečný je CD v hodnocení integrity membránových proteinů během extrakce a charakterizace. Interakce mezi chromofory mohou vyvolat vznik charakteristických CD signálů (Kelly a Price 2000).

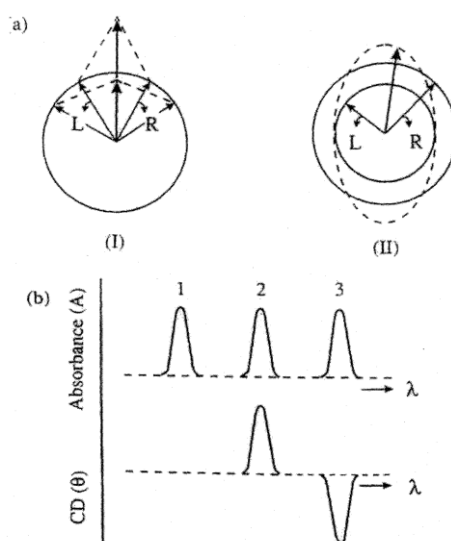
Silná stránka CD spektroskopie spočívá v extrémní citlivosti ke konformačním změnám proteinů. V blízkém UV se projevují změny v terciární struktuře způsobené interakcemi protein-protein. Tato oblast obsahuje signály z disulfidických vazeb a aromatických aminokyselin. Data z této oblasti jsou významná pro sledování termostability a denaturace ([www.cryst.bbk.ac.uk](http://www.cryst.bbk.ac.uk))

Z výše uvedeného je zřejmé, že CD je univerzální metodou používanou zejména ve strukturální biologii a že se rozrůstá oblast jejího využití .

## 2. 1. 1. PRINCIP METODY

Podstatou CD je rozdílná absorpce levo- a pravotočivě cirkulárně polarizované složky rovinně polarizovaného záření. K tomuto může docházet, pokud je chromofor chirální, tzn. opticky aktivní, z důvodu své struktury, kovalentního napojení na centrum chiraloty nebo umístění v asymetrickém prostředí.

Rovinně polarizované světlo je štěpeno na dvě kruhově polarizované složky průchodem skrz modulátor umístěný ve střídavém elektrickém poli. Modulátor je zpravidla tvořen piezoelektrickým křemenným krystalem a tenkou deskou z isotropaního materiálu pevně spojenou s krystalem. Střídavé pole vyvolává strukturální změny v krystalu křemenu a deska přenáší cirkulárně polarizované světlo. Pokud nejsou po průchodu vzorkem levo- a pravotočivě cirkulárně polarizované složky absorbovány (nebo jsou absorbovány ve stejném rozsahu), spojením obou složek vznikne původní záření. Pokud je však jedna složka vzorkem absorbována ve větším rozsahu, výsledné záření bude nyní elipticky polarizováno, tzn. výslednice vytvoří elipsu. Pokud mají obě složky rovinně polarizovaného záření stejnou amplitudu, jejich spojením vzniká rovinně polarizované záření. Mají-li složky rozdílnou velikost, výslednice je elipticky polarizovaná (Kelly a Price 2000).



Obr. 1 Původ CD efektu.

- a) Levotočivě a pravotočivě cirkulárně polarizovaná složka rovinně polarizovaného záření. (I) Obě komponenty mají stejnou amplitudu a jejich spojením vzniká rovinně polarizované záření. (II) Obě složky mají různou velikost a výslednice je elipticky polarizovaná.
- b) Vztah mezi absorpčními a CD spektry. Pík 1 odpovídá látce, která není opticky aktivní. Pík 2 dává látka, která vykazuje pozitivní CD spektrum s levotočivou složkou absorbovanou víc než pravotočivou. Pík 3 poskytuje látka, která vykazuje negativní CD spektrum (Kelly a Price 2000).

CD spektropolarimetr detekuje obě složky odděleně. Přístroj zobrazuje dichroismus při dané vlnové délce záření vyjádřený jako rozdíl v absorbanci dvou složek ( $\Delta A = A_L - A_R$ ) nebo jako elipticitu ve stupních ( $\theta$ ) ( $\theta = \text{tg}^{-1}(b/a)$ ), kde  $b$  a  $a$  jsou menší a větší osa výsledné elipsy. Mezi  $\Delta A$  a  $\theta$  ve stupních existuje jednoduchý vztah  $\theta = 32,98 \Delta A$ . CD spektrum získáme, pokud je dichroismus měřen jako funkce vlnové délky.

Sigmoidální CD spektrum může vzniknout, pokud dojde k interakci dvou nebo více identických sousedících chromoforů.

V praxi bývají většinou zjištěny elipticity v řádu desítek milistupňů, rozdíl v absorbanci mezi dvěma polarizovanými složkami záření je řádově  $3 \cdot 10^{-4}$  jednotek absorbance. Je tedy potřeba striktně dbát na zajištění požadovaných experimentálních podmínek pro získání smysluplných výsledků (Kelly a Price 2000).

## 2. 1. 2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ CD :

Jako zdroj světla pro měření se zpravidla používá xenonová lampa s dobrým výkonem v oblasti vlnových délek 178 až 1000 nm, které se používají téměř ve všech studiích proteinů. Světlo prochází dvojitým monochromátorem s křemennými hranoly. Lineární paprsek z prvního monochromátoru je štěpen na dvě složky, které jsou ve druhém monochromátoru polarizovány v pravých úhlech. Výstupní štěrbina v monochromátoru eliminuje mimořádný paprsek. Získané polarizované monochromatické světlo prochází opticky aktivním modulátorem, výsledkem je střídavé cirkulárně polarizované světlo. Paprsek dále prochází zkoumaným vzorkem a dopadá na fotonásobič spojený se zesilovačem, který produkuje dva elektrické signály. Jedním je stejnosměrný proud  $V_c$  a druhým je střídavý proud s modulační frekvencí  $V_{ac}$  charakteristickou pro zkoušený vzorek. Fáze udává znaménko cirkulárního dichroismu. Poměr  $V_{ac}/V_c$  je úměrný diferenční absorpci  $\Delta A$ , která vytvořila signál (Český Lékopis 2002).

Je nezbytné prohnat přístrojem dusík k odstranění kyslíku z prostoru lampy a prostoru pro vzorek, aby se předešlo vzniku ozonu, k minimalizaci poškození optického systému a aby bylo možné provést měření při vlnové délce nižší než 200 nm. V dusíkové atmosféře je možné používat vlnové délky pod 180 nm, moderní přístroje s účinným pročišťováním dusíkem umožňují dokonce měření pod 175 nm. K záznamu dat pod těmito vlnovými délkami je nezbytné používat vakuové UV techniky nebo zdroje vysoce intenzivního synchrotronového záření (Clarke a Jones 1999).

Aby získaná data byla spolehlivá, je potřeba věnovat pozornost přístroji i vzorku. Přístroj je třeba pravidelně kalibrovat vhodným chirálním standardem. K tomuto účelu se používá mj. 1S-(+)-10-kafersulfonová kyselina.

Je důležité, aby vzorek proteinu byl homogenní, prostý rozptýlených částic. Odstranění částic lze docílit centrifugací nebo použitím vhodného filtru (0,2  $\mu\text{m}$ ). Celková absorbance vzorku při dané vlnové délce nesmí převyšovat 1, jinak dojde ke vzniku nadměrného spektrálního šumu. Nad určitou hranicí dojde k automatickému přerušení a poklesu CD signálu na nulu.

Co se týče měření, je nezbytné minimalizovat absorpci jiných složek ve směsi, jako jsou pufrý, rozpouštědla atd. Problémy mohou vznikat ve vzdálené UV oblasti. Absorpční vlastnosti řady běžně používaných pufrů jsou často studovány a zabývá se jimi např. Martin (1996). Fosfátové, borité a nízkomolekulární tris pufrý téměř neabsorbují nad 190 nm. Používají se pro vytvoření pH mezi 6 a 9,5. Pufrý vhodné pro hodnoty pH 4 až 6 obsahují zpravidla karboxylové skupiny a absorbují tudíž výrazně pod 200 nm. V těchto případech je

třeba pracovat se zředěnými vzorky, které však udrží potřebné pH, aby složky pufru netvořily nadbytečný šum ve spektru. Často bývá přehlíženo, že chloridové ionty silně absorbují pod 195 nm. Vyšší koncentrace chloridových iontů nelze tudíž doporučit jako složku roztoku pufru pro CD měření. Pokud je to nezbytně nutné, fluoridové a sulfátové soli jsou vhodnější k udržení iontové síly.

Abychom mohli za pomoci CD odhadnout sekundární strukturu proteinu, je nezbytné přesně znát koncentraci proteinu (Kelly a Price 2000).

### 2. 1. 3. JEDNOTKY MĚŘENÍ CD

Existuje několik jednotek měření cirkulárního dichroismu. V literatuře jsou uváděny molární elipticita, střední zbytková elipticita a delta epsilon. Moderní přístroje měří rozdíl v absorpci levo- a pravotočivě cirkulárně polarizovaného světla jako funkci vlnové délky ([www.cryst.bbk.ac.uk](http://www.cryst.bbk.ac.uk)).

Český lékopis 2002 uvádí, že CD lze vypočítat dle vzorce :

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \Delta A / (c \cdot l),$$

kde  $\Delta\varepsilon$ - molární cirkulární dichroismus nebo molární diferenční dichroická absorptivita ( $\text{litr} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$\varepsilon_L$ -molární absorptivita levotočivě cirkulárně polarizovaného světla

$\varepsilon_R$ -molární absorptivita pravotočivě cirkulárně polarizovaného světla

$\Delta A$ -diferenční cirkulárně dichroická absorbance

c-koncentrace roztoku ( $\text{mol} \cdot \text{litr}^{-1}$ )

l-tloušťka vrstvy v kyvetě (cm)

Lze také využít termíny elipticity, molární elipticitu  $[\Theta]$ , která se udává v jednotkách  $\text{stupně} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ .

Některé přístroje měří rovnou elipticitu  $\Theta$  ve stupních. Molární elipticitu lze potom vypočítat

$$[\Theta] = \Theta \cdot M / c \cdot l \cdot 10,$$

kde  $[\Theta]$ -molární elipticita ve stupních  $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$

$\Theta$ -elipticita odečtená z přístroje

M-relativní molekulovou hmotnost zkoušené látky

c-koncentrace zkoušeného roztoku ( $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

l-tloušťka kyvety (cm)

Vzájemný vztah mezi molární elipticitou a molárním cirkulárním dichroismem:

$$[\Theta] = 2,303\Delta\varepsilon (4500/\pi), \text{ přibližně } 3300\Delta\varepsilon.$$

Molární elipticita se často využívá při analýze bílkovin a nukleových kyselin. Molární koncentrace se v tomto případě vyjadřuje jako monomerní zbytek, který získáme, když vydělíme molekulovou hmotnost počtem aminokyselin. Střední relativní molekulová hmotnost monomerního zbytku pro bílkoviny je 100 až 120, nejčastěji 115. V případě nukleových kyselin ve formě sodných solí jde o hodnotu 330 (Český lékopis 2002).

#### 2. 1. 4. MNOŽSTVÍ VZORKU POTŘEBNÉ PRO MĚŘENÍ CD

Množství vzorku pro měření CD vychází z potřeby udržet absorbanci nižší než 1. Vhodná šířka kyvety pro měření ve vzdáleném UV spektru je 0,01 až 0,05 cm a koncentrace proteinu 0,2 až 1 mg/ml. V závislosti na použité kyvetě bývá objem vzorku od 1 ml až po tak malý objem jako je 50  $\mu$ l. K získání ucházejícího CD spektra ve vzdálené UV oblasti stačí množství proteinu 10  $\mu$ g. Pro záznam spektra se však zpravidla používá množství 100 až 500  $\mu$ g vzorku.

CD signály v blízké UV a viditelné oblasti spektra jsou mnohem slabší než ve vzdáleném UV, což vyjadřuje mnohem nižší molární koncentrace chromoforů ve srovnání s těmi z peptidických vazeb, které se projeví ve vzdálené UV oblasti. Pro měření v této oblasti spektra se používá koncentrace proteinu 0,5 až 2 mg/ml a šířka kyvety 0,5 až 2 cm. Pro tyto pokusy je potřeba množství proteinu v řádu několika mg (Kelly a Price 2000).

Velmi užitečné informace lze získat při měření CD spekter za nízké teploty (tekutý dusík, 77 K) s využitím směsi rozpouštědel. Při nízkých teplotách může být značně zesíleno rozlišení. Nízké teploty umožňují také sledovat strukturu zmrazených konformačních stavů, které by se při vyšších teplotách rychle vzájemně přeměňovaly (Strickland 1974).

#### 2. 1. 5. CHARAKTERISTIKA METODY

Měření spekter CD je významnou strukturální technikou. Její výhodou je, že je to metoda rychlá a pohodlná. Měření CD může být provedeno rychle, poskytuje kvalitní spektra ve vzdálené i blízké UV oblasti během 30 min ve srovnání s rentgenovou krystalografií a NMR. Studie spekter CD ve vzdálené UV oblasti vyžadují pouze malé množství materiálu. CD je nedestruktivní metoda, je tudíž možné provádět více experimentů s tímž vzorkem. Vzhledem k tomu, že lze používat různé velikosti kyvet, je možno studovat široké rozmezí koncentrací proteinů. Navíc studie CD mohou probíhat za různých experimentálních podmínek (pH,

teplota) jak v roztoku, tak pevném stavu při splnění podmínky omezení absorpce a rozptylu vedlejšího záření (Kelly a Price 2000).

Vývoj umožnil využít stopped flow CD ke sledování strukturálních změn proteinů, které se vyskytují v řádu desítek milisekund (Clarke a Jones 1999).

Hlavním omezením CD je relativně malé rozlišení struktury proteinů. Ačkoli vzdálené UV CD umožňuje spolehlivě odhadnout sekundární strukturu proteinu ( $\alpha$ -helix,  $\beta$ - skládaný list, atd.), jde pouze o souhrnný tvar. Neinformuje však, jaký je strukturní typ té které oblasti proteinové struktury. Měření CD také samo o sobě nestačí pro získání detailnějšího pohledu na terciární strukturu proteinu (Strickland 1974).

I přes tato omezení hraje CD důležitou roli ve strukturální práci, zvláště v kombinaci s ostatními technikami. CD je hojně využíván také na poli proteinového inženýrství. S využitím CD lze rychle vyhodnotit charakteristiky sekundární a terciární struktury řady mutantních proteinů, což umožňuje rychlou selekci mutantních proteinů se změněnou strukturou, které mohou být charakterizovány detailnějšími strukturálními technikami (Robertson a Nimmo 1995).

Autoři sledovali dvě mutantní formy isocitrátlyasy z *E. coli*, u kterých byl cystein Cys 195 nahrazen alaninem nebo serinem. Tato záměna vedla ke ztrátě aktivity. Závěry studie posílily již dříve vyslovenou myšlenku, že Cys 195 je esenciální pro katalytickou aktivitu tohoto enzymu.

Další limitací CD je to, že poskytuje málo detailních informací o kvarterní struktuře proteinů. Změny v kvarterní struktuře proteinů mohou být zachyceny ve vzdáleném a blízkém UV pouze tehdy, pokud je tvorba oligomerů doprovázena změnami v sekundární struktuře podjednotek, jako v případě od GCN4 odvozeného peptidu (Weiss se sp. 1990), nebo v oblasti zbytků aromatických aminokyselin, jako u inzulínu, kde asociace podjednotek do hexamerů je doprovázena změnami prostředí tyrosinových postranních řetězců (Woody a Dunker 1996).

Častějším přístupem pro vyšetření vztahu mezi kvarterní a sekundární nebo terciární strukturou by bylo použít techniky jako je gelová permeace, ultracentrifugace, rozptyl záření nebo chemický cross link ve spojení s CD měřením (Jaenicke 1987).

Ve srovnání s CD spektrometrií rentgenová krystalografie poskytuje detailní informace na úrovni atomů. Poskytuje však pouze statický obraz proteinu. Je limitující, co se týče dynamických aspektů proteinové struktury, které jsou rozhodující pro funkci proteinu (Wess 1997).

NMR je zase metodou, která vyžaduje relativně vysoké koncentrace vzorku (0,5 - 2 mM). Problémem je, že řada proteinů není za těchto podmínek dostatečně rozpustná nebo mají

sklon k agregaci. Pro určení struktury je nezbytné změřit jednotlivé rezonance. To vyžaduje multidimensionální NMR techniky a drahé značení stabilními isotopy ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) (James a Oppenheimer 1994). Je ale třeba zdůraznit, že metoda NMR je schopna získat řadu informací jak o struktuře, tak o dynamických aspektech proteinů.

## 2. 1. 6. CD VYUŽÍVAJÍCÍ SYNCHROTRONOVÉ ZÁŘENÍ

Synchrotronové záření vzniká, když jsou nabitě částice urychleny magnetickým polem. Jedná se o elektrony, které se pohybují rychlostí blízkou rychlosti světla. Intenzivní záření je vytvářeno širokou oblastí vlnových délek od X-záření po IČ záření. Tento fakt přinesl nové příležitosti v oblasti strukturální biologie.

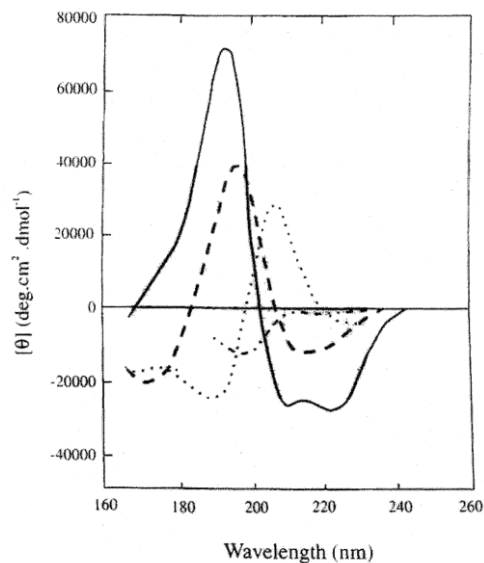
Co se týče CD, největší výhodou urychlovače (synchrotronu) je velký nárůst (až 1000x) intenzity ve vzdálené UV oblasti (pod 200 nm) ve srovnání s xenonovým obloukem jako je tomu při běžných CD instrumentacích (Sutherland 1995).

Např. Clarke a Jones (1999) využili synchrotronové záření pro studium proteinů klatrinového pláště. Sledovali kompletování klatrinových plášťových proteinů, které se účastní receptorem zprostředkované endocytózy. Protein klatrinového pláště je složen z trojhranu (trojnožky), který je tvořen třemi těžkými řetězci, třemi lehkými řetězci a poskládanými polypeptidy. Celý plášťový protein stejně jako různé konstituční polypeptidové řetězce a proteolytické fragmenty byly studovány při pH 6 a 8 v závislosti na podmínkách skládání a rozkládání. Výsledkem detailních analýz sekundární struktury bylo zjištění, že během procesu skládání nedochází k výrazným změnám v sekundární struktuře proteinů.

Dřívější CD studie kompletování proteinů se potýkaly s problémy, limitovaným rozsahem vlnových délek a deformacemi způsobenými rozptylem ve zvířených vzorcích. V synchrotronovém CD systému byl problém odstraněn blízkostí vzorku a detektoru, větší intenzita zdroje umožnila rozšířit rozsah vlnových délek směrem dolů až k 175 nm pro rozvířené vzorky (Kelly a Price 2000).

## 2. 1. 7. CHROMOFORY SLEDOVANÉ V CD STUDIÍCH PROTEINŮ

Dalším pozitivem CD je, že lze sledovat různé aspekty struktury proteinů. Ve vzdáleném UV je hlavní absorbující skupinou peptidová vazba. Studie v této oblasti vlnových délek mohou podat informace o sekundární struktuře.



Obr. 2 Vzdálená UV CD spektra spojená s různými typy sekundární struktury proteinů. Plná čára odpovídá struktuře  $\alpha$ -helixu, čárkovaná antiparalelnímu  $\beta$ -skládanému listu, tečkovaná  $\beta$ -ohybům a střídavě čárkovaná a tečkovaná nepravidelné struktury (Kelly a Price 2000).

V blízké UV oblasti postranní řetězce aromatických aminokyselin (Phe, Tyr, Trp) absorbují v oblasti vlnových délek 250 až 290 nm. Terciární uspořádání polypeptidového řetězce umístí postranní řetězce v chirálním prostředí a tím dá vzniknout CD spektrům, která slouží jako charakteristický otisk prstu nativní struktury. Na modelových strukturách obsahujících disulfidickou vazbu se tato vazba projevila CD spektrem v oblasti 240 až 290 nm (Kelly a Price 2000).

Problematické je provedení těchto analýz v případě proteinů, které obsahují více disulfidických vazeb. Může u nich docházet k překrývání signálů disulfidových vazeb se signály z postranních řetězců aromatických aminokyselin (Chaffotte se sp. 1992).

Navíc nebílkovinné složky nebo kofaktory, jako pyridoxal-5-fosfát, hem, flavin, bakteriochlorofyl nebo další ligandy mohou absorbovat ve spektru odděleně od aminokyselin a peptidických vazeb, čímž zajišťují detailní informace o prostředí a možných interakcích mezi kofaktory nebo ligandy (Kelly a Price 2000).

#### 2. 1. 7. 1. Peptidová vazba

Jak bylo uvedeno výše, hlavní absorbující skupinou ve vzdálené UV oblasti (240 nm až 180 nm nebo ještě níže v případě synchrotronového CD) je peptidická vazba. Jde o slabý, ale široký



přechod  $n \rightarrow \pi^*$  kolem 210 nm a intenzivní přechod  $\pi \rightarrow \pi^*$  kolem 190 nm. Studie CD ve vzdáleném UV jsou užívány ke kvantitativnímu zhodnocení celkové sekundární struktury proteinu. Již mnoho let je jasné, že peptidy se vyskytují v různých formách sekundární struktury a že bílkoviny vykazují rozdílná spektra viz obr. 2 (Kelly a Price 2000).

#### 2. 1. 7. 2. Postranní řetězce aromatických aminokyselin

CD v blízké UV oblasti proteinů vzniká v prostředí každého postranního řetězce aromatických aminokyselin. Stejně tak mohou přispívat disulfidické můstky nebo neproteinové kofaktory, které též mohou absorbovat v této spektrální oblasti (Strickland 1974).

Malé modelové sloučeniny složené z aromatických aminokyselin vykazují CD spektra, protože chromofory jsou připojeny v sousedství chirálního  $\alpha$ -uhlíkového atomu. Co se týče proteinů v nativním stavu, na postranní řetězce aminokyselin působí různá asymetrická prostředí terciární struktury složeného proteinu. Detailní analýzou blízkého UV CD spektra se zabývalo více autorů, např. Strickland (1974) nebo Kahn (1979). Každá aromatická aminokyselina vykazuje charakteristický profil vlnových délek. Tryptofan vykazuje pík v blízkosti 290 nm, jemnou strukturu mezi 290 a 305 nm, tyrosin pík mezi 275 a 282 nm, jemná struktura může být při vyšších vlnových délkách zastíněna píkem tryptofanu. Fenylyalanin má jemnou strukturu mezi 255 až 270 nm. Tato struktura vzniká vibračními přechody, ve kterých jsou obsaženy jednotlivé vibrační hladiny excitovaného stavu.

Existuje řada faktorů, které mohou ovlivnit CD spektra aromatických aminokyselin, např. rigidita proteinu, s mobilnější postranními řetězci mají nižší intenzitu, a charakter prostředí (vodíkové můstky, polární skupiny, polarizovatelnost).

Navíc CD spektrum může být pozměněno interakcemi mezi aromatickými aminokyselinami, zvláště pokud je vzdálenost mezi nimi menší než 1 nm (Kelly a Price 2000).

Rozhodujícím faktorem je počet aromatických aminokyselin v proteinu. Proteiny s vysokým počtem aromatických aminokyselin mohou vykazovat slabší CD signály než by se očekávalo z důvodu rušivého vlivu pozitivních a negativních příspěvků, jak je tomu např. u aspartátkarbamoyltransferasy (Griffin se sp. 1972) nebo karboanhydrasy (Fresgard se sp. 1994).

Příspěvek jednotlivých aromatických aminokyselin do výsledného blízkého UV CD spektra proteinu může být vyhodnoceno měřením CD spekter vhodných mutantních proteinů. Touto problematikou se ve své práci zabývá např. Fresgard se sp. (1994). Autoři sledovali

příspěvek jednotlivých tryptofanů, kterých se v molekule lidské karboanhydrasy II nachází sedm, s využitím mutantů, v nichž byly postupně jednotlivé tryptofany nahrazeny. Tryptofany se projevují v CD spektru jak v blízké, tak ve vzdálené UV oblasti. Byla změřena CD spektra jednotlivých tryptofanů. Spektra potvrdila, že tryptofany se podílí na CD spektru téměř v celé oblasti sledovaných vlnových délek (180-310 nm). Spojení spekter CD jednotlivých tryptofanů poskytlo spektrum kvalitativně podobné spektru lidské karboanhydrasy II. Z toho plyne, že tryptofany jsou základní determinanty této části CD spektra. Bylo zjištěno, že každý z tryptofanů značně přispívá v blízkém UV CD spektru. Zároveň bylo prokázáno, že každý z postranních řetězců se viditelně podílí nejen v blízkém, ale i ve vzdáleném UV CD spektru. Tyto poznatky mají obecnější význam pro proteiny, které stejně jako lidská karboanhydrasa II mají ve struktuře několik tryptofanů.

Blízká UV CD spektra slouží jako otisky prstů (fingerprints) pro porovnávání terciární struktury u blízkých proteinů, např. u divokého a mutantního proteinu (Kelly a Price 2000).

#### 2. 1. 7. 3. Disulfidická vazba

Jak již bylo zmíněno, také disulfidická vazba absorbuje v blízké UV oblasti. Absorbce se vyskytuje v blízkosti vlnové délky 260 nm a je poměrně slabá. Intezita závisí obecně na faktorech jako je dihedrální (torzní) úhel disulfidické vazby, úhel vazby C-S-S a efekty sousedních skupin. Navíc poloha absorpčních a CD signálů závisí na dihedrálním úhlu (Kelly a Price 2000).

Z teoretických a experimentálních studií spekter CD modelových cystinylových sloučenin, které zahrnují malé peptidové hormony, bylo možno vyvodit tzv. kvadrantové pravidlo týkající se zápisu dlouhovlnného signálu a dihedrálního úhlu (Strickland 1974, Kishore se sp. 1988). Pro úhly menší než 90°, pozitivní dlouhovlnný signál indikuje pravotočivý smysl disulfidu a negativní signál levotočivý. Pro úhly větší než 90° platí opačné pravidlo.

Není jasné, do jaké míry je možno toto pravidlo aplikovat v případě větších proteinů, protože CD signály disulfidů jsou zpravidla mnohem širší než signály aromatických aminokyselin a je obtížné vyhodnotit jejich příspěvek k celkovému spektru.

#### 2. 1. 7. 4. Neproteinové chromofory

CD spektrum v blízké UV, ve viditelné a blízké IČ oblasti může podat značné množství informací z prostředí kofaktorů, které hrají zásadní roli v aktivitě proteinů, nebo o jiných

nekovalentně vázaných ligandech. Volné ligandy nebo kofaktory zpravidla vykazují malý nebo žádný signál CD. Pozorované CD signály poukazují na chiralitu vazebného místa ligandu nebo kofaktoru. Ztráta integrity vazebného místa během změny struktury proteinu může být monitorována změnami v CD signálu. Je však potřeba počítat s tím, že změna v absorpenci kofaktoru na disociaci z proteinu je podstatně menší (Kelly a Price 2000).

### Pyridoxal-5-fosfát

Pyridoxal-5-fosfát (PLP) je koenzymem tzv. pyridoxalových enzymů. Je tudíž využíván řadou enzymů podílejících se metabolismu aminokyselin, jako jsou aminotransferasy a dekarboxylasy. Reakční cyklus zahrnuje protonované iminové intermediáty. PLP je také kofaktorem glykogenfosforylasy, přičemž se předpokládá, že jeho fosfátová skupina hraje roli kyseliny při působení anorganického fosfátu na glykogenový substrát (Johnson a Barford 1990). Pokud je PLP připojen k proteinu, jeho absorpční spektrum vykazuje maximum kolem 350 nm.

