

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Příprava *N*-acylovaných substrátů
aminoaldehyddehydrogenas**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Zdeněk Perutka
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Termín odevzdání práce:	13. 5. 2013

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 13. května 2013

Poděkování

Děkuji panu profesoru Marku Šebelovi za vedení a poskytnuté cenné rady při tvorbě této práce. Děkuji také panu docentu Miroslavu Suralovi za pomoc při syntéze substrátů a panu doktoru Tomáši Pospíšilovi za změření NMR spekter připravených látek.

Mé poděkování patří také všem pracovníkům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum a pracovníkům i spolužákům z katedry Biochemie PŘF UP.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Zdeněk Perutka
Název práce	Příprava <i>N</i> -acylovaných substrátů aminoaldehyddehydrogenas
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	ω-Aminoaldehydy vznikají oxidací polyaminů aminoxidasami nebo polyaminoxidasami. Následně mohou být oxidovány aminoaldehyddehydrogenasami (AMADH) na odpovídající aminokyseliny. AMADH vykazují velmi širokou substrátovou specifitnost pro přírodní i syntetické ω-aminoaldehydy. Nejlépe charakterizovaným enzymem z této skupiny je AMADH z hrachu setého, nedávno byly popsány i tři isoenzymy z kukuřice. V rámci této bakalářské práce bylo připraveno 8 <i>N</i>-acylových derivátů C2-C4 ω-aminoaldehydů, které byly testovány jako možné substráty pro 3 rekombinantní isoformy kukuřičné AMADH a jednu isoformu hrachové AMADH. Syntetické látky byly vesměs oxidovány všemi studovanými enzymy. Pro <i>N</i>-acyl deriváty 3-aminopropanalu a dvě isoformy kukuřičné AMADH byly určeny kinetické parametry K_m a V_{lim}.
Klíčová slova	Aminoaldehyd, aminoaldehyddehydrogenasa
Počet stran	51
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Zdeněk Perutka
Title	Preparation of <i>N</i> -acylation aminoaldehydes dehydrogenase substrates
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2013
Abstract	ω-Aminoaldehydes arise from the oxidation of polyamines by amine oxidases and polyamine oxidases. Subsequently they can be oxidised to the corresponding amino acids by aminoldehyde dehydrogenases (AMADHs). AMADHs show a broad substrate specificity for both natural and synthetic ω-aminoaldehydes. AMADH from pea is the best characterized enzyme of this group, three isoenzymes of maize AMADH have recently been described. During working on this bachelor thesis, 8 <i>N</i>-acyl derivatives of C2-C4 ω-aminoaldehydes were prepared and tested as potential substrates for three recombinant isoforms of maize AMADH and one isoform of pea AMADH. The synthetic compounds were all oxidized by the studied enzymes. For the <i>N</i>-acyl derivatives of 3-aminopropanal and two isoforms of maize AMADH, the kinetic parameters K_m and V_{lim} were determined.
Keywords	Aminoaldehyde, aminoaldehyde dehydrogenase
Number of pages	51
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Prohlášení.....	1
Poděkování.....	1
Bibliografická identifikace.....	2
Bibliographical identification	3
Obsah	4
Cíle práce	5
TEORETICKÁ ČÁST	6
1 Aminoaldehydy	6
1.1 α -aminoaldehydy	6
1.1.1 <i>N</i> -chráněné α -aminoaldehydy	6
1.1.1.1 Vybrané metody přípravy <i>N</i> -chráněných α -aminoaldehydů	6
1.1.2 <i>C</i> -chráněné α -aminoaldehydy	10
1.1.2.1 Vybrané metody přípravy <i>C</i> -chráněných α -aminoaldehydů	10
1.2 β -aminoaldehydy.....	11
1.2.1 Vybrané metody přípravy β -aminoaldehydů	11
1.3 ω -aminoaldehydy	12
1.3.1 Možnosti přípravy ω -aminoaldehydů	13
1.4 <i>N</i> -acylované aminoaldehydy.....	13
1.4.1 Možnosti přípravy <i>N</i> -acylovaných aminoaldehydů	14
2 Polyaminy	14
2.1 Metabolismus polyaminů.....	15
2.1.1 Polyaminoxidasy	16
2.1.2 Cyklizace produktů polyaminoxidasy.....	18
2.1.3 Vlastnosti některých ω -aminoaldehydů vznikajících z polyaminů.....	19
3. Aminoaldehyddehydrogenasy	20
3.1 Aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu	20
3.2 Aminoaldehyddehydrogenasy z kukuřice	22
3.3 Lidská aminoaldehyddehydrogenasa	23
3.4 Průběh reakce katalyzované aminoaldehyddehydrogenasami	23
3.5 Produkty oxidace ω -aminoaldehydů aminoaldehyddehydrogenasami	24
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4 Materiál a metody.....	26
4.1 Použité chemikálie	26
4.2 Použité enzymy	26
4.3 Použité přístroje	26

