

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Měření aktivity enzymů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-ToF

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Jan Strnad</b>
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.</b>
Rok:	2023

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

### **Poděkování**

Velmi děkuji svému školiteli prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za odborné vedení, vstřícný přístup, cenné rady, ochotu zodpovídat mnohé dotazy, trpělivost a čas, který mi věnoval.

Chtěl bych také poděkovat všem, kdo poskytli materiál pro provedení experimentů provedených v rámci této práce.

Dále bych chtěl poděkovat také své rodině za nenahaditelnou podporu v průběhu celého studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jan Strnad
Název práce	Měření aktivity enzymů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-ToF
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2023

### Abstrakt

Cu-dependentní aminoxidas jsou enzymy, jež se účastní mnoha důležitých biologických procesů, mezi něž patří například regulace buněčného růstu, dělení, programované buněčné smrti a odezvy na stresory v prostředí. Přírodními substráty jsou např. putrescin, kadaverin a spermidin. Aktivita aminoxidas je obvykle měřena spektrofotometrickými, radiometrickými, elektrochemickými či fluorimetrickými metodami. Cílem této práce bylo vytvořit metodu měření aktivity pomocí MALDI ToF hmotnostní spektrometrie na základě signálů substrátu a produktu naměřených se vzorky reakční směsi. Pro tento účel byla použita aminoxidasa purifikovaná ze semenáčků hrachu setého (*Pisum sativum*). Pomocí metody, jež využívala  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicovou kyselinu s přídavkem cetrimoniumbromidu jako matrici, byly určeny kinetické parametry  $k_{cat}$  a  $K_m$  pro oxidační deaminaci vybraných substrátů, a to na základě závislosti poměrů intenzit signálů produktu a substrátu na koncentraci substrátu. Výsledky byly porovnány s paralelním měřením pomocí spektrofotometrické metody využívající spřažené reakce s křenovou peroxidasou a guajakolem a diskutovány s použitím údajů z literatury a databáze BRENDA. Bylo zjištěno, že metoda poskytuje výsledky přesné, jež však nemusí být správné. Hodnoty  $K_m$  řádově souhlasily se spodními hranicemi rozsahů uváděných v literatuře, oproti srovnávacímu spektrofotometrickému měření byly nižší. Byl navržen postup zdokonalení metody. Mezi výhody metody patří nízká spotřeba vzorku a náklady na spotřební materiál a to, že na rozdíl od metod používajících MALDI ToF malých molekul bez využití cetrimoniumbromidu nevyžaduje specifický poměr matrice a analytu. Mezi nevýhody patří to, že metoda je založena na relativní kvantifikaci a že může poskytovat horší výsledky při vysokých koncentracích substrátu.

Klíčová slova	MALDI ToF, enzymová aktivita, aminoxidasa, <i>Pisum Sativum</i> , měření aktivity
Počet stran	107
Počet příloh	3
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and Bc. Jan Strnad  
surname

Title Measuring enzyme activity using MALDI-TOF mass spectrometry

Type of thesis Diploma

Department Department of biochemistry

Supervisor prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.

The year of presentation 2023

### Abstract

Cu-dependent amine oxidases are enzymes, that are part of many fundamental biological processes, among which belong for example regulation of cell growth, division, programmed cell death and of reactions to environmental stressors. Examples of natural substrates are putrescine, cadaverine and spermidine. Activity is usually measured using spectrophotometric, radiometric, electrochemical or fluorimetric methods. The aim of this thesis was to create a method of activity measurement using MALDI ToF mass spectrometry based on signals of substrate and product measured with samples of reaction mixture. For this purpose was used amine oxidase purified from garden pea (*Pisum sativum*) seedlings. Using a method, that utilizes  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid with added cetrimonium bromide as matrix, kinetic parameters  $k_{cat}$  a  $K_m$  were measured for oxidative deamination of selected substrates, based on the dependence of ratio of intensities of signals of product and of product plus substrate on substrate concentration. Results were compared with parallel measurement using spectrophotometric method utilizing coupled reaction with horseradish peroxidase and guaiacol and discussed with data from literature and BRENDA database. The tested method provides data, that are precise, but may not be accurate. The order of measured  $K_m$  values was on par with lower ends of ranges found in literature. Values were lower than those measured using spectrophotometric method. Improvement of method was suggested. Advantages of this method include low sample amount requirements, low cost of consumables and compared to methods using MALDI ToF of small molecules without the use of cetrimonium bromide no specific matrix to analyte ratio requirements. Disadvantages include, that the method is based on relative quantification and may produce skewed results at high substrate concentrations.

Keywords MALDI ToF, enzyme activity, amine oxidase, *Pisum Sativum*, measurement of activity

Number of pages 107

Number of appendices 3

Language Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Aminoxidasy</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Výskyt .....	4
2.1.2	EC klasifikace .....	5
2.1.3	Cu/chinon dependentní aminoxidasy .....	6
2.1.3.1	Obecné vlastnosti, celková struktura.....	6
2.1.3.2	Struktura aktivního místa, mechanismus katalýzy .....	7
2.1.3.3	Substráty, substrátová specifita .....	12
2.1.3.4	Inhibice.....	12
2.1.4	Jiné typy aminoxidas.....	15
2.1.4.1	Flavinové aminoxidasy .....	15
2.1.4.2	„multicopper“ oxidasy .....	15
2.1.5	Biologické role aminoxidas.....	16
2.1.5.1	Rostliny .....	16
2.1.5.2	Živočišné, člověk .....	17
2.1.5.3	Prokaryota .....	19
2.1.5.4	Houby, kvasinky .....	19
2.1.6	Technologické a farmaceutické využití, praktický význam.....	19
<b>2.2</b>	<b>Metody kvantifikace aminoxidas</b> .....	<b>21</b>
2.2.1	Založené na měření enzymové aktivity.....	21
2.2.1.1	Spektrofotometrické .....	21
2.2.1.2	Manometrické .....	24
2.2.1.3	Elektrochemické.....	24
2.2.1.4	Radiometrické .....	25
2.2.1.5	Fluorometrické .....	26
2.2.1.6	Bioluminiscenční .....	26
2.2.1.7	Hmotnostní spektrometrie.....	27
2.2.2	Založené na měření jiných parametrů než aktivity enzymu.....	27
<b>2.3</b>	<b>Příprava Cu dependentních aminoxidas</b> .....	<b>27</b>
2.3.1	Zdroje aminoxidas.....	27
2.3.2	Extrakce a purifikace.....	28
2.3.2.1	Z rostlinných zdrojů .....	28
2.3.2.2	Z živočišných zdrojů .....	29
2.3.2.3	Z bakteriálních zdrojů .....	30
2.3.2.4	Z houbových zdrojů .....	30
2.3.3	Příprava rekombinantních CuAO.....	31
<b>2.4</b>	<b>Měření enzymové aktivity pomocí hmotnostní spektrometrie</b> .....	<b>31</b>
2.4.1	Ionizační techniky a analyzátory pro měření enzymové aktivity.....	31
2.4.1.1	Použití MALDI ToF pro měření enzymové aktivity.....	32
2.4.1.2	NIMS („Nanostructure initiator mass spectrometry“ ).....	33
2.4.1.3	„MS imaging“ .....	34
<b>2.5</b>	<b>MALDI MS malých molekul</b> .....	<b>34</b>
2.5.1	přímé měření s běžnými matricemi.....	34
2.5.2	matrice pro měření malých molekul .....	35
2.5.3	derivatizace analytu.....	35
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>37</b>
3.1.1	Chemikálie .....	37

3.1.2	Přístroje a pomůcky.....	39
3.1.3	Biologický materiál .....	40
<b>3.2</b>	<b>Metody .....</b>	<b>41</b>
3.2.1	Extrakce a purifikace PSAO .....	41
3.2.1.1	Měření aktivity pomocí spřažené peroxidasové reakce .....	42
3.2.1.2	Měření obsahu proteinu Bradfordovou metodou .....	43
3.2.1.3	Ověření čistoty enzymu pomocí SDS-PAGE .....	43
3.2.1.4	Ověření identity pomocí peptidového mapování .....	44
3.2.2	Měření kinetických parametrů pomocí spřažené peroxidasové reakce.....	45
3.2.3	Ověření proveditelnosti detekce pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI ToF .....	46
3.2.3.1	Výběr vhodného pufru .....	46
3.2.3.2	Optimalizace detekce pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI ToF . .....	46
3.2.3.3	Měření kinetických parametrů pomocí MALDI ToF MS.....	48
3.2.4	Měření s reaktivní maticí DMNTH .....	50
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Extrakce a purifikace PSAO.....</b>	<b>51</b>
4.1.1	Ověření čistoty pomocí SDS-PAGE .....	53
4.1.1.1	Určení identity pásů pomocí peptidového mapování .....	54
<b>4.2</b>	<b>Měření kinetických parametrů pomocí spřažené peroxidasové reakce.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3</b>	<b>Ověření proveditelnosti detekce pomocí MALDI ToF a její optimalizace ....</b> .....	<b>58</b>
<b>4.4</b>	<b>Měření kinetických parametrů pomocí MALDI ToF MS.....</b>	<b>65</b>
4.4.1	Ukázka detailů postupu vyhodnocení .....	74
4.4.2	Měření kinetických parametrů pomocí MALDI ToF MS s korekcí na odlišnou míru ionizace substrátu a produktu .....	78
4.4.3	Měření s reaktivní maticí DMNTH .....	79
<b>5</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>103</b>
<b>9.1</b>	<b>Příloha 1 – Návod na přípravu Bradfordova činidla.....</b>	<b>103</b>
<b>9.2</b>	<b>Příloha 2 – Data získaná pomocí spektrofotometrického měření .....</b>	<b>104</b>
<b>9.3</b>	<b>Příloha 3 - Data získaná pomocí MALDI ToF hmotnostní spektrometrie....</b> .....	<b>106</b>

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část:**

- Zpracování literární rešerše na téma měření enzymové aktivity pomocí hmotnostní spektrometrie s důrazem na MALDI-ToF MS, použití MALDI ToF MS pro analýzu malých molekul, extrakce a izolace patřičných enzymů, zkoumaných v experimentální části, z biologického materiálu a biologické funkce těchto enzymů

### **Experimentální část:**

- Výběr vhodných zkoumaných enzymů na základě možnosti měřit hmotnostní spektra jejich substrátů a produktů
- Extrakce těchto enzymů z vhodného biologického materiálu
- Vytvoření metody měření aktivity těchto enzymů pomocí MALDI-ToF MS na základě změn poměru intenzit signálu substrátu a produktu
- Porovnání této metody s běžně používanými metodami.



## 1 ÚVOD

Aminoxidasy jsou enzymy katalyzujících oxidaci aminů za spotřeby kyslíku a vzniku odpovídajícího aldehydu, peroxidu vodíku a amoniaku. Dle přítomného kofaktoru je lze rozdělit na Cu-dependentní, obsahující jako kofaktor ionty mědi a topachinon, a FAD-dependentní, dále dělené na monoaminoxidasy a polyaminoxidasy. Jde obecně o enzymy se širokými substrátovými specifitami, které se společně s biologickými rolemi různých aminoxidas mohou překrývat (Medda *et al.*, 1995; Gong & Boor, 2006; Cona *et al.*, 2006; Cuzzocrea & Masini, 2008; Tavladoraki *et al.*, 2016). Tyto enzymy se vyskytují v mnoha různých skupinách organismů, kde se účastní metabolismu biogenních aminů, čímž mohou plnit různé funkce v rámci organismu jako celku. Ve vyšších organismech se substráty a produkty aminoxidas zapojují do regulace proliferace buněk, regulace a indukce programované buněčné smrti a tím vývoje organismu (Toninello *et al.*, 2005; Cona *et al.*, 2006; Agostinelli *et al.*, 2009; Tavladoraki *et al.*, 2016). Dále se ve vyšších organismech účastní obranných reakcí při poškození tkáně, abiotickém stresu a napadení patogeny (Nocera *et al.*, 2002; Cuzzocrea & Masini, 2008; Fraudentali *et al.*, 2021), a to v případě rostlin změn fenotypu a produkce pro patogeny toxických látek, ať již přímo, nebo v rámci počátku biosyntézy některých sekundárních metabolitů (Cona *et al.*, 2006; Fraudentali *et al.*, 2021). V případě živočichů se opět účastní produkce látek toxických pro patogeny, či jimi napadené buňky, popř. buňky rakovinné (Nocera *et al.*, 2002; Toninello *et al.*, 2005; Agostinelli *et al.*, 2009), regulace zánětlivých procesů (degradací i tvorbou signálních molekul) (Nocera *et al.*, 2002; Cuzzocrea & Masini, 2008; Boyer *et al.*, 2021), regulace metabolismu (Carpéné *et al.*, 2005) a metabolismu léčiv a látek přijatých z vnějšího prostředí (Gong & Boor, 2006). Monoaminoxidasy se účastní degradace některých neurotransmitterů, čímž zajišťují správnou funkci nervové soustavy při adekvátní míře aktivity (Seiler 2000; Gong & Boor 2006; Klema & Wilmot 2012; Manzoor & Hoda, 2020). Tyto rozmanité funkce však všechny vyžadují míru aktivity pro dané podmínky a narušení rovnováhy může vést k různým efektům nepříznivým pro organismus. Může dojít k rozvoji zánětu a poškození tkáně (Ekblom, 1998; Cuzzocrea & Masini, 2008; Boyer *et al.*, 2021) či nadměrné proliferaci buněk a rakovinnému bujení (Nocera *et al.*, 2002; Toninello *et al.*, 2005) při nadměrné aktivitě. Naopak při nedostatečné aktivitě hrozí omezená likvidace defektních buněk (Toninello *et al.*, 2005; Agostinelli *et al.*, 2009), zpomalení degradace zánětlivých mediátorů (Nocera *et al.*, 2002; Cuzzocrea & Masini, 2008) a toxických látek (Gong & Boor, 2006). V případě mikroorganismů jde o enzymy indukovatelné přítomností substrátu zajišťující jeho využitelnost jako zdroje

uhlíku či dusíku (Frébert & Adachi, 1995; Suzzi & Gardini, 2003; Klema & Wilmot, 2012).

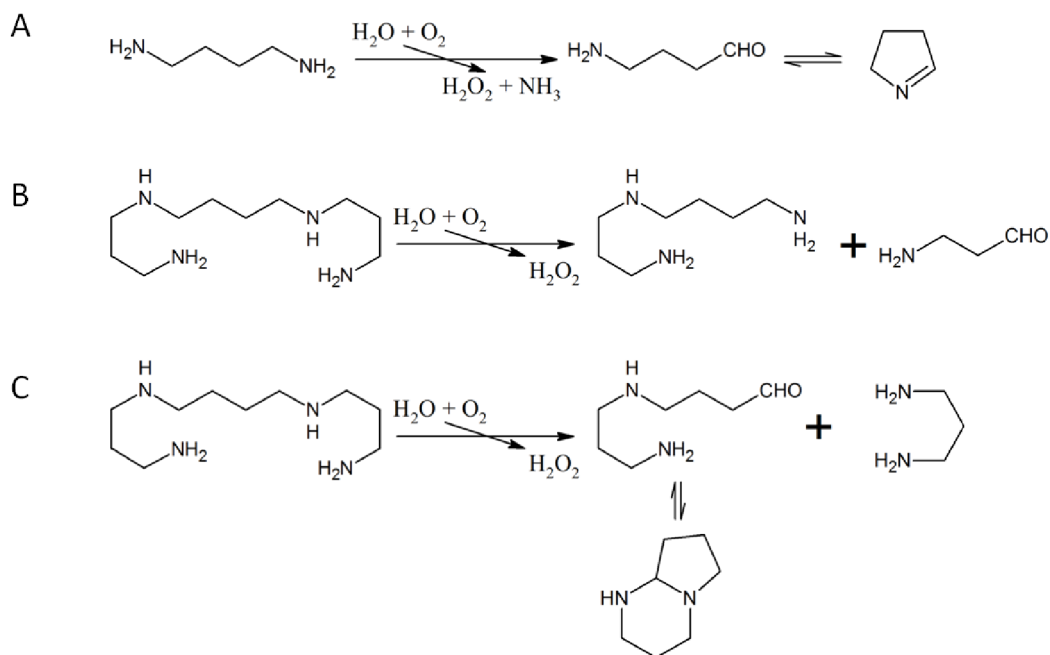
Rozmanité role těchto enzymů mohou vést k různým potenciálním praktickým využitím ve farmakologii, ať již jde o využití enzymů samotných (Toninello *et al.*, 2005; Cuzzocrea & Masini, 2008), jejich substrátů (Carpéné *et al.*, 2005), produktů (Agostinelli *et al.*, 2009) nebo inhibitorů (viz str. 19) (Ekblom, 1998; Manzoor & Hoda, 2020; Boyer *et al.*, 2021). Dále mají tyto enzymy potenciál pro využití jako biokatalyzátory chemickém průmyslu (viz str. 20) (Wahart *et al.*, 2021) a mikroorganismy tyto enzymy produkující (popř. dle Li & Lu, 2020 i enzymy samotné) jsou využitelné v potravinářství pro snížení produkce biogenních aminů v rámci výroby fermentovaných masných a mléčných výrobků (Suzzi & Gardini, 2003; Li & Lu, 2020).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Aminoxidasy

Aminoxidasy katalyzují reakci, do níž vstupuje amin vhodný vzhledem k substrátové specificitě daného enzymu, molekulární kyslík a voda. Produkty reakce jsou odpovídající aldehyd, peroxid vodíku a v případě oxidace primární aminoskupiny amoniak. Dle rovnice:  $RCH_2NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow RCHO + H_2O_2 + NH_3$  (Frébort & Adachi, 1995; Medda *et al.*, 1995; Cona *et al.*, 2006; Tavladoraki *et al.*, 2016)

V případě oxidace di- a polyaminů Cu-dependentními aminoxidasami (dále CuAO, oxidují koncové aminoskupiny) dochází buď k oxidaci pouze jedné aminoskupiny (např. pro putrescin, kadaverin a spermidin) a k následné spontánní cyklizaci aminoaldehydu za uvolnění vody (viz Obr. 1 A), nebo v případě sperminu ke vzniku dialdehydu, jež může reagovat s neoxidovaným sperminem nebo aldolovou kondenzací s jinými molekulami vzniklého dialdehydu za vzniku polymeru (Medda *et al.*, 1995). FAD dependentní polyaminoxidasy oxidují polyaminy v místech sekundárních aminoskupin buď „z vnější strany“ za vzniku aminů s kratšími řetězci a aldehydů v případě živočišných enzymů (i v případě některých rostlinných enzymů dle Tavladoraki *et al.*, 2006 a Moschou *et al.*, 2008), např. přeměna sperminu na spermidin, (viz Obr. 1 B), nebo v případě bakteriálních a rostlinných enzymů „z vnitřní strany“ za vzniku produktů tomuto štěpení odpovídajících (např. viz Obr. 1 C) (Šebela *et al.*, 2001; Cona *et al.*, 2006).



Obr. 1: Schémata oxidace vybraných substrátů některými aminoxidasami. A, oxidace putrescinu diaminoxidasou (EC 1.4.3.22) za vzniku aldehydu a jeho následné cyklizace (dle Medda *et al.*, 1995; Cona *et al.*, 2006), B, přeměna sperminu na spermidin za odštěpení 3-aminopropanalu živočišnou polyaminoxidasou (EC 1.5.3.17) (Šebela *et al.*, 2001; Cona *et al.*, 2006), C, rozklad sperminu rostlinnou či bakteriální polyaminoxidasou (EC 1.5.3.14) za vzniku propan-1,3-diaminu (Šebela *et al.*, 2001; Cona *et al.*, 2006); Všechna schémata pro jednotnost převedena do neutrálního zápisu.

### 2.1.1 Výskyt

Aminoxidasy se přirozeně vyskytují v některých jednobuněčných organismech (Frébort & Adachi, 1995; Li & Lu, 2020) a v tkáních rostlin a živočichů. U živočichů se vyskytují zejména v séru, cytoplasmatických membránách buněk stěny cév, v rychle proliferujících tkáních a v tkáních s probíhajícími zánětlivými procesy (Cuzzocrea & Masini, 2008). Monoaminoxidasy se vyskytují v mitochondriích buněk, ve vyšších množstvích v nervové soustavě (Manzoor & Hoda, 2020). V mnohobuněčných vláknitých houbách se aminoxidasy vyskytují ve velkých množstvích (McGrath *et al.*, 2011). Co se rostlin týče, vyskytují se zejména v rostoucích tkáních, jako jsou klíčící semena a stonky mladých rostlin (Petřivalský *et al.*, 2007), v meristémech (Roach *et al.*, 2015) a v místech intenzivního tloustnutí buněčných stěn, jako například v buňkách cévních svazků (Laurenzi *et al.*, 2001). V etiolovaných semenáčcích je aktivita několikanásobně vyšší než v případě rostlin pěstovaných na světle (Petřivalský *et al.*, 2007), což je v této práci využito při použití etiolovaných semenáčků hrachu jako zdroje enzymu pro experimentální část.

## 2.1.2 EC klasifikace

V Tab. 1 je uveden výčet hlavních skupin aminooxidas dle konvencí EC klasifikace (enzyme commmission number). Třídy enzymů jsou uvedeny dále v úsecích textu pojednávajících o jejich vlastnostech.

Tab. 1: Výčet hlavních skupin aminooxidas dle konvencí EC klasifikace; Obsahuje odkazy na strany této práce se zmínkami daného enzymu; Výběr z: <https://enzyme.expasy.org/cgi-bin/enzyme/enzyme-search-de> , dotazy „amine oxidase“ a „lysyl oxidase“, a zápisy ke konkrétním uvedeným třídám, příklady substrátů vybrány ze zápisů ke konkrétním uvedeným třídám v <https://www.brenda-enzymes.org/>

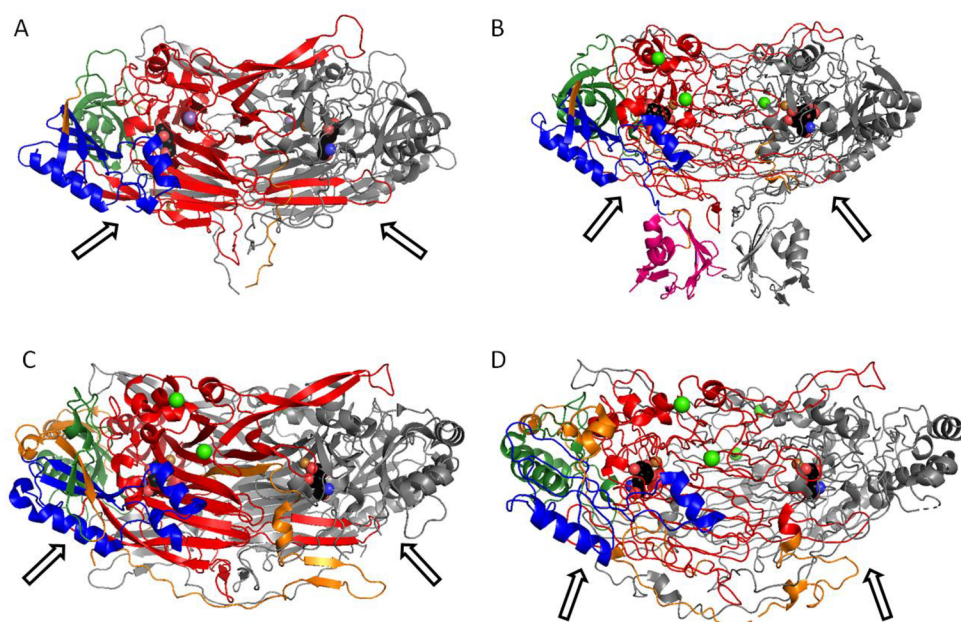
	Popis	Příklady substrátů	Zmínky
<b>Cu dependentní</b>			
EC 1.4.3.21 oxidasa primárních aminů	aminooxidas se substrátovou specifičností spíše pro primární monoaminy	benzylamin methylamin fenylethylamin	str. 6, 12, 17 a 20
EC 1.4.3.22 diaminooxidasa	aminooxidas se substrátovou specifičností spíše pro diaminy a polyaminy, oxidují i některé monoaminy (ND*); používána v praktické části této práce.	putrescin kadaverin histamin spermidin benzylamin (ND*) tyramin (ND*)	Hlavní náplň teoretické části
EC 1.4.3.13 lysoxidasa	katalyzuje oxidaci lysinu a 5- hydroxylysinu v proteinech	lysin 5-hydroxylysin	str. 18
<b>Flavinové</b>			
EC 1.4.3.4 monoaminooxidasa	katalyzuje oxidaci primárních aminů i některých sekundárních a terciárních	benzylamin serotonin tryptamin histamin	str. 15, 18 a 19
EC 1.5.3.13 N(1)- acetylpolyaminooxidasa	katalyzuje oxidaci N(1)-acetylderivátů polyaminů za vzniku 3- acetamidopropanalu	N(1)-acetylspermin	
EC 1.5.3.14 polyaminooxidasa, propan-1,3-diamin tvořící	katalyzuje oxidaci polyaminů za vzniku propan-1,3-diaminu	spermin spermidin	str. 4 a 22
EC 1.5.3.17 polyaminooxidasa, nespecifická	katalyzuje oxidaci polyaminů za odštěpení 3-aminopropanalu a N(1)- acetylpolyaminů za vzniku 3- acetamidopropanalu	spermin spermidin např. N(1)- acetylspermin	str. 4

\*ND značí substrát, který je enzymem oxidován, ale nepatří mezi jeho obvyklé substráty a je špatným substrátem

## 2.1.3 Cu/chinon dependentní aminoxidasy

### 2.1.3.1 Obecné vlastnosti, celková struktura

Aminoxidasy obsahující měď a topachinon (EC 1.4.3.21 a 1.4.3.22, ve starších zdrojích společně jako EC 1.4.3.6) jsou dimerní enzymy obsahující dvě identické podjednotky o hmotnosti cca 70-90 kDa [dle Fréborta & Adachiho (1995) až 105 kDa v případě některých živočišných variant] katalyzující přeměnu primárních aminoskupin na aldehydy (Frébort & Adachi, 1995; Medda *et al.*, 2004; Cuzzocrea & Masini, 2008; Fraudentali *et al.*, 2021). Z této hmotnosti tvoří cca 70-80 kDa polypeptidový řetězec, zbytek je tvořen (v případě původu z eukaryot) posttranslační glykosylací (Klema & Wilmot, 2012). Enzymy z nepříbuzných zdrojů vykazují nízkou sekvenční homologii, avšak strukturní homologie je vysoká, kdy výrazný rozdíl je pouze v případné přítomnosti N-koncové domény označované jako D1 (např. *E. coli* ano, člověk, tur, hrách a *Pichia pastoris* ne, viz Obr. 2). Většinu hmoty enzymu (cca 500 amk zbytků), struktury aktivního místa a styčné plochy podjednotek tvoří C-koncová doména (D4; viz Obr. 2). Její sekundární strukturou je  $\beta$ -sendvič složený ze dvou antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů (jeden deseti- a druhý osmivláknový (Brazeau *et al.*, 2014). Dvě  $\beta$ -smyčky vycházející z této domény zajišťují interakci s druhou podjednotkou a patrně ovlivňují substrátovou specifitu enzymu (Klema & Wilmot, 2012). Domény D2 a D3 (viz Obr. 2) jsou malé (dle Klema & Wilmot, 2012 cca 100 amk zbytků) tvořené dvěma  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -skládaným listem, které nasedají na doménu D4 z vnější strany enzymu (resp. dále od rozhraní podjednotek) (Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014). Domény D2 a D3 jsou strukturně i sekvenčně vysoce homologní (Klema & Wilmot, 2012). Na rozhraní podjednotek je uvnitř enzymu dutina spojená polárním kanálem s aktivním místem enzymu, sloužící patrně k odvodu vyprodukovaného peroxidu vodíku a jež může být jednou z cest přístupu kyslíku do aktivního místa (spolu s dalšími druhově specifickými přístupy) (Klema & Wilmot, 2012). Aktivní místo je hluboko uvnitř enzymu (Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014), tvar kanálu k němu vedoucího je ovlivněn dvěma  $\beta$  smyčkami domény D4, což má vliv na možnost přístupu substrátu (aminu) do a vyloučení produktu (aldehydu) z aktivního místa a tím na substrátovou specifitu (Klema & Wilmot, 2012). Ve struktuře enzymu je 33 konzervovaných aminokyselinových zbytků, jež jsou součástí zejména aktivního místa a přístupového kanálu k němu (Toninello *et al.*, 2005; Cuzzocrea & Masini, 2008).



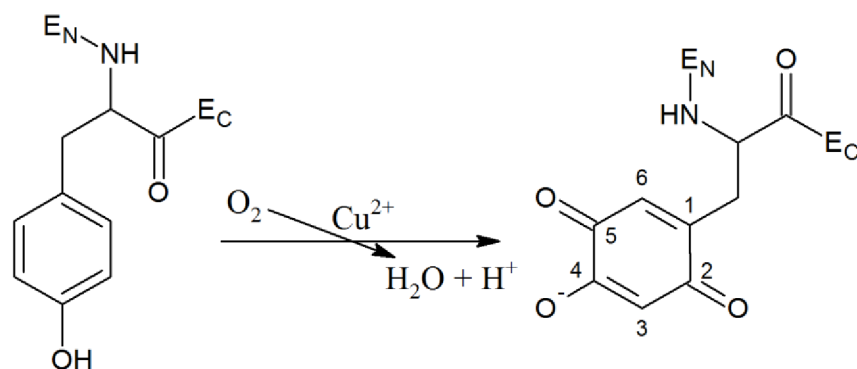
Obr. 2: Porovnání struktur vybraných CuAO. Doména D1 označena růžově, D2 modře, D3 zeleně, D4 červeně, oranžově úseky mezi doménami, šedě druhá, identická podjednotka. Kuličkovými modely označen topachinon (uhlíky černě), měď (oranžově), mangan (fialově) a vápník (zeleně). Šipky označují vstupní místo kanálu pro substrát a jeho směr. A, aminooxidasa hrachu setého (již používám v praktické části), PDB kód 1KSI, B, aminooxidasa E. coli, PDB kód 1QAK, C, lidská sérová aminooxidasa, PDB kód 3HI7, D, lidská membránová aminooxidasa HVAPI, PDB kód 2Y73. Vytvořeno v programu PyMol dle zápisů v PDB pod odpovídajícími kódy a Brazeau *et al.*, 2014.

Co se spektrofotometrických vlastností týče, CuAO mimo typické absorpční maximum proteinů při  $\lambda = 278$  nm absorbují ještě v širokém pásu s maximem  $\lambda = 480$  nm (Klema & Wilmot, 2012), což je dáno elektronovými přechody v oxidované formě kofaktoru a projevuje se růžovým zbarvením (Medda *et al.*, 1995; Klema & Wilmot 2012). Po přidání substrátu v anaerobním prostředí tento absorpční pás mizí, objevuje se pás s různými absorpčními maximy a barva se mění z růžové na žlutou. Po obnovení přístupu kyslíku tento pás mizí a obnovuje se opět růžové zbarvení (Medda *et al.*, 1995).

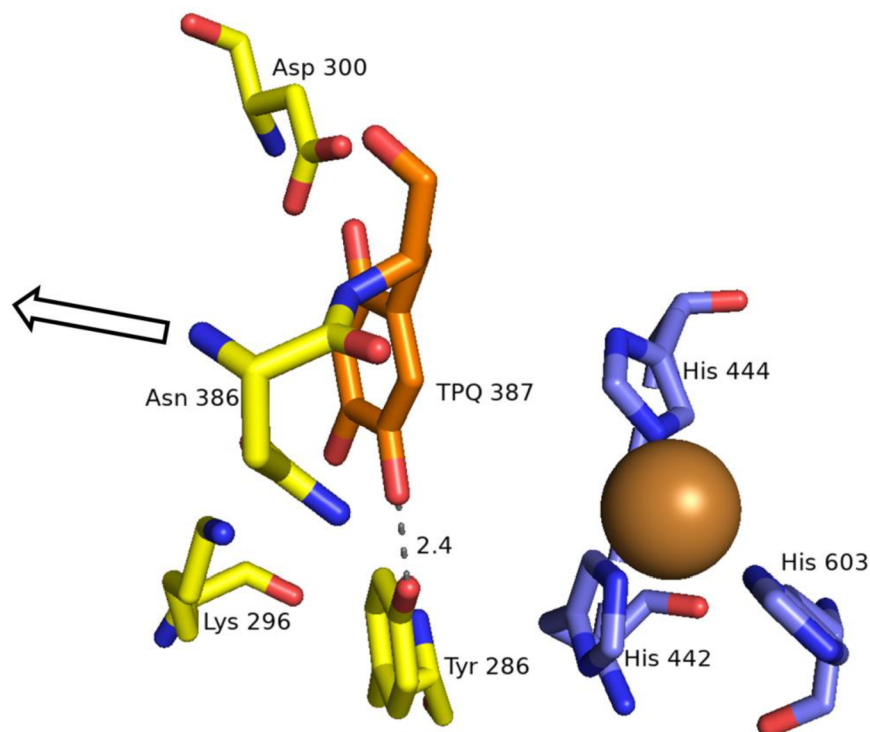
### 2.1.3.2 Struktura aktivního místa, mechanismus katalýzy

Kofaktorem CuAO je topachinon (struktura viz Obr. 3) posttranslačně vznikající z tyrosinu v původním polypeptidovém řetězci ( Brazeau *et al.*, 2014; Shepard & Dooley, 2015). Tato posttranslační úprava, vedoucí ke konformační změně, probíhá v přítomnosti měďnatých iontů a kyslíku autokatalyticky (viz Obr. 3) za účasti tří konzervovaných histidinových zbytků a za vzniku peroxidu vodíku. Tyto tři histidinové zbytky poté ve finálním enzymu váží měďnatý ion v komplexu tvaru deformované

čtvercové pyramid, kdy dalšími dvěma ligandy jsou molekuly vody. Molekula vody tvořící vrchol této čtvercové pyramidy interaguje vodíkovou vazbou s topachinonem. S topachinonem interaguje vodíkovou vazbou konzervovaný tyrosinový zbytek (dle Klema & Wilmot, 2012 sdílejí proton). Dále je přítomen konzervovaný aspartátový zbytek směřující do dutiny pro substrát a usnadňující přenos protonu při katalyzované reakci a lysinový a asparaginový zbytek interagující se substrátem. (viz Obr. 4) (Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014; záznam v PDB, kód 1KSI).



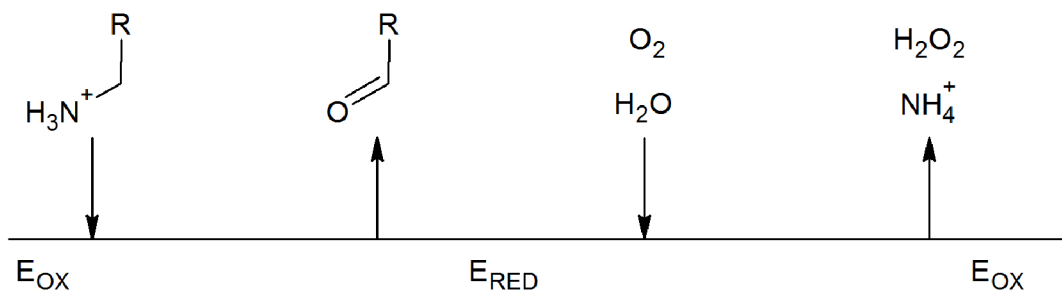
Obr. 3: Schéma vzniku topachinonu a jeho struktury s číslováním atomů uhlíku v kruhu. EN znázorňuje pokračování polypeptidového řetězce enzymu k N-konci, EC k C-konci (dle Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014)



Obr. 4: Znárodnění aktivního místa aminoxidasy hrachu setého se zobrazením katalytických zbytků, kofaktoru, atomu mědi a strukturálních histidinů, šipka značí přístupový kanál pro substrát (v rovině nákresu). Číslování od N-konce finálního enzymu po odstrážení signálního peptidu. Dle záznamu v PDB, kód 1KSI a Brazeau *et al.*, 2014



Reakce katalyzovaná CuAO probíhá ping-pongovým mechanismem, kdy v první fázi vstupuje do reaktivního místa amin, dochází k jeho oxidaci na aldehyd za současné redukce topachinonu na aminochinol (tzv. redukční poloreakce). Ve druhé fázi dochází k reoxidaci aminochinolu na topachinon za spotřeby kyslíku a uvolnění peroxidu vodíku a amoniaku (Clelandovo schéma viz Obr. 5) ( Medda *et al.*, 1999; Medda *et al.*, 2004; Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014; Shepard & Dooley, 2015).



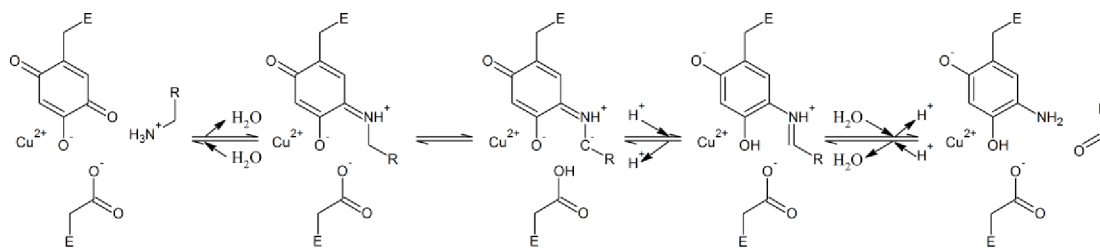
Obr. 5: Clelandovo schéma reakce katalyzyvané CuAO. R značí nezobrazenou část substátu/produktu, EOX a ERED značí oxidovanou a redukovanou formu kofaktoru enzymu (Vytvořeno dle Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014).

### 2.1.3.2.1 Redukční poloreakce

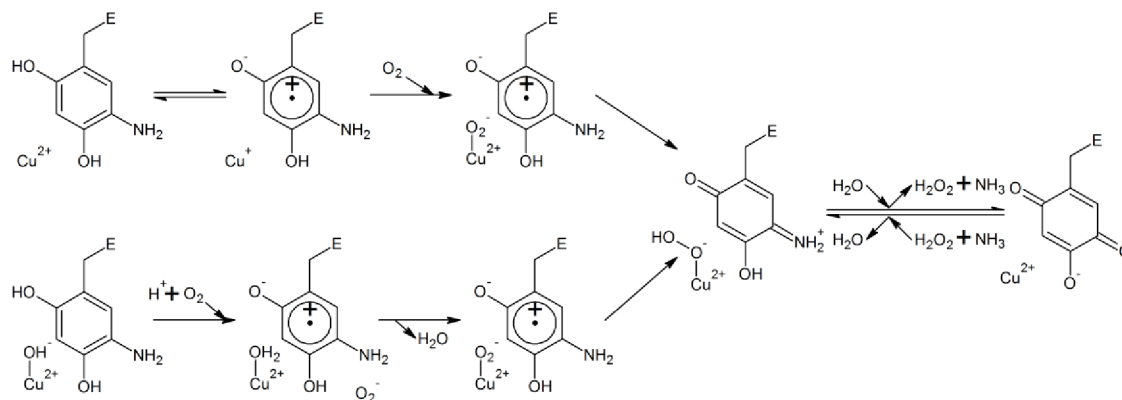
První fáze reakce začíná nukleofiním atakem uhlíku č. 5 topachinonu primárním aminem (substrátem) za vzniku Schiffovy báze, z níž je aspartátovým zbytkem odtržen proton. Následnou hydrolyzou takto vzniklého meziprojektu je uvolněn aldehyd (produkt) a vzniká redukovaná forma kofaktoru (schéma viz Obr. 6) (Medda *et al.*, 2004; Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014; Shepard & Dooley, 2015).

### 2.1.3.2.2 Oxidační poloreakce

Na rozdíl od redukční části reakce je průběh oxidační části stále částečně nejasný. Obecně dochází k navázání kyslíku na enzym, přijetí dvou elektronů a dvou protonů kyslíkem za vzniku peroxidu vodíku a současné oxidaci aminochinolu na iminochinon, který je následně hydrolyzován za uvolnění amoniaku (Obr. 7) (Medda *et al.*, 2004; Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014).



Obr. 6: Schéma redukční poloreakce se znázorněním aspartátového zbytku usnadňujícího přenos protonu. E znázorňuje polypeptidový řetězec enzymu, R uhlíkový zbytek substrátu a produktu (Vytvořeno kombinací redukčních částí schémat z Klema & Wilmot, 2012 a Brazeau *et al.*, 2014).



Obr. 7: Schéma oxidační poloreakce se znázorněním dvou možných mechanismů. Nahoře mechanismus obnášející redukcí Cu<sup>2+</sup> na Cu<sup>+</sup> ion. Dole mechanismus se zachováním oxidačního čísla mědi. E znázorňuje polypeptidový řetězec enzymu (dle Vakal *et al.*, 2020, upraveno pro vizuální sjednocení s ostatními schématy).

Nejasnou částí oxidační poloreakce je to, se kterou složkou interaguje kyslík a jaká je role mědi v enzymu. Byly navrženy dvě různé možnosti jejího průběhu. První možnost je založena tom, že po redukční poloreakci je v enzymu rovnováha mezi párem  $\text{Cu}^{2+}$  - aminochinol a  $\text{Cu}^+$  - semichinonový radikál (viz Obr. 7 nahoře). Na základě tohoto se předpokládá vazba kyslíku na měďný ion následovaná přenosem elektronu na kyslík a přenos dalšího elektronu na kyslík ze semichinonového radikálu společně se dvěma protony za vzniku peroxidu vodíku a iminochinonové formy kofaktoru. Druhá možnost obnáší přenos prvního elektronu z aminochinolu přímo na kyslík beze změny oxidačního čísla mědi (viz Obr. 7 dole) a následný přenos dalšího elektronu a dvou protonů z takto vzniklého semichinonového radikálu (Medda *et al.*, 2004; Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014).

Posun rovnováhy mezi aminochinolem a jeho semichinonovou formou je závislý na prostředí (teplota, pH), ale také na zdroji enzymu, kdy v případě rostlinných enzymů je v rovnováze přítomen velký podíl semichinonové formy (dle Klema & Wilmot, 2012 až 40 %), kdežto v případě živočišných enzymů je rovnováha výrazně posunuta ve prospěch aminochinolu (Medda *et al.*, 2004; Klema & Wilmot, 2012). Jelikož by přenos elektronu přes  $\text{Cu}^+$  měl být teoreticky snazší (Klema & Wilmot, 2012), starší zdroje (Medda *et al.*, 1999; Medda *et al.*, 2004) předpokládají buďto průběh reakce prvním navrženým způsobem, nebo to, že reakce probíhá odlišně v případě rostlinných (prvním způsobem) a živočišných enzymů (druhým způsobem). Některé novější zdroje (Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014) se přiklánějí spíše k druhé možnosti průběhu reakce, a to z toho důvodu, že poté, co Mills *et al.*, 2002 nahradili v aminoxidase kvasinky *Hansenula polymorpha* měď kobaltem, enzym vykazoval stejnou aktivitu jako původní. Také po náhradě mědi kobaltem v aminoxidase ze semenáčků čočky (Padiglia *et al.*, 1999) a hrachu (Mills *et al.*, 2012) došlo k částečnému zachování aktivity enzymu, což znamená, že i v případě rostlinných enzymů probíhá reakce druhým způsobem (ačkoliv první způsob to, vzhledem pouze k částečnému zachování aktivity nevylučuje (Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014; Shepard & Dooley, 2015). Tyto předpoklady jsou založeny na nízkém redoxním potenciálu páru  $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$  a tím pádem nízké pravděpodobnosti toho, že by kobalt byl během reakce redukován (Klema & Wilmot, 2012). Dále druhý způsob podporují i data z rentgenostrukturních analýz krystalů, kdy při použití oxidu dusnatého jako inertního mimetika kyslíku dochází k interakci spíše s aminochinolem, než s mědí (stále však s mědí interaguje). Pravděpodobně však existují i další možnosti vazby kyslíku mimo měď, jež dle použitých zdrojů zatím nebyly potvrzeny (Goto & Klinman, 2002; Brazeau *et al.*, 2014). Shepard & Dooley (2015) se však, i přes funkčnost enzymu po náhradě mědi

kobaltem, přiklání spíše k možnosti obou způsobů průběhu reakce za preference prvního způsobu (tzn. přenos prvního elektronu z  $\text{Cu}^{\text{I}}$ ) v případě posunu rovnováhy směrem k semichinonové formě kofaktoru a  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (tzn. zejména u rostlinných enzymů) z důvodu potenciálně snazšího přestupu elektronu. Existují důkazy pro oba způsoby, neexistují však, dle nalezených zdrojů, důkazy jeden z těchto způsobů jednoznačně vylučující (Klema & Wilmot, 2012; Brazeau *et al.*, 2014; Shepard & Dooley, 2015).