Na rozdíl od opticky inaktivního volného koenzymu pyridoxal-5-fosfátu, PLP vázaný na apoenzym aminotransferasy vykazuje optickou aktivitu. To umožňuje využívat ke studiu aminotransferas spektra cirkulárního dichroismu, která jsou ve viditelné oblasti podobná spektrům PLP (Martinez-Carrion se sp. 1970).

### Flaviny

Flaviny (flavinmononukleotid, FMN a flavinadenindinukleotid, FAD) hrají významnou redoxní roli v elektronovém transportním řetězci stejně jako v řadě enzymů katalyzovaných oxidačních reakcí substrátů (aminokyselin, hydroxykyselin).

Konverze oxidovaného flavinu na redukovaný zahrnuje transfer dvou elektronů. Flaviny mají schopnost tvořit semichinonové radikálové meziprodukty mezi oxidovaným a redukovaným stavem, což umožňuje přenos elektronu mezi organickými substráty (dvouelektronové donory-akceptory) a jednoelektronovým donorem/akceptorem. V případě flavocytochromů se elektrony přenáší jeden po druhém na akceptor přes polovinu hemu.

Oxidovaná forma volných flavinů vykazuje dva absorpční píky při 360 a 450 nm, redukovaná forma zase širokou absorpci v oblasti 300 až 500 nm. Neutrální semichinon má charakteristickou slabou absorpci kolem 600 nm, anionický semichinon silnou absorpci při 380 nm (Macheroux 1999).

Shrnutím CD studia flavoproteinů se ve své práci zabývali Munro se sp. (1999). Autoři uvádí, že zatímco volné flaviny vykazují pouze velmi malý viditelný CD, disociace kofaktoru zpravidla vede k téměř kompletní ztrátě signálu. Změny v reakčním prostředí flavinů mohou být zachyceny jako změny ve viditelném CD signálu. Je složité předvídat velikost CD signálu flavinu specificky navázaného na bílkovinu. CD signál také může být pozitivní nebo negativní, takže v mult flavinovém systému se mohou signály navzájem překrývat. Důležitým faktorem je také síla vazby flavinu na protein. Pokud je flavin připojen pouze slabou nekovalentní vazbou, pak za experimentálních podmínek značná část flavinů není vázána na protein a nepodílí se tudíž na viditelném CD spektru. Co se týče proteinů jako je bakteriální flavodoxin, v jehož případě je  $K_D$  FMN velmi malá, disociace bude za běžných podmínek sběru CD dat minimální.

### Hem

Hem hraje řadu rolí v proteinech, např. váže kyslík v hemoglobinu, cytochrom c oxidase nebo cytochromu P450. Je také kofaktorem hydroperoxidasy jako je katalasa nebo slouží jako redoxní kofaktor cytochromu b a c.

Polovina hemu silně absorbuje při 410 nm (Soretův pás) a v závislosti na povaze koordinačních skupin a spinu centrálního atomu železa v oblasti vlnových délek 500 až 650 nm ( $\alpha$  a  $\beta$  pásy) a okolo 350 nm ( $\delta$  pás).

Velký význam má CD při studiu cytochromu P450. Jde o širokou rodinu enzymů, jejíž členové katalyzují na kyslíku závislou hydroxylaci řady organických sloučenin. Název této skupiny enzymů je odvozen z faktu, že po přidání CO se absorpční maximum přesouvá do oblasti vlnové délky 450 nm. Z CD spektra cytochromu P450 lze předpovědět strukturální vlastnosti aktivního místa, jako jsou vodíkové vazby a polarita (Andersson a Peterson 1995).

### Flavocytochromy

Flavocytochromy jsou skupinou enzymů, které obsahují dva redoxní kofaktorové systémy, flaviny (FMN nebo FAD) a hemovou skupinu. Výhodou těchto systémů je působení flavinu jako jednoelektronového přenašeče mezi substrátem a hemem. Mezi flavocytochromy patří např. dehydrogenasy 2-hydroxykyselin. Hemová skupina absorbuje ve stejné spektrální oblasti jako flaviny, ale se zhasacími koeficienty 10x vyššími než v případě flavinů. Může být proto složité provést spektrofotometrickou analýzu flavinů v takových proteinech. Důležité

informace týkající se flavinů v těchto enzymech proto poskytuje CD ve viditelné oblasti (Munro se sp. 1999).

### Fotosyntetické pigmenty

Viditelné a blízké IČ CD spektrum rozpuštěných „light harvesting complexes“ z fotosyntetických bakterií vykazuje řadu píků kvůli karotenoidovým a bakteriochlorofylovým složkám, které absorbují v různých spektrálních oblastech. CD spektrum v oblasti 750 až 900 nm poskytuje citlivý průzkum interakcí mezi sousedícími bakteriochlorofylovými molekulami v komplexu. CD signály v oblasti 450 až 550 nm vznikají z důvodu deformace karotenoidů zkroucením rovin v komplexu. Extrahované karotenoidy rozpuštěné v organických rozpouštědlech jsou opticky inaktivní (Cogdell se sp. 1997).

#### 2. 1. 7. 5. Chromofory nukleových kyselin

CD lze využít k analýze struktury nukleových kyselin a interakcí nukleová kyselina-protein. Baze v DNA a RNA vykazují poměrně široké absorpční píky s maximy v blízkém UV (kolem 260 nm) vzhledem k multiplicitě přechodu  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Doplňkové píky se vyskytují ve vzdálené UV (kolem 200 nm a nižší).

Baze sami o sobě jsou planární a nevykazují žádný vlastní signál CD. Chiralita cukerných zbytků v nukleotidu vyvolává malý CD. Spojování bazí, které se vyskytuje ve struktuře helixu, dává vzniknout rozsáhlým CD signálům. CD spektrum nad oblastí 230 až 300 nm podává informace o sekundární struktuře s rozlišením různých forem DNA (A-, B- a Z-DNA) a i v případě RNA má v této oblasti charakteristickou strukturu (Rodger a Nordén 1997).

#### 2. 1. 8. TYPY PROBLÉMŮ ŘEŠITELNÉ POMOCÍ SPEKTER CD

##### 2. 1. 8. 1. Sekundární struktura peptidů a proteinů

Jak již bylo uvedeno dříve, různé typy pravidelné sekundární struktury v proteinech vytváří odlišný typ vzdáleného UV CD spektra. Získání spektra a odvození příspěvku jednotlivých strukturních forem je limitováno počtem současně se ustalujících rovnováh ovlivňujících vzdálené UV spektrum. V praxi se ukázalo, že toto je složité z řady důvodů. Za prvé je jasné,

že postranní řetězce aromatických aminokyselin (hlavně Trp) přispívají ke vzdálenému UV spektru (viz kap. 2. 1. 7. 2. Postranní řetězce aromatických aminokyselin). Za druhé ke spektru přispívají také disulfidické vazby (viz kap. 2. 1. 7. 3. Disulfidická vazba). Za třetí charakteristiky spekter závisí na délce a pravidelnosti strukturálních elementů v peptidech a proteinech, jak je uvedeno v práci Hirsta a Brookse (1994).

Redukce signálu CD při vlnové délce 222 nm souvisí se ztrátou helicity. Předpokládá se, že zbytková elipticita při 222 nm je přímo úměrná počtu zbytků v helixu. Autoři zjistili, že fragmentace dlouhých helixů bez redukce počtu helikálních zbytků snižuje střední zbytkovou elipticitu při 222 nm. Pohyb proteinů a přesná konformace helikálních zbytků hraje též důležitou roli.

Více přístupů je založeno na propracovaných „curve fitting procedures“ zahrnující soubory spekter dobře charakterizovaných proteinů známé sekundární struktury. Tzv. CONTIN metoda byla představena Provencherem a Glöcknerem (1981). Týká se přímé analýzy CD spektra v oblasti 240 až 190 nm jako lineární kombinace CD spekter 16 proteinů, jejichž struktura byla objasněna s vysokým rozlišením rentgenovou krystalografií. Tento přístup se vyhýbá problému s definováním referenčních spekter a zajišťuje flexibilní analýzu spektra proteinu. Při CONTIN metodě je důraz automaticky kladen na ty proteiny v referenčním setu, jejichž spektra se věrně podobají analyzovanému proteinu.

V metodě „variabilního výběru“ Manavalana a Johnsona (1987) mohou být spektra odstraněna z referenčního setu systematicky tak, aby se stanovilo nejlépe padnoucí. Je to další metoda, která používá k odhadu sekundární struktury proteinu spektra cirkulárního dichroismu. Jde o vylepšení techniky Provenchera a Glöcknera (1981).

Analýza vzdáleného UV CD spektra může být provedena spolehlivěji, pokud jsou data dosažitelná při nízkých vlnových délkách (Johnson 1990). Např. soubor CD dat do 175 nm zlepšuje přesnost určení sekundární struktury okolo 5 % nebo je určení lepší než to, které bylo získáno za pomoci rentgenové krystalografie.

S tradičními CD spektrofotometry bylo někdy složité získat data dostatečné kvality pod 190nm, nebo při 200 nm v biologických systémech, pokud byla nevyhnutelná přítomnost absorbujících složek, jako jsou pufrů. S ohledem na řadu výhod záznamu dat pod 190 nm je zpravidla užitečné pokusit se o přístup do této oblasti. Toho může být dosaženo snížením koncentrace absorbujících komponent, využitím pufrů s nízkou absorbancí nebo používáním úzkých květ, popř. kombinací více metod. Pokud jsou dostupná data pouze z oblasti nad 200 nm, pořád je možno provést docela spolehlivý odhad obsahu  $\alpha$ -helixů v proteinech a

peptidech z elipticit při 208 a 222 nm. Tyto vlnové délky odpovídají charakteristickému dvojitému minimu spektra  $\alpha$ -helixu (Barrow se sp. 1992).

#### 2. 1. 8. 2. Konformační změny v proteinech

Cirkulární dichroismus se ukázal jako ideální technika pro monitorování konformačních změn proteinů, které mohou vznikat jako důsledek změn experimentálních parametrů ( pH, teplota, vazba ligandů atd). Během změny uspořádání proteinu lze analyzovat rozsah konformačních změn k provedení kvantitativního odhadu stability nově uspořádaného proteinu. CD je pro tento účel značně využíván.

V posledních letech roste zájem o schopnost určitých proteinů přecházet mezi různými formami sekundární struktury. Tvorba struktury  $\beta$ -skládaného listu určitých proteinů může působit jako prekurzor tvorby amyloidních fibril, které doprovází degenerativní choroby jako je Alzheimerova choroba, scrapie, BSE (bovine spongiform encephalopathy) atd. Neocenitelným nástrojem pro sledování přechodů ze struktury  $\alpha$ -helixu na  $\beta$ -skládaný list proteinů a peptidů je vzdálené UV CD spektrum.

Strukturální nebo konformační změny mohou být pozorovány za pomoci CD ve vzdáleném UV, v blízkém UV nebo v obou oblastech. Malé konformační změny se pravděpodobně projeví v blízkém UV spektru, protože příspěvky postranních řetězců aromatických aminokyselin na CD spektru jsou citlivé k prostředí. Naopak změny ve vzdálené UV oblasti zpravidla poukazují na velké změny v centrálním řetězci proteinu (Kelly a Price 2000).

Jedna z prvních aplikací CD bylo jeho využití pro pozorování vlivu přidavku kompetitivního inhibitoru N-acetylglukosaminu k lysosomu. Dochází ke 100 % nárůstu píků v blízkém UV CD při vlnové délce 285 a 295 nm, které charakterizují tryptofanový postranní řetězec (Glazer a Simmons 1965).

CD je také hodně využíván např. při sledování R (oxyhemoglobin) a T (deoxyhemoglobin) allosterických přechodů v hemoglobinu. CD spektrum proteinu vykazuje řadu píků v oblasti 270 až 300 nm z důvodu přítomnosti postranních řetězců tyrosinu a tryptofanu a velký pík v oblasti 260 nm kvůli hemové skupině. Z analýzy chování mutantního hemoglobinu a účinku látek jako je inositol hexakisfosfát, který inhibuje strukturální přechody, byl učiněn závěr, že změny v blízkém UV CD spektru mohou být připsány změnám v prostředí Trp-37 na řetězci  $\beta$  a Tyr-42 na řetězci  $\alpha$  (Perutz se sp. 1974).

Zvlášť důležitou roli hraje CD při charakterizaci celkového strukturního stavu proteinů. Tato metoda umožnila mezi prvními demonstrovat přechodný stav mezi nativním a plně rozvinutým stavem.

Např. pokud dochází k inkubaci  $\alpha$ -laktalbuminu při pH 2, protein si udrží většinu své nativní sekundární struktury, jak ukazuje vzdálené UV CD spektrum. Blízké UV CD spektrum proteinu je za těchto podmínek velmi redukováno, což poukazuje na chybějící nativní terciární interakce (Dolgikh se sp. 1981).

Při pH 2 je molekula kompaktní, což vede k termínu „molten globule“ nebo kompaktní intermediát. Stav „molten globule“ představuje důležitý meziprodukt v cestě skládání proteinů. Podle internetové encyklopedie Wikipedia představuje „molten globule“ stabilní, částečně složený stav proteinu vytvořený v mírně denaturačních podmínkách jako je nízké pH (obecně pH 2), mírný denaturant nebo vysoká teplota.

„Molten globules“ (MG) jsou zřícené struktury, které mají zpravidla částečnou, nativnímu stavu podobnou sekundární strukturu, ale dynamickou terciární strukturu, jak je možné pozorovat spektroskopii cirkulárního dichroismu ve vzdálené a blízké UV oblasti. Tyto znaky jsou podobné těm, které lze pozorovat v přechodném intermediárním stavu, který se vytváří během skládání některých proteinů, zvláště globulárních proteinů. Globulární proteiny prodělávají hydrofobní kolaps. Soubory MG během skládání a rozkládání proteinů jsou považovány za zhruba podobné. MG postrádají sbalení postranních řetězců aminokyselin, což je typické pro nativní stav proteinu.

Studie CD hrají důležitou roli při definování charakteristik MG proteinů (Kelly a Price 2000).

### 2. 1. 8. 3. Nové uspořádání („refolding“) proteinů a peptidů

#### Všeobecný pohled

Mechanismus skládání proteinů představuje jeden z mnoha nevyřešených problémů molekulární biologie. Pochopení principu uspořádání proteinů je přitom podstatné, mj. kvůli úspěšné produkci exprimovaných proteinů a pro pochopení molekulární podstaty stále rostoucí řady onemocnění, které vznikají v důsledku špatného uspořádání proteinů (Radford a Dobson 1999).

Je jasné, že proces skládání proteinu je vícestupňový a zahrnuje:

1.) tvorbu prvků rozpoznatelné sekundární struktury ( $\alpha$ -helix,  $\beta$ -skládaný list, ohyby)



- 2.) zborcení rozsáhlého polypeptidového řetězce tak, že vznikne kompaktnější stav, kdy nepolární postranní řetězce jsou ukryty před rozpouštědlem
- 3.) vznik interakcí dalekého dosahu, které charakterizují nativní terciární strukturu a jsou nezbytné pro tvorbu specifických vazebných a katalytických míst
- 4.) asociaci podjednotek v oligomeru (Jaenicke 1987, 1991).

Lze polemizovat o tom, zda existuje všeobsáhlý model skládání proteinů. Cílem je však vytvořit řadu technik, které by pomohly získat potřebná strukturální a kinetická data, aby mohl být navrhnut a testován model skládání proteinů. CD se ukázal jako technika nezbytná pro sledování časných dějů při skládání proteinů (Kelly a Price 2000).

#### Experimentální přístup ke skládání proteinů

Zdaleka nejdetailnější pohled na kinetiku a mechanismus skládání proteinů podaly studie nového uspořádání „refolding“, ve kterých je zralý protein nesložený, rozložený zpravidla vysokou koncentrací urey nebo guanidiniumchloridu. Sbalování proteinů je iniciováno prudkým zředěním denaturačního činidla. Pokus by tudíž mohl zahrnovat inkubaci proteinu v 6 M roztoku guanidiniumchloridu a zředění puřem, což by nastartovalo opětovné skládání. Je nutné zdůraznit, že protein je před zředěním úplně rozložen a že zbytková koncentrace denaturantu po zředění má zanedbatelný vliv na protein. Aby bylo možné stanovit mechanismus nového uspořádání, je potřeba sledovat čas obnovy struktury z denaturovaného stavu a porovnat získaná data s mírou obnovení biologické aktivity. Znovunabytí sekundární struktury lze pozorovat měřením CD ve vzdálené UV oblasti, terciární struktury v blízké UV oblasti a za pomoci fluorescence. Obnovu kvarterní struktury lze sledovat rychlým crosslinkem s glutaraldehydem nebo pomocí hybridizace (Jaenicke 1987).

Vzhledem k rychlosti různých procesů je nezbytné používat rychlé kinetické metody („stopped flow“ a zhášecí metody), stejně jako manuální směšovací metody (Kelly a Price 2000).

### Povaha časných meziproduktů skládání

„Stopped flow“ CD je značně využíván pro sledování vlastností časných meziproduktů skládání proteinů.

V jednom z prvních pokusů tohoto typu provedených Kuwajimou se sp. (1987) bylo ukázáno, že během opětovného skládání denaturovaného ferricytochromu c a  $\beta$ -laktoglobulinu dochází k obnově nativní elipticity ve vzdáleném UV odhadem během 18 ms, což odpovídá mrtvému času přístroje. Naopak k obnově elipticity ve viditelné oblasti (ferricytochrom c) nebo v blízkém UV ( $\beta$ -laktoglobulin) došlo v řádu minut. Výsledky poukazují na fakt, že během 20 ms vzniká meziprodukt, u něhož je přítomen podstatný podíl nativní sekundární struktury. Intermediát také vykazuje lehce stabilní terciární strukturu.

Podobných výsledků bylo dosaženo v řadě studií s různými proteiny, např. s  $\alpha$ -laktalbuminem provedené Gilmanshinem a Ptitsynem (1987) s využitím CD a vnitřní (intrinsic) fluorescence. Potvrdili, že intermediát má značný podíl sekundární struktury a ve své struktuře má nepolární klastry, ale nemá rigidní terciární strukturu. Na základě těchto výsledků bylo navrženo, že proces skládání proteinů prochází stádiem meziproduktu vykazujícího charakteristiky „molten globule“.

#### 2. 1. 8. 4. Navrhování proteinů a peptidů

CD je velmi užitečným nástrojem pro charakterizaci struktury peptidů a proteinových fragmentů, které byli připraveny jako specifické struktury a tudíž vykazují příslušnou biologickou funkci. Tento postup není významný jen pro pochopení vztahu mezi strukturou a funkcí, ale má také technologickou důležitost, protože fragmenty proteinů mohou být podstatně stabilnější než odpovídající tzv. full size proteiny (Kelly a Price 2000).

Zároveň narůstá důležitost představy, že stabilní proteinové fragmenty nebo vytvořené peptidy mohou být základem nástroje molekulárního switchingu (Aggeli se sp. 1997).

Studie proteinových fragmentů umožňuje také nahlédnout do některých z časných stádií skládání proteinů. Některé z fragmentů mohou sloužit jako jádra pro řízení dalšího skládání.

Z informací o preferenci sekundární struktury jednotlivých aminokyselin nebo sekvencí aminokyselin bylo možné navrhnout oligopeptidy, které vykazují tendenci k tvorbě  $\alpha$ -helixů v roztoku (Dyson a Wright 1991).

Modelové peptidy pro strukturu  $\beta$ -skládaného listu jsou méně prozkoumány, ale mohou mít zajímavé strukturní a mechanické vlastnosti. Peptidy tvořící strukturu  $\beta$ -skládaného listu

v lipidové dvojvrstvě způsobí, že amfifilní rozpouštědla jako methanol se vmezeří do struktury molekulární „stuh“. Spektrální (CD) vlastnosti těchto peptidů poukazují na přítomnost struktury anti-paraletního  $\beta$ -skládaného listu, elektronová mikroskopie a rentgenová difrakce potvrdily existenci stuh. Tyto stuh jsou jednotlivé molekuly. Z těchto výsledků bylo možné navrhnout nové peptidy různé polaroty, které tvoří stuhu  $\beta$ -skládaného listu. Tyto proteiny mohou být využity jako součásti mechanických a fyzických spouštěcích zařízení, stejně tak umožňují nahlédnout do tvorby fibril u různých degenerativních onemocnění (Aggeli se sp. 1997).

#### 2. 1. 8. 5. Membránové proteiny

V posledních letech dosáhl výzkum integrálních membránových proteinů značného pokroku. Membránové proteiny ale pořád tvoří pouze malou část proteinů s objasněnou strukturou (Garavito 1998). Hlavním důvodem je obtížné získávání vhodných krystalických preparátů integrálních membránových proteinů za podmínek, za kterých se předpokládá, že jejich struktura odpovídá nativnímu proteinu v membráně.

Většina strukturálních studií integrálních proteinů se provádí na preparátech, které byly získány extrakcí z membrány vhodnými detergenty. Přídavek krystalizačního činidla a amfifilů k extrahovaným proteinům vede ke vzniku krystalů dobré kvality pro difrakční studie (Cogdell and Lindsay 1996).

Dalším problémem při práci s membránovými proteiny je fakt, že je obtížné zjišťovat biologickou aktivitu extrahovaných proteinů, zejména těch, které mají transportní, vazebnou nebo strukturní funkci.

CD představuje důležitou metodu při studiu membránových proteinů, mj. z důvodu zhodnocení efektu různých detergentů na protein. V práci Swordse a Wallaceho (1993) je uvedeno, že solubilizace bakteriorhodopsinu v neionogenním detergentu oktylglykosidu vedla k signifikantním změnám v sekundární struktuře, což bylo zachyceno ve vzdáleném UV CD spektru malým posunem absorpčního maxima ve srovnání se spektrem nativního membránového fragmentu.

Kromě membránových proteinů, které jsou tvořeny transmembránovými helixy a představují řadu membránových proteinů (bakteriorhodopsin, receptory spojené s G-proteinem), se ukazuje, že vnější membrány jsou bohaté na  $\beta$ -„soudkovité“ struktury. Typickým představitelem proteinu tohoto typu je porin. Porin se skládá z 16 vláken antiparalelního  $\beta$ -

skládaného listu, která jsou poskládána tak, že tvoří  $\beta$ -soudkovitou strukturu (Weiss se sp. 1991).

Membránové proteiny, které nejsou hluboce zapaštěné v membráně, jsou snáze charakterizovatelné, protože je jednodušší připravit je v rozpustné formě. Příkladem je kinetoplastidový membránový protein-11 (KMP-11). KMP-11 je hlavní složkou povrchu membrány leishmanií a pravděpodobně hraje významnou roli při internalizaci parazitů do hostitelské buňky. Pomocí CD bylo zjištěno, že rekombinantní KMP-11 vykazuje vysoký helikální obsah (75 %). Pravděpodobně je složen z řetězců aminokyselin uspořádaných do dvou helixů, které jsou odděleny krátkou oblastí náhodného klubka. Přítomnost helixů bude usnadňovat interakce proteinů s lipidy a zodpovídat za schopnost proteinů porušit stabilitu membrány (Fuertes se sp. 1999).

#### 2. 1. 8. 6. Interakce mezi doménami v proteinech

Většina polypeptidových řetězců větších než 30 kDa má tendenci existovat jako mnohonásobné domény, tj. jako nezávisle skládané jednotky (Price a Stevens 1999). I když v některých multidoménových proteinech je možno izolovat jednotlivé domény limitovanou proteolýzou nativního proteinu, hlavní objevy v této oblasti byly získány aplikací rekombinantních DNA technik. Tyto metody umožnily přípravu velkých množství proteinu definovaných domén. Lze charakterizovat jednotlivé domény a interakce mezi nimi v proteinu. K řešení těchto otázek se také často používá CD jako strukturální metoda (Kelly a Price 2000).

Systém cytochromu P-450 BM-3 z *Bacillus megaterium* je výborným modelem savčího systému cytochromu P-450, který se podílí na metabolismu léčiv a jiných xenobiotik. Dva redoxní systémy BM-3 flavocytochromu, tj. flavinová doména, složená ze subdomén FMN a FAD, a P-450 hem obsahující doména, jsou v intaktním polypeptidu navzájem kovalentně spojeny. BM-3 je solubilním enzymem a jeho konstituentní domény a subdomény mohou být získány s vysokým výtěžkem (Miles se sp. 1992). Experimenty, ve kterých byly v různých poměrech smíchány flavinová a P-450 doména BM-3 flavocytochromů, poukázaly na fakt, že rozsah celkové reakce měřené jako NADPH-dependentní hydroxylace dodekanové kyseliny byl minimálně 500x nižší než v intaktním BM-3 systému. CD napomáhá odůvodnění tohoto jevu. CD spektrum ve vzdálené UV oblasti získané pro intaktní BM-3 bylo shodné se spektrem směsi nebo algebraického součtu domén. Kovalentní vazba má tudíž malý vliv na celkovou sekundární strukturu domén. Byly však zjištěny značné rozdíly v CD spektru

v blízké UV oblasti a ve viditelné oblasti spektra. V intaktní BM-3 jsou charakteristická prostředí postranních řetězců aromatických aminokyselin a flavinových a hemových kofaktorů. Ačkoli CD spektra nedokáží určit povahu změn v prostředí chromoforů, lze předpokládat, že umožňují účinný transfer elektronů v BM-3. Elektronový transfer mezi izolovanými doménami je podstatně menší než v intaktním flavocytochromu.

Studie spekter cirkulárního dichroismu ukázaly, že vazba domén v intaktním P-450 BM-3 vytvoří prostředí hemu a aminokyselin vhodné pro účinný přenos elektronu z flavinové domény (Munro se sp. 1994).

CD bývá používán ve spojení s dalšími biofyzikálními metodami za účelem zjištění vztahu mezi jednotkami v řadě proteinů složených z jednotek. Jedná se o řadu proteinů imunitního systému, komplementu, srážecí kaskády a extracelulární matrix. I když v těchto proteinech každá jednotka vykazuje určitou sekvenci a tím i určitý strukturní rámec, díky variabilitě nekonzervativních oblastí v jednotkách nebo způsobu jejich skládání lze dosáhnout značné rozmanitosti (Kirkitaдзе se sp. 1999).

Je možno zmínit jeden významný znak těchto jednotkových systémů z oblasti vzdáleného UV CD. Vykazují neobvyklou pozitivní elipticitu při vlnové délce 240 nm. Přesný důvod tohoto jevu není znám, odráží však příspěvek neměného jádra tryptofanu postranních řetězců, která se nachází v blízkosti jednoho ze dvou zcela zachovaných disulfidických můstků v každé jednotce (Craig se sp. 1989).

#### 2. 1. 8. 7. Vazba ligandů a hledání nových léčiv

Vazba ligandu na protein způsobuje vznik signálu CD navázaného ligandu. Ke vzniku signálu dochází vazbou ligandu tak, že vzniká asymetrické centrum.

Navázání ligandů může vést ke konformačním změnám, které jsou esenciální pro biologickou funkci proteinů. Tyto změny mohou být zachyceny vzdáleným a blízkým UV CD spektrem (Kelly a Price 2000).

V posledních letech roste zájem o možnost využití dostupných strukturálních informací o proteinech k navržení vhodných inhibitorů, které mohou působit jako specificky zacílená léčiva nebo přinejmenším jako potenciální vůdčí struktury při hledání specifických léčiv (Appelt se sp. 1991).

V této oblasti bylo dosaženo určitých úspěchů, např. navržení inhibitorů angiotensin-konvertujícího enzymu (ACEI), hojně využívaných jako antihypertenziv. Jiným příkladem

bylo navržení inhibitorů HIV proteasy, která je nezbytná pro tvorbu virionů a maturaci viru a je tudíž považována za výborný cíl.

Proces navrhování zahrnuje kombinaci strukturálních informací získaných pomocí rentgenového záření, NMR a detailních aritmetických modelů interakcí mezi ligandem a proteinem. CD doposud nehrálo významnější roli v tomto procesu, protože strukturální informace poskytované CD jsou nižšího rozlišení (Wlodawer a Vondrasek 1998).

