

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Interakce malých molekul biologického původu s Na^+/K^+ - ATPasou

Interaction of small natural molecules with Na^+/K^+ -ATPase

Vypracovala:

Barbora Arnoštová

Studijní obor:

Molekulární biofyzika

Vedoucí práce:

Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.

Děkuji vedoucímu diplomové práce, Doc. RNDr. Matinu Kubalovi, Ph.D., za jeho ochotu, čas a pomoc, kterou mi při vypracovávání teoretické a experimentální části poskytl. Dále děkuji Mgr. Miroslavu Huličiakovi a Mgr. Jaroslavě Geletičové, za jejich čas, pomoc při realizaci experimentů a poskytnutí potřebného biologického materiálu.

Prohlašuji, že jsem magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Martina Kubaly, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne.....

.....

Souhrn

Na^+/K^+ -ATPasa (NKA) nebo-li sodno-draselná pumpa je transmembránový protein patřící do skupiny P-ATPas, jehož hlavním úkolem je přenášet sodné a draselné ionty přes membránu.

Na^+/K^+ -ATPasa přenosem výše uvedených iontů přes membránu udržuje jak osmotickou rovnováhu, pH a energetickou bilanci buňky, tak také klidový potenciál buňky. Jelikož Na^+/K^+ -ATPasa zajišťuje klidový potenciál buňky, což umožňuje vedení nervového vzruchu, byly zkoumány interakce Na^+/K^+ -ATPasy s aminokyselinami a endogenními látkami ovlivňující nervovou soustavu organismů.

Bylo zjištěno, že na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy mají vliv některé vybrané aminokyseliny (např. fenylalanin) a látky od těchto aminokyselin odvozené (např. dopamin, který je metabolitem fenylalaninu).

Abstract

Na^+/K^+ ATPase (NKA), or sodium- potassium pump is a transmembrane protein belonging to the group of P- ATPases , whose main task is to transfer the sodium and potassium ions across the membrane.

The transmission of the above mentioned ions across the membrane as NKA maintains the osmotic balance , energy balance and pH of the cell as well as the resting potential of the cell. Since NKA provides the resting potential of the cell, allowing nerve conduction, we examined interaction with endogenous NKA substances affecting the nervous system of organisms.

It was found that the activity of Na^+/K^+ -ATPase is affected by certain selected amino acids (e.g. phenylalanine) and substances derived from these amino acids (e.g. dopamine, a metabolite of phenylalanine).

Seznam zkratek

ATP - adenosintrifosfát

ADP - adenosindifosfát

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

CNS - centrální nervová soustava

H₂O - voda

HCl - kyselina chlorovodíková

KH₂PO₄ - dihydrogenfosforečnan draselný

KCl- chlorid draselný

M - mol/l

MgCl₂ - chlorid hořečnatý

NKA - Na⁺/K⁺ ATPasa

NaCl - chlorid sodný

PDB - protein data bank

SDS - dodecylsulfát sodný

Obsah

Souhrn.....	iv
Abstract.....	v
Seznam zkratek	vi
Teoretická část.....	1
1. Úvod	1
2. Přehled problematiky	2
2.1 Historie zkoumání Na^+/K^+ -ATPasy	2
2.2 Struktura Na^+/K^+ - ATPasy	3
2.2.1. Podjednotka α	6
2.3 FXYD proteiny	8
2.3.1 FXYD2 - podjednotka γ	10
2.4 Fungování Na^+/K^+ - ATPasy	11
2.4.1 Cyklus Na^+/K^+ - ATPasy.....	11
2.5 Na^+/K^+ - ATPasa a její fyziologický význam.....	14
2.6 Endogenní látky	15
2.6. 1 Aminokyseliny	15
2.6.2 Fenylalanin (L - fenylalanin (Phe, F).....	19
2.6.3 Tyrozin (Tyr, Y).....	22
2.6.4 Tryptofan (L-tryptofan, Trp, W)	24
2.6.5 Methionin (L-methionin, Met, M)	28
2.6.6 Cystein (Cys, C).....	29
2.6.7 Histidin (L-histidin, His, H)	30
2.6.8 Kyselina asparagová (Asp, D) a asparagin (Asn, N).....	32
2.6.9 Threonin (Thr, T)	33
2.6.10 Serin (Ser, S).....	34
2.6.11 Lyzin (Lys, K).....	35
2.6.13 Prolin (Pro, P).....	36
2.6.14 Arginin (Arg, R).....	36
2.6.15 Plazmatické koncentrace aminokyselin	37
Cíl práce	41
Experimentální část	42
4 Materiál a metody	42
4.1 Přehled použitého materiálu.....	42
4.2 Izolace Na^+/K^+ ATPasy	44

4.3. Metoda stanovení koncentrace proteinů - Metoda Bradfordové	45
4.4 Metody pro stanovení aktivity enzymu	45
4.5. Měření aktivity enzymu - Baginského test.....	47
4.6 Vyhodnocení hodnot získaných Baginského testem	51
4.7. Určení hodnoty IC50.....	52
5. Výsledky	53
5.1 Izolace Na ⁺ /K ⁺ - ATPasy	53
5.2 Vliv aminokyselin na aktivitu Na ⁺ /K ⁺ - ATPasy	54
5.3 Koncentrační závislost aktivity Na ⁺ /K ⁺ - ATPasy při interakci s vybranou aminokyselinou	56
5.4. Vliv metabolitů vybraných aminokyselin na aktivitu Na ⁺ /K ⁺ - ATPasy.....	59
6 Diskuze	63
7 Závěr	66
8 Seznam literatury	67

Teoretická část

1. Úvod

Buňky jsou od okolního prostředí odděleny cytoplazmatickou membránou. Základ cytoplazmatické membrány je fosfolipidová dvouvrstva, která se skládá z hydrofilní části (hlavičky) a hydrofobního konce. Hydrofilní fosfátové konce tvoří vnější povrch dvouvrstvy, uvnitř se nacházejí hydrofobní konce.

Životní cyklus buněk velmi je závislý na výměně molekul se svým okolím. Část molekul, například voda, může přes cytoplazmatickou membránu volně pronikat a buňka na jejich přenos nevykládá žádnou energii. Tento přenos látek přes membránu se nazývá pasivní transport. Jiné molekuly nemohou přes cytoplazmatickou membránu volně pronikat, musí tedy být do buňky transportovány pomocí iontových kanálů nebo iontových přenašečů. Tento způsob přenosu molekul do buňky se nazývá aktivní transport. Při aktivním transportu spotřebovává buňka při přenosu molekuly energii (Albers B. et al. 1998).

Mezi iontové transmembránové přenašeče iontů patří Na^+/K^+ ATPasa. Na^+/K^+ ATPasa je enzym, který zajišťuje přenos tří sodných iontů z vnitřku buňky ven a dvou draselných iontů z vnějšku buňky dovnitř. Čerpáním těchto iontů přes membránu se vytváří gradient pro tyto ionty. Další funkce Na^+/K^+ ATPasy je udržování klidového potenciálu, dále se podílí na sekundárním transportu, kde vytvořením gradientu Na^+ vznikne hnací síla pro přenos další molekuly jako je např. glukóza, udržování osmotické rovnováhy a energetické bilance buňky. Dále se spolu s kardiotonickými steroidy účastní signálních drah v buňce. Pokud je cyklus Na^+/K^+ -ATPasy narušen nebo zcela inhibován, dochází ke vzniku různých závažných onemocnění (Schulpis K.H. et al. 2007; Glynn I.M., 2002).

V lidském organismu je přítomno velké množství malých molekul. Z těchto malých molekul jsou velmi významné aminokyseliny. Biogenních aminokyselin je známo 20, respektive 21. V této práci byly z této skupiny vybrány tyto aminokyseliny: histidin, tryptofan, methionin, fenylalanin a kyselina asparagová. U těchto vybraných aminokyselin byla zkoumán vliv na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy.

Jak bylo uvedeno výše, jednou z funkcí Na^+/K^+ -ATPasy je udržování klidového membránového potenciálu, což je velmi důležité pro vedení nervového vzruchu. Další molekuly, u kterých bude zkoumán vliv na aktivitu Na^+/K^+ ATPasy, jsou metabolity aminokyselin, které se nacházejí v nervové soustavě.

2. Přehled problematiky

2.1 Historie zkoumání Na^+/K^+ -ATPasy

První experimenty, které vedly k objevu NKA, byly uskutečněny již v první polovině 20. století, kdy Ernst Overton zkoumal chování žabího svalu. Žabí sval byl ponořen do isotonického roztoku sacharosy, kde nedocházelo k jeho excitaci. Po přidání chloridu sodného do roztoku byl sval excitován. Z tohoto chování usoudil, že sodné ionty mají v organismu specifickou funkci (Glynn I.M., 2002).

Později na práci E. Overtona navázali Angličané Andrew Huxley a Alan Hodgkin. Jejich práce spočívala ve studiu akčního potenciálu v gigantických axonech sépie. Zjistili, že sodné a draselné ionty udržují klidový potenciál buňky a dávají vzniknout akčnímu potenciálu. (Glynn I.M., 2002)

V roce 1957 byla Na^+/K^+ -ATPasa Jensem Christianem Skouem izolována z nervů kraba. (Skou J.C., 1957) Za tento objev mu byla později (1997) udělena Nobelova cena za chemii.

60. a 70. léta byla velmi bohatá na objevy v oblasti Na^+/K^+ ATPasy. Nejprve byla objevena reverzibilita pumpy (rok 1966). V 70. letech byly zkoumány konformační stavy E1 a E2. (Glynn I.M., 2002)

V 80. a 90. letech minulého století došlo k rozvoji molekulární biologie. Strukturní informace byly získávány ze zmutovaných forem enzymu.

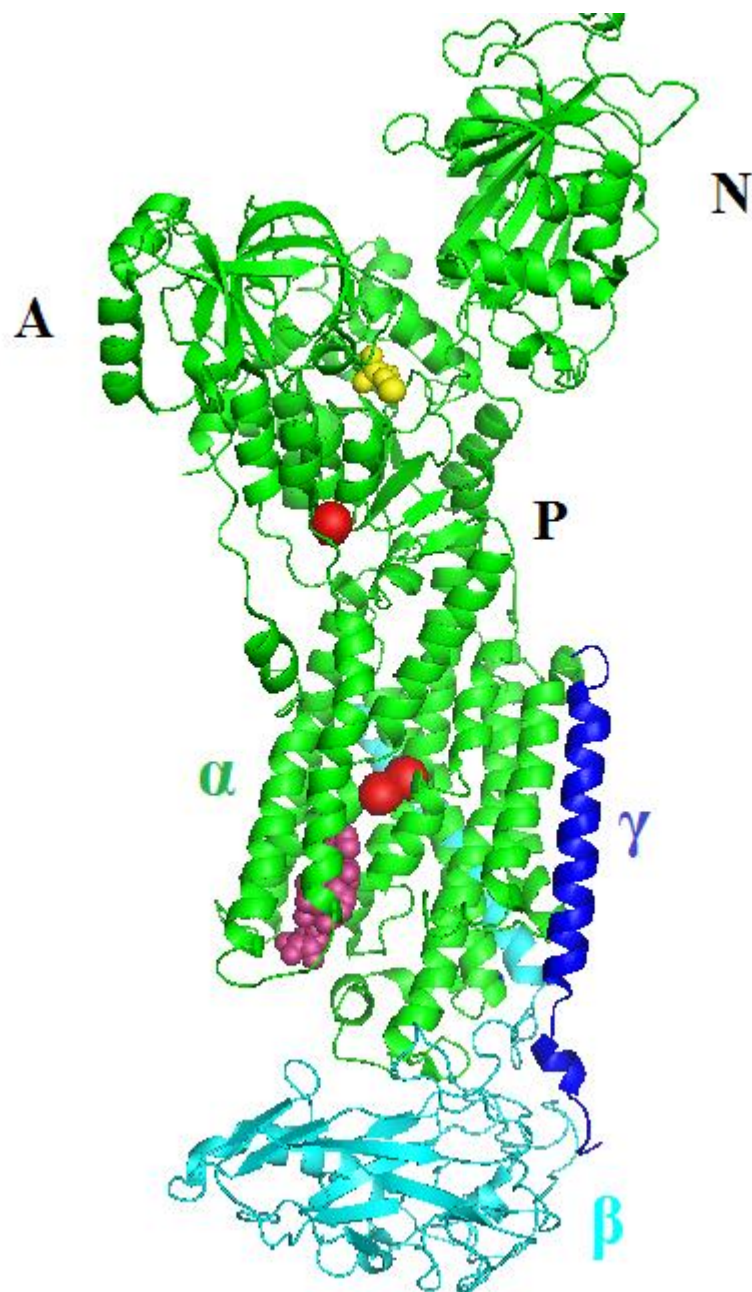
Mezi čerstvé objevy můžeme zařadit vyřešení krystalové struktury proteinu. V roce 2007 byla vyřešena struktura v rozlišení 3,5 Å. Před rokem 2007 byla většina

poznatků získána porovnáváním NKA s Ca^{2+} ATPasou, protože její krystalová struktura byla vyřešena dříve, a to již v roce 2000 (Morth J.P. et al., 2007). Pozdějších letech byly získány krystalové struktury s lepším rozlišením 2,4 Å a 2,8 Å (Shinoda et al., 2009; Ogawa et al., 2009). V těchto krystalových strukturách je NKA zachycena v konformačním stavu E2. V roce 2013 byla získána krystalová struktura NKA v konformačním stavu E1 (Kanai R. et al., 2013).

2.2 Struktura Na^+/K^+ -ATPasy

NKA zařazujeme do rodiny tzv. P-ATPas, do které patří také např. H^+/K^+ -ATPasa nebo Ca^{2+} -ATPasa.

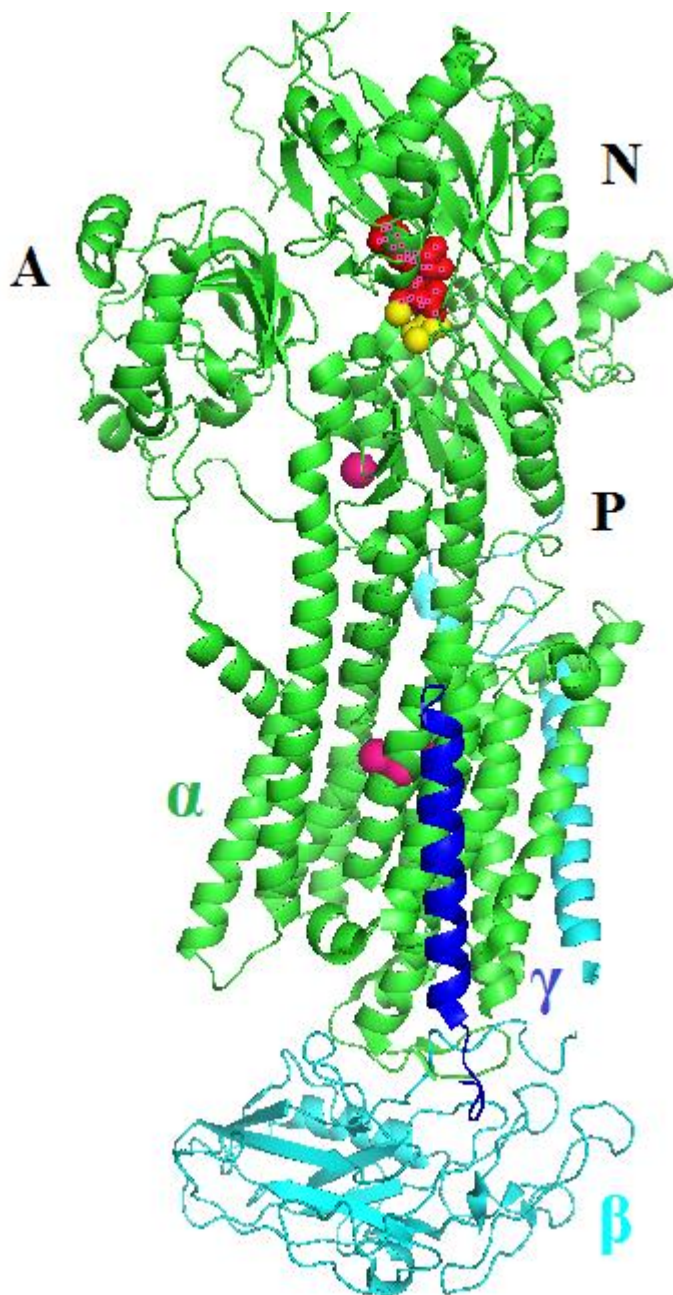
Na^+/K^+ -ATPasa a H^+/K^+ -ATPasa jsou složeny z podjednotek α a β a vytváří spolu asociovaný komplex $\alpha\beta$. Na podjednotce α se nacházejí vazebná místa pro Na^+ a K^+ ionty a ATP. K asociovanému komplexu $\alpha\beta$ náleží také třetí podjednotka nazývaná γ , která patří do skupiny tzv. FXYD proteinů. (Morth J.P. et al., 2007). Na obr. 1 je struktura NKA v konformačním stavu E2 a místa vazby K^+ iontů a inhibitoru ouabainu jsou vyznačeny barevně.



Obr.1: Struktura NKA v konformačním stavu E2. Zelenou barvou je znázorněna podjednotka α , akvamarínovou podjednotka β , tmavě modře podjednotka γ . Červeně jsou zakreslena vazebná místa K^+ iontů, žlutě Mg^{2+} , růžovou barvou je zakresleno vazebné místo inhibitoru ouabainu. (PDB; 2ZXE)

NKA se v živočišných buňkách vyskytuje v různých izoformách. Druh izoformy záleží na místě výskytu v těle, protože v různých životních orgánech nalezneme různé druhy izoform. Tyto izoformy se od sebe odlišují jen velmi nepatrně ve své sekvenci (Köksoy A.A., 2002; Kaplan J.H., 2002).

V roce 2013 byla poprvé vykrystalizována NKA v konformačním stavu E1 (Kanai R. et al., 2013). Na obr. 2 je struktura NKA v tomto stavu a jsou zakreslena vazebná místa pro ADP a ionty Na^+ .



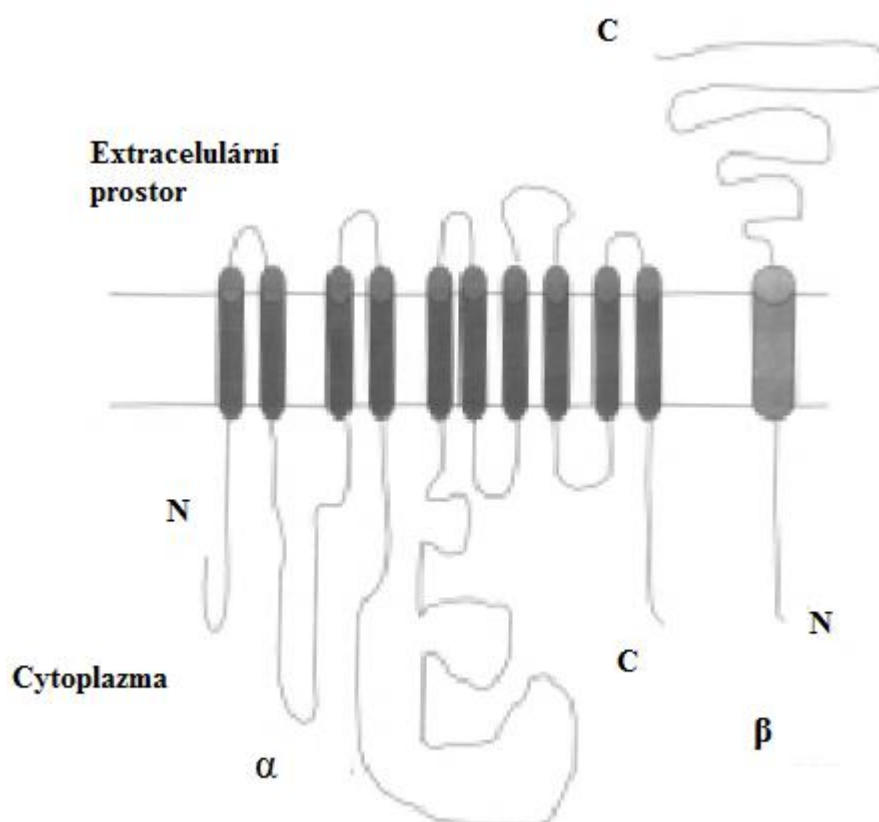
Obr.2: Struktura NKA v konformačním stavu E1. Zelenou barvou je znázorněna podjednotka α , akvamarínovou podjednotka β , tmavě modře podjednotka γ . Červeně je zakresleno vazebné místo ADP, žlutě Mg^{2+} , růžovou barvou jsou zakreslena vazebná místa Na^+ iontů. (PDB; 3WGU)

2.2.1. Podjednotka α

Podjednotka α je katalytickou částí proteinu obsahující vazebná místa pro ionty, ATP, fosforylační místo a je největší podjednotkou NKA. Její molekulová váha se pohybuje okolo 110 kDa a její primární strukturu tvoří přibližně 1000 aminokyselinových zbytků. (Kaplan J.H., 2002)

Na α -podjednotce od N konce k C konci rozlišujeme 10 transmembránových helixů a 2 kličky zanořené dovnitř buňky. Menší klička se nachází mezi druhou a třetí transmembránovou šroubovicí, větší klička se nalézá mezi čtvrtou a pátou transmembránovou šroubovicí (Köksoy A.A., 2002). (Výše uvedené kličky se také označují C23 pro menší a C45 pro větší.) Na obr. 3 je schematicky znázorněna struktura podjednotky α .