### 2.1.3.3 Substráty, substrátová specifická

Substrátová specifická se u aminoxidas z různých zdrojů liší, obecně je však široká, kdy jsou s různou účinností přeměňovány primární aminoskupiny monoaminů (EC 1.4.3.21 a omezeně 1.4.3.22) či di- a polyaminů (zejm. EC 1.4.3.22) (Medda *et al.* 1995; Longu *et al.*, 2005). Schopnost přeměnit substrát závisí zejména na tvaru kanálu pro přístup substrátu do aktivního místa enzymu, kdy tento tvar vykazuje mezi různými variantami významné odlišnosti (Klema & Wilmot, 2012; Shepard & Dooley, 2015). Dále tvar tohoto kanálu a aminokyselinové zbytky do něj směřující ovlivňují případnou stereospecifitu pro některé ze substrátů na základě možnosti omezení orientace Schiffovy báze, jakožto meziproductu reakce (Klema & Wilmot, 2012).

Obecně pro enzymy rostlinného původu a živočišné enzymy pocházející z ledvin, střeva a placenty (EC 1.4.3.22) jsou nejlepšími substráty putrescin a kadaverin (Medda *et al.*, 1995; Šebela *et al.*, 2007). Vhodným substrátem pro výše uvedené živočišné varianty je histamin (Nocera *et al.*, 2002), jež je z rostlinných variant ve vyšší míře metabolizován enzymem z hrachových semenáčků, jinak špatně či vůbec (Medda *et al.*, 1995). Pro živočišné enzymy z krevní plazmy jsou dobrými substráty arylalkylaminy (benzylamin, fenylethylamin) (Toninello *et al.*, 2005; Šebela *et al.*, 2007), některé neurotransmitery (Šebela *et al.*, 2007), látky exogenního původu (Gong & Boor, 2006; Šebela *et al.*, 2007) či methylamin a aminoaceton (Gong & Boor, 2006). Rostlinné enzymy metabolizují některá syntetická analoga cytokininů s aminoskupinami na postranním řetězci vázaném na adenin v poloze  $\text{N}^6$  (Lamplot *et al.*, 2005).

### 2.1.3.4 Inhibice

Vzhledem k rozmanitým rolím CuAO v organismu mohou být některé jejich inhibitory použity jako selektivní léčiva při léčbě např. diabetických cévních defektů a tlumení zánětu (Vakal *et al.*, 2020; Boyer *et al.*, 2021), nebo jako látky ovlivňující rozvoj nádorů (potenciálně pozitivně i negativně) (Nocera *et al.*, 2002; Toninello *et al.*, 2005; Vakal *et al.*, 2020). Znalost možných inhibitorů těchto enzymů je důležitá z hlediska možných vedlejších účinků inhibitorů monoaminoxidas (antidepresiva, léčba

neurodegenerativních onemocnění) (Gong & Boor, 2006; Shepard & Dooley, 2015) popř. vedlejších účinků léčiv cílených na houby a prvoky (Shepard & Dooley, 2015).

#### 2.1.3.4.1 Kompetitivní inhibitory

Jsou strukturními analogy substrátů nepodléhajícími reakci a blokujícími aktivní místo enzymu (Padiglia *et al.*, 1998; Longu *et al.*, 2005). Účinnými kompetitivními inhibitory CuAO jsou diamino- a monoaminoketony (např. 1,3-diamino-2-propanon a 1,4-diamino-2-butanon) (Padiglia *et al.*, 1998; Šebela *et al.*, 2007). Dalšími kompetitivními inhibitory jsou piperidinové a chininové alkaloidy, komplexy dvojmocných přechodných kovů se substráty, cysteamin (Padiglia *et al.*, 1998), diaminy s heterocyklickými substituenty či dlouhými postranními řetězci (Šebela *et al.*, 2007), popř. pro některé varianty enzymu i deriváty agmatinu ([N-(4-aminobutyl)guanidinu]) (Seiler, 2000; Šebela *et al.*, 2007). Některé z těchto inhibitorů, např. cysteamin (Padiglia *et al.*, 1998), deriváty agmatinu, či některé diaminoketony (Šebela *et al.*, 2007) jsou zároveň substráty, u nichž dochází k velmi pomalé enzymové reakci.

#### 2.1.3.4.2 Nekompetitivní inhibitory

Váží se na enzym mimo aktivní místo, aniž by ovlivňovaly vazbu substrátu (Padiglia *et al.*, 1998; Longu *et al.*, 2005). Mezi nekompetitivní inhibitory patří chelatační činidla vážící měď (např. kyanidové a azidové ionty, diethylthiokarbamát), některé deriváty imidazolu (Padiglia *et al.*, 1998), diethylentriamin a triethyltetramin (Devoto *et al.*, 1986)

#### 2.1.3.4.3 Akompetitivní (pouze azid sodný)

Inhibitor se váže pouze na enzym-substrátový komplex a brání vzniku produktu. (Padiglia *et al.*, 1998). V případě CuAO je příkladem azid sodný (Luhová *et al.*, 1996).

#### 2.1.3.4.4 Irreverzibilní inhibitory

Jsou to takové látky, které tvoří stabilní kovalentní vazby s klíčovými skupinami enzymu. Inhibice je trvalá (Padiglia *et al.*, 1998). Irreverzibilními inhibitory CuAO jsou karbonylové sloučeniny, jako např. substituované hydraziny (Padiglia *et al.*, 1998; Seiler, 2000), hydroxylamin (Seiler, 2000), a hydrazidy (Padiglia *et al.*, 1998), mezi něž patří např. semikarbazid (Padiglia *et al.*, 1992), kdy v klinicky zaměřené literatuře bývají CuAO nazývány aminoxidasami citlivými na semikarbazid (např. v Seiler, 2000; Capéné *et al.*, 2005; Gong & Boor, 2006; Agostinelli *et al.*, 2009)

#### 2.1.3.4.5 Reakčně závislé inhibitory (sebevražedné substráty)

Jedná se o strukturní analoga substrátů, která se váží do aktivního místa enzymu, stejně jako substrát podléhají reakci, avšak v průběhu reakce vzniká reaktivní intermediát, jež se může kovalentně vázat aminokyselinový zbytek poblíž aktivního místa či na kofaktor, nebo být přeměněn na produkt analogicky substrátu. V případě vazby intermediátu je inhibice trvalá (Padiglia *et al.*, 1998; Longu *et al.*, 2005; Shepard & Dooley, 2015). Mezi tyto inhibitory patří alkylaminy,  $\beta$  substituované halogeny či látky s aromatickými substituenty a obsahující násobné vazby mezi  $\beta$  a  $\gamma$  uhlíkem (Longu *et al.*, 2005; Shepard & Dooley, 2015), což způsobuje odtahování elektronů od  $\alpha$  uhlíku a uděluje elektrofilní vlastnosti tomuto uhlíku v rámci meziprojektu redukční poloreakce (Shepard & Dooley, 2015). Tímto způsobem mohou působit i tyramin a tryptamin, jakožto v přírodě se běžně vyskytující aminy. Deaminace tryptaminu je součástí biosyntézy kyseliny indolyl-3-oxo-pyruvátové působící jako fytohormon (Longu *et al.*, 2005). Tyramin, působící na organismus mírně toxicky a vyskytující se hojně v některých fermentovaných výrobcích (Suzzi & Gardini, 2003) nebo některá analoga cytokininů [např.  $N^6$ -(4-Aminobut-2-ynyl)adenin (Lamplot *et al.*, 2005)], působí také jako reakčně závislé inhibitory, kdy aminoxidas jsou součástí přirozených metabolických drah obnášejících tyto látky (či jejich přirozené obdoby), ale v průběhu reakce dochází k postupné inaktivaci enzymu (Longu *et al.*, 2005). Dalšími příklady jsou 1,4-diamino-2-butyn (Frébort *et al.*, 2000) 1,5-diamino-2-pentyn (Lamplot *et al.*, 2004) a aminoguanidin (Sattler *et al.*, 1988). Podobně působí (v rámci vedlejších účinků) i některé léky cílené na monoaminoxidas, jako např. antidepressivum tranylcypromin (Shepard & Dooley, 2015).

Další skupinou sebevražedných substrátů jsou látky rozkládající se za uvolnění oxidu dusnatého irreverzibilně inhibujícího enzym, jako např. 3,3-Bis(aminoethyl)-1-hydroxy-2-oxo-1-triazin. Neodpovídají však plně definici reakčně závislého substrátu (Longu *et al.*, 2005 b).

#### 2.1.3.4.6 Peroxid vodíku

CuAO jsou inhibovány také produkovaným peroxidem vodíku, který brání zpětné reoxidaci kofaktoru (Pietrangeli *et al.*, 2000; Nocera *et al.*, 2002). Inhibici peroxidem vodíku lze zabránit přidáním katalasy do reakční směsi či jejím prudkým mícháním za přístupu vzduchu. (Pietrangeli *et al.*, 2000). Bardsley *et al.* (1973) tuto inhibici uvádějí jako akompetitivní vůči aminovému substrátu a nekompetitivní vůči kyslíku. Zmiňují také, že peroxid vodíku zvýrazňuje inhibici nadbytkem kyslíku jakožto druhého substrátu. Pietrangeli *et al.* (2000) uvádí, že se tato inhibice zdánlivě projevuje jako

inhibice nadbytkem aminového substrátu [ke které dochází v případě oxidace některých diaminů (Costa *et al.*, 1971)] a spekuluje o tom, že by mohlo jít o mechanismus vyvinutý jako ochrana před nadprodukcí peroxidu vodíku.

## 2.1.4 Jiné typy aminoxidas

### 2.1.4.1 Flavinové aminoxidasy

Kofaktorem těchto aminoxidas je FAD. Na rozdíl od CuAO neoxidují pouze primární, ale i sekundární a terciární aminoskupiny. Dle preferovaných substrátů je lze rozdělit na monoaminoxidas (EC 1.4.3.4) a polyaminoxidas (EC 1.5.3.X) (Seiler, 2000; Benedetti, 2001; Gong & Boor, 2006). Monoaminoxidas živočichů (zejména v nervové tkáni a gastrointestinálním traktu) při své široké substrátové specifitě preferují neurotransmittery, jako např. noradrenalin, adrenalin a serotonin (Kanazawa, 1994; Benedetti, 2001). Polyaminoxidas živočichů (ve všech tkáních) preferují lineární konjugované polyaminy (např.  $N^1$ -acetylspermin) a méně jejich nekonjugované varianty (Seiler, 2000; Gong & Boor, 2006). Naproti tomu rostlinné polyaminoxidas jsou vysoce specifické pro spermin a spermidin (Šebela *et al.*, 2001; Cona *et al.*, 2006), popř. jejich na sekundárních aminoskupinách acetylované deriváty (Cona *et al.*, 2006). Dále se rostlinné a živočišné polyaminoxidas liší způsobem, jakým oxidují substrát a vznikajícími produkty (viz Obr. 1, str. 4) (Šebela *et al.*, 2001; Cona *et al.*, 2006).

Reakce katalyzovaná flavinovou aminoxidasou (podobně jako v případě CuAO) probíhá ve dvou fázích, kdy v redukční fázi dochází k redukcí FAD za současné oxidace aminu na iminový meziprodukt, jež je následně hydrolyzován za uvolnění produktu a v oxidační fázi dochází ke zpětné reoxidaci  $FADH_2$  kylíkem za vzniku peroxidu vodíku (Benedetti, 2001; Šebela *et al.*, 2001).

Struktury flavinových aminoxidas obecně vykazují vyšší variabilitu než v případě CuAO, kdy např. polyaminooxidasa kukuřice je monomerní enzym s nekovalentně vázaným kofaktorem (Šebela *et al.*, 2001), kdežto lidské monoaminoxidas A a B jsou dimerní enzymy (A i jako monomerní), kdy identické podjednotky obsahují po jedné kovalentně vázané molekule FAD (Manzoor & Hoda, 2020). Sekundární a terciární struktura podjednotky (či monomerního enzymu) je v obou případech značně podobná.

### 2.1.4.2 „multicopper“ oxidasy

Jde o v přírodě hojně rozšířené enzymy s velmi širokými substrátovými specifitami, které oxidují různé substráty za sprotřeby kyslíku a uvolnění dvou molekul vody. Tyto enzymy obsahují v aktivním místě podjednotky měď a těsný shluk tří atomů mědi. Vyskytují se ve formě di-, tri- a hexameru (Bento *et al.*, 2005; Li & Lu, 2020). Nejde o

enzymy primárně oxidující aminy, ale některé jejich varianty (lakasy, EC 1.10.3.2) jsou toho schopny (Guarcello, 2016; Callejón *et al.*, 2017; Li & Lu, 2020). Substrátová specifita lakas je široká a zahrnuje fenolové látky, aniliny, thioly a také aromatické aminy, jako např. tyramin [Callejón *et al.* (2017), jednoznačně uvádí oxidaci tyraminu, o dalších aromatických aminech spekulují]. Vzhledem k širokým substrátovým specifitám je možno tyto enzymy (či organismy je produkující) využívat v různých biotechnologických aplikacích (Callejón *et al.*, 2017), kam vzhledem ke schopnosti oxidace tyraminu patří výroba fermentovaných potravin. Výhodou je, že neprodukuje peroxid vodíku, který by vadil růstu ušlechtilých mikroorganismů (Guarcello, 2016; Callejón *et al.*, 2017; Li & Lu, 2020).

### **2.1.5 Biologické role aminoxidas**

Přesto, že tato práce je zaměřena na Cu dependentní aminooxidas, tato podkapitola bude, vzhledem k částečnému překryvu substrátových specifitostí a biologických rolí (Gong & Boor, 2006; Cona *et al.*, 2006; Cuzzocrea & Masini, 2008; Tavladoraki *et al.*, 2016), věnována rolím aminoxidas v organismech obecně.

#### **2.1.5.1 Rostliny**

Aminoxidasy rostlin jsou zapojeny do řízení mnoha procesů udržováním či regulací koncentrace svých substrátů a produktů působících jako signální molekuly. Peroxid vodíku jimi produkovaný stimuluje tloušťnutí buněčných stěn, jejich lignifikaci (dřevnatění) či suberizaci (korkovatění) a dlouhivý růst listů a potlačuje dlouhivý růst stonku (Cona *et al.*, 2006; Tavladoraki *et al.*, 2016; Fraudentali *et al.*, 2020). Produkovaný peroxid vodíku se účastní také řízení procesu programované buněčné smrti, např. při diferenciaci dřevní části cévních svazků. Jsou zapojeny do regulace růstu kořene, tvorby hojivých pletiv, stimulace tvorby pylu a semen (Tavladoraki *et al.*, 2016; Fraudentali *et al.*, 2020). Katabolismus polyaminů je spojen se zráním plodů (Tavladoraki *et al.*, 2016). Aminoxidasy ve svěracích buňkách průduchů se účastní regulace jejich otevírání (Tavladoraki *et al.*, 2016; Fraudentali *et al.*, 2020). Polyaminy a jejich metabolity jsou zapojeny do odezvy na sucho a osmotický stres, vysoké teploty a napadení patogeny, včetně programované buněčné smrti napadených buněk (Cona *et al.*, 2006; Fraudentali *et al.*, 2020). V případě bobovitých rostlin jsou aminoxidasy zapojeny do regulace morfologických změn buněk kořene při kontaktu s *Rhizobium* (symbiotické hlízkové bakterie), tvorby hlízkové a udržování symbiotického vztahu nepřecházejícího v patogenitu (Cona *et al.*, 2006) Produkty reakce aminoxidas vystupují v biosyntéze obranných sekundárních metabolitů, např. nikotinových, tropanových a piperidinových alkaloidů. (Cona *et al.*, 2006; Shoji, 2018; Fraudentali *et al.*, 2020)



Např. *N*-methylputrescinoxidasa (CuAO specifická pro tento substrát) oxiduje *N*-methylputrescin na 4-methylaminobutanal, následně cyklizující na kation *N*-methyl  $\Delta^1$ -pyrrolinu, jakožto intermediát biosyntézy nikotinu (Shoji, 2018). Vznikající aldehydy zapojeny do biosyntézy signálních molekul jako je kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (vznikající oxidací  $\Delta^1$ -pyrrolinu, vzniklého oxidací putrescinu CuAO a následnou samovolnou cyklizací 4-aminobutanalu), regulující např. citrátový cyklus, pH cytosolu a stresové odezvy (Cona *et al.*, 2006; Fraudentali *et al.*, 2020).

### 2.1.5.2 Živočichové, člověk

Podobně jako u rostlin jsou zde aminoxidasy zapojeny do udržování homeostázy a řízení důležitých procesů regulací koncentrací svých substrátů a produktů, kdy aminy a produkovaný peroxid vodíku společně s aldehydy slouží jako signální molekuly (Nocera *et al.*, 2002; Gong & Boor, 2006; Cuzzocrea & Masini, 2008; Boyer *et al.*, 2020; Vakal *et al.*, 2020). Aminoxidasy se podílí na regulaci proliferace buněk a apoptózy, kdy polyaminy modulují tyto procesy v závislosti na koncentraci (v malých koncentracích stimulují růst buněk, ve velkých jsou cytotoxické). Produkovaný peroxid vodíku v malých koncentracích stimuluje proliferaci buněk a ve velkých je společně s produkovanými aldehydy cytotoxický (Toninello *et al.*, 2006; Agostinelli *et al.*, 2009). V rámci rychlé proliferace buněk při vývoji plodu dochází ke zvýšení koncentrace polyaminů v krvi (Seiler, 2000; Cuzzocrea & Masini, 2008), což je v organismu matky kompenzováno zvýšením koncentrace sérové aminoxidasy (EC 1.4.3.22) (Cuzzocrea & Masini, 2008; Vakal *et al.*, 2020). Vzhledem k tomu, jedním z mechanismů spouštění či inhibice apoptózy je iniciace změn či udržování potenciálu na mitochondriální membráně, se aminoxidasy podílejí patrně i na regulaci funkce mitochondrií (Nocera *et al.*, 2002).

Aminoxidasy ve stěnách cév (např. u člověka HVAP1 – „human vascular associated protein 1“, EC 1.4.3.21) se účastní regulace zánětlivých procesů. Řídí činnost hladkého svalstva cévní stěny a tím průsvit cév, produkovaný peroxid vodíku zvyšuje propustnost stěny cév a tím průnik tekutiny do mezibuněčného prostoru (vznik otoku). Zvýšená přítomnost aminoxidasy v cévní stěně stimuluje vazbu leukocytů (jsou ligandem leukocytárního receptoru) a jejich vstup do tkáně (vznik zánětu) (Ekblom, 1998; Vakal *et al.*, 2020; Boyer *et al.*, 2021). Jejich nadbytečná činnost je charakteristická např. pro zánětlivé poškození cév v rámci diabetu (Ekblom, 1998; Boyer *et al.*, 2021). Aminoxidasy v krevní plazmě (EC 1.4.3.22) naopak potlačují zánětlivé procesy degradací histaminu fungujícího jako prozánětlivá signální molekula (Nocera *et al.*, 2002; Cuzzocrea & Masini, 2008; Vakal *et al.*, 2020), čímž například brání vzniku

srdeční anafylaxe (patologické změny srdce v důsledku prudkého uvolnění histaminu) (Nocera *et al.*, 2002; Cuzzocrea & Masini, 2008) a poškození orgánů při prudkém uvolnění histaminu např. po náhlém obnovení zastaveného krevního oběhu. Takovéto poškození po obnovení oběhu (tzv. ischemicko-reperfúzní poranění, ischemie – omezení průtoku krve, reperfuze – jeho obnovení) nastává např. v rámci akutní léčby infarktu myokardu, mozkové mrtvice či ucpání tělních tepen krevní sraženinou (Cuzzocrea & Masini, 2008).

Aminoxidasy se také účastní posttranslačních modifikací některých proteinů oxidací koncových aminoskupin a postranních řetězců lysinu (Nocera *et al.*, 2002; Cuzzocrea & Masini, 2008). Společně s lisyloxidasou se účastní např. správného vývoje elastinové (lisyloxidasa i CuAO) a kolagenové (pouze lisyloxidasa) mezibuněčné matrice a cévního systému nenarozeného plodu (Gong & Boor, 2006). Lisyloxidasu lze také zařadit mezi aminoxidas (Cu dependentní, selektivní pro postranní řetězce lysinu, EC 1.4.3.13) (Agostinelli *et al.*, 2009; McGrath *et al.*, 2011). V případě nadbytečné aktivity aminoxidas může docházet např. k nežádoucí modifikaci proteinů oční čočky vedoucí ke vzniku šedého zákalu (Nocera *et al.*, 2002) či poškození srdce a cév v rámci pozdních komplikací diabetu (Cuzzocrea & Masini, 2008).

Aminoxidasy mají významný vliv na regulaci nervové soustavy. Mitochondriální monoaminoxidas (EC 1.4.3.4) se podílejí na degradaci některých neurotransmitterů, např. serotoninu, dopaminu a noradrenalinu (Kanazawa, 1994; Manzoor & Hoda, 2020) za současného vzniku neurotoxických látek (amoniak, peroxid vodíku, aldehydy). Nerovnováha v míře jejich aktivity je spojena s neurodegenerativními chorobami jako např. Alzheimerova a Parkinsonova choroba (Manzoor & Hoda, 2020), s poruchami osobnosti jako např. deprese a úzkostné poruchy a se závislostmi na návykových látkách (Gong & Boor, 2006). Nadměrná produkce polyaminů je spojena s dalšími patologickými stavy, jako např. s epilepsií a působí cytotoxicky (Seiler, 2000).

Aminoxidasy se účastní regulace metabolismu lipidů a sacharidů (Carpéné *et al.*, 2005; Agostinelli *et al.*, 2009), kdy produkovaný peroxid vodíku částečně napodobuje účinky inzulínu jako stimulaci lipogeneze a příjmu glukózy adipocyty a inhibici lipolýzy (Carpéné *et al.*, 2005).

Tyto enzymy se účastní i degradace ve stravě přijatých exogenních aminů, které působí toxicky narušováním výše uvedených rovnovážných stavů. Takovéto otravy exogenními aminy se projevují bolestmi hlavy, nevolnostmi, zvracením, bušením srdce a zmateností (Gong & Boor, 2006; Li & Lu, 2020). Biogenní aminy jsou obsaženy zejména ve fermentovaných potravinách bohatých na proteiny, jako jsou sýry a fermentované masné výrobky, ale i ve fermentované zelenině a alkoholických nápojích

(Suzzi & Gardini, 2003; Gong & Boor, 2006; Li & Lu, 2020). Přítomny mohou být např. histamin, tyramin, tryptamin, putrescin a kadaverin (Suzzi & Gardini, 2003; Li & Lu, 2020). Ohroženy jsou zejména osoby užívající antidepresiva založená na inhibici monoaminoxidasy (obzvláště starší méně selektivní varianty, tzv. „reakce na sýr“) (Carpéné *et al.*, 2005; Gong & Boor, 2006), popř. osoby trpící chorobami způsobenými nízkou aktivitou aminoxidasy (např. některé varianty astmatu a dermatitid). Zvýšené opatrnosti (co se týče potravin aminy obsahujících či léčiv aminoxidasy inhibujících) by měly dbát těhotné ženy z důvodu vysoké produkce vlastních polyaminů plodem, kdy v kombinaci s poruchami vlastní tvorby aminoxidasy, mohou vysoké koncentrace aminů v krvi vyvolat potrat (Vakal *et al.*, 2020). Dále se aminoxidasy účastní biotransformací některých toxických xenobiotik a léčiv (Benedetti, 2001; Gong & Boor, 2006), kdy některá xenobiotika (např. psychotropní látka mescalín) mohou být deaminací převedena na neaktivní či méně toxické metabolity, zatímco jiná xenobiotika mohou být přeměňována do aktivní účinné formy (např. prop-2-en-1-amin je deaminován na kardiotoxický akrolein) (Gong & Boor, 2006).

### **2.1.5.3 Prokaryota**

Bakteriální aminoxidasy jsou enzymy indukovatelné přítomností substrátu zajišťující jeho využitelnost jako zdroje uhlíku či dusíku (Frébort & Adachi, 1995; Suzzi & Gardini, 2003; Klema & Wilmot, 2012; Li & Lu, 2020) či regulaci obsahu polyaminů produkovaných v rámci odezvy na nepříznivé pH (Li & Lu, 2020). Tyto enzymy vytvářejí jen některé kmeny bakterií (Suzzi & Gardini, 2003; Li & Lu, 2020).

### **2.1.5.4 Houby, kvasinky**

V houbách, obzvláště vláknitých (např. rod *Aspergillus*) se aminoxidasy vyskytují hojně (McGrath *et al.*, 2011). Podobně, jako v případě prokaryot, jde o substrátem indukovatelné enzymy sloužící k metabolizaci substrátu jako zdroje uhlíku (Frébort & Adachi, 1995; Yagodina *et al.*, 2001). Umožňují růst i za vysokých koncentrací aminů v prostředí (McGrath *et al.*, 2011).

### **2.1.6 Technologické a farmaceutické využití, praktický význam**

Vzhledem k mnoha výše uvedeným rolím aminoxidasy v živých organismech je možno tyto enzymy, jejich substráty, inhibitory a produkty využít k různým farmaceutickým, potravinářským a technologickým aplikacím.

V medicíně jsou inhibitory monoaminoxidasy (EC 1.4.3.4) využívány jako antidepresiva a léky proti úzkostným poruchám osobnosti (Gong & Boor, 2006; Manzoor & Hoda 2020) a je zkoumán jejich potenciál pro léčbu neurodegenerativních

chorob, jako jsou Parkinsonova (Kanazawa, 1994; Manzoor & Hoda, 2020) a Alzheimerova choroba (Manzoor & Hoda, 2020). Tyto inhibitory je potřeba, aby byly vysoce selektivní a nedocházelo k vedlejším účinkům způsobených inhibicí ostatních aminoxidas (Gong & Boor, 2006). Inhibitory aminoxidas se využívají v léčbě onemocnění způsobených prvky, např. spavé nemoci, kdy však používané látky inhibují i lidské CuAO, což vede k nežádoucím účinkům (Shepard & Dooley, 2014). Inhibitory aminoxidasy HVAP1 (v cévní stěně, EC 1.4.3.21) mají potenciál jako prostředky léčby zánětlivých onemocnění (Vakal *et al.*, 2020) a pozdních komplikací diabetu spojených se zánětlivým poškozením cév (Ekblom, 1998; Boyer *et al.*, 2021). V kontrastu s tímto se uvažuje i o použití aminů pro modulaci glukózové tolerance, glykémie a profilu sérových lipidů v rámci metabolického syndromu a diabetu typu II, kdy však může docházet ke zvýšené míře poškození cév a pozdních komplikací v závislosti na volbě použitého aminu, resp. toxicitě vznikajících aldehydů, kdy je nutno vyhodnocení rizika pozdních komplikací vzhledem k vedlejším účinkům a k absenci léčby (Carpéné *et al.*, 2005). Enzymy samotné (konkrétně aminoxidasa hrachu setého, s níž pracují v této práci) jsou potenciálně využitelné pro léčbu komplikací souvisejících s prudkým uvolněním histaminu do cévního řečiště, kdy by enzym modifikovaný polyethylenglykolem (pro odstranění imunogenicity) byl vpraven do cévního řečiště a degradoval přebytečný histamin. Toto by mohlo být využitelné v léčbě septického a anafylaktického šoku, astmatu, zánětu spojivek, alergické kopřivky či poškození tkání v rámci opětovného obnovení zastaveného krevního oběhu např. po infarktu myokardu (Cuzzocrea & Masini, 2008). Vzhledem k roli aminoxidas v modulaci proliferace buněk a apoptózy je prověřována možnost využití jejich inhibitorů (Toninello *et al.*, 2006), substrátů, produktů a enzymů samotných (Agostinelli *et al.*, 2009) v léčbě rakoviny.

Aminoxidasy jsou také jedněmi z enzymů potenciálně využitelných jako biokatalyzátory v chemické syntéze, kdy by jejich použití mohlo zajistit snížení výrobních nákladů a zátěže životního prostředí a potenciálně umožnit kontrolu stereospecificity syntetizovaných látek. Z tohoto hlediska má větší potenciál využití FAD aminoxidas, které uvolňují do roztoku již iminový intermediát, který tak může přímo reagovat s dalšími složkami reakční směsi, např. při syntéze  $\alpha$  substituovaných aminů (Wahart *et al.*, 2021).

Dalším odvětvím s potenciální využitelností aminoxidas je potravinářský průmysl, kde je z hlediska potřeby snížení obsahu toxických biogenních aminů v potravinách možno, v rámci ušlechtilých startovacích kultur mikroorganismů, využívat mikroorganismy aminoxidasy produkující (Suzzi & Gardini, 2003; Latorre-Moratalla *et al.*, 2012; Li & Lu, 2020) či potenciálně přímo přidat aminoxidasy samotné

(Guarcello, 2016; Callejón *et al.*, 2017; Li & Lu, 2020). Ovlivňovány mohou být i vlastnosti zemědělských produktů, např. obsah polyaminů v révě vinné (a v důsledku toho ve víně) na základě míry exprese aminoxidasy danou odrůdou v rámci reakce na stresové podmínky (Fraudentali *et al.*, 2021).

Další využití nacházejí aminoxidasy v analytické chemii při použití v biosenzorech pro detekci biogenních aminů, kdy je elektrochemicky pomocí kyslíkové elektrody (Frébort *et al.*, 2000; Kivirand & Rinke, 2009) či pomocí elektrody založené na uhlíkové pastě a mediátoru (selektivnější) (Wimmerová & Macholán, 1999) detegován úbytek kyslíku v roztoku vzorku a enzymu (popř. je enzym imobilizován na vhodném nosiči) a z rychlosti tohoto úbytku odvozeno množství přítomných aminů (Wimmerová & Macholán, 1999; Frébort *et al.*, 2000; Kivirand & Rinke, 2009). Takovéto měření je selektivitou srovnatelné s tradičními chromatografickými metodami, nevýhodou je však nižší citlivost. Výhodami jsou snazší příprava vzorku a nižší finanční a časová náročnost (Kivirand & Rinke, 2009). Další výhodou je dostatečně jednoduchá instrumentace pro použití v „point of care testing“ přístrojích při péči o pacienty (Piermarini *et al.*, 2010). Biosenzory na tomto principu jsou využitelné např. v rámci klinické biochemie (Piermarini *et al.*, 2010) či kontroly kvality potravin (Frébort *et al.* 2000; Kivirand & Rinke, 2009).

## **2.2 Metody kvantifikace aminoxidasy**

Kvantifikace obsahu aminoxidasy je založena zejména na měření aktivity enzymu na základě přímé či nepřímé detekce vznikajících produktů. Na tomto je založena značná část v praxi běžně používaných metod (Zhang *et al.*, 2010; Boehm *et al.*, 2016) a po desítky let tyto metody byly jediné používané (Boehm *et al.*, 2016). Mohou však být ovlivněny změnami pH, teploty (Zhang *et al.*, 2010) či poměrem množství substrátu vůči enzymu a vyžadují nastavení ředění a inkubačních časů pro daný vzorek tak, aby měření probíhalo v dynamickém rozsahu metody. Další nevýhodou je velmi obtížné odlišení enzymů oxidujících stejné substráty (Boehm *et al.*, 2016).

Také je možno kvantifikovat enzymový protein [např. imunochemicky (Boehm *et al.*, 2016) nebo pomocí MS/MS Zhang *et al.*, 2010] či míru exprese jeho genu (Nordquist *et al.*, 2002).

### **2.2.1 Založené na měření enzymové aktivity**

#### **2.2.1.1 Spektrofotometrické**

Některé starší spektrofotometrické metody jsou založeny na přímém měření úbytku substrátu či přibývání produktu. Příkladem využití pro CuAO je metoda podle Tabora *et*

*al.*, (1954) pro měření aktivity hovězí sérové AO. Metoda je založena na oxidaci benzylaminu (vhodné spíše pro EC 1.4.3.21) a měření nárůstu absorpce benzaldehydu při  $\lambda = 250$  nm. Tato metoda vyžaduje purifikovaný protein. Dochází k překryvu s oblastí absorpce proteinů ( $\lambda_{\text{MAX}} = 280$  nm) Dle Dietricha & Erwina (1969) jde o nejstarší spektrofotometrickou metodu měření aktivity aminoxidas.

Další možností, jež byla v minulosti využívána, je spektrofotometrická kvantifikace amonných iontů například pomocí Nesslerova činidla (Nessler, 1856) měnícího zbarvení v jejich přítomnosti (použili např. Guha & Krishnamurti, 1965). Metoda, již vytvořili Nagatsu & Yagi (1972) využívá reakce amoniaku s fenolem a chlornanem sodným v přítomnosti nitroprussidu sodného za vzniku modrého produktu absorbujícího při  $\lambda = 610$  nm. Je nutno vysrážet proteiny směsí wolframnanu sodného a kyseliny sírové. Tyto metody umožňují měření s různými substráty, avšak pouze v „endpoint“ uspořádání.

Jiné metody spočívají v reakci činidla s  $\Delta^1$ -pyrrolinem za vzniku barevného produktu.  $\Delta^1$ -pyrrolin vzniká oxidací putrescinu CuAO nebo oxidací spermidinu polyaminoxidasami odštěpujícími propandiamin (EC 1.5.3.14) a následnou cyklizací uvolněného 4-aminobutyraldehydu (Naik *et al.*, 1981). Metody založené na tomto principu jsou shrnuty v Tab. 2.

Další metody spočívají v spektrofotometrické kvantifikaci vznikajícího peroxidu vodíku. Ten lze kvantifikovat spřaženou enzymovou reakcí s enzymem (využívána peroxidasa) přeměňujícím bezbarvý chromogen na barevnou sloučeninu (Eisenthal & Danson, 2002). Obecnou výhodou těchto metod je možnost měření s různými substráty a všemi aminoxidasami produkujícími peroxid vodíku. Příkladem takovéto metody je metoda dle Smithe (1974), kterou používám pro spektrofotometrická měření v praktické části této práce. Metoda využívá křenovou peroxidasu pro sekundární reakci. Jako druhý substrát peroxidasy je zde použit guajakol, který je oxidován na barevný (hnědožlutý) produkt (Wilkesman *et al.*, 2014), jehož absorpce byla Smithem (1974) měřena při  $\lambda = 470$  nm. V praktické části této práce byla měření prováděna při  $\lambda = 436$  nm (modifikace dle Fréborta *et al.*, 1989). Výhodou je možnost kontinuálního měření a možnost měření v kyselých roztocích, kdy například fluorometrické metody neposkytují dostatečný signál (Smith, 1974). Výhodou guajakolu je, že není karcinogenní (Wilkesman *et al.*, 2014). Další postupy využívající peroxidasové reakce jsou uvedeny v Tab. 3.

Kvantifikace vzniklého peroxidu vodíku může být založena na tvorbě komplexů s ionty kovů. Nag *et al.* (2000) kvantifikovali vznikající peroxid vodíku na základě toho, že tvoří komplex s titaničitými ionty v roztoku. Reakce je zastavena přidáním

směsi síranu titaničitého a kyseliny sírové. V přítomnosti peroxidu vodíku vzniká žlutooranžový komplex absorbující při  $\lambda = 410$  nm.

### 2.2.1.1.1 HPLC se spektrofotometrickou detekcí

Pro kvantifikaci vznikajících produktů lze využít také HPLC se spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti (podobně jako u metod s přímou detekcí). Oproti ostatním spektrofotometrickým metodám je výhodou spojení s HPLC vyšší selektivita a citlivost (Herraiz & Chaparo, 2006). Jde o „endpoint“ metody, kdy je k analýze odebírán alikvot reakční směsi po zastavení reakce (Nissien, 1984; Li *et al.*, 2004). Příklady těchto metod jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 2: Souhrn metod spočívajících v reakci činidla s  $\Delta^1$ -pyrrolinem za vzniku barevného produktu

Autoři	derivatizace $\Delta^1$ -pyrrolinu	$\lambda$ [nm]	provedení	poznámka
Holmstedt <i>et al.</i> , 1961	<i>o</i> -aminobenzaldehyd	430	„endpoint“	
Naik <i>et al.</i> , 1981	ninhydrin	510	„endpoint“	
Angelini <i>et al.</i> , 2018	orthoaminobenzoát	435	„endpoint“	vychází ze Smithe & Barkerové, 1988

Tab. 3: Některé z postupů využívajících spřažené reakce s peroxidasou

Autoři	substrát peroxidasy	úprava produktu	$\lambda$ [nm]	provedení	poznámka
Aarsen & Kemp, 1964	<i>o</i> -dianisidin	-	470	kontinuální	
Gordon & Peters, 1967	<i>o</i> -dianisidin	okyselení HCl	540	„endpoint“	rychlejší a citlivější než Aarsen & Kemp, 1964
Szutovicz <i>et al.</i> , 1984	kys. 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonová	-	414	„endpoint“	netoxický substrát
Elliot <i>et al.</i> , 1991	4-aminoantipyrin	derivatizace 2,4-dichlorofenolem	492	kontinuální	inhibuje MAO, nutno oxidovat vzorek
Holta <i>et al.</i> , 1997	4-aminoantipyrin	derivatizace kys. vanilovou	498	kontinuální	
Smith & Barker, 1988	3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonát	derivatizace 4-aminoantipyrinem	515	kontinuální	citlivější než metody s guajakolem

Tab. 4. Příklady HPLC metod se spektrofotometrickou detekcí

autoři	substrát	produkt	derivatizace produktu	separace	$\lambda$ [nm]
Nissien, 1984	benzaldehyd	benzylamin	-	C18	254
Deng & Yu, 1999	aminoaceton	methylglyoxal	<i>o</i> -fenyldiamin	C18	315
Li <i>et al.</i> , 2004	benzaldehyd	benzylamin	2,4-dinitrofenylhydrazin	C18	382

### 2.2.1.2 Manometrické

Historicky byly využívány k určování aktivity aminoxidas metody založené na měření spotřeby kyslíku probíhající reakcí na základě poklesu tlaku plynu nad reakční směsí v uzavřené nádobě. K tomuto účelu bylo využíváno Warburgova přístroje (např. v Tabor *et al.*, 1954; Creasey 1956; Smith, 1972) což je vzduchotěsně uzavřená reakční nádoba napojená na kapalinový manometr a tvarovaná tak, aby umožňovala vložení reaktantů bez jejich smísení a následné smísení překlopením nádoby po jejím utěsnění. Úbytek či nárůst množství plynu se projeví posunem hladiny kapaliny manometru (Warburg & Christian, 1941).

### 2.2.1.3 Elektrochemické

Tyto metody využívají změn potenciálu mezi dvěma elektrodami detegujícími změny přímo v reakční směsí nebo změny ve složení protékající mobilní fáze na výstupu z chromatografu.

Tipton & Dawson, (1968) a nezávisle na nich Sweetman & Weetman, (1969) využili k určení aktivity aminoxidas měření spotřeby kyslíku Clarkovou elektrodou. Tyto postupy mají nízkou citlivost, avšak je možné je provádět i na hrubých extraktech bez předchozí purifikace složek (Mason & Olson, 1970) a umožňují kontinuální měření (Tipton & Dawson, 1968; Sweetman & Weetman, 1969). Principu těchto postupů se v dnešní době stále používá. Např. Angelini *et al.* (2018) zmiňují vhodnost své modifikace pro stanovení aktivity CuAO v hrubých rostlinných extraktech obsahujících zbytky buněčných stěn působící zákal. Na podobném principu fungují již zmiňované biosenzory aminů (viz str. 21) s imobilizovaným enzymem (např. Wimmerová & Macholán, 1999; Frébort *et al.*, 2000; Kivirand & Rinke, 2009).

Mason & Olson (1970) vyvinuli postup s vyšší citlivostí oproti kyslíkové elektrodě. Využívá spřažené reakce s peroxidasou ke kvantifikaci peroxidu vodíku. Druhým substrátem peroxidasy je hexakynoželezitan draselný, oxidovaný na hexakynoželezitan draselný. Reakce probíhá v průtokovém uspořádání a měří se změny rozdílu potenciálu mezi kalomelovou referenční a uhlíkovou elektrodou.

#### 2.2.1.3.1 HPLC s elektrochemickou detekcí

Metody využívající chromatografického dělení směsi vykazují vyšší citlivost (Yu *et al.*, 2003), není je však možno použít ke kontinuálnímu měření.

Pro měření aktivity CuAO vyvinuli Yu *et al.* (2003) metodu využívající jako substrát methylamin (vhodné spíše pro EC 1.4.3.21), jež je deaminován na formaldehyd. Formaldehyd je derivatizován reakcí s dopaminem a vzniklý produkt je separován na



reverzní fázi (C18) a kvantifikován detekčním přístrojem na elektrochemickém principu. Metoda je využitelná i ke kvantifikaci formaldehydu v biologických vzorcích.

#### 2.2.1.4 Radiometrické

Radiometrické metody měření aktivity aminoxidas využívají radioaktivně značeného substrátu a separace nezreagovaného substrátu od produktu vhodným způsobem. Po této separaci je v produktové frakci [či v produktové i substrátové v případě Okuyamy & Kobayashiho (1961)] kvantifikován analyt počítáním záblesků světla produkovaných scintilátorem, což je látka vyzařující světlo po excitaci radioaktivním zářením způsobeným rozpadem radioaktivního atomu ve značené sloučenině (Eisenthal & Danson, 2002). Mezi výhody patří možnost provádění měření aktivity v hrubém homogenátu tkáně bez předchozí purifikace enzymu, malá spotřeba vzorku a oproti metodám využívajícím fluorescence či kvantifikace peroxidu vodíku zamezení interference složek přítomných ve vzorku samotném (Wurtman & Axelrod, 1963). Dále tyto metody nejsou omezeny přítomností enzymů přeměňujících vznikající produkt (např. aldehyddehydrogenas), jelikož při vhodném způsobu separace (zejm. na ionexech) jsou po oddělení substrátu s produktem kvantifikovány i produkty jeho následných reakcí (Jain *et al.*, 1973). Ve výzkumu jsou tyto metody hojně používány a zavedeny jako spolehlivé, avšak vzhledem k jejich vyšší časové náročnosti, vysoké pořizovací ceně značených substrátů a nutnosti dodržování opatření pro práci s radioaktivním materiálem je možnost jejich využití v klinické praxi omezená (Yan *et al.*, 2004; Valley, 2006; Gella *et al.*, 2013). Všechny metody dále citované jsou „endpoint“ metodami.

##### 2.2.1.4.1 Využívající extrakci rozpouštědlem a papírovou chromatografií

Metoda, již vytvořili Okuyama & Kobayashi (1961) a její modifikace jsou v dnešní době považovány za „zlatý standard“ metod měření aktivity DAO (dle Boehm *et al.*, 2016). Původní metoda využívá jako substrátů  $^{14}\text{C}$ - značeného kadaverinu a putrescinu. Substrát a produkty jsou z reakční směsi extrahovány toluenem obsahujícím 2,5-difenyloxazol (dále PPO) jako scintilátor. Vzniklý extrakt je zahuštěn a dělen papírovou chromatografií. Substráty a produkty jsou kvantifikovány skenováním příslušných skvrn scintilačním detektorem, kdy počet detegovaných rozpadů je úměrný koncentraci látky v dané skvrně.

##### 2.2.1.4.2 Využívající extrakci rozpouštědlem

Metoda měření aktivity PAO a DAO popsaná Paschalidisem & Roubelakis-Angelakisem (2005) využívá  $^{14}\text{C}$ -značeného spermidinu (pro PAO) a putrescinu (pro

DAO). Po zastavení reakce jsou produkty extrahovány toluenem. Jako scintilátory slouží PPO a 1,4-bis(2,5-fenyloxazolyl)benzen. Nevýhodou těchto postupů je možná extrakce vysokého množství původního substrátu, jež může zkreslovat data i při použití blanku (Wu & Dyck, 1975). Vyžadují však malé množství vzorku, jsou rychlé, citlivé a použitelné pro hrubé homogenáty tkání (Wurtman & Axelrod, 1963)

#### 2.2.1.4.3 Využívající separaci na iontoměničích

Využití separace na iontoměničích má tu výhodu, že nedochází k nežádoucí přítomnosti substrátu v produktové frakci v míře, která by ovlivňovala získaná data (Wu & Dyck, 1975). Používáno pro MAO a to jak na katexech (např. Jain *et al.*, 1973), tak na anexech (např. Goridis & Neff, 1971).

#### 2.2.1.5 Fluorometrické

Tyto metody využívají přímé či nepřímé tvorby produktů, jež po ozáření světlem vhodné vlnové délky emitují světlo vlnové délky vyšší (Eisenthal & Danson, 2002). Výhodou je vysoká citlivost, jednoduchost provedení (Valley *et al.*, 2006; Gella *et al.*, 2013) a nízká cena vůči jiným srovnatelně citlivým postupům (např. radiometrii) (El-Magrabey *et al.*, 2015). Nevýhodou je, že signál je rušen interferencí způsobenou přítomností přirozeně fluoreskujících látek ve vzorku (Meyerson *et al.*, 1978; Valley *et al.*, 2006).