Také práce Jonese se sp. (1998) naznačuje roli CD v oblasti navrhování nových léčiv. Práce se týká potenciálních cílových proteinů, rozhodujících v procesu virové infekce HIV-1. Tyto tzv. terče obsahují glykosylované plášťové proteiny (gp120 a gp41), které zůstávají na povrchu virové částice a jsou zapojeny ve vazbě a fúzi s hostitelskými receptorovými buňkami. Výsledky pokusu vypovídají, že komplex gp41-gp120 podléhá konformačním změnám doprovázeným připojením proteinu gp120 na cílovou buňku. Tato konformační změna se jeví jako rozhodující v přeměně gp41 na formu kompetentní k fúzi. Předcházení této přeměně je dobrou strategií při vývoji úspěšných léčiv proti virovým infekcím.

## 2. 1. 9. SOUHRN O METODĚ

CD je strukturální technikou, která hraje důležitou roli při doplňování metod s vysokým rozlišením, jako je rentgenová krytalografie a NMR. Síla metody tkví v její ekonomičnosti na požadované vzorky a rychlosti získávání dat. Lze předpokládat, že v budoucnu značně vzroste oblast proteinů ke studování. Nárůst odráží potřebu identifikace řady genů a pseudogenů z projektů sekvenování genomu a vývoj zlepšených systémů exprese pro takové geny. CD bude hrát významnou roli při charakterizaci těchto genových produktů (Kelly a Price 2000).

## 2. 2. TRANSAMINASY

Enzymy katalyzující transaminační reakce jsou v oficiální „Enzymové nomenklatuře 1978“ (International Union of Biochemistry 1979) nazývány aminotransferasy. Pro každodenní používání je povoleno synonymum transaminasy. V doporučení IUB z roku 1978 bylo uvedeno 60 záznamů v podpodskupině transaminačních enzymů (EC 2. 6. 1. . .). Tento seznam je však předmětem další expanze i příležitostného odstraňování. Isoenzymy, druhově specifické varianty a další „multiple forms“ nejsou uvedeny odděleně (Braunstein, 1985).

Harperova Biochemie (23. vydání) popisuje transaminaci jako vzájemnou přeměnu páru aminokyselin a páru ketokyselin, obecně libovolné  $\alpha$ -aminokyseliny a  $\alpha$ -ketokyseliny.

Transaminace se mohou zúčastnit i jiné aminoskupiny kromě  $\alpha$ -aminoskupiny a jiné karbonylové skupiny kromě  $\alpha$ -karbonylové skupiny, toto je však méně obvyklé. Transaminace je plně reverzibilní a její rovnovážná konstanta je rovna přibližně 1. Jak již bylo řečeno, z důvodu reverzibility se aminotransferasy (transaminasy) účastní jak katabolismu aminokyselin, tak jejich biosyntézy. Koenzymem všech aminotransferas je pyridoxal-5'-fosfát, je tudíž součástí jejich katalytického místa. Pyridoxalfosfát je koenzymem i dalších enzymů, které mají jako substrát aminokyseliny.

### 2. 2. 1. PRŮBĚH TRANSAMINACE

V prvním kroku transaminace dochází ke vzniku enzymově vázané Schiffovy baze mezi pyridoxalfosfátem a aminoskupinou stabilizované interakcí s kationtovou oblastí aktivního místa enzymu. Během transaminace vázaný pyridoxalfosfát slouží jako přenašeč aminoskupiny. Dojde k uvolnění ketokyseliny a na enzymu zůstane navázaný pyridoxaminfosfát. Ten poté vytvoří novou Schiffovu bazi s druhou ketokyselinou.

Každá aminotransferasa je specifická pouze pro jeden pár  $\alpha$ -aminokyseliny a  $\alpha$ -ketokyseliny, ale nespecifická je pro jiný pár. K nejběžnějším aminotransferasám u člověka patří sérová alaninaminotransferasa (ALT) a aspartátaminotransferasa (AST). Transaminasy (AST, ALT) jsou známy jako markery orgánového poškození. Stanovuje se jejich aktivita v krvi.

Aminotransferasy katalyzují zvrátne reakce. ALT tvoří pyruvát z alaninu a přenáší jeho aminoskupinu na 2-oxoglutarát. AST vytváří z aspartátu oxalacetát a z 2-oxoglutarátu glutamát. Výsledný L-glutamát je jedinou aminokyselinou savčích tkání, která je oxidativně deaminována dostatečnou rychlostí. Amoniak z  $\alpha$ -aminoskupin je tvořen především z dusíku  $\alpha$ -aminoskupiny glutamátu. Transaminace není striktně vázána na  $\alpha$ -aminoskupiny, k transaminaci dochází např. i na  $\delta$ -aminoskupině ornitinu (Harperova biochemie).

### 2. 2. 2. HISTORIE TRANSAMINAS A TRASAMINAČNÍCH REAKCÍ

Pro zpracování této části rešerše byla využita publikace Biochemistry : A Series of Monographs, Volume 2, Transaminases. Část zpracovaná Alexandrem E. Braunsteinem (1985) se týká historického vývoje pohledu na metabolismus aminokyselin a transaminační reakce.

Do roku 1930 neexistoval dostatek experimentálních nástrojů, komerčně dostupných metabolitů a speciálních činidel. Tyto nedostatky byly hlavní překážkou pro objasnění metabolických cest a charakterizaci jednotlivých reakcí a enzymů v nich obsažených. V letech 1936-1937 Braunstein se sp. studovali na Institutu experimentální medicíny A. M. Gorkého v Moskvě transformace aminokyselin ve zvířecích tkáních. Autoři však neměli zatím k dispozici důkladné výzkumné nástroje. Využívali vizuální odhad několika amino- a oxokyselin v Dubosqových kolorimetrech nebo zdlouhavé série stanovení frakcí dusíku aminoskupiny s využitím volumetrické metody Van Slykea a podobné metody. S tímto vybavením bylo možné získat pouze omezené informace o metabolismu aminokyselin.

Již v roce 1930 bylo odvozeno, že aminoskupiny glutamátu a aspartátu mohou reagovat s reaktivními karbohydrátovými zbytky za vzniku nové aminokyseliny a zbytek dikarboxylátu se přemění na sukcinát. Nebyl však proveden pokus, který by demonstroval úbytek aminodikarboxylátů nebo určil metabolické akceptory aminoskupiny podílející se na reakci.

Od samého začátku však bylo zřejmé, že při inkubaci tkáně svalu za aerobních podmínek přidaný glutamát a endogenní laktát mizí v ekvivalentních množstvích. V nepřítomnosti kyslíku reakce vyžaduje nabídku pyruvátu z vnějšího prostředí. Zřejmý závěr, že vzniklou aminosloučeninou je alanin, byl potvrzen analytickými daty získanými Fürthovou-Kendallovou metodou. Jeho konfigurace byla L, jak bylo uvedeno v podobné studii s aspartátem jako počátečním donorem aminoskupiny.

Konečný bod shiftu aminodusíku z glutamátu k alaninu po tříhodinové inkubaci určil reverzibilní proces, který je přibližně termodynamicky neutrální. Při inkubaci svalových vláken souběžně s glutamátem a pyruvátem nebo alaninem a 2-oxoglutarátem probíhá zároveň i zpětná reakce. Rovnováha se ustaluje přibližně uprostřed. Tyto výsledky a izolace L-glutamátu jako hydrochloridu vyprodukovaného zpětnou reakcí vypovídají o rychlém reverzibilním transferu aminoskupiny ve svalu. Současně dochází k přenosu elektronového páru a protonu mezi donorem (aminokyselina) a akceptorem (oxokyselina). Svalová tkáň nebyla nejprve považována za aktivní v oblasti přeměny aminokyselin a aminů, výše uvedené poznatky však podnítily další výzkum, který potvrdil tyto domněnky.

Od počátku bylo zřejmé, že řada aminokyselin a oxokyselin se může podílet na enzymatickém přenosu aminoskupin, přednostně dvojicí substrátů glutamát/oxoglutarát. Vysoký podíl přenosu aminoskupin a jeho všudypřítomnost poukazuje na důležitou fyziologickou roli těchto reakcí.

Určitou dobu byla rozšířena myšlenka, že přenos aminoskupin má přesný metabolický význam a že je omezen zejména na vzájemné přeměny tří oxokyselin zapojených v cyklech



buněčného dýchání a v glykolýze, oxoglutarátu, oxalacetátu a pyruvátu a odpovídajících aminokyselin, glutamátu, aspartátu a alaninu. Významným objevem bylo objevení in vivo rychlého přesouvání  $^{15}\text{N}$  značených aminoskupin mezi zbytky téměř všech aminokyselin v savčích proteinech. Toto je ukázkou téměř univerzálního rozsahu přenosu aminoskupiny především v glutamátových a aspartátových zbytcích.

V předválečném období (1937-1941) byly připraveny poločistěné enzymové extrakty z kosterní a srdeční svaloviny. Podobnost mezi dobře známým přenosem aminoskupiny mezi aminokyselinami nebo aminy a reaktivními karbonylovými sloučeninami jako jsou chinony, glyoxaly a ninhydrin potvrdila, že enzymatická transaminace je založena na tvorbě a tautomerním přeskupení meziproductů, Schiffových basí. Tento závěr byl podpořen výsledky pokusů s isotopickým značením  $\alpha$ -vodíku nebo aminodusíku. Došlo ke kompletní výměně  $\alpha$ -vodíku a retenci aminodusíku.

Braunstein také naznačuje, že v procesu enzymatické transaminace musí být obsažen speciální zprostředkující akceptor dusíku a /nebo vodíku. Byla zjištěna role fosforylovaného pyridoxalu jako esenciálního kofaktoru enzymatické transaminace.

Po druhé světové válce došlo k nástupu chromatografických metod, elektroforézy a dalších adekvátních technik pro frakcionaci směsí blízkých metabolitů. Umožnily zhodnotit výskyt víceméně selektivních enzymově katalyzovaných přenosů aminoskupin mezi téměř všemi amino- a oxokyselinami ve všech živých buňkách.

### 2. 2. 3. BIOLOGICKÝ VÝZNAM TRANSAMINAČNÍCH REAKCÍ

Jak již bylo zmíněno, v současnosti je známo přibližně 60 aminotransferas, které jsou všudypřítomné. Nicméně stále je platný již dříve učiněný závěr, že zejména u vyšších rostlin a živočichů většina transaminačních reakcí zahrnuje tři oxokyseliny vznikající v glykolýze a respiračním cyklu a jejich aminoanalogy.

Podobně byla také zjištěna všudypřítomnost NAD-dependentní glutamátdehydrogenasy. Šlo o jediný rozpustný enzym katalyzující selektivně a efektivně reverzibilní s dehydrogenací spojenou deaminaci přirozeně se hojně vyskytující L-aminokyselin. Činnost glutamátdehydrogenasy a transaminas představuje hlavní cesty nepřímé deaminace a syntézy jiných přirozených aminokyselin, později označované jako transdeaminace a transreaminace (Braunstein 1957).

Funkce glutamátdehydrogenasy v řadě biologických systémů je spíše katabolická než anabolická. Tento enzym má slabou afinitu k amoniaku, nemůže tudíž katalyzovat aminaci 2-

oxoglutarátu významnější rychlostí. V živých buňkách je rovnováha stále posunuta ve prospěch transdeaminace. Dochází k rychlému odstraňování produktů dehydrogenace glutamátu NAD(P)H reoxidací, 2-oxoglutarátu oxidativní dekarboxylací, redukcí, transreaminací a amoniaku exkrecí nebo přeměnou na močovinu, amidové skupiny atd. Byl objasněn význam transdeaminace ve spojení s minoritními cestami pro disimilaci  $\text{NH}_2$  skupin (Braunstein 1957).

#### 2. 2. 4. SPEKTRÁLNÍ VLASTNOSTI PLP JAKO KOENZYMU VÁZANÉHO V TRANSAMINASACH (AST, ALT)

Zatímco AST je v literatuře zpracována důkladně, o ALT je referováno zřídka. Proto se v dalším textu věnuji také AST jako další představitelce skupiny transaminas.

AST jako transaminasa patří do skupiny enzymů, které obsahují koenzym pyridoxal-5-fosfát (PLP). PLP je kovalentně připojen k  $\epsilon$ -aminoskupině lysinu 258 v aktivním centru AST (Kirsch se sp. 1984). PLP zajišťuje charakteristická absorpční spektra AST, která se liší od spekter samostatného PLP a která jsou stejná bez ohledu na druh. Enzym má proteinovou část složenou ze dvou identických, nekovalentně spojených podjednotek s molekulovou hmotností asi 93 kDa. Jisté rozdíly v tomto enzymu jsou mezi živočišnými druhy (Brenda).

Enzym je dostupný v relativně čisté a stabilní formě z několika komerčních zdrojů. Přestože tyto preparáty nejsou pravděpodobně určeny pro speciální spektrální použití, jeví se jako relativně vhodné pro tyto účely (Dršata se sp. 1991).

Pyridoxalfosfátová forma AST vykazuje v závislosti na pH hlavní absorpční pík při 360 nm (aktivní, neprotonizovaná forma koenzymu převažující při vyšších hodnotách pH) a /nebo pík při 430 nm (inaktivní, protonizovaná forma, vzrůstající při nízkých hodnotách pH).

Po reakci se substrátem L-aspartátem v průběhu první fáze ping-pongové transaminační reakce se objevuje pyridoxaminfosfátová (PMP) forma koenzymu a původní absorpční maximum se přesouvá do oblasti 325 až 330 nm (Kirsch se sp. 1984).

Zatímco volný pyridoxal-5-fosfát a pyridoxamin-5-fosfát nejsou opticky aktivní substance, koenzym navázaný v aktivním místě AST vykazuje spektra cirkulárního dichroismu v oblasti 300 až 500 nm, která jsou podobná absorpčním spektrům. CD efekt je způsoben změnami v elektronové konfiguraci molekuly (Breusov se sp. 1964). Výhodou CD je odstranění absorpčních znaků opticky neaktivních složek, což umožňuje identifikaci specifických signálů

koenzymu a jejich změn, a také dovoluje odkrytí píků aromatických aminokyselin v oblasti 260 až 280 nm.

Vyhodnocení intenzity, znaků a změn absorpčních spekter a spekter cirkulárního dichroismu umožňuje, vedle měření katalytické aktivity, určit kvalitu enzymových preparátů a pomáhá pochopit interakce AST s dalšími molekulami. U ALT je situace analogická.

Co se týče ALT, Matsuzawa a Segal (1968) ve své práci uvádí, že absorpční spektrum volné ALT vykazuje maximum při 430 nm. Reakcí ALT s L-alaninem vzniká pyridoxaminová forma, která způsobí přesun maxima k 325 nm. Stejně výsledky pozorovali ještě dříve také jiní autoři (Gatehouse se sp. 1966).

Vliv Z-4,4-bis(4-ethylphenyl)-2,3-dibromo-2-butenové kyseliny na absorpční spektra a spektra cirkulárního dichroismu ALT a AST v oblasti charakteristické absorpce koenzymu ve své práci sledovali Dršata se sp. (1991). Uvedená sloučenina byla syntetizována jako cytostatikum edikron. Edikron má schopnost inhibovat některé pyridoxalové enzymy, mezi které patří také ALT a AST. Byla zjištěna také inhibice tetrahydrofolátreduktasy, folátreduktasy, formiminotransferasy, glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a glykolytických thiolových enzymů (Drobnica se sp. 1975). Inhibice těchto enzymů je důležitá z pohledu cytostatického účinku sloučeniny. Inhibice některých pyridoxalových enzymů poukazuje na nespecifické účinky potenciálního cytostatika.

Co se týče AST, edikron snižoval absorpci a CD maxima při 360 nm, které reprezentuje aktivní formu enzymu. Nepředešel ale tvorbě pyridoxaminové formy enzymu vznikající v přítomnosti L-aspartátu. Došlo k celkovému mírnému nárůstu absorpce a potlačení píků v celé oblasti měření v přítomnosti edikronu v důsledku rostoucího zákalu po částečné denuraci proteinu.

V přítomnosti L-aspartátu se maxima koenzymu zřetelně přesunula na jeden pozitivní pás při vlnové délce 325 až 300 nm odpovídající pyridoxaminové formě. Navíc vzrostl pozitivní pík v oblasti 270 až 280 nm a negativní pík v oblasti 290 až 300 nm. Oba píky reprezentují aromatické aminokyseliny apoenzymu v aktivním místě (Martinez-Carrion se sp. 1970). Vliv edikronu na pyridoxaminovou formu koenzymu a na apoenzym se projevil poklesem píku v oblasti 325 až 330 nm. Pozitivní pík v oblasti 270 až 280 nm se mírně zvýšil a negativní pík při 290 až 300 nm vymizel v přítomnosti edikronu (Dršata se sp. 1991).

V případě ALT edikron způsobuje nevýznamné spektrální změny enzymu, ale částečně tento enzym denaturuje. Ve směsi enzymu a L-alaninu edikron nepředchází vzniku pyridoxaminové formy, přesouvá pík pyridoxalové formy (430 nm) k 325 nm, což odpovídá právě pyridoxaminové formě, a to bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost edikronu. Edikron

však zvyšuje absorpční křivky v důsledku částečné denaturace enzymu doprovázené nárůstem turbidity vzorků. Edikron nemá výrazný vliv na spektra ALT v oblasti optických znaků pyridoxalfosfátu v oblasti 300 až 500 nm. Na druhé straně edikron mírně ovlivňuje spektra ALT v oblasti 270 až 290 nm, což poukazuje stejně jako v případě AST na konformační změny aromatických aminokyselin apoenzymu. Závěrem práce Dršaty se sp. (1991) je fakt, že vzhledem chemické reaktivitě edikronu je pravděpodobná interakce sloučeniny s proteiny vedoucí ke značným konformačním změnám.

#### 2. 2. 4. 1. Absorpční spektra

Tato část je věnována absorpčním spektrům pyridoxalových enzymů obecně, největší prostor je opět věnován AST, jejíž spektrální vlastnosti jsou v literatuře popsány nejpodrobněji. Totéž platí pro následující kapitolu 2. 2. 4. 2. Cirkulární dichroismus.

Řada pyridoxalových enzymů má podobná spektra.

Při nízkém pH cytosolická aspartátaminotransferasa vykazuje maximum při 430 nm, mitochondriální aspartátaminotransferasa při 435 nm. Tato maxima jsou podobná maximu Schiffovy base při 415 nm.

Pro některé pyridoxalové enzymy je poloha píků blízká píkům jednoduché Schiffovy base ve vodě. U jiných, např. aspartátaminotransferasy, jsou zřetelně posunuty. Posun lze pozorovat také u glutamátdekarboxylasy *E.coli*, které absorbuje v oblasti 420 nm, a DOPAdekarboxylasy. U těchto tří enzymů dochází pravděpodobně k protonaci koenzymu na dusíku kruhu vnitřní Schiffovy base koenzymu s lysinem postranního řetězce proteinu.

„Sedlo“ v oblasti vlnových délek 430 až 435 nm a pík aromatických aminokyselin v proteinu zahrnuje zřetelné množství další absorpce. To může být způsobeno nečistotami, mezi které lze zařadit malé množství  $\beta$ -subformy cytosolického isoenzymu. Je také možné, že odpovídají minoritním tautomerům (Christen a Metzler 1985).

Spektra cytosolické a mitochondriální aspartátaminotransferasy při vysokém pH jsou podobná, ale liší se polohou píků a jejich tvarem. Pík cytosolické AST se nachází v oblasti 363 nm, mitochondriální při 354 nm a je zřetelně širší. Oba píky jsou blízko vlnové délce 357 nm předpokládané pro dipolární ionické tautomery jednoduché Schiffovy base ve vodě.

Vazba dikarboxylátů, glutarátu, sukcinátu nebo 2-oxoglutarátu způsobí bathochromní posun píku (posun polohy píku do oblasti vyšších vlnových délek) při nízkém pH.

Po vazbě dikarboxylátů je pro oba isoenzymy absorpce minoritních píků v „sedle“ poněkud snížena, jako by byla posunuta tautomerická rovnováha. Tvorba dikarboxylátových komplexů při vyšším pH způsobuje malé změny ve spektru (Bonsib se sp. 1975).

Spektrum pyridoxaminových forem obou enzymů je v podstatě stejné. Pík se objevuje v oblasti 323 až 333 nm. Pík nacházející se v oblasti 327 nm odpovídá neutrálnímu vodnému pyridoxaminu s dipolárním ionickým kruhem a protonovanou 4'-aminoskupinou.

Na spektrech komplexů aspartátaminotransferasy s dvojicemi substrátů aspartát+oxalacetát a glutamát+2-oxoglutarát lze pozorovat čtyři komponenty. Slabý chinoidní pík s hlavním maximem při 493 nm se objevuje v případě cytosolické AST, ale téměř chybí ve spektru mitochondriálního isoenzymu. Píky v oblastech 417 až 428, 356 až 372 a 327 až 337 nm odpovídají protonovanému aldiminu, neprotonovanému aldiminu a pyridoxaminové formě volného enzymu. V oblasti 334 až 337 nm pro aspartát+oxalacetát je pík extrémně široký, což naznačuje přítomnost další spektrální formy přesahující tuto oblast (Christen a Metzler 1985). Zatímco mitochondriální AST se objevuje v jedné hlavní formě, o cytosolické AST se dlouho uvažovalo, že se vyskytuje v různých formách (Martinez-Carrion se sp. 1965).

$\alpha$ -forma je plně funkční, druhá forma,  $\beta$ -forma, vykazuje pouze poloviční aktivitu, nižší isoelektrický bod a druhý silný absorpční pík v oblasti kolem 340 nm. Nedochozí k posunu tohoto píku vlivem pH, ani vazbou substrátů.

Většina aminotransferas se podobá AST tím, že mají absorpční maximum při nízkém pH v oblasti 410 až 435 nm. Nicméně mohou zde být zřetelné rozdíly. Jak uvádí Saier a Jenkins (1967), např. savčí ALT, která má pK kolem 7,4, absorbuje maximálně při vlnové délce 425 nm při nízkém pH, ale při vysokém pH při 325 nm.

Některé aminokyseliny mají neznámé pK hodnoty, ale konstantní spektrum napříč širokou oblastí pH.

Skupina enzymů zahrnující GABA-AT, bakteriální  $\omega$ -aminotransferasy a bakteriální taurinAT, mají absorpční maxima v oblasti 330 až 345 nm, která reprezentují inaktivní koenzym ve formě podobné té, která způsobila pík při 340 nm  $\beta$ -formy cytosolické AST (Christen a Metzler 1985).

#### 2. 2. 4. 2. Cirkulární dichroismus

Volný PLP je symetrický a tudíž opticky neaktivní chromofor. Jeho navázáním v aktivním místě enzymu dojde k vytvoření indukované optické aktivity. Optickou aktivitu lze detekovat ve formě záznamu optického rotačního rozptylu (optical rotatory dispersion) nebo

cirkulárního dichroismu. Indukovaný neboli „extrinsic“ Cottonův jev zobrazený pomocí enzymově vázaného PLP byl poprvé pozorován pro cytosolickou AST z prasečího srdce (Fasella a Hammes 1964).

Podle Laboratorní encyklopedie na internetových stránkách [www.labo.cz/sl/vy02.htm](http://www.labo.cz/sl/vy02.htm) vyjadřuje Cottonův jev závislosti mezi velikostí cirkulárního dichroismu a optické rotace (cirkulárního dvojlomu) na vlnové délce světla. Tyto dvě veličiny vykazují charakteristické průběhy v oblasti absorpčních píků zkoumané látky.

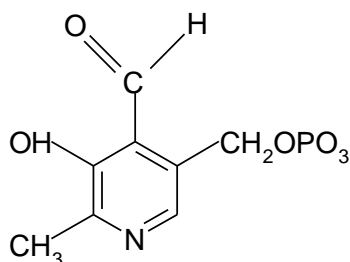
Později byly podobné Cottonovy efekty zjištěny pro mnoho dalších pyridoxalových enzymů (dekarboxylasy, glykogenfosforylasy) (Johnson a Graves 1966).

Na CD spektru volné cytosolické AST a jejích oximových a acylhydrazonových derivátů je patrný pozitivní pík v oblasti 362 a 430 nm odpovídající enzymově vázanému PLP. Po reakci s hydroxylaminem dochází ke zmenšení píku CD při pH 8. Při pH 5 pík téměř kompletně mizí. Reakce s objemnými karbonylovými sloučeninami jako je aminooxyacetát, isonikotinoylhydrazid nebo semikarbazid vede k obrácení signálu cirkulárního dichroismu. Dochází ke vzniku negativního signálu cirkulárního dichroismu komplexů enzym-inhibitor. Negativní pík v oblasti 493 nm lze pozorovat také po reakci AST s kvazisubstrátem erythro-3-hydroxyaspartátem. Z těchto poznatků bylo odvozeno následující empirické pravidlo : Přerušení iminové vazby mezi PLP a lysinem v aktivním místě AST po reakci s karbonylovými sloučeninami je doprovázeno silným úbytkem pozitivního CD nebo inverzí signálu. Toto pravidlo je užitečné pro interpretaci vlivu inhibitorů a substrátových analogů na AST (Torchinsky a Malakhova 1968).

Pokles cirkulárního dichroismu po vazbě substrátů je pravděpodobně způsoben přerušením vnitřní iminové vazby a tvorbou „externího“ (substrátového) aldiminu. Komplexy pyridoxalové formy AST s 2-methylaspartátem a 2-oxoglutarátem mají podobná absorpční spektra, ale rozdílné hodnoty koenzymového CD. Tímto je podpořena hypotéza, že CD hodnoty koenzymu rozlišují spektrofotometriky podobné formy enzymů, které se liší chemickou strukturou nebo konformací (Christen a Metzler 1985).

Pozitivní cirkulární dichroismus v oblasti 333 nm je pozorován pro pyridoxaminovou formu enzymu a také v signálu komplexů apoenzymu s pyridoxinfosfátem, 4'-deoxy pyridoxinfosfátem a některými dalšími PLP analogy (Ivanov a Karpeisky 1969).

## 2. 2. 5. PYRIDOXALFOSFÁT (PLP)



Obr. 3 Vzorec pyridoxal-5-fosfátu

Termín „vitamín B6“ byl poprvé použit v roce 1934 Paulem Gyorgym. Vitamín B6 označoval neidentifikovanou směs, která má schopnost předcházet, příp. léčit floridní dermatitidu vyvolanou u potkanů krměných potravou obsahující pouze v té době známé esenciální složky potravy. Tehdy byly známy pouze vitamín B1 (thiamin) a vitamín B2 (riboflavin).

Tento vitamín bývá také označován jako pyridoxin. Řadu let byly tyto dva termíny považovány za synonymum. Později se ukázalo, že vitamín B6 je komplexní, zatímco pyridoxin je pouze jednou jeho složkou (Snell a Rannefeld 1945).

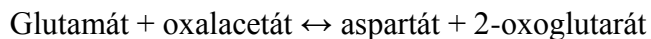
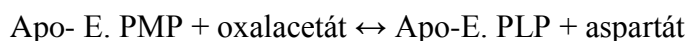
V roce 1945 provedl Snell pokusy, při kterých zahříval pyridoxal s glutamátem. Došlo ke konverzi na pyridoxamin. Naopak zahříváním pyridoxaminu a 2-oxoglutarátu vznikal pyridoxal. Šlo o plně reverzibilní reakci. Podobné reakce pozoroval i u dalších aminokyselin. Shrnutí dvou takových reakcí dává analogickou transaminační reakci mezi amino- a oxokyselinami jako v případě enzymatické transaminace. V enzymatické reakci však pyridoxal a pyridoxamin působí jako katalyzátory.

Snell (1945) předpověděl, že pyridoxal, pyridoxamin a jejich deriváty by se mohli podílet na enzymatické transaminaci. Řada vzájemně navazujících pokusů vedla k závěru, že fosforylovaný pyridoxal je nezbytným koenzymem metabolismu aminokyselin, zahrnující enzymatickou transaminaci. PLP se podílí na transaminaci stejným způsobem, jako pyridoxal funguje v odpovídajících neenzymatických reakcích. Pyridoxaminfosfát (PMP) se zřejmě reverzibilně tvoří během enzymatické transaminace a vyskytuje se proto přirozeně.