Podjednotka α v cytoplazmatické membráně tvoří 3 domény A (actuator), P (phosphorylation) a N (nucleotide binding).



Obr.3: Schéma podjednotky α a β (upraveno podle Köksoy A.A., 2002)

Existují 4 izoformy této podjednotky. Tyto izoformy mají ve své sekvenci jen velmi málo funkčních odlišností např. rozdíly v afinitě k iontům. Tyto funkční odlišnosti závisí na druhu tkáně, ve které se nacházejí. Nejčastěji vyskytující se izoformu α_1 můžeme nalézt v mnoha tkáních, ale nejvíce je zastoupena v ledvinách (Kaplan J.H., 2002). Isoforma α_2 se primárně vyskytuje v kosterním svalstvu, ale také v nervech. Isoformu α_3 je součástí nervových buněk a izoforma α_4 nalezneme pouze ve spermatozomu (Morth J.P. et al., 2011).

Vznik závažných onemocnění souvisí s vytvořením mutace u některé izoformy. Jako příklad takového onemocnění je Parkinsonova choroba, která má prokázanou souvislost s mutací izoformy α_3 . (Geering K., 2005)

2.2.2. 1 Velká cytoplazmatická klička C45

C45 klička je intracelulární částí podjednotky α a nachází se mezi čtvrtým a pátým transmembránovým helixem (M4 a M5) a je tvořena N a P doménami. Molekulová hmotnost C45 kličky představuje 40 % celkové molekulové váhy NKA. Genetická sekvence C45 kličky je složena z evolučně zakonzervované sekvence P-ATPas, zahrnující sekvenci D-K-T-G včetně neměnného aspartátového zbytku (Asp 369). Na Asp 369 probíhá fosforylace ATP, která je součástí katalytického mechanismu proteinu (Havlíková M. et al., 2012).

Experimentálně bylo prokázáno, že tato klička si zachovává své vlastnosti a funkci i poté, co je oddělena od zbytku proteinu (Kubala M. et al., 2003).

Izolovaná C45 klička může měnit svou konformaci. Konformační změny segmentu jsou způsobeny vazbou ligandů (např. Mg^{2+} a/nebo ATP) na kličku. U kličky rozlišujeme dvě možné konformace, a to otevřenou a uzavřenou. Zjistilo se, že v uzavřené konformaci se C45 klička nachází, pokud na ní není navázán žádný ligand nebo je navázáno jen Mg^{2+} nebo je navázáno současně ATP a Mg^{2+} . Při vazbě samotného ATP tj. bez Mg^{2+} změní klička konformaci z uzavřené na otevřenou konformaci. Změnu konformace je možné sledovat pomocí vnitřní fluorescence tryptofanu a molekulových dynamických simulací (Gryčová et al, 2009).

2.2.2.2 Malá cytoplazmatická C23 klička

Malá cytoplazmatická klička se nachází mezi druhým a třetím transmembránovým helixem (M2 a M3). Kličku tvoří přibližně 120 aminokyselinových zbytků. Umístění kličky má strategickou pozici v komunikaci mezi místem s enzymatickou aktivitou a místem uchycení celého proteinu v membráně (Moller J.V. et al., 1996).

2.2.3 Podjednotka β

Podjednotka β se skládá z N-koncové cytoplazmatické domény (přibližně 30 aminokyselinových zbytků), jednoho transmembránového helixu, který je umístěn mezi M7 a M10 helixem podjednotky α , a velké extracelulární domény (ectodomény) tvořené přibližně 240 aminokyselinovými zbytky (Toyoshima et al., 2011).

Sekundární struktura této podjednotky je tvořena antiparalelními β listy a krátkými helixy. Celá struktura ectodomény je stabilizována 3 disulfidovými můstky (Shinoda et al., 2009).

Úkolem této podjednotky je kotvení proteinu v membráně a také hraje úlohu molekulárního chaperonu (Geering K, 2008).

Tato podjednotka se také vyskytuje ve 4 izoformách a její molekulová váha je 55 kDa.

2.3 FXYD proteiny

FXYD proteiny je skupina malých proteinů, které jsou nejčastěji asociovány s dalšími proteiny podílející se na transportu iontů přes membránu jako je např. Na^+/K^+ -ATPasa (Garty H. et al., 2005).

Název skupiny je odvozen od jejich specifické a evolucí zakonzervované sekvence FXYD, kde F je aminokyselina fenylalanin, Y - je aminokyselina tyrosin, D je aminokyselina asparagin a písmeno X značí libovolnou aminokyselinu (Sweadner et al., 2000).

U savců do této skupiny zařazujeme 7 druhů, které se označují FXYP 1-7. Typ (druh) FXYP proteinu záleží na typu tkáně, ve které se FXYP protein vyskytuje, a také na samotné struktuře proteinu (Geering K., 2005). V tabulce 1 jsou uvedeny místa výskytu jednotlivých typů FXYP proteinů.

Tabulka 1: Místa výskytu FXYP proteinů a funkční vliv FXYP proteinu na fungování NKA (upraveno podle Geering K.,2005)

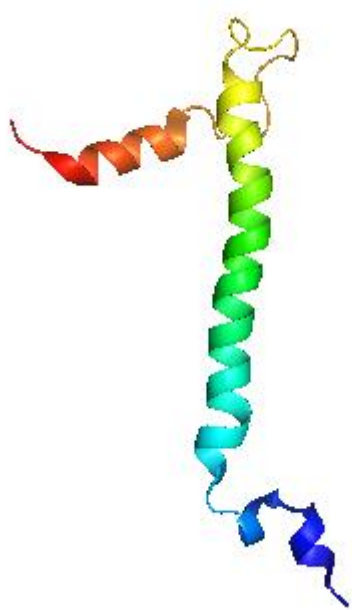
Typ FXYP proteinu	Místo výskytu	Efekt na NKA	
		Na ⁺	K ⁺
FXYP1 (phospholeman)	Srdeční a kosterní svalstvo	↓↓	↓
FXYP2 (podjednotka γ)	Ledviny	↓	↓
FXYP3 (Mat-8)	Žaludek	↓	↓
FXYP4 (CHIF)	Ledviny	↑↑	↓↓
FXYP5 (Rice)	-	-	-
FXYP6	-	-	-
FXYP7	Mozek	-	↓↓

FXYP 2-7 jsou modulátory aktivity NKA, efekt závisí na relativní expresi a míry asociace podjednotek α a β. FXYP2- 7 také stabilizují NKA. FXYP1 je regulátorem v klasickém pojetí, protože fosforyluje proteinkinasy (např. PKA,PKC). (Mishra et al., 2011)

Podrobněji se zaměříme na protein FXYP2, protože v našich experimentech byla NKA izolována z vepřových ledvin.

2.3.1 FXYD2 - podjednotka γ

Podjednotka γ má specifickou sekvenci, která je typická pro skupinu FXYD proteinů. Tato podjednotka se nachází mezi podjednotkami α a β , kde je v hlavním kontaktu s β podjednotkou (Preben J.P. et al., 2007). Skládá se z jednoho transmembránového helixu, jež má extracelulární N konec a C konec se nachází v cytoplazmě. Tato struktura je typická pro všechny proteiny ze skupiny FXYD proteinů. FXYD protein není esenciálně důležitý pro fungování NKA. Hlavní funkcí této podjednotky je regulace NKA a její stabilizace (Mishra et al., 2011). Na obrázku 4 je znázorněna typická struktura FXYD proteinu.



Obr.4: Typická struktura FXYD proteinů, konkrétně se jedná o protein FXYD1. (PDB; 2JO1)

Regulace proteinu podjednotkou γ spočívá v posunu rovnováhy mezi konformačními stavy E1 a E2, tímto způsobem se mění afinita k sodným a draselným iontům (Geering K., 2005).

2.4 Fungování Na^+/K^+ -ATPasy

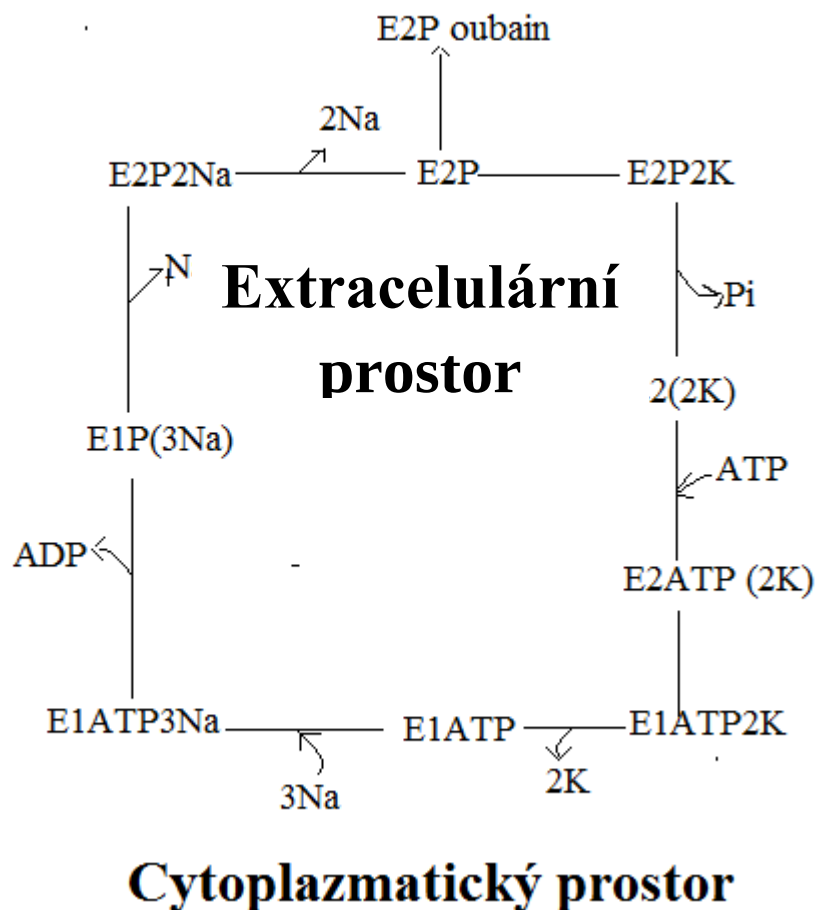
Sodno -draselná pumpa transportuje během jednoho katalytického cyklu 3 Na^+ ven z buňky a 2 K^+ dovnitř buňky a využívá k přenosu energii pocházející z hydrolýzy ATP. Ionty jsou přenášeny proti koncentračnímu gradientu, proto se jedná o aktivní transport. Správná funkce NKA je klíčová pro správnou funkci živočišných buněk. (Vedovato N. et al., 2014)

2.4.1 Cyklus Na^+/K^+ -ATPasy

Cyklus NKA podle Alberse a Posta vychází z hypotézy, že na začátku vytváří enzym komplex složený z intracelulárního ATP, Mg^{2+} a 3 Na^+ iontů označovaný jako konformační stav E1. Po fosforylaci proteinu dojde k vyvázání ADP do intracelulárního prostoru buňky, změní se konformace proteinu a 3 Na^+ ionty jsou vypuštěny do vnějšího prostoru buňky a nahrazeny 2 K^+ ionty z extracelulárního prostoru. Protein se nachází ve druhém konformačním stavu označovaném jako stav E2. Další změnou konformace jsou draselné ionty přeneseny do buňky (Post R.L. et al., 1972).

Zda jsou na enzymu navázány sodné nebo draselné ionty, záleží tedy na konformačním stavu. Konační stav E1 má vysokou afinitu k sodným iontům a konformační stav E2 má vysokou afinitu k draselným iontům. Jak se uvedeno výše, tak energie potřebná pro změnu konformace pochází z hydrolýzy ATP (Glynn I.M., 1992).

Na počátku cyklu je enzym v konformačním stavu E1 s navázanými třemi sodnými ionty (v obr. 5 označeno jako E1ATP3Na). V dalším kroku dojde k hydrolýze ATP na ADP a fosforylaci enzymu (EP(3Na)) a energie uvolněná při hydrolýze je využita ke změně konformace proteinu na konformační stav E2, zároveň dojde k rychlému odvázní jednoho sodného iontu (E2P2Na). Potom dojde k uvolnění dvou sodných iontů (E2P) a vazbě dvou draselných iontů do vazebných míst pro ně určených. Pak dojde k odvázní fosfátu (E22K). Následuje vazba ATP (E2ATP(2K)). Následně dojde ke změně konformačního stavu zpět na E1 stav (E1ATP2K) a odvázní dvou draselných iontů. Poté může být cyklus opět zopakován (Glynn I.M., 2002).



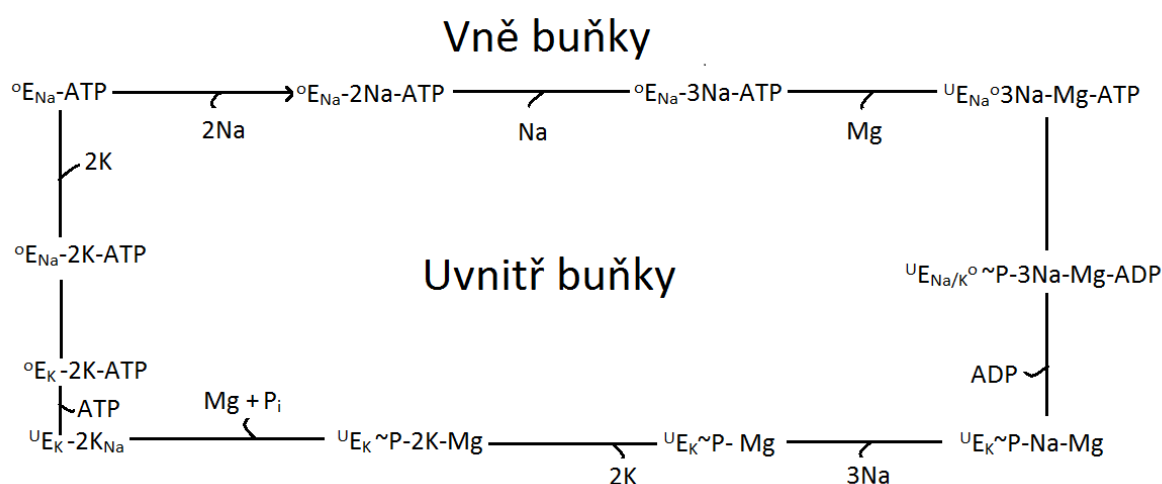
Obr.5: Schéma cyklu NKA podle Alberse a Posta (upraveno podle Glynn I.M.,2002)

V pozdějších letech byl cyklus NKA zkoumán podrobněji a došlo tedy k úpravám funkčního cyklu proteinu.

Cyklus byl později zkoumán v práci Gryčové et al (2009), kdy autoři předpokládali, že změny konformačního stavu proteinu E1, E2 souvisejí se změnami v cytoplazmatické části proteinu, což vedlo ke komplexnějšímu popisu cyklu podle Alberse a Posta (obr. 6).

Na začátku cyklu je NKA v uzavřené konformaci ${}^{\text{u}}\text{E}_{\text{K}}\text{-}2\text{K}$ s navázanými draselnými ionty, dojde k vazbě ATP, tím pádem změně konformace na otevřenou

konformaci : ${}^uE_K \rightarrow {}^oE_K$ a k odvázáni 3 Na^+ iontů do vnějšího prostoru. Podmínkou přechodu ze stavu oE_K na stav ${}^oE_{\text{Na}}$ je navázání Mg^{2+} iontů, které katalyzují hydrolýzu ATP a fosforylaci proteinu. Vazba Mg^{2+} iontů, hydrolýzy ATP a fosforylace je impulsem k přechodu ${}^uE_{\text{Na}} \rightarrow {}^oE_K$, kde oE_K odpovídá konformačnímu stavu E_1 podle Alberse-Posta, zároveň dojde k výměně iontů na extracelulární straně membrány. Vazba draselných iontů je podnětem k odvázáni fosfátu a Mg^{2+} iontů. Protein je pak připraven znovu k navázání molekuly ATP a cyklus může být opět celý zopakován (Grycova et al., 2009).



Obr.6: Schéma fungování NKA. Symbol E_{Na} odpovídá konformačnímu stavu tradičně označovanému podle Alberse-Posta E_1 tj. vysoké afinitě k sodným iontům, E_K odpovídá konformačnímu stavu označovanému podle Alberse-Posta E_2 a vysoké afinitě k draselným iontům, horní symboly ${}^u/oE$ označují uzavřenou/otevřenou konformaci cytoplazmatické části proteinu (upraveno podle Grycova et al. 2009, figure 8)

2.5 Na^+/K^+ - ATPasa a její fyziologický význam

Jelikož do buňky neustále proudí pomocí přenašečových proteinů a iontových kanálů Na^+ ionty, je hlavním úkolem NKA přenášet tyto sodné ionty ven z buňky a dovnitř přenášet draselné ionty, a tím zajistit optimální koncentraci sodných a draselných iontů v buňce.

Sodné a draselné ionty jsou přenášeny proti koncentračnímu gradientu, proto na jejich transport musí buňka vynakládat energii. Tuto energii získává buňka z hydrolýzy ATP. To je důvod, proč NKA hraje důležitou roli v energetické bilanci buňky, dokáže spotřebovat až 30 % všech molekul ATP v buňce. Jedná se tedy o aktivní transport (Albers B. et al., 1998).

Živočišné jsou v tkáních obklopeny kapalinou bohatou na Na^+ , Cl^- a další látky. Buňky musí tedy udržovat koncentraci anorganických a organických látek uvnitř i mimo buňku. Tento jev se označuje jako udržování osmotické rovnováhy. Protože osmotická rovnováha je neustále narušována, musí buňky nechtěné rozpuštěné látky odčerpávat. Tuto funkci zastává NKA, která odčerpává sodné ionty, které do buňky neustále proudí a zamezuje vstupu Cl^- iontů. Pokud je funkce NKA inhibována pomocí inhibitoru (např. ouabain), dojde k pronikání sodných a chloridových iontů do buňky pomocí iontových kanálů a dalších přenašečů, tím je narušena osmotická rovnováha v buňce. Výsledkem narušení osmotické rovnováhy je, že buňka postupně nabobtná, až nakonec praskne.

Jednou z dalších a velmi významných funkcí NKA je, že se podílí na tvorbě klidového membránového potenciálu. Klidový potenciál je příčinou rozdílných nábojů na povrchích cytoplazmatické membrány. Cytoplazmatická strana membrány je nabitá záporně vzhledem k vnější straně membrány, která je nabitá kladně. Kladně nabité ionty se snaží dostat podle svého koncentračního gradientu dovnitř buňky a záporně nabité ionty mimo buňku. Z toho tedy vyplývá, že síla, která pohání solut přes membránu se skládá ze dvou sil, a to z koncentračního gradientu a z napětí, které vzniká mezi oběma stranami cytoplazmatické membrány. Souhrnně tuto sílu pohánějící ionty přes membránu nazýváme gradient elektrochemického potenciálu (Albers B. et al., 1998).

NKA přenosem sodných iontů přes membránu vytváří gradient. Tento gradient je buňkou využit pro přenos dalších látek přes cytoplazmatickou membránu. Takovýto typ přenosu látek přes membránu nazýváme sekundárním transportem. Sekundární transport můžeme rozdělit na 2 možné transporty: symport, kdy jsou obě látky transportovány stejným směrem např. glukosovo- sodný symport, a antiport, kdy jsou látky přenášeny každá opačným směrem např. $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ antiport nebo Na^+ / H^+ antiport. Posledně zmiňovaný antiport se podílí na regulaci pH v buňce, tak že využívá toku sodných iontů do míst s nižší koncentrací k čerpání H^+ iontů ven z buňky (Bossuyt J. et al, 2006; Albers B. et al. 1998).