Jsou používány zejména pro měření aktivity benzylaminoxidasy [EC 1.4.3.21; např. metoda dle El-Magrabey *et al.* (2015)] a MAO, některé však mohou být použitelné i pro měření aktivity DAO, jako např. metoda, již vyvinuli Harada & Nagatsu, (1973), jež kvantifikuje vznikající amoniak pomocí spřažené reakce s glutamátdehydrogenasou na základě fluorescence produkovaného  $\text{NAD}^+$

Pro měření aktivity DAO by měla být použitelná také metoda dle Guibaulta *et al.* (1968) obecně sloužící k měření aktivity enzymů produkujících peroxid vodíku. Spočívá v spřažené reakci s peroxidasou, kdy jejím druhým substrátem je nefluoreskující kyselina homovanilová přeměňovaná na fluoreskující produkt.

#### 2.2.1.6 Bioluminiscenční

Metody využívající produkci světla reakční směsí jsou obecně citlivější než spektrofotometrické metody, méně nákladné než radiometrické. Oproti fluorometrickým metodám je výhodou, že nejsou rušeny signály na pozadí (Valley *et al.*, 2006). Příkladem je metoda dle Schwelberga *et al.* (2007), jež luminometricky kvantifikuje vznikající peroxid vodíku pomocí křenové peroxidasy a luminolu. Metoda byla tvořena pro diaminoxidasy, umožňuje však měřit aktivitu různých enzymů.

### 2.2.1.7 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie použili Wang *et al.* (2012a) pro měření aktivity DAO ve vzorcích z myši a krys. Jako substrát sloužil methylamin (vhodné spíše pro EC 1.4.3.21), vzniklý formaldehyd byl derivatizován dopaminem. Produkt derivatizace byl izolován pomocí HPLC na Pentafluorofenylpropylu (hydrofobní a  $\pi$ - $\pi$  interakce) a kvantifikován pomocí ESI-„ion trap“ porovnáním s interním standardem. Jeho identita byla potvrzena pomocí MS/MS na stejném přístroji. Výhodou těchto postupů je vysoká citlivost a selektivita v kombinaci s možností „high-throughput“ analýzy.

### 2.2.2 Založené na měření jiných parametrů než aktivity enzymu

Zde uvedené postupy byly zkoumány jako možnosti potenciální náhrady měření aktivity enzymu.

První ze zkoumaných možností jsou postupy imunologické. Jejich výhodou je selektivita pro danou variantu enzymu a to, že data nejsou zkreslena inhibicí substrátem a případnou přítomností inhibitoru (Boehm *et al.*, 2017). Abella *et al.* (2004) (kvantifikace HVAP1) a Schwelberg *et al.* (2012) (kvantifikace sérové DAO) používali metodu Western blot. Boehm *et al.* (2017) používali metodu ELISA. Byly zjištěny pozitivní korelace mezi aktivitou enzymu a jeho koncentrací. Schwelberg *et al.* (2012) zmiňují možnost náhrady měření aktivity těmito postupy z důvodu vyšší citlivosti, Boehm *et al.* (2017) z důvodu snadnosti a možnosti tvorby komerční sady.

Další potenciální možností je MS kvantifikace enzymu samotného. Zhang *et al.* (2010) kvantifikovali sérovou DAO pomocí LC-MS/MS peptidového sekvencování. Postup má sloužit ke kvantifikaci DAO přímo a náhradě postupů měřících aktivitu. Vzájemné porovnání však nebylo provedeno.

Zkoumána byla i možnost měření exprese. Nordquist *et al.* (2002) a Gokturk *et al.* (2004) zkoumali korelaci mezi genovou expresí diaminoxidas myši s jejich aktivitou pomocí kvantitativní RT-PCR. Nebyla nalezena pozitivní korelace, postupy tedy nelze použít k náhradě měření aktivity.

## 2.3 Příprava Cu dependentních aminoxidas

### 2.3.1 Zdroje aminoxidas

Aminoxidas se vyskytují v mnoha různých skupinách organismů, kde plní rozmanité funkce (viz kapitola 2.1.5, str. 16). Různé vzájemně orthologní varianty CuAO je pro studium detailních parametrů možno získávat přímo z jejich zdrojových organismů či je připravovat jako rekombinantní enzymy ve vhodných expresních systémech. Pro výzkum obecných vlastností je možno využít „modelových enzymů“ z organismů

produkcijících je ve zvýšené míře po vhodné indukci. Příkladem jsou etiolované semenáčky rostlin, kdy při pěstování klíčících rostlin ve tmě dochází k výraznému nárůstu tvorby CuAO v nadzemních částech (Joseph & Srivastava, 1995).

## 2.3.2 Extrakce a purifikace

### 2.3.2.1 Z rostlinných zdrojů

Rané postupy purifikace CuAO byly založeny na sledu precipitačních kroků případně doplněných jednoduchou nízkotlakou chromatografií. Jako příklady lze uvést postupy, jež vytvořili Werle & Pechmann (1949) (frakční precipitace acetonem, poté síranem amonným), Mann (1955 opakovaná frakční precipitace síranem amonným, 1961 doplněno chromatografií na hydroxyapatitu a DEAE-cellulose) a McGowan a Muir (1971)[frakční precipitace síranem amonným, poté ethanolom, chromatografie na katexu (fosfocellulosa)].

Kluetz *et al.* (1980) využívají pro purifikaci CuAO z hrachových semenáčků postup založený na frakční precipitaci síranem amonným, kdy jsou nejprve sráženy nežádoucí proteiny a po zvýšení koncentrace síranu amonného frakce obsahující enzym. Po resuspendování jsou proteiny dále sráženy přidáním směsi ethanolu s chloroformem. Po centrifugaci je CuAO z vodno-ethanolové frakce opět přesrážena síranem amonným. Vzniklá sraženina je resuspendována (náročné, riziko ztrát). Následuje přečištění chromatografií na anexu (DEAE-cellulosa) a gelovou permeační chromatografií. McGuirl *et al.* (1994) postup doplnili zařazením chromatografie na hydroxyapatitu mezi poslední dva kroky.

Wimmerová *et al.* (1993) vyvinuli způsob purifikace CuAO z hrachových semenáčků pěstovaných ve tmě. Postup spočívá v homogenizaci semenáčků bez kořene, filtraci homogenátu následované precipitací nežádoucích proteinů síranem amonným. Supernatant je následně separován hydrofobní interakční chromatografií s elucí postupným snižováním obsahu síranu amonného. Aktivní frakce je separována na katexu a poté gelovou permeační chromatografií. Postup, jež vytvořili Šebela *et al.* (1997) pro pískavici řecké seno (prvotní příprava vzorku před separací podobná) využívá frakční precipitace síranem amonným, kdy supernatant po první precipitaci je srážen vyšší koncentrací síranu amonného a vzniklá sraženina obsahující enzym je resuspendována a odsolena pomocí dialýzy. Další srážení je prováděno tepelnou denaturací nepotřebných proteinů a supernatant po centrifugaci je odsolen dialýzou. Dialyzát je separován na anexu (DEAE-cellulosa) a poté na hydroxyapatitu. Téměř identický postup byl opakovaně použit i v jiných pracích Šebela *et al.* (1998, 2005). V praktické části této diplomové práce byl využit postup na podobném základu

doplněný o dva další purifikační kroky (viz kapitola 3.2.1, str. 41). Pufry v těchto postupech mohou obsahovat měďnaté ionty pro stabilizaci enzymu (Wimmerová *et al.*, 1993; Šebela *et al.*, 1997; Šebela *et al.*, 1998).

Pietrangeli *et al.*, (2004) použili postup izolace CuAO ze semenáčků hrachoru cizrnového, obnášející homogenizaci za sníženého pH, což vede k zachycení CuAO na zbytcích buněčných stěn. Tento pevný materiál je důkladně promyt pufrem (pomocí tkaniny) pro vymytí nezachycených proteinů. CuAO je následně uvolněna do roztoku zvýšením iontové síly pomocí síranu amonného (proteiny precipitované touto koncentrací zároveň zůstávají zachyceny na tkanině, prošlý zbytek oddělen centrifugací). Následně je purifikovaný enzym vysrážen vyšší koncentrací síranu amonného. Sraženina je poté resuspendována a přečištěna na anexu (DEAE-cellulosa) a následně na katexu (SP-Sepharosa).

Pro udržení aktivity enzymu je vhodné všechny operace purifikačního procesu provádět při teplotě okolo 5°C (Kluetz *et al.*, 1980, Wimmerová *et al.*, 1993, Šebela *et al.*, 1998). Toto platí i pro následně uváděné postupy purifikace ze živočišných a houbových zdrojů. V případě zdrojů bakteriálních není chlazení nutné (Freeman *et al.*, 1996, Lee *et al.*, 2008).

### **2.3.2.2 Z živočišných zdrojů**

#### **2.3.2.2.1 CuAO z krevní plazmy**

Pro purifikaci CuAO z koňské plazmy vytvořili Carter *et al.* (1994) postup obnášející frakční precipitaci síranem amonným, resuspendování cílové frakce a její separaci na anexu (Q-Sepharosa). Následuje odsolení dialýzou a separace afinitní chromatografií (aminohexyl-Sepharosa) a přečištění na hydroxyapatitu. Poté následuje gelová filtrace. Pro zvýšení specifické aktivity je možno zařadit ještě gradientovou FPLC na anexu (Mono-Q HR). Wang *et al.* (1994) vytvořili odlišný postup, kdy cílem byla také současná extrakce ceruloplasminu druhou větví postupu (zde nezmíněno). Nejprve je provedena frakční precipitace síranem amonným. Následně autoři nabízejí dvě možnosti postupu obnášející separaci na anexech (aminoethyl-Sepharosa a Q-Sepharosa) a afinitní chromatografii (ConA-Sepharosa, na nosiči imobilizován konkanavalin A, váže glykosylované proteiny) v různém pořadí.

#### **2.3.2.2.2 Membránové CuAO (orthology HVAP1)**

Lizcano *et al.* (1998) purifikovali CuAO z plicní tkáně skotu. Plicní tkáň je v tomto postupu nasekána a řádně promyta, aby se zabránilo kontaminaci sérovou CuAO. Následuje homogenizace a frakční centrifugace organel, dále je používána frakce

obsahující mikrosomy. Mikrosomální frakce byla inkubována s detergentem. Následovala centrifugace a dále byl použit supernatant. Byla provedena chromatografie na Cibacron Blue 3GA-agarose, na hydroxyapatitu a afinitní chromatografie na agarose s čočkovým lektinem. Poté byla provedena FPLC (rychlá/střednětlaká kapalinová chromatografie proteinů) na anexu (Resource Q) a gelová filtrace pomocí FPLC. Postup pro ledvinovou tkáň prasat vyvinutý Wilflingsederovou & Schwelbergem (2000) obnáší po homogenizaci vzorku sled centrifugačních kroků. Získaná aktivní frakce je postupně přečišťována pomocí FPLC nejprve afinitní (ConA-Sepharosa a následně Sepharosa s navázaným heparinem), poté na anexu (Mono Q HR).

### **2.3.2.3 Z bakteriálních zdrojů**

Freeman *et al.* (1996) prováděli purifikaci aminoxidasy z *Arthrobacter globiformis* (grampozitivní bakterie) po kultivaci na médiu obsahujícím fenylethylamin. Zmrazené buňky byly suspendovány v pufru obsahujícím inhibitory proteas a lysozym a narušeny ultrazvukem a použitím „French pressu“. Po centrifugaci a odsolení dialýzou byla provedena separace na anexu (DEAE-cellulosa). Následovaly tři vysokoúčinné separace kapalinovou chromatografií a to na anexu (Mono Q HR), hydrofobní interakční chromatografií (fenyl-Superosa) a chromatofokusací (Mono P HR).

Lee *et al.* (2008) vytvořili postup izolace CuAO z mykobakterií kultivovaných na médiu obsahujícím benzylamin jako zdroj dusíku. Buňky jsou po resuspendování rozrušeny ultrazvukem a hrubý extrakt je srážen protaminsulfátem. Supernatant je separován pomocí FPLC na anexu (Mono Q HR), gelové filtrace (Superose HR) a hydrofobní interakční chromatografie (fenyl-Sepharosa). Frakce získané v posledním kroku a vykazující aktivitu jsou chromatograficky odsoleny.

### **2.3.2.4 Z houbových zdrojů**

Frébort *et al.* (1999) purifikovali CuAO oxidující methylamin z mycelia plísně *Aspergillus niger*. Bylo třeba tuto CuAO oddělit od ostatních variant (více separačních kroků). Produkce enzymu byla indukována kultivací na médiu s methylaminem jako zdrojem dusíku. Homogenát byl centrifugován a supernatant frakčně precipitován síranem amonným. Následovala dvoukroková frakcionace resuspendovaného precipitátu na anexu (DEAE-cellulosa, poté DEAE-Sephadex). Cílová frakce byla precipitována síranem amonným a separována na anexu (DEAE-Sephadex) a přečištěna gelovou permeační chromatografií.

### 2.3.3 Příprava rekombinantních CuAO

Mimo purifikace ze zdrojového materiálu je možno CuAO produkovat ve vhodném expresním systému a z něj poté vhodným způsobem purifikovat. Příklady takovéto exprese genu pro CuAO v jiném organismu jsou: Juda *et al.* (2001) produkovali v *E. coli* fúzní protein CuAO z *Aspergillus niger* s polypeptidovou značkou Strep-Tag II umožňující snadnou izolaci pomocí afinitní chromatografie. Elmore *et al.* (2002) produkovali lidskou ledvinnou diaminoxidasu v buňkách octomilky pěstovaných jako buněčná kultura. Rea *et al.*, 2004 provedli úspěšné zvýšení citlivosti rostlin tabáku k exogenně aplikovaným aminům modifikací rostlin tabáku vedoucí k produkci CuAO hrachu a FAD dependentní polyaminoxidasy kukuřice. Kolaříková *et al.* (2007) získali aminoxidasu z *Aspergillus niger* produkcí v *Saccharomyces cerevisiae* (dle autorů jde o jediný známý organismus, u nějž bylo dokázáno, že neobsahuje vlastní aminoxidasu).

## 2.4 Měření enzymové aktivity pomocí hmotnostní spektrometrie

Hmotnostně spektrometrické techniky při měření enzymové aktivity nabízí vysokou citlivost, jednoduchost a rychlost měření společně s možností přímé detekce (bez nutnosti derivatizace či použití substrátů fluoreskujících, absorbujících či přeměňovaných na takovéto produkty) a identifikace látek, včetně případně přítomných neznámých vedlejších produktů a intermediátů reakce. Další výhodou je vysoká selektivita pro analyty různých molekulových hmotností (Wang *et al.*, 2012b; Šebela, 2021). V případě stejné molekulové hmotnosti substrátu a produktu (např. měření aktivity isomeras) je možno využít spřažené reakce přeměňující jeden z analytů na látku jiné molekulové hmotnosti (Šebela, 2021). Kvantifikace substrátu či produktu může být relativní měřením poměru intenzity signálu substrátu vůči produktu (Wang *et al.*, 2012b; Šebela 2021) nebo mohou být kvantifikovány porovnáním s interním standardem podobné struktury a ionizovatelnosti (Šebela, 2021). Výhodou jsou také nízké náklady na rutinní měření (po počáteční jednorázové investici) a možnost „high-throughput“ měření pro farmakologické aplikace (např. screening inhibitorů) (Greis, 2007). Také lze měření enzymové aktivity či screening inhibitorů provádět detekcí hmotnostního přírůstku enzymu při vzniku komplexu enzym-substrát či enzym-inhibitor (Greis, 2007; Wang *et al.*, 2012b).

### 2.4.1 Ionizačních techniky a analyzátory pro měření enzymové aktivity

Pro měření enzymové aktivity se používají měkké ionizační techniky. Ionizace elektrosprejem je kombinována s online napojením na chromatografickou separaci a

jako analyzátoři jsou používány např. iontové pasti, kvadrupólové analyzátoři (Yan *et al.*, 2004) či jejich kombinace (Greis, 2007; Šebela, 2021). Nevýhodou je vysoká citlivost systému na kontaminaci solemi a mnohonásobný náboj iontů (Wang *et al.*, 2012b). Výhodou oproti MALDI je spolehlivější kvantifikace analytů (Greis, 2007). Příkladem použití pro aminoxidas je postup dle Wanga *et al.* (2012a) na str. 27.

MALDI ionizace je používána ve spojení s ToF analyzátořem, iontovou cyklotronovou rezonancí, popř. jejich kombinacemi s kvadrupólovým analyzátořem. Výhodou je měření s jednonásobně nabitými ionty a tolerance solí. Nevýhodou je přítomnost signálu použité matrice v oblasti nízkých  $m/z$  poměrů (příklady řešení viz následující kapitola) (Greis, 2007; Wang *et al.*, 2012b). Možné postupy obnáší kokrytalizaci alikvotu reakční směsi s matricí a imobilizaci substrátu (pro měření aktivity) či enzymu (pro screening substrátů a inhibitorů) na destičku následované pokrytím matricí (Šebela, 2021). Příklady konkrétních použití jsou uvedeny následovně.

#### **2.4.1.1 Použití MALDI ToF pro měření enzymové aktivity**

Příklad měření aktivity aminooxidas jinými MS technikami je uveden na str. 27 Co se MALDI-ToF týče, byla prováděna měření na jiných oxidasách. Bungert *et al.* (2004a) měřili aktivitu pyranosaoxidas s použitím iontové kapalné matrice (viz str. 35) a to dihydroxybenzoátu pyridinia. Substrát (glukosa) a produkt (glukoson) byly kvantifikovány dle poměru intenzit signálu. K měření aktivity glukosaoxidas Bungert *et al.* (2004b) používali různých běžných matric. Pro měření koncentrace glukosy (standard  $^{13}\text{C}$ -glukosa) byla optimální kys. dihydroxybenzoová (dále DHB), měření koncentrace kys. glukonové (substrát  $^{13}\text{C}$ -glukosa, standard neznačená kys. glukonová) kys. sinapová (dále SA). Bayramoglu *et al.* (2019) zkoumali produkty vznikající při degradaci barviva Cibaron Blue 3GA lakasou a identifikovali je v různých reakčních časech. Jako matrice sloužila DHB. Aktivita nebyla měřena, prováděná měření byla pouze kvalitativní.

Měření aktivity peptidas (a proteas) má široké využití ve farmaceutickém výzkumu a potenciál pro tvorbu diagnostických metod. Kvantifikace je založena zejména na použití izotopově značených interních standardů (Šebela, 2021). Příkladem samotného měření aktivity je postup, jež vytvořili Elased *et al.* (2006) pro ACE2 (angiotenzinkonvertasa 2, vliv na činnost srdce a ledvin) pomocí SELDI-ToF s využitím hydrofobního povrchu. Z hlediska vývoje léčiv má význam použití pro screening potenciálních inhibitorů cílových enzymů. Např. Yanes *et al.* (2005) identifikovali inhibitory trypsinu (příbuzné enzymy se účastní srážení krve) v extraktu z pijavic. Podobně lze využít tato měření i k identifikaci substrátů či určování substrátové specificity. Např. Watson *et al.* (2011)



sestavovali a porovnávali „knihovny“ proteas přítomných v séru a plicní tekutině tak, že identifikovali případné produkty rozpadu (a tím i štěpná místa) zvolených syntetických peptidů. Dalším možným využitím je detekce patogenů obsahující proteasy se specifitou charakteristickou pro daný organismus na základě identifikace produktů rozpadu zvolených peptidů (např. Sabbagh *et al.* (2015) diagnostika Aspergillózy).

V posledních letech je také intenzivně zkoumáno využití MALDI-ToF pro detekci produktů  $\beta$ -laktamas. Tyto enzymy hydrolyzují amidovou vazbu ve struktuře  $\beta$ -laktamových antibiotik (např. penicilin a jeho varianty). Detekce vznikajících produktů může být použita např. k určení odolnosti bakterií (Hoof *et al.*, 2012; Šebela, 2021), či zjištění přídavku  $\beta$ -laktamasy do mléka (ilegální aditivum) (Wang *et al.*, 2012b).

Dále je možno MALDI-ToF MS použít pro charakterizaci proteinkinasy a fosfatasy. Co se kinasy týče, např. Kondo & Nishimura (2009) vytvořili postup screeningu potenciálních syntetických substrátů kinasy a také jejich inhibitorů. Toto je významné pro farmaceutický průmysl, kdy kinasové kaskády regulačních drah jsou častými cíli léčiv (inhibitory). Je však požadována vysoká selektivita daného inhibitoru pro danou variantu kinasy. Podobný význam mají i fosfatasy, účastníci se také regulačních kaskád. Příkladem měření s fosfatasy je např. Houstonem *et al.* (2000) prováděné měření kinetických parametrů protein-tyrosin-fosfatasy.

Dalším významným enzymem, jehož aktivita může být měřena pomocí MALDI-ToF MS je acetylcholinesterasa. Např. Hu *et al.* (2006) použili pro měření její aktivity a screening inhibitorů oxidovaných uhlíkových nanotrubiček jako matrice. Xu *et al.* (2008) použili DHB jako matrice pro měření tétož pomocí MALDI-FTICR.

#### **2.4.1.2 NIMS („Nanostructure initiator mass spectrometry“)**

Měřit enzymovou aktivitu LDI-ToF technikami lze také pomocí postupů NIMS, využívajících perfluorovaný substrát nekovalentně vázaný na destičku pokrytou kapalným iniciátorem. Na destičku je nanesen vzorek a v případě přítomnosti enzymu dochází ke štěpení či jiné modifikaci produktu. Po omytí destičky v požadovaném čase zůstane přítomen pouze iniciátor a návázané substráty a produkty, které jsou identifikovány na základě hmotnostního rozdílu a kvantifikovány na základě poměru signálu. Výhodou postupu je vysoká citlivost a možnost přímého použití na hrubých buněčných extraktech (Northern *et al.*, 2008). Northern *et al.* (2008) tento postup použili pro charakterizaci  $\beta$ -galaktosidasy termofilních bakterií (substrátem galaktosa modifikovaná argininem a polyfluorovaným alkylovým řetězcem).

### 2.4.1.3 „MS imaging“

Enzymovou aktivitu je možno měřit také lokalizovaně na tkáňových řezech a určit její rozložení ve zkoumaném orgánu (plošně či sestavením 3D snímku z více řezů). Postupy toto zajišťující umožňují získání více informací než měření měření s tkáňovými homogenáty. Nevýhodou je možnost vysoké komplexity spekter z důvodu přítomnosti jiných analytů (Hamilton *et al.*, 2020). Příkladem je metoda měření lokální aktivity fosfolipasy C, již použili Hamilton *et al.* (2020) pro tkáňové řezy jedové žlázy kobry. Na tkáňový řez byla aplikována vrstva deuteriem značeného fosfatidylcholinu (z důvodu odlišení od endogenního) a reakce zastavena vysušením. Poté byla aplikována vrstva matrice (kyselina  $\alpha$ -kyanohydroxyskořicová, dále CHCA) a provedeno měření pomocí MALDI-ToF.

## 2.5 MALDI MS malých molekul

Výhodou MALDI, jako ionizační techniky pro biochemické MS analýzy, je měkká ionizace a oproti ESI produkce zejména jednonásobně nabitých iontů. Další výhodou je značný hmotnostní rozsah při použití pro analýzu makromolekul. Pro analýzu malých molekul ( $m/z < 1000$ ) je však značnou nevýhodou přítomnost iontů matrice, jejichž signály se překrývají se signály analytů a potlačují je. Další nevýhodou je potlačení signálů, způsobené přítomností nabitých molekul, vedoucí k omezenému využití v kvantitativní analýze. Tyto nevýhody však mohou být minimalizovány. V případě iontové suprese přítomnými složkami lze např. vzorek vhodně přečistit (Wang *et al.*, 2012b). Postupy sloužící k potlačení signálů matrice a dalšímu omezení iontové suprese jsou uvedeny v této kapitole.

### 2.5.1 přímé měření s běžnými maticemi

Výhodou postupů využívajících běžně používaných matic (oproti dále uvedeným maticím speciálním) je dostupnost materiálu a použití běžného vybavení (Guo *et al.*, 2002). Např. Guo *et al.* (2002) k potlačení signálu matrice CHCA použili iontový detergent CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) v molárním poměru 1:1000 vůči matici. Postup je založen na pozorování, že některé analyty samy potlačují signály matrice a využitím přídatku CTAB do matrice lze dosáhnout téhož efektu. Postup se označuje jako MSLDI („matrix suppressed laser desorption ionization“). Postup založený na tomto základu je použit pro měření v praktické části této diplomové práce. Další možností úpravy postupu je použití rozpouštědel vedoucích k rychlé tvorbě homogennějších krystalů (Wang *et al.*, 2012b).

V případě, že je třeba analyt kvantifikovat, je možné použít jako interní standard látku podobných vlastností a jiné molekulové hmotnosti (Wang *et al.*, 2012b). Takto postupovali např. Grant *et al.* (2003) při kvantifikaci glukosy porovnáním se známým množstvím sorbitolu.

### 2.5.2 matrice pro měření malých molekul

Jednou z možností odstranění vlivu signálů matrice z oblasti nízkých  $m/z$  poměrů je jejich „posunutí“ směrem k vyšším  $m/z$  hodnotám výběrem těžší matrice (Wang *et al.*, 2012b). Příkladem je použití F20TPP [*meso*-tetrakis(pentafluorofenyl)porfyrin; 974,6 Da] např. pro analýzu sacharidů, mastných kyselin a léčiv (Van Kampen *et al.*, 2006).

Další možností je použití ILM („ionic liquid matrices“). Jejich výhodou je vysoká reprodukovatelnost a lineární závislost intenzity signálu na koncentraci (Wang *et al.*, 2012b) a vyšší signál analytu oproti matricovým signálům (Santos *et al.*, 2004). Iontové kapaliny jsou soli kapalné za běžných laboratorních teplot (Lei *et al.*, 2017). Příkladem je sůl triethylaminu s CHCA, kterou Santos *et al.*, (2004) použili k analýze alkaloidů po jejich tenkovrstevné chromatografii (nanesení matrice na skvrnu analytu, měření přímo z chromatografické destičky). Podobně je možno využít i matrice složené z pevných iontových krystalů (např. Ham *et al.*, 2006).

Také je možno k odstranění signálu matrice použít přístupů LDI („laser desorption ionization“) využívajících destiček, jejichž povrch samotný slouží jako matrice či anorganického materiálu v roztoku analytu. Příklady jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Přehled alternativ k použití organické matrice

autoři	„matricový“ materiál	mód	specifika
Shen <i>et al.</i> , 2001	porézní křemík (destička)	+/-	fragmentace analytu minimální
Xu <i>et al.</i> , 2003	uhlíkové nanotrubičky (destička)	+	vysoká citlivost a reprodukovatelnost
Dong <i>et al.</i> , 2010, Lu <i>et al.</i> , 2011	grafen (disperse)	+/-	vysoká reprodukovatelnost a tolerance solí
Sunner <i>et al.</i> , 1995	grafit (disperse)	+	může zanášet iontovou optiku
Kang <i>et al.</i> , 2019	oxid grafenu (disperse)	+	
Kinumi <i>et al.</i> , 2000	kovy, oxidy (disperse)	+	
Lai <i>et al.</i> , 1998	stříbro (destička)	+	koloidní stříbro na Ag, Au či Pt fólii
Kang <i>et al.</i> , 2019	nanočástice zlata (disperse)	+	
Park <i>et al.</i> , 2017	parylen (destička)	+	polymer napařený na kovové destičce

### 2.5.3 derivatizace analytu

Rušení signály matrice se lze vyhnout také vhodnou derivatizací analytu. To může vést např. k posunu jeho  $m/z$  poměru mimo oblast signálů matrice. Také je možno využít derivatizace izotopovými značkami a porovnání s interním standardem (derivatizován značkou o jiné  $M_r$ , lze použít ke kvantifikaci). Dále lze použít derivatizace skupinami či

sloučeninami zvyšujícími ionizovatelnost analytu a tím zintenzivňujícími jeho signál oproti signálu matrice (Wang *et al.*, 2012b). Poslední uvedený přístup může využívat takovéto snadno ionizovatelné značky i jako náhrady matrice samotné. Takto funguje např. DMNTH [4-dimetylamino-6-(4-metoxy-1-naftyl)-1,3,5-triazin-2-hydrazin], sloužící jako reaktivní matrice pro analýzu karbonylových sloučenin, s nimiž tvoří snadno ionizovatelný hydrazon (Mugo *et al.*, 2007).

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiál a metody

##### 3.1.1 Chemikálie

- 1,4-dioxan (Lachema, Česká republika)
- 1,5-diamino-3-pentanon dihydrochlorid (připravil prof. Lumír Macholán, PřF MU)
- 1,8-diamino-3,6-dioxaoktan (připravil školitel; Šebela et al., 2007b)
- 1-methoxynaftalen (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- 2-hydroxykadaverin dihydrochlorid (připravil prof. Lumír Macholán, PřF MU)
- 2-hydroxyputrescin dihydrochlorid (připravil prof. Lumír Macholán, PřF MU)
- 4-(aminomethyl)piperidin (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- aceton (Merck, Německo)
- acetonitril (Merck, Německo)
- agmatin sulfát (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- akrylamid (Serva, Německo)
- aminobutylaldehyd diethylacetal (ABAL; Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- aminopropylaldehyd (APAL; Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- cetyltrimethylamoniumbromid (poskytl prof. Juraj Ševčík, KACH PřF UP)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Německo)
- cystamin dihydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- diaminohexan dihydrochlorid (poskytl prof. Lumír Macholán, PřF MU)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Fluka Chemie, Švýcarsko)
- dimethylamin hydrochlorid (poskytl doc. Miroslav Soral, KOCH PřF UP)
- dithiothreitol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- dodecylsírán sodný (SDS; Serva, Německo)
- ethanol 95% (Lach-ner, Česká republika)
- furfural (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- glycin (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- guajakol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- histamin dihydrochlorid (ICN Pharmaceuticals, USA)
- hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- hydrazin hydrát (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- hydrogenfosforečnan didraselný (Lach-ner, Česká republika)
- hydrogenuhličitan amonný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)

- hydrogenuhličitan sodný (Fluka Chemie, Švýcarsko)
- hydroxid draselný (Lach-ner, Česká republika)
- chlorid hlinitý (poskytl doc. Miroslav Soural, KOCH PřF UP)
- chlorid manganatý (Fluka Chemie, Švýcarsko)
- chlorid sodný (Lach-ner, Česká republika)
- jodacetamid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- kadaverin dihydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- katalasa (z jater skotu,  $\geq 20000 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ; Sigma-Aldrich Chemie, Německo; poskytl prof. Marek Petřivalský, KBC PřF UP)
- křenová peroxidasa (140 U/mg, Fluka Chemie, Švýcarsko)
- kyanurchlorid (poskytl doc. Miroslav Soural, KOCH PřF UP)
- kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (Bruker Daltonik, Německo)
- kyselina fosforečná 85% (Lach-ner, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková 37% (VWR Chemicals, Francie)
- kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- kyselina  $\alpha$ -kyanohydroxyskořicová (Bruker Daltonik, Německo)
- Laemmliho vzorkový pufr 2x koncentrovaný (Bio-Rad, USA)
- methanol (Biosolve Chimie, Francie)
- *N*-(3-aminopropyl)piperidin (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED; Merck, Německo)
- *N,N'*-metylenbisakrylamid (Serva, Německo)
- *n*-butanol (Penta, Česká republika)
- peroxidisíran amonný (APS; Bio-Rad, USA)
- protaminsulfát (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- putrescin dihydrochlorid (Fluka Chemie, Švýcarsko)
- QC Colloidal Coomassie Stain (Bio-Rad, USA)
- sacharosa (Fluka Chemie, Švýcarsko)
- síran amonný (Lach-ner, Česká republika)
- spermidin trihydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- standard pro SDS-PAGE Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Bio-Rad, USA)
- standardy pro kalibraci pH metru o pH 4, 7 a 10 (Giorgio Berma, Itálie)
- tetrahydrofuran (THF; Lach-ner, Česká republika)
- toluen (Lach-ner, Česká republika)
- triethylamin acetát (Merck, Německo)

- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris; MP Biomedicals, USA)
- trypsin (SOL-u trypsin rekombinantní,  $\geq 10000 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ; Merck, Německo)
- uhličitán draselný (Fluka Chemie, Švýcarsko)
- voda demineralizovaná (z výrobničku MilliQ, Merck Millipore, Německo)
- $\alpha$ -aminoadipát- $\delta$ -semialdehyd ethylenacetal (AASAL; Chiralix, Nizozemí)

### 3.1.2 Přístroje a pomůcky

- analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko)
- čistička ultrazvuková K-5LM (Kraintek, Slovensko)
- digestoř M1 500 (MERCİ, Česká republika)
- digitální pH metr pH 50 (XS instruments, Čína)
- elektroforetická komůrka Mini PROTEAN 3 (Bio-Rad, USA) a příslušenství k ní (skla, stojan na lití gelu)
- elektromagnetická míchačka Big-squid (IKA, Německo)
- elektromagnetická míchačka C-MAG HS 4 (IKA, Německo)
- elektromagnetická míchačka C-MAG HS 7 (IKA, Německo)
- elektromagnetická míchačka M2-D (Chromservis, Česká republika)
- hmotnostní spektrometr MALDI-TOF Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, Německo)
- hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme (Bruker Daltonik, Německo)
- homogenizátor ULTRA-TURRAX T 50 basic (IKA, Německo)
- chromatografická kolona ENrich SEC 650  $10 \times 300 \text{ mm}$  (Bio-Rad, USA)
- chromatografická kolona UNO S12 (Bio-Rad, USA)
- kapalinový chromatograf střednětlaký BioLogic DuoFlow (Bio-Rad, USA) s UV-vis detektorem BioLogic QuadTec (Bio-Rad, USA)
- MALDI destička MSP AnchorChip 96 (Bruker Daltonik, Německo)
- MALDI destička MSP BigAnchor 96 BC (Bruker Daltonik, Německo)
- MALDI destička MTP target plate ground steel BC (Bruker Daltonik, Německo)
- minicentrifuga Frontier S306 (Ohaus, USA)
- monitor UV-1 (Pharmacia, Švédsko)
- nylonová tkanina
- peristaltická pumpa PCD 1082 (Dávkovací čepadla Kouřil, Česká republika)
- pipetové špičky ZipTip-C18 (Merck-Millipore, Irsko)
- předvážky Pioneer (Ohaus, USA)
- skener Umax U9908-HAR0 (Amersham Biosciences, VB)

- skleněná chromatografická kolona 2,5 × 20 cm (Sigma-Aldrich, USA) plněná DEAE Sepharosou (Amersham Biosciences, Švédsko)
- skleněná chromatografická kolona 2,5 × 20 cm (Sigma-Aldrich, USA) plněná krystalickým hydroxyapatitem (připraven školitelem podle Mazin a Sulimova, 1975) ve směsi s Celitem (Fluka, Švýcarsko)
- skleněná chromatografická kolona 2,5 x 50 cm (Sigma-Aldrich, USA) plněná Sephadexem G-25 Medium (Pharmacia, Švédsko)
- spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, VB)
- stolní centrifuga Microspin 12 (Biosan, Litva)
- termoblok (Major Science, Tchaj-Wan)
- termostat Thermomixer Comfort (Eppendorf, Německo)
- třepačka KS 130 (IKA, Německo)
- ultrafiltrační cela Amicon 8200 (Merck, Německo)
- vakuová pumpa (KIF LAB, Francie)
- vodní lázeň digitální SUB 6 (p-Lab, ČR)
- vortex (Argolab, Itálie)
- vortex Genius 3 (IKA, Německo)
- výrobce ledu (Brema, Itálie)
- zapisovač REC 112 (Amersham Pharmacia Biotech, Švédsko).
- zdroj pro elektroforézu PowerPac HC (Bio-Rad, USA)
- zdroj stlačeného dusíku (začleněn do budovy laboratoře)
- Běžné laboratorní vybavení: automatické pipety (Eppendorf, Německo) a špičky k nim (Eppendorf, Německo; Sarstedt, Německo), kádinky, odměrné válce, špachtle, mikrozkuhavky a stojany na ně, stříčky, nádoby na ledovou tříšť, květy do spektrofotometru (skleněné a plastové), teploměr, magnetická míchadla atd.

### **3.1.3 Biologický materiál**

Hrách setý byl pěstován ve tmě po dobu 7 dní na vrstvě perlitu a každý den zaléván vodou. Nadzemní části semenáčků byly odděleny nůžkami a skladovány zmrazené při teplotě -28 °C.



## 3.2 Metody

### 3.2.1 Extrakce a purifikace PSAO

Všechny purifikační kroky byly prováděny za teploty 0-5°C (chlazení nádob ve směsi vody s ledem). Nadzemní části semenáčků hrachu (1 kg) byly homogenizovány 10 minut tyčovým homogenizátorem ve 2 l 0,1 mol·l<sup>-1</sup> K-fosfátového pufru, pH 7,0 obsahujícím 10% sacharosu, 15 mmol·l<sup>-1</sup> merkaptoethanol a 1 mM EDTA. Homogenát byl filtrován přes nylonovou tkaninu a centrifugován 30 min při 4200 g.

K supernatantu byla za míchání na elektromagnetické míchače přidána 5% suspenze protaminsulfátu (pH upraveno na 6,5 kyselinou fosforečnou), a to tak, že 1 g protaminsulfátu odpovídal 10 g proteinu v supernatantu. Po posledním přidavku a 10 min míchání byla provedena centrifugace 30 min při 4200 g. K supernatantu byl za míchání přidán 0,5 mol·l<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>, aby výsledná koncentrace MnCl<sub>2</sub> činila 7,5 mmol·l<sup>-1</sup>. Roztok byl ještě 30 minut míchán a poté 30 min centrifugován při 4200 g. Proteiny v supernatantu byly dále sráženy přidáváním jemně práškového síranu amonného do 65% saturace (430 g·l<sup>-1</sup>). Následovalo 30 min míchání a centrifugace při 4200 g po dobu 30 min. Bylo-li třeba, precipitát byl uchováván zmrazený při -28 °C. Precipitát byl dále suspendován do maximálního rozpuštění ve 40 ml pufru A: 20 mmol·l<sup>-1</sup> fosforečnan draselný (pH 6,0) obsahující 5 mmol·l<sup>-1</sup> 2-merkaptoethanol, 1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA a 5% (w/v) glycerol. Nerozpuštěný podíl byl odstraněn centrifugací 30 min při 4200 g. Následovalo chromatografické odsolení na Sephadexu G-25. Vzorek byl nanesen na kolonu ekvilibrovanou pufrům A. Průtoková rychlost zajištěná peristaltickou pumpou byla 2 ml·min<sup>-1</sup>. Separace byla monitorována při 280 nm pomocí monitoru UV-1 a zaznamenávána na zapisovači REC 112. Odsolený roztok proteinů byl nanesen na kolonu obsahující DEAE-Sepharosu ekvilibrovanou pufrům A. Průtoková rychlost byla 2 ml·min<sup>-1</sup>. Separace byla monitorována při 280 nm. Sbírána byla nezachycená frakce. Ta byla ihned nanesena na kolonu obsahující hydroxyapatit s celitem ekvilibrovanou 20 mmol·l<sup>-1</sup> K-fosfátovým pufrům, pH 7,0. Průtoková rychlost byla 2 ml·min<sup>-1</sup>. Separace byla monitorována při 280 nm. Pro eluci byl použit 0,5 mol·l<sup>-1</sup> K-fosfátový pufr, pH 7,0. Eluát s aktivitou aminoxidasu byl dialyzován přes noc proti 20 mmol·l<sup>-1</sup> K-fosfátovému pufru, pH 5,8. Dialyzovaný roztok byl zahuštěn ultrafiltrací (limit zadržování 10 kDa).

Vzorek byl dále separován na iontoměničové koloně (katexu) UNO S12 s použitím průtokové rychlosti 1 ml·min<sup>-1</sup> a 1 ml smyčky pro nanášení na chromatografu BioLogic DuoFlow. Eluce byla prováděna gradientem narůstající koncentrace NaCl (0-1 mol·l<sup>-1</sup>) v mobilní fázi (20 mmol·l<sup>-1</sup> K-fosfátový pufr, pH 5,8) a monitorována pomocí detektoru

při 280 a 500 nm. Aktivní frakce byly spojeny, odsoleny dialýzou proti 20 mmol·l<sup>-1</sup> K-fosfátovému pufru (pH 7,0) a zahuštěny ultrafiltrací. Posledním krokem byla separace gelovou chromatografií na koloně Enrich SEC650 připojené k chromatografu BioLogic DuoFlow, kdy mobilní fází byl 20 mmol·l<sup>-1</sup> K-fosfátový pufr, pH 7,0. Průtoková rychlost činila 0,75 ml·min<sup>-1</sup>, nanášecí smyčka měla objem 500 µl. Separace byla monitorována pomocí detektoru při 280 a 500 nm. Aktivní frakce byly spojeny a zahuštěny ultrafiltrací. Dialyzovaný roztok byl zahuštěn ultrafiltrací (limit zadržování 10 kDa). Purifikovaný enzym byl skladován v objemových alikvotech při -28 °C.

### 3.2.1.1 Měření aktivity pomocí spřažené peroxidasové reakce

Aktivita PSAO v jednotlivých fázích purifikace byla měřena metodou dle Frébort *et al.* (1989). Tato spektrofotometrická metoda je založena na spřažené enzymové reakci s využitím křenové peroxidasy (HRP), jež v přítomnosti peroxidu vodíku (který vzniká reakcí PSAO) přeměňuje guajakol na barevný produkt.

Pro měření bylo využito peroxidasové směsi sestávající se z 500 µl 35 mmol·l<sup>-1</sup> guajakolu a 500 µl HRP (6,25 mg/50 ml) přidaných k 30 ml 0,117 mol·l<sup>-1</sup> K-fosfátovému pufru, pH 7,0. Do křemenné kyvety (objem 3 ml) bylo za stálého míchání napipetováno 1,55 ml této směsi předehřáté na 30 °C, v součtu 150 µl destilované vody a enzymového roztoku (2 µl 10x ředěného až 10 µl neředěného enzymového roztoku neznámé aktivity z dané fáze purifikace dle potřeby daného měření, a to tak, aby hodnota  $\Delta A/3 \text{ min}$  byla 0,1 - 0,6). Tato směs před přidáním substrátu sloužila jako blank. Těsně před počátkem měření bylo přidáno 50 µl 87,5 mmol·l<sup>-1</sup> putrescinu. Byla měřena změna absorbance při  $\lambda = 436 \text{ nm}$  po dobu 3 minut. Aktivita byla vypočtena dle vzorce:  $a[\text{nkcat/ml}] = \frac{[\Delta A/3 \text{ min}] \cdot 2,16}{V[\text{ml enzymu}]}$ , kde koeficient  $2,16 = \frac{1,75 \cdot 10^6}{4500 \cdot 180} = \frac{V_{RS} \cdot 10^6}{\epsilon \cdot t}$ .  $V_{RS}$  je celkový objem reakční směsi (1,75 ml),  $t$  je čas měření (180 s) a  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient ( $4500 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Vycházelo se z obecného vztahu  $a = \frac{dA}{dT} \cdot \frac{V_{RS}}{\epsilon \cdot t}$ .

Pomocí této metody byla také ověřována reaktivita potenciálních substrátů [*N*-(3-aminopropyl)piperidin, dále N(3AP)P; 4-(aminomethyl)piperidin, dále 4(AM)P, kdy místo putrescinu bylo použito 50 µl 87,5 mmol·l<sup>-1</sup> potenciálního substrátu. Enzymu bylo použito 10 µl 10x zředěného roztoku enzymu o aktivitě 1741 nkat·ml<sup>-1</sup> (koncentrace proteinu 1,4 mg·ml<sup>-1</sup>, specifická aktivita 1232 nkat·mg<sup>-1</sup>). Bylo ověřováno pouze to, zda reakce probíhá či nikoliv.

Pro všechny substráty (a potvrzené potenciální substráty) byly metodou založenou na tomto principu změřeny kinetické parametry (popsáno dále, podkapitola 3.2.2, str. 45).

### 3.2.1.2 Měření obsahu proteinu Bradfordovou metodou

Celkový obsah proteinu v enzymových roztocích byl měřen spektrofotometrickou metodou dle Bradforda (1976). Metoda je založena na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein, způsobující posun absorpčního maxima barviva z  $\lambda = 465$  nm na  $\lambda = 595$  nm. S metodou interferují detergenty (Bradford 1976).

Roztok činidla byl připraven podle dostupného protokolu (viz příloha č. 1). Kalibrační řada byla vytvořena smísením 2 ml činidla s 5; 10; 20; 30; 40 a 50  $\mu$ l roztoku BSA ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Pro měření koncentrace 2 ml činidla se vzorkem (1-20  $\mu$ l dle potřeby daného měření). Směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Byla měřena absorbance při  $\lambda=595$  nm oproti slepému vzorku (činidlo).