4.4	Příprava substrátů.....	26
4.5	Měření aktivity a kinetických parametrů	28
5	Výsledky a diskuse.....	28
5.1	NMR spektra.....	30
5.2	Substrátová specifita.....	39
5.3	Stanovení kinetických parametrů.....	42
6	Závěr	45
	Seznam citované literatury.....	46
	Seznam použitých zkratek	50

Cíle práce:

Teoretická část:

Literární rešerše k tématům

- Syntéza a použití aminoaldehydů
- Metabolismus aminoaldehydů jako produktů metabolických drah organismů

Experimentální část:

- Laboratorní příprava derivátů aminoaldehydů strukturně podobných přirozeným substrátům aminoaldehyddehydrogenas a ověření jejich struktury.
- Změření a porovnání relativních rychlostí enzymové přeměny připravených substrátů pro hrachovou a kukuřičné aminoaldehyddehydrogenasy.
- Stanovení kinetických parametrů pro vybrané substráty

TEORETICKÁ ČÁST

1 Aminoaldehydy

Aminoaldehydy jsou alifatické i aromatické sloučeniny obsahující dvě funkční skupiny, aminoskupinu a aldehydovou skupinu. Podle vzájemného umístění obou skupin mohou být aldehydy rozděleny na α -aminoaldehydy, kdy je aminoskupina přítomna na vedlejším uhlíku karbonylu aldehydu. Dále β -aminoaldehydy s aminoskupinou na třetím uhlíku a ω -aminoaldehydy s aminoskupinou na uhlíkovém atomu, který je nejvíce vzdálen od karbonylového uhlíku. Charakteristickou vlastností je vzájemná kondenzace jejich molekul za vzniku iminu, umožněná právě přítomností amino- a aldehydové skupiny.

1.1 α -aminoaldehydy

α -aminoaldehydy obsahující aminoskupinu nejbližší aldehydové skupině jsou velmi rozšířenými a používanými látkami ve farmaceutickém i chemickém průmyslu. Chirální α -aminoaldehydy jsou důležitými strukturními součástmi biologicky aktivních látek. Podstatou využití je možnost transformace aldehydové skupiny na velké množství jiných struktur. Volné aminoaldehydy s oběma nechráněnými funkčními skupinami jsou velmi reaktivní, dochází u nich k vzájemné reakci amino- a aldehydové skupiny, a přecházejí na polymerizační produkty, ze kterých je zpět není možné regenerovat. Využití a příprava nechráněných aminoaldehydů je proto velmi omezená a v praxi jsou využívány α -aminoaldehydy s chráněnou *N*- nebo *C*-skupinou.

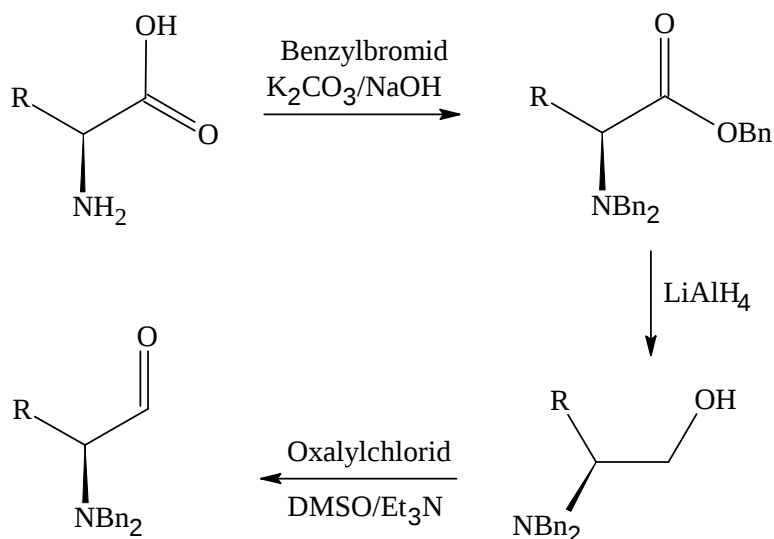
1.1.1 *N*-chráněné α -aminoaldehydy

N-chráněné α -aminoaldehydy jsou základními stavebními jednotkami pro přípravu řady biologicky aktivních aminů. Podle vazby chránící skupiny na atom dusíku je můžeme rozlišit na *N*-monosubstituované a *N,N*-aminoaldehydy (Reetz & Lee, 2001). *N*-chráněné α -aminoaldehydy jsou většinou olejovité nebo krystalické látky rozpustné ve většině organických rozpouštědel. Stabilita těchto sloučenin však není velká a proto je vhodné uchovávání v mrazáku (Rittle et al., 1982).