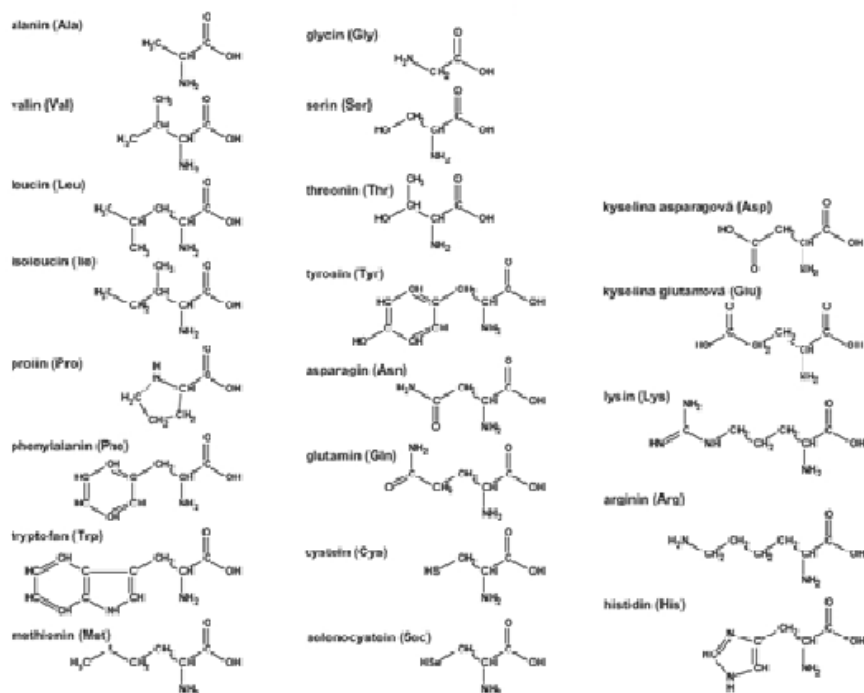
Jak je vidět, tak NKA má ve správném fungování buňky nezastupitelnou roli. Pokud je fungování NKA narušeno, má to negativní dopad na fungování buňky a dále pak na fungování celého organismu. Proto narušení správné funkce NKA je příčinou vzniku celé řady onemocnění jako je např. šedý zákal, cukrovka, onemocnění nervového aparátu, ledvin a v neposlední řadě i infarktu.

2.6 Endogenní látky

2.6. 1 Aminokyseliny

Ve skupině aminokyselin najdeme pestrou škálu různých druhů molekul, které mají jedinou společnou vlastnost: obsahují karboxylovou a aminovou skupinu, přičemž obě skupiny jsou navázány na jednom uhlíkovém atomu. Různorodost molekul spočívá v postranním řetězci, který je také navázán na uhlík s karboxylovou a aminovou skupinou. Důležitost aminokyselin pro funkci buňky spočívá v jejich hlavní roli při tvorbě proteinů. Jednotlivé aminokyseliny jsou k sobě připojovány vytvořením peptidové vazby karboxylovou skupinou jedné aminokyseliny a aminoskupinou druhé aminokyseliny, čímž vytváří primární strukturu proteinu. V proteinech se běžně vyskytuje 21 různých aminokyselin, které jsou vyjmenovány a rozděleny podle charakteru postranního řetězce na obrázku 7. Podobně jako cukry vytváří aminokyseliny izomery D a L, výjimku tvoří aminokyselina glycín, ten izomery nevytváří. V proteinech nalezneme pouze izomery L (Albers B. et al., 1998).

Přehled základních aminokyselin



Obr.7: Přehled 20 základních aminokyselin. 21. aminokyselinou je selenocystein, který má stejnou strukturu jako cystein, ale atom síry je nahrazen atomem selenu.

2.6.1.1 Esenciální a neesenciální aminokyseliny

V roce 1951 Roce definoval rozdělení aminokyselin na základě dusíkaté bilance na esenciální a neesenciální. Nejprve do skupiny esenciálních aminokyselin patřilo osm aminokyselin: izoleucin, lyzin, metionin, fenylalanin, treonin, tryptofan a valin. U těchto osmi aminokyselin jejich deficit vedl k rychlému rozvoji negativní dusíkaté bilance (Holeček M., 2006).

Dodatečně byl do seznamu zařazen histidin, jehož deficit se projeví poklesem koncentrace hemoglobinu, a arginin, který je důležitý ve fetálním vývoji člověka a spermatogenezi. Ostatní aminokyseliny byly tehdy považovány za neesenciální. Později bylo zjištěno, že v důsledku absence nebo nízké syntézy určitých aminokyselin vznikají nemoci. Při podávání těchto aminokyselin dojde k vyléčení nemoci. Z tohoto důvodu vznikla nová skupina aminokyselin nazvaná podmíněně esenciální. Nyní se

aminokyseliny rozdělují na tři skupiny - esenciální, podmíněně esenciální a neesenciální. U esenciálních a neesenciálních aminokyselin se rozlišují dvě podskupiny.

Esenciální aminokyseliny, tj. aminokyseliny, které si lidský organismus neumí syntetizovat v dostatečném množství ani za běžných životních podmínek, se rozdělují na totálně esenciální (lyzin, treonin) a aminokyseliny, které si při poskytnutí uhlíkového řetězce umíme syntetizovat. Takto mohou být v organismu syntetizovány valin, tryptofan, leucin, izoleucin, fenylalanin, methionin, arginin a histidin.

Mezi podmíněně esenciální aminokyseliny patří ty, které potřebují pro svou syntézu některou esenciální aminokyselinu. Například pro syntézu tyrozinu je nutný fenylalanin. Do druhé části této skupiny aminokyselin patří ty, jejichž deficit se rozvíjí v některých zátěžových stavech (např. glutamin u sepsí) .

Neesenciální aminokyseliny jsou syntetizovány v organismu v dostatečném množství nejen za fyziologických podmínek, ale také v zátěžových stavech a onemocněních (Holeček M., 2006).

Aminokyseliny jsou nejen základními podjednotkami bílkovin, ale mají celou řadu dalších funkcí. Jsou součástí či výchozí látkou syntézy mnoha biologických významných látek, účastníci se regulace translace, transkripce, některé aminokyseliny mají imunomodulační účinky, ovlivňují sekreci hormonů, transport přes buněčnou membránu, příjem potravy a řadu dalších funkcí (Holeček M., 2006).

V této práci byl zkoumán vliv na NKA u těchto 11 aminokyselin: fenylalanin, histidin, tryptofan, metionin, kyselina asparagová, serin, treonin, lyzin, arginin, prolin, tyrozin a cystein. Dále bude zkoumán vliv 5 derivátů aminokyselin, které působící na nervovou soustavu: serotonin, tryptamin, histamin a dopamin. Základní informace o vybraných aminokyselinách jsou uvedeny v tabulce 2.

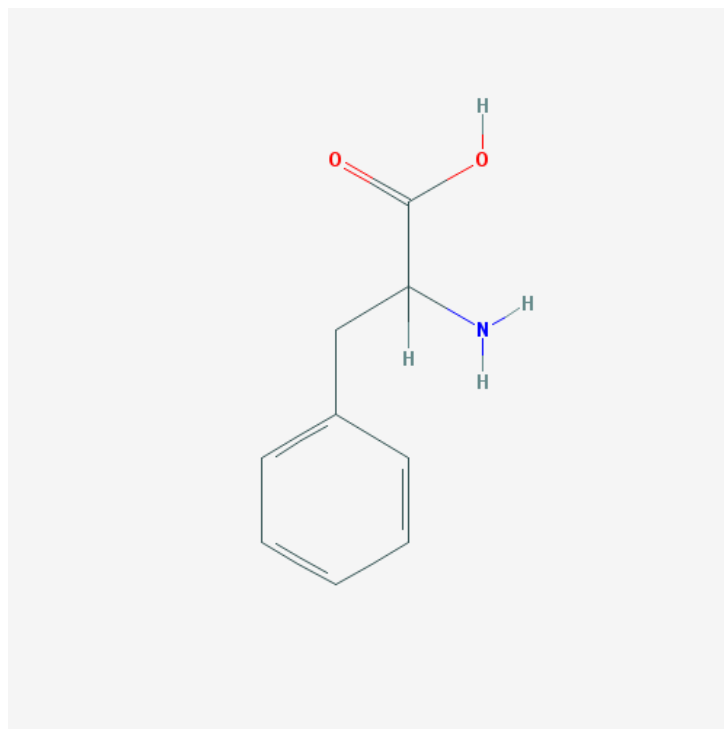
Tabulka 2: Přehled základních vlastností vybraných aminokyselin vlastností vybraných aminokyselin

Aminokyselina	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost [g/mol]	Charakteristiky	Rozpustnost ve vodě při 25 °C [g/l]
<i>Fenylalanin (Phe, F)</i>	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,19	Bílá krystalická látka, bez zápachu, hořké chuti	26,4
<i>Methionin (Met, M)</i>	C ₅ H ₉ NO ₂ S	149,21	Bezbarvé krystalky nebo bílý prášek, slabý zápach, sirnatá chuť	56,6
<i>Tryptofan (Trp, W)</i>	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,09	Bílé až nažloutlé krystalky, bez zápachu, slabě hořká chuť	11,4
<i>Histidin (His, H)</i>	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155,15	Bezbarvý, sladká chuť	45,6
<i>Kyselina asparagová (Asp, D)</i>	C ₄ H ₇ NO ₄	133,1	Bílá krystalická látka n. prášek	5,39
<i>Prolin (Pro, P)</i>	C ₅ H ₉ NO ₂	115,13	Bezbarvé krystalky, hořko sladké chuti	162
<i>Cystein (Cys, C)</i>	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121,16	Bezbarvé n. bílé krystalky	277
<i>Treonin (Thr, T)</i>	C ₄ H ₉ NO ₃	119,12	Bezbarvé krystalky	97
<i>Tyrozín (Tyr, Y)</i>	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,19	Bílé větší kuličky	479

Serin (Ser, S)	C ₃ H ₇ NO ₃	105,09	Bezbarvé krystalky, nasládlé chuti	425
Lyzin (Lys, K)	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146,19	Bezbarvé krystalky, hořkosladké chuti	584
Arginin (Arg, R)	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,2	Bezbarvé krystalky	182

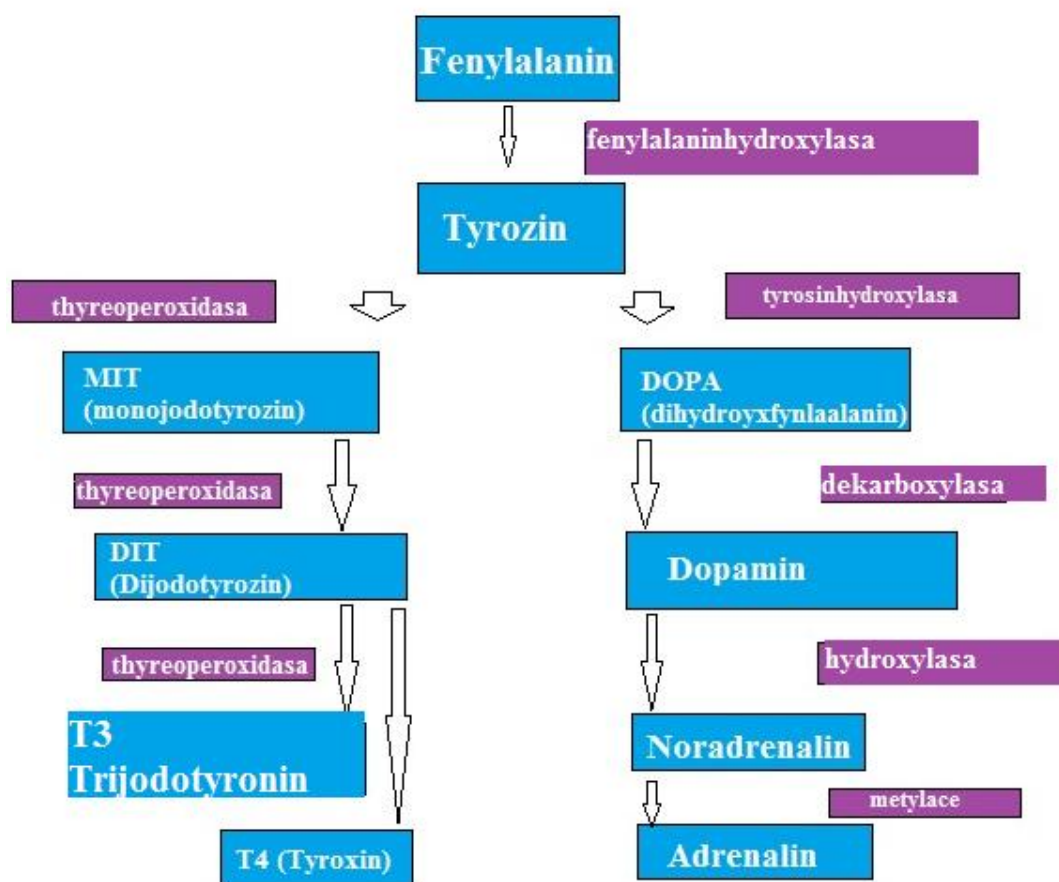
2.6.2 Fenylalanin (L - fenylalanin (Phe, F))

Fenylalanin je jednou z esenciálních aminokyselin, kterou si lidský organismus neumí syntetizovat a je nucen ji přijímat v potravě. Na obr. 8 je zakreslena struktura aminokyseliny a v tabulce 2 jsou zaznamenány základní vlastnosti.



Obr.8: Struktura fenylalaninu (Pubchem)

U této aminokyseliny je velmi zajímavý její metabolismus, protože je prekurzorem řady látek, které mají další využití v organismu jako hormony štítné žlázy a dřeně nadledvinek, a taktéž mají vliv na nervovou soustavu organismu. Metabolickou přeměnou (obr.9) této aminokyseliny tedy vznikají melanin, dopamin, noradrenalin a tyroxin. Důležitým krokem v metabolismu je hydroxylace fenylalaninu enzymem fenylalaninhydroxylázou. Pokud je v těle vlivem genetické mutace tohoto enzymu přítomno malé nebo žádné množství, nazývá se tato porucha fenylalaninketonurie (Holeček M., 2006).



Obr.9: Přehled metabolitů fenylalaninu

Vysoká koncentrace fenylalaninu v krvi (0,3-1,8 mM) je škodlivá zejména v první roce života, přičemž důsledkům škodlivosti fenylalaninu se dá zabránit dietou. Léčba této poruchy v pozdějších letech dítěte také spočívá v dietě prosté fenylalaninu. (Tsakiris S. et al., 1998)

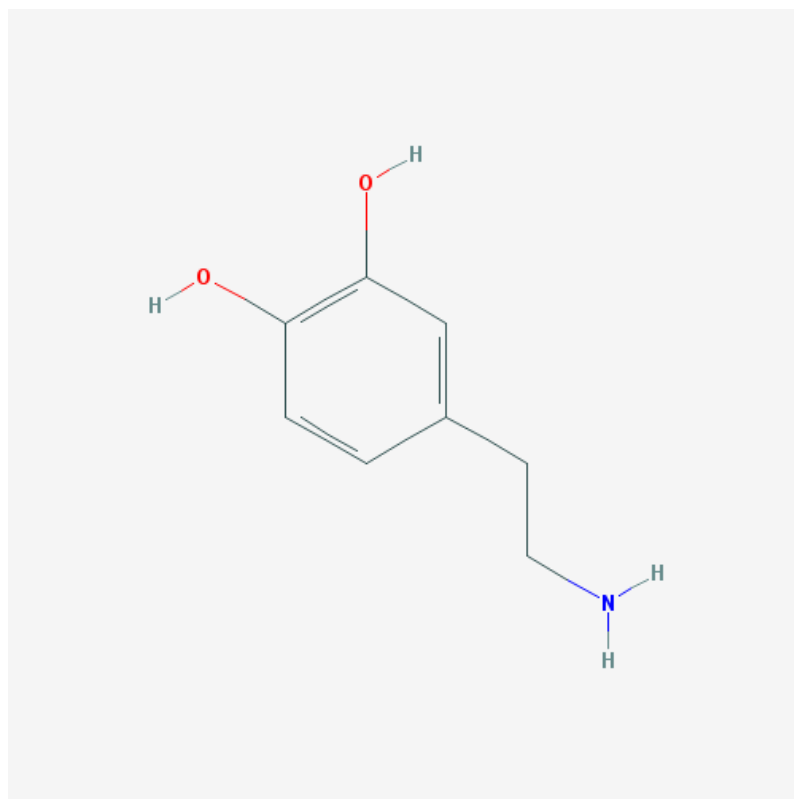
V farmacii se L-fenylalanin používá pro zvýšení produkce noradrenalinu v mozku. Noradrenalin je látka, která přenáší signály mezi jednotlivými nervovými

buňkami v mozku, jedná se o neurotransmitter. Její účinky jsou takové, že udržuje organismus bdělý a soustředěný, oddaluje spánek a pomáhá zlepšit paměť. Také se L-fenylalanin používá jako antidepresivum (Drugbank).

Jak je uvedeno výše, má fenylalanin vliv na nervovou soustavu, a proto bude zkoumán také jeho vliv na NKA, která je také jednou ze součástí nervových buněk.

2.6.2.1 Dopamin

Dopamin patří do skupiny přírodních katecholaminů a vzniká metabolismem fenylalaninu (obr. 9). Na obr.10 je zakreslena struktura této látky.



Obr.10: Struktura dopaminu (Pubchem)

Dopamin je prekursor v syntéze norepinefrinu a je taktéž neurotransmitterem v určitých oblastech CNS. Tělíska v hypothalamu uvolňují dopamin do adenohypofýzy, kde reguluje uvolňování prolaktinu. Dopamin spolu s dalšími neurotransmitery je v sítnici uvolňován amakrinními buňkami, kde má inhibiční účinek. Dopamin je taktéž vytvářen

v ledvinách, kde inhibuje fosforylaci NKA a tím zvyšuje natriurézu, dalším efektem je renální vazodilatace (Kittnar O. et al., 2011).

V mozku a v CNS má dopamin většinou inhibiční účinky. Dopaminergní neurony se nachází v několika oblastech mozku. V nigrostriálním systému v mozku se nachází 2 typy D-receptorů: D1 a D2 dopaminové receptory, které mají oba inhibiční účinky. V mezokortikálním systému hraje roli v mechanismech odměny, strachu, potěšení a závislosti (Kittnar O. et al., 2011).

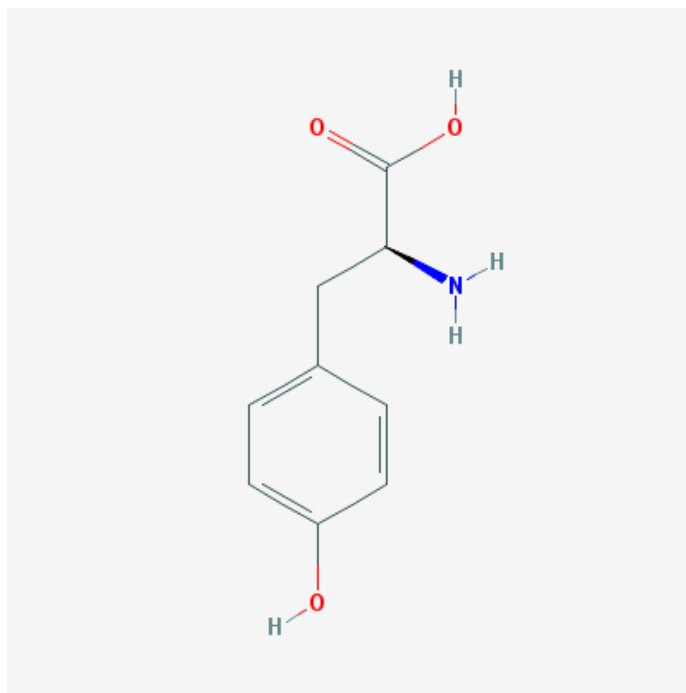
Pomocí přípravku vyrábějícího se z dopaminu L- DOPA je možné léčit pacienty s Parkinsonovým syndromem. Dále se používá při léčbě schizofrenie a depresí. Při dlouhodobém užívání dochází k úbytku dopaminových receptorů nebo snížení produkce dopaminu, což vede ke snížené vnímavosti k běžným libým činnostem daného pacienta. Závislí často proto cítí beznaděj, depresi a další pocity s tímto spojené (Drugbank).

Dopamin má do jisté míry pozitivní vliv na myokard - zvyšuje jeho frekvenci a kontraktilitu, proto po podání intravenózně zvyšuje systolický tlak, ale zachovává stejnou hodnotu diastolického tlaku (Drugbank).

Protože je u této látky prokázána inhibice NKA a působí také na nervovou soustavu, bude i tato látka zkoumána.

2.6.3 Tyrozin (Tyr, Y)

Tyrozin je neesenciální aminokyselinou syntetizovanou z fenylalaninu. Tyrozin je rozhodující pro tvorbu proteinů, enzymů a svalové tkáně. Základní charakteristiky jsou zaznamenány v tabulce 2 a na obr. 11 je zakreslena struktura aminokyseliny.



Obr.11: Struktura tyrozinu (Pubchem)

Tyrozín v těle živočichů vzniká nevratnou hydroxylací fenylalaninu pomocí fenylalaninhydroxylázy. Přibližně 50 % veškeré aktivity fenylalaninhydroxylázy v organismu je přítomno v ledvinách a ledviny produkují okolo 1 g tyrozinu za den (Holeček M., 2006).