### 3.2.1.3 Ověření čistoty enzymu pomocí SDS-PAGE

Čistota purifikovaného proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE v diskontinuálním uspořádání dle Laemmliho (1970), a to v 1 mm silném deskovém gelu. Složení separačního a zaostřovacího gelu je uvedeno v Tab. 6. Před přidáním SDS, TEMED a zahájením polymerace pomocí APS byly gely odvzdušněny mícháním v odsávací Erlenmeyerově baňce napojené k vakové pumpě. Vzorek byl smísen v poměru 1:1 s Laemmliho vzorkovým pufrům (Bio-Rad) a zahříván 5 min při 100 °C. Elektrodový pufr byl použit Tris-glycinový ( $0,025 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris,  $0,192 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  glycin; 0,1% SDS; pH 8,3). Na jamku bylo použito 7  $\mu$ l proteinového standardu, vzorky byly nanášeny v objemu maximálně 20  $\mu$ l. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 120 V. Po jejím skončení (při doputování bromfenolové modři na konec separační dráhy) byl gel vpraven do barvicího roztoku.

#### 3.2.1.3.1 Barvení gelu Coomassie Brilliant blue

Gel byl barven přes noc v roztoku koloidního barviva Coomassie (na krouživé třepačce v plastové Petriho misce), otáčky  $160 \text{ min}^{-1}$ . Gel byl odbarven opakovaným jemným protřepáváním v deionizované vodě. Poté byl gel skenován na skeneru s využitím programu LabScan. Obraz byl zpracován v programu PaintShop Pro 8.0.

Tab. 6: Objemy zásobních roztoků na separační a zaostřovací gely

Složka	Separací gel (12 % T)	Zaostřovací gel (4 % T)
AA + BIS (30% T, 3,3% C)	4 ml	0,65 ml
$1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	-
$0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris/HCl pH 6,8	-	1,25 ml
SDS (10%)	0,1 ml	0,1 ml
Destilovaná voda	3,2 ml	2,95 ml
TEMED	0,015 ml	0,015 ml
APS (10%)	0,05 ml	0,06 ml

### 3.2.1.4 Ověření identity pomocí peptidového mapování

Z gelu po SDS-PAGE a barvení byly vyříznuty a následně rozřezány nadrobno vybrané proteinové pásy. Odbarvení bylo provedeno promísením se 180  $\mu\text{l}$  směsí 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a acetonitrilu, 1:1 v/v, hodinovou inkubací při laboratorní teplotě a následným odpipetováním kapaliny. Gel byl vysušen přidáním acetonitrilu (180  $\mu\text{l}$ ). Po inkubaci 15 min proběhla centrifugace (2 min, 10 000 g) a acetonitril byl odpipetován.

Obsažené proteiny byly redukovány přidáním 100  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  obsahujícího 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dithiothreitol, inkubace proběhla 30 min při 60 °C. Následovala centrifugace (2 min, 10 000 g), odpipetování kapaliny a opětovné vysušení acetonitrilem (viz výše). Proteiny v gelu byly alkylovány přidáním 100  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  obsahujícího 55  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  jodacetamid, inkubace probíhala 20 min ve tmě při laboratorní teplotě). Roztok byl odpipetován a gel byl promyt 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , jenž byl odpipetován a gel opět vysušen pomocí acetonitrilu.

K vysušeným kouskům gelu bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  0,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  SOLu-trypsinu ve vychlazeném 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Rehydratace probíhala 45 minut za chlazení ledem. Následně byl přebytečný roztok odebrán a bylo provedeno převrstvení 40  $\mu\text{l}$  50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Šěpení proteinů v gelu probíhalo přes noc při teplotě 37 °C. Následovala centrifugace (5 min, 10 000 g). Extrakce peptidů proběhla podle publikovaného postupu (Shevchenko et al., 2006), odsolení peptidů proběhlo na pipetových špičkách ZipTip-C18 podle návodu výrobce (Merck-Millipore, Irsko).

Na MALDI destičku MSP AnchorChip 96 (Bruker Daltonik) bylo naneseno 0,5  $\mu\text{l}$  vzorku či peptidového standardu (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonik) a ihned převrstveno 0,5  $\mu\text{l}$  matrice (2 mg CHCA, 330  $\mu\text{l}$  2,5% TFA, 660  $\mu\text{l}$  acetonitrilu). Krystalizace probíhala volně na vzduchu.

Měření s peptidy bylo prováděno na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 (Bruker Daltonik) s ovládacím software flexControl 3.4; spektrum bylo sčítáno z 1000 laserových impulsů při frekvenci 60 Hz a relativní intenzitě laseru 20 %. Rozsah detekce iontů byl 500-6000 Da, napětí iontového zdroje: IS1 17,5 kV, IS2 15,1 kV, čočka (lens) 9,5 kV; napětí reflektoru 19 kV, pulsní iontová extrakce: 300 ns. Spouštěcí úroveň digitalizátoru byla nastavena na 2000 mV, citlivost 100 mV. Napětí lineárního detektoru bylo nastaveno na 1300 mV, v reflektorovém módu na 1400 mV.

K vyhodnocení bylo použito software flexAnalysis 3.4, Biotoools 3.2 (Bruker Daltonik) a databázového software Mascot 2.2 (Matrix Science, London, UK). Použita byla databáze aminokyselinových sekvencí Swiss-Prot s omezením na zelené rostliny (*Viridiplantae*), konkrétně rod *Pisum*. V nastavení bylo vybráno šěpení trypsinem, pevná modifikace karbamidometylace cysteinu, variabilní modifikace oxidace

methioninu. Možná opomenutá štěpení v sekvenci peptidu byla nastavena na hodnotu 2, tolerance hmotnosti iontu  $\pm 100$  ppm, náboj peptidu 1+.

### 3.2.2 Měření kinetických parametrů pomocí spřažené peroxidasové reakce

Pomocí varianty (nižší celkový objem reakční směsi) výše popsané (kapitola 3.2.1.1) spektrofotometrické metody měření aktivity byly změřeny kinetické parametry testovaných substrátů (Tab. 7), a to tak, že do kyvety byla za míchání napipetována reakční směs (míchání viz kapitola 3.2.1.1) přehřátá na 30 °C, zvolená dávka enzymu (Tab. 7) a dávka  $60 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  substrátu pro daný bod koncentrační řady tak, aby celkový objem směsi v kyvetě byl 1,5 ml. Výsledné koncentrace substrátu byly 2000; 1000; 750; 500; 250; 150; 100; 75; 50; 25 a  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ostatní parametry byly shodné s výše uvedenou metodou. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism 8. Z hodnot  $\Delta A/3\text{min}$  byly programem MS Excel vypočteny hodnoty reakční rychlosti pomocí vzorce  $v[\text{nmol}/\text{s}] = \frac{[\Delta A/3\text{min}] \cdot 1,85}{V[\text{ml enzymu}]}$ , kde koeficient 1,85 byl vypočten způsobem uvedeným na str. 42 (použity následující hodnoty: celkový objem = 1,5 ml, čas = 180 s). Získané hodnoty reakční rychlosti byly zadány do příslušných polí v programu GraphPad a vyhodnoceny automaticky.

Tab. 7: Dávky 10x zředěného enzymu pužité při měření kinetických parametrů pro jednotlivé substráty

substrát	agmatin	kadaverin	spermidin	cystamin
$\mu\text{l}$ enzymu*	50	10	30	10
substrát	diaminohexan	histamin	putrescin	hydroxyputrescin
$\mu\text{l}$ enzymu*	10	100	10	10
substrát	hydroxykadaverin	4(AM)P	DADO <sup>‡</sup>	N(3AP)P
$\mu\text{l}$ enzymu*	10	20 <sup>†</sup>	20 <sup>†</sup>	neměřeno <sup>§</sup>

\*Množství roztoku enzymu 10x zředěného 0,117M K-fosfátovým pufrém, pH 7,0, ředěno ze zásobního roztoku o koncentraci proteinu  $2,9 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a specifické aktivitě  $415,5 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

<sup>†</sup>Pro měření použit roztok enzymu zředný 10x ze zásobního roztoku o koncentraci proteinu  $1,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , specifické aktivitě  $1232 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

<sup>‡</sup>1,8-diamino-3,6-dioxaoktan, dále vždy DADO

<sup>§</sup>Kinetické parametry nebyly měřeny, měřením uvedeným na str. 42 bylo zjištěno, že látka není substrátem.

### **3.2.3 Ověření proveditelnosti detekce pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI ToF**

#### **3.2.3.1 Výběr vhodného pufru**

Pro měření pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI ToF byl vybrán těkavý hydrogenuhličitánový pufr. Jeho vhodnost byla ověřena spektrofotometrickým měřením kinetických parametrů pro putrescin metodou uvedenou v kapitole 3.2.2, kdy byl fosfátový pufr nahrazen  $0,117 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydrogenuhličitánem amonným (pH 6,9; upraveno kyselinou mravenčí) a výsledky byly porovnány.


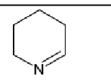
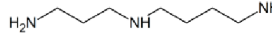
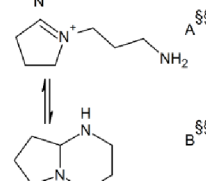
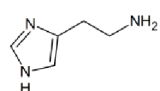
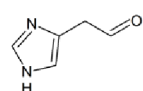
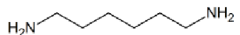
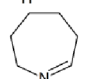
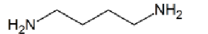
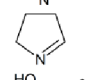
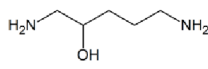
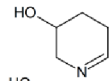
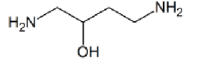
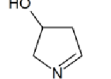
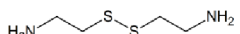
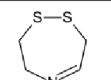
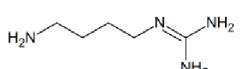
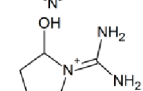
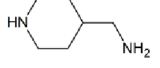
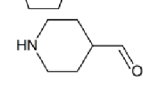
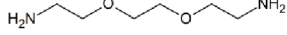
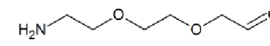
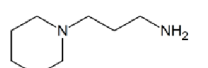
#### **3.2.3.2 Optimalizace detekce pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI ToF**

Detegovatelnost substrátů (a v důsledku i a produktů jejich oxidace v reakční směsi; Tab. 8) byla ověřena jejich smísením s 1 ml  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 6,9) tak, aby finální koncentrace substrátu byla  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z této reakční směsi byl odebrán vzorek před přidáním enzymu a po 24 h inkubace s enzymem. Z několika testovaných MALDI destiček byla vybrána destička MSP BigAnchor 96 BC. Použitelná byla také destička MSP AnchorChip 96. Jako matrice byla použita  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  CHCA s  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  CTAB ve směsi acetonu a destilované vody (4:1, v/v). Byly testovány různé postupy nanášení vzorku a matrice na destičky (současné nanesení, metoda tenké vrstvy) a možnost zastavení reakce přidávkem matrice obsahující 2,5% TFA.

Byla testována možnost použití přídatku diaminopentanonu (finální konc.  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) do roztoku matrice jako interního standardu.

K měření byl použit hmotnostní spektrometr Microflex LRF20 (Bruker Daltonik) s ovládacím software flexControl 3.4, byla testována různá nasavení (finálně používané nastavení uvedeno dále; viz str. 48). K vyhodnocení bylo použito software flexAnalysis 3.4.

Tab. 8: Použité substráty a produkty jejich oxidace (vzorce vytvořeny dle zápisů v databázi PubChem pro dané látky: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

substrát	$m/z$ [M+H <sup>+</sup> ]	$m/z$ [M+H <sup>+</sup> ] produktu	vzorec substrátu	vzorec produktu
<b>substráty testované v rámci počátečního testování</b>				
kadaverin <sup>**</sup>	103	84		
spermidin <sup>**</sup>	146	127		
histamin <sup>†</sup>	112	111		
diaminohexan <sup>‡</sup>	117	98		
putrescin <sup>*</sup>	89	70		
2-hydroxykadaverin <sup>§</sup>	119	100		
2-hydroxyputrescin <sup>§</sup>	105	86		
<b>substráty vybrané dodatečně v pozdější fázi</b>				
cystamin <sup>**</sup>	153	134		
agmatin <sup>††</sup>	131	130 <sup>‡‡</sup>		
4(AM)P <sup>†††</sup>	115	114		
DADO <sup>***</sup>	149	148		
N(3AP)P	143	nereaguje		nereaguje

\*dle Medda et al., 1995; v případě spermidinu identita produktu dále rozebrána v diskusi na str. 82

†dle Cuzzocrea a Massini, 2008

‡dle Callery et al., 1992

§ dle Macholán et al., 1967

\*\*dle Cavallini et al., 1957, pouze teoretická hodnota, reálně nedetegován, dle De Marco et al. (1965) se produkt v případě PSAO dále rozkládá.

††dle Ascenzi et al., 2002

‡‡Molekulová hmotnost substrátu a produktu totožná, produkt však je již přítomen ve formě kationtu [M<sup>+</sup>] a substrát je ionizován na [M+H<sup>+</sup>] o jednu jednotku těžší

§§ dle Brandänge et al. (1984) převažuje v roztocích o pH vyšším než 6 forma B, v roztocích o pH nižším než 5 převažuje forma A. Mezi pH 5 a 6 se mohou vyskytovat také další formy.

\*\*\* dle Šebela et al., 2007b

†††produkt odvozen z obecné rovnice katalyzované reakce, hmotnostního rozdílu substrátu a produktu a reakci podobných substrátů

### 3.2.3.3 Měření kinetických parametrů pomocí MALDI ToF MS

Pro měření kinetických parametrů byly připraveny sedmibodové řady koncentrací substrátu (Tab. 9) v  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 6,9). Celkový objem reakční směsi po přidání enzymu byl 1 ml. Tyto reakční směsi byly předebrány v termostatu na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Do reakčních směsí byla přidána dávka 10x zředěného roztoku enzymu optimalizovaná pro daný substrát (Tab. 9; ředěno ze zásobního roztoku o koncentraci proteinu  $2,9 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a specifické aktivitě  $415,5 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Reakční směsi byly inkubovány v termostatu při teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  za stálého třepání ( $500 \text{ rpm}$ ) po dobu optimalizovanou pro daný substrát (Tab. 9). Poté byla reakce zastavena umístěním mikrozkušavek s reakčními směsmi do nádoby s ledem.

Na MALDI destičku MSP BigAnchor 96 BC bylo napipetováno na jednotlivé pozice po  $1 \text{ } \mu\text{l}$  roztoku matrice (CHCA viz str 46, pro DHB ostatní složky totožně). Po vysušení na vzduchu byl na krystaly nanesen  $1 \text{ } \mu\text{l}$  reakční směsi (ihned po zastavení reakce) směs byla opět sušena volně na vzduchu.

Měření byla prováděna na hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 (Bruker Daltonik) s ovládacím software flexControl 3.4; nastavení: 500 laserových impulsů, frekvenci  $60 \text{ Hz}$  a relativní intenzitě laseru  $15 \%$  pro CHCA,  $65 \%$  pro DHB. Rozsah detekce iontů byl  $0\text{-}2100 \text{ Da}$ , napětí iontového zdroje: IS1  $19 \text{ kV}$ , IS2  $16,2 \text{ kV}$ , čočka (lens)  $8,9 \text{ kV}$ ; napětí reflektoru  $20 \text{ kV}$ , pulsní iontová extrakce:  $150 \text{ ns}$ . Spouštěcí úroveň digitalizátoru byla nastavena na  $2000 \text{ mV}$ , citlivost  $100 \text{ mV}$ . Napětí lineárního detektoru bylo nastaveno na  $1300 \text{ mV}$ , v reflektorovém módu na  $1400 \text{ mV}$ .

Kalibrace molekulových hmotností byla prováděna na matricové píky CHCA, a to i v případě DHB (CHCA na kalibrační pozici), jelikož kalibrační signály pro DHB byly suprimovány).

Podobným způsobem bylo u potenciálních substrátů [N3(APP) a 4(AM)P] testováno, zda jsou oxidovány. Byla však použita pouze reakční směs obsahující potenciální substrát v  $250 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci,  $10 \text{ } \mu\text{l}$  10x zředěného roztoku enzymu (ředěný ze zásobního roztoku o koncentraci proteinu  $1,41 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a specifické aktivitě  $1232 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Čas inkubace byl  $24 \text{ h}$ . U potvrzených substrátů byly změřeny kinetické parametry (postup měření viz text výše a Tab. 8).



Tab. 9: Odlišnosti parametrů v postupu optimalizované pro jednotlivé substráty.

Optimalizované parametry měření pro substráty s úspěšně změřenými kinetickými parametry					
substrát	dávka enzymu *	koncentrace substrátu	čas inkubace	matrice	další testované parametry
kadaverin	2 µl	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup>	10 min	CHCA	
diaminohexan	7 µl	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup>	10 min	CHCA	
spermidin	2 µl	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup>	10 min	CHCA	
histamin	10 µl	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup>	3 hod	CHCA	
agmatin	5 µl	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup>	20 min	CHCA	
2-hydroxyputrescin	5 µl	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup>	1 hod	CHCA	
4(AM)P	10 µl <sup>†</sup>	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup>	15 min	DHB	
putrescin <sup>§</sup>	5 µl	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup> /	10 min	CHCA	katalasa <sup>‡</sup>
DADO <sup>§</sup>	10 µl <sup>†</sup>	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup> /	30 min	DHB	
Testované rozsahy parametrů pro substráty, u nichž měření nepodařilo optimalizovat					
substrát	dávka enzymu *	koncentrace substrátu	čas inkubace	matrice	další testované parametry
cystamin	2-5 µl	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup>	10 min – 24 hod	CHCA, DHB	Pufry: NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> pH = 6,0 TEAAc <sup>§</sup> . pH = 6,9
2-hydroxykadaverin	5-10 µl	25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 µmol·l <sup>-1</sup> / 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 µmol·l <sup>-1</sup>	10 - 50 min	CHCA	

\*Dávka roztoku enzymu zředěného 10x, ředěno ze zásobního roztoku o koncentraci proteinu 2,9 mg·ml<sup>-1</sup> a specifické aktivitě 415,5 nkat·mg<sup>-1</sup>

†V případě těchto měření byl použit roztok enzymu 10x ředěný ze zásobního roztoku o koncentraci proteinu 1,4 mg·ml<sup>-1</sup> a specifické aktivitě 1232 nkat·mg<sup>-1</sup>

‡Do reakční směsi byla přidána katalasa ve fiálním množství 0,1 mg·ml<sup>-1</sup> (fiální aktivita 2000 U·ml<sup>-1</sup>)

§V případě těchto substrátů se měření nepodařilo adekvátně optimalizovat, částečné vyhodnocení však bylo možno provést

Vzhledem k výsledkům tohoto měření (viz zhodnocení v diskusi na str. 83 - 86) bylo testováno, zda se produkt a substrát ionizují identicky (z časových důvodů pouze pro putrescin) s využitím ekvimolárních směsí putrescinu a ABAL (aminobutyraldehydu). Roztok ABAL byl připraven inkubací 10 µl diethylacetalu této látky v 500 µl 0,5 mol·l<sup>-1</sup> HCl po dobu 2 hodin při 70 °C následovanou přidáním 25 µl 25% amoniaku a doplněním destilovanou vodou do 1 ml. Byly připraveny ekvimolární směsi putrescinu a ABAL o koncentracích těchto látek 25; 50; 100; 200; 500 a 1000 µmol·l<sup>-1</sup>. Byl změřen poměr intenzit signálů těchto látek při měření pomocí MALDI ToF, a to postupem uvedeným na předchozí straně (CHCA jako matrice).

### 3.2.4 Měření s reaktivní maticí DMNTH

DMNTH byl syntetizován postupem, jež uvádí Kemptner *et al.* (2000). Z 3,69 g kyanurchloridu a 3,16 g 1-methoxynaftalenu bylo v přítomnosti 2,67 g  $\text{AlCl}_3$  (rozpuštědlem toluen) syntetizováno DMNT. Ve dvou provedeních bylo syntetizováno celkem 8,05 g této látky (výtěžek 66 %). Z DMNT a 3,22 g dimethylamin hydrochloridu bylo v přítomnosti 3,62 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (rozpuštědlem 1,4 dioxan) syntetizováno 2,97 g CDMNT (výtěžek 36 %). Reakcí CDMNT a 928  $\mu\text{l}$  hydrazin hydrátu v přítomnosti 0,84 g  $\text{NaHCO}_3$  (rozpuštědlem acetonitril) bylo získáno 2,72 g DMNTH (výtěžek 92 %, celkový výtěžek 22 %). Měření pomocí MALDI ToF MS probíhalo postupem, jež uvádějí Mugo a Botaro (2007). Z důvodu špatné rozpustnosti matrice v 80% acetonitrilu obsahujícím 1 mM HCl (navzdory publikovaným údajům) byla testována jiná rozpuštědla. Nakonec byl zvolen 80% THF obsahující 1 mM HCl.

Byla provedena zkouška detegovatelnosti aldehydů při měření s použitím této reaktivní matrice. Byla změřena spektra 5 mM roztoků furfuralu, APAL (3-aminopropionaldehyd) a AASAL ( $\alpha$ -aminoadipátsemialdehyd). Následně byla změřena spektra reakčních směsí [v 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 6,9)] obsahujících na počátku 5 mM substrát (histamin, DADO či 4(AM)P) a 5  $\mu\text{l}$  roztoku PSAO (koncentrace proteinu 1,4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , specifická aktivita 1232  $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) na 1 ml reakční směsi. Inkubace probíhala 20 hodin při 30 °C. Byly testovány oba způsoby derivatizace jež uvádějí Mugo a Botaro (2007) [„on plate“ – nanesení 0,6  $\mu\text{l}$  roztoku matrice na destičku, po vysušení nanesení 0,6  $\mu\text{l}$  vzorku; a „one pot“ – 30 min inkubace směsi 10  $\mu\text{l}$  roztoku matrice a 10  $\mu\text{l}$  roztoku vzorku při laboratorní teplotě, nanesení 0,6  $\mu\text{l}$  alikvotu na destičku; destička MTP 384 target plate ground steel BC (Bruker Daltonik)].

Měření na hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 (Bruker Daltonik) neposkytovalo žádný signál. Měření tedy byla prováděna na hmotnostním spektrometru ultrafleXtreme (Bruker Daltonik) v MS módu; ovládací software flexControl 3.4; nastavení 1000 laserových impulsů, frekvenci 100 Hz a relativní intenzitě laseru 26 %. Rozsah detekce iontů byl 0-1000 Da, napětí iontového zdroje: IS1 25 kV, IS2 22,25 kV, čočka (lens) 7,75 kV; napětí reflektoru: R1 25,95 kV, R2 13,20 kV, pulsní iontová extrakce: 150 ns. Spouštěcí úroveň digitalizátoru byla nastavena na 800 mV, citlivost 100 mV. Napětí lineárního detektoru bylo nastaveno na 2500 mV, v reflektorovém módu na 2200 mV. K vyhodnocení bylo použito software flexAnalysis 3.4.

Další měření nebyla prováděna (důvody viz výsledky str. 79).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Extrakce a purifikace PSAO

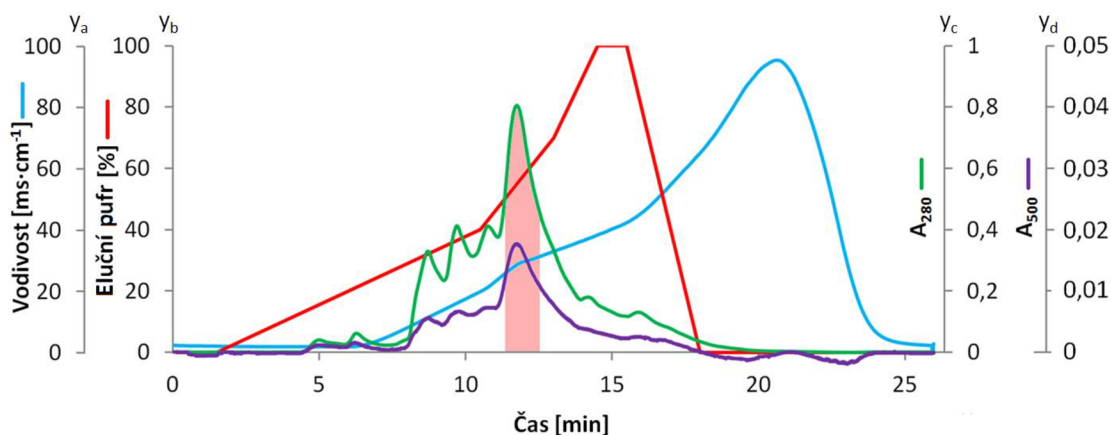
V průběhu purifikace PSAO byl mezi jednotlivými kroky spektrofotometricky měřen obsah proteinu Bradfordovou metodou a aktivita metodou využívající spřažené reakce s peroxidasou. Celkové objemy enzymových roztoků, naměřené hodnoty aktivity, obsahu proteinu a vypočtené hodnoty specifické aktivity a výtěžku mezi jednotlivými kroky jsou uvedeny v Tab. 10. Počáteční fáze purifikace (kroky 1-6) byla prováděna dvakrát a data pro kroky 7 a 8 jsou pro spojený enzymový roztok. Chromatogramy z kroků 7 a 8 jsou na Obr. 8 a 9.

Příprava enzymu byla prováděna opakovaně. Nejvyšší dosažená hodnota specifické aktivity činila  $1232 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

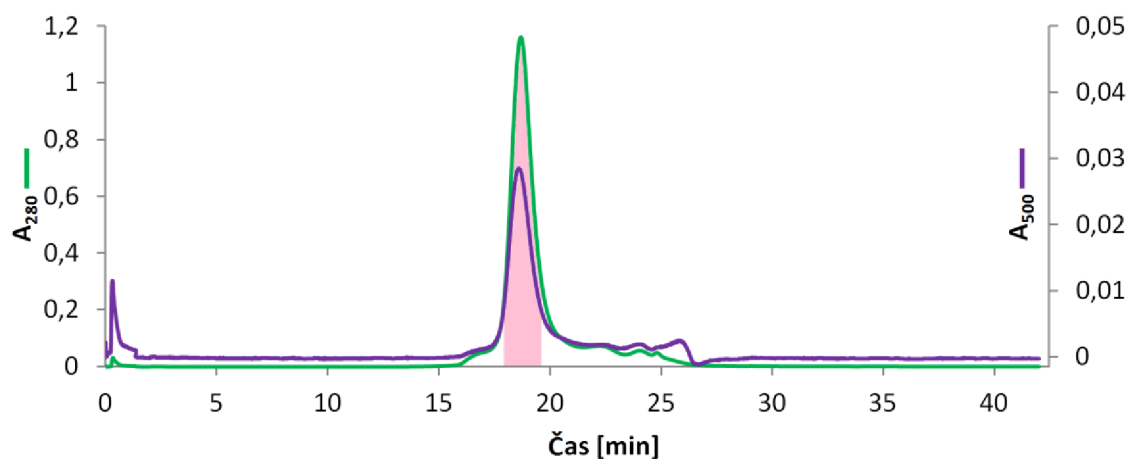
Tab. 10: Purifikační schéma přípravy PSAO

Hodnoty pro počáteční fáze purifikace provedené z 600 g semenáčků						
Purifikační krok	Objem [ml]	Celková aktivita [nkat]	Celkový obsah proteinu [mg]	Specifická aktivita [ $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]	Stupeň přečištění	Výtěžek [%]
1. Hrubý extrakt	1300	5546	2799	2,0	1,0	100
2. Precipitace protaminsulfát	1320	5945	1878	3,2	1,6	107
3. Precipitace $\text{MnCl}_2$	1340	6802	1646	4,1	2,1	123
4. Precipitace 65% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a odsolení na Sephadexu G-25	100	5954	896	6,6	3,3	107
5. Chromatografie na DEAE-Sepharose	140	5796	179	32,4	16,4	105
6. Chromatografie na hydroxyapatitu a dialýza	48	4507	156	28,9	14,5	81
Hodnoty pro dva spojené extrakty (celkem 1200 g semenáčků) v následných krocích						
7. Iontoměničová chromatografie, UnoS12	56	4742	55,8	85,0	42,5*	41*
8. Gelová chromatografie, ENrich SEC650	3,4	3989	9,6	415,5	207,8*	35*

\*Hodnoty počítány ze součtu hodnot celkové aktivity (11443 nkat) a součtu celkového obsahu proteinu (5648 mg) z 1. kroku purifikace pro obě provedení tohoto kroku.



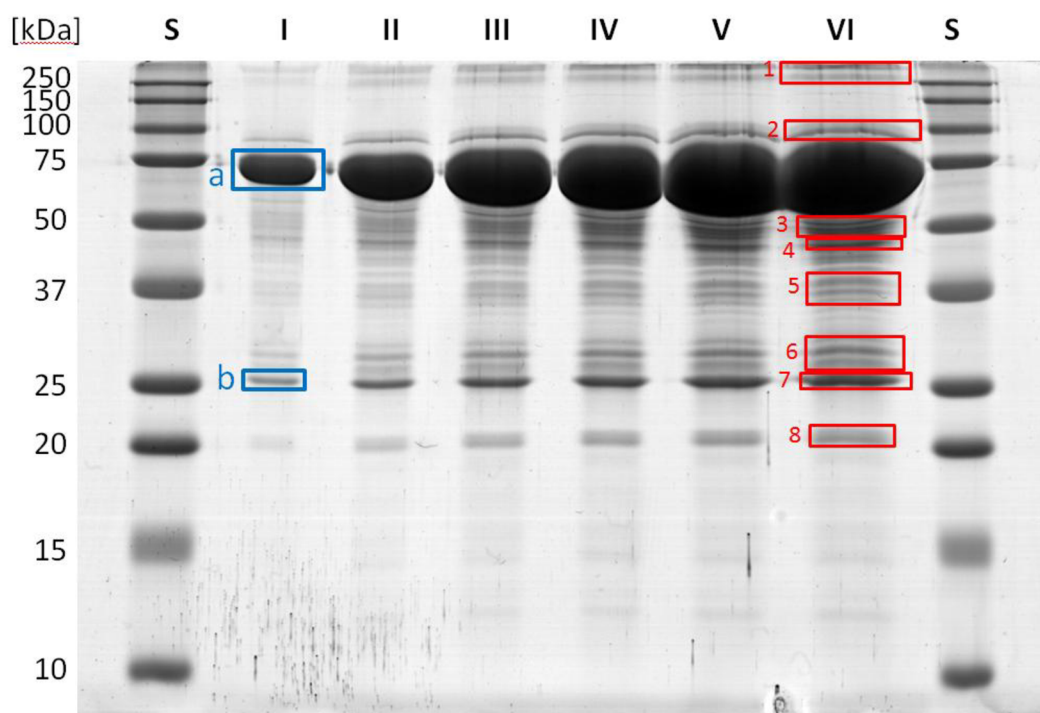
Obr. 8: Chromatogram z iontoměničové chromatografie na koloně UnoS12. Na ose  $y_c$  zobrazena absorbance při  $\lambda = 280$  nm (zeleně); na ose  $y_d$  absorbance při  $\lambda = 500$  nm (fialově); na ose  $y_a$  změna vodivosti roztoku procházejícího detektorem (modře); na ose  $y_b$  procentuální zastoupení elučního pufru ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  K-fosfátový pufr; pH 5,8 obs.  $1\text{M NaCl}$ ) na vstupu do chromatografické kolony (červeně). Růžově vyznačena sbíraná frakce.



Obr. 9: Chromatogram z gelové chromatografie na koloně ENrich SEC 650. Zeleně zobrazena změna absorbance při  $\lambda = 280$  nm (levá osa), fialově změna absorbance při  $\lambda = 500$  nm (pravá osa). Růžově vyznačena sbíraná frakce.

### 4.1.1 Ověření čistoty pomocí SDS-PAGE

Po provedení SDS-PAGE způsobem popsáným na str. 43 byly ze skenu obarveného gelu (Obr. 10) pomocí programu GelAnalyzer 19.1 určeny retenční faktory proteinových páسů vzorku a standardu. Z těchto retenčních faktorů a kalibrační závislosti byly pomocí programu GelAnalyzer a MS Excel nezávisle na sobě vypočteny molekulové hmotnosti proteinů přítomných ve dvou nejvýraznějších pásech ve vzorku I (pás a a b; viz Tab. 11 a Obr. 10; měřeno pro vzorek s nejnižší koncentrací proteinu, aby bylo minimalizováno zkreslení hodnot nadměrnou koncentrací proteinu) a v pásech vyřezaných a použitých pro peptidové mapování pomocí MALDI-TOF MS (vyznačené na Obr. 10 červeně; hodnoty molekulových hmotností viz Tab. 11; postup viz str. 44) Do dráhy VI bylo aplikováno relativně vysoké množství proteinu, aby bylo možné detegovat minoritní složky visualizované v oblasti 20 – 50 kDa. Výsledky peptidového mapování jsou uvedeny v Tab. 12 (kapitola 4.1.1.1).



Obr. 10: Snímek gelu po barvení QC Colloidal Coomassie Stain; S: standardy s uvedením příslušné molekulové hmotnosti, I-VI vzorky proteinu v množství 3; 7,5; 12; 15; 22,5 a 30  $\mu\text{g}$  na jamku; červeně označeny pásky vyřezané pro peptidové mapování; modře označeny pásky, jejichž retenční faktory byly použity pro výpočet molekulových hmotností s minimálním zkreslením nadměrnou koncentrací proteinu.

Tab. 11: Hodnoty molekulových hmotností vypočtené dle změřených retenčních faktorů vybraných pásů

Pás	Rf	M [kDa] GelAnalyzer	M [kDa] MS Excel	Protein	M [kDa] teoretická <sup>†</sup>
a	0,175	60	77	PSAO; AMO_PEA* <sup>†</sup>	73,679
b	0,486	23	28	Non-seed lectin; LECN_PEA* <sup>†</sup>	26,150
1	0,016	304	157 <sup>§</sup>	PSAO; AMO_PEA* <sup>†</sup>	NZ <sup>‡</sup>
2	0,105	107	97	PSAO; AMO_PEA* <sup>†</sup>	NZ <sup>‡</sup>
3	0,255	37 <sup>§</sup>	60	PSAO; AMO_PEA* <sup>†</sup>	NZ <sup>‡</sup>
4	0,279	33 <sup>§</sup>	55	PSAO; AMO_PEA* <sup>†</sup>	NZ <sup>‡</sup>
5	0,338	28 <sup>§</sup>	45 <sup>§</sup>	PSAO; AMO_PEA* <sup>†</sup>	NZ <sup>‡</sup>
6	0,439	24 <sup>§</sup>	33	PSAO; AMO_PEA* <sup>†</sup>	NZ <sup>‡</sup>
7	0,487	23	28	Non-seed lectin; LECN_PEA* <sup>†</sup>	26,150
8	0,573	22	21	neidentifikováno*	

\*Identifikováno pomocí peptidového mapování, viz Tab. 12 dále

<sup>†</sup>Přístupové kódy sekvencí v databázi UniProt a teoretické molekulové hmotnosti příslušných proteinů po odštěpení signálních peptidů, bez zahrnutí možné glykosylace

<sup>‡</sup>Není známo; jde o PSAO, identita rozebrána v diskusi na str. 80

<sup>§</sup>Hodnoty takto označené se výrazně odlišují od vizuálního zhodnocení gelu (viz Obr. 8)

#### 4.1.1.1 Určení identity pásů pomocí peptidového mapování

V Tab. 12 jsou uvedeny proteiny identifikované na základě prohledávání databáze UniProt (část Swiss-Prot) se soubory peptidových hmotností z naměřených MALDI-TOF MS spekter. Ve většině pásů byl identifikován purifikovaný enzym. Dále byl v pásu 7 identifikován hrachový lektin. Protein či fragment přítomný v pásu č. 8 nebyl identifikován.

Tab. 12: Tabulka proteinů identifikovaných v pásech vyřezaných z gelu

Pás	Přístupový kód*	Protein	Skóre	Počet identifikovaných peptidů	Pokrytí sekvence
1	AMO_PEA	PSAO OS=Pisum sativum PE=1 SV=1	146	18	34,3 %
2	AMO_PEA	PSAO OS=Pisum sativum PE=1 SV=1	117	13	26,9 %
3	AMO_PEA	PSAO OS=Pisum sativum PE=1 SV=1	53	12	18,0 %
4	AMO_PEA	PSAO OS=Pisum sativum PE=1 SV=1	78	13	23,3 %
5	AMO_PEA	PSAO OS=Pisum sativum (fragment) PE=1 SV=1	99	16	31,3 %
6	AMO_PEA	PSAO OS=Pisum sativum (fragment) PE=1 SV=1	83	8	15,7 %
7	LECN_PEA	Non-seed lectin OS=Pisum sativum PE=2 SV=2	92	7	46,0 %
8		nepřiřazeno			

\*Přístupové kódy pro sekvence v databázi UniProt

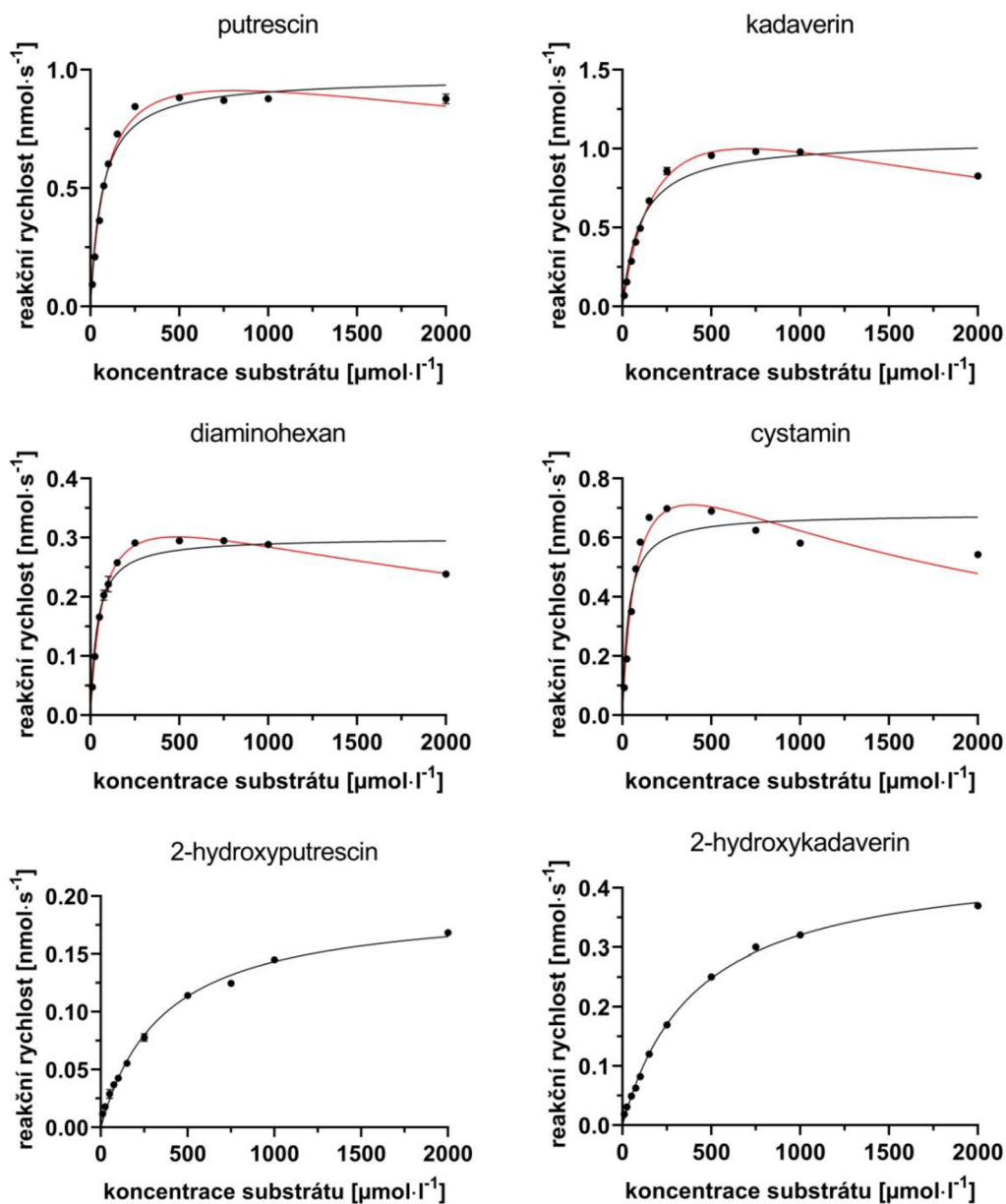
## 4.2 Měření kinetických parametrů pomocí spřažené peroxidasové reakce

Kinetické parametry PSAO pro oxidaci zvolených substrátů byly změřeny spektrofotometricky způsobem uvedeným na str. 45. Pro každý bod datové řady byla provedena 3 měření (naměřené hodnoty  $\Delta A/3\text{min}$  v příloze č. 2. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism 8. Získané saturační křivky nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové jsou zobrazeny na Obr. 11 a 12 níže. V případě, že ze získaných křivek byla patrná inhibice nadbytkem substrátu (putrescin, kadaverin, diaminohexan a cystamin), byla data hodnocena také pomocí modelu nelineární regrese pro inhibici nadbytkem substrátu. Vypočtené hodnoty  $K_m$ ,  $V_{lim}$  a  $k_{cat}$  jsou uvedeny v Tab. 13. Hodnoty  $k_{cat}$  byly vypočteny pomocí programu MS Excel z hodnot  $V_{lim}$  získaných pomocí programu GraphPad a obsahu proteinu změřeného Bradfordovou metodou (viz str. 51). Výpočty závislé na molekulové hmotnosti proteinu byly provedeny s hmotností podjednotky 73,679 kDa (UniProt; po odštěpení signálního peptidu).

Tab. 53: Hodnoty kinetických parametrů získané vyhodnocením v programu Graph Pad Prism 8

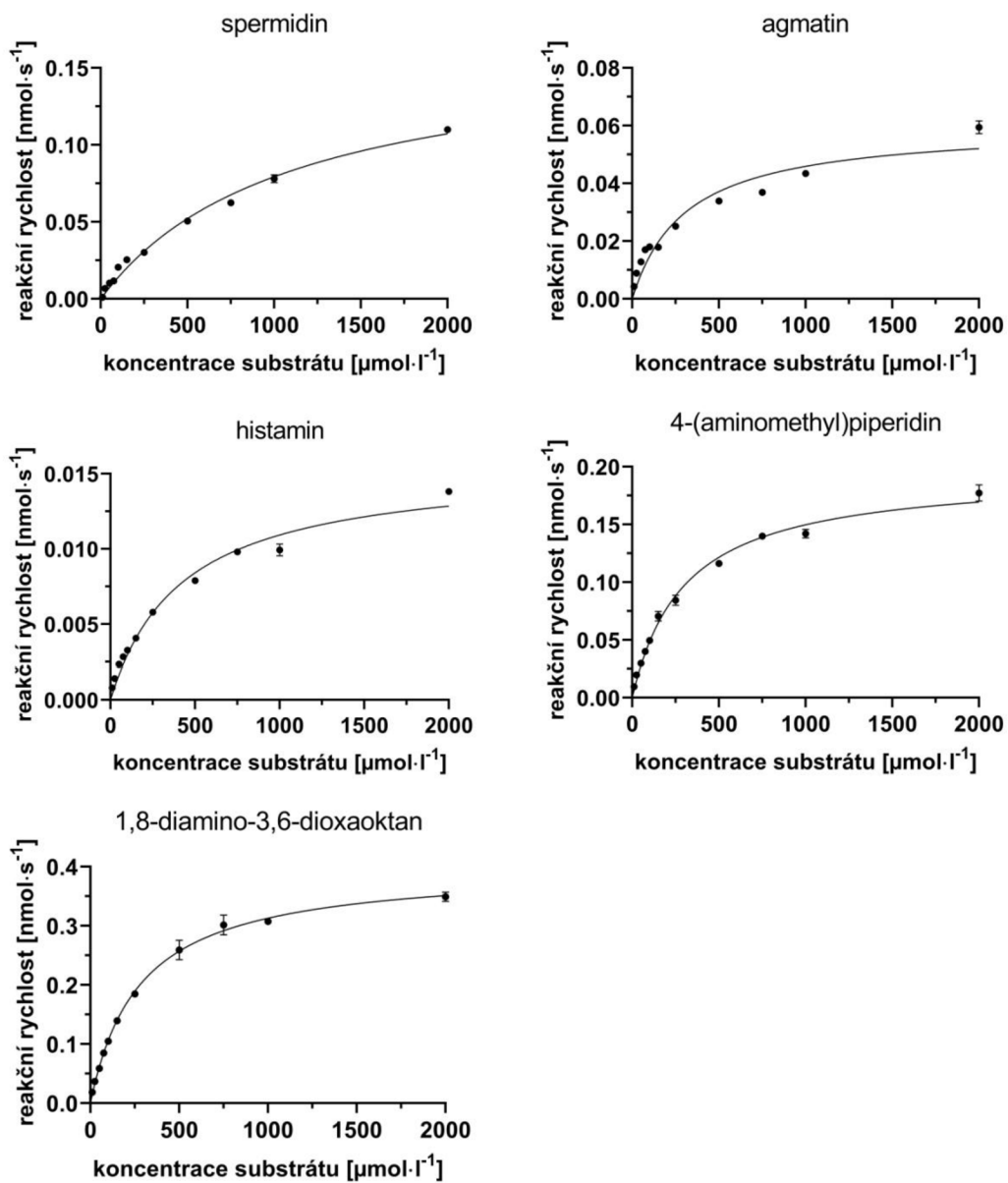
Nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové						
Substrát	$K_m^*$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$V_{lim}^*$ [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$V_{lim}$ na mg proteinu [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]	$k_{cat}^*$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_m$ [ $\text{l}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ ]	$K_{isubstr.}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
putrescin	66	0,966	337	23,60	0,36	
kadaverin	101	1,054	368	25,75	0,25	
diaminohexan	38	0,300	105	7,34	0,19	
cystamin	34	0,681	238	16,64	0,49	
2-hydroxyputrescin	359	0,195	68	4,76	0,013	
2-hydroxykadaverin	413	0,453	158	11,07	0,027	
spermidin	1087	0,165	19	1,42	0,0013	
agmatin	308	0,060	4,2	0,31	0,0010	
histamin	426	0,016	0,6	0,040	0,000094	
4(AM)P	302	0,195	69	5,07	0,017	
DADO	278	0,400	141	10,40	0,037	
Nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu						
putrescin	88	1,110	388	27,13	0,31	7450
kadaverin	210	1,596	557	39,01	0,19	2358
diaminohexan	68	0,386	135	9,43	0,14	3471
cystamin	78	0,998	348	24,40	0,31	1912

\*V příloze č. 2 tabulka s hodnotami intervalů spolehlivosti pro  $K_m$ ,  $V_{lim}$  a  $k_{cat}$



Obr. 11: Saturační křivky oxidace putrescinu, kadaverinu, diaminohexanu, cystaminu, 2-hydroxyputrescinu a 2-hydroxykadaverinu za katalýzy PSAO. Křivky získány z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové v programu GraphPad Prism 8. V případě, že docházelo k inhibici nadbytkem substrátu, jsou zobrazeny také křivky získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu (červeně).