1.1.1.1 Vybrané metody přípravy *N*-chráněných α -aminoaldehydů

Významné využití je zejména u *N,N*-disubstituovaných aminoaldehydů kde je aminoskupina chráněna dvěma benzylovými skupinami. Prostorově objemné benzyly v tomto případě nejen chrání amino skupinu, ale i stereoselektivně ovlivňují nukleofilní adici na skupinu aldehydovou. Při přípravě těchto látek (Obr. 1) jsou jako výchozí látky využity odpovídající aminokyseliny. Aminokyselina je nejprve postupně benzylována za vzniku esteru a poté dochází k redukci karboxylové skupiny na alkohol a nakonec k oxidaci na aldehyd (Swernova

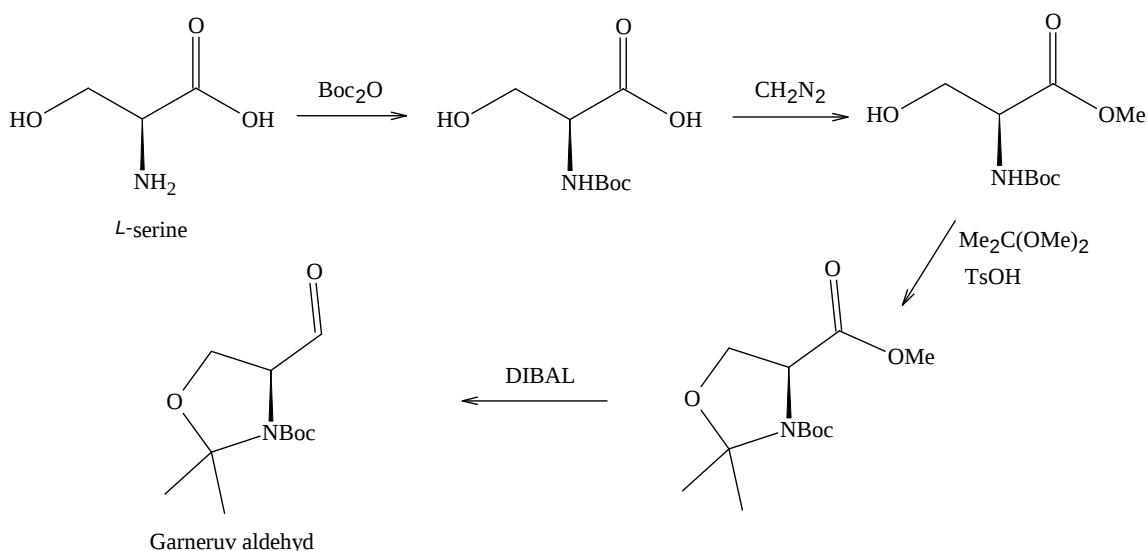
reakce). Z takto připraveného aldehydu (2S, 3S, 4S)-4-amino-3-hydroxy-2-methylvalerové kyseliny bylo například získáno antibiotikum Bleomycin, produkované bakterií *Streptomyces verticillus* a dnes využívané jako protinádorové léčivo (Aoyagi et al., 1982).



Obr. 1 Schéma obecné přípravy *N,N*-disubstituovaných α -aminoaldehydů, převzato a upraveno (Reetz & Lee, 2001; dimethylsulfoxid DMSO, triethylamin Et_3N)

Modifikací výše popsaného postupu, kdy nejprve dojde k redukci karboxylové skupiny a až poté k *N*-benzylaci je využíváno k přípravě složitějších aminoaldehydů, které jsou používány například jako meziprodukty při přípravě inhibitorů proteas HIV pro léčbu AIDS (Liu et al., 1997).

V organické syntéze je jako chirální stavební jednotka hojně využíván Garnerův aldehyd. Původně byla tato sloučenina připravena z *L*-serinu (Garner & Park, 1986) (Obr. 2). V prvním kroku byla provedena substituce aminoskupiny ditercbutylbikarbonátem (Boc_2O) za vzniku karbamátu. Ten je následně esterifikován pomocí diazomethanu. Získaný ester dále reaguje s přidáním 2,2-bismethoxypropanem [$\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2$] v prostředí *p*-toluensulfonové kyseliny (TsOH) za vzniku esteru oxazolidinu. V posledním kroku je oxazolidin ester redukován hydridem diisobutylaluminia (DIBAL) na 1,1-dimethylethyl-2,2-dimethyl-4-(*S*)-formyloxazolidine-3-karboxylát (Garnerův aldehyd).



Obr. 2 Schéma přípravy Garnerova aldehydu

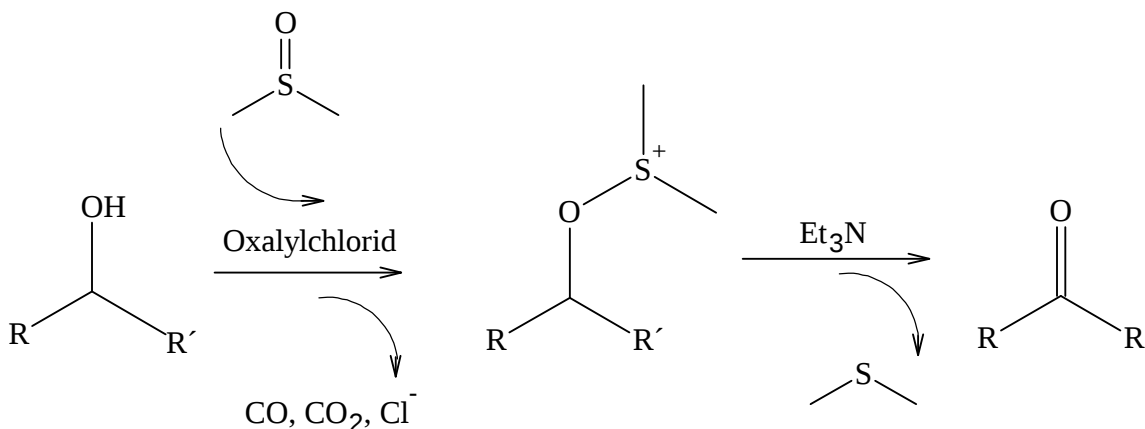
Metoda využití DIBAL pro redukci *N*-Boc chráněných aminokyselin je rozšířená hlavně v chemii peptidů. Aminoaldehydy připravené touto cestou téměř netvoří racemické směsi (Zlatoidsky, 1994).