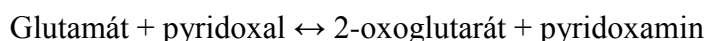
Rabinowitz a Snell (1947) připravili PMP neenzymatickou transaminací mezi PLP a L-glutamátem. Zjistili, že se tato substance vyskytuje přirozeně a že představuje velký podíl celkového vitamínu B6 v buněčných extraktech. Později bylo zjištěno, že vitamín B6 je

esenciální přirozeně se vyskytující růstový faktor, který je mnohem aktivnější než pyridoxamin nebo pyridoxal a také podstatně aktivnější než PLP. Tato informace pochází z pokusů na různých druzích laktobacilů (McNutt a Snell 1947).

Zatímco původní pokusy o demonstrování aktivity PMP jako koenzymu aspartátaminotransferasy byly neprůkazné, studie provedená Meisterem se sp. (1954), kteří používali purifikovanou apoaspartátaminotransferasu, poukázala na kompletní aktivaci ekvimolárními množstvími krystalického PMP nebo PLP. Vzájemné přeměny PMP a PLP během enzymatické transaminace v přítomnosti nadbytku 2-oxoglutarátu nebo glutamátu přesvědčivě dokládají význam neenzymatických transaminačních reakcí jako modelů spoluúčasti koenzymu na enzymatické transaminaci. Dnes je plně akceptován tzv. ping-pongový mechanismus působení koenzymu.

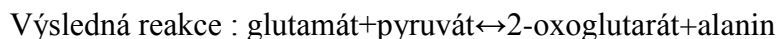
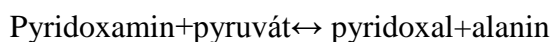
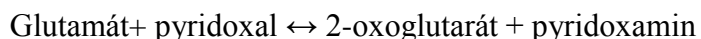


Apo- E v těchto rovnicích znamená apoformu aspartátaminotransferasy, Apo-E.PLP a Apo-E.PMP představují dvě vzájemně přeměnitelné formy aspartátaminotransferasy. I když v průběhu katalyzované reakce nedochází k disociaci holoenzymu na apoenzym a koenzym, je zřejmé, že apoaspartátaminotransferasa katalyzuje (i když poměrně neúčinně) obě reakce :



Proto katalyzuje i výslednou reakci : glutamát + oxalacetát  $\leftrightarrow$  aspartát + 2-oxoglutarát (Meister se sp. 1954).

Lze odvodit analogické reakce pro ALT:





### 2. 2. 5. 1. Mechanismus působení koenzymu pyridoxalfosfátu

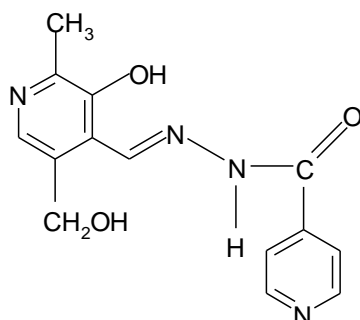
Pyridoxalfosfát (PLP) jako koenzym řady enzymů podílejících se na metabolismu aminokyselin má klíčové postavení v přeměnách aminokyselin. Při transaminaci funguje PLP jako nosič aminoskupiny a přenáší ji na oxokyselinu.

PLP je aldehydovou skupinou vázán na  $\epsilon$ -aminoskupinu zbytku lysinu molekuly enzymu a tvoří s ní Schiffovu bazi.  $\alpha$ -aminoskupina přeměňované aminokyseliny vytlačí  $\epsilon$ -aminoskupinu lysinu a vytvoří s PLP novou Schiffovu bazi (aldimin). PLP zůstane mezitím spojen s enzymem nekovalentně. Následuje labilizace vazby C-H a transaminace. Může také dojít k labilizaci vazby C-C a následné dekarboxylaci aminokyseliny, labilizaci vazby C-R a aldolovému štěpení nebo vazby C-N a racemaci.

Jak již bylo uvedeno, navázáním aminokyseliny na PLP dochází k tvorbě aldiminu. Dvojná vazba v Schiffově bazi aminokyselina-PLP se posune za vzniku ketiminu, ze kterého se pak hydrolyticky odštěpí  $\alpha$ -oxokyselina. Aminoskupina zůstává v komplexu pyridoxaminfosfát-enzym. Reakce je snadno vratná. Pyridoxaminfosfát může s jinou  $\alpha$ -oxokyselinou vytvořit Schiffovu bazi, z níž se hydrolyticky uvolňuje aminokyselina, odvozená od této oxokyseliny. Transaminace PLP-katalýzou je příkladem dvousubstrátové reakce s ping-pongovým mechanismem. Ping-pongová reakce probíhá tak, že na enzym se naváže první substrát, dojde k reakci a oddělí se první produkt. Během reakce substrát předá aminoskupinu. Dochází ke změně enzymu. Poté se připojí druhý substrát, převezme od enzymu skupinu, kterou mu předal první substrát, a uvolní se druhý produkt. Enzym se vrací do původní formy.

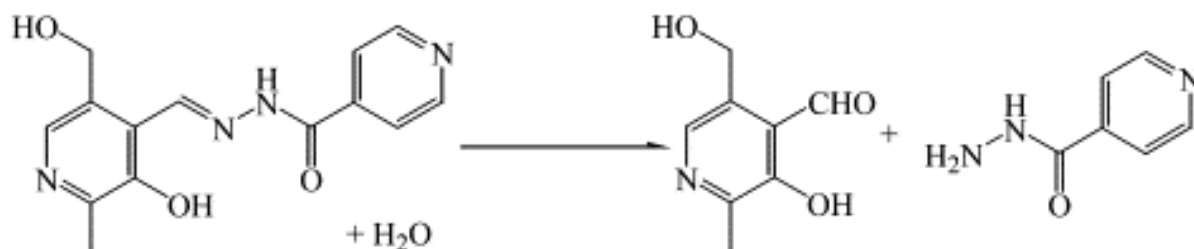
Nejčastěji bývá  $\alpha$ -oxokyselinou, na niž se převádí aminoskupina z pyridoxaminu, 2-oxoglutarát. Společný akceptor aminoskupin většiny aminokyselin umožňuje jejich shromáždění do jedné látky, glutamátu. Glutamát poté poskytuje aminoskupiny k syntézám nebo je zavádí do finálních reakcí, jimiž se tvoří konečný produkt vylučování odpadního kyslíku. Oxidační deaminaci glutamátu katalyzuje glutamátdehydrogenasa. Je lokalizována v mitochondriích téměř všech savčích buněk. Glutamátdehydrogenasa katalyzuje i opačnou reakci, aminaci 2-oxoglutarátu amoniakem. Směr reakce závisí na koncentraci reakčních složek v buňce (Vodrážka 1996 )

## 2. 3. PYRIDOXALISONIKOTINOYLHYDRAZON (PIH)



Obr. 4 Vzorec pyridoxalisonikotinoylhydrazonu

Stejně jako v diplomové práci, i v případě této práce byl v pokusech používán jako struktura, která se může vázat v aktivním centru enzymu, pyridoxalisonikotinoylhydrazon (PIH). PIH vzniká kondenzací pyridoxalu a hydrazidu kyseliny isonikotinové (isoniazidu). Vzniklá struktura má charakter tzv. Schiffovy base (iminu). Je relativně nestabilní, rozkládá se výchozí složky.



Obr. 5 Rozklad PIH na pyridoxal a isoniazid

Předpoklad působení PIHu jako inhibitoru pyridoxalových enzymů jsme do určité míry potvrdili předchozími pokusy. Přes strukturální podobu nebyla zjištěná inhibice dekarboxylasy aromatických aminokyselin kompetitivní s pyridoxalfosfátem (Vančurová 2006).

PIH je podobný pyridoxalfosfátu, který je koenzymem jak dekarboxylasy aromatických aminokyselin, tak aminotransferas (ALT, AST). Kromě pyridoxalové části lze ve struktuře PIH rozpoznat část podobnou isoniazidu, který je známý jako antituberkulotikum.

PIH představuje vůdčí strukturu skupiny aroylhydrazonů, potenciálních chelátorů železa. Je schopen vázat volný nebo volně vázaný  $\text{Fe}^{3+}$  pomocí fenolového a karbonylového kyslíku a

iminového dusíku. Komplexy železo-PIH ve vodném roztoku vykazují stechiometrii 1:2 (Buss se sp. 2002).

Jelikož v současnosti existuje nedostatek v klinické praxi využitelných chelátorů železa, které by nahradily deferoxamin, PIH a jeho analogy se jeví jako nadějně struktury, které stojí za to dále studovat. Z literatury vyplývá, že si tyto struktury zaslouží další výzkum jako potenciální orálně aktivní chelátory železa. Jako jediný chelátor železa je v současnosti používán deferoxamin (DFO). Používání DFO má určité nevýhody, jako je nutnost podávání v subkutánní infuzi, slabá intestinální absorpce a poměrně vysoká cena. PIH vykazuje vysokou chelatační účinnost k železu jak *in vitro* na buněčných kulturách, tak *in vivo* u myší a potkanů. Navíc je tento chelátor relativně netoxický a ekonomický, co se týče přípravy, a lze jej podávat *per os*. Vykazuje vysokou selektivitu a afinitu k železu. V nedávné minulosti byl PIH se svými analogy a jejich chelatačním potenciálem ignorován, pozornost byla upřena mj. na strukturu 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-onu. Byly však zjištěny komplikace doprovázející terapii touto látkou, proto se nyní pozornost upírá směrem k aroylhydrazonům (Richardson a Poňka 1998).

Chelatační terapie byla původně určena pro zmírnění toxického působení nadbytku železa v organismu. Nové poznatky o toxikologických vlastnostech komplexu chelátor železa-kov přesunuly část pozornosti na jejich využití v nádorové chemoterapii. Zatímco redoxně inaktivní komplexy chelátoru železa jsou vhodné pro terapii nemocí z nadbytku železa, komplexy s vysokou redoxní aktivitou vykazují slibné výsledky jako chemoterapeutika neoplazií. Kalinowski a Richardson (2007) ve své práci hodnotí různé způsoby působení a toxikologické profily chelátorů železa zahrnující analogy 2-pyridylkarboxaldehydisonikotinoylhydrazonu, di-2-pyridylketonisonikotinoylhydrazonu, di-2-pyridylketonthiosemikarbazonu a klinicky testovaný chelátor 3-aminopyridin-2-karboxaldehydthiosemikarbazon.

Bernhardt se sp. (2005) studovali chelatační aktivitu diaroylhydrazinů. Stejně jako v případě aroylhydrazonů byla u těchto látek zjištěna N, N, O trojboká koordinace chelátorů se železem. Chelatační schopnost těchto látek byla podstatně větší než v případě v současnosti v klinické praxi používaného deferoxaminu. Ve srovnání s PIH byla tato aktivita přibližně stejná.

PIH a jiné aroylhydrazony působí jako potenciální ochranné látky proti kardiotoxicitě vyvolané anthracykliny. Anthracyklinová antibiotika zůstávají mezi nejčastěji využívanými a nejúčinnějšími antineoplastiky. Z tohoto důvodu je studován kardioprotektivní efekt aroylhydrazonových chelátorů železa. Kardioprotektivní efekt PIH u králíků zkoumali Šimůnek se sp. (2005, 2008).

U králíků, kterým byl dlouhodobě podáván daunorubicin, PIH v dávce 25 mg/kg pomohl předejít smrti a funkčnímu poškození levé komory srdeční. Dvou- až dvouapůlnásobné zvýšení dávky chelátorů vedlo paradoxně k negativnímu výsledku, co se týče kardioprotekce a celkové mortality (Šimůnek se sp. 2008).

Kaiserová se sp. (2006) používali k pokusům antineoplastika doxorubicin a bleomycin. O těchto léčivých látkách je známo, že způsobují oxidativním stresem vyvolané nežádoucí účinky na srdci a plicích. Je často zmiňováno, že na toxicitě doxorubicinu a bleomycinu se podílí ionty železa. Autoři si stanovili za cíl zjistit, jestli chelatace železa předchází oxidativním stresem způsobené toxicitě doxorubicinu a bleomycinu. Výsledkem práce je poznatek, že schopnost chelatovat železo není jediný způsob, jak daná molekula chrání proti doxorubicinem ev. bleomycinem vyvolané cytotoxicitě.

Problémem aroylhydrazonů je jejich krátký biologický poločas. Stabilitou aroylhydrazonů v plazmě a příbuzných biologických médiích se zabývali mj. Kovaříková se sp. (2008). Ačkoli jsou aroylhydrazony relativně stabilní ve fosfátovém pufru, v plazmě podléhají rychlé degradaci. Stabilitu autoři hodnotili za pomoci HPLC.

Některé dostupné práce se věnují derivátům aroylhydrazonů a jejich schopnosti snižovat oxidativní poškození buněk vlivem UV záření. Vystavování buněk lidské kůže slunečnímu UV A záření vede k okamžitému na dávce závislému vzestupu labilního železa, které následně podporuje oxidativní poškození a nekrózu buněk. Silné chelátory železa mají schopnost potlačovat buněčné poškození a nekrózu řízením poolu volného železa ve tkáni. Dlouhodobé podávání má však za následek systémovou depleci železa. Řešením jsou „prodrugs“, které se aktivují v buňkách kůže při fyziologicky významné hladině UV A záření (tzv. caged-iron chelators). K uvolňování chelátoru dochází v závislosti na dávce. Yiakouvakí se sp. (2006) představili prototypy chelátorů železa, které jsou odvozené od pyridoxalisonikotinoylhydrazonu a salicylaldehydisonikotinoylhydrazonu. Autoři prokázali, že intracelulární pool volného železa a následná nekróza buněk lidských fibroblastů je výrazně nižší po vystavení testovaných buněk kombinaci zmíněných sloučenin a fyziologicky relevantním dávkám UV A. Z uvedeného vyplývá, že tyto nové, světlem aktivované „prodrugs“ mají schopnost chránit kožní buňky před škodlivým vlivem slunečního záření.

Další potenciální možnost využití PIHu a dalších aroylhydrazonů je v terapii neurodegenerativních onemocnění (Whitnall a Richardson 2006). Železo je prvek nezbytný pro proces transportu kyslíku, elektronový transport a syntézu DNA. Pokud však chybí možnost uskladnění nebo chelace, nadbytečný volný prvek se podílí na tvorbě volných radikálů, které vyvolávají oxidační stres s apoptózu. Předpokládá se tudíž, že železo se může

podílet na vzniku neurodegenerativních onemocnění jako Parkinsonova choroba, Huntingtonova chorea a Alzheimerova choroba. Práce Whitnalla a Richardsona (2006) pojednává o potenciálních možnostech využití chelátorů železa jako terapeutické možnosti v případě léčby neurodegenerativních chorob.

### 3. CÍL PRÁCE

Cíle práce lze definovat v několika bodech:

- 1.) Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda PIH ovlivňuje spektrální vlastnosti pyridoxalových enzymů, což mělo být demonstrováno na alaninaminotransferase (EC 2. 6. 1. 2). Úkolem bylo ověřit, jak se přítomnost PIH ve vzorku projeví na absorpčním a CD spektru enzymu, zda neovlivní vazbu koenzymu pyridoxalfosfátu.
  
- 2.) Cílem bylo také zpracovat dostupné informace o cirkulárním dichroismu jako použité metodě. Vzhledem k tomu, že rešerši o pyridoxalisonikotinoylhydrazonu jsem se věnovala již dříve (Vančurová 2006), úkolem bylo zaměřit se v rešerši o PIHu zejména na aktuální informace.

## 4. MATERIÁL A METODIKY

### 4. 1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

#### 4. 1. 1. SUBSTRÁT

L- $\alpha$ -alanin (Roana, Budapešť, Maďarsko)

#### 4. 1. 2. CHEMIKÁLIE PRO PŘÍPRAVU PUFRŮ

Hydrogenfosforečnan disodný p. a. (Penta, Chrudim)

Dihydrogenfosforečnan sodný p. a. (Lachema, Neratovice)

Azid sodný (Lachema, Brno)

#### 4. 1. 3. CHEMIKÁLIE PRO PŘÍPRAVU ROZTOKŮ

Pyridoxalisonikotinoylhydrazon (dar od prof. Poňky, McGill University, Montreal, Kanada)

Dimethylsulfoxid Chromasolv for high performance liquid chromatography (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)

### 4. 2. ENZYM

Alaninaminotransferasa EC 2. 6. 1. 2.

syn. Glutamát-pyruvát transaminasa (GTP) z prasečího srdce 25 mg/ 2,5 ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)

#### 4. 2. 1. POSTUP PŘÍPRAVY ENZYMU

Byl použit purifikovaný enzym glutamát-pyruvát transaminasa firmy Roche. Suspenzi enzymu z lahvičky jsme přepipetovali do tapvalky, enzym jsme stočili v centrifuze při 5000 otáčkách po dobu 20 minut. Odpipetovali jsme supernatant a precipitát jsme rozpustili v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7, 4 s 0,05 % azidem. Preparát jsme dialyzovali 2x půl hodiny (resp. 2x 1 hodinu v případě přípravy enzymu pro měření CD spekter) proti 500 ml 0,1 M

fosfátovému pufru pH 7,4 s 0,05 % azidem. Charakteristika dialyzační trubice viz kapitola 4.4. Dialyzační trubice. Dialýza byla prováděna v chladicí místnosti za neustálého míchání pufru magnetickým míchadlem. Po ukončení dialýzy jsme obsah dialyzační trubice kvantitativně odebrali a nastavili pufrům na požadovaný objem.

Pro přípravu vzorků pro měření UV-VIS spekter byla dialyzována pouze polovina celkového objemu enzymu. Po ukončení dialýzy byl objem nedialyzovaného enzymu doplněn na objem dialyzovaného enzymu po ukončení dialýzy.

#### 4. 3. PYRIDOXALISONIKOTINOYLHYDRAZON

##### 4. 3. 1. PŘÍPRAVA ROZTOKU PIH

PIH je látkou obtížně rozpustnou ve vodném prostředí. Existuje také riziko jeho zpětného vykrystalizování z vodného roztoku. Rozpuštění PIH bylo podpořeno použitím dimethylsulfoxidu (DMSO).

##### 4. 3. 2. POSTUP PŘÍPRAVY ROZTOKU PIH

Potřebnou navážku PIH jsme rozpustili nejprve v dimethylsulfoxidu. Optimální množství použitého dimethylsulfoxidu bylo zjištěno dřívějšími pokusy a tyto poznatky byly již využity v pokusech v rámci diplomové práce (Vančurová 2006). Pro zvolení optimální koncentrace DMSO je potřeba zohlednit riziko ovlivnění aktivity enzymu a zpětného vykrystalizování PIH během pokusu. Po rozpuštění a promíchání na shakeru byl k roztoku přidáván 0,1 M fosfátový pufr s 0,05 % azidem. Směs byla opět pořádně promíchána a rozpuštění PIH ve zředěném DMSO podpořeno použitím ultrazvukové lázně. Do vzorků byl PIH přidáván ve formě roztoku v pufru s 5 % DMSO.

#### 4. 4. DIALYZAČNÍ TRUBICE

Dialyzační trubice Dialysis Tubing . Visking, vel. 3 Inf Dia 20/32-15,9 mm (Medicell, Londýn, Velká Británie)



#### 4. 5. PŘÍSTROJE

předvážky BL 310 Sartorius AG Göttingen (Německo)

analytické váhy CP 225D Sartorius AG Göttingen (Německo)

magnetická míchačka- IKA Color Squid (Německo)

- MM 2A Laboratorní přístroje Praha (ČR)

shaker MS 2 Minishaker, IKA Works (USA)

pH metr WTW inoLab pH Level 2, Weilheim (Německo)

ultrazvuková lázeň VWR Ultrasonic Cleaner (Leuven, Malajsie)

centrifuga Biofuge Stratos, Heraeus (Německo)

cirkulární dichrograf JASCO J-815 CD Spectrometer (Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, Praha)

spektrofotometr Hewlett-Packard 8453 (Katedra biofyziky a fyzikální chemie, FaF UK)

#### 4. 6. UV-VIS SPEKTRA

Purifikované pyridoxalové enzymy umožňují sledovat spektrální vlastnosti aktivního místa enzymu. Nejprve, odděleně od ostatních pokusů studujících interakci PIH s pyridoxalovým enzymem s využitím cirkulárního dichroismu, byl proveden pokus, jehož úkolem bylo ověřit stabilitu PIH a jeho chování v přítomnosti enzymu alaninaminotransferasy, příp. i substrátu L-alaninu za pomoci měření UV-VIS spekter. Cílem bylo také sledovat změny v jednotlivých vzorcích v čase. Pro měření byl použit UV-VIS spektrofotometr v laboratoři Doc. Kubíčka na Katedře biofyziky a fyzikální chemie FaF UK.

##### 4. 6. 1. POSTUP PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO MĚŘENÍ UV-VIS SPEKTER

Dialyzovaný a nedialyzovaný enzym byly použity pro přípravu vzorků. Z nedialyzovaného enzymu byly připraveny vzorky č.1 až 4 :

Vzorek č. 1 : ALT + pufr + pufr s 5 % DMSO

Vzorek č. 2 : ALT + PIH + pufr

Vzorek č. 3 : ALT + L-alanin + pufr s 5 % DMSO

Vzorek č. 4 : ALT + L-alanin + PIH

Předdialyzovaný enzym sloužil k přípravě vzorků č. 5 až 8 :

Vzorek č. 5 : předdialyzovaná ALT + pufr + pufr s 5 % DMSO

Vzorek č. 6 : předdialyzovaná ALT + PIH + pufr

Vzorek č. 7 : předdialyzovaná ALT + L-alanin+ pufr s 5 % DMSO

Vzorek č. 8 : předdialyzovaná ALT + L-alanin + PIH

Bylo také změřeno UV-VIS spektrum samostatného PIHu (Vzorek č. 9)

Pozn. : ALT ... enzym alaninaminotferasa EC 2. 6. 1. 2., zpracovaný postupem uvedeným v kapitole 4. 2. 1. Postup přípravy enzymu, výsledná koncentrace  $10^{-4}$  M

L-alanin... substrát alaninaminotferasy, výsledná koncentrace L-alaninu ve vzorku byla  $3,3 \cdot 10^{-2}$  M

PIH ... pyridoxalisonikotinoylhydrazon, strukturně podobný koenzymu ALT pyridoxal-5-fosfátu, výsledná koncentrace PIH ve vzorku byla  $10^{-5}$  M, v případě vzorku tvořeného pouze PIHem byla koncentrace  $3 \cdot 10^{-5}$  M.

Pufr ... 0,1 M Na-fosfátový pufr pH 7,4 s 0,05 % azidem jako antimikrobní přísadou

Pufr s 5 % DMSO...0,1 M Na-fosfátový pufr pH 7,4 s 0,05 % azidem a 5% dimethylsulfoxidem. DMSO je využíván ke zlepšení rozpustnosti PIHu ve vodném prostředí, jak již bylo popsáno v kapitole 4. 3. 2. Postup přípravy roztoku PIH. DMSO ve vyšších koncentracích negativně ovlivňuje biologickou aktivitu enzymu. Byla proto zvolena taková koncentrace DMSO, která na jedné straně udrží PIH rozpuštěný ve vodném roztoku a zároveň neovlivní aktivitu enzymu.

Aby byla ve všech vzorcích stejná koncentrace DMSO, byl do vzorků, které neobsahovaly roztok PIHu v pufru s 5 % DMSO, přidán pufr s 5 % DMSO.

#### 4. 6. 2. MĚŘENÍ UV-VIS SPEKTER

Měření UV-VIS spekter proběhlo na Katedře biofyziky a fyzikální chemie na spektrofotometru Hewlett-Packard 8453. Pro měření byla použita kyveta o tloušťce 1 cm.

Bezprostředně po přípravě byly jednotlivé vzorky proměřeny. Jako první byl však změřen blank, spektrum 0,1M fosfátového pufru pH 7,4 s 0,05 % azidem. UV-VIS spektrum pufru bylo postupně odečteno od každého změřeného vzorku, aby se eliminovala absorpce samostatného pufru.

Po sedmidenní inkubaci vzorků v temnu při teplotě laboratoře byly vzorky rozděleny na polovinu. Polovina vzorků byla dialyzována 2x 30 minut proti 0,1M fosfátovému pufru pH 7,4 s 0,05 % azidem výše uvedeným způsobem (charakteristika dialyzační trubice viz kapitola 4. 4. Dialyzační trubice). Všechny vzorky byly následně proměřeny.

## 4. 7. SPEKTRA CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU

### 4. 7. 1. POSTUP PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO MĚŘENÍ SPEKTER CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU

Složky jednotlivých vzorků byly připraveny den předem na Katedře biochemických věd FaF UK. Příprava vzorků pro měření probíhala následující den podle uvedeného schématu zředěním předem připravených komponent :

Vzorek č. 1 : ALT + pufr + pufr s 5 % DMSO

Vzorek č. 2 : ALT + L-alanin + pufr s 5 % DMSO

Vzorek č. 3 : ALT + PIH + pufr

Vzorek č. 4 : ALT + L-alanin + PIH

Vzorek č. 5 : PIH

Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M, koncentrace PIH  $2 \cdot 10^{-4}$ , ve vzorku tvořeném samostatným PIHem  $6 \cdot 10^{-4}$  M. Koncentrace L-alaninu ve vzorcích byla  $10^{-1}$  M.

Po napipetování jednotlivých součástí v případě vzorků č. 1 až 4 do tapvalem, byly vzorky důkladně promíchány za použití shakeru. Vzorky byly následně rozděleny na dvě části v poměru 1 : 2. Jeden díl vzorků č. 1, 2, 3, a 4 vytvořil vzorky označené A1, A2, A3 a A4. Zbývající dva díly vzorků č. 1 až 4 byly označeny jako vzorky B1, B2, B3 a B4.

Vzorky A1 až A4 a vzorek č. 5 byly bezprostředně po přípravě proměřeny. Vzorky označené B1, B2, B3 a B4 byly bez měření odvezeny z pražského pracoviště ÚOCHB na FaF UK do Hradce Králové, kde byly uchovány důkladně uzavřené v temnu při teplotě laboratoře po dobu šesti dnů. Stejným způsobem byly po měření uchovány vzorky A1 až A4.

Po šesti dnech byly vzorky B rozděleny přesně na polovinu. Tímto vznikly vzorky označené jako C1 až C4 a D1 až D4. Vzorky C řady byly bez dalších úprav připraveny pro měření CD spekter. Vzorky D1 až D4 byly přepipetovány do předem připravených a navlhčených dialyzačních trubic a dialyzovány důkladně třikrát 1 hodinu proti 500 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4 s 0,05 % azidem. Charakteristika dialyzační trubice viz kapitola 4. 4. Dialyzační trubice.

Dialýza probíhala v chladicí místnosti, po 1 hodině byl vždy pufr vyměněn za čerstvý. Po ukončení dialýzy byl obsah dialyzačních trubic kvantitativně odebrán. Byl zjištěn přesný objem jednotlivých vzorků po dialýze za pomoci automatických pipet. Vzhledem k tomu, že

objem vzorku D4 byl větší než původní objem, bylo potřeba doplnit všechny vzorky řady D i C na tento objem vzorku D4 uvedeným pufrem. Tímto byly vzorky C a D připraveny k měření.

#### 4. 7. 2. MĚŘENÍ SPEKTER CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU

Vlastní měření probíhalo v laboratoři Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky na cirkulárním dichrografu JASCO J-815 CD Spectrometer. Všechny vzorky, A1-A4, C1-C4, D1-D4 a vzorek č. 5, byly proměřovány stejným způsobem, byly změřeny jejich UV-VIS spektra a CD spektra. UV-VIS spektra byla vyjádřena jako závislost absorbance na vlnové délce, CD spektra jako molární cirkulární dichroismus  $\Delta\epsilon$  v litrech/mol.cm na vlnové délce v nm.

Měření proběhlo ve dvou dnech. Nejprve byly proměřovány vzorky A1-A4. Vzorky řady A vytvořila třetina objemu vzorků č.1- 4 oddělená ihned po jejich smíchání z výchozích komponent. Zbývající dvě třetiny původních vzorků vytvořily vzorky řady B. Ty byly ponechány uzavřené v tapvalkách, odvezeny na FaF UK do Hradce Králové a zde byly ponechány šest dnů v temnu při teplotě laboratoře. Z nich byly po pěti dnech vytvořeny rozdělením na půl vzorky řady C a D.