Obr. 12: Saturační křivky oxidace spermidinu, agmatinu, histaminu, 4-(aminomethyl)piperidinu a 1,8-diamino-3,6-dioxaoktanu za katalýzy PSAO. Křivky získány z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové v programu GraphPad Prism 8.

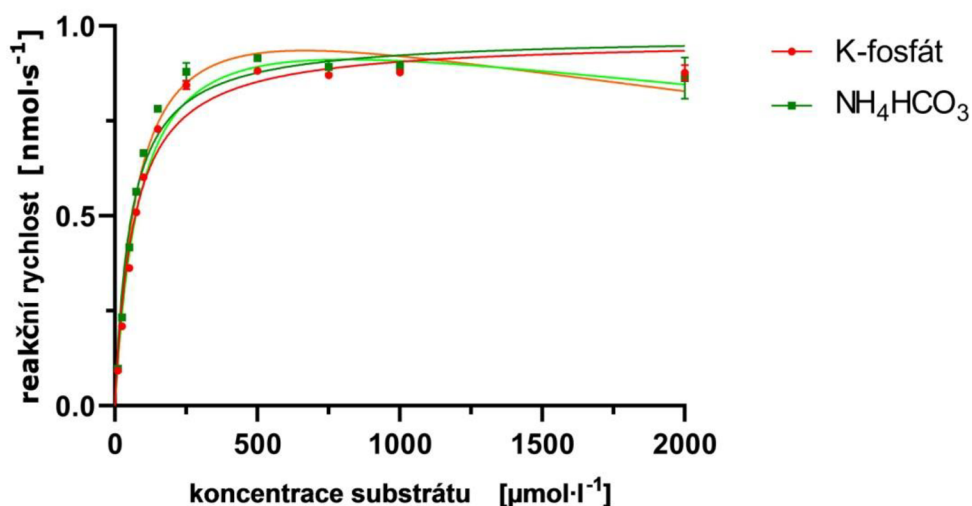
### 4.3 Ověření proveditelnosti detekce pomocí MALDI ToF a její optimalizace

Pro měření pomocí MALDI ToF bylo nutno použít těžkého pufru namísto pufru K-fosfátového používaného pro spektrofotometrická měření. Vybrán byl hydrogenuhličitan amonný, který pufruje v mírně bazické oblasti, hodnota pH byla ale nastavena kyselinou mravenčí na hodnotu 6,9. Jeho vhodnost byla ověřena spektrofotometrickým měřením kinetických parametrů v tomto pufru stejným způsobem jako v případě pufru K-fosfátového. Porovnání hodnot naměřených kinetických parametrů je uvedeno v Tab. 14. Grafické porovnání saturačních křivek je na Obr. 13.

Tab. 64: Hodnoty kinetických parametrů pro oxidaci putrescinu v porovnávaných pufrch získané vyhodnocením v programu Graph Pad Prism 8

Nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové						
Použitý pufr	$K_m^*$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$V_{\text{lim}}^*$ [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$V_{\text{lim}}$ na mg proteinu [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}^*$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_m$ [ $\text{l}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ ]	$K_{\text{isubstr.}}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
K-fosfát (pH 7)	66	0,966	337	23,60	0,36	
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (pH 6,9)	55	0,974	340	23,80	0,43	
Nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu						
K-fosfát (pH 7)	88	1,110	388	27,13	0,31	7450
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (pH 6,9)	80	1,160	405	28,35	0,35	5553

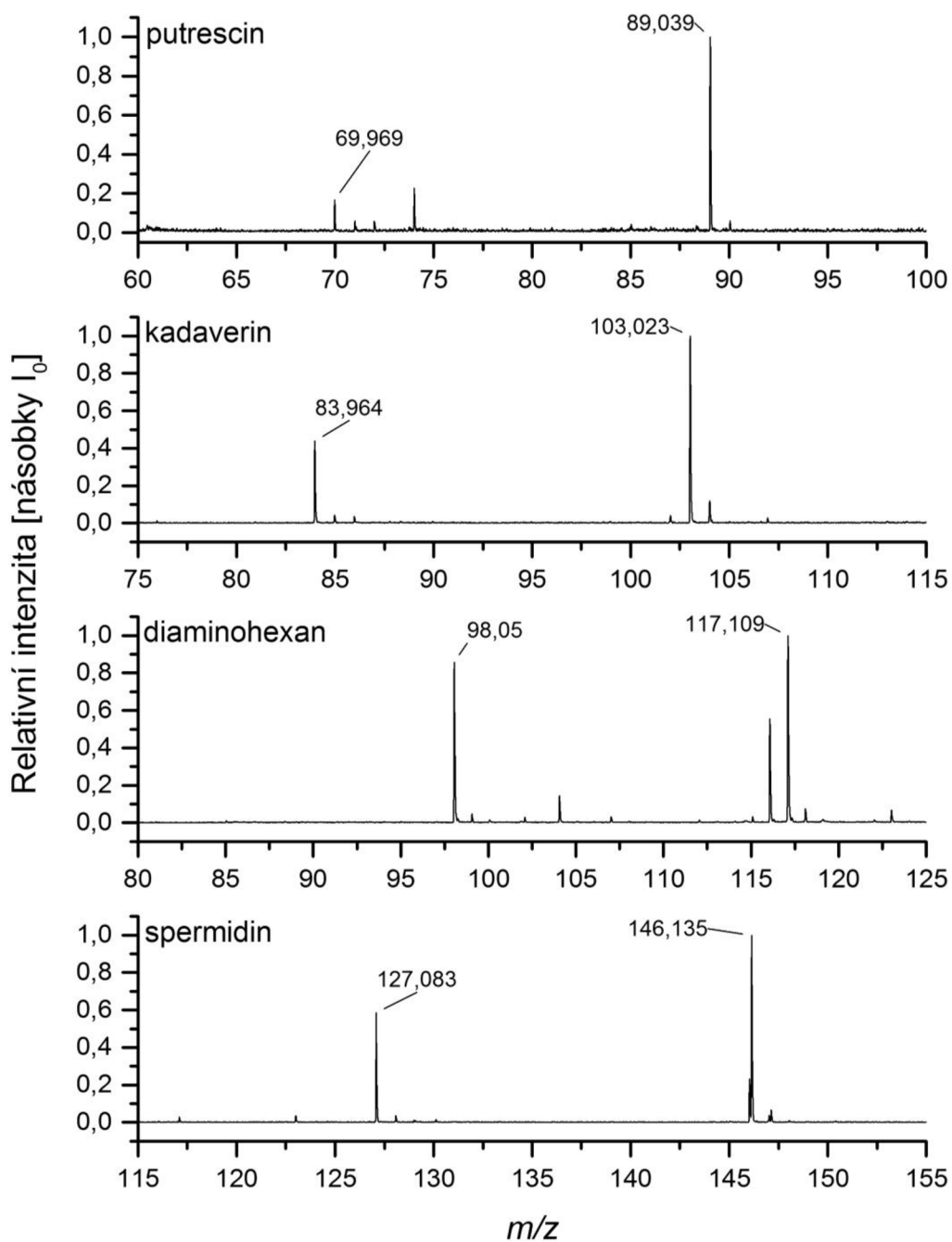
\*V příloze č. 1 tabulka s hodnotami intervalů spolehlivosti pro  $K_m$ ,  $V_{\text{lim}}$  a  $k_{\text{cat}}$



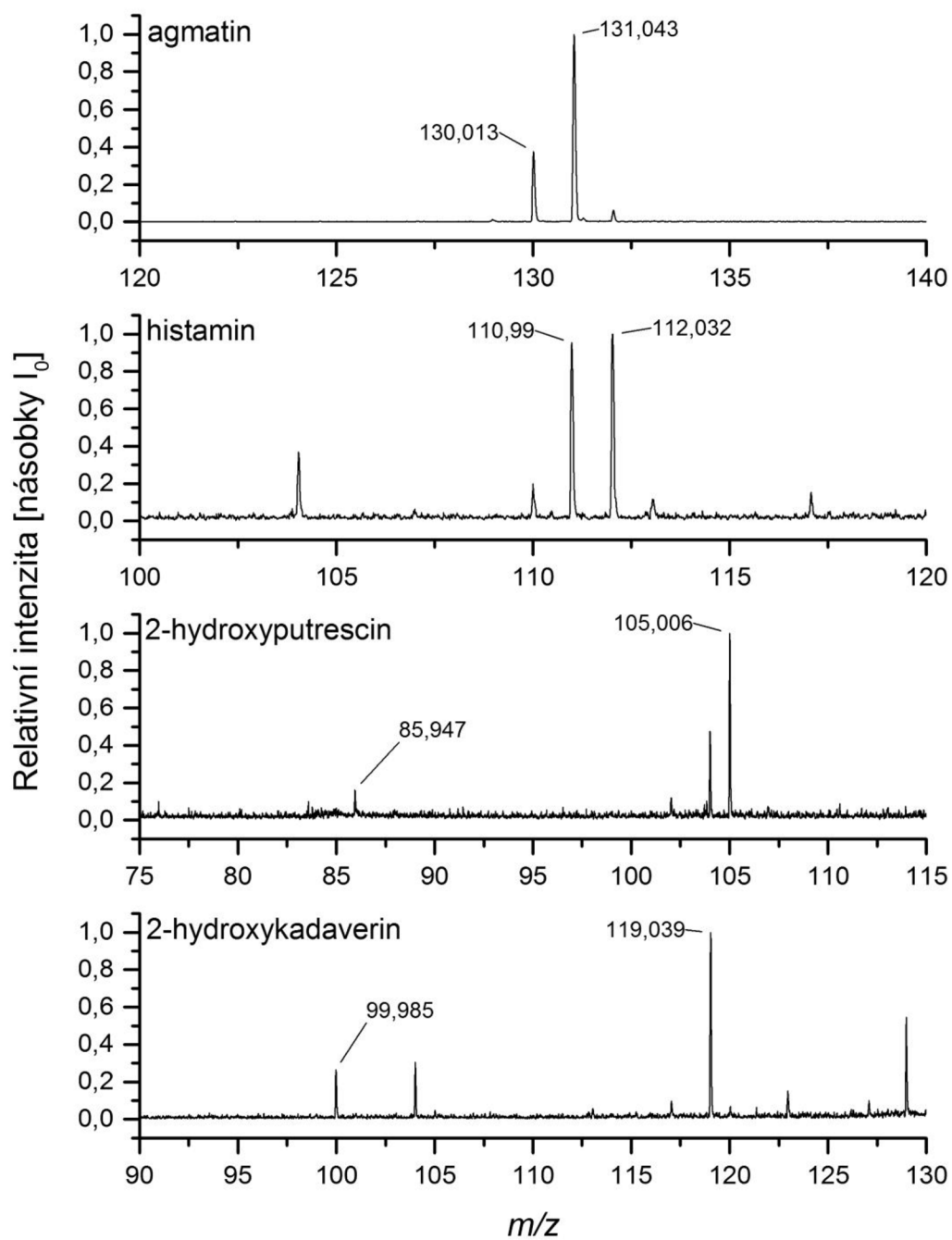
Obr. 13: Saturační křivky oxidace putrescinu v porovnávaných pufrch za katalýzy PSAO. Červeně v K-fosfátovém pufru, zeleně v hydrogenuhličitanu amonném. Křivky získány z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové v programu GraphPad Prism 8. Světlejším odstínem jsou zobrazeny křivky získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu.

Dále byla ověřována detegovatelnost substrátů a produktů jejich oxidace pomocí MALDI ToF MS (postup viz str. 46). Všechny testované substráty byly detegovatelné. Produkty byly detegovatelné (hmotnostní spektra viz Obr. 14 - 16), s výjimkou produktu oxidace DADO, jež byl detegovatelný pouze při použití DHB jako matrice (potlačení signálu produktu), a produktu oxidace cystaminu, jež nebyl detegován vůbec. V případě DADO se ve spektru reakční směsi vyskytoval neznámý signál o  $m/z = 147$  (v matici nepřítomen). Jelikož ve spektru reakční směsi obsahující cystamin byl signál o  $m/z = 78$ , což odpovídá jeho redukované formě (cysteaminu), která je známým inhibitorem CuAO (De Marco *et al.*, 1962), bylo pojata podezření, že cystamin je v hydrogenuhličitanovém pufru redukován a dochází k inhibici. Bylo provedeno spektrofotometrické měření s použitím hydrogenuhličitanového pufru a cystaminu jako substrátu. Cystamin nebyl v tomto pufru (na rozdíl od K-fosfátu) oxidován. Z tohoto důvodu bylo testováno použití 50 mM triethylamoniumacetátu o pH 6,9 při měření s cystaminem. Při spektrofotometrickém měření k reakci docházelo. Při měření pomocí MALDI ToF již nebyl přítomen signál o  $m/z = 78$  a docházelo ke spotřebování substrátu (v případě reakce přes noc úplně), signál produktu však nebyl detegován (hmotnostní spektra viz Obr. 17). V případě měření s 4(AM)P jako substrátem poskytoval produkt lepší signály při použití DHB matrice. Produkt oxidace N(3AP)P nebyl detegován (hmotnostní spektrum viz Obr. 18), při spektrofotometrickém měření k reakci nedocházelo. Látka tedy není substrátem. V případě některých substrátů a produktů byly signály slabé, což omezovalo měření kinetických parametrů (dále, viz str 65-66).

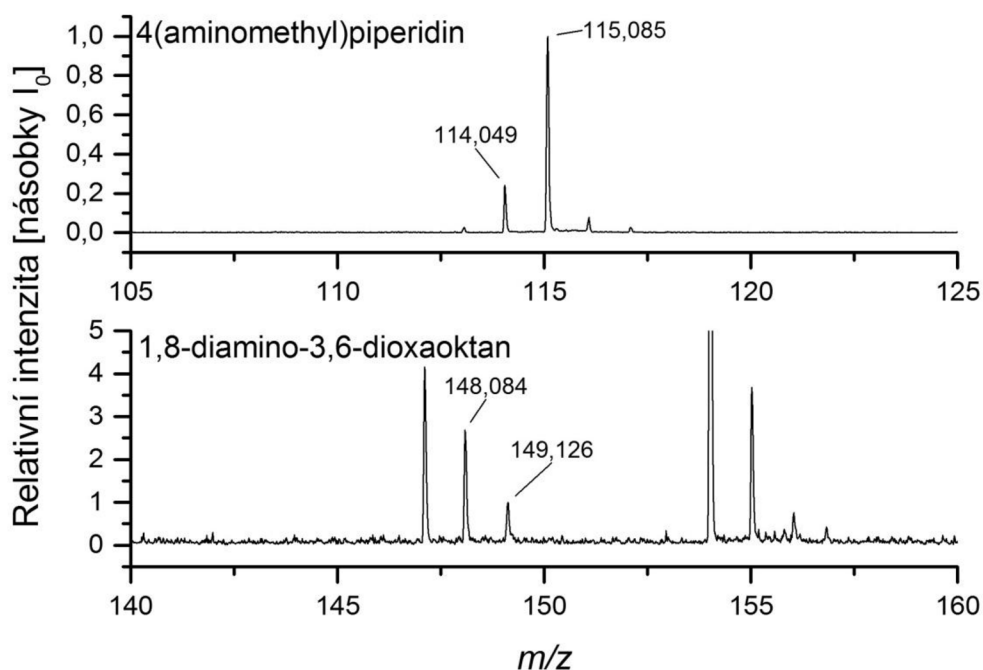
MALDI destičky, jež byly pro měření použitelné, jsou uvedeny na str. 46. Vybraný postup nanášení na destičku je uveden na str. 46. Byla testována možnost zastavení reakce přidávkou matrice obsahující 2,5% TFA. Po přidávku TFA docházelo k supresi signálu produktů, postup tedy není použitelný. Vybráno bylo zastavení reakce pomocí chlazení reakční směsi ledem.



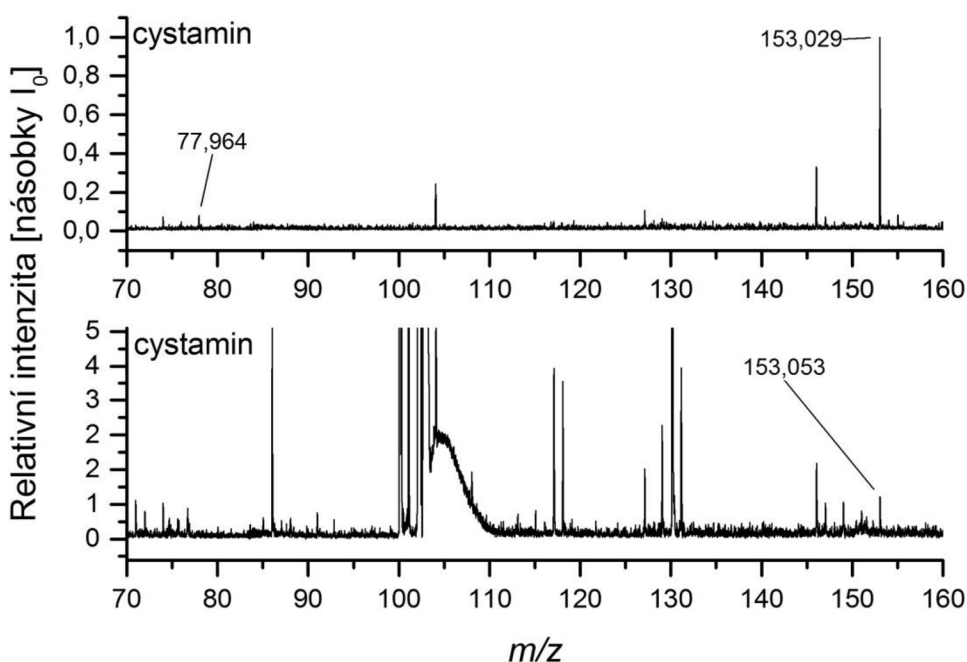
Obr. 14: MALDI-ToF hmotnostní spektra reakčních směsí obsahujících putrescin ( $m/z$  89, produkt  $m/z$  70), kadaverin ( $m/z$  103, produkt  $m/z$  84), diaminohexan ( $m/z$  117, produkt  $m/z$  98) a spermidin ( $m/z$  146, produkt  $m/z$  127); (shora v tomto pořadí). Zobrazná spektra vybrána z průběhu měření kinetických parametrů dále (viz str. 48). Relativní intenzita znázorněna v násobcích intenzity signálu substrátu.



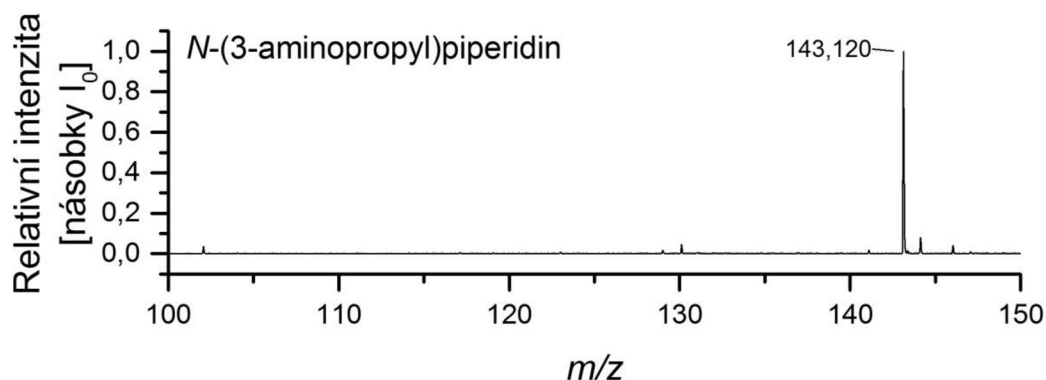
Obr. 15: MALDI-ToF hmotnostní spektra reakčních směsí obsahujících agmatin ( $m/z$  131, produkt  $m/z$  130), histamin ( $m/z$  112, produkt  $m/z$  111), 2-hydroxyputrescin ( $m/z$  105, produkt  $m/z$  86) a 2-hydroxykadaverin ( $m/z$  119, produkt  $m/z$  100); (shora v tomto pořadí). Zobrazná spektra vybrána z průběhu měření kinetických parametrů dále (viz str. 48). Relativní intenzita znázorněna v násobcích intenzity signálu substrátu.



Obr. 16: MALDI-ToF hmotnostní spektra reakčních směsí obsahujících 4(AM)P ( $m/z$  115, produkt  $m/z$  114) a DADO ( $m/z$  149, produkt  $m/z$  148); (shora v tomto pořadí). Zobrazná spektra vybrána z průběhu měření kinetických parametrů dále (viz str. 48). Relativní intenzita znázorněna v násobcích intenzity signálu substrátu.

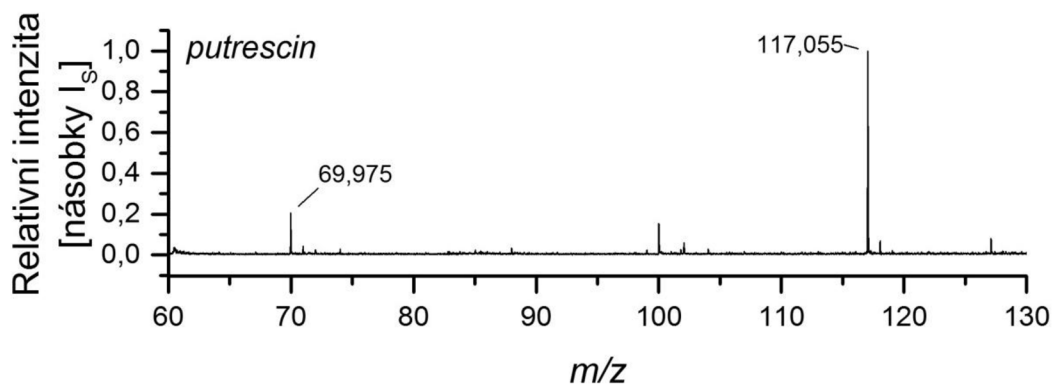


Obr. 17: MALDI-ToF hmotnostní spektra reakčních směsí obsahujících cystamin ( $m/z$  153). Nahoře měření hydrogenuhličitanovém pufru o pH 6,9 po 24 h inkubace, dole měření v triethylamoniumacetátu amonném o pH 6,9 po 50 min inkubace. Signál  $m/z$  78 by mohl být redukovanou formou substrátu (viz text výše). Použito 5  $\mu$ l 10x ředěného enzymového roztoku (ředění ze zásobního roztoku o koncentraci proteinu 2,9  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a specifické aktivitě 415,5  $\text{ncat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Relativní intenzita znázorněna v násobcích intenzity signálu substrátu.

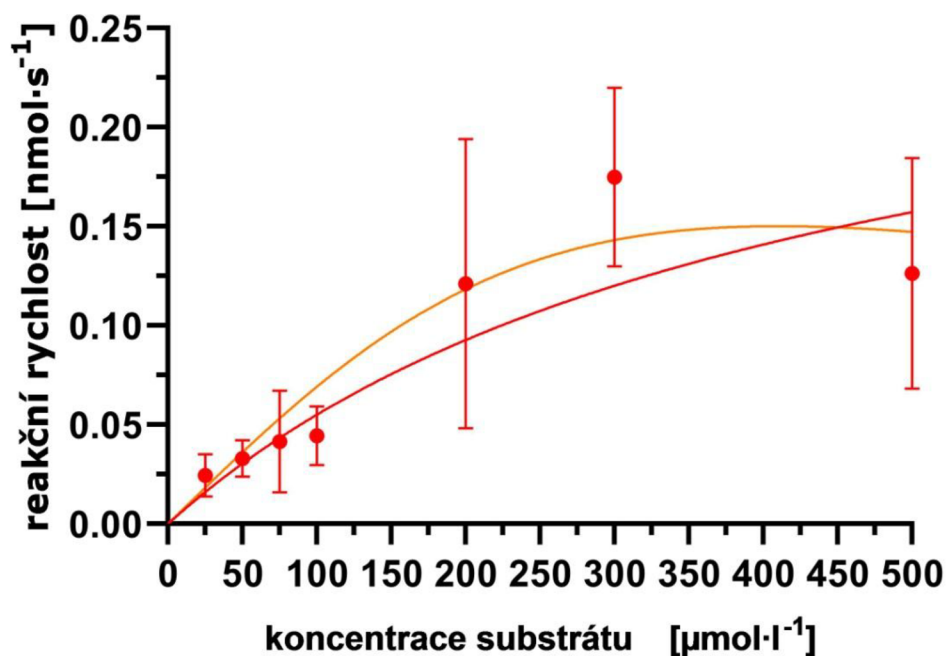


Obr. 18: MALDI-ToF hmotnostní spektrum reakční směsi obsahující N(3AP)P ( $m/z$  143). Po 24 h inkubace, 10  $\mu\text{l}$  10x ředěného ze zásobního roztoku o koncentraci proteinu 1,4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , specifické aktivitě 1232  $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

Byla testována možnost použití přídavku diaminopentanonu (finální konc. 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) do roztoku matrice jako interního standardu. Tato možnost byla testována při použití putrescinu jako substrátu. Docházelo k potlačení signálu substrátu, avšak signál standardu a produktu byl silný (intenzita o 2-3 řády vyšší než intenzita šumu, spektrum viz obr. 19) a bylo možno spočítat vzájemné poměry pro jednotlivé koncentrace. Vydělením koncentrace standardu poměrem  $I_{\text{st}}/I_{\text{p}}$ , kde  $I_{\text{st}}$  a  $I_{\text{p}}$  jsou intenzity signálu standardu a produktu byla odvozena koncentrace produktu, dle níž byla odvozena reakční rychlost (za předpokladu identické účinnosti ionizace standardu a produktu). Z 8 provedených měření bylo vybráno 6, jež zdánlivě vykazovaly kinetiku Michaelise a Mentenové. Z těchto dat byla provedena nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové a tato nelineární regrese se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu v programu GraphPad Prism 8. Odlehlé hodnoty byly odstraněny automaticky. Saturační křivky jsou zobrazeny na obr. 20. Proložení dle rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu bylo programem vyhodnoceno jako nevhodné. Z proložení dle rovnice Michaelise a Mentenové byly získány následující hodnoty kinetických parametrů:  $K_m = 432$ ;  $V_{\text{lim}} = 0,293$ ;  $k_{\text{cat}} = 7,54$ . Tyto hodnoty a měření k nim vedoucí však nelze považovat za použitelné z důvodu velké odlišnosti hodnot získaných v rámci jednotlivých měření (viz chybové úsečky na obr. 20).



Obr. 19: Ukázka změřeného MALDI-ToF hmotnostního spektra s označenými signály standardu ( $m/z = 117$ ) a produktu ( $m/z = 70$ ). Relativní intenzita znázorněna v násobcích intenzity signálu standardu.



Obr. 20: Saturační křivky oxidace putrescinu získané porovnáním intenzit signálů standardu a produktu v hmotnostních spektrech. Křivky získány z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové v programu GraphPad Prism 8. Oranžově křivka získaná z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu. Z délky chybových úseček je patrná nepoužitelnost hodnot takto změřených.



#### 4.4 Měření kinetických parametrů pomocí MALDI ToF MS

Bylo provedeno měření kinetických parametrů pomocí MALDI ToF MS postupem uvedeným na str. 48. Pro každý bod datové řady byly provedeny 3 nezávislé reakce, v rámci každé reakce byly provedeny 3 technické replikáty. Pro každé měření (technický replikát) byl vypočten poměr  $\frac{I_p}{I_p+I_s}$ , kde  $I_p$  je intenzita signálu produktu a  $I_s$  je intenzita signálu substrátu. Tento poměr vyjadřuje zastoupení substrátu a produktu v reakční směsi za předpokladu identické účinnosti ionizace obou látek; jeho získané hodnoty vypsány v příloze č. 3). Z tohoto poměru pak byla výpočtem odvozena reakční rychlost (stejným způsobem bylo možno k výpočtu použít poměr ploch signálů, získané výsledky byly téměř shodné). Ze závislosti určeného poměru intenzit na výchozí koncentraci substrátu byly pomocí nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové či této nelineární regrese se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu získány saturační křivky, jež jsou zobrazeny na Obr. 21-29 níže. Spolehlivý výpočet kinetických parametrů bylo možno provést pouze nelineární regresí dle rovnice Michaelise a Mentenové. V případě zohlednění inhibice nadbytkem substrátu vycházely nereálné hodnoty a program GraphPad hlásil nevhodnost tohoto proložení (saturační křivky viz Obr. 24, 28, a 29). Získané hodnoty kinetických parametrů pro jednotlivé reakce ( $K_m$ ,  $V_{lim}$  a  $k_{cat}$ ) byly zprůměrovány. Tyto průměry jsou uvedeny v Tab. 15 včetně směrodatných odchylek. Ukázka naměřených dat a detailů postupu vyhodnocení na příkladu agmatinu je zapsána dále (kapitola 4.4.1, str. 74).

V případě kadaverinu, spermidinu, histaminu a agmatinu byly signály silné (intenzita signálů o 2-3 řády vyšší než intenzita šumu) a nepřekrývaly se se signály matrice. Při vyhodnocení dat pro histamin nebyla použita nejvyšší koncentrace substrátu, jelikož snižovala přesnost proložení křivky. V případě diaminohexanu docházelo k překryvu signálu substrátu s nevýrazným signálem matrice (intenzita o řád vyšší než intenzita šumu), signály byly silné (intenzita o 2-3 řády vyšší než intenzita šumu). V případě hydroxyputrescinu a 4(AM)P byly signály slabé, ale dostatečné (intenzita o 1-2 řády vyšší než intenzita šumu). V případě putrescinu a DADO docházelo k neznámému jevu způsobujícímu výraznější pokles reakční rychlosti s rostoucí koncentrací substrátu, než by odpovídalo kinetice Michaelise a Mentenové (až k reakčním rychlostem nižším než při nižších koncentracích substrátu, viz Obr. 28 a 29). Proložení křivkou nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu neodpovídalo tomuto jevu. Signály byly slabé, ale použitelné (intenzita o 1-2 řády vyšší než intenzita šumu, v případě nižších koncentrací blížíci se intenzitě šumu). Vyhodnocení poskytovalo relevantní výsledky pouze po odstranění nejvyšších hodnot

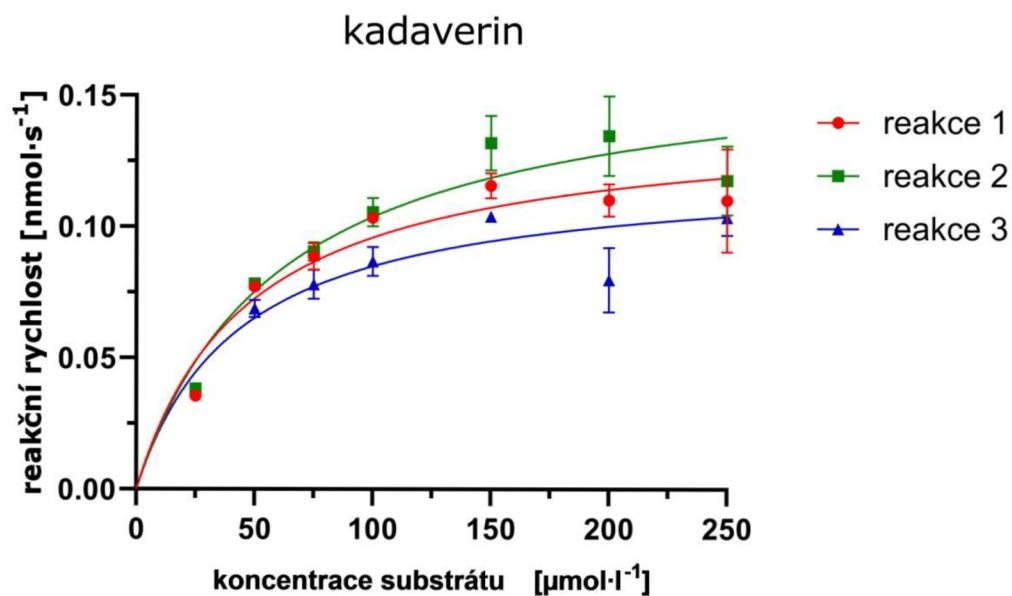
koncentrační řady (3 koncentrace pro putrescin, 1 pro DADO) a jedné z reakčních řad značně odlišné od dvou pro vyhodnocení použitých. Byla ověřována možnost, že výše uvedený neznámý jev je inhibice produkovaným peroxidem vodíku zmíněná v teoretické části (str. 14). V tomto případě by po přidání katalasy do reakční směsi došlo k omezení tohoto jevu. Přidání katalasy do reakční směsi na tento jev nemělo žádný vliv. V případě hydroxykadaverinu docházelo k výše uvedenému jevu ve značné míře a signály byly velmi slabé (intenzita o řád vyšší než intenzita šumu, v případě nižších koncentrací blíží se intenzitě šumu), nebylo možno provést adekvátní vyhodnocení. Pro cystamin nebylo možno měření provést, jelikož nebyl detegován produkt (viz výsledky str. 59 a diskuse str. 81).

Tab. 15: Hodnoty kinetických parametrů získané měřením pomocí MALDI ToF MS; průměr hodnot z vyhodnocení tří reakcí pomocí programu GraphPad Prism 8. Výpočty závislé na molekulové hmotnosti proteinu byly provedeny s hmotností podjednotky 73,679 kDa (UniProt; po odštěpení signálního peptidu).

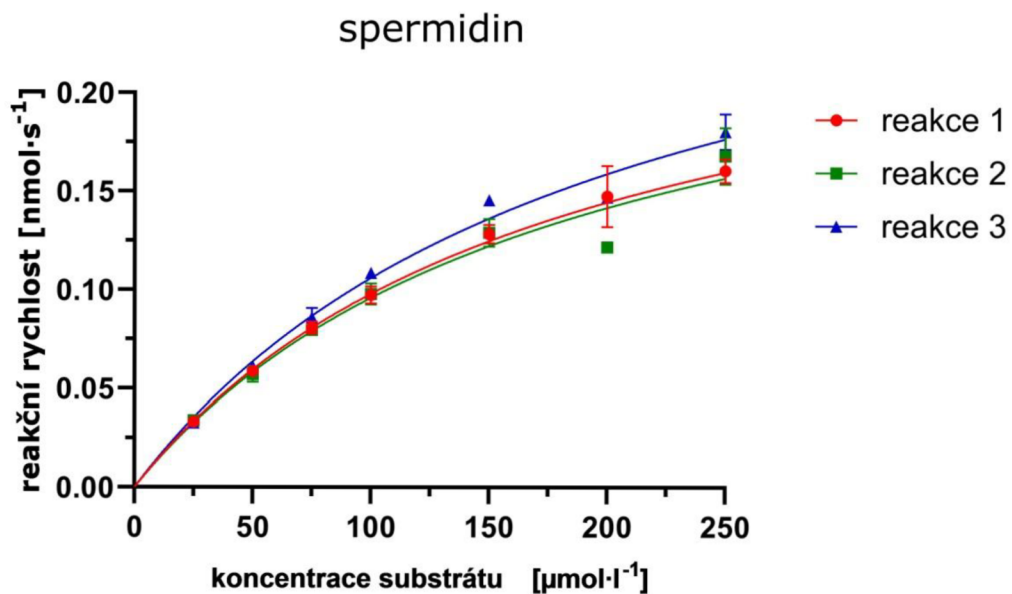
Substrát	$K_m$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$S_D$	$V_{\text{lim}}$ [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$S_D$	$k_{\text{cat}}^*$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$S_D$	$k_{\text{cat}}/K_m$ [ $\text{l}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ ]	$V_{\text{lim}}$ na mg proteinu [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]
kadaverin	50	7,5	0,143	0,018	18,4	2,4	0,37	250
spermidin	188	8,4	0,288	0,021	37,1	2,7	0,20	503
histamin	57	12,7	0,006	0,001	0,16	0,03	0,0028	2,1
agmatin	71	7,7	0,069	0,003	3,5	0,1	0,050	48
diaminohexan	127	10,4	0,308	0,021	11,3	0,8	0,089	154
2-hydroxyputrescin	68	11,2	0,015	0,001	0,8	0,1	0,012	10
4(AM)P	36	6,8	0,064	0,004	3,3	0,2	0,093	45
putrescin <sup>†</sup>	65	2,5	0,117	0,008	6,02	0,4	0,093	82
DADO <sup>†</sup>	174	11,9	0,109	0,002	5,67	0,1	0,033	77

\*Uvedené hodnoty  $k_{\text{cat}}$  nejsou vypočteny ze zde uvedených průměrných hodnot  $K_m$  a  $V_{\text{lim}}$ . Jedná se o průměry hodnot  $k_{\text{cat}}$  vypočtených pro jednotlivé reakce z pro ně vypočtených hodnot  $K_m$  a  $V_{\text{lim}}$ .

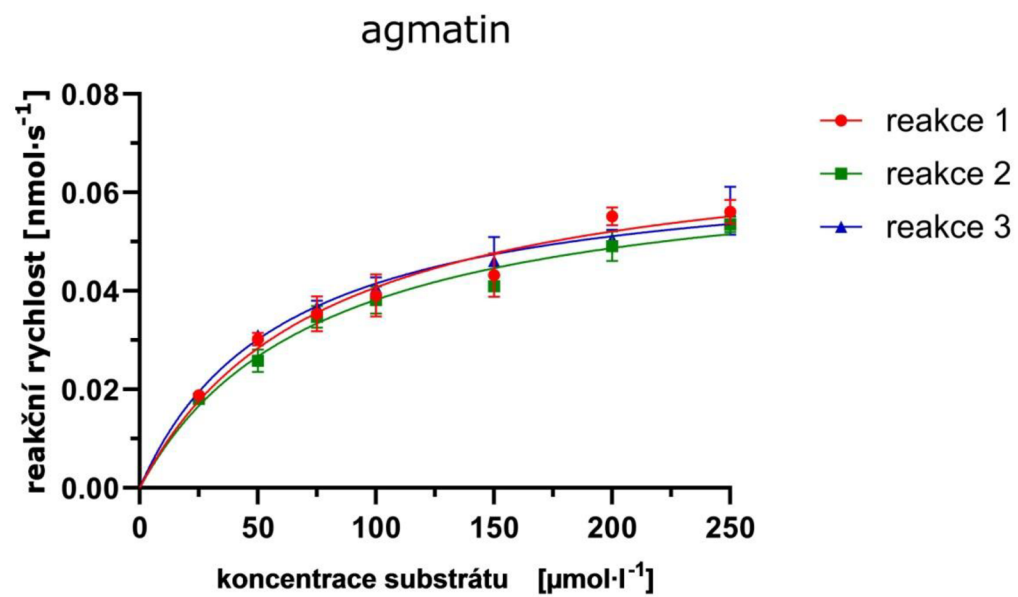
<sup>†</sup>V případě těchto substrátů brána v potaz pouze část naměřených hodnot. Viz text výše.



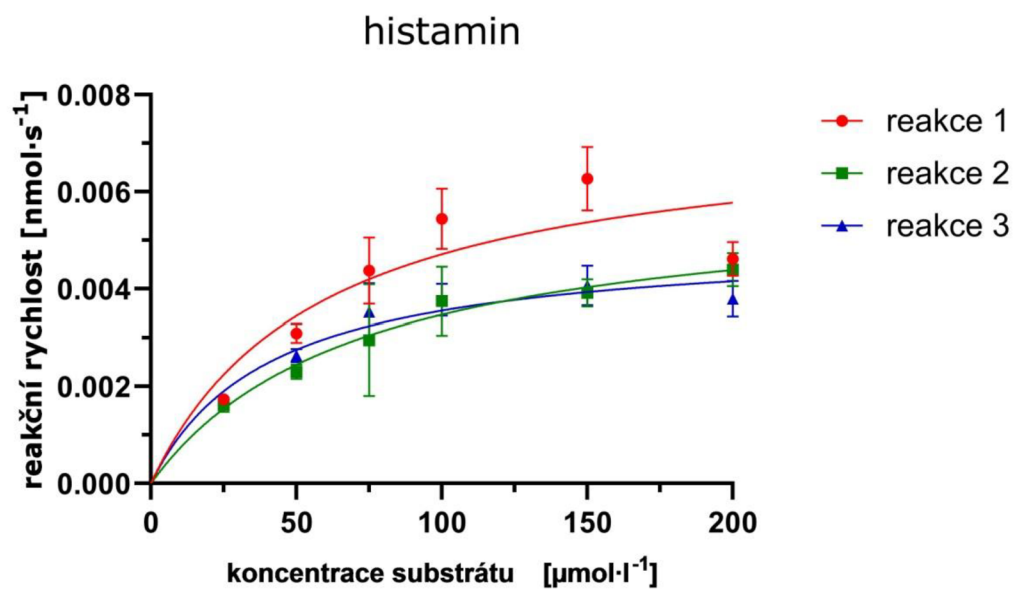
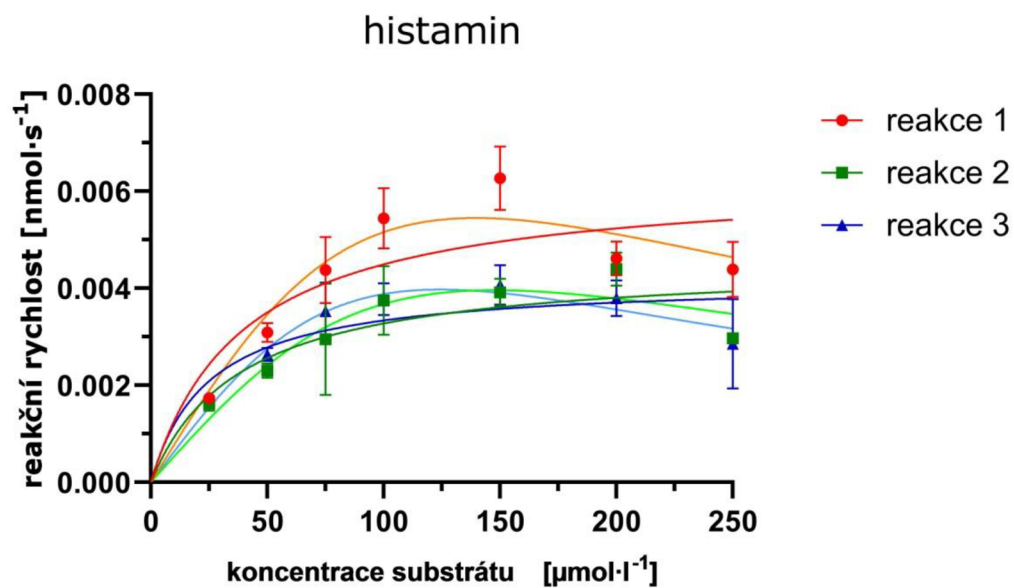
Obr. 21: Saturační křivky pro kadaverin jako substrát získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové v programu GraphPad Prism 8. Barevně odlišeny jednotlivé reakce.