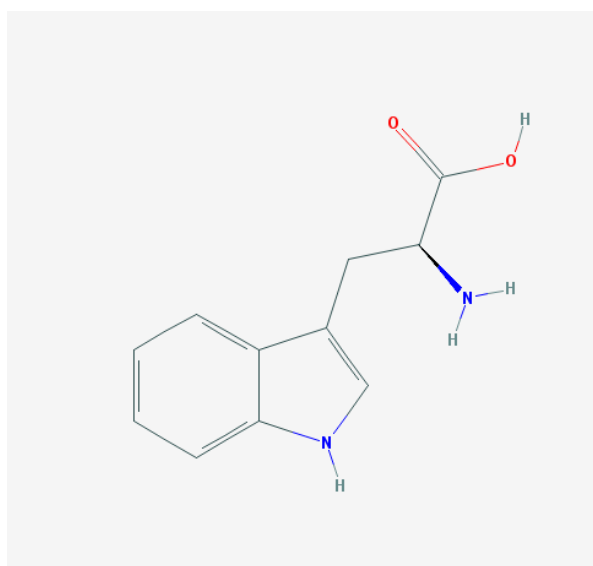
Tyrozín je meziproduktem syntézy neurotransmiterů - adrenalinu, noradrenalinu, dopaminu a také je meziproduktem syntézy melaninu a tyroxinu.

Tyrozín zlepšuje paměť a zvyšuje duševní činnost. Tuto aminokyselinu je možné použít jako podpůrnou léčbu při dlouhodobém stresu, dále pomáhá proti chronické únavě a bojuje proti narkolepsii (Drugbank).

Jeho nedostatek se projevuje onemocněním hypertyreózou, která se projevuje nízkým krevním tlakem a nízkou tělesnou teplotou. Dalším onemocněním v poruše metabolismu tyrozinu je tyrozinemie, která se projevuje zvýšenou hladinou tyrozinu v krvi. U chronické renální insuficience je inhibována přeměna fenylalaninu na tyrozín (Holeček M., 2006).

2.6.4 Tryptofan (L-tryptofan, Trp, W)

Tryptofan patří mezi esenciální aminokyseliny. Tryptofan je rozhodující pro výrobu proteinů, enzymů a svalové tkáně. Je rovněž nezbytný pro výrobu niacinu a syntézu neurotransmiterů serotoninu a melatoninu. Základní charakteristiky jsou zaznamenány v tabulce 2 a na obr. 12 je zakreslena struktura aminokyseliny.



Obr. 12: Struktura tryptofanu (Pubchem)

Ve své struktuře obsahuje aromatické jádro. Tato aminokyselina je zdrojem přirozené fluorescence proteinů. Původ fluorescence u tryptofanu jsou indolové skupiny, jež mají nejvyšší absorpci a emisi v UV oblasti spektra. Základní fluorescenční spektrální charakteristiky jsou takovéto: excitační vlnová délka 295 nm, emisní vlnová délka 353 nm, kvantový výtěžek je asi 0,13 a doba života 3,1 ns. (Lakowicz J.R., 2009)

Tryptofan slouží jako prekurzor syntézy serotoninu a melatoninu. Existuje jen málo důkazů o účinnosti tryptofanu při léčbě deprese, ale i přesto se používá jako podpůrná léčba. Někdy se podává s pyridoxynem a kyselinou askorbovou, které se podílejí na metabolismu serotoninu (Drugbank).

Kromě vlivu na depresi, snižuje L-tryptofan spánkovou latenci a mírně prodlužuje dobu spánku při nespavosti.

Doplňky obsahující tryptofan mohou snížit pocit úzkosti a deprese. Dále je možné použít tryptofan pro snížení chronické bolesti, snížení impulzivitu nebo při léčbě obsedantně kompulzivní poruchy. Tryptofan má také pozitivní účinky na imunitní systém (Drugbank).

K onemocnění způsobené nadbytkem nebo nedostatkem tryptofanu patří například Pelegra. Pelegra je nemoc rozvíjející se s nedostatečným příjmem niacinu, hlavně v oblastech, kde k hlavním potravinám patří kukuřice. Nové odrůdy kukuřice mají vyšší obsah niacinu a tryptofanu, proto nehrozí jejich deficit (Holeček M.,2006).

Nedostatek tryptofanu v těle je provázen depresí, nespavostí a poruchami sexuálních reakcí, zejména v důsledku poklesu tvorby serotoninu. Protože serotonin neprochází přes hematoencefalickou bariéru, je nutno jeho deficit v mozku korigovat aplikací jeho prekurzorů (Holeček M.,2006).

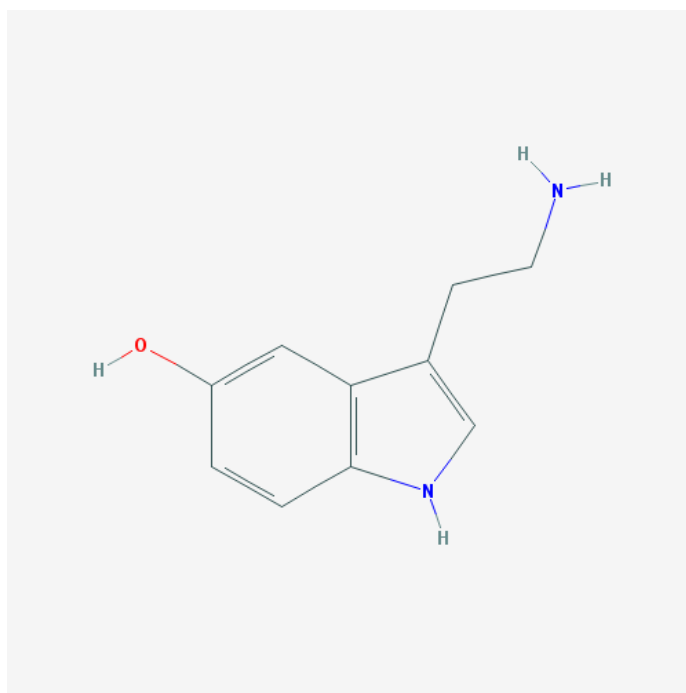
Pokud máme zvýšený příjem tryptofanu, jsou stimulovány fibroblasty, zvýší se syntéza kolagenu a může se vyskytnout tzv. eozinofilní myalgický syndrom. Nadbytek tryptofanu je provázen povznesenou náladou, poklesem prahu bolesti a nechutenstvím. (Holeček M.,2006)

Tato aminokyselina je prekurzor neurotransmiterů, a proto byla vybrána pro zjištění vlivu na NKA.

Neurotransmitery vznikající přeměnou tryptofanu jsou serotonin a tryptamin.

2.6.4.1 Serotonin

Serotonin (5-hydroxytryptamin, zkráceně 5-HT) je v čistém stavu bílá krystalická látka, o molekulové hmotnosti 176,22 g/mol a rozpustnosti 20 g/l. Na obr. č. 13 je zakreslena jeho struktura.



Obr. 13: Struktura serotoninu (Pubchem)

Serotonin vzniká hydroxylací tryptofanu, pomocí tryptofan-5-monoxygenázy vzniká 5-hydroxytryptofan, který je dekarboxylován na inhibiční neuromediátor serotonin - 5-hydroxytryptamin. Serotonin je syntetizován v neuronech (především v oblasti hypotalamu, mozkového kmene a epifýzy), v chromafinních buňkách trávicího traktu a v trombocytech. Neurony syntetizující serotonin mají významnou roli v příjmu potravy, chování a spánku. Serotonin je degradován monoaminoxidázou na 5-hydroxyindolacetát, který se vylučuje z těla močí (Holeček M., 2006)

Nedostatek serotoninu se projevuje sníženým přenosem nervových vzruchů, změnami nálad a celkovou depresí, případně poruchami spánku, podrážděností až agresivitou (Drugbank).

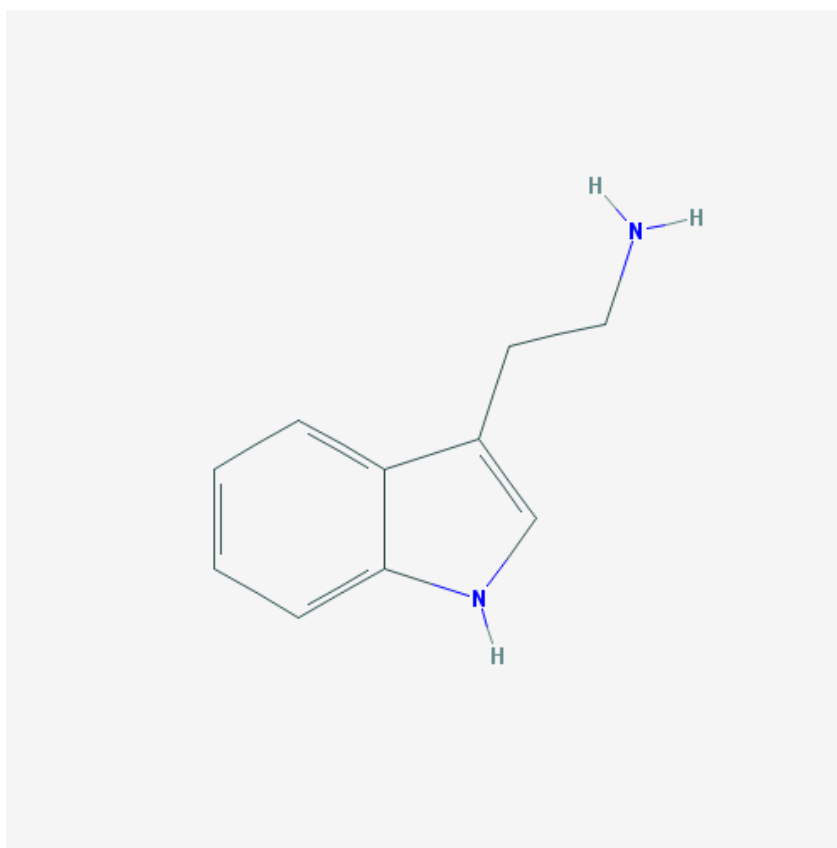
Serotonin působí v mozku na velké množství různorodých receptorů. Tato látka se proto hojně využívá ve farmacii pro výrobu léků používaných při léčbě psychiatrických onemocnění - antidepresiv. K těmto lékům patří inhibitory monoaminoxidázy, tricyklická antidepresiva a antipsychotika a selektivní inhibitory zpětnovazebného vychytání serotoninu (Drugbank).

Dále se serotonin ve farmacii využívá pro výrobu léků proti zvracení, tzv. antiemetik (Drugbank).

Nadměrně zvýšená hladina serotoninu způsobuje nebezpečný stav tzv. serotoninový syndrom (Holeček M.,2006).

2.6.4.2 Tryptamin

Tryptamin je oranžovožlutá, silně zapáchající krystalická látka, o molekulové hmotnosti 160,1 g/mol. Na obr. 14 je zakreslena jeho struktura.

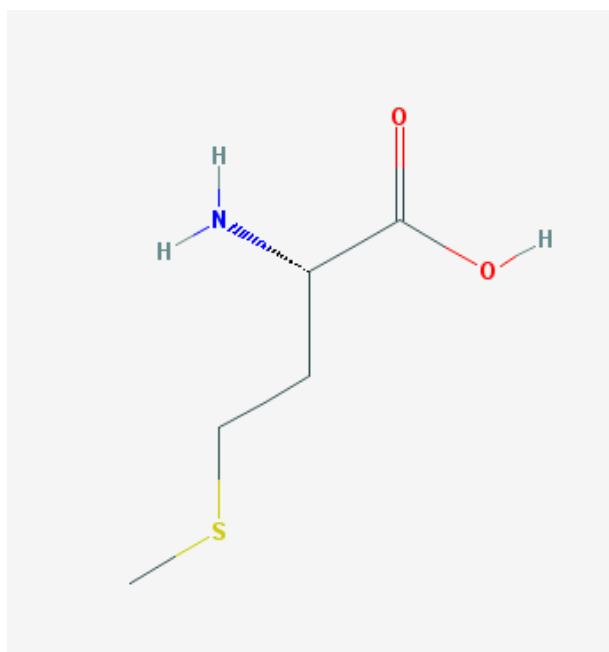


Obr. 14: Struktura tryptaminu (Pubchem)

Tryptamin vzniká dekarboxylací tryptofanu, který má stimulační vliv na CNS a je jedním s neurotransmiterů. Kromě mozku savců je možné ho najít v některých rostlinách nebo potravě (např. v sýru). Má také účinek na zvýšení krevního tlaku (Drugbank).

2.6.5 Methionin (L-methionin, Met, M)

Methionin je esenciální aminokyselinou, která ve své struktuře má atom síry a je velmi důležitá pro mnoho tělesných funkcí. Jeho struktura je zakreslena na obr. 15 a jeho základní charakteristiky jsou zaznamenány v tabulce 2 (Drugbank).



Obr.15: Struktura methioninu (Pubchem)

Tato aminokyselina patří mezi významné donory metylových skupin. Forma schopná přenášet metylovou skupinu se nazývá S-adenosylmethionin (SAME - aktivní metionin). SAME může být použit pro syntézu polyaminů v reakci katalyzované specifickou dekarboxylázou. Druhou možností je přenos metylové skupiny na různé akceptory za vzniku S-adenosylhomocysteinu (SAHC). Existuje mnoho specifických metyltransferáz, které umožňují přenos metylové skupiny ze SAME na akceptor. Reakce se uplatňují například při syntéze adrenalinu a kreatinu (Holeček M., 2006).

L- methionin a jeho metabolismus je pro organismus zdrojem síry, zabraňuje vypadávání vlasů a poruchám růstu nehtů. Dále pomáhá snižovat hladinu cholesterolu v krvi zvýšením výroby lecitinu v játrech a chrání ledviny. Je přírodní chelatační činidlo pro těžké kovy. Reguluje také množství čpavku v moči, čímž snižuje podráždění močového měchýře. L- methionin může také chránit před toxickými účinky hepatotoxinů, jako je např. acetaminofen. Může mít antioxidační účinky (Drugbank).

L- methionin se používá jako alternativa k acetylcysteinu při léčbě otravy paracetamolem (Drugbank).

L-methionin v nadměrném množství může způsobovat nevolnost, zvracení, ospalost a podrážděnost. U osob s onemocněním jater je doporučeno jej používat s nadměrnou opatrností (Drugbank).

2.6.6 Cystein (Cys, C)

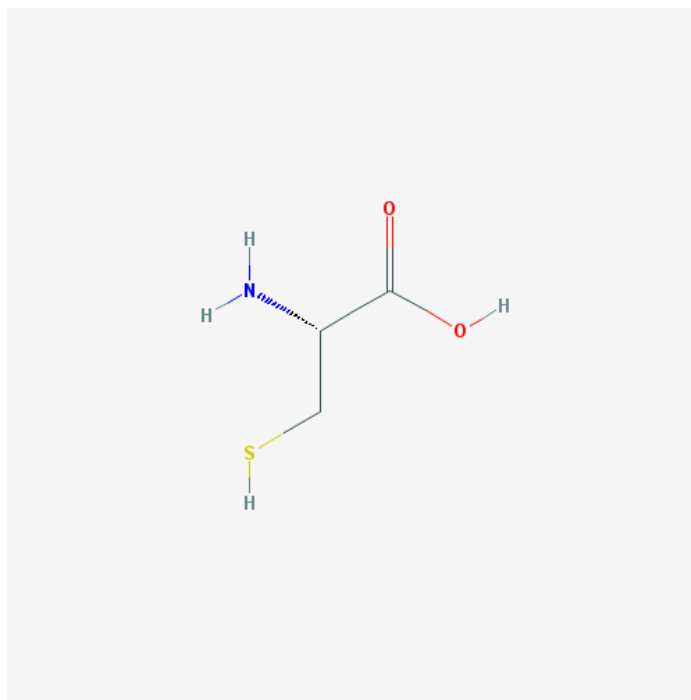
Cystein je neesenciální aminokyselina, která ve své struktuře stejně jako methionin obsahuje atom síry. V tabulce 2 jsou uvedeny základní charakteristiky a na obr. 16 je zakreslena struktura cysteinu.

Cystein získává organismus z proteinů nebo syntézou z homocysteinu. Syntéza cysteinu z homocysteinu umožňují postupně cystation- β -syntáza a γ -cystationáza. Oba tyto enzymy se vyskytují v játrech, ledvinách, pankreatu a tenkém střevu.

Pokud je v těle snižená nebo zcela chybějící aktivita cystationinsyntázy, vede to k rozvoji onemocnění homocystinurii.

Cysteinové zbytky jsou základem disulfidových můstků, které umožňují vytvoření kompaktní proteinové struktury. Cystein je součástí glutathionu (Glu-Cys-Glu), který je velmi účinným antioxidantem a je součástí řady detoxikačních systémů (Holeček M., 2006).

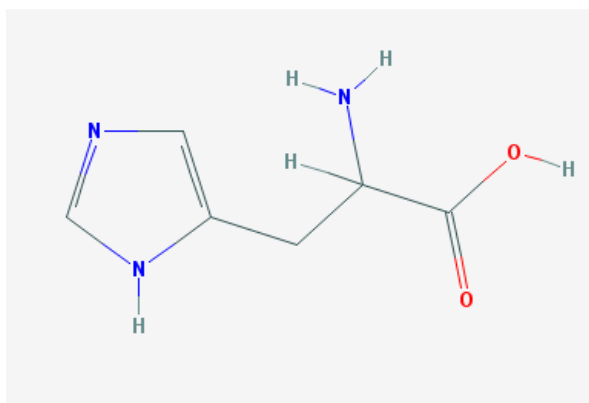
V lékařství se používá jako prevence před poškozením jater a ledvin spojené s předávkováním paracetamolem (Drugbank).



Obr. 16: Struktura cysteinu (Pubchem)

2.6.7 Histidin (L-histidin, His, H)

Tato esenciální bazická aminokyselina má nejvyšší procentuální zastoupení v hemoglobinu. Základní charakteristiky aminokyseliny jsou zaznamenány v tabulce 2 a na obr. 17 je zakreslena struktura aminokyseliny.



Obr.17: Struktura histidinu (Pubchem)

Mechanismus působení této aminokyseliny nebyl dosud objasněn. U jeho metabolitů histaminu a kyseliny transurakanové může být prokázán vliv na imunitu a antioxidační účinky. Nízkou nebo nulovou hladinu histaminu v séru je možné nalézt u některých

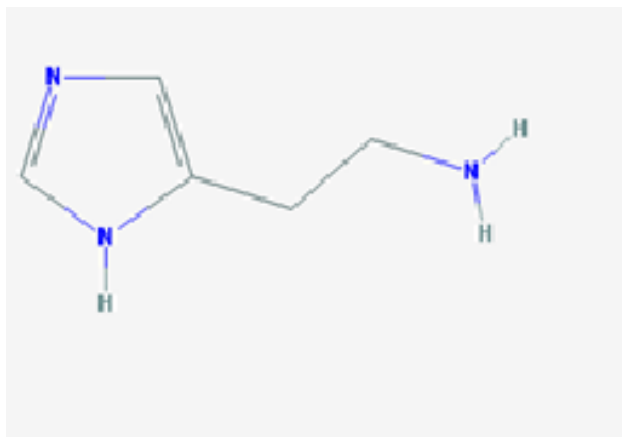
pacientů s revmatoidní artritidou. L-histidin přítomný v séru je vynikajícím chelatačním činidlem pro železo, měď a zinek. Je možné použít L-histidin při léčbě revmatoidní artritidy, alergických onemocnění, vředů a anémie. Jeho nedostatek může způsobit vadu sluchu (Drugbank).

Histidinemie je patofyziologické onemocnění, kdy v důsledku dědičného nedostatku histidinamoniaklyázy je blokována přeměna histidinu na urokanát (Holeček M., 2006).

K významným metabolitům histidinu patří histamin.

2.6.7.1 Histamin

Histamin je látka, která vzniká z histidinu jeho dekarboxylací. V našich experimentech budeme používat histamin dichlorid. Molekulová váha této látky je 184,1 g/mol a na obr. 18 je zakreslena její struktura.



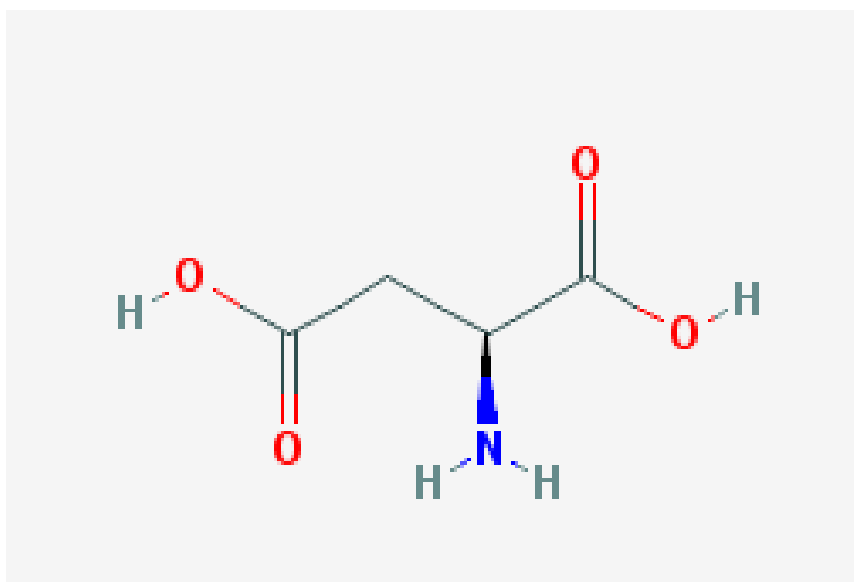
Obr.18: Struktura histaminu

Mezi nejznámější funkce a nejvíce ve farmakologickém průmyslu využívané patří jeho vliv na alergickou reakci. Působí proti nadměrné imunitní reakci na podněty vyvolané běžně se vyskytující v okolí. Léky s tímto účinkem se nazývají antihistaminika (Drugbank).