Dalšími možnostmi přípravy α -aminoaldehydů je oxidace odpovídajících aminoalkoholů a aminodiolů. Aminoalkohol je získán redukcí výchozí aminokyseliny nebo jejího esteru. K oxidaci na výsledný α -aminoaldehyd je poté možno využít různé metody. Při hledání způsobu syntézy nových aminoaldehydů pro přípravu látek s antiproteolytickými vlastnostmi byla nalezena i enzymatická metoda přípravy oxidací nepolárních aminokyselin koňskou alkoholdehydrogenasou (Andersson & Wolfenden, 1982).

Nejvíce rozšířenou metodou se stala oxidace podle Swerna (Mancuso et al., 1977). Tato metoda byla v osmdesátých letech vyvinuta pro potřebu studia biologicky aktivních látek, při jejichž syntéze byly aldehydy s dlouhými řetězci nebo obsahující násobné vazby, důležitými prekurzory, které předtím nebylo možné připravit.

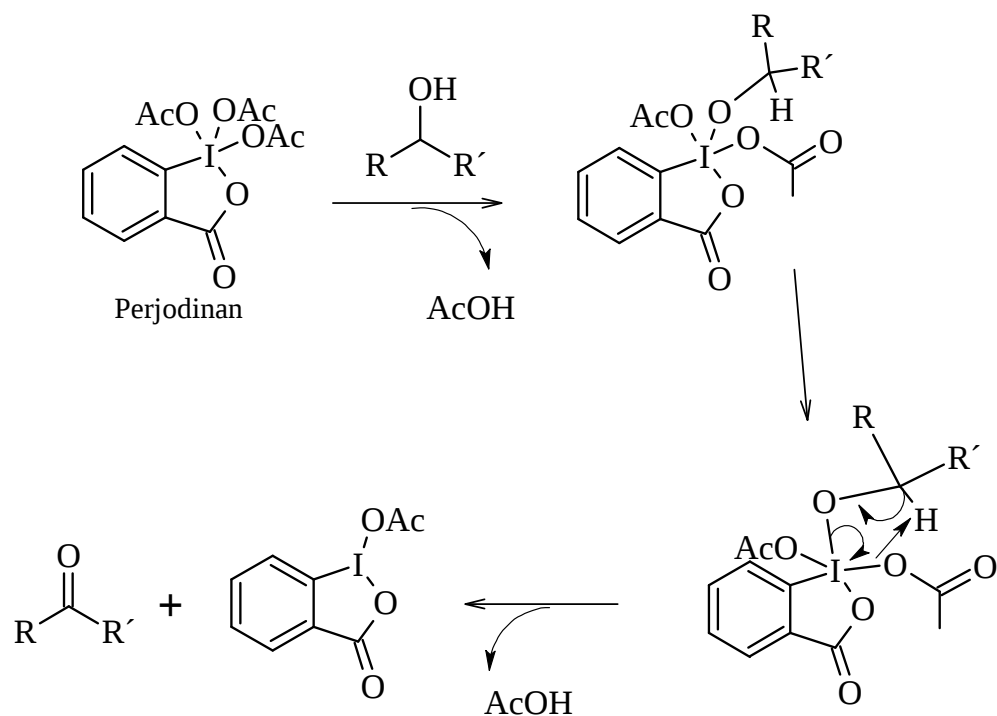
Při Swernově oxidaci je výchozí alkohol oxidován na příslušný aldehyd nebo keton dimethylsulfoxidem (DMSO). Reakce začíná aktivací DMSO oxalylchloridem, vzniklý intermediát je pak atakován chloridovým aniontem. Tvoří se dimethylchlorsulfoniový kation a z reakční směsi se uvolňuje CO a CO_2 . Poté je teprve do reakční směsi přidán alkohol, který má být oxidován. Přidaný alkohol atakuje vzniklou chlorsulfoniovou sůl. Tím se uvolňuje chloridový anion ve formě HCl a dochází k vytvoření alkoxysulfoniového kationtu. Nakonec je do směsi přidána báze triethylamin, pomocí ní dojde k deprotonizaci na α -pozici alkoxysulfonia za vzniku alkoxysulfonium ylidu. Stabilizací je uvolněna molekula plynného dimethylsulfidu a výsledným produktem je dle zvoleného alkoholu aldehyd nebo keton (Obr. 3). Aldehyd vzniká v případě použití primárního alkoholu, keton je získán při využití alkoholu sekundárního.