Vzorky řady A byly proměřovány v oblasti vlnových délek 500 až 195 nm. Měření probíhalo při laboratorní teplotě. Neřaděné vzorky A bylo možno měřit v oblasti 500 až 300 nm. Pro měření byla využita kyveta široká 0,5 cm. Nejprve byl proměřen 0,1 M fosfátový pufr pH 7,4 s 0,05 % azidem jako blank. Změřené spektrum bylo poté automaticky odečítáno od naměřených spekter pro všechny vzorky, aby se eliminovala absorpce složek pufru.

Po změření neřaděných A-vzorků, bylo pro oblast vlnových délek 300 až 195 nm potřeba vzorky zředit pro získání přesnějšího a přehlednějšího spektra. Bylo zvoleno ředění 1:5. Ze vzorků A1-A4 byly ředěním 0,1 M fosfátovým pufrem pH 7,4 s 0,05 % azidem získány vzorky označené AA1-AA4. Pro měření nařaděných vzorků byla použita 0,02 cm kyveta.

Podobně bylo měření provedeno u vzorku č. 5 (A5), který odpovídal roztoku PIHu koncentrace  $6 \cdot 10^{-4}$  M. V případě oblasti 300-195 nm bylo nezbytné roztok PIHu zředit více než vzorky A1-A4. Bylo zvoleno ředění 1:25 (vznikl vzorek AA5). Roztok PIHu  $6 \cdot 10^{-4}$  M je intenzivně žluté barvy, výrazně absorbuje ve viditelné oblasti spektra, proto bylo potřeba zředit roztok samostatného PIHu více než ostatní vzorky.

Po pěti dnech byly rozděleny B-vzorky na vzorky C a D. Vzorky D byly dialyzovány viz výše 4. 7. 1. Postup přípravy vzorků pro měření spekter cirkulárního dichroismu. Vzorky C již nebyly dále upravovány.

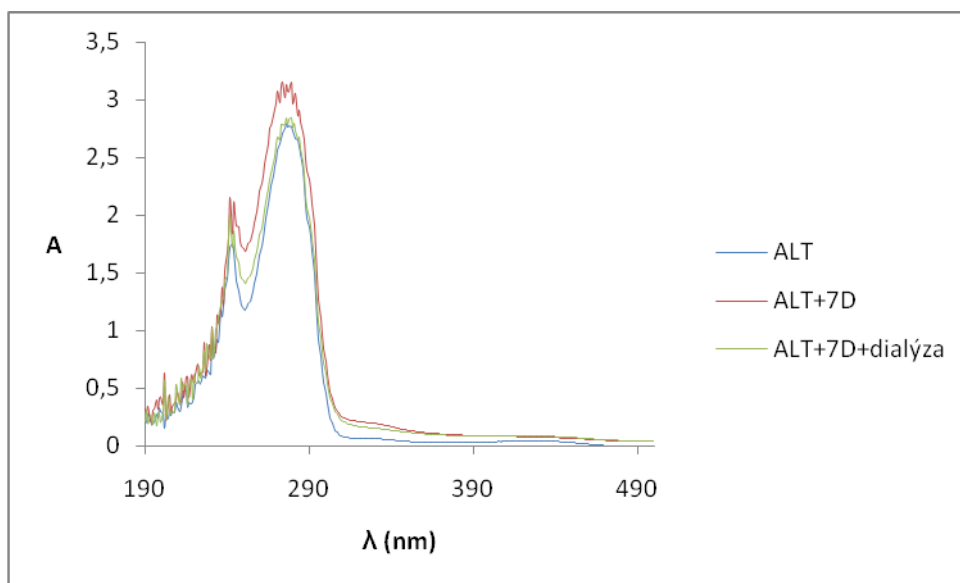
Na ÚOCHB v Praze bylo po 6 dnech inkubace proměřováno 16 vzorků, C1-C4, D1-D4 a ředěné vzorky CC1-CC4 a DD1-DD4. Nejprve byl však opět proměřen blank. Měřili jsme oblast vlnových délek 500 až 190 nm. Pro oblast 500 až 280 nm jsme proměřovali neředěné vzorky C1-C4 a D1-D4 za použití půl centimetrové kyvety. Poté jsme opět ředili jednotlivé vzorky v poměru 1:5 puřrem. Naředěné vzorky jsme měřili v kyvetě o šířce 0,02 cm.

## 5. VÝSLEDKY

### 5. 1. VÝSLEDKY MĚŘENÍ UV-VIS SPEKTER

Pro vzorky připravené viz 4. 6. 1. Postup přípravy vzorků pro měření UV-VIS spekter jsme měřili UV-VIS spektra na spektrofotometru Hewlett-Packard 8453.

#### 5. 1. 1. ABSORPČNÍ SPEKTRUM ALT



Obr. 6 UV-VIS spektrum pyridoxalového enzymu alaninaminotransferasy.

Jde o závislost absorbance na vlnové délce v nm pro enzym bez předchozí dialýzy.

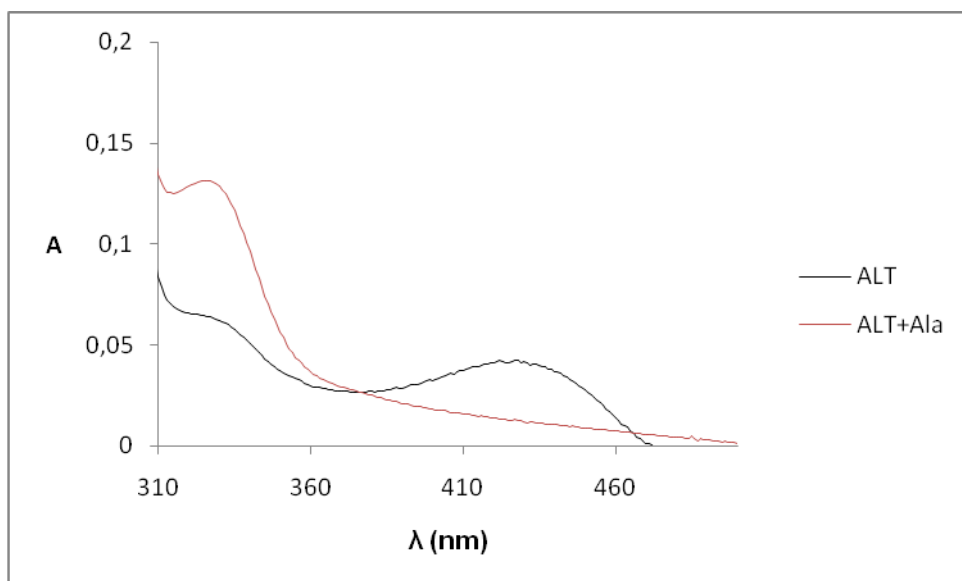
Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M.

Modrá křivka představuje spektrum předem nedialyzovaného enzymu, červená odpovídá enzymu po sedmidenní inkubaci při laboratorní teplotě a zelená enzymu po sedmidenní inkubaci za stejných podmínek a následné dialýze.

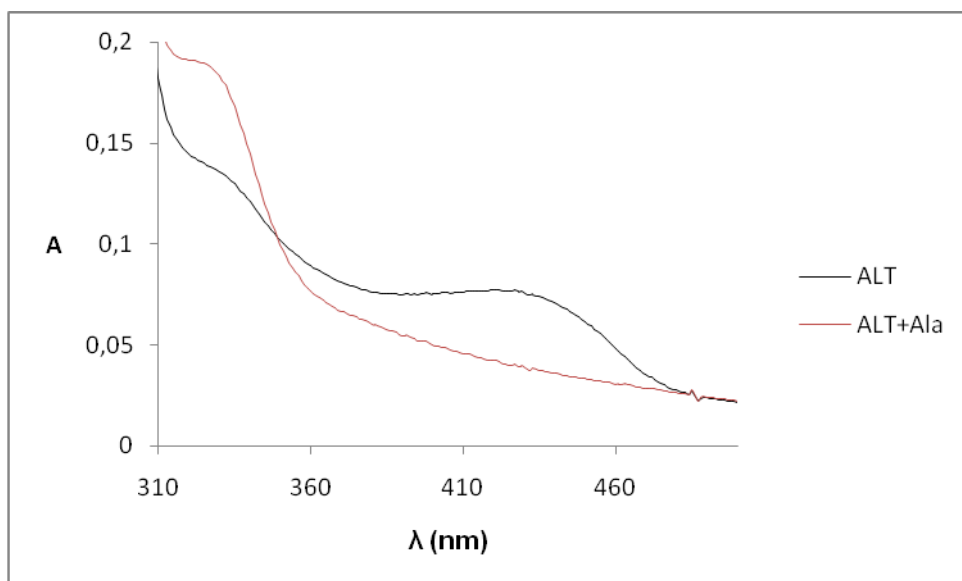
V oblasti vlnové délky 280 nm je možno pozorovat hlavní absorpční maximum charakteristické pro aromatické aminokyseliny v proteinu.

Spektrum předdialyzovaného enzymu bylo obdobné.

## 5. 1. 2. ABSORPČNÍ SPEKTRUM ALT V OBLASTI ABSORPCE KOENZYMU



Obr. 7 Spektrum enzymu bez předběžné dialýzy



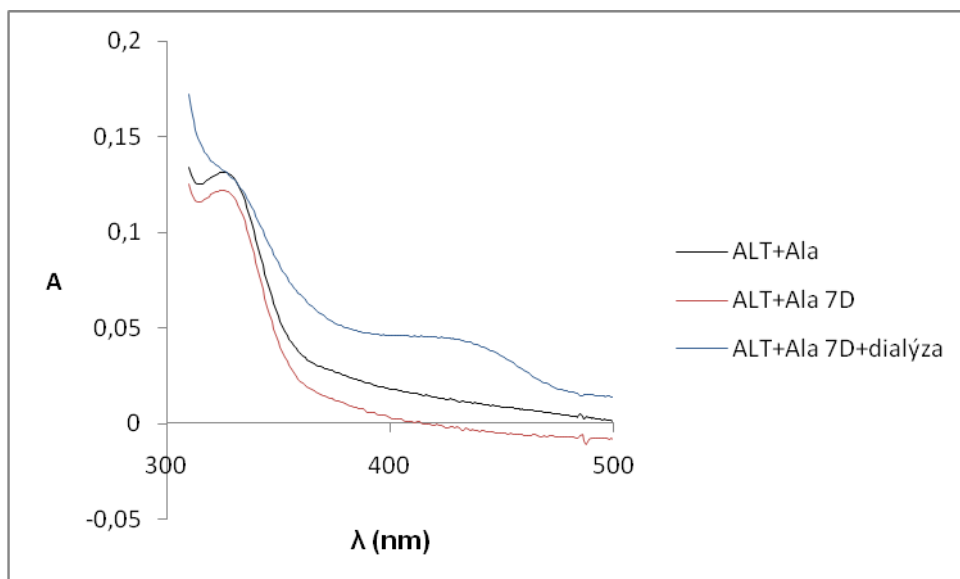
Obr. 8 Spektrum předdialyzovaného enzymu

Spektra na obrázcích 7 a 8 ukazují na vliv dialýzy na spektrum enzymu ALT. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M, koncentrace alaninu  $3,3 \cdot 10^{-2}$  M. Z obrázků vyplývá, že předchozí dialýza enzymu neovlivnila výrazně jeho absorpční spektrum. Černá křivka znázorňuje spektrum samotné ALT, na němž je viditelné absorpční maximum v oblasti 430nm, které odpovídá

absorpci navázaného koenzymu pyridoxal-5'-fosfátu. Spektrum je obdobné i po dialýze enzymu, což poukazuje na relativně pevnou vazbu koenzymu v aktivním místě enzymu.

Červená křivka odpovídá vzorku obsahujícímu enzym a substrát alanin. Spektru dominuje pík v oblasti 320 až 330 nm, který odpovídá pyridoxaminové formě enzymu. Přidáním substrátu k enzymu mizí maximum při 430 nm. Pyridoxaminová forma enzymu váže koenzym méně pevně než pyridoxalová. Existuje tudíž větší šance, že by mohl být koenzym vytěsněn PIHem.

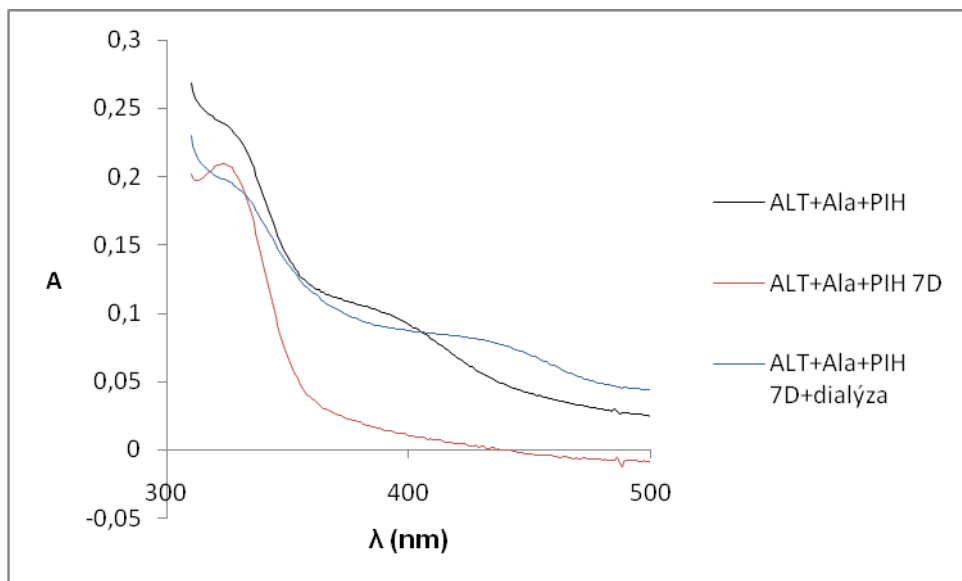
### 5. 1. 3. SROVNÁNÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER PŮVODNÍCH VZORKŮ, VZORKŮ PO SEDMIDENNÍ INKUBACI A INKUBOVANÝCH A NÁSLEDNĚ DIALYZOVANÝCH VZORKŮ



Obr. 9 Spektrum enzymu se substrátem alaninem pro nedialyzovaný enzym, po sedmidenní inkubaci a po inkubaci s následnou dialýzou vzorku.

Koncentrace ALT ve vzorcích byla  $10^{-4}$  M. Koncentrace substrátu alaninu byla  $3,3 \cdot 10^{-2}$  M. Pro původní vzorek a vzorek po inkubaci je možno pozorovat maximum při 320 nm odpovídající pyridoxaminové formě ALT. Dialýzou se odstranil alanin a došlo k přechodu enzymu do původní pyridoxalové formy s charakteristickým maximem při 430 nm, pík při 320 nm zanikl.

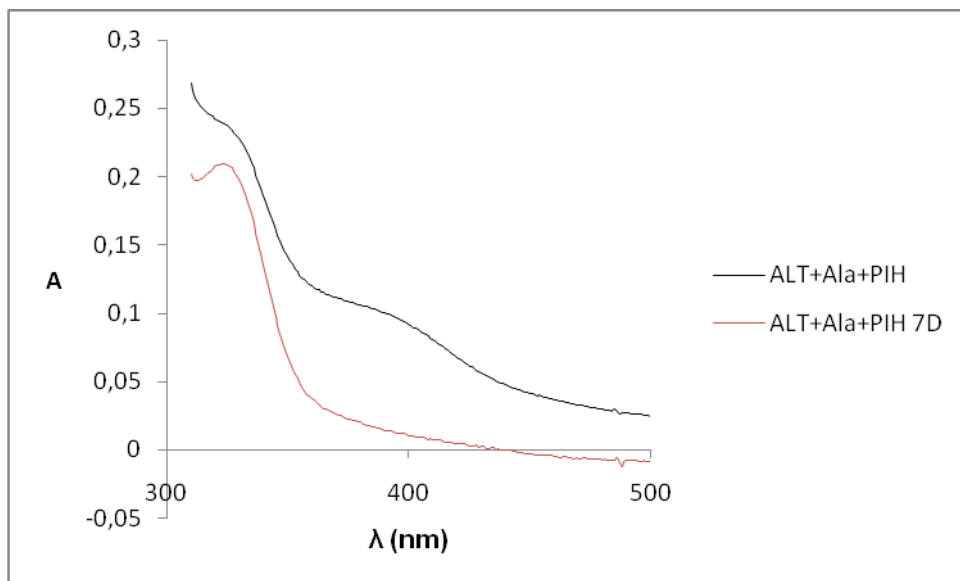




Obr. 10 Vliv PIH na pyridoxaminovou formu nedialyzovaného enzymu.

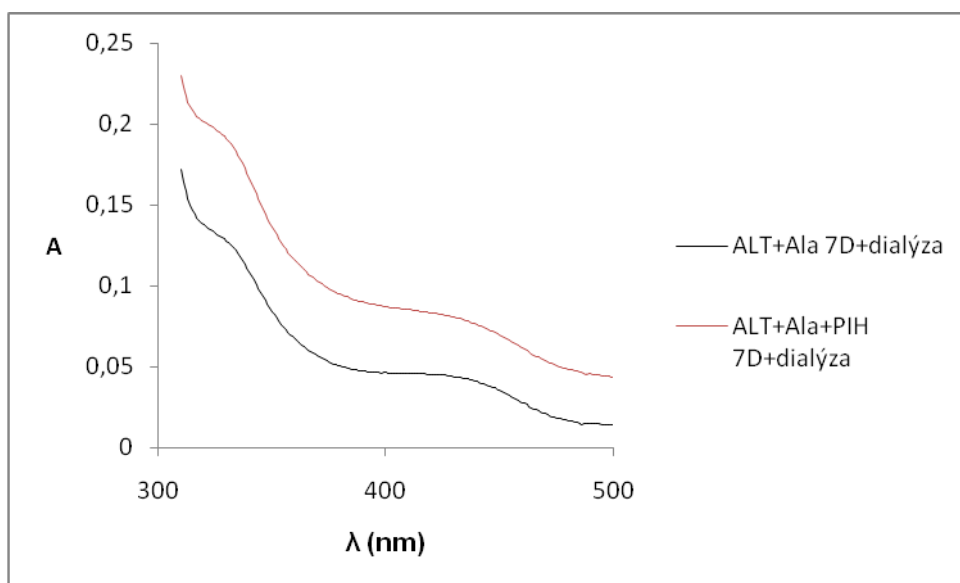
Koncentrace ALT a alaninu byla shodná jako u obr. 7, 8 a 9, koncentrace PIHu byla  $10^{-5}$  M. Substrát se váže na enzym, enzym přechází na pyridoxaminovou formu. V případě pyridoxaminové formy ALT je po přidání PIH trochu lépe než u pyridoxalové formy vidět zvýšení absorbance v oblasti kolem 350-360 nm, což odpovídá absorpci PIH.

Po inkubaci směsi s PIH a následné dialýze dochází k návratu enzymu zpět na pyridoxalovou formu. Došlo zřejmě k oddialyzování PIHu. Objevuje se znovu pík při 430 nm odpovídající pyridoxalové formě ALT.



Obr. 11 Srovnání původní křivky s křivkou po sedmidenní inkubaci směsi.

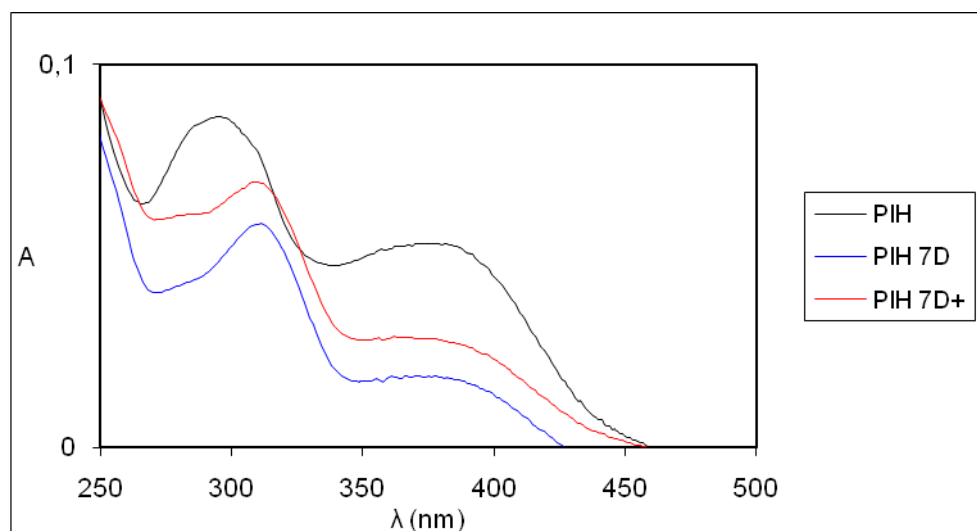
Koncentrace ALT a L-alaninu byla shodná jako u obr. 7, 8 a 9, koncentrace PIH byla  $10^{-5}$  M. Po týdenní inkubaci v podstatě mizí maximum v oblasti kolem 350-360 nm, což odpovídá rozkladu PIH. Spektrum se podobá spektru ALT+Ala z obrázku 9, je však podstatně vyšší v oblasti 320 nm, což by mohlo svědčit o tom, že vedle enzymu je ve vzorku ještě směs rozloženého pyridoxalu a isoniazidu.



Obr. 12 Srovnání spekter po sedmidenní inkubaci a dialýze pro enzym se substrátem a enzym, substrát a PIH. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M, koncentrace alaninu  $3,3 \cdot 10^{-2}$  M, koncentrace PIHu  $10^{-5}$  M.

Kvalitativně jsou tato spektra podobná, což podporuje představu, že PIH pravděpodobně nezpůsobil změnu v aktivním místě enzymu.

#### 5. 1. 4. ABSORPČNÍ SPEKTRUM PIH



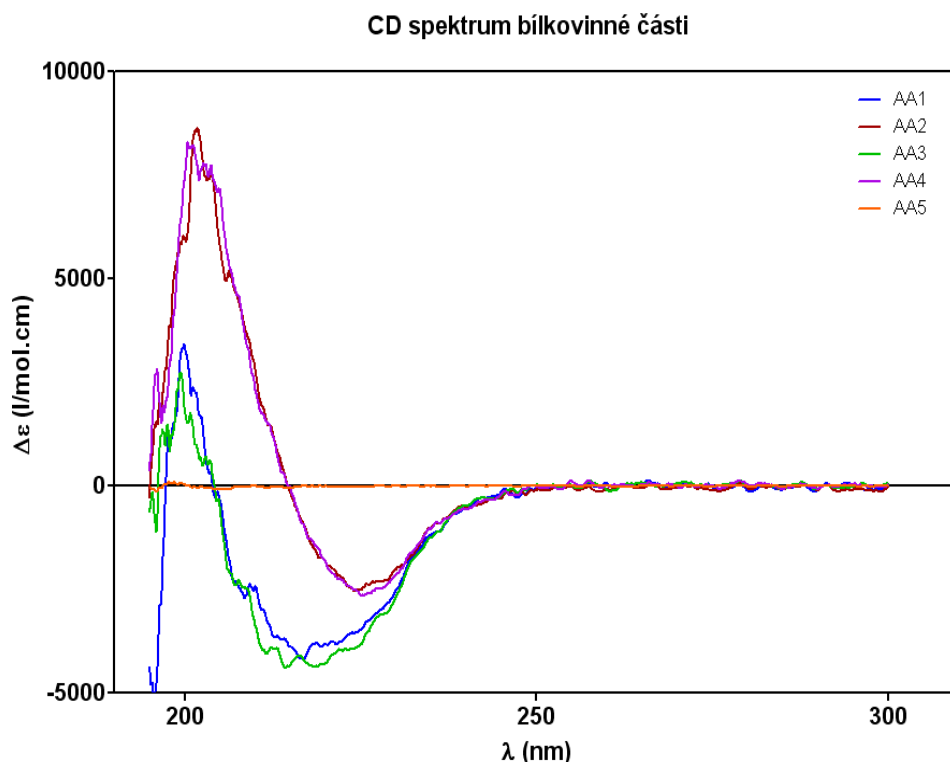
Obr. 13 Absorpční spektrum PIHu.

Černá křivka odpovídá spektru PIHu změřenému v čase 0, modrá spektru PIH po sedmi dnech inkubace a červená po sedmi dnech inkubace a následné dialýze. Koncentrace PIH byla  $3 \cdot 10^{-5}$  M. Spektrum samotného PIHu vykazuje maxima při 300 a 380 nm.

#### 5. 2. VÝSLEDKY MĚŘENÍ SPEKTER CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU (A UV-VIS SPEKTER)

Měření na cirkulárním dichrografu JASCO J-815 CD Spectrometer (Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, Praha) poskytlo kromě CD spekter i absorpční spektra.

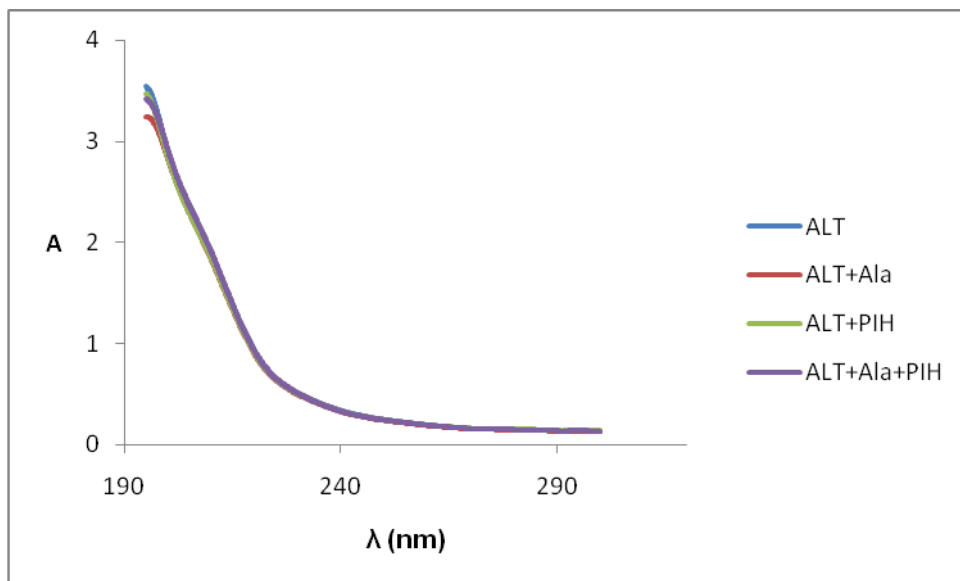
## 5. 2. 1. CD A ABSORPČNÍ SPEKTRUM BÍLKOVINNÉ ČÁSTI



Obr. 14 CD spektrum bílkovinné části měřené pro původní vzorky (neinkubované, nedialyzované).

Ve vzorcích ALT+PIH (AA3) a ALT+Ala+PIH (AA4) byl PIH o koncentraci  $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . Koncentrace ALT byla  $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , L-alaninu  $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ .

PIH (AA5) o koncentraci  $2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  nedává signál cirkulárního dichroismu, protože není opticky aktivní. Ostatní spektra lze rozdělit na dvě dvojice, které vykazují podobné spektrum. První dvojici s podobným spektrem tvoří vzorky ALT (AA1) a ALT+PIH (AA3). Po navázání substrátu alaninu v aktivním místě enzymu dochází ke změně kvantifikace píku. Druhou dvojici tvoří vzorky ALT+Ala (AA2) a ALT+Ala+PIH (AA4).

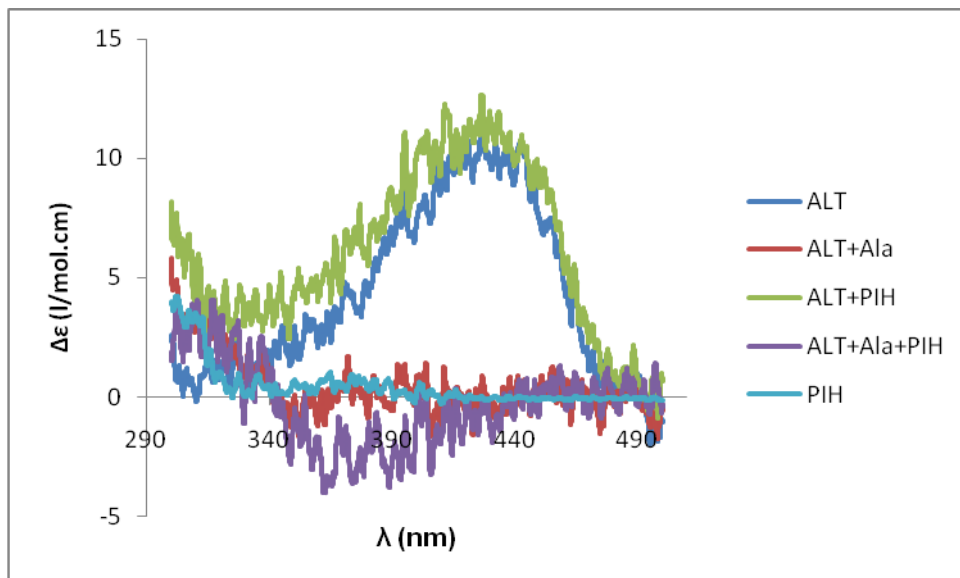


Obr. 15 Absorpční spektrum bílkovinné části vzorků.