Histamin má imunomodulační a antioxidační účinky. Histamin aktivuje u T-lymfocytů H2 receptory. Pro jeho vliv na imunitní systém, je možné ho použít pro léčbu některých typů rakoviny a virových onemocnění (Drugbank).

2.6.8 Kyselina asparagová (Asp, D) a asparagin (Asn, N)

Kyselina asparagová patří do skupiny neesenciálních aminokyselin. V tabulce 2 jsou uvedeny základní vlastnosti této aminokyseliny a na obr. 19 je zakreslena struktura této aminokyseliny.



Obr.19: Struktura kyseliny asparagové (Pubchem)

Organismus ji vytváří rozpadem bílkovin a syntézou z oxalacetátu. Z oxalacetátu vzniká aspartát transaminační reakcí, kde se jako kofaktor uplatňuje pyridooxalacetát a zdroj aminoskupiny je glutamát. Dále aspartát může vstupovat do ornitinového cyklu prostřednictvím argininsukcinátu, jehož štěpením vzniká arginin a fumarát, které stejně jako oxaloacetát vstupují do citrátového cyklu.

Tato aminokyselina je nezbytná pro syntézu purinů a pyrimidinů a L- argininu. Patří mezi excitační aminokyseliny v mozku, druhou excitační aminokyselinou je glutamát. Snadno vytváří vodíkové můstky a zvyšuje rozpustnost bílkovin ve vodě. (Holeček M., 2006)

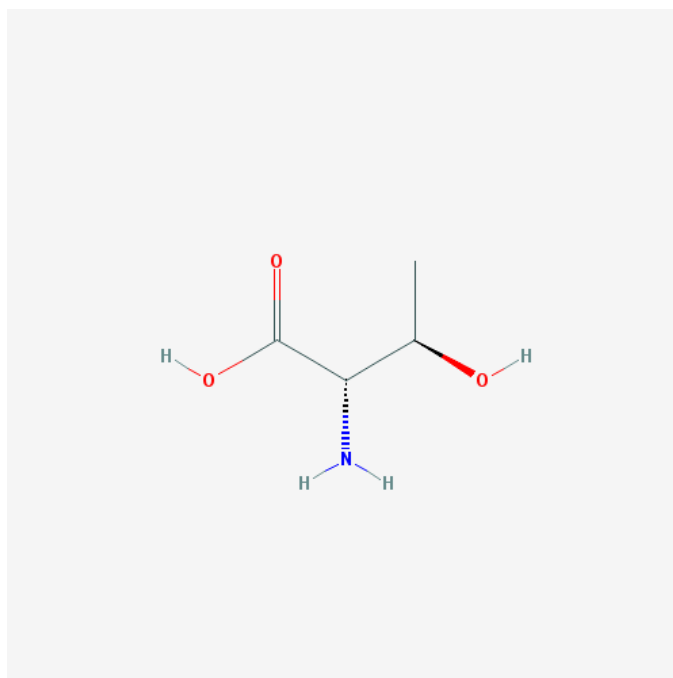
Aspartát je součástí sladidla aspartamu, který tvoří spolu s fenylationinem. Spousta prací prokazuje negativní účinky spojené s jeho příjmem (např. bolest hlavy,

únava, nespavost, ztráta sluchu). Při teplotách vyšších než 40 °C se rozkládá za vzniku jedovatého formaldehydu. (Holeček M., 2006)

Předpokládá se, že L- aspartát, zejména jeho draselná a hořečnatá sůl, jsou součástí svalového glykogenu a podporuje rychlejší zpětnou syntézu během cvičení (Drugbank).

2.6.9 Threonin (Thr, T)

Threonin je polární a pro živočichy esenciální aminokyselinou, jejíž základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 2. Na obr. 20 je zachycena jeho struktura.



Obr. 20: Struktura threoninu (Pubchem)

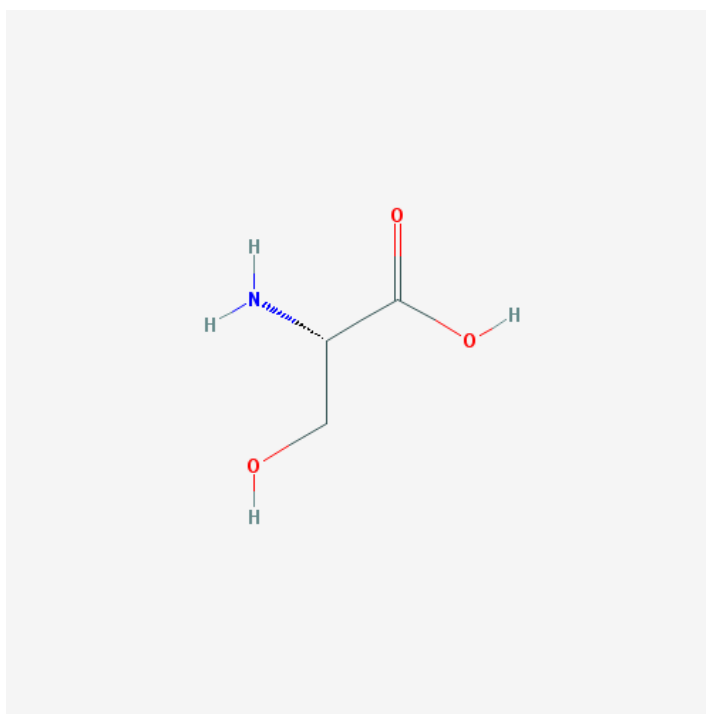
Threonin vytváří prostřednictvím vodíkových vazeb interakce s řadou látek a zvyšuje rozpustnost bílkovin ve vodě. Má schopnost vázat reverzibilně fosfátovou skupinu a společně se serinem se uplatňuje při aktivaci a inaktivaci enzymů. V rostlinách a mikroorganismech je syntetizován z aspartátu přes homoserin. U živočichů je prekurzor pro syntézu proteinů, glycinu a serinu (Holeček M., 2006).

V lidském organismu je důležitý také pro tvorbu kolagenu, elastinu a zubní tkáně. V kombinaci s kyselinou asparagovou a metioninem pomáhá při onemocnění

jater. V klinické praxi byl také použit za cílem zvýšení koncentrace glycinu v mozkomíšním moku u pacientů trpících křečemi (Drugbank).

2.6.10 Serin (Ser, S)

Serin patří do skupiny neesenciálních polárních aminokyselin, proto snadno jako threoninu interaguje s řadou látek a zvyšuje rozpustnost bílkovin ve vodě. Jeho základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 2 a na obr. 21 je zakreslena jeho struktura. Serin je v organismu syntetizován z threoninu nebo z 3-P-glycerátu. . Významným zdrojem serinu jsou ledviny, které produkují 4 g serinu za den.



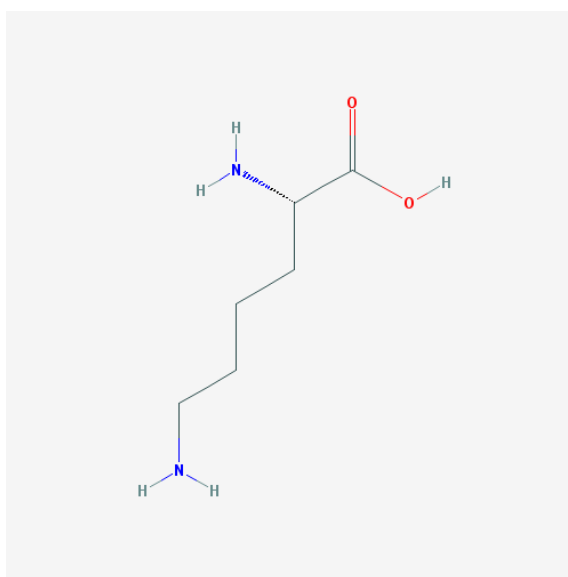
Obr.13: Struktura serinu (Pubchem)

Serin je součástí O-glykosidických vazeb glykoproteinů a esterových vazeb fosfoproteinů. Spolu s treoninem se uplatňuje při regulaci aktivity enzymů řízených prostřednictvím fosforylace-defosforylace. Serin je také substrát pro syntézu fosfolipidů a cysteinu. Serin je zdroj jednoduchých jednováhlíkových zbytků, proto je nezbytnou součástí živných médií pro buněčné kultury (zde se stává serin podmíněčně esenciální aminokyselinou, protože buňky bez jeho přítomnosti nejsou schopny proliferace. (Holeček M., 2006)

Nedávno bylo prokázáno, že serin má také specifickou funkci v metabolismu nervové tkáně (Holeček M., 2006)

2.6.11 Lyzin (Lys, K)

Lyzin, nebo také diaminokapronová kyselina, je esenciální aminokyselinou s bazickým charakterem. Jeho základní vlastnosti jsou zapsány v tabulce 2 a na obr. 22 je zakreslena jeho struktura.

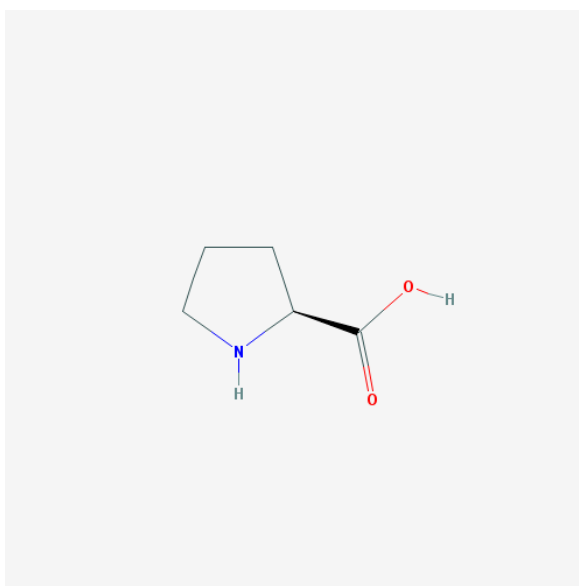


Obr.22: Struktura lyzinu (Pubchem)

Lyzin získává tělo z potravy nebo štěpením vlastních bílkovin. Přítomnost dvou aminoskupin a elektrického náboje umožňuje velké množství interakcí, především s peptidy a proteiny a vzniku silných kovalentních vazeb v elastinu a kolagenu. Na ϵ - aminoskupinu lyzinových zbytků se váže ubiquitin. Lyzin je nezbytný pro syntézu karnitinu, jeho nevratnou dekarboxylací vzniká biogenní amin kadaverin (Holeček M., 2006).

2.6.13 Prolin (Pro, P)

Prolin je neesenciální glukoplastickou aminokyselinou s nepolárním charakterem. V tabulce 2 jsou uvedeny základní charakteristiky této látky a na obr. 23. je zachycena struktura této aminokyseliny.



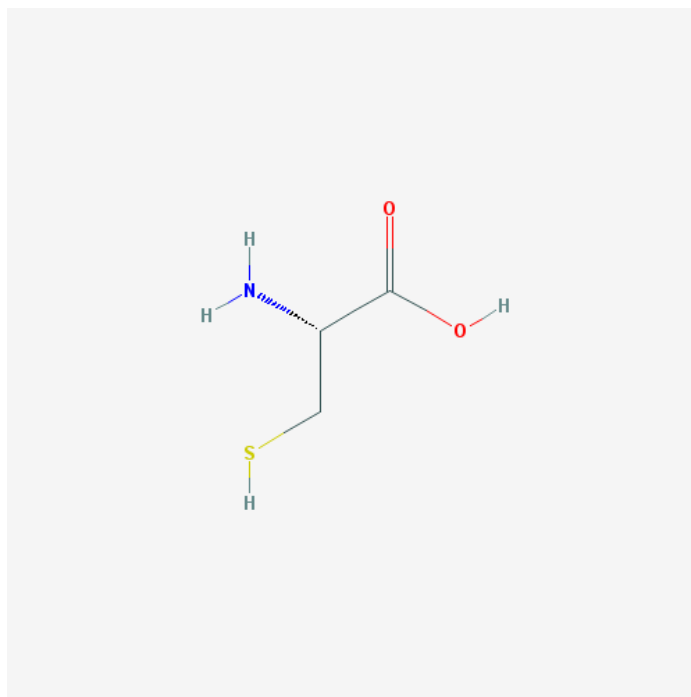
Obr. 23: Struktura prolinu (Pubchem)

Prolin se uplatňuje zejména při hydrofobních interakcích bílkovin. Vysoké koncentrace prolinu se nachází v kolagenu (okolo 13 %) společně s hydroxyprolinem (okolo 9 %). Je tedy velmi důležitý pro správnou funkci kloubů a šlach, taktéž pomáhá udržovat a posilovat srdeční svalstvo. Udržuje také rovnováhu imunitního systému (Holeček M, 2006 a Drugbank).

2.6.14 Arginin (Arg, R)

Arginin je aminokyselina, která je součástí ornitinového cyklu a je taktéž součástí proteinů. Molekula argininu obsahuje 4 atomy dusíku (struktura argininu obr.24), což jej předurčuje za jeho významný zdroj v organismu a je prekurzorem pro syntézu oxidu dusnatého, ornitinu, urey, polyaminů, prolinu, kreatinu, agmatinu a

kyseliny glutamové (Holeček M., 2006). Zdrojem argininu jsou bílkoviny a syntéza z citrulinu v ledvinách.



Obr.24: Struktura argininu (Pubchem)

Kromě syntézy výše uvedených látek má arginin celou řadu dalších významných regulačních funkcí. Působí jako allosterický aktivátor N-acetylglutamátsyntázy, stimuluje sekreci růstového hormonu, prolaktinu, luteinizačního hormonu a inzulinu (Holeček M., 2006).

Přídavná léčba argininem má příznivý vliv na proteinovou bilanci, reparaci poškozené tkáně a imunitní systém. Pro tyto své vlastnosti je arginin součástí potravinových doplňků pro sportovce a aktivně žijící lidi (Drugbank).

Arginin je považován za esenciální aminokyselinu při spermatogenezi, v období fetálního vývoje a u novorozenců (Holeček M., 2006).

2.6.15 Plazmatické koncentrace aminokyselin

Plazmatická koncentrace aminokyselin se obvykle stanovuje na lačno, po deproteinaci krevní plazmy získané centrifugací krve z žíly. Tyto aminogramy jsou

významně ovlivněny metabolismem kosterního svalstva a mohou se výrazně lišit od aminogramů získaných analýzou smíšené žilní krve, respektive krve arteriální. Nesporně aminogramy získané analýzou arteriální krve vypovídají daleko přesněji o změnách metabolismu aminokyselin v organismu než vzorky získané z krve periferních žil. Na plazmatickou koncentraci aminokyselin má největší vliv výživa, ale také i věk a pohlaví.

Přesnost stanovení aminokyselin závisí na mnoha faktorech a mezi jednotlivými laboratořemi dosud přetrvávají výrazné rozdíly v hodnotách považovaných za normu. Výrazný vliv na aminogram má například způsob odběru a přípravy vzorku a jeho skladování před další analýzou (Holeček M., 2006).

Příčinou rozdílných výsledků získaných za použití odlišných analytických metod je okolnost, že stanovení velkého počtu aminokyselin, mezi kterými je často velký rozdíl v koncentraci, je obtížné zabezpečit u každé aminokyseliny lineární vztah mezi její koncentrací a měřeným signálem (Holeček M., 2006).

Do této doby nejvíce používané analytické postupy jsou iontová výměna na katexu s post-kolonovou derivatizací s ninhidrinem a HPLC s předkoloovou derivatizací s o-ftaldialdehydem (OPA). Novějším, ale málo rozšířeným derivatizačním činidlem pro fluorimetrickou detekci je 6-aminochinolyl-N-hydroxysukcimidyl karbamát (Holeček M., 2006).

Koncentrace aminokyselin v krevní plazmě (tabulka 3) je výslednicí rozdílu mezi jejich vstupem do krevního řečiště a jejich utilizací ve tkáních. Za fyziologických podmínek se jen malá část ztrácí v nezměněné formě močí, potem a stolicí. Aminogram poskytuje tedy jen omezenou informaci o metabolismu proteinů a aminokyselin u daného jedince a nemůže vysvětlit příčinu možné nerovnováhy (Holeček M., 2006).

Tabulka 3: Plazmatické koncentrace aminokyselin stanovené na lačno u zdravých jedinců obou pohlaví (28-45 let) odlišnými metodami - hodnoty jsou uvedeny v $\mu\text{mol/l}$, průměr $\pm$ SD (Holeček. 2006)

Aminokyselina	Ninhydrin	OPA	Poznámka
Esenciální	(n=44)	(n=44)	
Fenylalanin	55 $\pm$ 7	61 $\pm$ 8	
Histidin	92 $\pm$ 13	82 $\pm$ 11	
Izoleucin	71 $\pm$ 14	82 $\pm$ 16	
Leucin	135 $\pm$ 24	142 $\pm$ 23	
Lyzin	171 $\pm$ 26	180 $\pm$ 27	
Metionin	27 $\pm$ 7	28 $\pm$ 5	
Treonin	137 $\pm$ 33	137 $\pm$ 24	
Tryptofan	55 $\pm$ 10	57 $\pm$ 7	90 % ve vazbě na proteiny
Valin	251 $\pm$ 56	285 $\pm$ 48	
Semiesenciální			
Arginin	79 $\pm$ 24	81 $\pm$ 15	↓ při opakované venepunkci*
Citrulin	31 $\pm$ 7	36 $\pm$ 7	
Glutamin	576 $\pm$ 74	570 $\pm$ 69	↓ během skladování vzorku
Ornitin	72 $\pm$ 19	73 $\pm$ 15	
Taurin	50 $\pm$ 11	46 $\pm$ 8	↓ při opakované venepunkci*
Tyrozín	63 $\pm$ 19	67 $\pm$ 11	
Neesenciální			
Alanin	399 $\pm$ 71	379 $\pm$ 75	↑ při kontaminaci potem
Asparagin	58 $\pm$ 14	54 $\pm$ 8	↓ během skladování vzorku
Hydroxyprolin	-	-	Nereaguje s OPA
Kyselina asparagová	5 $\pm$ 3	5 $\pm$ 3	↑ během skladování vzorku
Glycin	202 $\pm$ 48	196 $\pm$ 42	↑ při kontaminaci potem
Kyselina glutamová	36 $\pm$ 12	52 $\pm$ 18	↓ při opakované venepunkci * ↑ během skladování vzorku
Prolin	-	-	Nereaguje s OPA

Serin	99 ± 20	104 ± 16	↑při kontaminaci potem
l- methylhistidin	8 ± 9	6 ± 4	
3- metylhistidin	7 ± 5	10 ± 5	

** Pravděpodobnou příčinou poklesu taurinu, glutamátu a argininu při opakované vénépunkci je uvolnění arginázy při homeostázi.*

Cíl práce

- zpracovat problematiku o Na^+/K^+ - ATPase
- zjistit, které aminokyseliny mají vliv na nervovou soustavu
- stanovit aktivitu Na^+/K^+ - ATPasy po reakci s aminokyselinou nebo jejím metabolitem ovlivňující nervovou soustavu
- určit, které aminokyseliny mají vliv na aktivitu enzymu na základě naměřených dat a porovnat výsledky s literaturou

Experimentální část

4 Materiál a metody

4.1 Přehled použitého materiálu

ATP - Sigma Aldrich

ouabain- Fluka

kyselina askorbová- Sigma Aldrich

citrát vizmutitý - Sigma Aldrich

SDS- Sigma Aldrich

molybdenan amonný - Sigma ALdrich

chlorid draselný (KCl) - Fluka

chlorid sodný (NaCl) - Sigma Aldrich

citrát sodný- Sigma Aldrich

chlorid hořečnatý (MgCl_2) - Sigma Aldrich

kyselina chlorovodíková (HCl)- Sigma Aldrich

Imidazol - Carl Roth GmbH

Dopamin- Sigma Aldrich

Serotonin- Sigma Aldrich

Tryptamin - Sigma Aldrich

Fenylalanin- Carl Roth GmbH

Histidin - Sigma Aldrich

kyselina aspartátová- Fluka

methionin- Fluka

Serin- Carl Roth GmbH

Threonin - Carl Roth GmbH

Arginin - Carl Roth GmbH

Tryptofan- Fluka

Cystein- Fluka

Prolin- Sigma Aldrich

Tyrozin- Carl Roth GmbH

4.2 Izolace Na^+/K^+ ATPasy

K našim experimentům byla použita NKA, která byla vyizolována z čerstvých vepřových ledvin. Při izolaci jen nutné pracovat s materiálem při nízké teplotě, a to v rozmezí 0 - 4 °C.