Během celé procedury je nutné reakční směs chladit na -60°C . Tato metoda je vhodná i pro přípravu aldehydů z molekul obsahující více funkčních skupin, např. oxidaci aminoalkoholů na aminoaldehydy. Dobře aplikovatelná je také pro přípravu aldehydů s dusíkatými heterocykly (Frömmel et al., 2012). Nevýhodou metody Swernovy oxidace je velká citlivost aktivátoru oxalylchloridu na vzdušnou vlhkost a racemizace během oxidace.



Obr. 3 Zjednodušené schéma průběhu Swernovy oxidace

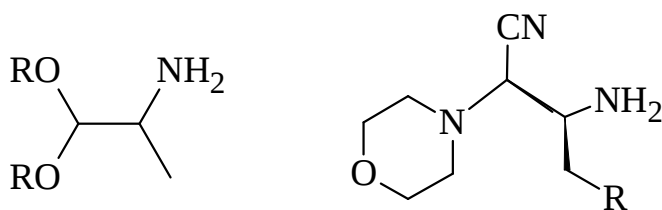
Další použitelnou oxidační metodou pro přípravu α -aminoaldehydů je postup dle Dess Martina (Dess & Martin, 1983). Tato metoda je velmi vhodná pro substráty obsahující citlivé funkční skupiny, protože je použitelná při teplotě 25°C při mírně kyselém až neutrálním pH. Pro oxidaci je využito těžko dostupného a obtížně připravitelného reagentu 1,1,1-triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-on (Perjodinan). Pomocí Perjodinanu je možné oxidovat molekuly alkoholů obsahující furanový heterocyklus, sulfidy, vinylétery i sekundární aminy. Z počátku bylo využití této metody problematické kvůli nedostupnosti Perjodinanu, který bylo potřeba svépomocí vyrobit, což bylo obtížné. V roce 1992 byla metoda přípravy Perjodinanu mírně pozměněna (Ireland & Liu, 1992), když pro acylaci meziprojektu hydroxyjodinanu bylo využito katalalytické množství TsOH namísto kyseliny octové a tím bylo dosaženo více než 90% konverze při přípravě Perjodinanu.



Obr. 4 Schéma průběhu oxidace primárního alkoholu za využití Perjodinanu

1.1.2 C-chráněné α -aminoaldehydy

Význam α -aminoaldehydů s chránicí skupinou na C-konci molekuly je podobně jako u *N*-substituovaných α -aminoaldehydů hlavně ve využití jako výchozích látek při syntéze přírodních látek hlavně polypeptidů. Pro omezení kondenzace těchto látek je aldehydová skupina příslušného α -aminoaldehydů převedena buď na formu diacetalu nebo na skupinu nitrilovou (Myers et al., 1999) (Obr. 5). Tyto metody jsou však oproti popsaným vybraným metodám pro přípravu *N*-substituovaných α -aminoaldehydů složitější a zahrnují více reakčních kroků.

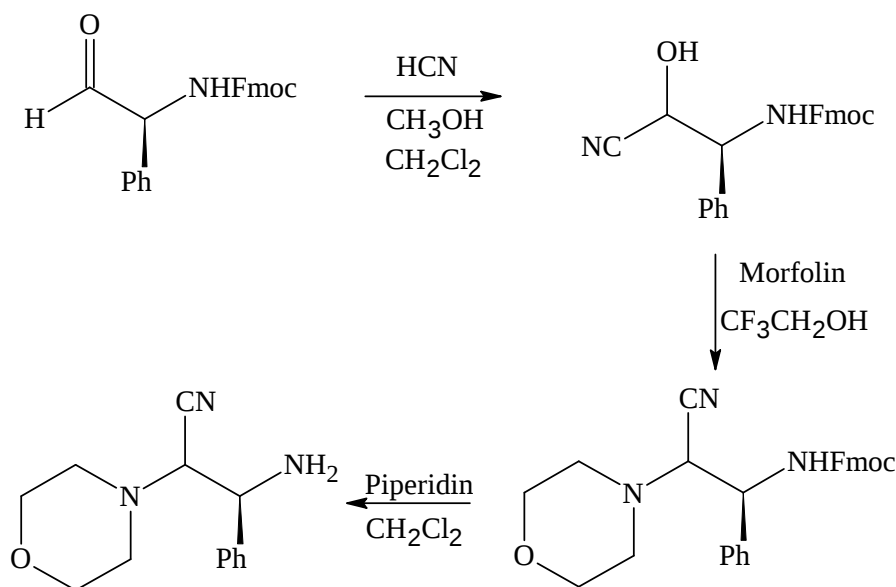


Obr. 5 Příklady C-chráněných α -aminoaldehydů. Vlevo α -aminoaldehyd ve formě diacetalu. Vpravo α -aminoaldehyd s nitrilovou skupinou.