Koncentrace ALT byla  $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , koncentrace L-alaninu  $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  a PIHu  $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ .

Z obrázku je patrné, že se bílkovinná složka vzorků nemění.

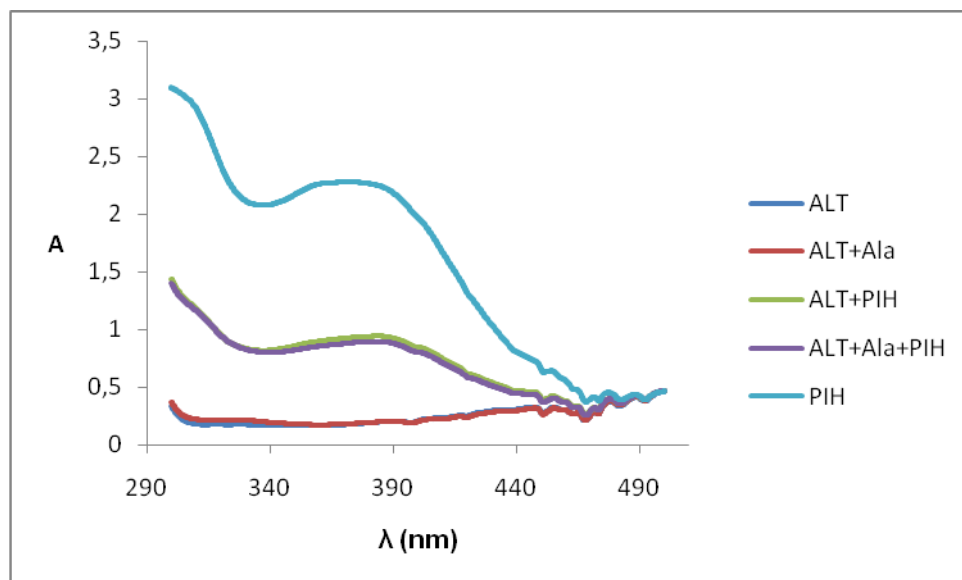
### 5. 2. 2. CD A ABSORPČNÍ SPEKTRUM ALT V OBLASTI ABSORPCE KOENZYMU



Obr. 16 CD spektrum ALT v oblasti absorpce koenzymu.

Koncentrace samostatného PIH ve vzorku byla  $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , ve vzorcích ALT+PIH a ALT+Ala+PIH byla výsledná koncentrace PIH  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ . Koncentrace ALT byla  $10^{-4} \text{ M}$ , alaninu  $10^{-1} \text{ M}$ .

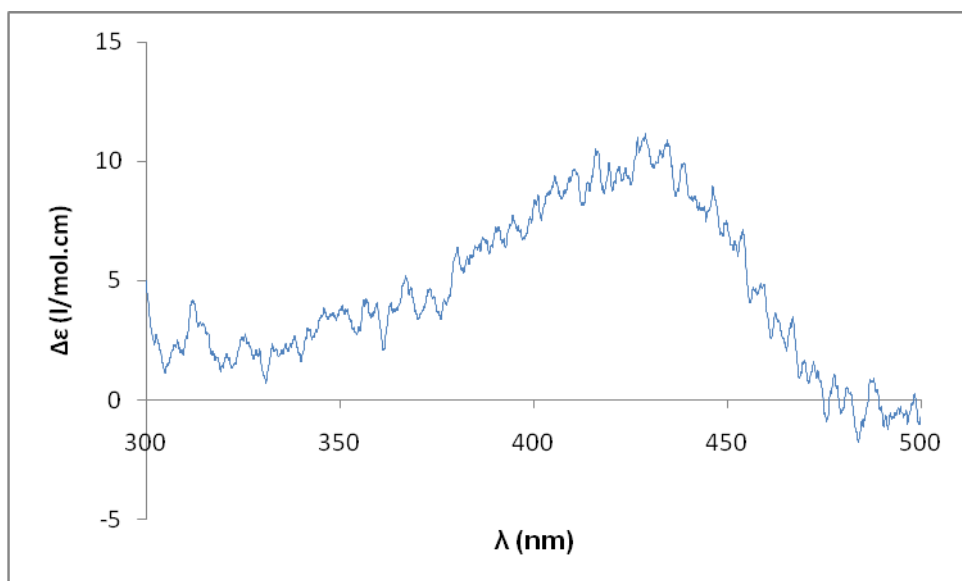
PIH nedává CD signál, což je v souladu s vlastnostmi látky. U vzorků ALT a ALT+PIH pozorujeme zřetelný pík při vlnové délce 430 nm, což odpovídá pyridoxalové formě enzymu. V případě vzorků ALT+alanin a ALT+alaninem +PIH pík v přítomnosti alaninu zaniká. Enzym přechází na pyridoxaminovou formu, lze pouze tušit pík v oblasti 320 až 330nm.



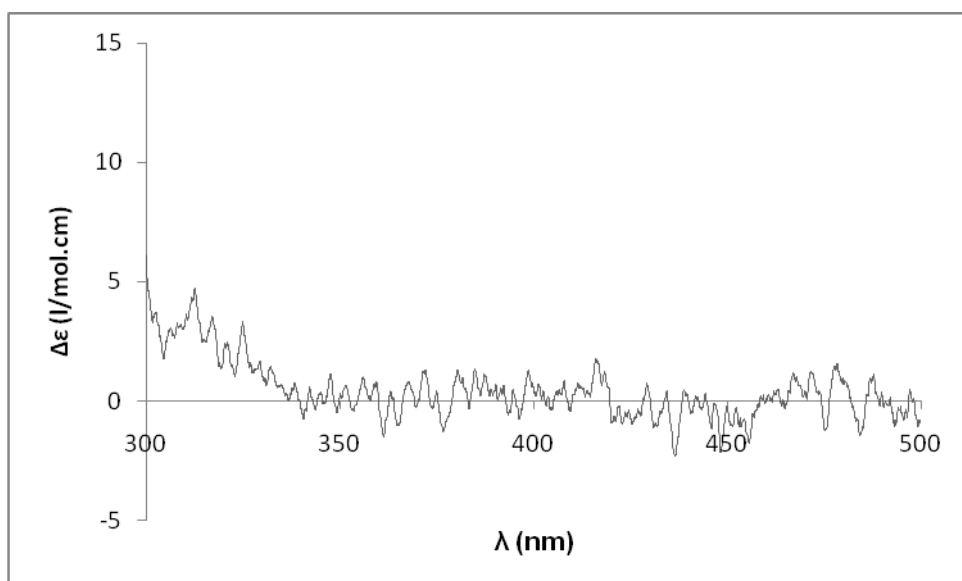
Obr. 17 Vliv PIH na absorpční spektrum ALT v oblasti absorpce koenzymu.

Koncentrace jednotlivých složek byla stejná jako v případě obr. 16. Obrázku dominuje absorpční spektrum PIHu, zatímco absorpce vlastního koenzymu je zanedbatelná. PIH vykazuje charakteristická maxima absorpce při 300 a 380 nm na rozdíl od CD spekter, kde se neprojevuje. Vzorky ALT+PIH a ALT+alanin+PIH vykazují také maximum při 300 a 380 nm, změřená absorbance je však méně než poloviční, což je dáno třetinovou koncentrací PIH ve vzorcích oproti vzorku tvořeném samostatným PIHem. Absorpční maximum pyridoxaminové formy enzymu při 320 až 330 nm pro vzorek ALT+Ala je nevýrazné.

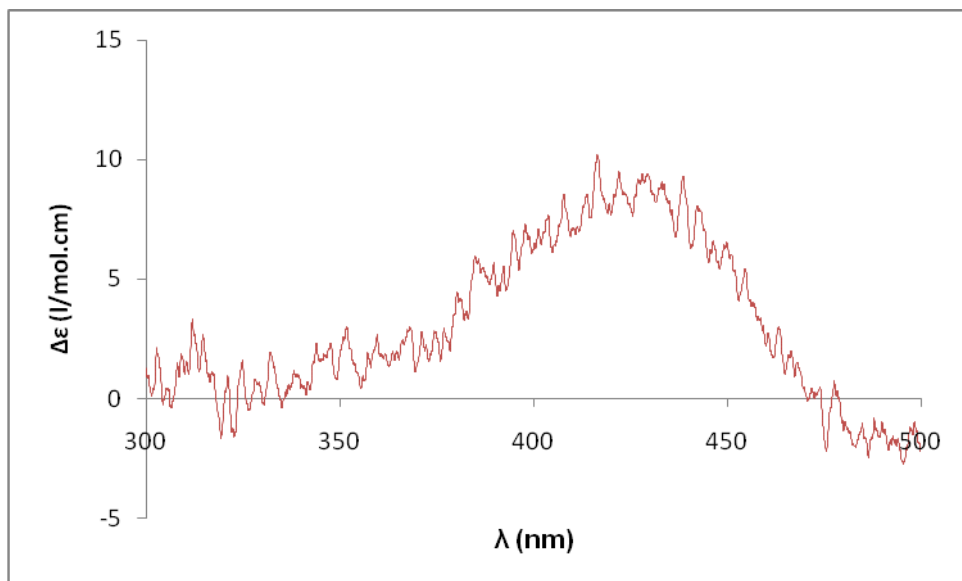
## 5. 2. 3. CD SPEKTRA VZORKŮ INKUBOVANÝCH 6 DNÍ



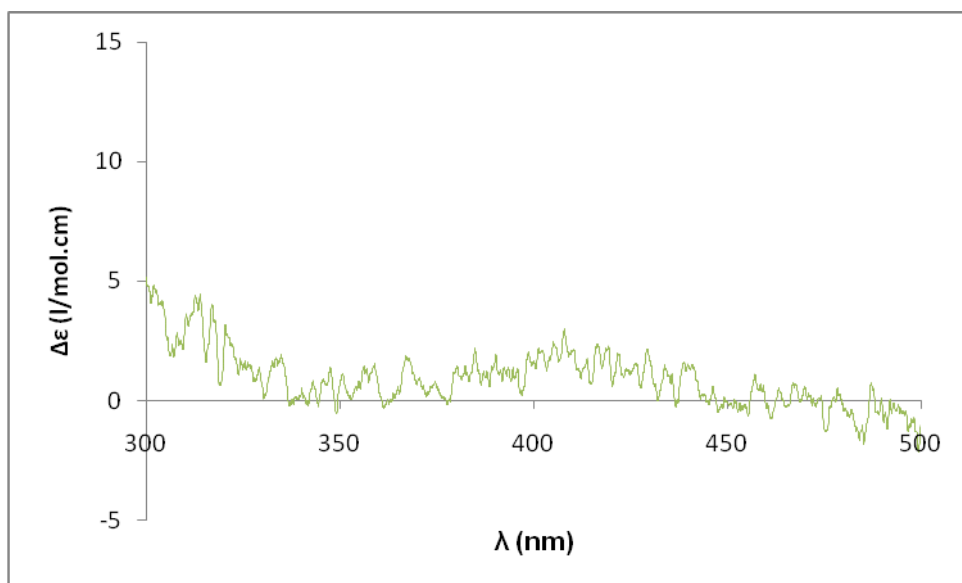
Obr. 18 CD spektrum vzorku tvořeného ALT o koncentraci  $10^{-4}$  M v rozmezí vlnových délek 300 až 500 nm.



Obr. 19 CD spektrum vzorku ALT+Ala v rozmezí vlnových délek 300 až 500 nm. Koncentrace ALT ve vzorku byla  $10^{-4}$ M, koncentrace alaninu byla  $10^{-1}$ M.



Obr. 20 CD spektrum vzorku ALT+PIH v rozmezí vlnových délek 300 až 500 nm. Koncentrace ALT ve vzorku byla  $10^{-4}$ M, PIH byl ve vzorku v koncentraci  $2 \cdot 10^{-4}$ M.



Obr. 21 CD spektrum vzorku ALT+Ala+PIH v rozmezí vlnových délek 300 až 500 nm. Koncentrace ALT ve vzorku byla  $10^{-4}$ M, koncentrace alaninu  $10^{-1}$ M a PIHu  $2 \cdot 10^{-4}$ M.

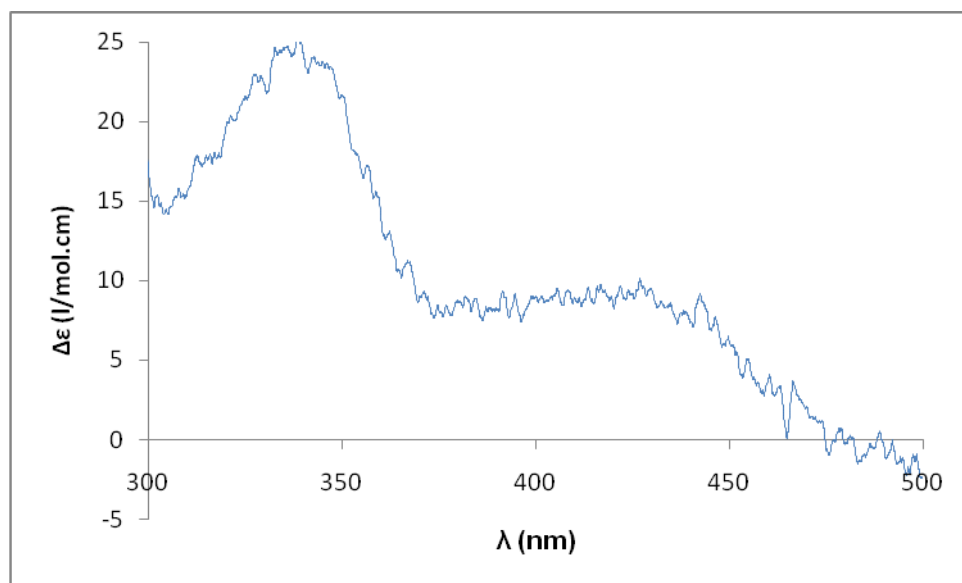
Na obrázcích 18 až 21 jsou zachycena CD spektra vzorků inkubovaných 6 dní. Na obrázcích 18 (ALT po šestidenní inkubaci) a 20 (ALT+PIH po šestidenní inkubaci) je dobře patrný pík pyridoxalové formy enzymu při 430 nm. Vzorky C2 (ALT+alanin po šestidenní inkubaci) a C4 (ALT+alanin+PIH po šestidenní inkubaci) vykazovaly velmi slabý signál pyridoxaminové



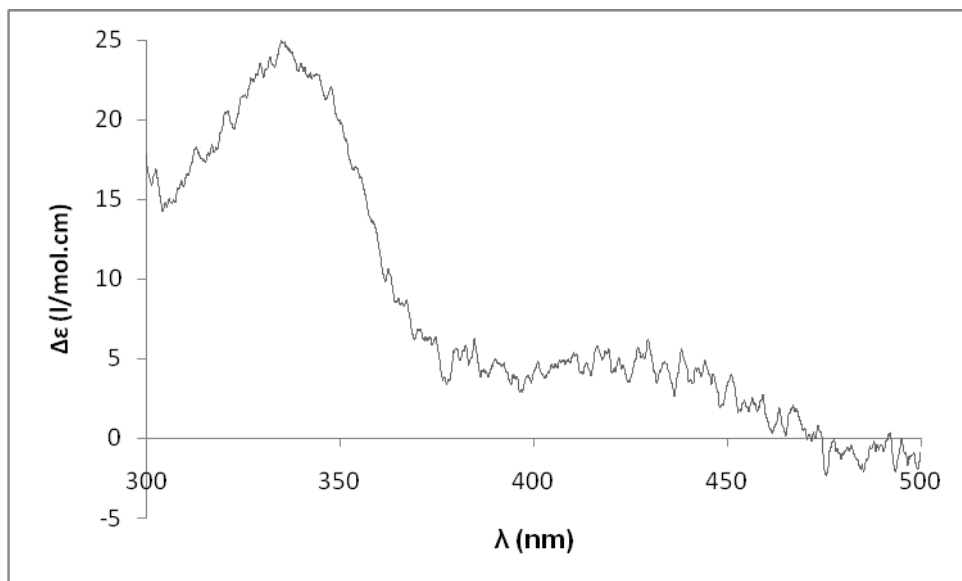
formy při 320 až 330 nm. Zmizelo maximum pyridoxalové formy ALT při 430 nm. PIH nezabránil transaminační reakci, nezabránil zmizení píku při 430 nm.

#### 5. 2. 4. CD SPEKTRA VZORKŮ 6 DNÍ INKUBOVANÝCH A NÁSLEDNĚ DIALYZOVANÝCH

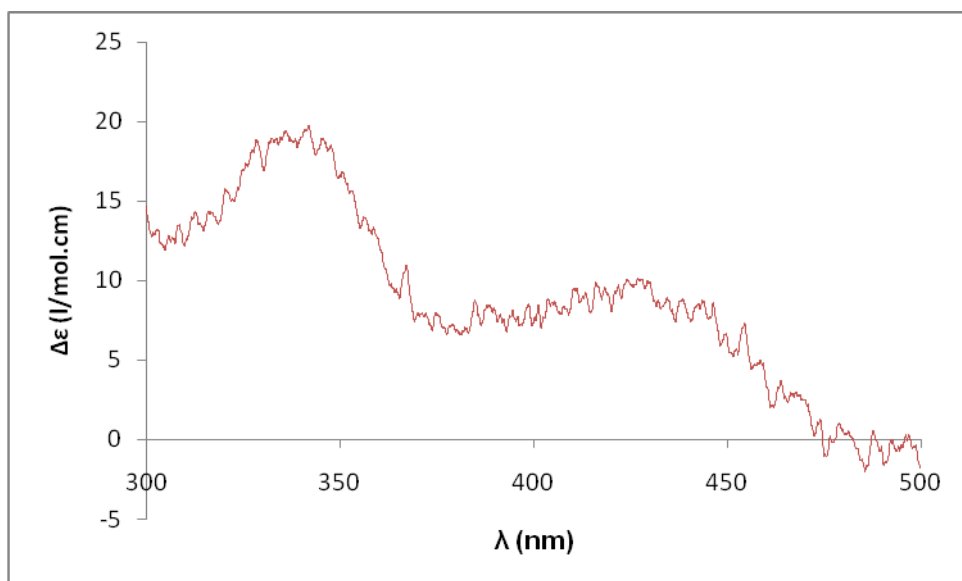
Vzorky byly inkubovány šest dní a poté dialyzovány jak bylo uvedeno v kapitole 4. 7. 1. Postup přípravy vzorků pro měření spekter cirkulárního dichroismu.



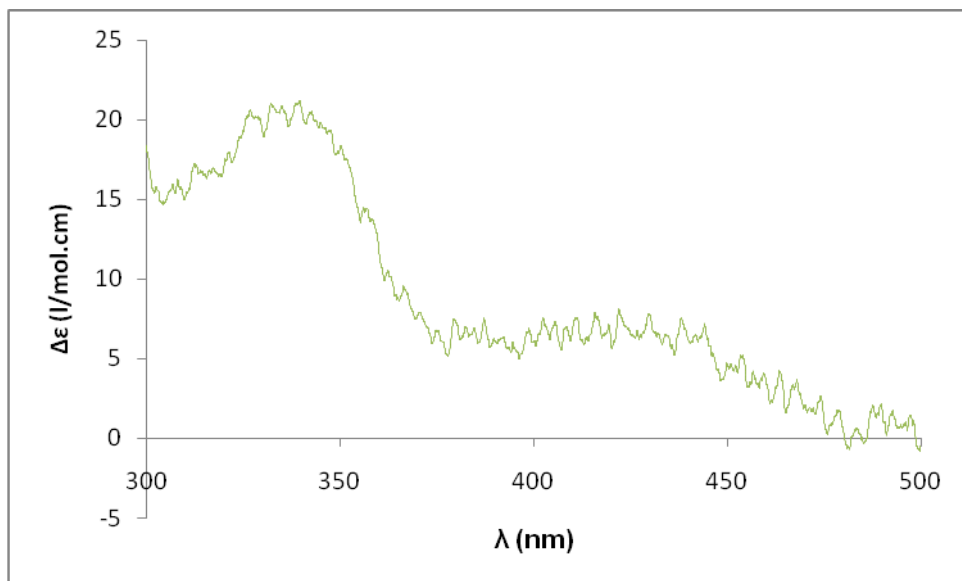
Obr. 22 CD spektrum ALT v rozmezí vlnových délek 300 až 500 nm. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$ M. Pík v oblasti 330 nm nejspíš odpovídá některé z dalších forem ALT, naše výsledky však nestačí na to, aby byla tato forma blíže identifikována.



Obr. 23 CD spektrum vzorku ALT+Ala v rozmezí vlnových délek 300 až 500 nm. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$ M, koncentrace alaninu  $10^{-1}$ M. Pyridoxaminová forma enzymu není trvalá, po dialýze se vrací do původní formy.



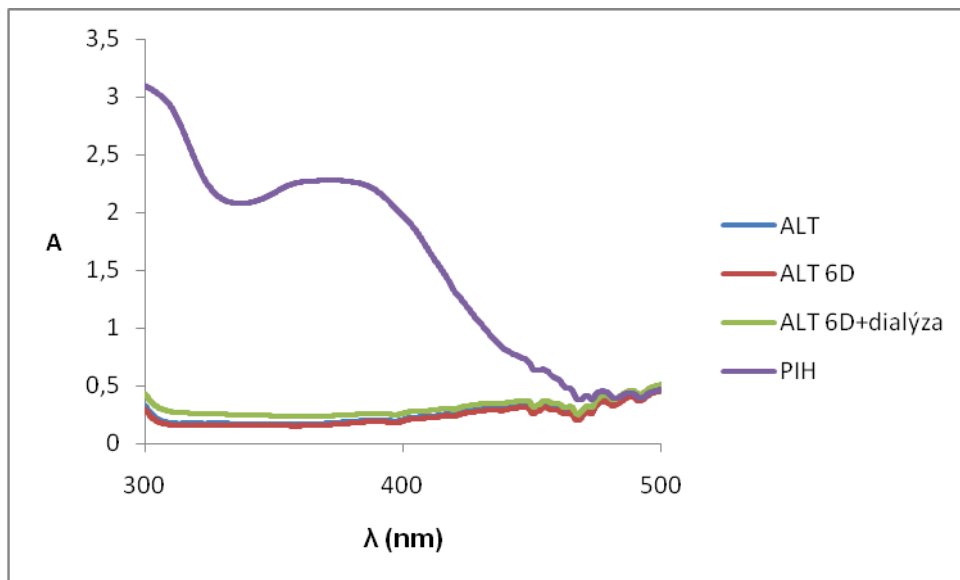
Obr. 24 CD spektrum vzorku ALT+PIH v oblasti vlnových délek 300 až 500 nm. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$ M, koncentrace PIH byla  $2 \cdot 10^{-4}$ M.



Obr. 25 CD spektrum vzorku ALT+Ala+PIH v rozmezí vlnových délek 300 až 500 nm.  
Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$ M, koncentrace alaninu  $10^{-1}$ M a PIHu  $2 \cdot 10^{-4}$ M

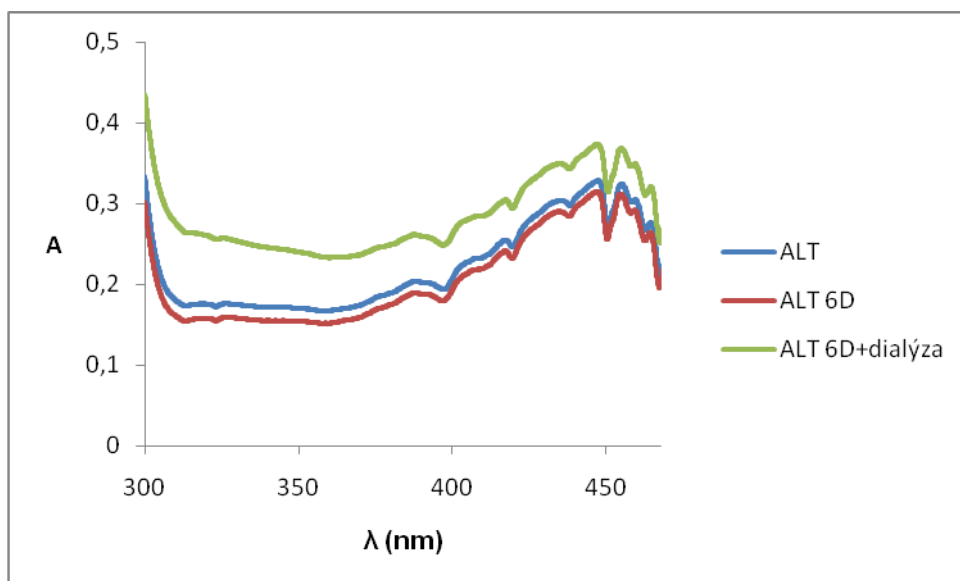
U vzorků ALT+Ala a ALT+Ala+PIH došlo zřejmě oddialyzování alaninu, enzym se vrátil do původní formy, pyridoxaminová forma přešla zpět na pyridoxalovou. Po dialýze se enzym ve všech vzorcích nacházel ve stejné formě.

### 5. 2. 5. SROVNÁNÍ ABSORBANCE PŮVODNÍCH VZORKŮ, VZORKŮ PO ŠESTIDENNÍ INKUBACI A INKUBOVANÝCH A NÁSLEDNĚ DIALYZOVANÝCH VZORKŮ



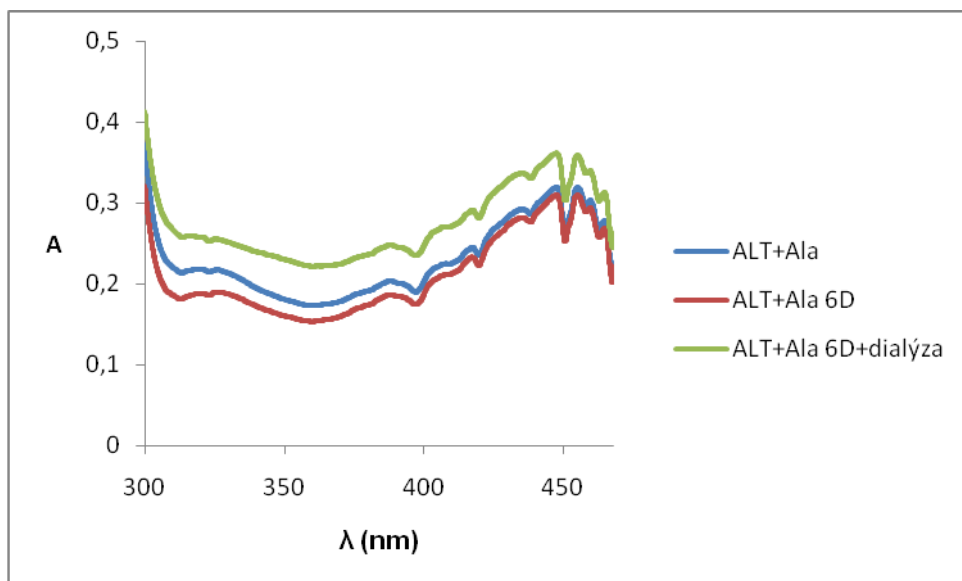
Obr. 26 Srovnání absorpčního spektra původního vzorku ALT, inkubovaného vzorku, inkubovaného a následně dialyzovaného vzorku a spektra PIHu.

Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M, koncentrace PIHu byla  $6 \cdot 10^{-4}$  M. Na obrázku je patrná výrazná absorpční křivka PIH, ve srovnání s ní je absorpce koenzymu ALT nevýrazná.