V prvním dni izolace je provedena preparace dřeně ledvin. Nejprve byly ledviny nakrájeny na plátky a následně z nich byla pomocí chirurgických kleštíček vypreparována dřeň jedná se o hnědorůžovou tkáň). Tato vypreparovaná tkáň byla umístěna do ISE (imidazol, sacharósa a EDTA) pufru. Kousíčky vypreparované tkáně byly ponechány přes noc při 4 °C.

Další den byla tkáň zhomogenizována a následně stočena na centrifuze. Nejprve byla centrifuga nastavena na $3700 \times g$, 20 minut a 5 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet rozsuspendován v ISE pufru. Tato směs byla centrifugována při $7400 \times g$ a 5 °C po dobu 20 minut. Supernatant byl slit a po té byl stočen při nastavení centrifugy $38000 \times g$, teplota 5 °C a doba centrifugace byla 40 minut. Pelet byl rozsuspendován ve 150 ml ISE pufru a homogenizován. Po homogenizaci bylo přidáno 50 ml ISE pufru. Následně byla směs rozdělena po 1 ml do eppendorfek. Část vzorků bude použita na titraci s SDS, zbytek se uchovává při -20°C. Jedná se o vyizolované mikrosomy, ve kterých je obsažena NKA. Zde je ve směsi přítomna Na^+/K^+ ATPasa, její aktivitu stanovíme z měření množství vyprodukovaného fosfátu a porovnáme ho s množstvím fosfátu vyprodukovaného po přidání ouabainu k mikrosomům. Pokud je aktivita enzymu po přidání ouabainu nižší, tak je v mikrosomech přítomna NKA.

Titrace SDS se provádí proto, že pomocí SDS jsou zdenaturovány i ostatní proteiny přítomny ve vyizolované směsi. Titraci provádíme tak, že do směsi přidáváme postupně zvyšující se množství SDS a měříme po přidání aktivitu enzymu. Poslední nejvyšší množství SDS při poslední naměřené nejvyšší aktivitě, je množství, které přidáme do ostatních eppendorfek pro získání NKA (Klodos I. et al., 2002).

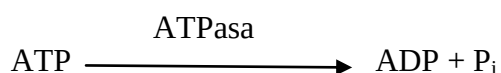
Po provedení titrace pomocí SDS získáme směs proteinů obsahující NKA. Koncentrace směsi proteinů byla zjištěna pomocí metody stanovení koncentrace podle Bradfordové.

4.3. Metoda stanovení koncentrace proteinů - Metoda Bradfordové

Metoda stanovení koncentrace neznámého proteinu podle Bradfordové je založena na srovnávání absorpce navázaného barviva na protein o známé koncentraci (standardu) s absorpcí navázaného barviva na protein o neznámé koncentraci. Tuto metodu poprvé použila v roce 1975 Marion M. Bradfordová, kdy pro určení koncentrace neznámého proteinu využila specifických spektrálních vlastností barviva Coomassie-Brilliant-Blue G-250. Toto barvivo má tu vlastnost, že po navázání na protein dojde k posunu jeho absorpčního maxima z původních 465 nm na 595 nm. Tento jev je doprovázen i změnou barvy z hnědé na modrou. (Bradford M.M., 1975).

4.4 Metody pro stanovení aktivity enzymu

Aktivita enzymu může být stanovena jinými metodami, které jsou založeny na detekování uvolněného fosfátu. Sledování množství uvolněného fosfátu je možné několika způsoby např. v metodě publikované Banikem a Royem (1990) byl fosfát detekován fluorescenčně.



Další variantou pro stanovení množství vyprodukovaného fosfátu je využít kolorimetrických vlastností aktivovaného komplexu vyprodukovaného fosfátu a molybdenanu amonného. Reakcí vyprodukovaného fosfátu s přidaným molybdenanem amonným vzniká modrý komplex. Změřením absorbance na příslušné vlnové délce zjistíme aktivitu enzymu. Příkladem těchto metod je metoda pro stanovení aktivity enzymu tzv. Baginského test (Sarkar P.K., 2002).

4.4. 1 Baginského test

Baginského test je metoda umožňující rychlé, opakovatelné a citlivé stanovení anorganického fosfátu P_i i v přítomnosti labilních fosfátů jako je např. ATP nebo kreatin-fosfát. Tato metoda může být použita pro analýzu biologických materiálů obsahujících fosfát, lipidů nebo může být přizpůsobena pro studium fosforečnanů štěpících enzymy (Cariani L. et al., 2004).

Při měření aktivity proteinu může dojít k tvorbě chyb v podobě zvýšené míry koncentrace anorganického fosfátu, což je způsobeno neenzymatickou hydrolyzou substrátu (Baginsky et al., 1966). Baginského test tyto chyby eliminuje a jeho další výhodou je, že po vytvoření barevného komplexu činidla a uvolněného fosfátu se jakýkoli další vzniklý fosfát neprojevuje v měření.

Principem reakce vzniku modrého produktu reakce je okamžitá syntéza anorganického fosfátu s molybdatem, čímž vzniká aktivovaný komplex. Takto vytvořený aktivovaný komplex je redukován kyselinou askorbovou, což je příčinou vzniku modrého zabarvení roztoku. Reakci zastavíme přidáním roztoku obsahujícím stabilizační činidlo pro aktivovaný komplex, které taktéž vysráží přebytečný molybdenan amonný, aby nedocházelo k tvorbě dalších aktivovaných komplexů po uplynutí doby vyvíjení modrého zabarvení roztoku (v našem případě byla doba vyvíjení modrého zbarvení roztoku osm minut). Jako stabilizační činidlo pro aktivovaný komplex se dříve používal citrát arsenitý. Z důvodu vysoké toxicity arsenu a s tím spojené problematické likvidace odpadu, byla původní metoda Baginského testu upravována Ottolenghim, Brotherusem a kol. a Forbushem, ale jejich návrhy na eliminaci citrátu arsenitého snižovaly citlivost metody. Cariani et al (2004) nahradili citrát arsenitý citrátem vizmutitým, čímž zajistili bezpečnost a zvýšili citlivost stanovení anorganického fosfátu.

Vizmut, který byl vybrán Carianim, je nejtěžším prvkem V. skupiny, do které také patří také arsen. Vizmut vytváří nerozpustné sloučeniny s molybdenanem, které mohou být rozpustné pouze při nízké hodnotě pH. Právě pro tyto vlastnosti byl zvolen místo citrátu arsenitého jako chelatační činidlo citrát vizmutitý pro vysrážení přebytečného molybdenanu a tím i stabilizaci aktivovaného komplexu.

Detekce fosfátu v této práci bude provedena touto upravenou verzí Baginského testu.

4.5. Měření aktivity enzymu - Baginského test

4.5.1 Příprava zásobních roztoků a vzorků

a) Zásobní roztoky pro stanovení kalibrace:

10 % molybdenan amonný (1 g molybdenan amonný a 10 ml H₂O), 35 % HCl, 20 % SDS (příprava: rozpuštění 10 g SDS v 50 ml H₂O), 1 mM KH₂PO₄ (vodný)

b) Zásobní roztoky pro vlastní měření aktivity proteinu:

1 M NaCl (objem 50 ml, vodný), 1 M KCl (objem 50 ml, vodný), 1 M MgCl₂ (objem 10 ml, vodný), 1 M imidazol (objem 50 ml, vodný)

c) Příprava vzorků

Smícháme v poměru 1:1 (v/v) izolovaný protein o koncentraci 1 mg/ml s roztokem aminokyseliny o určité koncentraci. Vzorek byl poté inkubován 2 h při 4 °C. Po uplynutí inkubace byla u takto připraveného vzorku stanovena hodnota aktivity NKA.

4.5.2 Kalibrační křivka

1. Pro stanovení kalibrace nejprve připravíme ze zásobních roztoků následující tři roztoky:
2. Roztok 1 je 10 % molybdenan amonný.
3. Druhý roztok (Roztok 2) připravíme následovně:
 - a. Nejprve navážíme 0,43 g kyseliny askorbové a rozpustíme v 10 ml deionizované vody.
 - b. K rozpuštěné kyselině přidáme 1,48 ml 35 % HCl a 2,145 ml 20 % SDS.
 - c. K takto připravenému roztoku přidáme těsně před jeho použitím 715 μ l Roztoku 1 a zchladíme na ledu. Po přidání Roztoku 1 dojde ke změně barvy Roztoku 2 z čiré na žlutou. Při přidávání Roztoku 1 postupujeme velmi opatrně, protože při neopatrné manipulaci dochází k znehodnocení celého roztoku - zmodrání roztoku nebo vytvoření modré sraženiny. Roztok 2 připravujeme před každým měřením čerstvý.
4. Třetí roztok (Roztok 3) připravíme následovně:
 - a. Nejprve navážíme 1,75 g citrát vizmutitý a 1,75 g citrátu sodného.
 - b. 1,75 g citrátu vizmutitého rozpustíme v max. 25 ml deionizované vody.
 - c. K rozpuštěnému citrátu vizmutitého přidáme 4,93 ml 35 % HCl a 1,75 g citrátu sodného.
 - d. Po úplném rozpuštění citrátu sodného vzniklý roztok doplníme do celkového objemu 50 ml. Roztok skladujeme ve tmě a chladu. Jeho expirace je asi 1 měsíc.
5. Dále si ze zásobního roztoku KH_2PO_4 připravíme roztoky o objemu 1 ml do ependorfech o vzrůstající koncentraci KH_2PO_4 (standardy) dle tabulky 4.

Tabulka 4: Příprava různých koncentrací fosfátu

Finální molární množství fosfátu [nmol]	Finální koncentrace fosfátu [mM]	V (KH ₂ PO ₄ (1mM)) [μl]	V (H ₂ O) [μl]
0	0	0	1000
2,5	0,05	50	950
5	0,1	100	900
10	0,2	200	800
17,5	0,35	350	650
25	0,5	500	500

- Do titrační destičky napipetujeme 50 μl fosfátu s vodou od nulové koncentrace po koncentraci 0,5 mM fosfátu.
- Reakce začne probíhat po přidání 75 μl Roztoku 2. Ponecháme reakci vyvíjet 8 minut. (Zvolili jsme 30 s rozdíl mezi jednotlivými jamkami)
- K ukončení reakce dojde přidáním 125 μl Roztoku 3. (Dodržujeme 30 s rozdíl mezi jamkami). Odstraníme bublinky vzniklé pipetováním jehlou a změříme absorbanci při vlnové délce 710 nm na spektrofotometru Synergy Mx (Biotek, USA).

4.5.3 Měření aktivity enzymu

- Připravíme 2x ATPasový aktivity pufr ze zásobních roztoků:
 - Smícháme 13 ml 1M NaCl, 2 ml 1 M KCl, 0,4 ml 1 M MgCl₂, a 3 ml 1 M imidazolu.
 - U vzniklého roztoku upravíme pH na hodnotu 7,2 a doplníme do celkového objemu 50 ml. Skladujeme v chladu.
- Připravíme zásobní roztok 10 mM ATP. Navážíme si potřebné množství ATP a rozpustíme ve vodě. Následně připravený roztok rozpipetujeme

po 300 μ l do ependorfe. Uchováváme při -20° C. Zásobní roztok 5 mM ouabainu připravíme stejně, ale uchováváme při pokojové teplotě a zacházíme s ním velice opatrně, jelikož se jedná o jed.

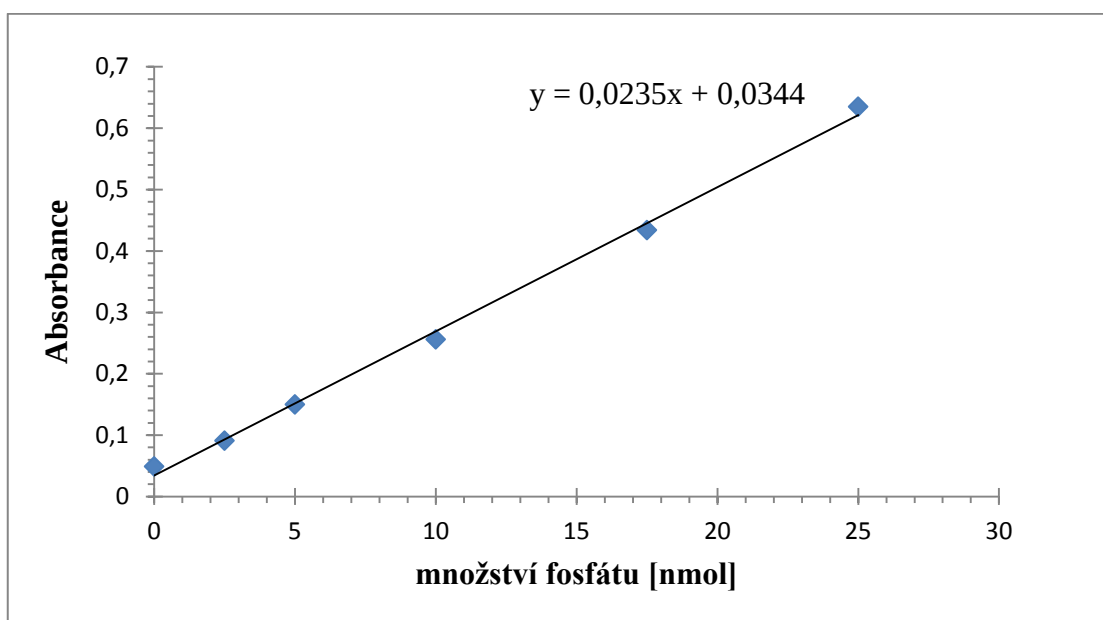
3. Dále si připravíme 1x ATPasový aktivty pufr a ouabain pufr:
 - a. 1x ATPasový aktivty pufr: 300 μ l 10 mM ATP smícháme s 511 μ l 2x ATPasový pufr a 189 μ l deionizované vody.
 - b. Ouabain pufr: 300 μ l 10 mM ATP smícháme s 511 μ l 2x ATPasový, pufrem, 89 μ l deionizované vody a 100 μ l 5 mM ouabainu.
4. Roztoky 2 a 3 jsou stejné jako při stanovení kalibrace.
5. Do 5 jamek titrační destičky napipetujeme 48 μ l 1x ATPase nebo ouabain pufru.
6. Do každé jamky přidáme 2 μ l vzorku (NKA nebo NKA s endogenní látkou) a necháme inkubovat 6 minut. Reakce začne přidáním 75 μ l Roztoku 2. Zbarvení necháme vyvíjet 8 minut.
7. Reakci zastavíme přidáním 125 μ l roztoku 3. Odstraníme bublinky vzniklé pipetováním jehlou a změříme absorbanci při vlnové délce 710 nm na spektrofotometru Synergy Mx (Biotek, USA).

Před každým měřením vzorků je nutné provést kalibrační měření. Měříme vždy 5 jamek s 1x ATPasovým aktivty pufrem spolu se vzorkem a 5 jamek s Ouabain pufrem spolu se vzorkem. Měření s ouabainem se provádí proto, že v izolovaných mikrosomech a směsi proteinů z nich se mohou nacházet i jiné ATPasy, které mohou ovlivnit výsledky našeho měření. Odečtením hodnoty aktivity vzorku s ouabainem od aktivity vzorku bez něj, získáme přímo hodnotu aktivity NKA.

4.6 Vyhodnocení hodnot získaných Baginského testem

Nejprve byla změřena kalibrační křivka. Hodnoty absorbance fosfátových standardů byly vyneseny do grafu jako závislost absorbance na koncentraci fosfátu. Takto získaná závislost byla proložena přímkou, z níž jsme získali rovnici lineární regrese. Graf 1 uvádí příklad kalibračního stanovení množství fosfátu. Obecný tvar rovnice lineární regrese je

$$y = kx + q \quad (1)$$



Obr.25: Příklad kalibrační závislosti absorbance na množství uvolněného fosfátu.

Z rovnice lineární regrese (1) byla vyjádřena proměnná x . Do takto upravené rovnice byly dosazovány za hodnotu y naměřené hodnoty absorbance jednotlivých vzorků.

Následně vypočtenou hodnotu x z lineární regrese dosadíme do vzorce (2)

$$A_{K_{A/O}} = \frac{x}{c_p \cdot t_r \cdot V_z} \quad (2)$$

kde $A_{K_{A/O}}$ je aktivita proteinu s ATP/Oubainem v $\mu M \cdot mg_{prot}^{-1} \cdot h^{-1}$, c_p je koncentrace proteinu v mg/ml, t_r je doba vyvíjení fosfátu v h (tedy 0,1 h) a V_z je objem vzorku v ml (tedy 0,002 ml).

Výslednou aktivitu A_K získám ze vzorce (3)

$$A_K = A_{K_A} - A_{K_O} \quad (3)$$

A_{K_A} je aktivita enzymu jen s ATP a A_{K_O} je aktivita enzymu v přítomnosti oubainu. Měření aktivity s oubainem u každého vzorku se provádí jako kontrola, abychom zjistili, zda vzorek obsahuje i další proteiny s ATPásovou aktivitou. Po odečtení hodnoty aktivity s oubainem získáme aktivitu samotné NKA.

Měření aktivity u každého vzorku bylo zopakováno 5 krát. Hodnoty byly poté zprůměrovány a byla stanovena směrodatná odchylka, která je v grafu zanesena chybovými úsečkami. Nakonec byl proveden také tzv. t-test, jehož hladiny významnosti jsou v grafu označeny * ($p < 0,05$) popř. ** ($p < 0,001$).

4.7. Určení hodnoty IC50

IC50 (EC50) je hodnota koncentrace, kdy dochází k poloviční inhibici zkoumané látky (např. proteinu).

U naměřených hodnot aktivity proteinu v závislosti na zvyšující se koncentraci aminokyseliny nebo metabolitu, byl v programu Origin proveden fit. Závislosti byly fitovány podle logistické funkce (4)

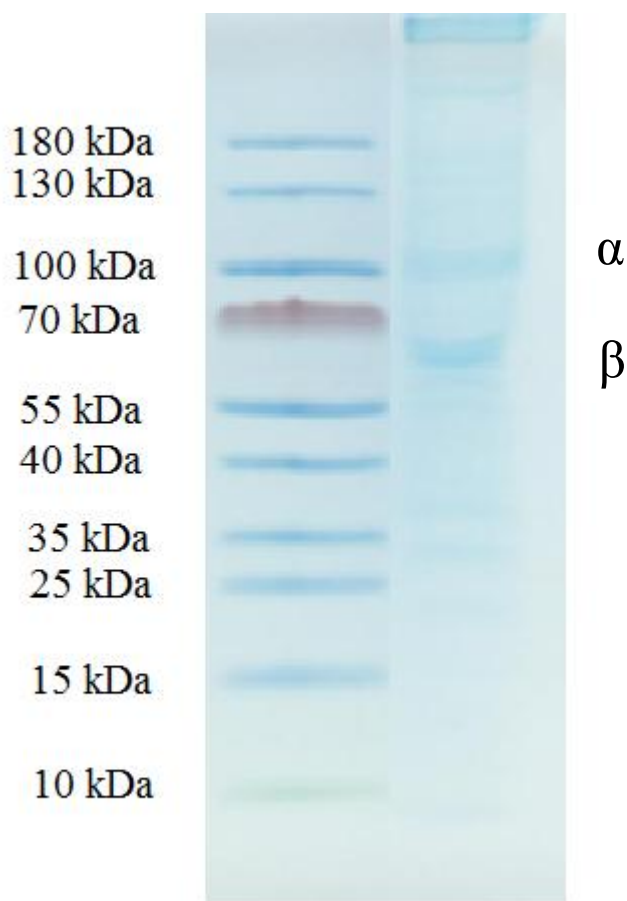
$$A = \frac{A_1 - A_2}{1 + (\frac{c}{IC_{50}})^n} + A_2 \quad (4)$$

kde A_1 maximální hodnota aktivity, A_2 minimální hodnota aktivity, c je koncentrace dané aminokyseliny a parametr n je tzv. Hillův koeficient. Hillův koeficient charakterizuje kooperativitu vazebných míst aminokyseliny nebo metabolitu. Pokud je $n > 1$ jedná se o pozitivní kooperativitu, je-li $n < 1$ jedná se o negativní kooperativitu.