1.1.2.1 Vybrané metody přípravy C-chráněných α -aminoaldehydů

Použitelnou metodou pro přípravu C-chráněných α -aminoaldehydů je syntéza z α -(*N*-fluorenylmethyloxykarbonyl chloridu) (Fmoc)-substituovaného aldehydu. Chráněný α -(*N*-Fmoc)aminoaldehyd je převeden na odpovídající kyanhydrin, který je poté spojen s morfolinem.

Nakonec je odstraněna *N*-chránící Fmoc skupina za použití piperidinu (Myers et al., 2000) (Obr. 6).



Obr. 6 Schéma přípravy C-chráněného α -aminoaldehydu Fenylglycinalu dle Myerse (Myers et al., 2000)

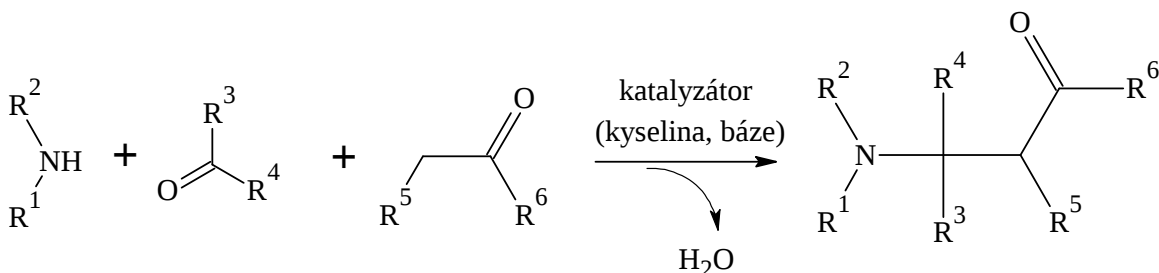
1.2 β -aminoaldehydy

Význam β -aminoaldehydů je oproti α -aminoaldehydům malý a jejich využití značně omezené. Struktura β -aminoaldehydů umožňuje přímou kondenzaci aminoskupiny s aldehydovou funkční skupinou, proto nemohou být připraveny přímo v čisté formě ale pouze v roztoku.. Připravit β -aminoaldehydy je možné stejně jako α -aminoaldehydy z odpovídajících kyselin nebo jejich derivátů. Avšak syntéza takovýchto kyselin nebo jejich derivátů je značně obtížná. Tato skutečnost bránila většímu využití β -aminoaldehydů. V nedávné době pokrok v chemii β -aminoaldehydů umožnil rozšíření jejich použití jako intermediátů při syntéze peptidů s redukovanou koncovou C-skupinou. Tyto peptidy jsou biologicky aktivní a fungují jako inhibitory proteolytických enzymů.

1.2.1 Vybrané metody přípravy β -aminoaldehydů

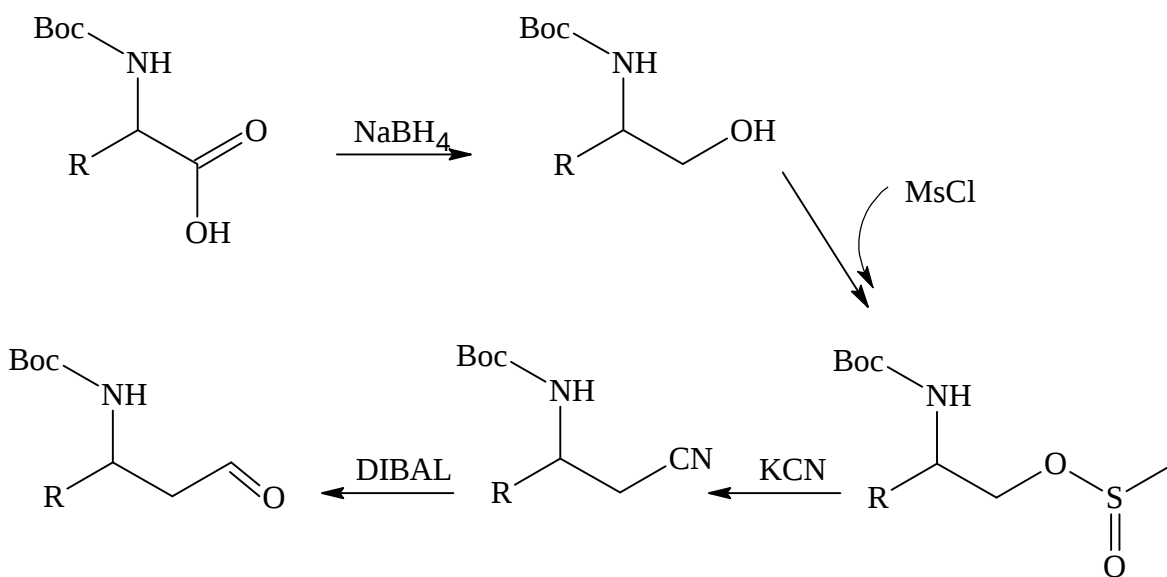
Nejstarší vhodnou metodou pro přípravu β -aminoaldehydů je Mannichova reakce. Tato metoda byla publikována již roku 1912 (Mannich & Krösche, 1912) a v průběhu let různě modifikována. Při Mannichově reakci (Obr. 6) dochází ke kondenzaci primárního nebo sekundárního aminu s enolyzovatelnou a neenolyzovatelnou karbonylovou sloučeninou. Reakce může být kyselé i zásadité katalyzována. V případě kyselé katalyzované průběhu jsou nejprve protonizovány kyslíkové atomy obou použitých karbonylových sloučenin. Enolyzovatelná sloučenina po odštěpení α -vodíku přechází na svoji enol formu zatímco neenolyzovatelný karbonyl reaguje s aminem za vzniku iminiového iontu za odštěpení molekuly vody. Nakonec