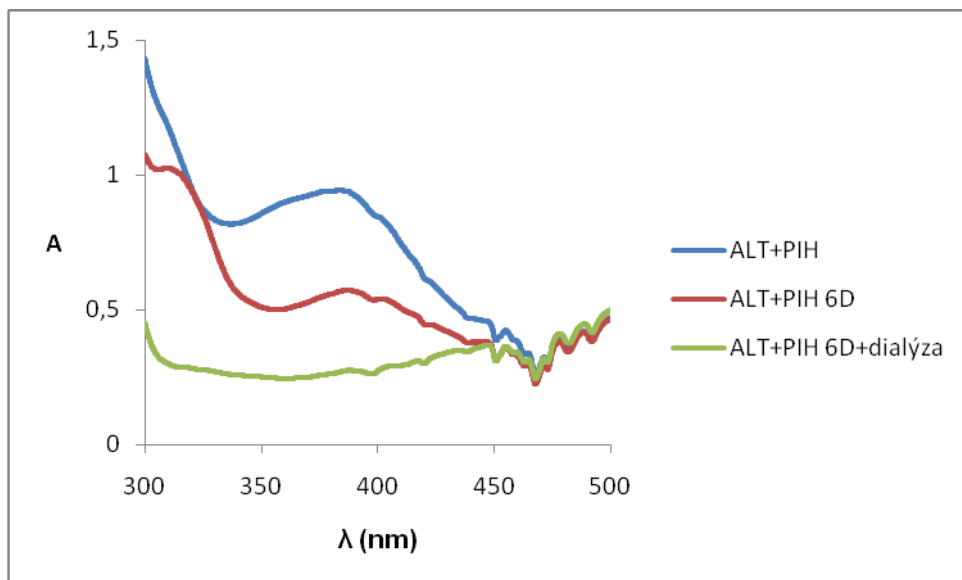


Obr. 27 Spektrum původního vzorku ALT, inkubovaného vzorku a inkubovaného a následně dialyzovaného vzorku po eliminaci absorpčního spektra PIH. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M.

Pík v oblasti 430 nm odpovídá pyridoxalové formě ALT. Není jasné, proč dialýza vzorku vede k nárůstu absorbance.

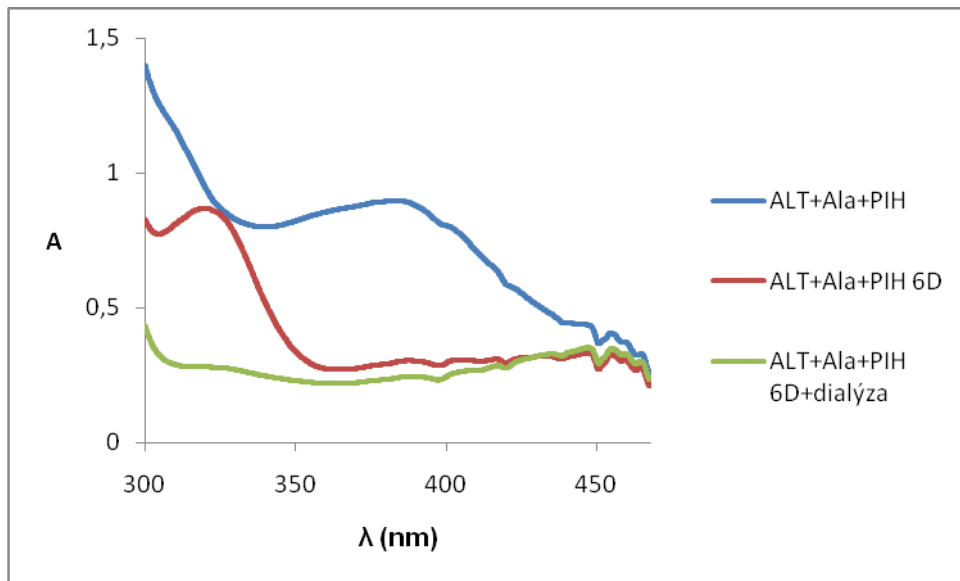


Obr. 28 Spektrum původního vzorku ALT+Ala, inkubovaného vzorku a inkubovaného a následně dialyzovaného vzorku. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$ M, koncentrace alaninu  $10^{-1}$ M. V oblasti 330 nm lze pouze tušit pík odpovídající pyridoxaminové formě enzymu.



Obr. 29 Absorpční spektrum původního vzorku enzymu s PIH, vzorku po týdenní inkubaci a vzorku inkubovaného a následně dialyzovaného. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$ M, koncentrace PIH byla  $2 \cdot 10^{-4}$ M.

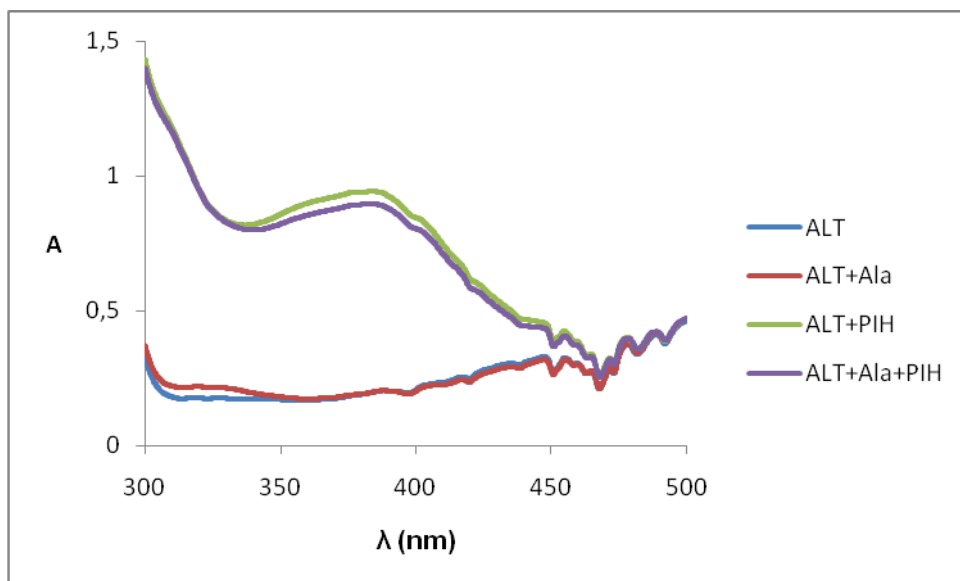
PIH vykazuje absorpční maxima při 300 a 380 nm. Lze pozorovat rozklad a úbytek PIH po šestidenní inkubaci. Následná dialýza odstranila veškerý PIH ze vzorku.



Obr. 30 Srovnání absorpčního spektra původního vzorku enzym+alanin+PIH, inkubovaného vzorku a inkubovaného a dialyzovaného vzorku. Koncentrace jednotlivých složek byly pro ALT  $10^{-4}$  M, L-alaninu  $10^{-1}$  M a PIHu  $2 \cdot 10^{-4}$  M.

PIH ani v přítomnosti substrátu alaninu neovlivní spektrální profil. Došlo však ke většímu úbytku PIH v přítomnosti alaninu.

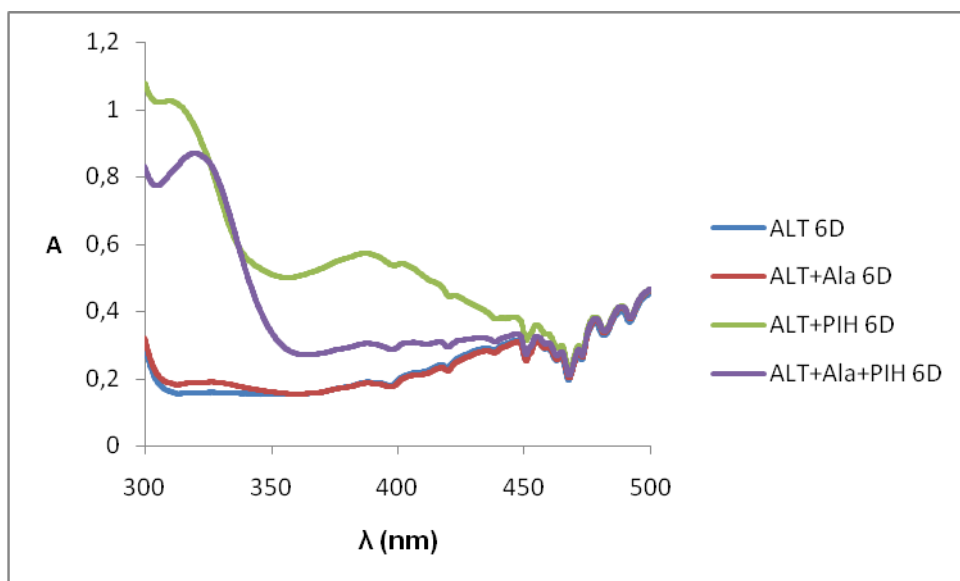
### 5. 2. 6. SROVNÁNÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER PŮVODNÍCH VZORKŮ (NEINKUBOVANÝCH, NEDIALYZOVANÝCH)



Obr. 31 Absorpční spektra původních vzorků (neinkubovaných, nedialyzovaných). Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M, L-alaninu  $10^{-1}$  M a PIHu  $2 \cdot 10^{-4}$  M.

Vzorek ALT+alanin má podobný spektrální profil jako ALT, v případě spektra vzorku ALT+alanin je v oblasti 320-330 nm nepatrný pík pyridoxaminové formy. Druhá dvojice podobných spekter odpovídá vzorkům ALT+PIH a ALT+alanin+PIH. Oba vzorky vykazují maximum při vlnové délce 300 a 380 nm, což odpovídá charakteristickým absorpčním maximům PIH.

## 5. 2. 7. SROVNÁNÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER VZORKŮ PO ŠESTIDENNÍ INKUBACI

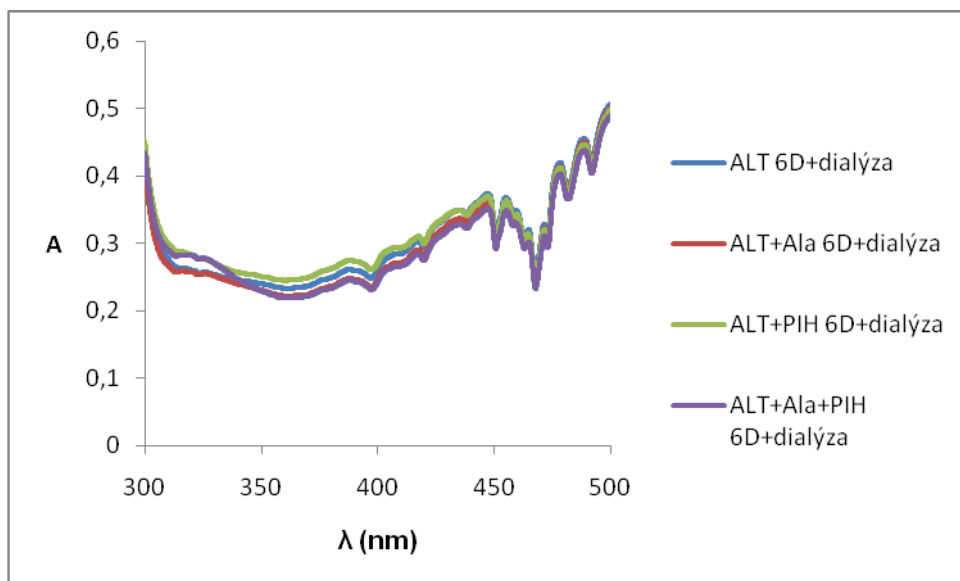


Obr. 32 Absorpční spektra vzorků po šestidenní inkubaci v temnu při laboratorní teplotě. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M, L-alaninu  $10^{-1}$  M a PIHu  $2 \cdot 10^{-4}$  M.

Spektra vzorků ALT a ALT+alanin jsou téměř shodná a neliší se od spekter původních vzorků. V případě vzorku ALT+alanin lze opět pozorovat nevýrazný pík pyridoxaminové formy kolem 320-330 nm. U spektra vzorku ALT+PIH je možno pozorovat snížení píku v oblasti 380 nm oproti vzorku před inkubací. Ještě výraznější pokles je vidět u vzorku ALT+alanin+PIH, u kterého došlo k zániku píku při vlnové délce 380 nm. Došlo pravděpodobně k rozkladu PIH. Vzorek ALT+alanin+PIH po inkubaci vykazuje maximum při 320-330 nm odpovídající pyridoxaminové formě enzymu.



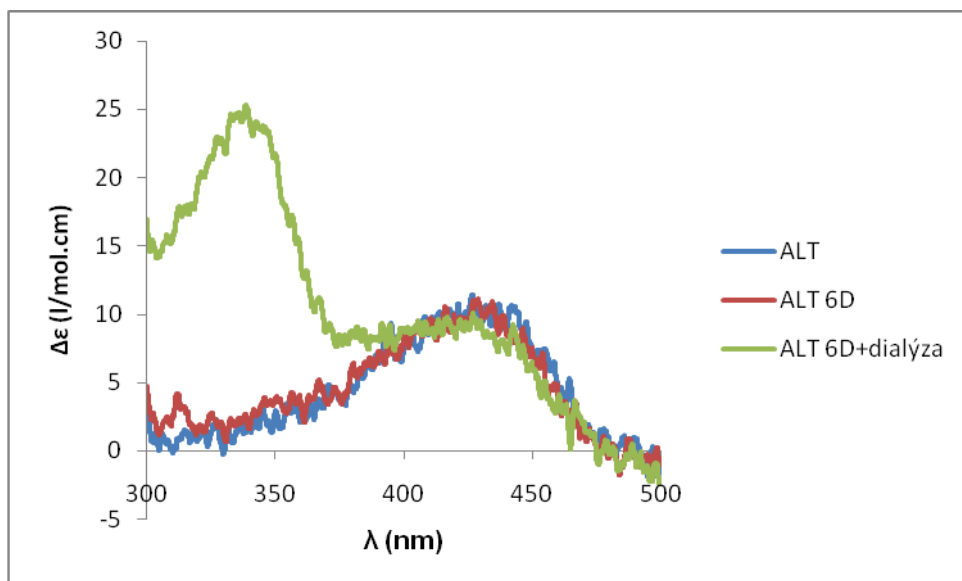
### 5. 2. 8. SROVNÁNÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER INKUBOVANÝCH A NÁSLEDNĚ DIALYZOVANÝCH VZORKŮ



Obr. 33 Absorpční spektra vzorků po šestidenní inkubaci a dialýze. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M, L-alaninu  $10^{-1}$  M a PIHu  $2 \cdot 10^{-4}$  M.

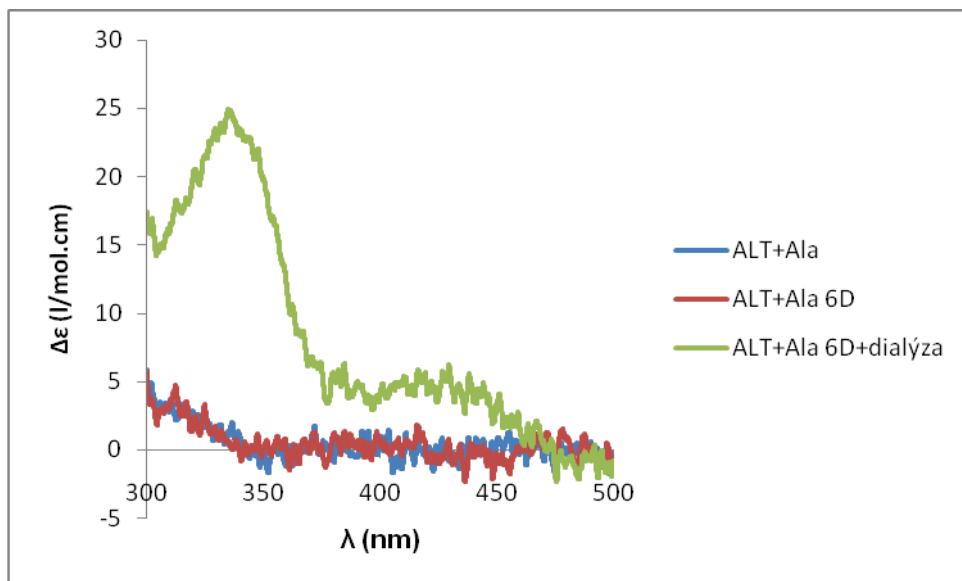
Absorpční křivky jsou totožné pro dvojici ALT a ALT+PIH a dvojici ALT+alanin a ALT+alanin+PIH. Dialýza úplně odstranila PIH.

### 5. 2. 9. SROVNÁNÍ CD SPEKTER PŮVODNÍCH, INKUBOVANÝCH A INKUBOVANÝCH A NÁSLEDNĚ DIALYZOVANÝCH VZORKŮ.

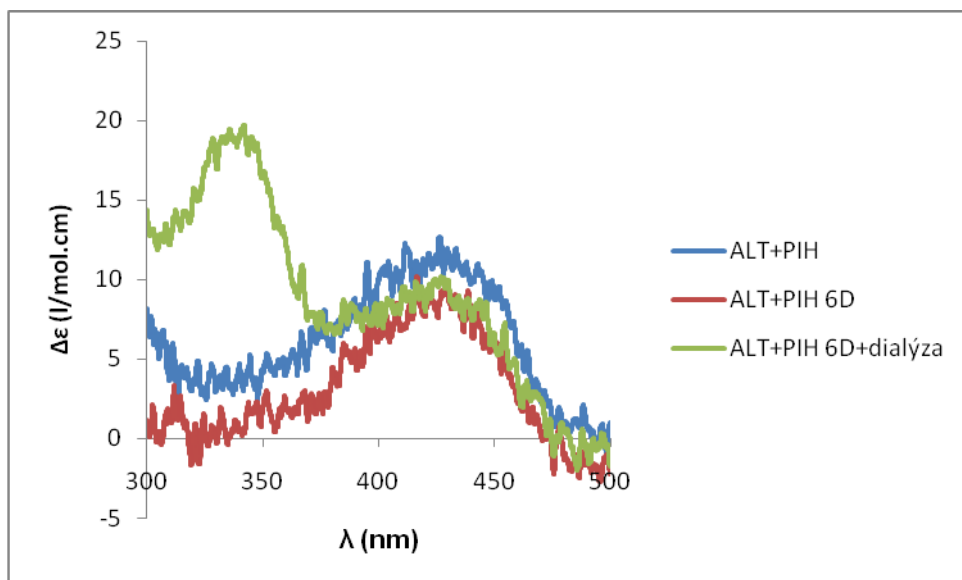


Obr. 34 Srovnání CD spekter v rozmezí vlnových délek 300 až 500 nm pro původní vzorek enzymu ALT, pro inkubovaný a inkubovaný a dialyzovaný vzorek. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M.

Po šestidenní inkubaci se spektrum nezměnilo tvarem ani kvantitativně. Pík při vlnové délce 430 nm odpovídá pyridoxalové formě ALT. Nelze však jednoznačně vysvětlit pík u inkubovaného a následně dialyzovaného vzorku při vlnové délce 330 nm. Pík při 330 nm po dialýze patrně odpovídá nějaké další formě enzymu.

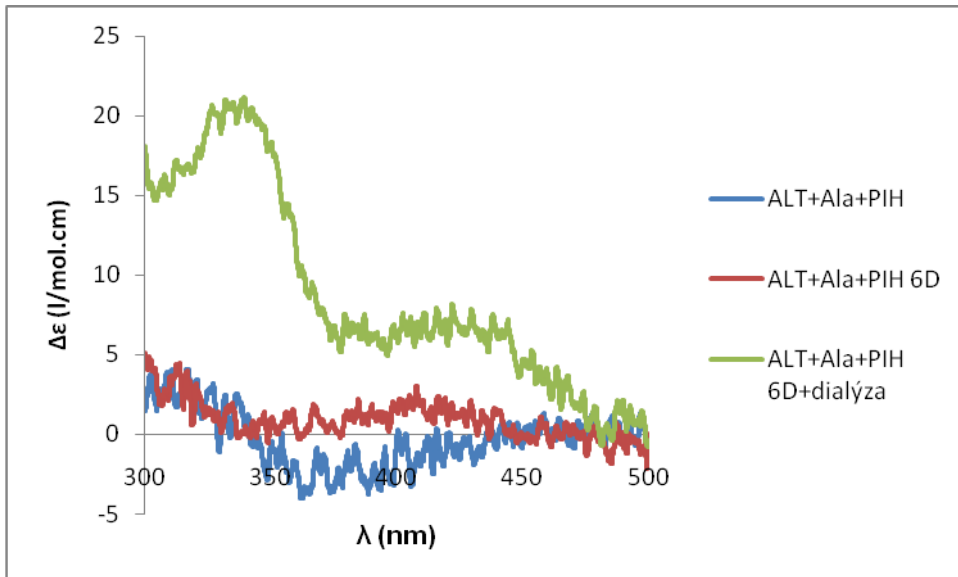


Obr. 35 Srovnání spekter cirkulárního dichroismu v rozmezí vlnových délek 300 až 500 nm pro původní vzorek enzym+ alanin, inkubovaný a inkubovaný a následně dialyzovaný vzorek. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M, koncentrace L-alaninu byla  $10^{-1}$ M. V přítomnosti alaninu mizí pík pyridoxalové formy, objevuje se slabý signál pyridoxaminové formy.



Obr. 36 Srovnání CD spekter původního vzorku ALT+PIH, vzorku po šestidenní inkubaci a inkubovaného a dialyzovaného vzorku. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M, koncentrace PIHu  $2 \cdot 10^{-4}$  M.

Původní a inkubovaný vzorek vykazují kvalitativně shodné spektrum, které je shodné se spektrem samotného enzymu ALT viz obr. 34. PIH pravděpodobně neovlivňuje spektrum koenzymu.



Obr. 37 Srovnání CD spekter původního vzorku ALT+alanin+PIH s inkubovaným a inkubovaným a dialyzovaným vzorkem. Koncentrace ALT byla  $10^{-4}$  M, koncentrace L-alaninu byla  $10^{-1}$  M a PIHu  $2 \cdot 10^{-4}$  M.

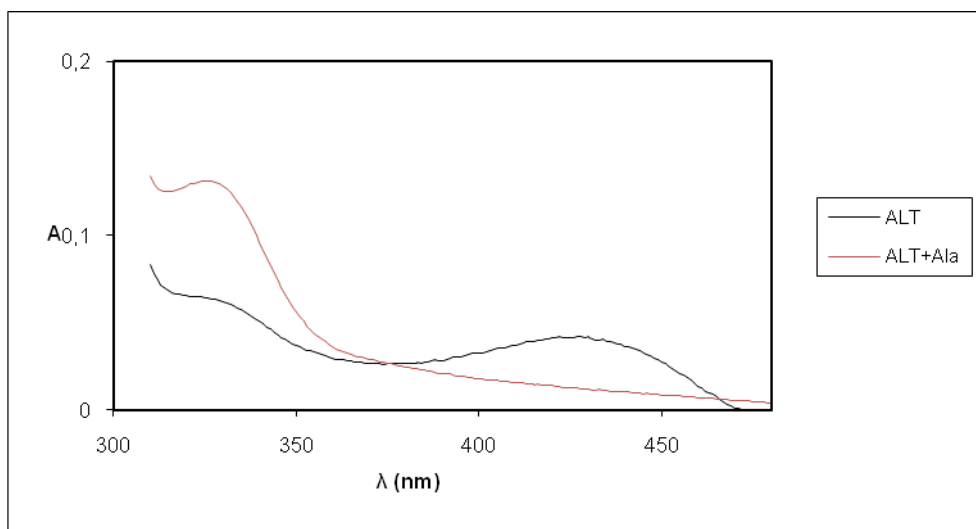
Pokles křivky v rozmezí vlnových délek 360 – 370 nm pro původní vzorek je pravděpodobně nevýznamný. PIH neovlivnil spektrum enzymu.

## 6. DISKUSE

Z důvodu větší přehlednosti byla řada problémů diskutována již ve výsledkové části pod příslušnými obrázky. V této části práce jsou zdůrazněny hlavní poznatky.

V rámci rigorózní práce jsme se zabývali vlivem pyridoxalisoikotinoylhydrazonu na spektrální vlastnosti pyridoxalového enzymu alaninaminotferasy (EC 2. 6. 1. 2.). Ovlivnění enzymu PIHem bylo zjišťováno měřením absorpčních spekter a spekter cirkulárního dichroismu.

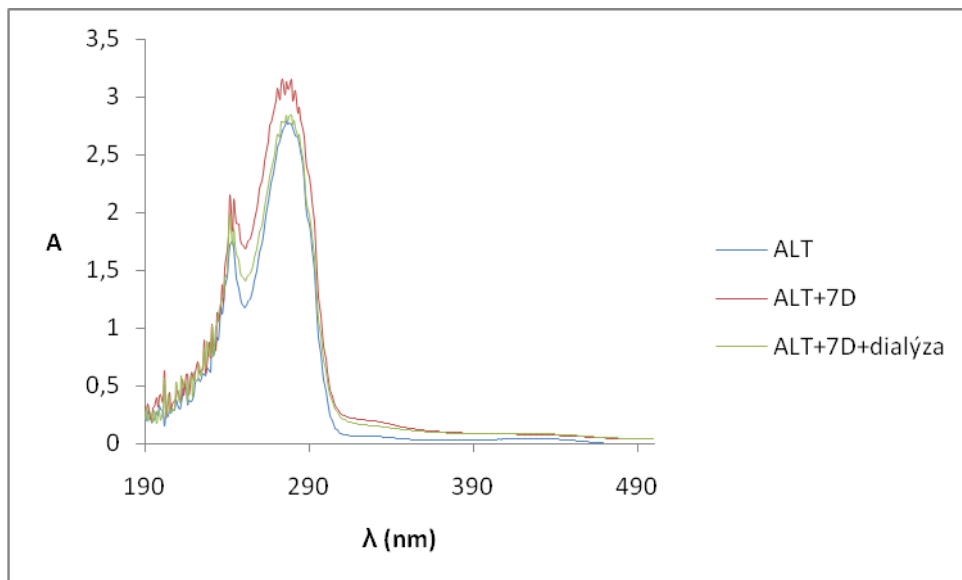
Pyridoxalová forma enzymu vykazovala absorpční maximum při vlnové délce 430 nm. Po přidání substrátu L-alaninu k enzymu, došlo k zániku maxima při 430 nm a objevilo se nové maximum v oblasti 320 až 330 nm. Zjištěná absorpční maxima jsou v souladu s výsledky uvedenými v literatuře (Gatehouse se sp. 1966). Přesun absorpčního maxima k 325 nm představuje první část transaminační reakce. Tímto bylo dokázáno, že je enzym aktivní a jeho koncentrace je dostatečná na to, aby bylo možno pozorovat transaminační reakce spektrálně.



Obr. 38 Důkaz funkčnosti enzymu alaninaminotferasy. Po přidání substrátu L-alaninu k ALT došlo ke změně polohy absorpčního maxima (nedialyzovaný enzym, koncentrace ALT  $10^{-4}$  M, koncentrace alaninu  $3,3 \cdot 10^{-2}$  M).

Zjistili jsme, že předchozí dialýza samotného enzymu nemá vliv na jeho spektrální vlastnosti. To svědčí o relativně pevné vazbě koenzymu na enzym v aktivním místě.

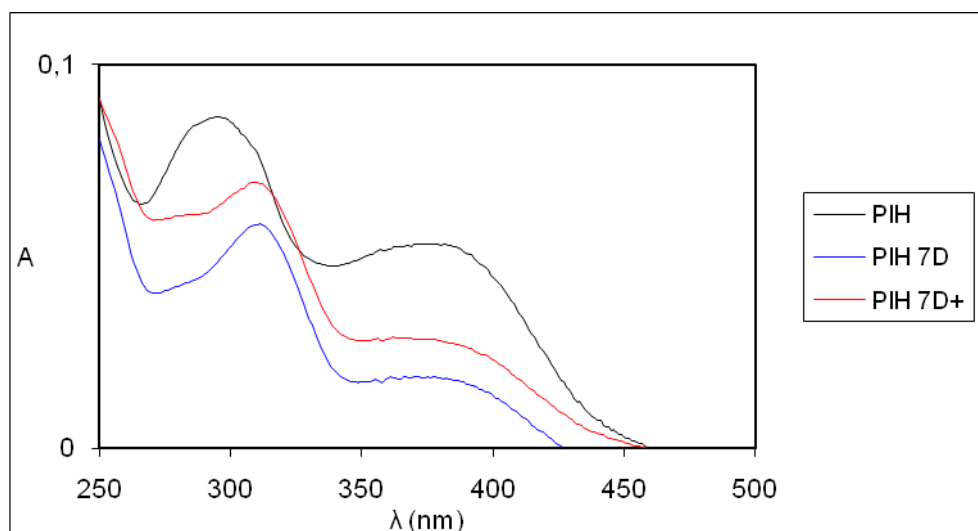
Prokázali jsme stabilitu použitého enzymu alaninaminotransferasy. Po sedmidenní inkubaci a následné dialýze enzym vykazoval hlavní absorpční maximum charakteristické pro aromatické aminokyseliny v proteinu při vlnové délce 280 nm.