5. Výsledky

5.1 Izolace Na^+/K^+ - ATPasy

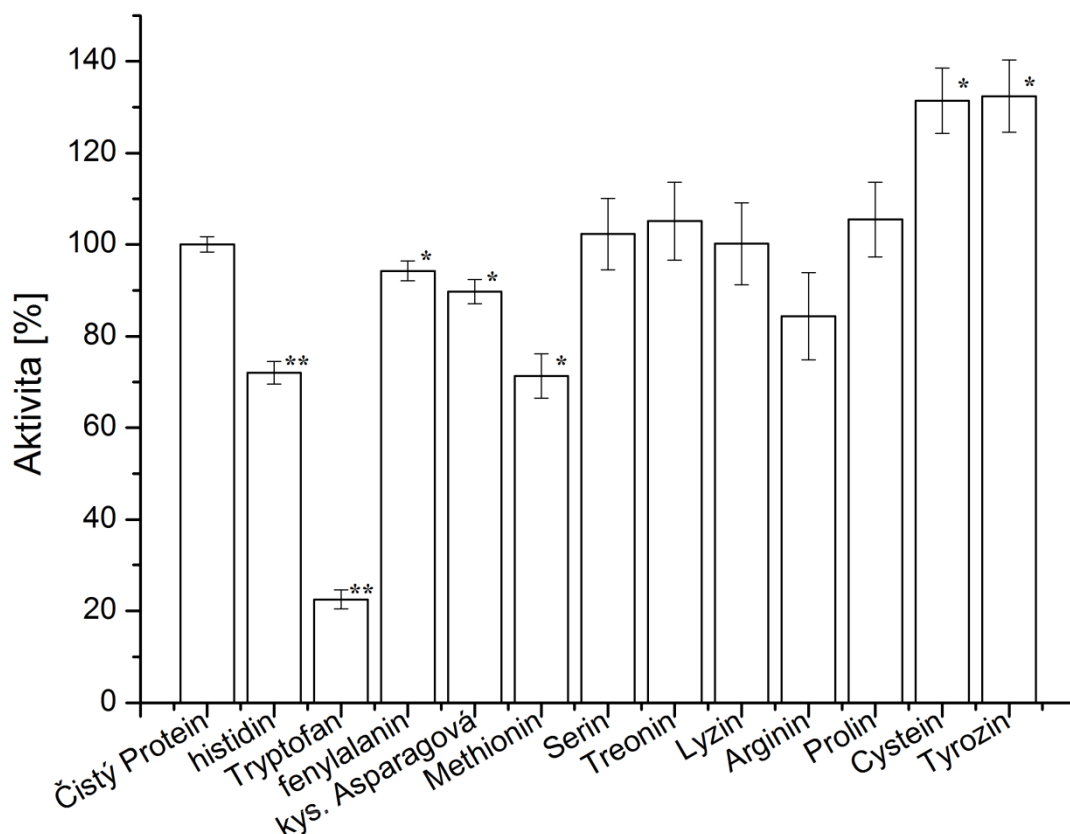
Čistota proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE - elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s příměsí SDS (obr. 26).



Obr. 26: Gel z elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s příměsí SDS. Vlevo je marker s jednotlivými molekulovými hmotnostmi, vpravo je čistý vyizolovaný protein o koncentraci 2 mg/ml

5.2 Vliv aminokyselin na aktivitu Na^+/K^+ - ATPasy

Nejprve jsme provedli test aminokyselin při vysoké koncentraci 15 mM.



Obr.27: Vliv aminokyselin na aktivitu Na^+/K^+ - ATPasy. * (hodnota $p < 0,05$) popř. ** ($p < 0,001$) je označuje hladinu statistické významnosti.

V tabulce 4 jsou uvedeny průměrné hodnoty aktivity proteinu při interakci s testovanými aminokyselinami, včetně směrodatné odchylky. Hodnoty aktivit jsou porovnávány s hodnotou aktivity čistého proteinu, která je rovna $(100 \pm 2) \%$.

Tabulka 4: Aktivita proteinu při interakci s vybranou aminokyselinou. Hodnoty jsou uvedeny v %, průměr $\pm$ SD.

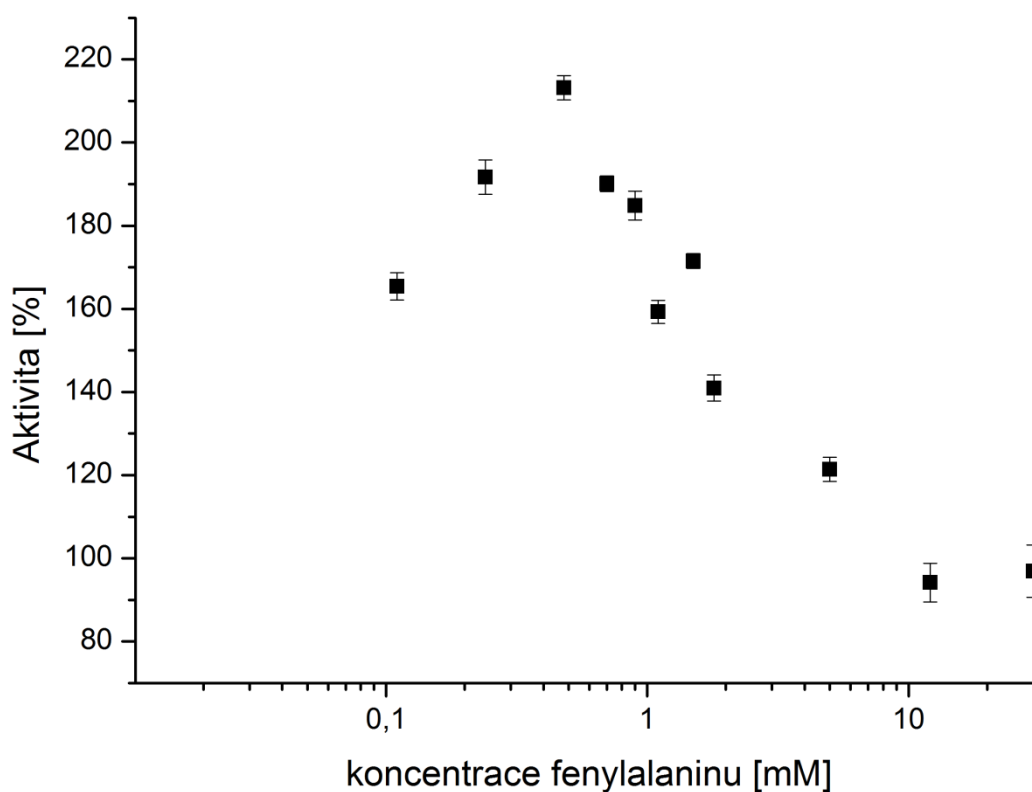
<i>Testovaná aminokyselina</i>	<i>Aktivita [%]</i>
Histidin	72 $\pm$ 4
Tryptofan	23 $\pm$ 3
Fenylalanin	94 $\pm$ 4
Kys. asparagová	90 $\pm$ 4
Methionin	71 $\pm$ 4
Serin	102 $\pm$ 14
Treonin	105 $\pm$ 15
Lyzin	103 $\pm$ 16
Arginin	84 $\pm$ 16
Prolin	105 $\pm$ 14
Cystein	131 $\pm$ 12
Tyrozín	132 $\pm$ 14

5.3 Koncentrační závislost aktivity Na^+/K^+ - ATPasy při interakci s vybranou aminokyselinou

Na základě měření, kdy byl proveden test vlivu na aminokyselinu na aktivitu proteinu, byly vybrány ty aminokyseliny, které ovlivňovaly aktivitu Na^+/K^+ - ATPasy.

5.3.1 Koncentrační závislost Na^+/K^+ - ATPasy při interakci s fenylalaninem

Jako první byla ověřena koncentrační závislost aminokyseliny fenylalaninu.

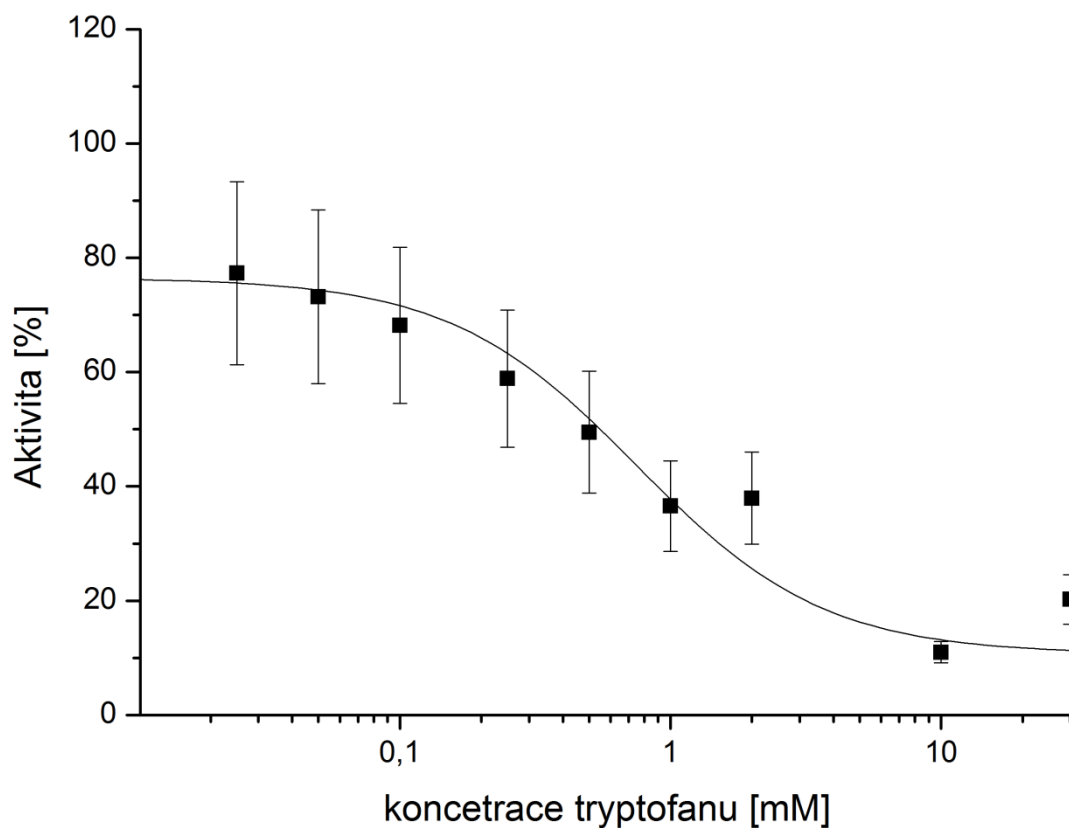


Obr.28: Koncentrační závislost aktivity Na^+/K^+ - ATPasy s aminokyselinou fenylalaninem.

Tato aminokyselina má při měření koncentrační závislosti specifický průběh. Bylo zjištěno, že v rozmezí koncentrací fenylalaninu 0,11-0,9 mM zvyšuje aktivitu proteinu. Maximální hodnota aktivity proteinu je při koncentraci aminokyseliny 0,48 mM je (213 ± 3) % aktivity čistého proteinu.

5.3. 2 Koncentrační závislost Na^+/K^+ -ATPasy při interakci s tryptofanem

U aminokyseliny tryptofan byla při vysoké koncentraci (obr. 27) naměřena nejnižší hodnota aktivity. Proto byla u této aminokyseliny proměřena koncentrační závislost aktivity proteinu na zvyšující se koncentraci tryptofanu.

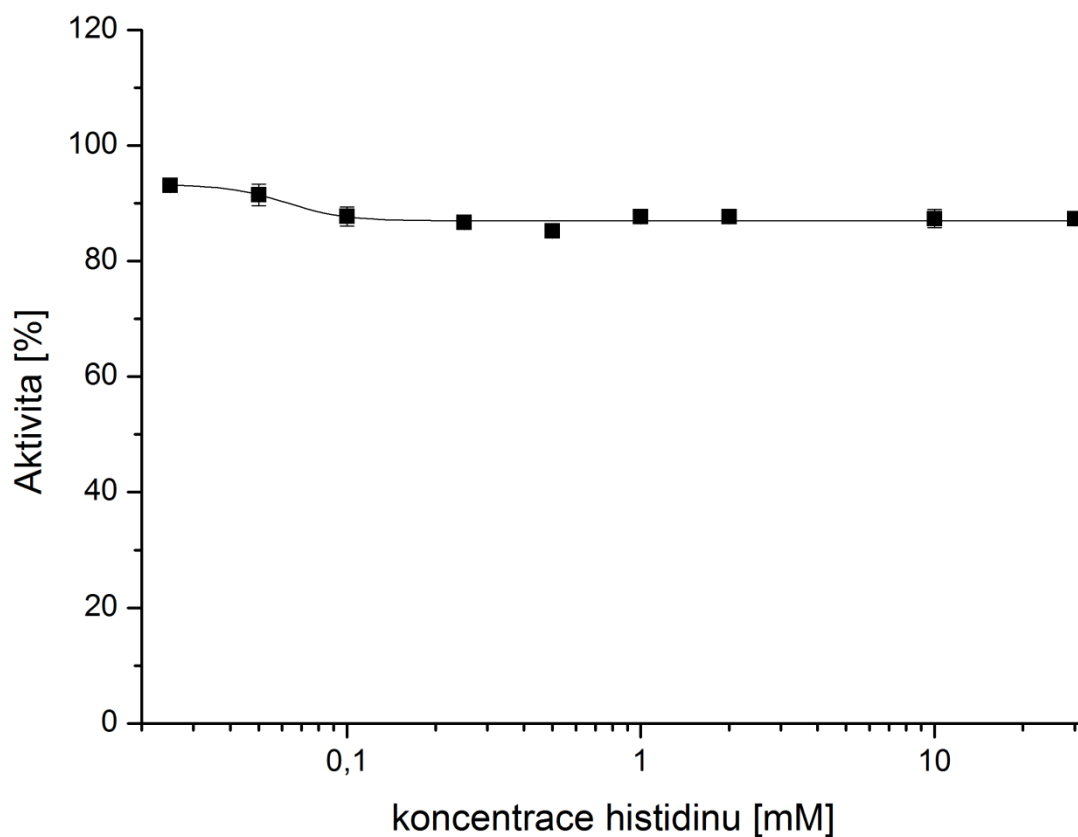


Obr.29: Koncentrační závislost aktivity Na^+/K^+ -ATPasy s aminokyselinou tryptofanem.

U této aminokyseliny bylo prokázán výsledek shodný z testem vlivu aminokyselin na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy. Hodnota IC_{50} je $(0,8 \pm 0,4)$ mM a hodnota Hillova koeficientu je $(1,3 \pm 0,8)$.

5.3.3 Koncentrační závislost Na^+/K^+ -ATPasy při interakci s histidinem

U této aminokyseliny také došlo k poklesu aktivity, i když ne tak výraznému jako u tryptofanu.

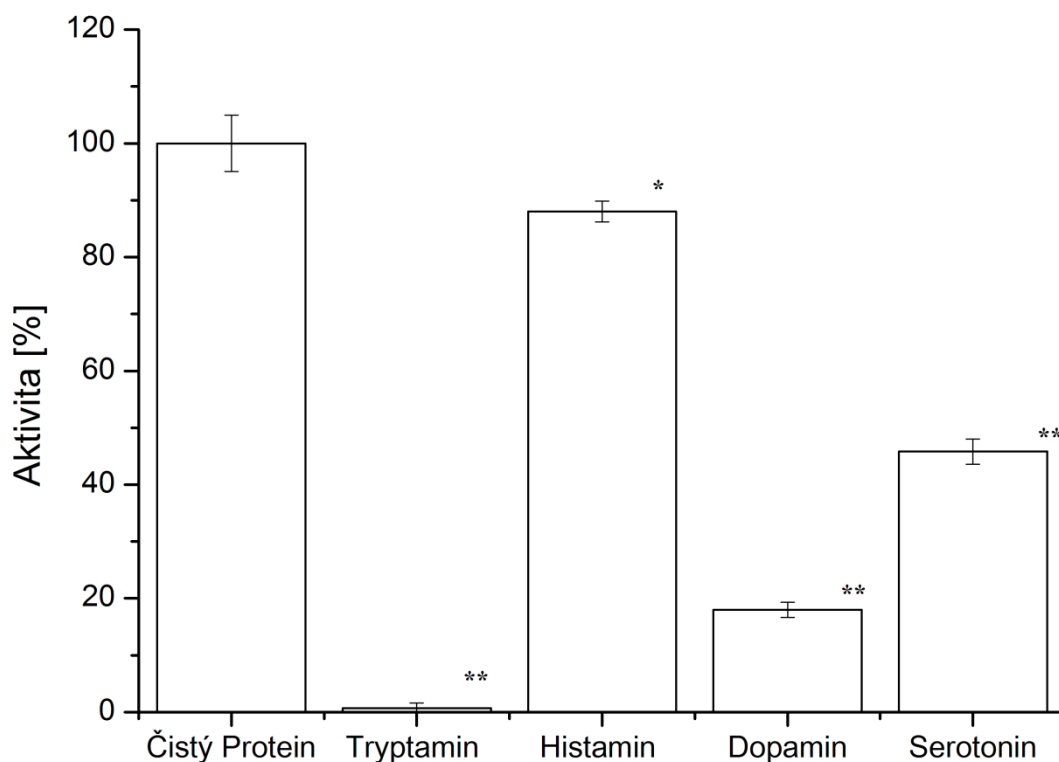


Obr.30: Koncentrační závislost aktivity Na^+/K^+ -ATPasy s aminokyselinou histidinem.

Tato aminokyselina měla podle testu vlivu na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy částečný vliv. Při měření koncentrační závislosti, ale nebyl prokázán výrazný vliv na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy, minimální hodnota aktivity byla $(87,0 \pm 0,4)$ % aktivity čistého proteinu. Hodnota IC_{50} je $(0,06 \pm 0,02)$ mM, hodnota Hillova koeficientu je (4 ± 4) .

5.4. Vliv metabolitů vybraných aminokyselin na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy

Metabolity aminokyselin, byly vybrány na základě vlivu na nervovou soustavu. Byly vybrány tyto metabolity - dopamin, tryptamin, serotonin a histamin. Jejich koncentrace byla 15 mM.



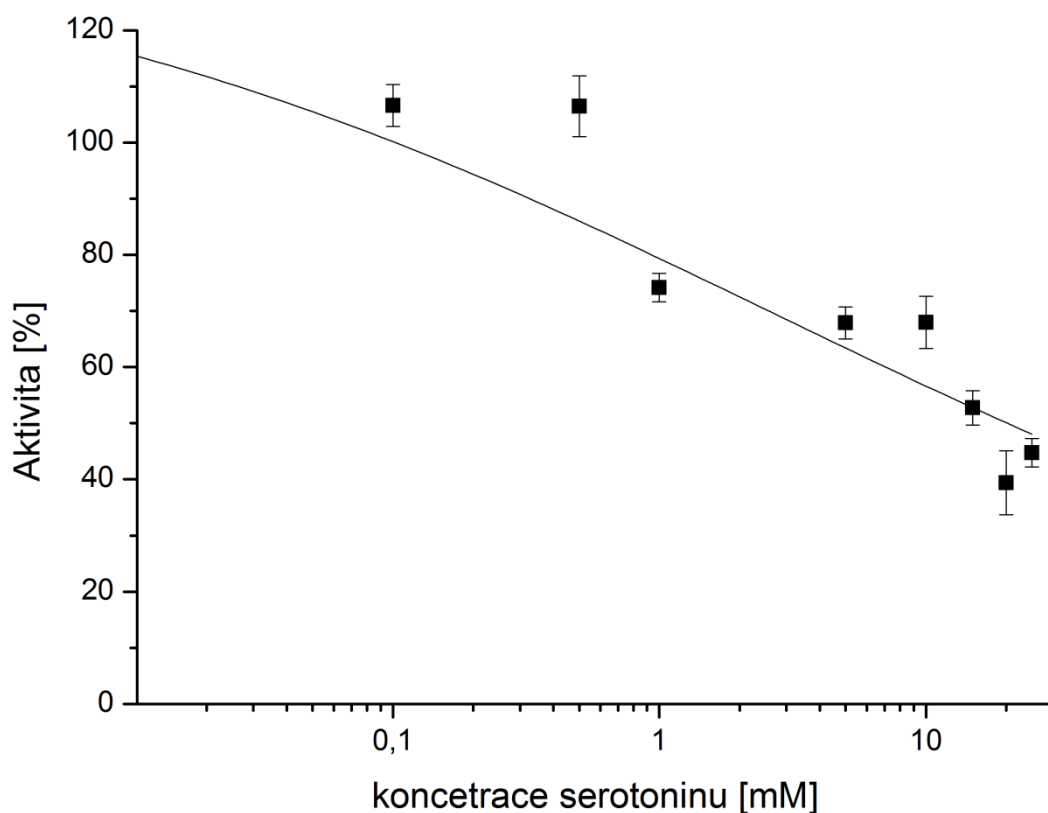
obr. 31: Vliv metabolitů na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy. * ($p < 0,05$) popř. ** ($p > 0,001$) je označuje hladinu statistické významnosti.

Hodnota aktivity Na^+/K^+ -ATPasy při interakci s tryptaminem je ($0,7 \pm 0,9$) %, při interakci s histaminem je (88 ± 2) %, při interakci s dopaminem je (18 ± 1) % při interakci se serotoninem (46 ± 2) %.

Podle testu vlivu na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy byly pro měření koncentrační závislosti vybrány -serotonin, tryptamin a dopamin.

5.4.1 Koncentrační závislost Na^+/K^+ -ATPasy při interakci se serotoninem

U serotoninu byl při koncentraci 15 mM prokázán vliv na aktivitu NKA, proto byla proměřena koncentrační závislost aktivity proteinu na zvyšující se koncentraci serotoninu.