dochází ke kondenzaci iminiového iontu a enolyzovaného meziproductu nesoucí kyselý vodík, který je odštěpen. Konečným produktem je β -aminokarbonylová sloučenina nazývaná podle objevitele reakce jako Mannichova báze. Touto metodou je možné připravit i ω -aminoaldehydy.



Obr. 6 Schéma Mannichovy reakce

Jinou použitelnou metodou pro přípravu β -aminoaldehydů je využití dostupných α -*N*-Boc substituovaných aminokyselin. Takto lze β -aminoaldehydy připravit tříkrokovou syntézou ve formě kyanidu. Prvním krokem je redukce příslušné α -*N*-Boc chráněné aminokyseliny na alkohol pomocí tetrahydridoboritanu sodného (NaBH_4). Následuje mesylace alkoholu methylsulfonyl chloridem (MsCl) a substituce mesylátové skupiny kyanidem. Redukcí kyanoskupiny je poté získán *N*-Boc substituovaný β -aminoaldehyd (Obr. 7) (In et al., 2007).



Obr. 7 Schéma přípravy β -aminoaldehydu z α -aminokyseliny

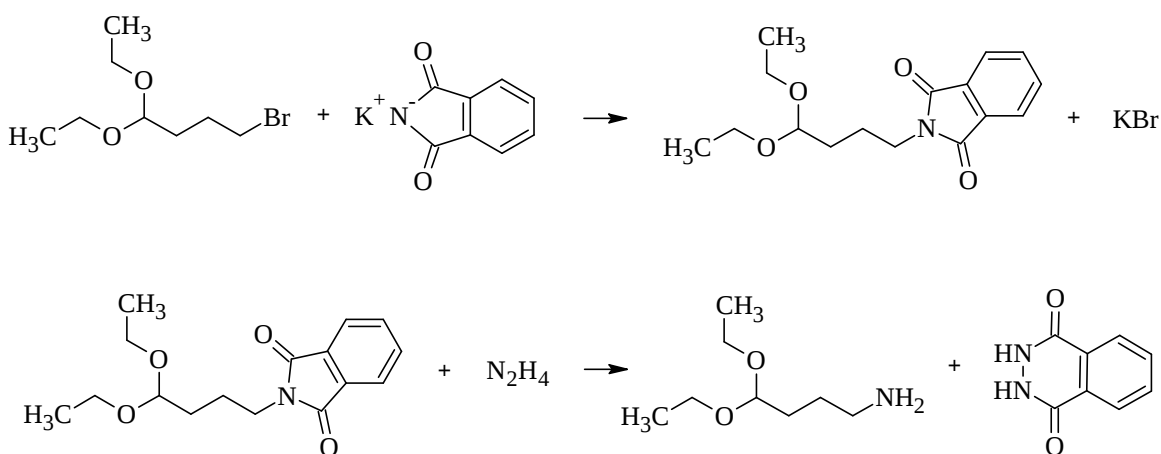
1.3 ω -aminoaldehydy

Aminoaldehydy nesoucí aminoskupinu na opačném konci uhlíkového řetězce vůči karbonylu můžeme označit jako ω -aminoaldehydy. Tyto sloučeniny jsou významné v živých organismech jako produkty katabolismu polyaminů a figurují také v metabolismu lysinu

a glycinbetainu. Možné je i průmyslové využití těchto látek. Díky přítomnosti dvou i více funkčních skupin jsou vhodné např. pro využití jako síťovací činidla v chemii umělých polymerů (Müller et al., 1996).

1.3.1 Možnosti přípravy ω -aminoaldehydů

Použitelnou metodou pro přípravu ω -aminoaldehydů při zvolení vhodné výchozí látky, je Gabrielova syntéza. Tato metoda původně sloužící pro syntézy primárních aminů byla popsána v roce 1887 německým chemikem Siegmundem Gabrielem, podle něhož je i pojmenována (Gabriel, 1887). Výchozími látkami jsou draselná sůl ftalimidu a alkylhalogenid. Při smíchání obou látek reaguje silně nukleofilní dusík ftalimidu s alkylhalogenidem za vzniku *N*-alkylftalimidu a draselné soli halogenidu. Nakonec je *N*-alkylftalimid substituční reakcí hydrazinem převeden na hydrazid a je uvolněn odpovídající primární alkylamin (Sheehan & Bolhofer, 1950). ω -Aminoaldehydy nesoucí aminoskupinu přímo na benzenovém je možné připravit redukcí odpovídající nitrosloučeniny v kyselém prostředí za katalýzy neúspěšným kovem nebo chloridem cínatým (McMurry, 2007).