Obr. 39 Absorpční spektrum alaninaminotransferasy.

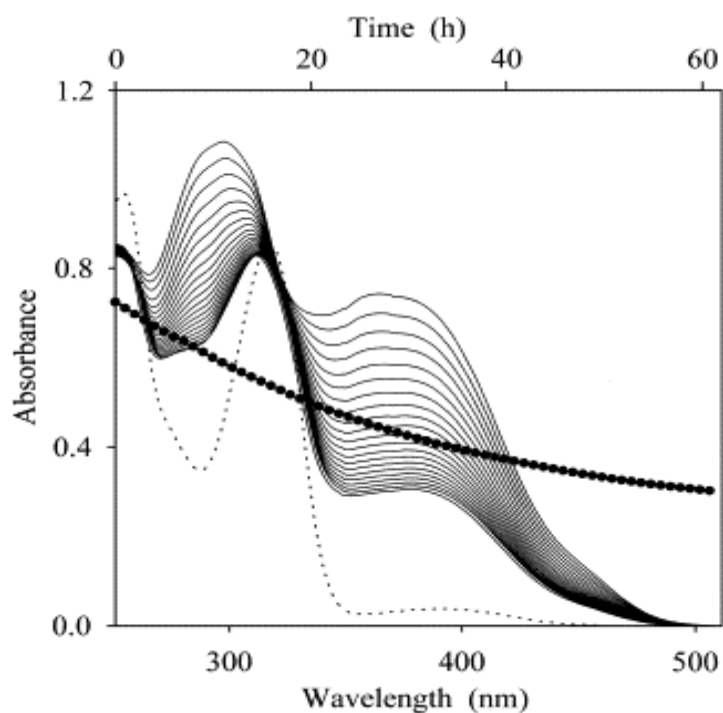
Při pokusech jsme vycházeli z představy, že na základě své podobnosti s pyridoxalfosfátem by mohl PIH vytěšňovat koenzym z vazby na aktivní místo, případně by mohl reagovat uvolňující se isoniazid.

Pozorování absorpčního spektra PIH ukázalo charakteristickou křivku, známou z literatury (Buss a Poňka 2003).



Obr. 40 Absorpční spektrum PIH (koncentrace  $3 \cdot 10^{-5}$  M). Spektrum PIHu vykazuje charakteristická maxima při 300 a 380 nm.

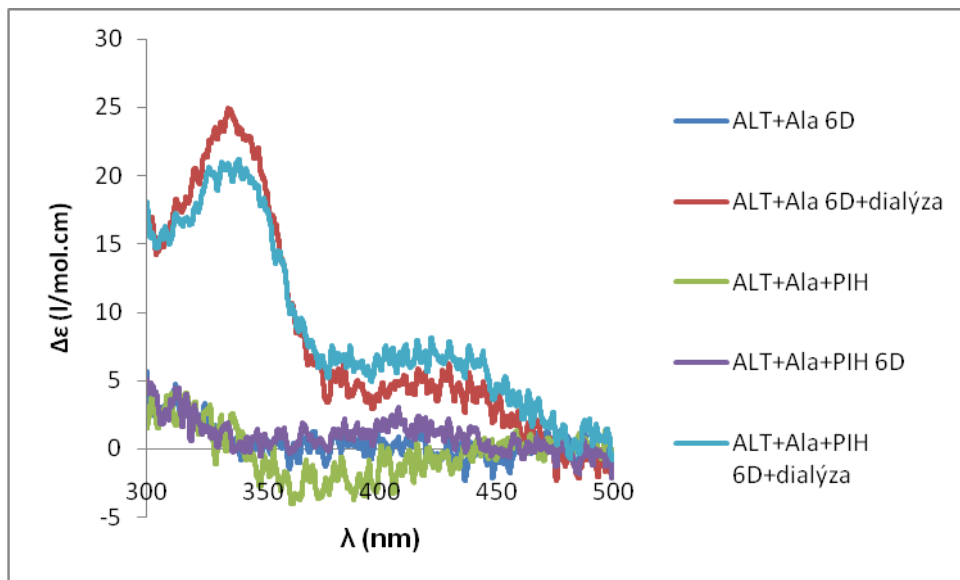
Naměřené spektrum odpovídá literatuře, i co se týče postupného rozkladu na směs pyridoxalu a isoniazidu (Buss a Poňka 2003).



— PIH  
 .... volný pyridoxal  
 + volný INH

Obr. 41 Absorpční spektrum PIH dle Busse a Poňky (2003).

Sledovali jsme, jak PIH ovlivňuje enzym ALT. Pro tato pozorování jsme s výhodou využili spektra cirkulárního dichroismu, kde samotný PIH neruší signál, protože není opticky aktivní. Zjistili jsme, že PIH neovlivňuje transaminační reakci, CD spektra se neměnila.



Obr. 42 CD spektra 6 dní inkubovaného vzorku ALT+alanin, inkubovaného a dialyzovaného vzorku ALT+alanin a původního vzorku ALT+alanin+PIH, inkubovaného a inkubovaného a následně dialyzovaného vzorku ALT+alanin+PIH (koncentrace ALT  $10^{-4}$  M, koncentrace L-alaninu  $10^{-1}$  M, koncentrace PIH  $2 \cdot 10^{-4}$  M).

PIH patrně neovlivnil spektrum enzymu. Pokles křivky v rozmezí vlnových délek 360 – 370 nm u původního vzorku ALT+Ala+PIH je pravděpodobně nevýznamný.

Ačkoli se jednalo o předem dialyzovaný enzym, po další dialýze po šestidenní inkubaci se objevil výrazný pík při 330 nm. Je možné, že se absorpcí při 330 nm projevila nějaká další forma enzymu. Tento pík si netroufáme blíže zhodnotit.

Podobné spektrum vykazovaly původní vzorek ALT+alanin+PIH, inkubovaný vzorek ALT+alanin+PIH a inkubovaný vzorek ALT+alanin (a původní vzorek ALT+alanin viz obr. 35). Z těchto spekter zmizelo maximum pyridoxalové formy při 430 nm, čemuž nezabránila ani přítomnost PIH, a objevil se slabý signál pyridoxaminové formy.

Dialýza odstranila ze vzorků PIH i alanin. Enzym se vrátil do původní pyridoxalové formy.



## 7. SOUHRN

Obsah práce je zaměřen na sledování vlivu pyridoxaisoniikotinoylhydrazonu na alaninaminotransferasu (EC 2. 6. 1. 2.).

Alaninaminotransferasa patří do skupiny pyridoxalových enzymů. Jak plyne z názvu, koenzymem tohoto enzymu je pyridoxalfosfát.

PIH je nestabilní in vitro a in vivo, v jeho vzorci lze rozpoznat část odpovídající pyridoxalu a isoniazidu. PIH je studován pro svou schopnost chelátovat železo. Byly také zkoumány jeho kardioprotektivní účinky využitelné při terapii kardiotoxickými antracykliny.

Z podobnosti PIH s pyridoxalfosfátem pramení představa, že by PIH mohl ovlivňovat spektrální vlastnosti pyridoxalových enzymů vazbou na aktivní místo enzymu nebo i mimo něj. Jako modelový pyridoxalový enzym vhodný pro spektrální studie byla zvolena alaninaminotransferasa. Transaminasy výrazně mění spektrum v průběhu katalyzované reakce ve srovnání s dekarboxylasou aromatických aminokyselin, která byla využívána pro předchozí pokusy s PIH (Vančurová 2006, diplomová práce). Častěji v praxi využívaná transaminasa aspartátaminotransferasa nebyla pro tyto pokusy vhodná, protože absorbuje v oblasti absorpce PIHu. Proto byla s výhodou použita ALT, jejíž pyridoxalová forma absorbuje odděleně od ostatních píků.

Byla měřena UV-VIS spektra a spektra cirkulárního dichroismu. Signály cirkulárního dichroismu poskytují pouze látky opticky aktivní. V našem případě došlo při měření CD spekter výhodně k eliminaci spektra samostatného PIHu, který není opticky aktivní.

Potvrdili jsme hlavní absorpční maxima pyridoxalové (430 nm) a pyridoxaminové (325 nm) formy ALT. Tím jsme si ověřili funkčnost vlastního enzymu, když v přítomnosti substrátu alaninu zanikl pík pyridoxalové formy a objevil se pík pyridoxaminové formy.

Zjistili jsme, že předdialýza enzymu nemá vliv na jeho spektrální vlastnosti.

Jak již bylo zmíněno výše, PIH je nestabilní. Provedli jsme pokus k ověření stability PIHu pomocí měření absorpčních spekter. Změřené spektrum PIH odpovídá údajům z literatury. Samotný PIH vykazuje maxima absorpce při 300 a 380 nm. Dochází k postupnému rozkladu PIH na směs pyridoxalu a isoniazidu.

Sledovali jsme vliv PIHu na spektra ALT. Využili jsme zejména spekter cirkulárního dichroismu, kde samotný PIH nedává signál. Zjistili jsme, že PIH nemá vliv na transaminační reakci, což je příznivé s ohledem na jeho potenciální využití v terapii.

## 8. ZÁVĚR

- 1.) Byla potvrzena nestálost PIHu v průběhu inkubace, jak je uvedeno v literatuře.
- 2.) Na základě naměřených absorpčních a CD spekter bylo zjištěno, že PIH neovlivňuje transaminační reakci, což je příznivé pro praktické využití PIH jako chelátoru železa.

## 9. SEZNAM LITERATURY :

Braunstein A. E. (1957) : Principal ways of assimilation & dissimilation of nitrogen in animals. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* **19**, 335-89.

Braunstein A. E. (1985) : Transamination and transaminases. 2–19, citováno z Christen P. a Metzler D. E. (1985) : *Transaminases- in John Wiley and Sons, Inc.: Biochemistry : A Series of Monographs, Vol. 2, USA, 2-108.*

Garavito R. M. (1998) : Membrane protein structures: the known world expands. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 344–349.

Jaenicke R. (1987) : Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237.

Jaenicke R. (1991) : Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochem.* **30**, 3147-3161.

Johnson W. C. Jr. (1990) : Protein secondary structure and circular dichroism : a practical guide. *Proteins: Struct., Funct. Genet.* **7**, 205-214.

Kahn P. C. (1979) : The interpretation of near-ultraviolet circular dichroism. *Methods Enzymol.* **61**, 339-378.

Macheroux P. (1999) : UV-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins. *Methods. Mol. Biol.* **131**, 1-7.

Martin S. R. (1996) : Circular dichroism-*in* Bios Scientific Publishers (ed.) : *Proteins Labfax* (Price, N. C.), Oxford, 195-204.

Ministerstvo zdravotnictví ČR. Cirkulární dichroismus-*in* Grada Publishing : *Český lékopis 2002*. Praha, 170-172.

Snell E. E. (1945) : The nutritional requirements of the lactic acid bacteria and their application to biochemical research. *J. Bacteriol.* **50**, 373-382.

Strickland E. H. (1974) : Aromatic contribution to circular dichroism spectra of proteins. *Crit. Rev. Biochem.* **2**, 113-175.

Sutherland J. C. (1995) : Magnetic circular dichroism. *Methods Enzymol.* **246**, 110-31.

Vančurová K. (2006) : Interakce dekarboxylasy aromatických aminokyselin s derivátem koenzymu in vitro. Diplomová práce. FaF UK HK, Katedra biochemických věd.

Vodrážka Z. (1996) : Vliv koncentrace substrátu a enzymu (3. 4. 1.)

Buněčný pool aminokyselin a přehled jejich metabolismu (4. 6. 3.) – *in* Academia (ed.): *Biochemie*, 2. upravené vydání, Praha, Kniha první - Obdivuhodné katalyzátory-enzymy, 151, Kniha druhá - Živý systém jako chemický stroj, 89-91.

Wess T. J. (1997) : Biocrystallography, structure determination and beyond. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **26**, 127-142.

Andersson L. A. a Peterson J. A. (1995) : Active-site analysis of ferric P450 enzymes : hydrogen-bonding effects on the circular dichroism spectra. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 389-395.

Buss J. L. a Poňka P. (2003) : Hydrolysis of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs. *Biochim. Biophys. Acta* **1619**, 177-186.

Clarke D. T. a Jones G. R. (1999) : Extended circular dichroism measurements using synchrotron radiation show that the assembly of clathrin coats requires no change in secondary structure. *Biochem.* **28**, 10457-10462.

Cogdell R. J. a Lindsay (1996) : Integral membrane proteins- *in* Academic Press (ed.) : *Proteins Labfax* (Price, N. C.), Guildford, 101-107.

Dyson H. J. a Wright P. E. (1991) : Defining solution conformations of small linear peptides. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 519-538.

Fasella P. a Hammes G. G. (1964) : An optical rotatory dispersion study of aspartic amino transferase. *Biochem.* **3**, 530-5.

Gilmanshin R. I. a Ptitsyn O. B. (1987) : An early intermediate of refolding  $\alpha$ -lactalbumin forms within 20 ms. *FEBS Lett.* **223**, 327-329.

Glazer A. N. a Simmons N. S. (1965) : The cotton effect associated with certain tyrosine residues in ribonuclease. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3991-3993.

Hirst J. D. a Brooks C. L. (1994) : Helicity, circular dichroism and molecular dynamics of proteins. *J. Mol. Biol.* **243**, 173-178.

Christen P. a Metzler D. E. (1985) : Transaminases – *in* John Wiley and Sons, Inc. : *Biochemistry* : A Series of Monographs, Vol. **2**, USA, 2-108.

Ivanov V. I. a Karpeisky M. Y. (1969) : Dynamic three-dimensional model for enzymic transamination. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **32**, 21-53.

James T. L. a Oppenheimer N. J. (1994) : Nuclear magnetic resonance part C. *Meth. In Enzym.* **239**, 14-21.

Johnson L. N. a Barford D. (1990) : Glycogen phosphorylase. The structural basis of the allosteric response and comparison with other allosteric proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 2409-2412.

Johnson G. F. a Graves D. J. (1966) : Circular dichroism and optical rotatory dispersion of glycogen phosphorylase. *Biochem.* **5**, 2906-2911.

Kalinowski D. S. a Richardson D. R. (2007) : Future of toxicology--iron chelators differing modes of action and toxicity: the changing face of iron chelation therapy. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 715-720.

Kelly S. M. a Price N. C. (2000) : The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Prot. Pept. Sc.* **1**, 349-384.

Manavalan P. a Johnson W. C. Jr. (1987) : Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Analyt. Biochem.* **167**, 76-85.

Matsuzawa T. a Segal H. L. (1968) : Rat liver alanine aminotransferase. Crystallization, composition, and role of sulphhydryl groups. *J. Biol. Chem.* **243**, 5929-5934.

Mc Nutt W. S. a Snell E. E. (1947) : Phosphates of pyridoxal and pyridoxamine as growth factors for lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.* **173**, 801-802.

Price N. C. a Stevens L. (1999) : The cell and molecular biology of catalytic proteins.-*in* Oxford University Press : *Fundamentals of enzymology*. Oxford, 15-46.

Provencher S. W. a Glöckner J. (1981) : Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochem.* **20**, 33-37.

Rabinowitz J. C. a Snell S. S. (1947) : Vitamin B6 group-extended procedures for microbiol. determination. *Ann. of N. Y. Ac. Sc.* **49**, 87-97.

Radford S. E. a Dobson C. M. (1999) : From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding. *Cell* **97**, 291-298.

Richardson D. R. a Poňka P. (1998) : Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs : potential orally effective iron-chelating agents for the treatment of iron overload disease. *J. Lab. Clin. Med.* **131**, 290-291.

Robertson A. G. a Nimmo H. G. (1995) : Site-directed mutagenesis of cysteine-195 in isocitrate lyase from *Escherichia coli* ML308. *Biochem. J.* **305**, 239-244.

Rodger A. a Nordén B. (1997) -*in* Oxford University Press: *Circular dichroism and linear dichroism*. Oxford, 15-32.

Saier M. H. Jr. a Jenkins W. T. (1967) : Alanine aminotransferase. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **242**, 91-100.

Snell E. E. a Rannefeld A. N. (1945) : The vitamin B6 group. III. The vitamin activity of pyridoxal and pyridoxamine for various organism. *J. Biol. Chem.* **157**, 475.

Swords N. A. a Wallace B. A. (1993) : Circular-dichroism analyses of membrane proteins : examination of environmental effects on bacteriorhodopsin spectra. *Biochem. J.* **289**, 215-219.

Torchinsky M. a Malakhova E. A. (1968) : Variations in the induced optic activity accompanying the association of certain dicarboxylic acids to aspartate aminotransferase. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **178**, 722-724.

Whitnall M. a Richardson D. R. (2006) : Iron: A new target for pharmacological intervention in neurodegenerative diseases. *Semin. Pediatr. Neurol.* **13**, 186-197.

Wlodawer A. a Vondrasek J. (1998) : Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 249-284.

Woody R. W. a Dunker A. K. (1996): Aromatic and Cystine Side-Chain Circular Dichroism in Proteins- *in* Plenum Press NY: *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules* (Fasman G. D.), USA, 109-157.

Aggeli A., Bell M., Boden N., Keen J. N., Knowles P. F., McLeish T. C., Pitkeathly M. Radford S. E. (1997) : Responsive gels formed by the spontaneous self-assembly of peptides into polymeric beta-sheet tapes. *Nature* **386**, 259-262.

Appelt K., Bacquet R. J., Bartlett C. A., Booth C. L., Freer S. T., Fuhry M. A., Gehring M. R., Herrmann S. M., Howland E. F., Janson C. A. et al. (1991) : Design of enzyme inhibitors using iterative protein crystallographic analysis. *J. Med. Chem.* **34**, 1925-1934.

Barrow C. J., Yasuda A., Kenny P. T. a Zagorski M. G. (1992) : Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J. Mol. Biol.* **225**, 1075-1093.

Bernhardt P. V., Chin P., Sharpe P. C., Wang J. Y. a Richardson D. R. (2005) : Novel diarylhydrazine ligands as iron chelators: coordination chemistry and biological activity. *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**, 761-777.

Bonsib S. M., Harruff R. C. a Jenkins W. T. (1975) : Factors contributing to the inhibition of aspartate aminotransferase by dicarboxylic acids. *J. Biol. Chem.* **250**, 8635-41.

Breusov Y. N., Ivanov V. I., Karpeisky M. Y. a Morozov Z. V. (1964) : Circular dichroism of aspartate transaminase. *Biochim. Biophys. Acta* **22**, 388-391.

Buss J. L., Hermes-Lima M. a Poňka P. (2002) : Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **509**, 205-229.

Cogdell R. J., Isaacs N. W., Freer A. A., Arrelano J., Howard T. D., Papiz M. Z., Hawthornthwaite-Lawless A. M. a Prince S. (1997) : The structure and function of the LH2 (B800-850) complex from the purple photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **68**, 1-27.

Craig S., Wingfield P. T., Pain P. H., Schmeissner U. a Virden R. (1989) : Determination of the contributions of individual aromatic residues to the CD spectrum of IL-1 $\beta$  using site directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1118-1128.

Dolgikh D. A., Gilmanshin R. I., Brazhnikov E. V., Bychkova V. E., Semisotnov G. V., Venyaminov S. Yu a Ptitsyn O. B. (1981) : Alpha- Lactalbumin : compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.* **136**, 311-315.

Drobnica L., Helia O. a Jindra A. (1975) : The effect of gamma, gamma-bis- 4-ethylphenyl-alpha, beta-dibromoisocrotonic acid on Ehrlich ascites carcinoma and yeast cells. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 853-858.



Dršata J., Boušová I. a Maloň P. (2005) : Determination of quality of pyridoxal-5'-phosphate enzyme preparations by spectroscopic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**, 1173-1177.

Dršata J., Hais I. M. a Maloň P. (1991) : Interaction of Z-4,4-bis(4-ethylphenyl)-2,3-dibromo-2-butenoic acid with aminotransferases : Changes in absorption and circular dichroism spectra. *Drug Metab. Drug Interact.* **9**, 255-268.

Freskgard P. O., Martensson L. G., Jonasson P., Jonsson B. H. a Carlsson U. (1994) : Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the circular dichroism spectrum of the human carbonic anhydrase II. *Biochem.* **33**, 14281-14288.

Fuertes M. A., Berberich C., Lozano R. M., Gimenez-Gallego G. a Alonso C. (1999) : Folding stability of the kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) from *Leishmania infantum*. *Eur. J. Biochem.* **260**, 559-567.

Gatehouse P. W., Hopper S., Schatz L. a Segal H. L. (1966) : Further characterization of alanine aminotransferase of rat liver. *J. Biol. Chem.* **242**, 2319-2324.

Griffin J. H., Rosenbusch J. P., Weber K. K. a Blout E. R. (1972) : Conformational changes in aspartate transcarbamylase. Studies of ligand binding and of subunit interactions by circular dichroism spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **247**, 6482-6490.

Chaffotte A. F., Guillou Y. a Goldberg M. E. (1992) : Kinetic resolution of peptide bond and side chain far-UV circular dichroism during the folding of hen egg white lysozyme. *Biochem.* **31**, 9694-9702.

Jones P. L., Korte T. a Blumenthal R. (1998) : Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 404-409.

Kaiserová H., den Hartog G. J., Šimůnek T., Schroeterová L., Kvasničková E a Bast A. (2006) : Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. *Br. J. Pharmacol.* **149**, 920-930.

Kirkitadze M. D., Krych M., Uhrin D., Dryden D. T., Smith B. O., Cooper A., Wang X., Hauhart R., Atkinson J. P. a Barlow P. N. (1999) : Independently melting modules and highly structured intermodular junctions within complement receptor type 1. *Biophys. Acta* **1482**, 9-24.

Kirsch J. F., Eichele G., Ford G. C., Vincent M. G., Jansonius J. N., Gehring H. a Christen P. (1984) : Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure. *J. Mol. Biol.* **174**, 497-525.

Kishore R, Raghothama S. a Balaram P. (1988) : Synthetic peptide models for the redox-active disulfide loop of glutaredoxin. Conformational studies. *Biochem.* **27**, 2462-2471.

Kovaříková P., Mrkvičková Z. a Klimeš J. (2008) : Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**, 360-370.

Kuwajima K., Yamaya H., Miwa S., Sugai S. a Nagamura T. (1987) : Rapid formation of secondary structure framework in protein folding studied by stopped-flow circular dichroism. *FEBS Lett.* **221**, 115-118.

Martinez-Carrion M., Riva F., Turano C. a Fasella P. (1965) : Multiple forms of supernatant glutamate-aspartate transaminase from pig heart. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 206-11.

Martinez-Carrion M., Tiemeier D. C. a Peterson D. L. (1970) : Conformational properties of the isoenzymes of aspartate transaminase and the enzyme-substrate complexes. *Biochem.* **9**, 2574-2582.

Meister A., Sober H. A. a Peterson E. A. (1954) : Studies on the coenzyme activation of glutamic-aspartic apotransaminase. *J. Biol. Chem.* **206**, 89-100.

Metzler D. E., Olivard J. a Snell E. E. (1954) : Transamination of pyridoxamine and amino acids with glyoxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 644-648.

Miles J. S., Munro A. W., Rospendowski B. N., Smith W. E., McKnight J. a Thomson A. J. (1992) : Domains of the catalytically self-sufficient cytochrome P-450 BM-3. *Genetic*

construction, overexpression, purification and spectroscopic characterization. *Biochem. J.* **288**, 503-509.

Munro A. W., Kelly S. M. a Price N. C. (1999) : Circular dichroism studies of flavoproteins. *Methods Mol. Biol.* **131**, 111-123.

Munro A. W., Lindsay J. G., Coggins J. R., Kelly S. M. a Price N. C. (1994) : Structural and enzymological analysis of the interaction of isolated domains of cytochrome P-450 BM-3. *FEBS Lett.* **343**, 70-74.

Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A. a Rodwell V. W. (2002) : Katabolismus bílkovin a dusíku aminokyselin – *in* H+H, Vyšehradská, s r.o. : *Harperova Biochemie*. 23. vydání (4. české vydání), Jinočany, 308-309.

Perutz M. F., Ladner J. E., Simon S. R. a Ho C. (1974) : Influence of globin structure on the state of the heme. I. Human deoxyhemoglobin. *Biochem.* **13**, 2163-2173.

Šimůnek T., Klimtová I., Kaplanová J., Štěrbá M., Mazurová Y., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V. a Poňka P. (2005) : Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol. Res.* **51**, 223-231.

Šimůnek T., Štěrbá M., Popelová O., Kaiserová H., Potačová A., Adamcová M., Mazurová Y., Poňka P. a Geršl V. (2008) : Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogs as protectants against anthracycline-induced cardiotoxicity. *Hemoglobin* **32**, 207-215.

Weiss M. A., Ellenberger T., Wobbe C. R., Lee J. P., Harrison S. C. a Struhl K. (1990) : Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA. *Nature* **347**, 575-578.

Weiss M. S., Kreusch A., Schiltz E., Nestel U., Welte W., Weckesser J. a Schultz G. E. (1991) : The structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 1.8 Å resolution. *FEBS Lett.* **280**, 379-382.

Yiakouvaki A., Savovič J., Al-Qenaei A., Dowden J. a Pourzand C. (2006) : Caged-iron chelators a novel approach towards protecting skin cells against UVA-induced necrotic cell death. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2287-2295.

internetová databáze Brenda <http://brenda.bc.uni-koeln.de> 22. 1. 2008

internetová encyklopedie Wikipedia [http://en.wikipedia.org/wiki/Molten\\_globule](http://en.wikipedia.org/wiki/Molten_globule) 2. 2. 2008

internetová Laboratorní encyklopedie [www.labo.cz/sl/vy02.htm](http://www.labo.cz/sl/vy02.htm) 23. 4. 2008

<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/info-cd.html> 20. 1. 2008

[http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid\\_es-002/hesla/chromofor.html](http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/chromofor.html) 20. 1. 2008

## 10. ABSTRACT

The aim of this study was to examine the influence of pyridoxalisonicotinoylhydrazone (PIH) on alanine aminotransferase (EC 2. 6. 1. 2.). Alanine aminotransferase belongs to the group of pyridoxal enzymes. Pyridoxal-5'-phosphate is a prosthetic group of these enzymes.

There is a similarity to the structure of pyridoxal and isoniazide in the formula of pyridoxalisonicotinoylhydrazone.

PIH has been investigated for its potential iron-chelating activity. There are also studies about PIH's protective effect against cardiotoxicity caused by the treatment with anthracyclines. Cardiotoxicity is the main harmful side effect of the anthracycline medication.

There is a part which is similar to pyridoxalphosphate in the structure of PIH. That's why the influence of PIH on spectral properties of pyridoxal enzymes was studied.

For this spectral study we chose transaminases as suitable pyridoxal enzymes. During the catalyzed reaction they change their absorption spectra. Most common transaminase aspartate aminotransferase (AST) was not optimal for this study. AST absorbs in the same region where PIH does. Alanine aminotransferase absorbs in the spectrum separately and therefore it was convenient for this study.

UV-VIS spectra and circular dichroism (CD) spectra were measured.

The ability of providing CD spectra is the feature of optically active substances. PIH does not belong to the group of optically active substances. Free PIH does not offer CD spectra.

In the case of ALT, we confirmed maxima at 430 nm (pyridoxal form) and at 325 nm (pyridoxamine form).

We also confirmed the absorption maxima for PIH at 300 and 380 nm, its lability and successive decomposition.

The influence of PIH on ALT was investigated. PIH does not affect the transamination reaction. This is favourable in relation to its possible therapeutical application.