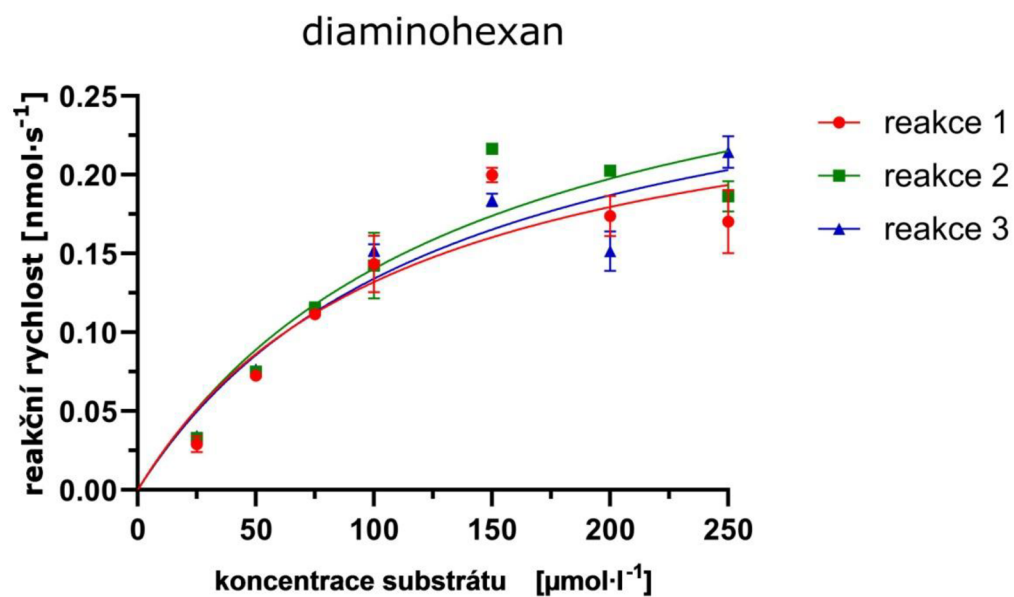
Obr. 22: Saturační křivky pro spermidin jako substrát získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové v programu GraphPad Prism 8. Barevně odlišeny jednotlivé reakce.



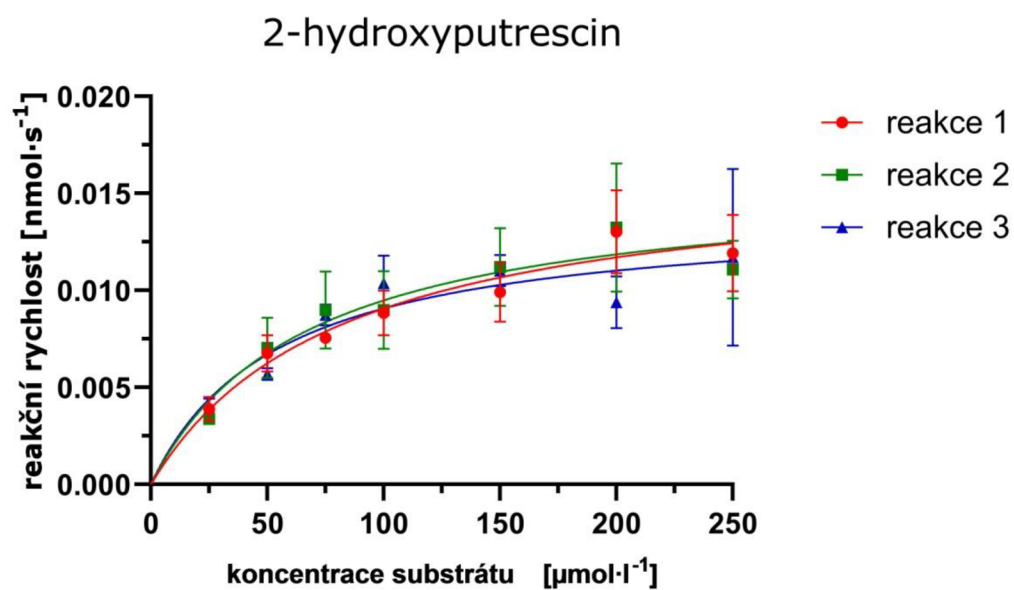
Obr. 23: Saturační křivky pro agmatin jako substrát získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové v programu GraphPad Prism 8. Barevně odlišeny jednotlivé reakce.



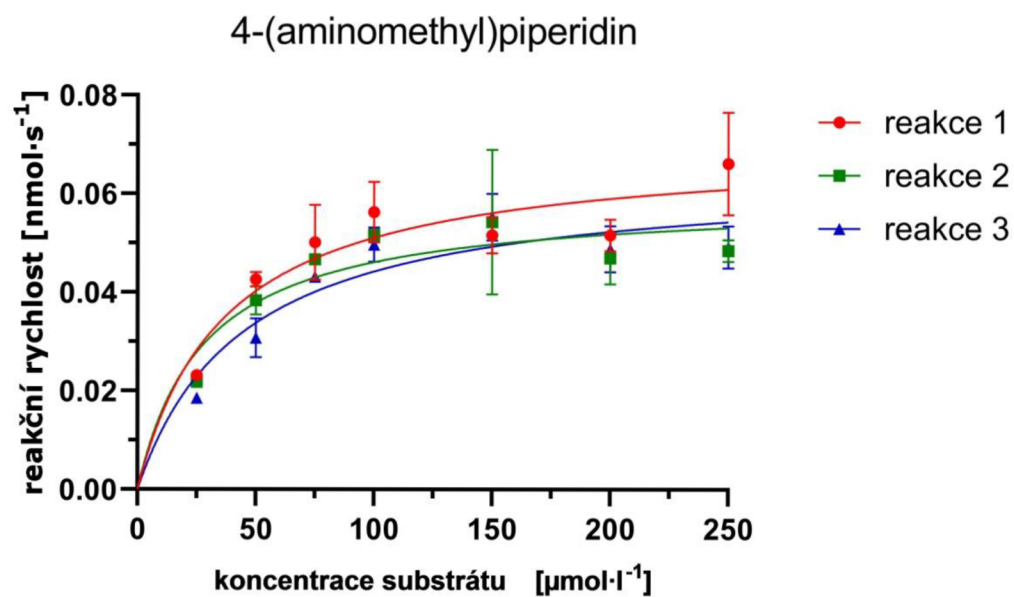
Obr. 24: Saturační křivky pro histamin jako substrát. Nahoře křivky získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové a z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu (světlejší odstíny) v programu GraphPad Prism 8; sedmibodová reakční řada. Dole křivky získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové; 6 bodů reakční řady použitých k určení kinetických parametrů. Barevně odlišeny jednotlivé reakce.



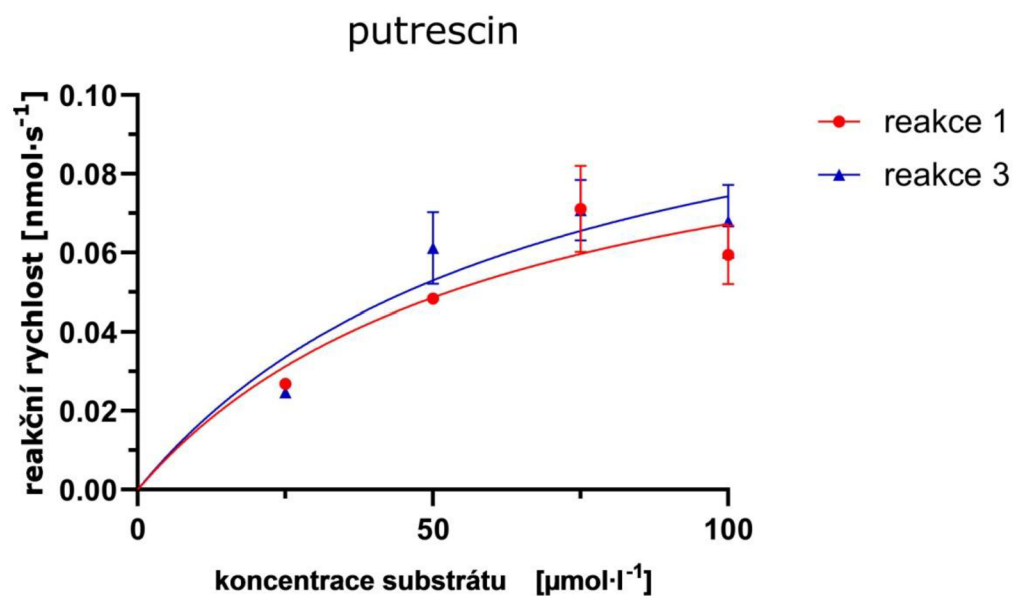
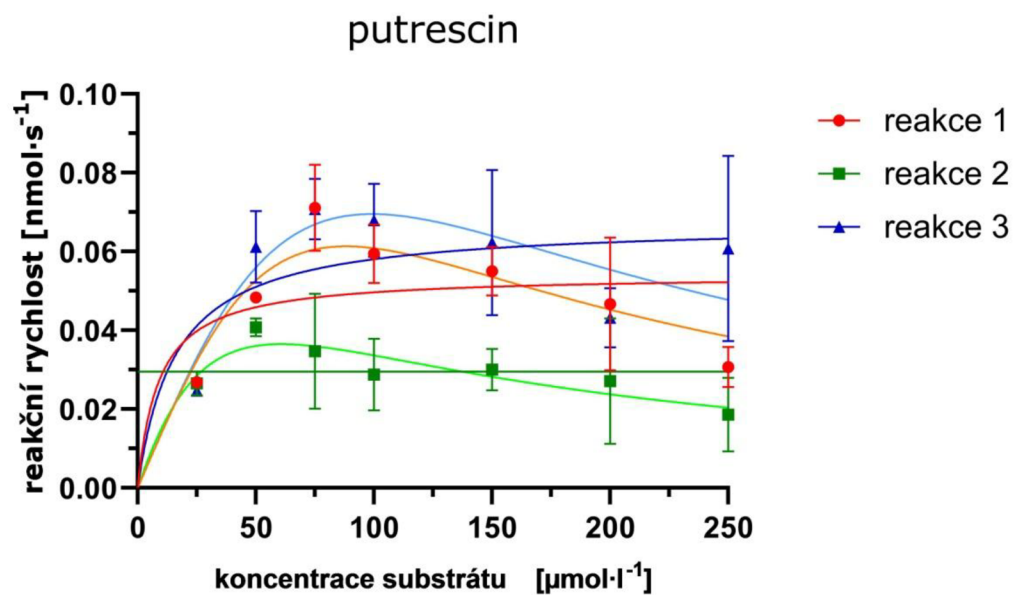
Obr. 25: Saturační křivky pro diaminohexan jako substrát získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové v programu GraphPad Prism 8. Barevně odlišeny jednotlivé reakce.



Obr. 26: Saturační křivky pro 2-hydroxyputrescin jako substrát získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové v programu GraphPad Prism 8. Barevně odlišeny jednotlivé reakce.

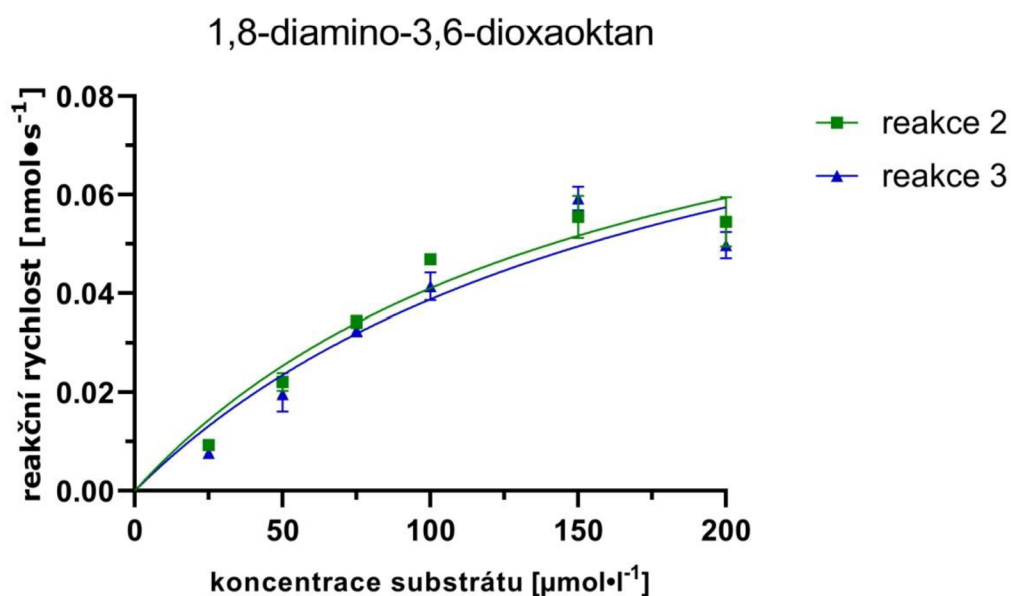
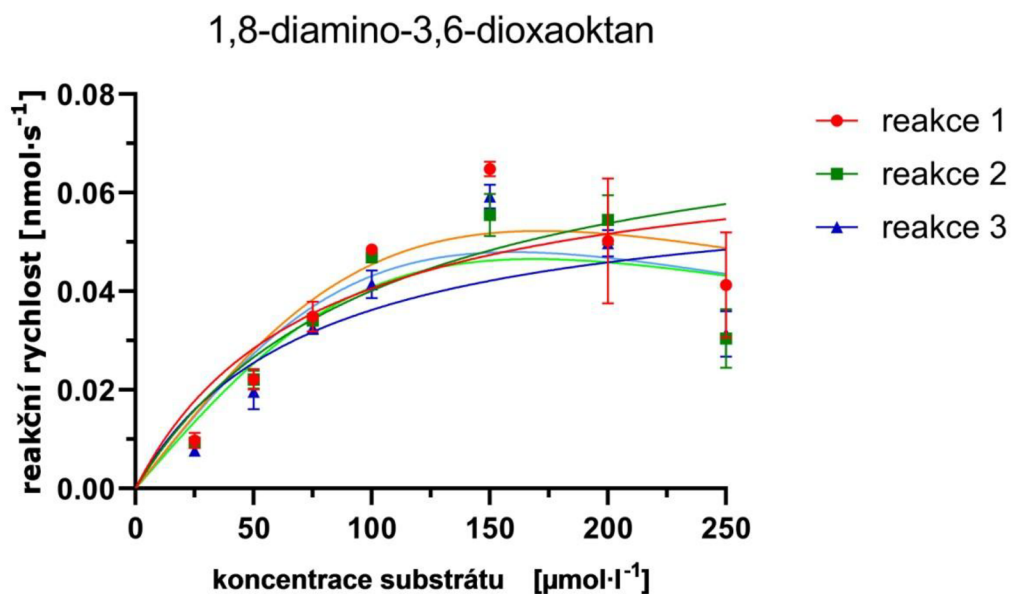


Obr. 27: Saturační křivky pro 4(AM)P jako substrát získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové v programu GraphPad Prism 8. Barevně odlišeny jednotlivé reakce.



Obr. 28: Saturační křivky pro putrescin jako substrát. Nahoře křivky získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové a z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu (světlejší odstíny) v programu GraphPad Prism 8; sedmibodová reakční řada. Dole křivky získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové; 4 body reakční řady použité k určení kinetických parametrů, reakce č. 2 nebrána v potaz. Barevně odlišené jednotlivé reakce.



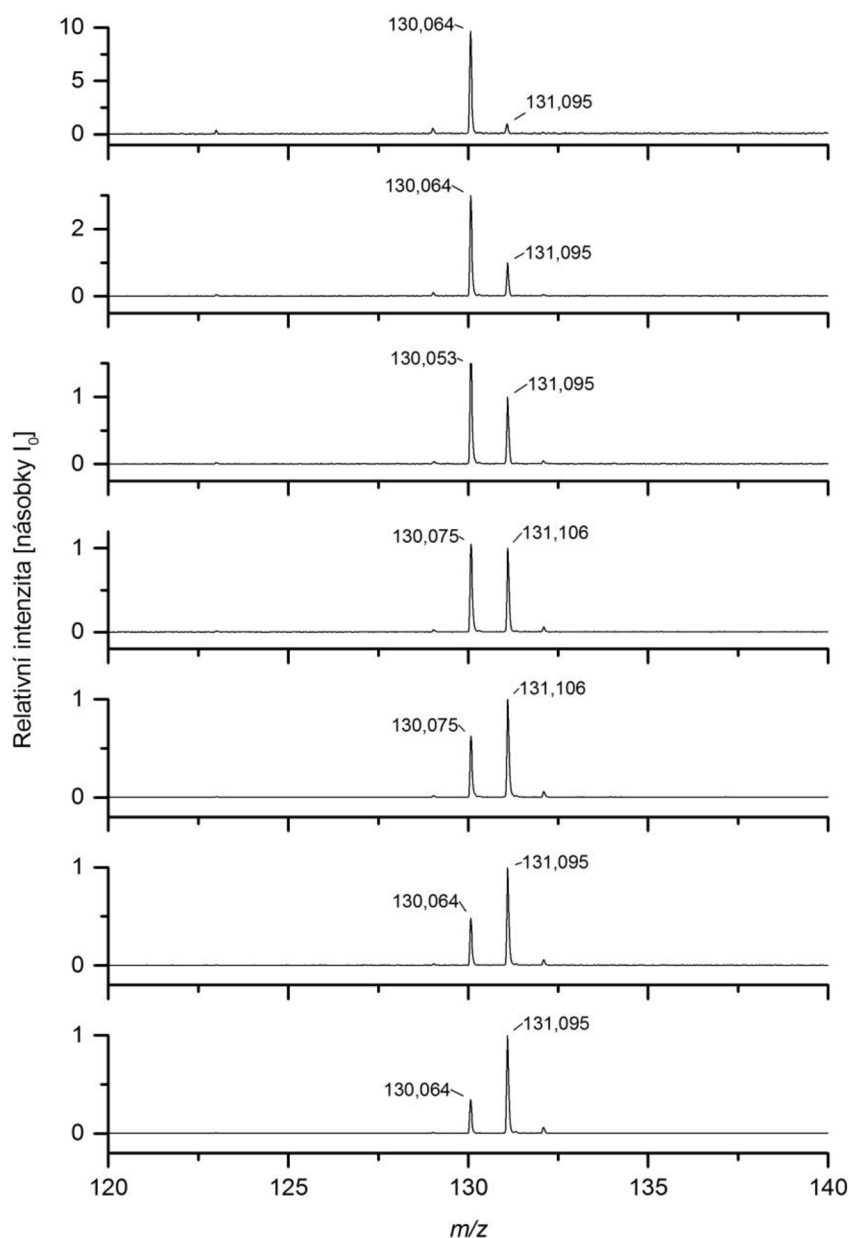


Obr. 29: Saturační křivky pro DADO jako substrát. Nahoře křivky získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové a z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu (světlejší odstíny) v programu GraphPad Prism 8; sedmibodová reakční řada. Dole křivky získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové; 6 bodů reakční řady použitých k určení kinetických parametrů, reakce č. 1 nebrána v potaz. Barevně odlišeny jednotlivé reakce.

#### 4.4.1 Ukázka detailů postupu vyhodnocení

V této části bude detailně popsáno, jak probíhalo vyhodnocování dat získaných pomocí MALDI ToF MS. Tato ukázka je provedena na příkladu agmatinu jako substrátu.

Pro každé opakování v triplikátu byla změřena sada hmotnostních spekter (Obr. 30). V této sadě reakčních spekter byly v rámci jednotlivých měření v programu flexAnalysis 3.4 označeny signály substrátu (zde  $m/z$  130) a produktu (zde  $m/z$  131).



Obr. 30: Ukázka sady spekter pro první ze tří měření v rámci reakce č. 1 při měření kinetických parametrů oxidace agmatinu. Viditelné jsou změny intenzity signálu produktu ( $m/z$  130) a substrátu ( $m/z$  131). Shora dolů rostoucí počáteční koncentrace substrátu v reakční směsi (25; 50; 75; 100; 150; 200 a 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Použitý enzym byl ředěn ze zásobního roztoku o koncentraci proteinu 1,4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a specifické aktivitě 1232  $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Enzym byl dávkován v množství 5  $\mu\text{l}$ , inkubace probíhala 20 min.

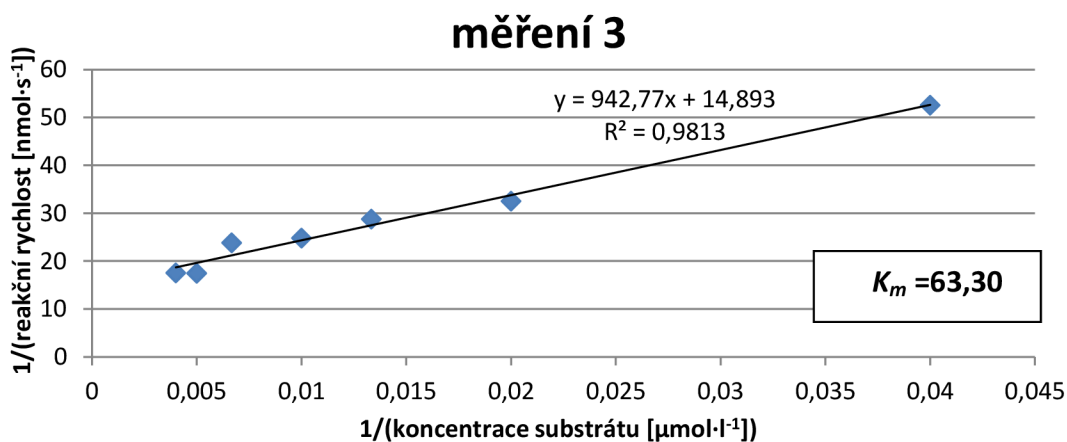
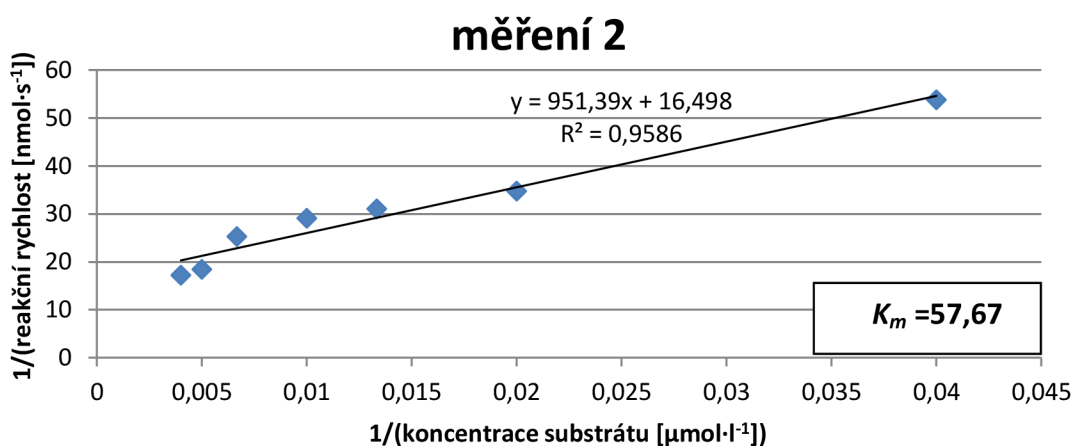
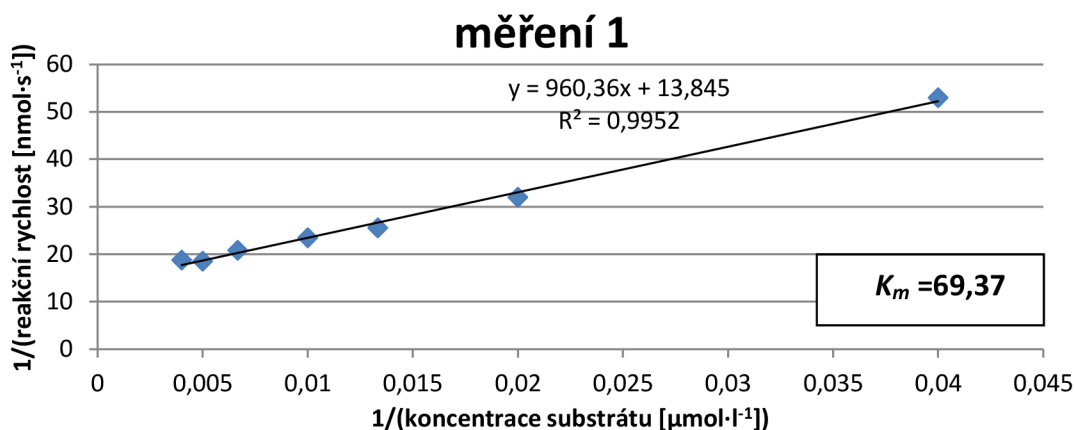
Byly určeny hodnoty intenzity těchto signálů (program flexAnalysis). Z těchto hodnot byl následně pomocí programu MS Excel vypočten poměr  $\frac{I_p}{I_p+I_s}$  a odvozené hodnoty reakční rychlosti. Ukázka tohoto výpočtu je zobrazena v Tab. 16. Zároveň byl proveden kontrolní výpočet  $K_m$  pomocí lineární regrese dle Lineweavera a Burka. Tento výpočet sloužil pouze k ověření, že jednotlivá opakování v rámci reakce a jednotlivé reakce poskytují podobné výsledky a nebyl dále použit. Ukázka je zobrazena na Obr. 31. Spočtené hodnoty poměru  $\frac{I_p}{I_p+I_s}$  pro všechna provedená měření jsou zapsány v příloze č. 3.

Tab. 16: Ukázka vzorců použitých pro výpočet poměru  $\frac{I_p}{I_p+I_s}$  a odvozené reakční rychlosti (včetně mezivýpočtů) pomocí programu MS Excel. Ukázka hodnot naměřených a vypočtených pro reakci č. 1 (pro přehlednost zaokrouhlo) při měření s agmatinem jako substrátem.

Vzorce použité pro výpočty								
Vstupní hodnoty		Výpočet reakční rychlosti a mezivýpočty					Hodnoty pro kontrolní vynesení dle L. a B. <sup>†</sup>	
c substrátu [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Intenzity signálů [a. u.]		$\frac{I_p}{I_p + I_s}$	Odvozená konc. produktu* [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Odvozené látkové množství produktu* [nmol]	Odvozená reakční rychlost* [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$1/v$	$1/[S]$
	$m/z$ 130	$m/z$ 131						
[S]	$I_p$	$I_s$	$X = \frac{I_p}{I_p + I_s}$	$c=[S]\cdot X$	$n = c\cdot V[\text{ml}]$ $V = 1 \text{ ml}$	$v = n/t[\text{s}]$ $t = 1200 \text{ s}$	$1/v$	$1/[S]$
Hodnoty pro 1. Měření reakce č. 1 (vychází ze spekter uvedených na Obr. 30) <sup>‡</sup>								
25	8668	900	0,906	22,65	22,65	0,01887	52,98	0,0400
50	20153	6712	0,750	37,51	37,51	0,03126	31,99	0,0200
75	10630	6335	0,627	46,99	46,99	0,03916	25,54	0,0133
100	18809	17930	0,512	51,20	51,20	0,04266	23,44	0,0100
150	18515	29607	0,385	57,71	57,71	0,04809	20,79	0,0067
200	15863	33060	0,324	64,85	64,85	0,05404	18,50	0,0050
250	12171	35349	0,256	64,03	64,03	0,05336	18,74	0,0040
Hodnoty pro 2. Měření reakce č. 1 <sup>‡</sup>								
25	9215	1112	0,892	22,31	22,31	0,01859	53,79	0,0400
50	35375	15844	0,691	34,53	34,53	0,02878	34,75	0,0200
75	31739	29888	0,515	38,63	38,63	0,03219	31,07	0,0133
100	33272	47431	0,412	41,23	41,23	0,03436	29,11	0,0100
150	5912	12774	0,316	47,46	47,46	0,03955	25,29	0,0067
200	9994	20729	0,325	65,06	65,06	0,05422	18,44	0,0050
250	16532	42814	0,279	69,64	69,64	0,05804	17,23	0,0040
Hodnoty pro 3. Měření reakce č. 1 <sup>‡</sup>								
25	8237	785	0,913	22,82	22,82	0,01902	52,57	0,0400
50	16567	5898	0,737	36,87	36,87	0,03073	32,54	0,0200
75	27432	21929	0,556	41,68	41,68	0,03473	28,79	0,0133
100	24235	25894	0,483	48,35	48,35	0,04029	24,82	0,0100
150	3723	7368	0,336	50,35	50,35	0,04196	23,83	0,0067
200	15308	29274	0,343	68,67	68,67	0,05723	17,47	0,0050
250	12373	32864	0,274	22,82	22,82	0,01902	17,55	0,0040

\*Tyto hodnoty odpovídají reálným za předpokladu shodné míry ionizace substrátu a produktu.

† Pouze kontrolní vynesení. Viz text výše.



Obr. 31: Ukázka kontrolního vynesení pro 3 měření v rámci reakce č. 1 pomocí lineární regrese dle Lineweawera a Burka. Vstupní hodnoty zobrazeny v Tab. 17. Toto kontrolní vynesení sloužilo pouze k průběžné kontrole, zda reakce vykazuje kinetiku Michaelise a Mentenové a zda jednotlivá opakování poskytují podobné hodnoty  $K_m$ .

Odvozené hodnoty reakční rychlosti získané pomocí programu MS Excel (Tab. 16 výše) byly vloženy do programu GraphPad Prism 8 a byla provedena nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové. Tato regrese byla provedena pro každou ze tří reakcí samostatně (tzn. pro 3 měření v reakci dohromady). Odlehlé hodnoty byly odstraněny automaticky. Získané hodnoty kinetických parametrů byly zprůměrovány. Výsledné průměry a jejich směrodatné odchylky jsou uvedeny výše v Tab. 15 (viz str. 66). Ukázka tohoto vyhodnocení, jako pokračování výše uváděného příkladu, je uvedena v Tab. 17. Saturační křivky jsou zobrazeny výše na Obr. 23 (str. 68).

Výpočet byl analogicky proveden pro všechny zkoumané substráty (výsledky viz str. 65).

Tab. 17: Ukázka vstupních dat vkládaných do programu Graph Pad Prism za účelem provedení nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové pro reakci č. 1 s agmatinem jako substrátem.

Vstupní hodnoty vložené do programu Graph Pad Prism 8				
c substrátu [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]		Reakční rychlost [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ ]*		
		Měření 1	Měření 2	Měření 3
25		0,01887	0,01859	0,01902
50		0,03126	0,02878	0,03073
75		0,03916	0,03219	0,03473
100		0,04266	0,03436	0,04029
150		0,04809	0,03955	0,04196
200		0,05404	0,05422	0,05723
250		0,05336	0,05804	0,01902
Výsledky analýzy				
Nejlepší proložení†		Interval spolehlivosti 95 %		R <sup>2</sup>
$K_m$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$V_{\text{lim}}$ [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$K_m$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$V_{\text{lim}}$ [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	
77,29	0,07223	56,46 až 106,0	0,06454 až 0,08204	0,9289

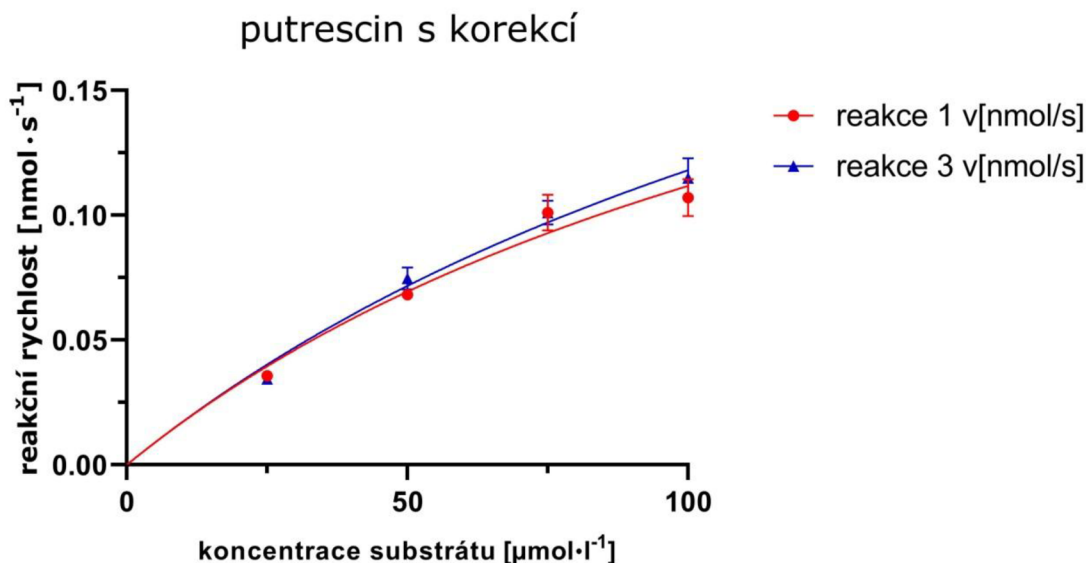
\*Tyto hodnoty jsou reálné za předpokladu shodné míry ionizace substrátu a produktu.

†V Tab. 16 uveden průměr ze tří takto vypočtených hodnot.

#### 4.4.2 Měření kinetických parametrů pomocí MALDI ToF MS s korekcí na odlišnou míru ionizace substrátu a produktu

Postupem uvedeným na str. 49 byl změřen poměr intenzit signálů putrescinu a ABAL v ekvimolárních směsích. Putrescin se ionizoval  $3,26 \pm 0,77$  krát lépe než  $\Delta^1$ -pyrrolin (všechny přítomný ABAL cyklizoval na  $\Delta^1$ -pyrrolin). Tento poměr nezávisel na koncentraci testovaných látek v ekvimolárních směsích.

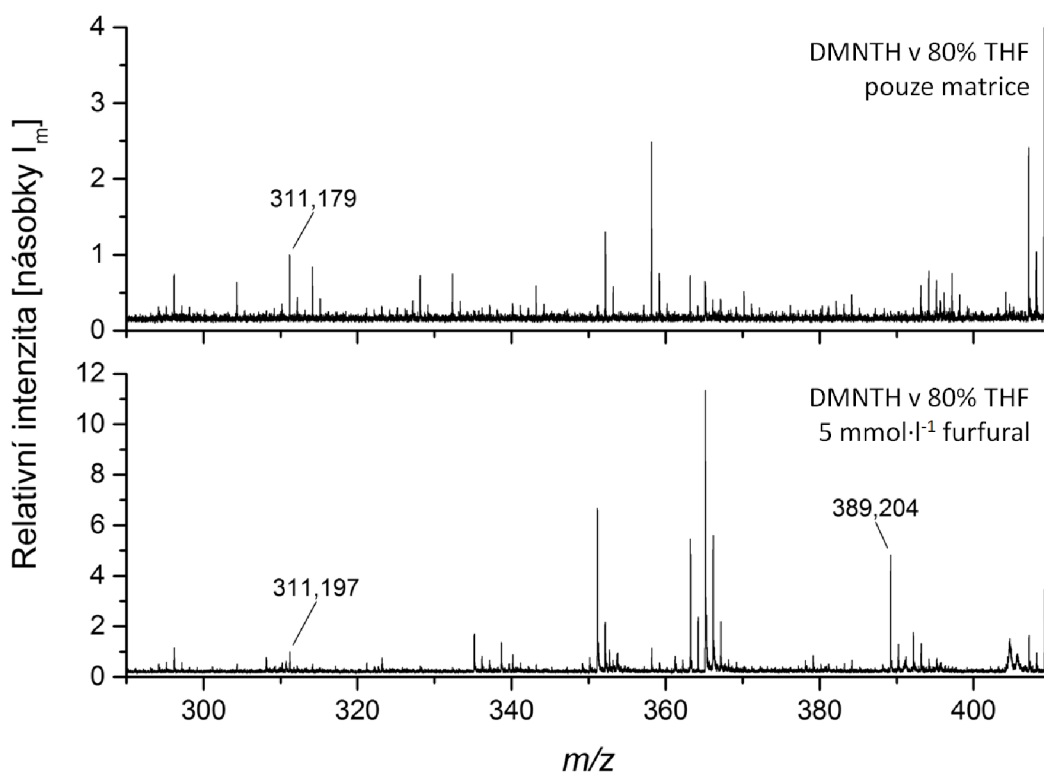
Bylo provedeno vyhodnocení měření kinetických parametrů pro měření s putrescinem jako substrátem způsobem uvedeným výše, avšak s tím rozdílem, že místo poměru  $\frac{I_p}{I_p+I_s}$  byl využit poměr  $\frac{I_p}{I_p+(I_s/Y)}$ , kde  $Y=3,26$ . Jedním z cílů tohoto měření bylo ověření možnosti, že takováto korekce by mohla odstranit výše zmíněný neznámý jev. K tomuto však nedošlo a pro toto vyhodnocení platí to, co provýše prováděné vyhodnocení měření kinetických parametrů oxidace putrescinu. Kinetické parametry vypočtené pomocí tohoto vyhodnocení byly:  $K_m = 170 \pm 13$ ;  $V_{lim} = 0,310 \pm 0,024$ ;  $k_{cat} = 16,0 \pm 1,2$ . Saturační křivky jsou zobrazeny na Obr. 32.



Obr. 32: Saturační křivky pro putrescin jako substrát s provedením korekce na rozdílnou míru ionizace substrátu a produktu. Dole křivky získané z nelineární regrese rovnice Michaelise a Mentenové pomocí programu GraphPad Prism 8; 4 body reakční řady použité k určení kinetických parametrů, reakce č. 2 nebrána v potaz. Barevně odlišeny jednotlivé reakce.

### 4.4.3 Měření s reaktivní maticí DMNTH

Bylo provedeno ověření detegovatelnosti aldehydů pomocí MALDI ToF s reaktivní maticí DMNTH (postup na str. 50). V hmotnostním spektru matrice samotné byly přítomny signály, jež ve spektrech v původním článku (Mugo a Botaro, 2007) přítomny nebyly. Signál matrice ( $m/z$  311) byl detegován (viz Obr. 33). V případě derivatizace furfuralu reakcí s DMNTH byl signál produktu ( $m/z$  389) detegován. Signály produktů derivatizace APAL ( $m/z$  366) a AASAL ( $m/z$  438) nemohly být detegovány z důvodu překryvu se signály přítomnými v matrici samotné. Signály produktů derivatizace aldehydů vznikajících v reálných reakčních směsích (vypočítány pro oxidační produkt histaminu, 4(AMP) a DADO jako  $m/z$  403, 406 a 440) nebyly detegovány. Nebyly pozorovány rozdíly mezi výsledky „on plate“ a „one pot“ derivatizace.



Obr. 33: MALDI-ToF hmotnostní spektra získaná měřením s reaktivní maticí DMNTH. Nahoře spektrum matrice samotné. Dole spektrum 5 mmol·l<sup>-1</sup> roztoku furfuralu derivatizovaného pomocí „on plate“ derivatizace. Vyznačeny jsou signály nezreagované matrice ( $m/z$  311) a produktu derivatizace furfuralu ( $m/z$  389). Intenzita vyjádřena v násobcích intenzity signálu nezreagované matrice ( $I_m$ ).

## 5 DISKUSE

Pomocí sledu precipitačních a chromatografických kroků byla purifikována aminoxidasa hrachu setého. Byl získán enzymový roztok o specifické aktivitě 415,5 nkat·mg<sup>-1</sup> při výtěžku 35% a stupni přečištění 207,8. Postup purifikace na podobném principu použili např. Šebela *et al.* (1997) pro pískavici řecké seno a Šebela *et al.* (1998) pro hrachor vonný a hrachor setý. Hodnoty specifické aktivity byly v těchto případech více než dvojnásobné (916,4; 810,2 a 1070,8 nkat·mg<sup>-1</sup>) a podobnou hodnotu (830 nkat·mg<sup>-1</sup>; další údaje neuvedeny) naměřili i Šebela *et al.* (2005) pro PSAO. V porovnání s těmito pracemi bylo dosaženo také nižšího výtěžku (uvedeno 42; 50 a 52 %), bylo však dosaženo vyšší úrovně přečištění oproti zmiňovaným pracem (52,4; 51,3 a 36,5). V průběhu purifikace tedy docházelo k vyšším ztrátám, byl však získán enzym přibližně dvojnásobné čistoty. Jiné postupy (např. Wimmerová *et al.*, 1993 pro PSAO) však mohou poskytovat vyšší úroveň přečištění současně s vyšším výtěžkem. Čistota získaného proteinu byla dále ověřena pomocí peptidového mapování na výřezech z gelu po SDS-PAGE. Pás obsahující purifikovaný enzym (74 kDa) byl oproti ostatním pásům velmi výrazný a ve většině ostatních pásů byl také identifikován purifikovaný enzym, podíl nečistot byl tedy minimální. Protein v druhém nejvýraznějším pásu byl identifikován jako hrachový lektin. Lektin je protein vázající polysacharidy a glykosylované proteiny (Lioli *et al.*, 2006), mezi něž patří právě Cu dependentní aminoxidasy (Klema a Wilmot, 2012). Domnívám se tedy, že lektin je pevně vázaný k PSAO a proto jej během purifikace nebylo možno oddělit. Lektin v rostlinách slouží nejspíše jako součást pasivní obrany proti patogenům a zásobní protein. Mimo sacharidů je schopen vázat také deriváty adeninu, některé hydrofobní látky a co se aminů týče, váže aminoderiváty sacharidů (Komath *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). Vzhledem k těmto vlastnostem by nemělo docházet k ovlivnění zkoumané enzymové reakce. Zastoupení lektinu bylo přibližně 7 % (odvozeno na základě intenzity pásu). V mnohých pásech byla identifikována PSAO. V případě lehčích z těchto pásů (M mezi PSAO a lektinem) by mohlo jít o fragmenty purifikovaného enzymu. Pás o M cca 100 kDa byl těžší než by odpovídalo glykosylovanému monomeru purifikovaného proteinu [obsah sacharidů 14% (Medda *et al.*, 1995), tedy by vycházelo cca 84 kDa (M proteinu + M sacharidu)], odpovídal však signálu 104 kDa, který detegovali Padiglia *et al.* (1991) při měření M pomocí HPLC. V případě nejtěžšího pásu (cca 300 kDa) je hmotnost mnohem vyšší, než by odpovídalo dimeru polypeptidových řetězců enzymu



(148 kDa). Půjde zřejmě o proteinový agregát, který nebyl disociován povařením vzorku v Laemmliho pufru.

Bylo testováno několik různých postupů nanášení vzorku a matrice a různé destičky. Nejlepší a pro další měření použitý způsob nanášení byl způsob uvedený v původním článku o využití CTAB pro potlačení signálu matrice CHCA při měření s krátkými peptidy (Guo *et al.*, 2002), avšak s tím rozdílem, že autoři používali ocelovou destičku a sušení ve vakuu. Bylo testováno zastavení reakce přidavkem TFA do reakční směsi, jenž ve spojení s MALDI ToF úspěšně použili např. Bungert *et al.*, (2004a,b) pro měření aktivity pyranosaoxidasu a glukosaoxidasu, či přidavkem matrice obsahující TFA. Docházelo však k potlačení signálu analytů.

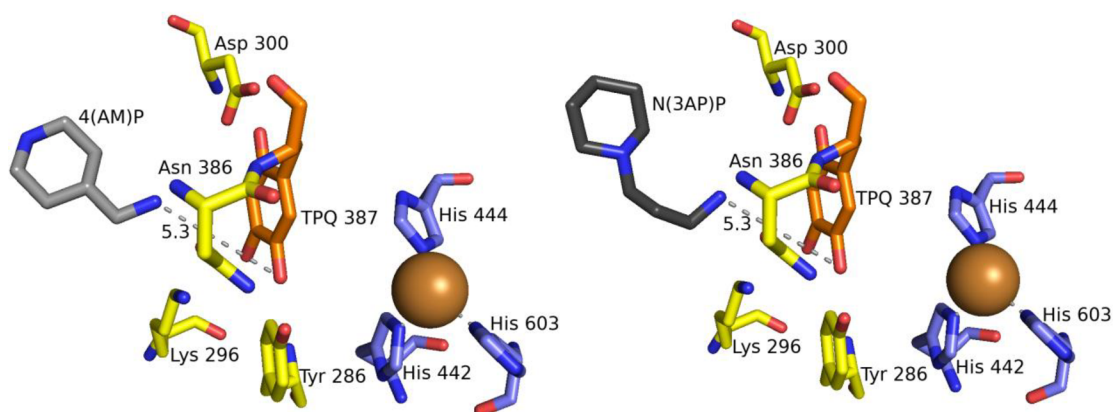
Z fyziologických substrátů PSAO byly vybrány putrescin, kadaverin a spermidin, jež společně s vznikajícími produkty jejich oxidace ovlivňují v rostlinách mnoho důležitých dějů, jako dělení a růst buně, stresové odezvy a regulaci programované buněčné smrti (Cona *et al.*, 2006; Fraudentali *et al.*, 2021). Dalším použitým substrátem byl cystamin, jež v organismu přirozeně vzniká rozpadem koenzymu A a vykazuje antibiotické a antivirotické účinky (Fraser-Pitt *et al.*, 2018). Dále šlo o látky, jež ovlivňují různé procesy u živočichů, a to agmatin, sloužící jako neurotransmitter a účastníci se regulace srdeční funkce (Ascenzi *et al.*, 2002), a histamin, který se účastní mnoha procesů včetně regulace zánětu, imunitní odezvy, funkce hladkého svalstva stěny cév a srdeční funkce. PSAO byla testována jako slibný lék pro potlačení důsledků nadměrného uvolnění histaminu (Cuzzocrea & Massini 2008). 2-hydroxyputrescin není fyziologickým substrátem PSAO, tuto látku však produkují některé druhy bakterií, např. *Bordetella pertusis* (původce černého kašle) a její tvorba může ovlivňovat infekčnost (Li *et al.*, 2016). Diaminohexan je substrátem umělým, avšak schopným v rostlinách vyvolat podobné účinky jako substráty fyziologické (Wada *et al.*, 1994). Dále byly vybrány 2 známé umělé substráty, a to 2-hydroxykadaverin (Macholán *et al.*, 1967) a DADO (Šebela *et al.*, 2007b). Kadaverin a putrescin jsou velmi dobrými substráty PSAO, dalšími dobrými substráty jsou cystamin, spermidin, agmatin, diaminohexan (Medda *et al.*, 1995) a DADO (Šebela *et al.*, 2007b). Hydroxylované substráty jsou horšími substráty než nehydroxylované (Macholán *et al.*, 1967), histamin je špatným substrátem (Medda *et al.*, 1995).