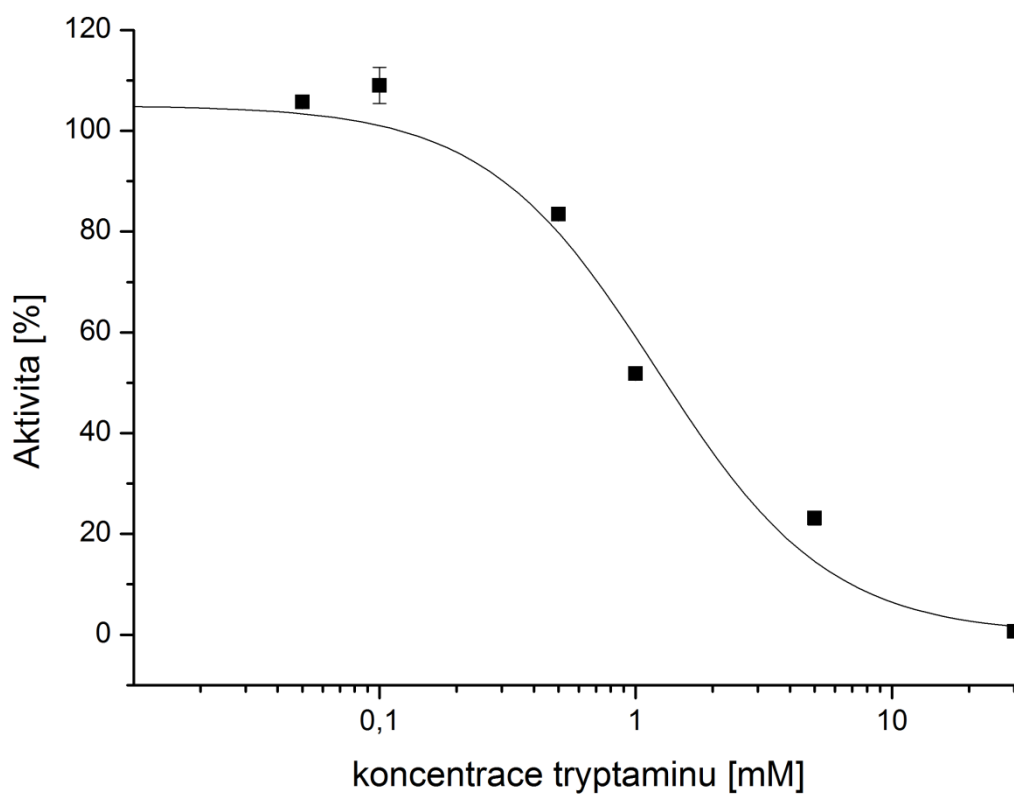


Obr.32: Koncentrační závislost aktivity Na^+/K^+ -ATPasy se serotoninem.

Nejnižší hodnota aktivity Na^+/K^+ -ATPasy je při koncentraci serotoninu 20 mM je (40 ± 6) % aktivity čistého proteinu, hodnota IC_{50} (3 ± 1) mM a hodnota Hillova koeficientu je (2 ± 1) .

5.4.2 Koncentrační závislost Na^+/K^+ -ATPasy při interakci s tryptaminem

U tryptaminu byla při koncentraci 15 mM naměřena nejnižší hodnota aktivity, proto byla proměřena koncentrační závislost aktivity proteinu na zvyšující se koncentraci tryptaminu.

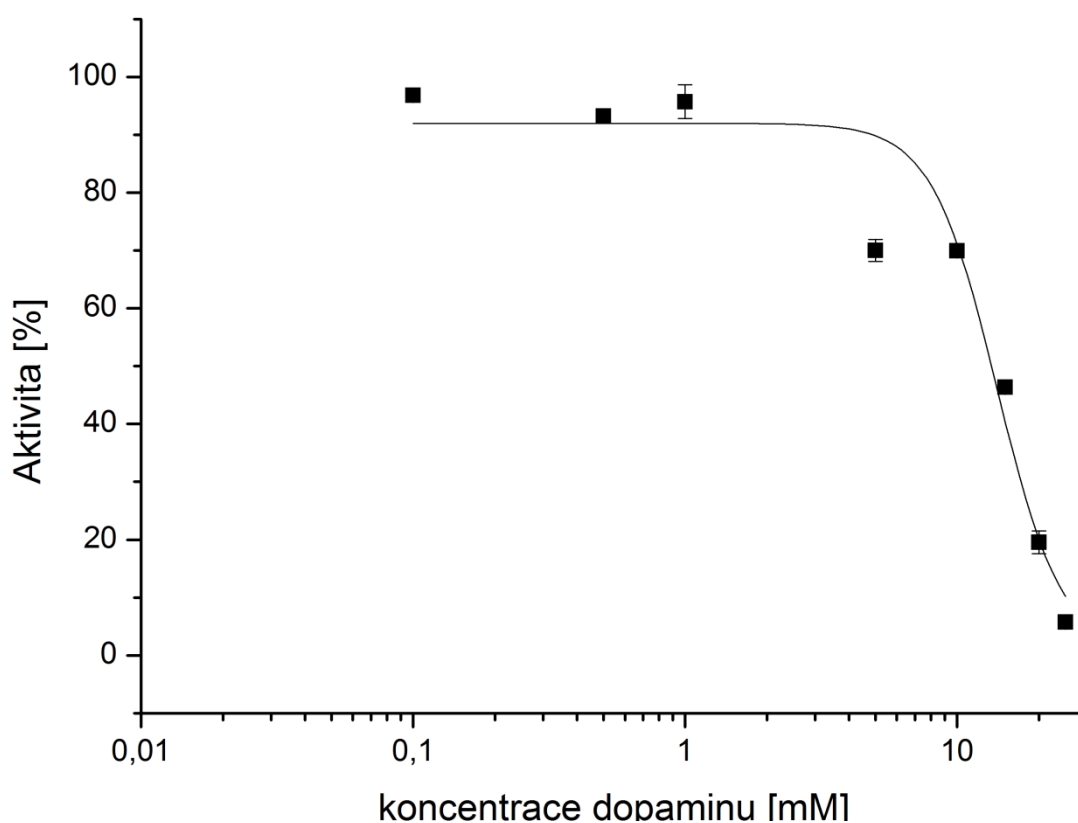


Obr.33: Koncentrační závislost aktivity Na^+/K^+ -ATPasy s tryptaminem.

Hodnota IC_{50} je $(1,2 \pm 0,2)$ mM, minimální hodnota aktivity je (11 ± 5) a hodnota Hillova koeficientu je $(1,3 \pm 0,2)$.

5.4.3 Koncentrační závislost Na^+/K^+ -ATPasy při interakci s dopaminem

U dopaminu o koncentraci 15 mM byl prokázán vliv na aktivitu NKA, proto byla proměřena koncentrační závislost aktivity proteinu na zvyšující se koncentraci dopaminu.



Obr.34: Koncentrační závislost aktivity Na^+/K^+ -ATPasy s dopaminem.

Hodnota IC_{50} je (14 ± 1) mM a hodnota Hillova koeficientu je (4 ± 1) .

6 Diskuze

Obr. 27 a tabulka 4 ukazuje vliv testovaných aminokyselin na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy. Hodnoty aktivity jsou zaznamenány v tabulce 4. Zjistili jsme, že na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy nemají vliv aminokyseliny - arginin, serin, treonin, kyselina asparagová, lyzin, prolin, tyrozin. Aminokyseliny cystein a tyrozin zvyšují aktivitu proteinu vyizolovaného z vepřových ledvin. Potvrdili jsme dřívější měření Tsakiris a kol. (2003), kdy inkubace NKA z cysteinem zvyšovala aktivitu proteinu. Z našich měření vyplynulo, že aktivitu NKA výrazně ovlivňuje pouze aminokyselina tryptofan, v menší míře také histidin a methionin.

Aminokyselina fenylalanin byla testována dále na základě vyhledaných informací z měření provedených dříve jinou laboratoří. Jak je vidět z obr. 28 tak aminokyselina fenylalanin v rozmezí koncentrací 0,11-0,9 mM zvyšuje aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy. Maximální hodnota aktivity proteinu dosahuje při koncentraci fenylalaninu 0,48 mM a její hodnota je $(213 \pm 3) \%$. Naše měření potvrdilo výsledky Tsakiris a kol. (1997), kdy aktivita Na^+/K^+ -ATPasy rostla v rozmezí koncentrací fenylalaninu 0,3-1,8 mM. Tento interval se kryje s intervalem, který i naše měření vymezilo. Rozmezí koncentrací fenylalaninu (0,3-1,8 mM) je v lidském organismu považováno za vysoké a je v prvních letech života nebezpečné.

Obr. 29 ukazuje závislost hodnoty aktivity Na^+/K^+ -ATPasy na koncentraci tryptofanu. Jak je vidět z grafu, dochází k poklesu aktivity proteinu přibližně na 20 % aktivity čistého proteinu. Podle Steppa a Novakoské (1997) nemá aminokyselina tryptofan vliv na aktivitu NKA. Z našeho měření, ale vyplývá, že dochází k částečné inhibici. Možnou příčinou rozdílu je, že při našem měření byla použita NKA vyizolovaná z vepřových ledvin, kdežto Stepp a Novakoská (1997) použili při měření NKA vyizolovanou z ledvin morčat.

Obr. 30 ukazuje závislost hodnoty aktivity proteinu na koncentraci histidinu. Hodnota aktivity u této aminokyseliny poklesla na hodnotu $(87 \pm 0,5) \%$ aktivity čistého proteinu. Podle Fodor a kol. vliv na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy spolu s histidinem má teplota. Jejich měření se soustředilo na termodynamické vlastnosti Na^+/K^+ -ATPasy při

interakci s histidinem. Na aktivitu proteinu má významný vliv teplota vyšší než 40 °C a doba inkubace při této teplotě. Při těchto podmínkách dojde k poklesu aktivity proteinu na 10 %. Při nízkých teplotách ale nepozorujeme změnu aktivity proteinu. Naše měření tedy potvrdilo, že při nízkých teplotách dochází k nevýraznému poklesu aktivity Na^+/K^+ -ATPasy.

Dále jsme se zabývali vlivem metabolitů aminokyselin na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy. Konkrétně nás zajímaly metabolity, které se podílejí na nervové činnosti organismu. Na obr. 31 je ukázána aktivita Na^+/K^+ -ATPasy při interakci s tryptaminem, histaminem, serotoninem a dopaminem. (obr.32-34)

Jak je vidět z obr. 31 tak histamin, což je metabolit aminokyseliny histidinu, má na aktivitu NKA jen velmi malý vliv. Naopak zbývající metabolity mají výrazný vliv na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy. Nejvíce aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy inhibuje tryptamin, což je metabolit aminokyseliny tryptofanu. Menší vliv na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy mají serotonin a dopamin.

Na obr. 32 je zachycena závislost zvyšující se koncentrace serotoninu, což je metabolit aminokyseliny tryptofanu, na aktivitě Na^+/K^+ -ATPasy. Jak je vidět z obr. 32 dochází k poklesu aktivity na 40 % aktivity čistého proteinu. Podle Steppa a Novakovské (1997) dochází k inhibici při koncentracích vyšších než 10 mM. Podle článku dochází k poloviční inhibici (IC_{50}) při koncentraci 0,98 mM. Námi zjištěná hodnota IC_{50} je 2,67 mM. Rozdíl může způsoben rozdílnou tkání použitou pro izolaci proteinu. V našem měření jsme použili NKA vyizolovanou z vepřových ledvin, kdežto v článku použili NKA z ledvin morčat.

Obr. 33 ukazuje závislost aktivity Na^+/K^+ -ATPasy na zvyšující se koncentraci tryptaminu, což je metabolit aminokyseliny tryptofanu. Jak vyplývá z obr. 31 tak tryptamin při koncentraci 30 mM prakticky inhibuje aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy. Při měření koncentrační závislosti dochází k částečné inhibici aktivity Na^+/K^+ -ATPasy při koncentraci 5 mM. Podle Steppa a Novakovské (1997) tryptamin, stejně jako serotonin, inhibuje při koncentracích vyšších než 10 mM. Hodnota IC_{50} podle Steppa a Novakovské (1997) je 2,7 mM. Námi zjištěná hodnota IC_{50} je $(1,2 \pm 0,2)$ mM.

Proměřením koncentračních závislostí tryptaminu a serotoninu jsme potvrdili závěry Steppa a Novakovské (1997), že tryptamin a serotonin jsou inhibitory Na^+/K^+ -ATPasy.

Obr. 34 ukazuje závislost aktivity Na^+/K^+ -ATPasy na zvyšující se koncentraci dopaminu. K částečné inhibici aktivity Na^+/K^+ -ATPasy dochází při koncentraci 25 mM, kdy aktivita proteinu poklesne na hodnotu $(5,7 \pm 0,9) \%$. Podle Bertorello a kol. (1990) dopamin inhibuje Na^+/K^+ -ATPasu při hodnotě 1 μM a hodnota IC_{50} je 10^{-9} M. Naše měření tyto hodnoty nepotvrdilo. Při našem měření docházelo k částečné inhibici při koncentracích vyšších než 25 mM. Rozpor může být opět způsoben použitím Na^+/K^+ -ATPasy izolované z různých živočichů. V našem měření byla použita Na^+/K^+ -ATPasa vyizolované z vepřových ledvin, kdežto v článku byla použita Na^+/K^+ -ATPasa vyizolovaná z nervových buněk morčat.

7 Závěr

Hlavním cílem práce, bylo zjistit, zda vybrané aminokyseliny a jejich metabolity mají vliv na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy.

Aminokyseliny jsou pro živé organismy nepostradatelné. Jsou základními strukturními jednotkami proteinů, v organismu se aminokyseliny mohou vyskytovat i volně. Aminokyseliny také slouží pro syntézu dalších látek nejenom proteinů. Příkladem takovýchto látek mohou být neuromediátory nebo různé hormony.

Pomocí experimentů bylo zjištěno, některé aminokyseliny mají vliv na aktivitu Na^+/K^+ -ATPasy. Aminokyselina fenylalanin v intervalu 0,11-0,9 mM zvyšuje aktivitu proteinu. Naopak aminokyselina tryptofan snižuje aktivitu proteinu. Aminokyselina histidin má na aktivitu proteinu vliv při nízkých teplotách jen malý vliv. Její vliv se projevuje při vyšších teplotách.

Z metabolitů aminokyselin má na aktivitu proteinu výrazný vliv tryptamin, serotonin a dopamin. Tyto látky byly již dříve popsány jako inhibitory Na^+/K^+ -ATPasy.

8 Seznam literatury

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Walter P. (1998) Základy buněčné biologie. EspPero publishing, Ústí nad Labem, 371-406

Baginski E. S., Foa P. P., Zak B. (1967). Determination of phosphate: Study of labile organic phosphate interference. Clinica Chimica Acta. 15, 155-158

Banik U., Roy S. (1990) A continuous fluorimetric assay for ATPase activity. Biochemical Journal 266(2), 4-611

Bertorello A. M., Hopfield J.F., Aperia A., Greengard P. (1990) Inhibition by dopamine of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ activity in neostriatal neurons through D_1 and D_2 dopamine receptor synergism. Nature 347, 386-388

Bossuyt J., Despa S., Martin J.L., Bers D.M. (2006) Phospholeman phosphorylation alter its fluorescence resonance energy with the Na/K-ATPase pump. Journal of Biological Chemistry 281(43), 32765-32773

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254

Cariani L., Thomas L., Brito , del Castillo J.R. (2004) Bismuth citrate in quantification of inorganic phosphate and utility in determination of membrane-bound phosphatases. Analytical Biochemistry 324, 79-83

Fofor R., Fedosova N.U., Ferencz C., Marsch D., Pali T., Esmann M. (2008) Stabilization of Na,K- ATPase by ionic interactions. Biochimica et Biophysica Acta 1778, 835-543

Garty H., Karlish S.J.D. (2006) Role of FXYD Proteins in Ion Transport. Annual Revue of Physiology 68, 431-459

Geering K. (2005) Function of FXYD proteins, regulators of Na,K- ATPase. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 6, 387-392

Geering K. (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 17, 526–532

Glynn I.M. (1993) All Hands to Sodium Pump. *Journal of Physiology* 462, 1-30

Glynn I.M. (2002) A hundred years of sodium pumping. *Annual Review of Physiology* 64, 1-18

Grycova L., Sklenovsky P., Lansky Z., Janovska M., Otyepka M., Amler E., Teisinger, Kubala M. (2009) ATP and magnesium drive conformational changes of the Na⁺/K⁺-ATPase cytoplasmatic headpiece. *Biochemica et Biophysica Acta* 1788, 1081-1091

Havlíková M., Huličiak M., Bazgier V., Berka K., Kubala M. (2013) Fluorone dyes have binding sites on both cytoplasmic and extracellular domains of Na,K-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828, 568-576

Holeček M. (2006) *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Grada Publishing 2006

Kanai R., Ogawwa H., Vilsen B., Cornelius F., Toyoshima Ch. (2013) Crystal structure of a Na⁺ bound Na⁺/K⁺-ATPase preceding the E1P state. *Nature* 507, 201-207

Kaplan J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry* 71, 511-535

Kittnar O a kol. (2011) *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing

Klodos I., Esmann M., Post R. L. (2002) Large-scale preparation of sodium-potassium APase from kidney outer medulla. *Kidney International* 62, 2097-2100

Köksoy A.A. (2002) Na⁺,K⁺-ATPase: Review. *Journal of Ankara Medical School* 24, 73-82

Kubala M., Plášek J., Amler E. (2003) Limitations in linearized analyses of binding equilibria: binding of TNP-ATP to the H4-H5 loop of Na / K-ATPase. *European Biophysics Journal*, 363-369

Lakowicz J.R. (1999) *Principles of fluoresce spectroscopy*, 2nd ed., Plenum Press, New York; 67

Mishra N.K., Peleg Y, Cirri E., Belogus T., Lifscitz Y., Voelker D.R., Apell H. J., Garty H., Karlsh S.J.D. (2011) FXYD Proteins Stabilize Na,K- ATPase: Amplification of Specific Phosphatidylserine-Protein Interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 9699-9712

Moller J.V, Juul B., le Maire M. (1996) Structural organization, ion transport and energy transduction of P-type ATPases. *Biochemica et Biophysica Acta* 1286, 1-51

Morth J.P., Pedersen B.P., Toustrup-Jensen M.S., Sorensen T. L-M., Petersen J., Andersen J.P., Vilsen B., Nielsen P. (2007) Crystal structure of the sodium - potassium pump. *Nature Reviews* 13, 1043-1049

Morth J.P., Pedersen B.P., Buch -Pedersen M..J, Andersen J.P., Vilsen B., Pamgren M.G., Nielsen P. (2011) A structural overview of plasma membrane Na^+/K^+ - ATPase and H^+ - ATPase ion pump. *Nature Reviews*; 60-70

Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na^+,K^+ -ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A* 106(33), 7-13742

Post R.L, Hegyvary C., Kume S. (1972) Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 6530-6540

Sarkar P.K. (2002) A Quick Assay for Na^+ , K^+ -ATPase Specific Activity. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 57c., 562-564

Stepp L.R., Novakoski M.A. (1997) Effect of 5-Hydroxytryptamin on Sodium-and Potassium -Dependent Adenosine Triphosphatase and Its reactivity toward Ouabain. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 337, 43-53

Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyoshima C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* 459(7245), 50-446

Schulpis K.H., Karantana A.G., Papaconstantinou E.D., Partimos T., Tjamouranis I., Tsakiris S. (2006) Erythrocyte membrane Na,K-ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities in subject with methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)677 C→T genotype and

moderate hyperhomocysteinemia. The role of L-phenylalanin and L-alanine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 44(4), 423-427

Skou J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica Biophysica Acta* 23(2), 394-401

Sweadner K. J., Rael E. (2000) The FXYD Gene Family of Small Ion Transport Regulators or Channels: cDNA Sequence, Protein Signature Sequence, and Expression. *Genomics* 68, 41-56

Tsakiris S., Kouniniotou-Krontiri P., Schulpis K.H., Stavridis J.C. (1998) L-Phenylalanine Effect on Rat Brain Acetylcholinesterase and Na^+ , K^+ -ATPase. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 58c., 163-167

Tsakiris S., Schulpis K.H., Marinou K., Behrakis P. (2003) Protective effect of L-cystein and glutathione on the modulated suckling rat brain Na^+ , K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities induced by the in vitro galactosaemia. *Pharmacological Research* 49, 475-479

Toyoshima Ch., Kanai R., Cornelius F. (2011) First crystal structure of Na^+/K^+ -ATPase: New light on the oldest ion pump. *Structure* 19, 1732-1738

Vedovato N., Gadsby D.C. (2014) Route, mechanism, and implications of proton import during Na^+/K^+ exchange by native Na^+/K^+ -ATPase pumps. *The Journal of General Physiology* 143, 449-464

Databáze

Drugbank: www.drugbank.com

PDB: www.rcsb.org

Pubchem: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>