Byla testována detegovatelnost substrátů a produktů. Pro většinu substrátů byla jako matrice zvolena CHCA. Vyjimkou byl DADO, kdy při použití CHCA nebylo možno detegovat signál produktu. Nedošlo však k překryvu se signálem matrice, ale k potlačení signálu produktu. Při použití DHB signál produktu detegován byl. Všechny detegované signály odpovídaly teoretickým hodnotám v Tab. 8 (str. 47) V případě

cystaminu nebyl produkt detegován, v triethylamoniumacetátovém pufru však byl pozorován úbytek substrátu. To by odpovídalo tomu, co popisují De Marco *et al.* (1965), kdy PSAO je jednou z CuAO, jež cystaldimin vznikající oxidací cystaminu dále oxidují (Medda *et al.*, 1995) za vzniku amoniaku, peroxidu vodíku, elementární síry a glykoaldehydu (De Marco *et al.*, 1965), tedy vznikající peroxid vodíku je detegován při použití spřažené peroxidasové reakce, avšak produkt, jež by byl detegován pomocí MALDI ToF se rozkládá.

V případě spermidinu odpovídala hmotnost detegovaného produktu 1,5-diazabicyklononanu. Cyklizaci na tento produkt uvádí Medda *et al.* (1995), avšak jako na primární zdroj odkazuje na článek zabývající se oxidací sperminu rostlinnou PAO (Smith *et al.*, 1986). Pro hovězí sérovou DAO Tabor *et al.* (1964) uvádí jako produkt *N*-(4-aminobutyl)-3-aminopropionaldehyd, jež by však nemohl cyklizovat pozorovaným způsobem. Zdroj, který by dokazoval, jaký produkt vzniká oxidací spermidinu rostlinnou DAO, nebyl nalezen. Vzhledem k pozorovanému poklesu M o 19 Da ukazujícímu na cyklizaci produktu za odštěpení vody byl produkt určen jako 4-(3-aminopropyl)aminobutyrinaldehyd cyklizující na 1,5-diazabicyklononan.

Také byly testovány potenciální nové substráty (pomocí spektrofotometrického i MS měření), a to 4(AM)P a N(3AP)P (modelování jejich vazby v aktivním místě je na Obr. 34). Bylo zjištěno, že N(3AP)P není substrátem PSAO, avšak 4(AM)P je dobrým substrátem PSAO. V případě obou těchto látek byl při použití DHB jako matrice lepší poměr signálů vůči šumu.



Obr 34: Model vazby testovaných substrátů v aktivním místě enzymu. Světle šedě 4(AM)P (vlevo), tmavě šedě N(3AP)P (vpravo), oranžově topachinon, žlutě aminokyselinové zbytky aktivního místa enzymu, fialově strukturální histidiny, hnědě měď. Číslování od N-konce finálního enzymu po odstržení signálního peptidu. Struktura enzymu dle záznamu v PDB, kód 1KSI; substráty modelovány do aktivního místa pomocí Achilles Blind Docking Server (<https://bio-hpc.ucam.edu/achilles/entry>).

Bylo provedeno měření kinetických parametrů pomocí MALDI ToF MS. Z poměru intenzit signálů substrátu a produktu  $\frac{I_p}{I_p+I_s}$  byla odvozena reakční rychlost použitá k výpočtu kinetických parametrů. Analogicky bylo možno použít také poměr ploch těchto signálů, toto vyhodnocení však nebylo provedeno, jelikož takto získané hodnoty poměru byly pro agmatin téměř identické a hodnoty kinetických parametrů se nelišily o více než 5 %, lze tedy předpokládat, že oba způsoby jsou shodně použitelné. Tyto poměry vyjadřují zastoupení produktu a substrátu v reakční směsi za předpokladu identické účinnosti ionizace obou látek. Jednalo se tedy o relativní kvantifikaci. Relativní kvantifikace pomocí MALDI-ToF používali např. Hooff *et al.* ke stanovení aktivity  $\beta$ -laktamasy, většina nalezených literárních zdrojů však uvádí kvantifikaci absolutní s využitím interního standardu [např. Bungert *et al.* (2004a a 2004b) při měření aktivit monosacharidy oxidujících enzymů]. Nalezené zdroje na rozdíl od postupu uvedeného v této práci nevyužívají suprese signálu matrice látkou do ní přidanou, tudíž tyto postupy vyžadují vhodně zvolený poměr množství matrice a analytu (Bungert *et al.* 2004a), což je nevýhodou oproti metodě testované v této práci, kdy stačí vhodně zvolený přídavek CTAB do matrice konstantní pro veškerá následná měření. Porovnání hodnot takto naměřených s hodnotami naměřenými spektrofotometricky a získanými z datebáze enzymů BRENDA a literatury je uvedeno v Tab. 18 a 19. Citlivost byla řádově srovnatelná se spektrofotometrickým měřením.

V případě některých substrátů docházelo k neznámému jevu způsobujícímu výraznější pokles reakční rychlosti s rostoucí koncentrací substrátu, než by odpovídalo kinetice Michaelise a Mentenové. Tento jev na první pohled připomínal inhibici nadbytkem substrátu, avšak v případě nelineární regrese se zohledněním této inhibice program GraphPad hlásil nevhodnost tohoto proložení a průběh křivky nebyl odpovídající. K jevu docházelo i při koncentracích substrátu nižších než  $K_m$ , což inhibici nadbytkem substrátu také neodpovídá. Bylo testováno, je-li tento jev inhibicí produkovaným peroxidem vodíku, již popisuje Pietrangeli *et al.* (2000) (viz str 14). Pokud by tomu takto bylo, přídavek katalasy do reakční směsi by vedl k odstranění tohoto jevu, avšak přídavek katalasy na tento jev neměl žádný vliv. Na základě úvahy bylo odvozeno, že by tento jev mohl být způsoben vyšší účinností ionizace substrátu oproti produktu, kdy v takovémto případě by teoreticky mohl vycházet velmi podobný tvar křivky. Toto bylo testováno (pro putrescin) pomocí měření poměru intenzit signálů ekvimolárních směsí substrátu a produktu. Bylo potvrzeno, že substrát se ionizuje 3,26 krát lépe než produkt. Neznámý jev však výsledky ovlivňoval stále stejným způsobem i po provedení dále uvedené korekce beroucí v potaz tento rozdíl v ionizaci.

V případě vyhodnocení měření kinetických parametrů putrescinu a DADO tento jev znemožňoval použít část dat a nejspíše i zkresloval získané hodnoty. V případě 2-hydroxykadaverinu tento jev znemožňoval vyhodnocení provést.

Tab. 18: Porovnání hodnot  $K_m$  změřených pomocí MALDI ToF MS s hodnotami změřenými spektrofotometricky a hodnotami uvedenými v literatuře a databázi BRENDA pro čeleď *Fabaceae*

Substrát	Měření pomocí MALDI-ToF MS		Spektrofotometrické měření	Literatura* a databáze BRENDA
	$K_m$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Neznámý jev	$K_m$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Rozsah $K_m$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
kadaverin	50	ano	210	60-400
spermidin	188	ne	1087	210-1670
histamin	57	ano	426	52-1340
agmatin	71	ne	308	150-560
diaminohexan	127	ano	68	93-160
2-hydroxyputrescin	68	ne	359	250-740
4(AM)P	36	ano	302	nově testováno
putrescin	65	ANO <sup>†</sup>	88	65-430
DADO	174	ANO <sup>†</sup>	278	150-360

\* Macholán *et al.*, 1967; Vianello *et al.*, 1993; Luhová *et al.*, 1998; Šebela *et al.*, 1998; Zajoncová *et al.*, 1999; Pietrangeli *et al.*, 2004; Ascenzi *et al.*, 2006; Pietrangeli *et al.*, 2007; Šebela *et al.*, 2007b

†Jev výrazně ovlivňoval měření

Tab. 19: Porovnání hodnot  $k_{\text{cat}}$  změřených pomocí MALDI ToF MS s hodnotami změřenými spektrofotometricky a hodnotami uvedenými v literatuře a databázi BRENDA pro čeleď *Fabaceae*

Substrát	Měření pomocí MALDI-ToF MS		Spektrofotometrické měření	Literatura* a databáze BRENDA
	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	Neznámý jev	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	Rozsah $k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
kadaverin	18,4	ano	39,01	88-500
spermidin	37,1	ne	1,42	100-190
histamin	0,16	ano	0,040	10-56
agmatin	3,5	ne	0,31	1,3-46
diaminohexan	11,3	ano	9,43	nenalezeno
2-hydroxyputrescin	0,8	ne	4,76	nenalezeno
4(AM)P	3,3	ano	5,07	nově testováno
putrescin	6,02	ANO <sup>†</sup>	27,13	92-280
DADO	5,67	ANO <sup>†</sup>	10,40	nenalezeno

\* Vianello *et al.*, 1993; Pietrangeli *et al.*, 2004; Ascenzi *et al.*, 2006; Pietrangeli *et al.*, 2007; Poonpipatgul *et al.*, 2012;

†Jev výrazně ovlivňoval měření

Tab. 20: Seřazení substrátů od nejlepšího po nejhorší na základě hodnot  $k_{cat}/K_m$  změřených pomocí MALDI ToF MS a spektrofotometricky

Měření pomocí MALDI-ToF MS		Spektrofotometrické měření	
Substrát	$k_{cat}/K_m$ [l·s <sup>-1</sup> ·μmol <sup>-1</sup> ]	Substrát	$k_{cat}/K_m$ [l·s <sup>-1</sup> ·μmol <sup>-1</sup> ]
kadaverin	0,37	putrescin	0,31
spermidin	0,20	cystamin	0,31
4(AM)P	0,093	kadaverin	0,19
putrescin	0,093	diaminohexan	0,14
diaminohexan	0,089	DADO	0,037
agmatin	0,050	2-hydroxykadaverin	0,027
DADO	0,033	4(AM)P	0,017
2-hydroxyputrescin	0,012	2-hydroxyputrescin	0,013
histamin	0,0028	spermidin	0,0013
		agmatin	0,0010
		histamin	0,000094

V Tab. 18 jsou zaneseny hodnoty  $K_m$  změřené pomocí MALDI ToF v porovnání s hodnotami změřenými spektrofotometricky a rozsahy hodnot uvedenými v literatuře a databázi BRENDA. Hodnoty změřené spektrofotometricky se pohybují v uvedených rozsazích. Vyjimkou je pouze diaminohexan, avšak řád s uvedeným rozsahem souhlasí. V případě měření pomocí MALDI ToF většina hodnot řádově souhlasí s uvedenými rozsahy, pohybují se při spodní hranici uvedených rozsahů. V případě 2-hydroxyputrescinu je však změřená hodnota o řád nižší než by odpovídalo uvedenému rozsahu. Při měření pomocí MALDI ToF vycházely pro kadaverin, spermidin, histamin, agmatin a 2-hydroxyputrescin hodnoty  $K_m$  přibližně 4-5 krát nižší oproti měření spektrofotometrickému, v případě 4(AM)P byla změřená hodnota o řád nižší. V případě putrescinu a DADO byly hodnoty nižší, ale blízké hodnotám změřeným spektrofotometricky. Jedinou vyjimkou byl diaminohexan, kdy hodnota  $K_m$  byla přibližně dvojnásobná oproti měření spektrofotometrickému.

Podobné porovnání bylo provedeno i pro hodnoty  $k_{cat}$  (Tab. 19). Vypovídající hodnota tohoto porovnání je však nižší z důvodu malého množství literatury uvádějící  $k_{cat}$  a malého počtu zápisů v databázi BRENDA. Pro většinu substrátů byly hodnoty změřené oběma postupy o řád nižší oproti dostupné literatuře, v případě histaminu o 2-3 řády nižší. Mimo spektrofotometrického měření se spermidinem (nižší hodnota) však pořadí substrátů dle hodnot přibližně odpovídalo vyhledaným údajům. Pro kadaverin, diaminohexan, 4(AM)P a DADO vycházely oběma postupy řádově podobné hodnoty. V případě spermidinu, histaminu, putrescinu a agmatinu byly hodnoty změřené pomocí MALDI ToF o řád vyšší, pro 2-hydroxyputrescin tomu bylo naopak.

Dále byly na základě hodnot  $k_{cat}/K_m$  seřazeny substráty od nejlepšího po nejhorší, a to dle obou prováděných metod měření (Tab. 20). Putrescin a kadaverin byly v obou

případech mezi nejlepšími substráty, což obecně odpovídá údajům ve výše uváděné literatuře. Pro spermidin, jakožto dle literatury jeden z nejlepších substrátů však neodpovídal výsledek spektrofotometrického měření. Nejhorším z vybraných substrátů byl histamin, což odpovídá dostupné literatuře. Co se ostatních substrátů týče, pořadí určené oběma metodami se lišilo a literatuře lépe odpovídalo pořadí zjištěné pomocí MALDI ToF, vzhledem k tomu, že agmatin byl pomocí spektrofotometrického měření určen jako horší substrát než by odpovídalo nalezeným údajům.

Metoda měření pomocí MALDI ToF MS poskytovala konzistentní výsledky mimo substrátů výrazněji ovlivněných výše zmíněným jevem (putrescin, DADO a 2-hydroxykadaverin). Data takto změřená jsou tedy přesná, ale nemusí být správná. Vzhledem závislosti této metody na předpokladu identické míry ionizace substrátu a produktu jsou odlišnosti vysvětlitelné právě rozdílnou mírou ionizace substrátu a produktu. Je-li tomu tak, metodu by mohlo být možno dále modifikovat tak, že by byly změřeny poměry intenzit signálů ekvimolárních směsí substrátu a produktu pro každý substrát. Z těchto poměrů intenzit (pokud by byly identické v rozsahu používaných koncentrací) by byl určen koeficient  $Y$ , jež by značil, kolikrát lépe se substrát ionizuje oproti produktu. Pro výpočet reakční rychlosti by byl využit poměr  $\frac{I_p}{I_p + (I_s/Y)}$  obsahující korekci rozdílné míry ionizace. Vyhodnocení zahrnující tuto korekci bylo provedeno pro putrescin. Byla takto získány hodnoty  $K_m = 170$  a  $k_{cat} = 16,0$ , tedy téměř trojnásobné oproti měření bez korekce. Hodnota  $K_m$  souhlasila s rozsahem uváděným v literatuře, oproti spektrofotometrickému měření byla přibližně dvojnásobná. Hodnota  $k_{cat}$  řádově souhlasila se spektrofotometrickým měřením, oproti literatuře však byla o řád nižší. Tuto korekci by pro zajištění správnosti naměřených dat bylo zapotřebí provést i pro ostatní substráty, což však nebylo provedeno z časových důvodů.

Bylo testováno měření kinetických parametrů oxidace putrescinu pomocí MALDI ToF MS se standardem v matrici (diaminopentanon). Toto měření nebylo zatíženo výše popisovaným jevem. Naměřená data však vykazovala příliš velký rozptyl, aby mohla být použita. Toto je dáno nejspíše nepřesným nanášením matrice a reakční směsi na MALDI destičku, tedy tento problém by mohl být odstranitelný tím, že by nanášení prováděl zkušenější personál či pipetovací automat. Další možností by byl výběr takového standardu, aby jej bylo možno přidat přímo do reakční směsi [diaminoketony jsou inhibitory PSAO (Šebela *et al.*, 2007)]. Signál substrátu byl potlačen.

Dále byla testována možnost použití reaktivní matrice DMNTH ke kvantifikaci vznikajících aldehydů. Nebylo dosaženo výsledků detekce aldehydů, jež popisují Mugo a Botaro (2007). Vzhledem k přítomnosti neznámých signálů ve spektru a nerozpustnosti matrice v rozpouštědlech uváděných autory je důvodem nejspíše chyba

v průběhu syntézy matrice, jež byla syntetizována (signál detegován) avšak pravděpodobně obsahovala i další látky.

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla zpracována literární rešerše zabývající se vlastnostmi Cu dependentních aminoxidas (s důrazem na EC 1.4.3.22) a biologickými rolemi a využitím aminoxidas obecně. Druhá část literární rešerše byla zaměřena na metody kvantifikace aminoxidas (s důrazem na měření aktivity EC 1.4.3.22), postupy purifikace Cu dependentních aminoxidas, měření enzymové aktivity pomocí MALDI ToF MS a MALDI MS malých molekul.

V praktické části byla vytvářena metoda měření aktivity aminoxidas pomocí MALDI ToF MS založená na odvození reakční rychlosti z poměru  $\frac{I_p}{I_p+I_s}$ , kde  $I_s$  a  $I_p$  jsou intenzity signálů substrátu a produktu. Pro účely měření byla použita PSAO purifikovaná v rámci této práce. Metoda byla navržena, byla provedena obecná optimalizace metody (postup zastavení reakce, výběr destičky, postup nanášení, nastavení přístroje pro měření s CHCA a DHB) a optimalizace pro zkoumané substráty (volba matrice, reakčního času a koncentrace enzymu). Pomocí této metody byly změřeny kinetické parametry oxidace 9 z 12 vybraných látek. *N*-(3-aminopropyl)piperidin nebyl substrátem, pro cystamin a 2-hydroxykadaverin nebylo možno kinetické parametry změřit. Změřené kinetické parametry byly porovnány s hodnotami naměřenými pro 11 substrátů pomocí spektrofotometrické metody dle Frébort *et al.* (1989) a s hodnotami uvedenými v literatuře a databázi BRENDA. Hodnoty  $K_m$  změřené pomocí testované metody se pohybovaly na dolní hranici hodnot uvedených v literatuře a byly nižší než hodnoty změřené spektrofotometricky. V případě diaminohexanu byla spektrofotometricky změřená hodnota nižší. Hodnoty  $K_{cat}$  řádově souhlasily s výsledky spektrofotometrického měření, byly však o řád nižší oproti hodnotám uvedeným v literatuře. Změřené hodnoty byly přesné, nemusejí však být správné. Byl navržen postup, kterým by metodu bylo možno zdokonalit.

Současně bylo testováno, zda *N*-(3-aminopropyl)piperidin a 4-(aminomethyl)piperidin jsou substráty PSAO. Bylo zjištěno, že první z látek není substrátem. Druhá z látek byla dobrým substrátem řádově srovnatelným se substráty fyziologickými.

V dalších experimentech byla neúspěšně testována varianta vytvářené metody využívající kvantifikace substrátu a produktu pomocí interního standardu. Měření takto bylo možno provést, výsledky však byly nekonzistentní.

Také byla neúspěšně testována možnost měření aktivity PSAO pomocí metody detekce aldehydů, již vytvořili Mugo a Botaro (2007). Metoda nebyla dostatečně citlivá pro zkoumané koncentrace produktů a to i přes to, že bylo použito dvakrát vyšších



koncentrací substrátu než ve výše popsané metodě použité k měření kinetických parametrů.

V rámci práce byl také určen produkt oxidace spermidinu PSAO. Bylo zjištěno, že tímto produktem je 4-(3-aminopropyl)aminobutyraldehyd cyklizující za vzniku 1,5-diazabicyklononanu.

## 7 LITERATURA

- Aarsen, P. N., & Kemp, A. (1964). Rapid spectrophotometric micromethod for determination of histaminase activity. *Nature*, 204(4964), 1195-1195. <https://doi.org/10.1038/2041195a0>
- Abella, A., Garcia-Vicente, S., Viguierie, N., Ros-Baro, A., Camps, M., Palacin, M., ... & Marti, L. (2004). Adipocytes release a soluble form of VAP-1/SSAO by a metalloprotease-dependent process and in a regulated manner. *Diabetologia*, 47(3), 429-438. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1346-2>
- Agostinelli, E., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., Battaglia, V., Grancara, S., ... & Stevanato, R. (2010). Potential anticancer application of polyamine oxidation products formed by amine oxidase: a new therapeutic approach. *Amino acids*, 38(2), 353-368. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0431-8>
- Angelini, R., Cona, A., & Tavladoraki, P. (2018). Determination of copper amine oxidase activity in plant tissues. In *Polyamines* (pp. 129-139). Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_13)
- Ascenzi, P., Fasano, M., Marino, M., Venturini, G., & Federico, R. (2002). Agmatine oxidation by copper amine oxidase: Biosynthesis and biochemical characterization of N-amidino-2-hydroxypyrrolidine. *European journal of biochemistry*, 269(3), 884-892. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2002.02718.x>
- Bardsley, W. G., Crabbe, M. J. C., & Shindler, J. S. (1973). Kinetics of the diamine oxidase reaction. *Biochemical Journal*, 131(3), 459-469. <https://doi.org/10.1042/bj1310459>
- Bayramoglu, G., Salih, B., Akbulut, A., & Arica, M. Y. (2019). Biodegradation of Cibacron Blue 3GA by insolubilized laccase and identification of enzymatic byproduct using MALDI-ToF-MS: toxicity assessment studies by *Daphnia magna* and *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 453-460. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.014>
- Benedetti, M. S. (2001). Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases. *Fundamental & clinical pharmacology*, 15(2), 75-84. <https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2001.00011.x>
- Bento, I., Martins, L. O., Lopes, G. G., Carrondo, M. A., & Lindley, P. F. (2005). Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Transactions*, (21), 3507-3513. <https://doi.org/10.1039/B504806K>
- Boehm, T., Pils, S., Gludovacz, E., Szoelloesi, H., Petroczi, K., Majdic, O., ... & Jilma, B. (2017). Quantification of human diamine oxidase. *Clinical biochemistry*, 50(7-8), 444-451. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.12.011>
- Boyer, D. S., Rippmann, J. F., Ehrlich, M. S., Bakker, R. A., Chong, V., & Nguyen, Q. D. (2021). Amine oxidase copper-containing 3 (AOC3) inhibition: a potential novel target for the management of diabetic retinopathy. *International Journal of Retina and Vitreous*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40942-021-00288-7>
- Bradford protein assay - goldbio.com. (n.d.). Zobrazeno 2. března, 2023, z <https://goldbio.com/documents/3604/Bradford%20Protein%20Assay.pdf>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandange, S., Eriksson, L. H., & Rodriguez, B. (1984). Ring-chain tautomerism of an N, N-acetal formed by enzymatic oxidation of spermine or spermidine. *Acta chemica Scandinavica. Series B. Organic chemistry and biochemistry*, 38(6), 526-528. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.38b-0526>
- Brazeau, B. J., Johnson, B. J., & Wilmot, C. M. (2004). Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Archives of biochemistry and biophysics*, 428(1), 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.034>
- BRENDA Enzyme Database. 2023. (dotazem ve vyhledávání vždy EC daného enzymu) [online] Dostupné z: <<https://www.brenda-enzymes.org/>> [Accessed 11 January 2023].
- Bungert, D., Bastian, S., Heckmann-Pohl, D. M., Giffhorn, F., Heinzle, E., & Tholey, A. (2004). Screening of sugar converting enzymes using quantitative MALDI-ToF mass spectrometry. *Biotechnology letters*, 26(13), 1025-1030. <https://doi.org/10.1023/b:bile.0000032965.18721.62>
- Bungert, D., Heinzle, E., & Tholey, A. (2004). Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the determination of enzyme activities. *Analytical biochemistry*, 326(2), 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.11.013>

- Callejon, S., Sendra, R., Ferrer, S., & Pardo, I. (2017). Recombinant laccase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine. *PLoS one*, *12*(10), e0186019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186019>
- Callery, P. S., Subramanyam, B., Yuan, Z. M., Pou, S., Geelhaar, L. A., & Reynolds, K. A. (1992). Isotopically sensitive regioselectivity in the oxidative deamination of a homologous series of diamines catalyzed by diamine oxidase. *Chemico-biological interactions*, *85*(1), 15-26. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(92\)90049-Q](https://doi.org/10.1016/0009-2797(92)90049-Q)
- Carpéné, C., Bour, S., Visentin, V., Pellati, F., Benvenuti, S., Iglesia-Osma, M. C., ... & Valet, P. (2005). Amine oxidase substrates for impaired glucose tolerance correction. *Journal of physiology and biochemistry*, *61*(2), 405-419. <https://doi.org/10.1007/BF03167058>
- Carter, S. R., McGuirl, M. A., Brown, D. E., & Dooley, D. M. (1994). Purification and active-site characterization of equine plasma amine oxidase. *Journal of inorganic biochemistry*, *56*(2), 127-141. [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(94\)85043-7](https://doi.org/10.1016/0162-0134(94)85043-7)
- Cavallini, D., De Marco, C., & Mondovi, B. (1957). Cystaldimine: the product of oxidation of cystamine by diamine-oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, *24*, 353-358. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90205-6](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90205-6)
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., & Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in plant science*, *11*(2), 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.009>
- Costa, M. T., Rotilio, G., Agró, A. F., Vallogini, M. P., & Mondoví, B. (1971). On the active site of diamine oxidase: kinetic studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *147*(1), 8-13. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(71\)90303-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(71)90303-1)
- Creasey, N. H. (1956). Factors which interfere in the manometric assay of monoamine oxidase. *Biochemical Journal*, *64*(1), 178. <https://doi.org/10.1042/bj0640178>
- Cuzzocrea, S., & Masini, E. (2008). Plant histaminase as an investigational drug in splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *17*(8), 1151-1160. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.8.1151>
- De Marco, C., Bombardieri, G., Riva, F., Dupre, S., & Cavallini, D. (1965). Degradation of cystaldimine, the product of oxidative deamination of cystamine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *100*(1), 89-97. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(65\)90430-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(65)90430-7)
- De Marco, C., Mondovi, B., & Cavallini, D. (1962). Temporary suppression of diamine oxidase (histaminase) activity by cysteamine. *Biochemical Pharmacology*, *11*(7), 509-514. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(62\)90112](https://doi.org/10.1016/0006-2952(62)90112)
- Deitrich, R. A., & Erwin, V. G. (1969). A convenient spectrophotometric assay for monoamine oxidase. *Analytical Biochemistry*, *30*(3), 395-402. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90133-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90133-X)
- Deng, Y., & Peter, H. Y. (1999). Assessment of the deamination of aminoacetone, an endogenous substrate for semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Analytical biochemistry*, *270*(1), 97-102. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4058>
- Devoto, G., Massacesi, M., Ponticelli, G., Medda, R., & Floris, G. (1986). Inhibitory activity of bivalent transition-metal complexes with diamines toward a diamine oxidase. *Polyhedron*, *5*(4), 1023-1025. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(00\)80146-1](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(00)80146-1)
- Dong, X., Cheng, J., Li, J., & Wang, Y. (2010). Graphene as a novel matrix for the analysis of small molecules by MALDI-TOF MS. *Analytical chemistry*, *82*(14), 6208-6214. <https://doi.org/10.1021/ac101022m>
- Eisenthal, R., & Danson, M. J. (Eds.). (2002). *Enzyme assays: a practical approach* (Vol. 257). Practical Approach, 71-74, 82-85, 177. ISBN: 9780199638215
- EKBLOM, J. (1998). Potential therapeutic value of drugs inhibiting semicarbazide-sensitive amine oxidase: vascular cytoprotection in diabetes mellitus. *Pharmacological research*, *37*(2), 87-92. <https://doi.org/10.1006/phrs.1997.0272>
- Elased, K. M., Cunha, T. S., Gurley, S. B., Coffman, T. M., & Morris, M. (2006). New mass spectrometric assay for angiotensin-converting enzyme 2 activity. *Hypertension*, *47*(5), 1010-1017. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000215588.38536.30>
- Elliott, J., Fowden, A. L., Callingham, B. A., Sharman, D. F., & Silver, M. (1991). Physiological and pathological influences on sheep blood plasma amine oxidase: effect of pregnancy and experimental alloxan-induced diabetes mellitus. *Research in veterinary science*, *50*(3), 334-339. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(91\)90134-A](https://doi.org/10.1016/0034-5288(91)90134-A)
- El-Maghrabey, M. H., Kishikawa, N., Ohyama, K., Imazato, T., Ueki, Y., & Kuroda, N. (2015). Determination of human serum semicarbazide-sensitive amine oxidase activity via flow injection analysis with fluorescence detection after online derivatization of the enzymatically

produced benzaldehyde with 1, 2-diaminoanthraquinone. *Analytica Chimica Acta*, 881, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.006>

Elmore, B. O., Bollinger, J. A., & Dooley, D. M. (2002). Human kidney diamine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7(6), 565-579. <https://doi.org/10.1007/s00775-001-0331-1>

Enzyme.expasy.org. 2022. ENZYME search by name (dotazy „amine oxidase“ a „lysyl oxidase“). [online] Dostupné z: <<https://enzyme.expasy.org/cgi-bin/enzyme/enzyme-search-de>> [Accessed 7 September 2022].

Fraser-Pitt, D. J., Mercer, D. K., Smith, D., Kowalczyk, A., Robertson, J., Lovie, E., ... & O'Neil, D. A. (2018). Cysteamine, an endogenous aminothiols, and cystamine, the disulfide product of oxidation, increase *Pseudomonas aeruginosa* sensitivity to reactive oxygen and nitrogen species and potentiate therapeutic antibiotics against bacterial infection. *Infection and Immunity*, 86(6), e00947-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00947-17>

Fraudentali, I., Rodrigues-Pousada, R. A., Angelini, R., Ghuge, S. A., & Cona, A. (2021). Plant copper amine oxidases: key players in hormone signaling leading to stress-induced phenotypic plasticity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5136. <https://doi.org/10.3390/ijms22105136>

Frébort, I. (1989). Employment of guaiacol for the determination of activities of enzymes generating hydrogen peroxide and for the determination of glucose in blood and urine. *Biológia (Bratislava)*, 44, 729-737. Kópia článku poskytnutá vedoucím práce.

Frébort, I., & Adachi, O. (1995). Copper/quinone-containing amine oxidases, an exciting class of ubiquitous enzymes. *Journal of fermentation and bioengineering*, 80(6), 625-632. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)87746-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)87746-4)

Frébort, I., Matsushita, K., Toyama, H., Lemr, K., Yamada, M., & Adachi, O. (1999). Purification and characterization of methylamine oxidase induced in *Aspergillus niger* AKU 3302. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63(1), 125-134. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.125>

Frébort, I., Skoupa, L., & Peč, P. (2000). Amine oxidase-based flow biosensor for the assessment of fish freshness. *Food Control*, 11(1), 13-18. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(99\)00032-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00032-8)

Frébort, I., Šebela, M., Svendsen, I., Hirota, S., Endo, M., Yamauchi, O., ... & Peč, P. (2000). Molecular mode of interaction of plant amine oxidase with the mechanism-based inhibitor 2-butyne-1, 4-diamine. *European Journal of Biochemistry*, 267(5), 1423-1433. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01132.x>

Freeman, H. C., Guss, J. M., Kumar, V., McIntyre, W. S., & Zubak, V. M. (1996). Purification, crystallization and preliminary X-ray crystal structure analysis of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 52(1), 197-198. <https://doi.org/10.1107/S0907444995007529>

Gella, A., Solé, M., Bolea, I., Ventriglia, M., Siotto, M., Durany, N., ... & Unzeta, M. (2013). A comparison between radiometric and fluorimetric methods for measuring SSAO activity. *Journal of Neural Transmission*, 120(6), 1015-1018. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-0987-z>

Gella, A., Solé, M., Bolea, I., Ventriglia, M., Siotto, M., Durany, N., ... & Unzeta, M. (2013). A comparison between radiometric and fluorimetric methods for measuring SSAO activity. *Journal of Neural Transmission*, 120(6), 1015-1018. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-0987-z>

Gokturk, C., Nordquist, J., Sugimoto, H., Forsberg-Nilsson, K., Nilsson, J., & Oreland, L. (2004). Semicarbazide-sensitive amine oxidase in transgenic mice with diabetes. *Biochemical and biophysical research communications*, 325(3), 1013-1020. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.140>

Gong, B., & Boor, P. J. (2006). The role of amine oxidases in xenobiotic metabolism. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2(4), 559-571. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.4.559>

Gordon, G. R., & Peters, J. H. (1967). Plasma histaminase activity in various mammalian species; a rapid method of assay. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 124(2), 399-404. <https://doi.org/10.3181/00379727-124-31750>

Goridis, C., & Neff, N. H. (1971). Evidence for a specific monoamine oxidase associated with sympathetic nerves. *Neuropharmacology*, 10(5), 557-564. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(71\)90021-9](https://doi.org/10.1016/0028-3908(71)90021-9)

Goto, Y., & Klinman, J. P. (2002). Binding of dioxygen to non-metal sites in proteins: exploration of the importance of binding site size versus hydrophobicity in the copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha*. *Biochemistry*, 41(46), 13637-13643. <https://doi.org/10.1021/bi0204591>

- Grant, G. A., Frison, S. L., Yeung, J., Vasanthan, T., & Sporns, P. (2003). Comparison of MALDI-TOF mass spectrometric to enzyme colorimetric quantification of glucose from enzyme-hydrolyzed starch. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(21), 6137-6144. <https://doi.org/10.1021/jf034118l>
- Greis, K. D. (2007). Mass spectrometry for enzyme assays and inhibitor screening: an emerging application in pharmaceutical research. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(3), 324-339. <https://doi.org/10.1002/mas.20127>
- Guarcello, R., De Angelis, M., Settanni, L., Formiglio, S., Gaglio, R., Minervini, F., ... & Gobetti, M. (2016). Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(23), 6870-6880. <https://doi.org/10.1128/AEM.01051-16>
- Guha, S. R., & Murti, C. K. (1965). Purification and solubilization of monoamine oxidase of rat liver mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 18(3), 350-354. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(65\)90712-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(65)90712-6)
- Guilbault, G. G., Brignac, P. J., & Zimmer, M. (1968). Homovanillic acid as a fluorometric substrate for oxidative enzymes. Analytical applications of the peroxidase, glucose oxidase, and xanthine oxidase systems. *Analytical Chemistry*, 40(1), 190-196. <https://doi.org/10.1021/ac60257a002>
- Guo, Z., Zhang, Q., Zou, H., Guo, B., & Ni, J. (2002). A method for the analysis of low-mass molecules by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 74(7), 1637-1641. <https://doi.org/10.1021/ac010979m>
- Ham, B. M., Jacob, J. T., & Cole, R. B. (2005). MALDI-TOF MS of phosphorylated lipids in biological fluids using immobilized metal affinity chromatography and a solid ionic crystal matrix. *Analytical chemistry*, 77(14), 4439-4447. <https://doi.org/10.1021/ac058000a>
- Hamilton, B. R., Marshall, D. L., Casewell, N. R., Harrison, R. A., Blanksby, S. J., & Undheim, E. A. (2020). Mapping enzyme activity on tissue by functional mass spectrometry imaging. *Angewandte Chemie*, 132(10), 3883-3886. <https://doi.org/10.1002/ange.201911390>
- Harada, M., & Nagatsu, T. (1973). A sensitive fluorometric assay for monoamine oxidase activity. *Analytical Biochemistry*, 56(1), 283-288. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90190-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90190-5)
- Herraiz, T., & Chaparro, C. (2006). Analysis of monoamine oxidase enzymatic activity by reversed-phase high performance liquid chromatography and inhibition by  $\beta$ -carboline alkaloids occurring in foods and plants. *Journal of Chromatography A*, 1120(1-2), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.009>
- Holmstedt, B., Larsson, L., & Tham, R. (1961). Further studies of a spectrophotometric method for the determination of diamine oxidase activity. *Biochimica et biophysica acta*, 48(1), 182-186. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(61\)90530-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(61)90530-3)
- Holt, A., Sharman, D. F., Baker, G. B., & Palcic, M. M. (1997). A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Analytical biochemistry*, 244(2), 384-392. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9911>
- Hooff, G. P., van Kampen, J. J., Meesters, R. J., van Belkum, A., Goessens, W. H., & Luidier, T. M. (2012). Characterization of  $\beta$ -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *Journal of proteome research*, 11(1), 79-84. <https://doi.org/10.1021/pr200858r>
- Houston, C. T., Taylor, W. P., Widlanski, T. S., & Reilly, J. P. (2000). Investigation of enzyme kinetics using quench-flow techniques with MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 72(14), 3311-3319. <https://doi.org/10.1021/ac991499m>
- [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(65\)90430-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(65)90430-7)
- Hu, L., Jiang, G., Xu, S., Pan, C., & Zou, H. (2006). Monitoring enzyme reaction and screening enzyme inhibitor based on MALDI-TOF-MS platform with a matrix of oxidized carbon nanotubes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(11), 1616-1619. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.07.005>
- Jain, M., Sands, F., & Von Korff, R. W. (1973). Monoamine oxidase activity measurements using radioactive substrates. *Analytical biochemistry*, 52(2), 542-554. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90060-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90060-2)
- Joseph, P., & Srivastava, S. K. (1995). Photoregulation of diamine oxidase from pea seedlings. *Journal of plant physiology*, 146(1-2), 108-114. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81975-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81975-9)
- Juda, G. A., Bollinger, J. A., & Dooley, D. M. (2001). Construction, overexpression, and purification of arthrobacter globiformis amine oxidase-Strep-Tag II fusion protein. *Protein Expression and Purification*, 22(3), 455-461. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1468>

- Kanazawa, I. (1994). Short review on monoamine oxidase and its inhibitors. *European neurology*, 34(Suppl. 3), 36-39. <https://doi.org/10.1159/000119540>
- Kang, H., Lim, Y. and Yeo, W. (2020). Optimized MALDI-TOF mass analysis conditions for natural small molecules. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 41(1), 84-87. <https://doi.org/10.1002/bkcs.11894>
- Kempton, C., Pötter, W., Binding, N., Klänning, H., Witting, U., & Karst, U. (2000). Tailor-made derivatizing agents for carbonyl compounds using liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, 410(1-2), 47-64. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00716-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00716-9)
- Kinumi, T., Saisu, T., Takayama, M., & Niwa, H. (2000). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 35(3), 417-422. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(200003\)35:3<417::AID-JMS952>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(200003)35:3<417::AID-JMS952>3.0.CO;2-%23)
- Kivirand, K., & Rincken, T. (2009). Interference of the simultaneous presence of different biogenic amines on the response of an amine oxidase-based biosensor. *Analytical letters*, 42(11), 1725-1733. <https://doi.org/10.1080/00032710902993860>
- Klema, V. J., & Wilmot, C. M. (2012). The role of protein crystallography in defining the mechanisms of biogenesis and catalysis in copper amine oxidase. *International journal of molecular sciences*, 13(5), 5375-5405. <https://doi.org/10.3390/ijms13055375>
- Kluetz, M. D., Adamsons, K., & Flynn Jr, J. E. (1980). Optimized preparation and determination of pea seedling diamine oxidase. *Preparative Biochemistry*, 10(5), 615-631. <https://doi.org/10.1080/00327488008061757>
- Kolaříková, K., Galuszka, P., Sedlářová, I., Šebela, M., & Frébort, I. (2009). Functional expression of amine oxidase from *Aspergillus niger* (AO-I) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology reports*, 36(1), 13-20. <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9146-7>
- Komath, S. S., Kavitha, M., & Swamy, M. J. (2006). Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Organic & biomolecular chemistry*, 4(6), 973-988. <https://doi.org/10.1039/b515446d>
- Kondo, N., & Nishimura, S. I. (2009). MALDI-TOF mass-spectrometry-based versatile method for the characterization of protein kinases. *Chemistry—A European Journal*, 15(6), 1413-1421. <https://doi.org/10.1002/chem.200801650>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lai, E. P., Owega, S., & Kulczycki, R. (1998). Time-of-flight mass spectrometry of bioorganic molecules by laser ablation of silver thin film substrates and particles. *Journal of mass spectrometry*, 33(6), 554-564. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199806\)33:6<554::AID-JMS661>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199806)33:6<554::AID-JMS661>3.0.CO;2-2)
- Lamplot, Z., Šebela, M., Fryčák, P., Longu, S., Padiglia, A., Medda, R., ... & Peč, P. (2005). Reactions of plant copper/topaquinone amine oxidases with N 6-aminoalkyl derivatives of adenine. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(2), 143-151. <https://doi.org/10.1080/14756360400021866>
- Lamplot, Z., Šebela, M., Maloň, M., Lenobel, R., Lemr, K., Havliš, J., ... & Sayre, L. M. (2004). 1, 5-Diamino-2-pentyne is both a substrate and inactivator of plant copper amine oxidases. *European journal of biochemistry*, 271(23-24), 4696-4708. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04434.x>
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2012). Control of biogenic amines in fermented sausages: role of starter cultures. *Frontiers in microbiology*, 3, 169. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00169>
- Laurenzi, M., Tipping, A. J., Marcus, S. E., Knox, P. J., Federico, R., Angelini, R., & McPherson, M. J. (2001). Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings. *Planta*, 214(1), 37-45. <https://doi.org/10.1007/s004250100600>
- Lee, H. I., Kim, Y. M., & Ro, Y. T. (2008). Purification and characterization of a copper-containing amine oxidase from *Mycobacterium* sp. strain JC1 DSM 3803 grown on benzylamine. *Journal of biochemistry*, 144(1), 107-114. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn047>
- Li, B., & Lu, S. (2020). The importance of amine-degrading enzymes on the biogenic amine degradation in fermented foods: A review. *Process Biochemistry*, 99, 331-339. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.012>
- Li, B., Lowe-Power, T., Kurihara, S., Gonzales, S., Naidoo, J., MacMillan, J. B., ... & Michael, A. J. (2016). Functional identification of putrescine C- and N-hydroxylases. *ACS chemical biology*, 11(10), 2782-2789. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00629>
- Li, H., Luo, W., Lin, J., Lin, Z., & Zhang, Y. (2004). Assay of plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase and determination of its endogenous substrate methylamine by liquid

- chromatography. *Journal of Chromatography B*, 810(2), 277-282. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.011>
- Lioi, L., Galasso, I., Santantonio, M., Lanave, C., Bollini, R., & Sparvoli, F. (2006). Lectin gene sequences and species relationships among cultivated legumes. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 1615-1623. <https://doi.org/10.1007/s10722-005-8719-3>
- Lizcano, J. M., Tipton, K. F., & Unzeta, M. (1998). Purification and characterization of membrane-bound semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) from bovine lung. *Biochemical Journal*, 331(1), 69-78. <https://doi.org/10.1042/bj3310069>
- Longu, S., Mura, A., Padiglia, A., Medda, R., & Floris, G. (2005). Mechanism-based inactivators of plant copper/quinone containing amine oxidases. *Phytochemistry*, 66(15), 1751-1758. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.06.013>
- Longu, S., Padiglia, A., Pedersen, J. Z., Finazzi Agrò, A., Mura, A., Maccioni, P., ... & Medda, R. (2005). Nitric oxide covalently labels a 6-hydroxydopa-derived free radical intermediate in the catalytic cycle of copper/quinone-containing amine oxidase from lentil seedlings. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.004>
- Lu, M., Lai, Y., Chen, G., & Cai, Z. (2011). Matrix interference-free method for the analysis of small molecules by using negative ion laser desorption/ionization on graphene flakes. *Analytical Chemistry*, 83(8), 3161-3169. <https://doi.org/10.1021/ac2002559>
- Luhová, L., Slavík, L., Frébort, I., Šebela, M., Zajoncová, L., & Peč, P. (1996). Comparison of kinetic properties between plant and fungal amine oxidases. *Journal of enzyme inhibition*, 10(4), 251-262. <https://doi.org/10.3109/14756369609036532>
- Luhová, L., Šebela, M., Frébort, I., Zajoncová, L., Faulhammer, H. G., & Peč, P. (1998). Screening of the occurrence of copper amine oxidases in Fabaceae plants. *Biologia plantarum*, 41(2), 241-254. <https://doi.org/10.1023/A:1001822831761>
- Macholán, L., Rozprimová, L., & Sedláčková, E. (1967). Oxidative deamination of 2-hydroxy derivatives of putrescine and cadaverine by pea-seedling and pig-kidney diamine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 136(2), 258-264. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(67\)90070-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(67)90070-0)
- Mann, P. J. G. (1955). Purification and properties of the amine oxidase of pea seedlings. *Biochemical Journal*, 59(4), 609. <https://doi.org/10.1042/bj0590609>
- Mann, P. J. G. (1961). Further purification and properties of the amine oxidase of pea seedlings. *Biochemical Journal*, 79(3), 623. <https://doi.org/10.1042/bj0790623>
- Manzoor, S., & Hoda, N. (2020). A comprehensive review of monoamine oxidase inhibitors as Anti-Alzheimer's disease agents: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 206, 112787. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112787>
- Mason, W. D., & Olson, C. L. (1970). Differential amperometric measurement of monamine oxidase activity at tubular carbon electrodes. *Analytical Chemistry*, 42(4), 488-492. <https://doi.org/10.1021/ac60286a016>
- Mazin, A. L., & Sulimova, G. E. (1975). Chromatography of nucleic acids, proteins and certain phages on granulated hydroxyapatite. *Biokhimiia (Moscow, Russia)*, 40(1), 115-122. PMID: 1138992.
- McGowan, R. E., & Muir, R. M. (1971). Purification and properties of amine oxidase from epicotyls of *Pisum sativum*. *Plant physiology*, 47(5), 644-648. <https://doi.org/10.1104/pp.47.5.644>
- McGrath, A. P., Mithieux, S. M., Collyer, C. A., Bakhuis, J. G., van den Berg, M., Sein, A., ... & Guss, J. M. (2011). Structure and activity of *Aspergillus nidulans* copper amine oxidase. *Biochemistry*, 50(25), 5718-5730. <https://doi.org/10.1021/bi200555c>
- McGuirl, M. A., McCahon, C. D., McKeown, K. A., & Dooley, D. M. (1994). Purification and characterization of pea seedling amine oxidase for crystallization studies. *Plant physiology*, 106(3), 1205-1211. <https://doi.org/10.1104/pp.106.3.1205>
- Medda, R., Longu, S., Agostinelli, E., Dalla Vedova, L., Pedersen, J. Z., Floris, G., ... & Padiglia, A. (2004). Copper/topaquinone-containing amine oxidase from lentil seedlings and bovine plasma: catalytic mechanism and energetic domains. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 1(2), 89-98. <https://doi.org/10.1007/BF03246100>
- Medda, R., Padiglia, A., & Floris, G. (1995). Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*, 39(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00756-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00756-J)
- Medda, R., Padiglia, A., Bellelli, A., Pedersen, J. Z., Agro, A. F., & Floris, G. (1999). CuI-semiquinone radical species in plant copper-amine oxidases. *Febs Letters*, 453(1-2), 1-5. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00675-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00675-4)

- Meyerson, L. R., McMurtrey, K. D., & Davis, V. E. (1978). A rapid and sensitive potentiometric assay for monoamine oxidase using an ammonia-selective electrode. *Analytical biochemistry*, 86(1), 287-297. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90344-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90344-5)
- Mills, S. A., Brown, D. E., Dang, K., Sommer, D., Bitsimis, A., Nguyen, J., & Dooley, D. M. (2012). Cobalt substitution supports an inner-sphere electron transfer mechanism for oxygen reduction in pea seedling amine oxidase. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17(4), 507-515. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0872-x>
- Mills, S. A., Goto, Y., Su, Q., Plastino, J., & Klinman, J. P. (2002). Mechanistic comparison of the cobalt-substituted and wild-type copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha*. *Biochemistry*, 41(34), 10577-10584. <https://doi.org/10.1021/bi0200864>
- Moschou, P. N., Sanmartin, M., Andriopoulou, A. H., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J. J., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2008). Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147(4), 1845-1857. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123802>
- Mugo, S. M., & Bottaro, C. S. (2007). Rapid on-plate and one-pot derivatization of carbonyl compounds for enhanced detection by reactive matrix LDI-TOF MS using the tailor-made reactive matrix, 4-dimethylamino-6-(4-methoxy-1-naphthyl)-1, 3, 5-triazine-2-hydrazine (DMNTH). *Journal of mass spectrometry*, 42(2), 206-217. <https://doi.org/10.1002/jms.1153>
- Nag, S., Saha, K., & Choudhuri, M. A. (2000). A rapid and sensitive assay method for measuring amine oxidase based on hydrogen peroxide-titanium complex formation. *Plant Science*, 157(2), 157-163. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00281-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00281-8)
- NAGATSU, T., & YAGI, K. (1966). A simple assay of monoamine oxidase and D-amino acid oxidase by measuring ammonia. *The Journal of Biochemistry*, 60(2), 219-221. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a128422>
- Naik, B. I., Goswami, R. G., & Srivastava, S. K. (1981). A rapid and sensitive colorimetric assay of amine oxidase. *Analytical Biochemistry*, 111(1), 146-148. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90242-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90242-6)
- Nebler, J. (1856). *Über das Verhalten des Jodquecksilbers und der Quecksilberverbindungen überhaupt zu Ammoniak und über eine neue Reaction auf Ammoniak: Inaugural-Dissertation.* Verlag nicht ermittelbar. [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=UzxPAAAcAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Ne%CC%9Fler,+J.,+1856.+U%CC%88ber+das+Verhalten+des+Jodquecksilbers+und+der+Quecksilberverbindungen+u%CC%88berhaupt+zu+Ammoniak+und+u%CC%88ber+eine+neue+Reaction+auf+Ammoniak,+Freiburg+i.+Br.+Poppen.&ots=CQuY0pKNJr&sig=Rvmj-D9TMKekUmFVtZnGBGVJByU&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=UzxPAAAcAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Ne%CC%9Fler,+J.,+1856.+U%CC%88ber+das+Verhalten+des+Jodquecksilbers+und+der+Quecksilberverbindungen+u%CC%88berhaupt+zu+Ammoniak+und+u%CC%88ber+eine+neue+Reaction+auf+Ammoniak,+Freiburg+i.+Br.+Poppen.&ots=CQuY0pKNJr&sig=Rvmj-D9TMKekUmFVtZnGBGVJByU&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Nissinen, E. (1984). Determination of monoamine oxidase B activity by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 309, 156-159. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(84\)80017-1](https://doi.org/10.1016/0378-4347(84)80017-1)
- Nocera, S., Marcocci, L., Pietrangeli, P., & Mondovì, B. (2003). New perspectives on the role of amine oxidases in physiopathology. *Amino Acids*, 24(1), 13-17. <https://doi.org/10.1007/s00726-002-0332-6>
- Nordquist, J. L., Göktürk, C., & Orelund, L. (2002). Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) gene expression in alloxan-induced diabetes in mice. *Molecular Medicine*, 8(12), 824-829. <https://doi.org/10.1007/BF03402087>
- Northen, T. R., Lee, J. C., Hoang, L., Raymond, J., Hwang, D. R., Yannone, S. M., ... & Siuzdak, G. (2008). A nanostructure-initiator mass spectrometry-based enzyme activity assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3678-3683. <https://doi.org/10.1073/pnas.071233210>
- Okuyama, T., & Kobayashi, Y. (1961). Determination of diamine oxidase activity by liquid scintillation counting. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(2), 242-250. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90141-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90141-2)
- Padiglia, A., Cogoni, A., & Floris, G. (1991). Characterization of amine oxidases from Pisum, Lens, Lathyrus and Cicer. *Phytochemistry*, 30(12), 3895-3897. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83429-O](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83429-O)
- Padiglia, A., Medda, R., & Floris, G. (1992). Lentil seedling amine oxidase: interaction with carbonyl reagents. *Biochemistry international*, 28(6), 1097-1107. ISSN : 0158-5231
- Padiglia, A., Medda, R., Pedersen, J. Z., Finazzi Agrò, A., Lorrai, A., Murgia, B., & Floris, G. (1999). Effect of metal substitution in copper amine oxidase from lentil seedlings. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 4(5), 608-613. <https://doi.org/10.1007/s007750050384>



- Padiglia, A., Medda, R., Pedersen, J. Z., Lorrapp, A., Peč, P., Frébort, I., & Floris, G. (1998). Inhibitors of plant copper amine oxidases. *Journal of enzyme inhibition*, 13(5), 311-325. <https://doi.org/10.3109/14756369809021478>
- Park, J. M., Kim, J. I., Noh, J. Y., Kim, M., Kang, M. J., & Pyun, J. C. (2017). A highly sensitive carbapenemase assay using laser desorption/ionization mass spectrometry based on a parylene-matrix chip. *Enzyme and Microbial Technology*, 104, 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.05.010>
- Paschalidis, K. A., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2005). Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant. Correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. *Plant Physiology*, 138(4), 2174-2184. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063941>
- Peter, H. Y., Cauglin, C., Wempe, K. L., & Gubisne-Haberle, D. (2003). A novel sensitive high-performance liquid chromatography/electrochemical procedure for measuring formaldehyde produced from oxidative deamination of methylamine and in biological samples. *Analytical biochemistry*, 318(2), 285-290. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00211-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00211-2)
- Petrivalský, M., Brauner, F., Luhová, L., Gagneul, D., & Šebela, M. (2007). Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *Journal of plant physiology*, 164(11), 1410-1418. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.018>
- Piermarini, S., Volpe, G., Federico, R., Moscone, D., & Palleschi, G. (2010). Detection of biogenic amines in human saliva using a screen-printed biosensor. *Analytical letters*, 43(7-8), 1310-1316. <https://doi.org/10.1080/00032710903518724>
- Pietrangeli, P., Federico, R., Mondovi, B., & Morpurgo, L. (2007). Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *Journal of inorganic biochemistry*, 101(7), 997-1004. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.03.014>
- Pietrangeli, P., Nocera, S., Fattibene, P., Wang, X., Mondovi, B., & Morpurgo, L. (2000). Modulation of bovine serum amine oxidase activity by hydrogen peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267(1), 174-178. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1925>
- Pietrangeli, P., Nocera, S., Federico, R., Mondovi, B., & Morpurgo, L. (2004). Inactivation of copper-containing amine oxidases by turnover products. *European journal of biochemistry*, 271(1), 146-152. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03913.x>
- Poonpipatgul, S., Wongsangchantra, P. Y., Udomsopagit, S., & Yuvaniyama, J. (2012). Purification and characterization of amine oxidase from *Vigna mungo* L. seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 11(78), 14361-14367. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1675>
- Prasthofer, T., Phillips, S. R., Suddath, F. L., & Engler, J. A. (1989). Design, expression, and crystallization of recombinant lectin from the garden pea (*Pisum sativum*). *Journal of Biological Chemistry*, 264(12), 6793-6796. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83499-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83499-8)
- Rea, G., de Pinto, M. C., Tavazza, R., Biondi, S., Gobbi, V., Ferrante, P., ... & Tavladoraki, P. (2004). Ectopic expression of maize polyamine oxidase and pea copper amine oxidase in the cell wall of tobacco plants. *Plant Physiology*, 134(4), 1414-1426. <https://doi.org/10.1104/pp.103.036764>
- Roach, T., Colville, L., Beckett, R. P., Minibayeva, F. V., Havaux, M., & Kranner, I. (2015). A proposed interplay between peroxidase, amine oxidase and lipoxygenase in the wounding-induced oxidative burst in *Pisum sativum* seedlings. *Phytochemistry*, 112, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.06.003>
- Sabbagh, B., Costina, V., Buchheidt, D., Reinwald, M., Neumaier, M., & Findeisen, P. (2015). Functional protease profiling for laboratory based diagnosis of invasive aspergillosis. *International Journal of Oncology*, 47(1), 143-150. <https://doi.org/10.3892/ijco.2015.2984>
- Santos, L. S., Haddad, R., Höehr, N. F., Pilli, R. A., & Eberlin, M. N. (2004). Fast screening of low molecular weight compounds by thin-layer chromatography and "on-spot" MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 76(7), 2144-2147. <https://doi.org/10.1021/ac035387d>
- Sattler, J., Häfner, D., Klotter, H. J., Lorenz, W., & Wagner, P. K. (1988). Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents and actions*, 23, 361-365. <https://doi.org/10.1007/BF02142588>
- Seiler, N. (2000). Oxidation of polyamines and brain injury. *Neurochemical research*, 25(4), 471-490. <https://doi.org/10.1023/A:1007508008731>
- Shen, Z., Thomas, J. J., Averbuj, C., Broo, K. M., Engelhard, M., Crowell, J. E., ... & Siuzdak, G. (2001). Porous silicon as a versatile platform for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73(3), 612-619. <https://doi.org/10.1021/ac000746f>

- Shepard, E. M., & Dooley, D. M. (2015). Inhibition and oxygen activation in copper amine oxidases. *Accounts of Chemical Research*, 48(5), 1218-1226. <https://doi.org/10.1021/ar500460z>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856-2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Shoji, T. (2018). Analysis of the intracellular localization of transiently expressed and fluorescently labeled copper-containing amine oxidases, diamine oxidase and N-methylputrescine oxidase in tobacco, using an Agrobacterium infiltration protocol. In *Polyamines* (pp. 215-223). Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_20)
- Schwelberger, H. G., & Feurle, J. (2007). Luminometric determination of amine oxidase activity. *Inflammation Research*, 56(1), S53-S54. <https://doi.org/10.1007/s00011-006-0526-6>
- Schwelberger, H. G., Feurle, J., & Houen, G. (2013). New tools for studying old questions: antibodies for human diamine oxidase. *Journal of Neural Transmission*, 120(6), 1019-1026. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0936-2>
- Smith, T. A. (1972). Purification and properties of the polyamine oxidase of barley plants. *Phytochemistry*, 11(3), 899-910. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88431-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88431-9)
- Smith, T. A. (1974). Polyamine oxidation by enzymes from *Hordeum vulgare* and *Pisum sativum* seedlings. *Phytochemistry*, 13(7), 1075-1081. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(74\)80077-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(74)80077-4)
- Smith, T. A., & Barker, J. H. (1988). The di- and polyamine oxidases of plants. *Progress in polyamine research*, 573-587. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5637-0\\_51](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5637-0_51)
- Smith, T. A., Croker, S. J., & Loeffler, R. T. (1986). Occurrence in higher plants of 1-(3-aminopropyl)-pyrrolinium and pyrroline: products of polyamine oxidation. *Phytochemistry*, 25(3), 683-689. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(86\)88024-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(86)88024-4)
- Sunner, J., Dratz, E., & Chen, Y. C. (1995). Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions. *Analytical chemistry*, 67(23), 4335-4342. <https://doi.org/10.1021/ac00119a021>
- Suzzi, G., & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International journal of food microbiology*, 88(1), 41-54. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00080-1)
- Sweetman, A. J., & Weetman, D. F. (1969). Polarographic assay of monoamine oxidase. *British Journal of Pharmacology*, 37(2), 550P. <https://europepmc.org/article/med/5360340>
- Szutowicz, A., Kobes, R. D., & Orsulak, P. J. (1984). Colorimetric assay for monoamine oxidase in tissues using peroxidase and 2, 2'-azinodi (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen. *Analytical biochemistry*, 138(1), 86-94. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90773-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90773-5)
- Šebela, M. (2021). The use of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in enzyme activity assays and its position in the context of other available methods. *Mass Spectrometry Reviews*, e21733. <https://doi.org/10.1002/mas.21733>
- Šebela, M., Jarkovská, K., Lenobel, R., Medda, R., Padiglia, A., Floris, G., & Peč, P. (2007). Interaction of plant amine oxidases with diaminoethers. *Arkivoc*, 7, 222-232. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0008.718>
- Šebela, M., Kopečný, D., Lamplot, Z., Havliš, J., Thomas, H., & Shevchenko, A. (2005). Thermostable  $\beta$ -cyclodextrin conjugates of two similar plant amine oxidases and their properties. *Biotechnology and applied biochemistry*, 41(1), 77-84. <https://doi.org/10.1042/BA20040047>
- Šebela, M., Luhová, L., Frébort, I., Faulhammer, H. G., Hirota, S., Zajoncová, L., ... & Peč, P. (1998). Analysis of the active sites of copper/topa quinone-containing amine oxidases from *Lathyrus odoratus* and *L. sativus* seedlings. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 9(5), 211-222. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199809/10\)9:5<211::AID-PCA407>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199809/10)9:5<211::AID-PCA407>3.0.CO;2-X)
- Šebela, M., Luhová, L., Frébort, I., Hirota, S., Faulhammer, H. G., Stuzka, V., & Peč, P. (1997). Confirmation of the presence of a Cu (II)/topa quinone active site in the amine oxidase from fenugreek seedlings. *Journal of experimental botany*, 48(11), 1897-1907. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.11.1897>
- Šebela, M., Radová, A., Angelini, R., Tavladoraki, P., Frébort, I., & Peč, P. (2001). FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science*, 160(2), 197-207. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00380-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00380-0)

- Šebela, M., Tylichová, M., & Peč, P. (2007). Inhibition of diamine oxidases and polyamine oxidases by diamine-based compounds. *Journal of neural transmission*, 114(6), 793-798. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0690-z>
- Tabor, C. W., Tabor, H., & Bachrach, U. (1964). Identification of the aminoaldehydes produced by the oxidation of spermine and spermidine with purified plasma amine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2194-2203. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)82220-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)82220-0)
- Tabor, C. W., Tabor, H., & Rosenthal, S. M. (1954). Purification of amine oxidase from beef plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 208(2), 645-661. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65591-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65591-7)
- Tavladoraki, P., Cona, A., & Angelini, R. (2016). Copper-containing amine oxidases and FAD-dependent polyamine oxidases are key players in plant tissue differentiation and organ development. *Frontiers in plant science*, 7, 824. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00824>
- Tavladoraki, P., Rossi, M. N., Saccuti, G., Perez-Amador, M. A., Polticelli, F., Angelini, R., & Federico, R. (2006). Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from Arabidopsis involved in polyamine back conversion. *Plant Physiology*, 141(4), 1519-1532. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080911>
- Tipton, K. F., & Dawson, A. P. (1968). The distribution of monoamine oxidase and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase in pig brain. *Biochemical Journal*, 108(1), 95-99. <https://doi.org/10.1042/bj1080095>
- Toninello, A., Pietrangeli, P., De Marchi, U., Salvi, M., & Mondovi, B. (2006). Amine oxidases in apoptosis and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1765(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.09.001>
- U.S. National Library of Medicine. (n.d.). *PubChem*. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. Zobrazeno 2. března, 2023, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; Na základě systematických názvů vyhledány záznamy pro konkrétní látky.
- Uniprot protein database*. UniProt. (n.d.). zobrazeno 1. února, 2022, from <https://www.uniprot.org/>; Záznamy pod kódy AMO\_PEA a LECN\_PEA.
- Vakal, S., Jalkanen, S., Dahlström, K. M., & Salminen, T. A. (2020). Human copper-containing amine oxidases in drug design and development. *Molecules*, 25(6), 1293. <https://doi.org/10.3390/molecules25061293>
- Valley, M. P., Zhou, W., Hawkins, E. M., Shultz, J., Cali, J. J., Worzella, T., ... & Wood, K. V. (2006). A bioluminescent assay for monoamine oxidase activity. *Analytical biochemistry*, 359(2), 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.035>
- van Kampen, J. J., Burgers, P. C., de Groot, R., & Luider, T. M. (2006). Qualitative and quantitative analysis of pharmaceutical compounds by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 78(15), 5403-5411. <https://doi.org/10.1021/ac060436i>
- Vianello, F., Dipaolo, M. L., Stevanato, R., Gasparini, R., & Rigo, A. (1993). Purification and characterization of amine oxidase from soybean seedlings. *Archives of biochemistry and biophysics*, 307(1), 35-39. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1556>
- Wada, N., Shinozaki, M., & Iwamura, H. (1994). Flower induction by polyamines and related compounds in seedlings of morning glory (*Pharbitis nil* cv. Kidachi). *Plant and cell physiology*, 35(3), 469-472. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078617>
- Wahart, A. J., Staniland, J., Miller, G. J., & Cosgrove, S. C. (2022). Oxidase enzymes as sustainable oxidation catalysts. *Royal Society Open Science*, 9(1), 211572. <https://doi.org/10.1098/rsos.211572>
- Wang, H., Zhao, Z., & Guo, Y. (2013). Chemical and biochemical applications of MALDI TOF-MS based on analyzing the small organic compounds. *Applications of MALDI-TOF spectroscopy*, 165-192. [https://doi.org/10.1007/128\\_2012\\_364](https://doi.org/10.1007/128_2012_364)
- Wang, L., Zhang, Y., Xiao, S., Hu, G., Che, B., Qing, H., ... & Deng, Y. (2012). LC-MS method for determining the activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase in rodents. *Analytical Methods*, 4(5), 1383-1388. <https://doi.org/10.1039/c2ay05914b>
- Wang, X. T., Dumoulin, M. J., Befani, O., Mondovi, B., & Mateescu, M. A. (1994). Joint chromatographic purification of bovine serum ceruloplasmin and amineoxidase. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 24(3-4), 237-250. <https://doi.org/10.1080/10826069408010096>
- Warburg, O., & Christian, W. (1941). Isolierung und kristallisation des garungsferments enolase. *Naturwissenschaften*, 29(39), 589-590. <https://doi.org/10.1007/BF01482279>
- Watson, D. S., Jambunathan, K., Askew, D. S., Kodukula, K., & Galande, A. K. (2011). Robust substrate profiling method reveals striking differences in specificities of serum and lung fluid proteases. *Biotechniques*, 51(2), 95-104. <https://doi.org/10.2144/000113717>

- Werle, E., & Pechmann, E. V. (1949). Über die Diamin-oxydase der Pflanzen und ihre adaptative Bildung durch Bakterien. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 562(1), 44-60. <https://doi.org/10.1002/jlac.19495620106>
- Wilflingseder, D., & Schwelberger, H. G. (2000). Highly efficient purification of porcine diamine oxidase. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 737(1-2), 161-166. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00444-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00444-2)
- Wilkesman, J., Castro, D., Contreras, L. M., & Kurz, L. (2014). Guaiacol peroxidase zymography for the undergraduate laboratory. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 42(5), 420-426. <https://doi.org/10.1002/bmb.20809>
- Wimmerová, M., & Macholán, L. (1999). Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedlings amine oxidase: a novel approach for enzyme immobilisation. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(8-9), 695-702. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(99\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(99)00048-2)
- Wimmerová, M., Glatz, Z., Janiczek, O., & Macholán, L. (1993). Improved chromatographic purification of pea seedlings diamine oxidase. *Preparative biochemistry*, 23(3), 303-319. <https://doi.org/10.1080/10826069308544558>
- Wu, P. H., & Dyck, L. E. (1976). Microassay for the estimation of monoamine oxidase activity. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 637-642. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90577-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90577-7)
- Wurtman, R. J., & Axelrod, J. (1963). A sensitive and specific assay for the estimation of monoamine oxidase. *Biochemical pharmacology*, 12(12), 1439-1441. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(63\)90215-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(63)90215-6)
- Xu, S., Li, Y., Zou, H., Qiu, J., Guo, Z., & Guo, B. (2003). Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 75(22), 6191-6195. <https://doi.org/10.1021/ac0345695>
- Xu, Z., Yao, S., Wei, Y., Zhou, J., Zhang, L., Wang, C., & Guo, Y. (2008). Monitoring enzyme reaction and screening of inhibitors of acetylcholinesterase by quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(12), 1849-1855. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.07.025>
- Yagodina, O. V., Nikol'skaya, E. B., Khovanskikh, A. E., & Kormilitsyn, B. N. (2002). Amine oxidases of microorganisms. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 38(3), 251-258. <https://doi.org/10.1023/A:1020714607203>
- Yan, Z., Caldwell, G. W., Zhao, B., & Reitz, A. B. (2004). A high throughput monoamine oxidase inhibition assay using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 18(8), 834-840. <https://doi.org/10.1002/rcm.1415>
- Yanes, O., Villanueva, J., Querol, E., & Aviles, F. X. (2005). Functional screening of serine protease inhibitors in the medical leech *Hirudo medicinalis* monitored by intensity fading MALDI-TOF MS. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(10), 1602-1613. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500145-MCP200>
- Yu, P. H., & AA, B. (1982). Deuterium isotope effect on the enzymatic oxidation of dopamine and serotonin. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90601-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90601-3)
- Yu, P. H., Bailey, B. A., & Durden, D. A. (1986). High-performance liquid chromatography of aldehydes and acids formed in monoamine oxidase-catalyzed reactions. *Analytical biochemistry*, 152(1), 160-166. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90135-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90135-1)
- Zajoncová, L., Frébort, I., Luhová, L., Sebela, M., Galuszka, P., & Pec, P. (1999). Comparison of kinetic properties of amine oxidases from sainfoin and lentil and immunochemical characterization of copper/quinoprotein amine oxidases. *IUBMB Life*, 47(1), 47-61. <https://doi.org/10.1080/15216549900201043>
- Zhang, J., Shi, J., Ilic, S., Jun Xue, S., & Kakuda, Y. (2008). Biological properties and characterization of lectin from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Food Reviews International*, 25(1), 12-27. <https://doi.org/10.1080/87559120802458115>
- Zhang, Y., Xiao, S., Wang, L., Wang, H., Zhu, Y., Li, Y., & Deng, Y. (2010). Absolute quantification of semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery by single-reaction monitoring with electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(2), 709-715. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3552-8>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

4(AM)P	4-(aminomethyl)piperidin
AA	akrylamid
AASAL	$\alpha$ -aminoadipát-6-semialdehyd
ABAL	aminobutyraldehyd
ACE2	angiotenzinkonvertasa 2
AO	aminoxidasa
APAL	aminopropionaldehyd
APS	peroxodisíran amonný
BIS	<i>N,N'</i> -metylenbisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CDMNT	2-chloro-4-dimethylamino-6-(4-methoxy-1-naftyl)-1,3,5-triazin
ConA-Sepharosa	Sepharosa s imobilizovaným konkanavalinem A
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CuAO	aminoxidasa obsahující měď
DADO	1,8-diamino-3,6-dioxaoktan
DAO	diaminoxidasa
DEAE-cellulosa	diethylaminoethyl cellulosa
DEAE-Sephadex	diethylaminoethyl Sephadex
DEAE-Sepharosa	diethylaminoethyl Sepharosa
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
DMNT	2,4-dichloro-6-(4-methoxy-1-naftyl)-1,3,5-triazin
DMNTH	4-dimethylamino-6-(4-metoxy-1-naftyl)-1,3,5-triazin-2-hydrazin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	na enzym vázaná imunospolečná analýza
ESI	ionizace elektrosperejem
F20TPP	<i>meso</i> -tetrakis(pentafluorofenyl)porfyrin
FAD	flavinadenindinukleotid
FPLC	rychlá/střednětlaká kapalinová chromatografie proteinů
FTICR	iontová cyklotronová rezonance s Furierovou transformací
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
HRP	křenová peroxidasa
HVAP1	„human vascular adhesion protein – 1“
CHCA	kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová

ILM	iontová kapalná matrice
IS1	iontový zdroj 1
IS2	iontový zdroj 2
LC	kapalinová chromatografie
LDI	desorpce/ionizace laserem
MALDI	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice
MAO	monoaminoxidasa
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MSLDI	desorpce/ionizace laserem s potlačením signálu matrice
N(3AP)P	<i>N</i> -(3-aminopropyl)piperidin
NIMS	„nanostructure initiator mass spectrometry“
PAO	polyaminoxidasa
PPO	2,5-difenyloxazol
PSAO	aminoxidasa z hrachu setého
QqQ	trojitý kvadrupólový hmotnostní analyzátor
Q-Sepharosa	Sepharosa s navázaným kvarterním aminem
RP	reversní fáze; chromatografie na reversní fázi
RT-PCR	polymerasová řetězová reakce s reverzní transkripcí
SA	kyselina sinapová
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéze v prostředí dodecylsíranu sodného
SELDI	desorpce/ionizace laserem z obohaceného povrchu
SP-Sepharosa	sulfopropyl Sepharosa
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
ToF	analyzátor doby letu
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UHPLC	kapalinová chromatografie při ultravysokém tlaku

## 9 PŘÍLOHY

### 9.1 Příloha 1 – Návod na přípravu Bradfordova činidla

Chemikálie: Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Německo), 95% ethanol (Lach-ner, Česká republika), 85% kyselina fosforečná (Lach-ner, Česká republika)

Postup: Bylo naváženo 100 mg Coomassie brilliant blue G-250. Bylo přidáno 50 ml 95% ethanolu. Poté bylo pomalu přidáno 100 ml 85% kyseliny fosforečné. Směs byla míchána na elektromagnetické míchačce do úplného rozpuštění barviva. Následně bylo přidáno 850 ml destilované vody a roztok byl přefiltrován. Hotové činidlo bylo skladováno při 4° C.

Postup je dostupný na:

<https://goldbio.com/documents/3604/Bardford%20Protein%20Assay.pdf>

## 9.2 Příloha 2 – Data získaná pomocí spektrofotometrického měření

Tab. 21: Hodnoty  $\Delta A/3\text{min}$  neměřené v rámci spektrofotometrického měření kinetických parametrů

substr [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] /č. měření	putrescin			kadaverin			diaminohexan			hydroxyputrescin			hydroxykadaverin			spermidin		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	2000	0,463	0,474	0,485	0,445	0,449	0,446	0,127	0,129	0,131	0,091	0,091	0,091	0,197	0,202	0,201	0,179	0,181
1000	0,473	0,472	0,479	0,535	0,526	0,528	0,156	0,155	0,157	0,078	0,078	0,079	0,174	0,172	0,174	0,128	0,130	0,122
750	0,470	0,469	0,473	0,519	0,541	0,533	0,159	0,159	0,160	0,066	0,067	0,069	0,164	0,163	0,160	0,103	0,101	0,100
500	0,482	0,476	0,472	0,519	0,518	0,515	0,157	0,160	0,161	0,061	0,061	0,063	0,135	0,135	0,136	0,081	0,080	0,085
250	0,450	0,461	0,459	0,456	0,458	0,478	0,156	0,157	0,159	0,040	0,043	0,043	0,091	0,091	0,093	0,047	0,049	0,051
150	0,388	0,397	0,397	0,357	0,361	0,367	0,139	0,142	0,137	0,031	0,030	0,029	0,063	0,065	0,067	0,042	0,043	0,039
100	0,322	0,325	0,329	0,270	0,265	0,268	0,119	0,113	0,127	0,023	0,023	0,023	0,046	0,045	0,042	0,035	0,032	0,033
75	0,274	0,276	0,277	0,225	0,219	0,218	0,105	0,110	0,114	0,020	0,020	0,020	0,036	0,033	0,033	0,019	0,020	0,018
50	0,193	0,195	0,201	0,154	0,154	0,158	0,090	0,090	0,089	0,015	0,018	0,014	0,027	0,027	0,026	0,015	0,017	0,018
25	0,118	0,110	0,112	0,083	0,084	0,086	0,055	0,053	0,053	0,009	0,010	0,010	0,015	0,017	0,018	0,011	0,010	0,012
10	0,049	0,051	0,051	0,037	0,037	0,038	0,025	0,026	0,026	0,007	0,006	0,006	0,009	0,010	0,011	0,002	0,001	0,002
	agmatin			histamin			cystamin			4(AM)P			DADO			putrescin v $\text{NH}_4\text{HCO}_3$		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2000	0,160	0,155	0,167	0,074	0,074	0,076	0,299	0,289	0,293	0,197	0,195	0,183	0,380	0,384	0,368	0,434	0,473	0,492
1000	0,120	0,117	0,115	0,053	0,052	0,056	0,317	0,312	0,314	0,150	0,153	0,158	0,333	0,332	0,332	0,486	0,486	0,474
750	0,100	0,102	0,097	0,053	0,054	0,052	0,337	0,339	0,337	0,153	0,150	0,151	0,314	0,347	0,317	0,486	0,489	0,472
500	0,093	0,091	0,091	0,042	0,043	0,043	0,372	0,375	0,371	0,127	0,125	0,125	0,300	0,276	0,265	0,496	0,493	0,496
250	0,068	0,067	0,069	0,031	0,032	0,031	0,378	0,373	0,381	0,086	0,093	0,095	0,196	0,200	0,204	0,462	0,487	0,478
150	0,047	0,048	0,050	0,022	0,022	0,022	0,361	0,359	0,364	0,081	0,076	0,072	0,148	0,151	0,153	0,418	0,427	0,423
100	0,051	0,047	0,048	0,019	0,017	0,017	0,313	0,320	0,316	0,050	0,056	0,055	0,115	0,113	0,112	0,357	0,364	0,358
75	0,046	0,045	0,047	0,015	0,015	0,016	0,266	0,268	0,268	0,042	0,044	0,044	0,095	0,090	0,090	0,300	0,307	0,307
50	0,034	0,035	0,035	0,013	0,012	0,013	0,187	0,192	0,189	0,034	0,032	0,031	0,066	0,061	0,064	0,227	0,226	0,224
25	0,024	0,025	0,023	0,008	0,007	0,008	0,105	0,101	0,103	0,020	0,021	0,023	0,040	0,040	0,040	0,126	0,125	0,127
10	0,011	0,012	0,012	0,005	0,004	0,004	0,047	0,051	0,053	0,012	0,012	0,007	0,018	0,020	0,022	0,053	0,054	0,052



Tab. 22: Hodnoty kinetických parametrů pro jednotlivé substráty vypočtené pomocí programu GraphPad Prism 8 z dat získaných spektrofotometrickým měřením společně s intervaly spolehlivosti těchto hodnot.

Nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové									
Substrát	$K_m$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	95 % interval spolehlivosti		$V_{\text{lim}}$ [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	95 % interval spolehlivosti		$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	95 % interval spolehlivosti	
		+	-		+	-		+	-
putrescin	<b>66</b>	10	9	<b>0,966</b>	0,034	0,033	<b>23,60</b>	0,84	0,81
kadaverin	<b>101</b>	24	20	<b>1,054</b>	0,065	0,062	<b>25,75</b>	1,58	1,51
diaminohexan	<b>38</b>	9	8	<b>0,300</b>	0,015	0,014	<b>7,34</b>	0,36	0,35
cystamin	<b>34</b>	13	10	<b>0,681</b>	0,050	0,048	<b>16,64</b>	1,22	1,17
2-hydroxyputrescin	<b>359</b>	39	35	<b>0,195</b>	0,008	0,007	<b>4,76</b>	0,19	0,17
2-hydroxykadaverin	<b>413</b>	24	23	<b>0,453</b>	0,010	0,010	<b>11,07</b>	0,25	0,24
spermidin	<b>1087</b>	234	186	<b>0,165</b>	0,018	0,015	<b>1,42</b>	0,15	0,12
agmatin	<b>308</b>	137	92	<b>0,060</b>	0,008	0,007	<b>0,31</b>	0,04	0,03
histamin	<b>426</b>	95	76	<b>0,016</b>	0,001	0,001	<b>0,040</b>	0,003	0,003
4(AM)P	<b>302</b>	39	34	<b>0,195</b>	0,009	0,008	<b>5,07</b>	0,22	0,21
DADO	<b>278</b>	22	20	<b>0,400</b>	0,011	0,010	<b>10,40</b>	0,28	0,27
Nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu									
putrescin	<b>88</b>	14	12	<b>1,110</b>	0,071	0,063	<b>27,13</b>	1,74	1,54
kadaverin	<b>210</b>	23	20	<b>1,596</b>	0,098	0,087	<b>39,01</b>	2,39	2,12
diaminohexan	<b>68</b>	6	5	<b>0,386</b>	0,013	0,012	<b>9,43</b>	0,31	0,29
cystamin	<b>78</b>	22	17	<b>0,998</b>	0,129	0,100	<b>24,40</b>	3,14	2,44

Tab 23: Hodnoty kinetických parametrů pro putrescin v K fosfátovém a hydrogenuhličitanovém pufru vypočtené pomocí programu GraphPad Prism 8 z dat získaných spektrofotometrickým měřením společně s intervaly spolehlivosti těchto hodnot.

Nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové									
Použitý pufr	$K_m$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	95 % interval spolehlivosti		$V_{\text{lim}}$ [ $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	95 % interval spolehlivosti		$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	95 % interval spolehlivosti	
		+	-		+	-		+	-
K-fosfát (pH 7)	<b>66</b>	10	9	<b>0,966</b>	0,034	0,033	<b>23,60</b>	0,84	0,81
$\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (pH 6,9)	<b>55</b>	10	9	<b>0,974</b>	0,040	0,039	<b>23,80</b>	0,98	0,95
Nelineární regrese dle rovnice Michaelise a Mentenové se zohledněním inhibice nadbytkem substrátu									
K-fosfát (pH 7)	<b>88</b>	14	12	<b>1,110</b>	0,071	0,063	<b>27,13</b>	1,74	1,54
$\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (pH 6,9)	<b>80</b>	13	11	<b>1,160</b>	0,079	0,069	<b>28,35</b>	1,94	1,70

### 9.3 Příloha 3 - Data získaná pomocí MALDI ToF hmotnostní spektrometrie

Tab. 24: Změřené hodnoty poměru  $\frac{I_p}{I_p+I_s}$  pro jednotlivá měření pomocí MALDI ToF MS

c	substr	kadaverin									spermidin								
		reakce 1			reakce 2			reakce 3			reakce 1			reakce 2			reakce 3		
25		0,0370	0,0354	0,0341	0,0377	0,0386	0,0387	0,0380	0,0380	0,0369	0,0346	0,0342	0,0310	0,0338	0,0353	0,0326	0,0302	0,0340	0,0339
50		0,0774	0,0780	0,0760	0,0780	0,0784	0,0785	0,0707	0,0706	0,0649	0,0557	0,0607	0,0598	0,0577	0,0530	0,0607	0,0637	0,0592	0,0602
75		0,0895	0,0933	0,0832	0,0872	0,0943	0,0903	0,0827	0,0719	0,0794	0,0814	0,0774	0,0836	0,0788	0,0814	0,0788	0,0877	0,0899	0,0804
100		0,1033	0,1021	0,1048	0,1056	0,1109	0,1001	0,0900	0,0805	0,0899	0,1024	0,0943	0,0956	0,0927	0,0975	0,1033	0,1119	0,1073	0,1066
150		0,1206	0,1155	0,1111	0,1228	0,1296	0,1433	0,1058	0,1020	0,1041	0,1334	0,1279	0,1238	0,1219	0,1293	0,1359	0,1432	0,1481	0,1456
200		0,1072	0,1172	0,1061	0,1242	0,1520	0,1278	0,0769	0,0693	0,0933	0,1446	0,1643	0,1338	0,1213	0,1194	0,1247	0,1436	0,1487	0,1487
250		0,1063	0,1314	0,0925	0,1085	0,1119	0,1329	0,0976	0,1110	0,1020	0,1663	0,1616	0,1541	0,1656	0,1551	0,1836	0,1907	0,1767	0,1737
c	substr	histamin									agmatin								
		reakce 1			reakce 2			reakce 3			reakce 1			reakce 2			reakce 3		
25		0,0018	0,0017	0,0017	0,0015	0,0015	0,0018	0,0017	0,0016	0,0017	0,0189	0,0186	0,0190	0,0180	0,0187	0,0177	0,0188	0,0187	0,0192
50		0,0032	0,0032	0,0029	0,0025	0,0023	0,0022	0,0025	0,0028	0,0027	0,0313	0,0288	0,0307	0,0264	0,0233	0,0279	0,0310	0,0304	0,0317
75		0,0052	0,0041	0,0039	0,0019	0,0027	0,0042	0,0029	0,0036	0,0041	0,0392	0,0322	0,0347	0,0345	0,0327	0,0371	0,0376	0,0354	0,0375
100		0,0058	0,0058	0,0047	0,0035	0,0032	0,0045	0,0037	0,0035	0,0041	0,0427	0,0344	0,0403	0,0409	0,0354	0,0382	0,0398	0,0392	0,0430
150		0,0068	0,0055	0,0065	0,0038	0,0037	0,0042	0,0039	0,0037	0,0045	0,0481	0,0395	0,0420	0,0420	0,0397	0,0412	0,0483	0,0495	0,0405
200		0,0042	0,0047	0,0049	0,0040	0,0046	0,0046	0,0042	0,0037	0,0035	0,0540	0,0542	0,0572	0,0476	0,0472	0,0526	0,0509	0,0487	0,0523
250		0,0050	0,0044	0,0038	0,0029	0,0030	0,0030	0,0039	0,0024	0,0023	0,0534	0,0580	0,0570	0,0550	0,0519	0,0536	0,0521	0,0551	0,0616

Tab. 24 (pokračování):

c	substr	diaminohexan									2-hydroxyputrescin								
		reakce 1			reakce 2			reakce 3			reakce 1			reakce 2			reakce 3		
25		0,0234	0,0310	0,0327	0,0344	0,0336	0,0308	0,0334	0,0341	0,0352	0,0043	0,0032	0,0042	0,0035	0,0031	0,0035	0,0045	0,0035	0,0039
50		0,0719	0,0739	0,0723	0,0747	0,0732	0,0773	0,0774	0,0752	0,0769	0,0059	0,0078	0,0066	0,0088	0,0063	0,0060	0,0059	0,0054	0,0058
75		0,1119	0,1120	0,1110	0,1172	0,1100	0,1175	0,1158	0,1162	0,1151	0,0074	0,0076	0,0076	0,0107	0,0068	0,0095	0,0081	0,0091	0,0090
100		0,1227	0,1527	0,1550	0,1182	0,1541	0,1547	0,1539	0,1477	0,1547	0,0077	0,0088	0,0101	0,0067	0,0102	0,0101	0,0115	0,0088	0,0109
150		0,2013	0,1946	0,2036	0,2144	0,2153	0,2203	0,1887	0,1813	0,1822	0,0106	0,0082	0,0110	0,0135	0,0103	0,0098	0,0115	0,0114	0,0101
200		0,1603	0,1852	0,1760	0,2031	0,2044	0,2002	0,1652	0,1405	0,1491	0,0152	0,0130	0,0109	0,0169	0,0125	0,0104	0,0104	0,0099	0,0079
250		0,1534	0,1654	0,1924	0,1833	0,1971	0,1788	0,2091	0,2080	0,2261	0,0134	0,0127	0,0097	0,0121	0,0094	0,0117	0,0070	0,0119	0,0162
c	substr	4(AM)P									putrescin								
		reakce 1			reakce 2			reakce 3			reakce 1			reakce 2			reakce 3		
25		0,0228	0,0237	0,0230	0,0236	0,0217	0,0210	0,0181	0,0189	0,0185	0,0274	0,0273	0,0258	0,0285	0,0281	0,0231	0,0239	0,0250	0,0252
50		0,0442	0,0412	0,0425	0,0408	0,0390	0,0352	0,0302	0,0271	0,0350	0,0484	0,0497	0,0469	0,0433	0,0400	0,0390	0,0509	0,0683	0,0643
75		0,0580	0,0496	0,0428	0,0469	0,0462	0,0469	0,0424	0,0435	0,0436	0,0589	0,0798	0,0748	0,0395	0,0463	0,0182	0,0794	0,0683	0,0646
100		0,0577	0,0616	0,0496	0,0528	0,0516	0,0502	0,0459	0,0506	0,0526	0,0518	0,0667	0,0598	0,0247	0,0393	0,0224	0,0637	0,0785	0,0616
150		0,0497	0,0558	0,0493	0,0380	0,0664	0,0585	0,0499	0,0580	0,0581	0,0607	0,0484	0,0561	0,0316	0,0242	0,0343	0,0833	0,0488	0,0548
200		0,0544	0,0523	0,0481	0,0500	0,0501	0,0409	0,0542	0,0454	0,0470	0,0315	0,0437	0,0649	0,0187	0,0455	0,0172	0,0441	0,0503	0,0353
250		0,0706	0,0736	0,0542	0,0510	0,0468	0,0477	0,0532	0,0446	0,0499	0,0291	0,0267	0,0365	0,0290	0,0160	0,0108	0,0361	0,0829	0,0634
c	substr	DADO																	
		reakce 1			reakce 2			reakce 3											
25		0,0090	0,0087	0,0115	0,0089	0,0094	0,0096	0,0069	0,0090	0,0071									
50		0,0228	0,0198	0,0239	0,0242	0,0206	0,0216	0,0235	0,0189	0,0166									
75		0,0314	0,0365	0,0368	0,0330	0,0341	0,0355	0,0312	0,0334	0,0332									
100		0,0484	0,0493	0,0478	0,0471	0,0465	0,0471	0,0429	0,0381	0,0432									
150		0,0656	0,0657	0,0631	0,0588	0,0507	0,0570	0,0605	0,0564	0,0608									
200		0,0579	0,0356	0,0571	0,0556	0,0589	0,0491	0,0488	0,0477	0,0528									
250		0,0535	0,0361	0,0342	0,0354	0,0321	0,0238	0,0299	0,0365	0,0277									