Obr. 8 Schéma Gabrielovy syntézy při přípravě ABAL z diethyacetalu butyralbromidu

1.4 *N*-acylované aminoaldehydy

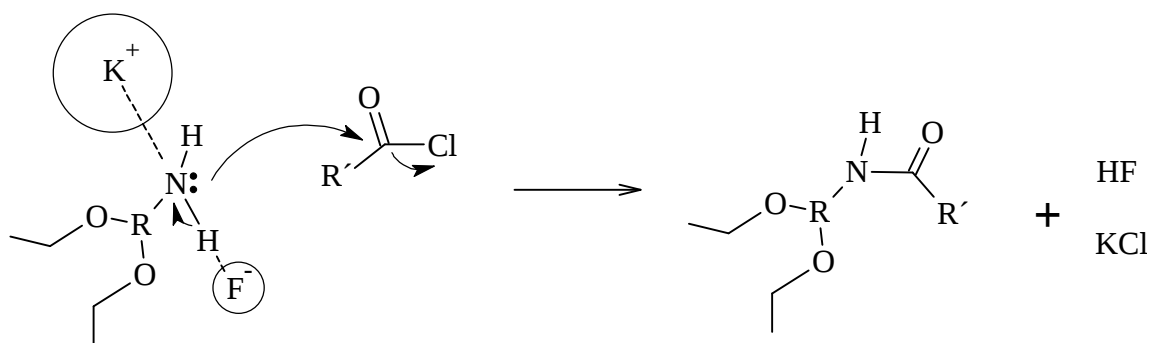
N-acylační reakce jsou v biochemii studovány např. v oblasti posttranslačních modifikací proteinů. Acetylace koncové *N*-koncové α -aminoskupiny se děje působením acetyltransferas. V *N*-acetylované formě se v eukaryotických buňkách nachází 50 – 80 % proteinů, které jsou takto chráněny před působením aminopeptidas. Zdrojem acetylové skupiny je acetylkoenzym A (Perrier et al., 2005). Další běžnou acylací proteinů je *N*-acylace kyselinou myristovou, 14ti uhlíkovou nasycenou mastnou kyselinou, enzymem *N*-myristoyltransferasou. Tato substituční reakce probíhá u eukaryotických organismů na α -aminoskupině koncového glycinu po odštěpení metioninu nebo ϵ -aminoskupině lysinu a takto vzniklá amidová vazba je

velmi stabilní. Proteinů modifikovaných tímto způsobem je vzhledem k jejich celkovému počtu v buňkách jen malá část a většina z nich je zapojena do procesů přenosu signálu. Nejvýznamější skupinou jsou proteinkinasy serin/threoninkinasa a tyrosinkinasa (DeMar et al., 1999). Další rozšířenou modifikací je acylace kyselinou palmitovou. Obě modifikace pak mohou ovlivnit strukturu takovýchto proteinů, jejich umístění a reaktivitu s jinými molekulami (Béven et al., 2001).

Jinými významnými metabolickými *N*-acylačními produkty jsou některé polyaminy a jejich degradační produkty aminoaldehydy. O těchto látkách je pojednáno v části polyaminy.

1.4.1 Možnosti přípravy *N*-acylovaných aminoaldehydů

Vhodnou metodou pro laboratorní přípravu *N*-acylovaných aminoaldehydů je acylace *C*-chráněného ω -aminoaldehydu za použití katalyzátoru KF-celit (SiO_2 s povrchově vázaným fluoridem draselným) (Ando & Yamawaki, 1979). Po přidání aminoaldehydu jež má být acylován ke KF-celitu rozpuštěném v aprotickém rozpouštědle musí dojít nejprve k navázání diethylacetalu aminoaldehydu ke katalyzátoru a až poté může být přidán acyl ve formě nestabilního elektrofilního acylhalogenidu. Rozkladem acylhalogenidu vzniká acyl kation, který reaguje s volným elektronovým párem dusíku. Přitom ihned dochází k odštěpení protonu aminoskupiny interagujícího s katalyzátorem. Produkty reakce jsou žádaný *N*-acylaminoaldehyd draselná sůl a plynný HF (Obr. 9).



Obr. 9 Mechanismus *N*-acetylce diethylacetalu ω -aminoaldehydu chloridem karboxylové kyseliny za použití katalyzátoru KF-celite (převzato a upraveno z Pace et al., 2007)

2 Polyaminy

ω -Aminoaldehydy v živých buňkách vznikají oxidací jednoduchých alifatických sloučenin polyaminů. Polyaminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky vyskytující se ve všech živých buňkách. Obecně je možné je zařadit mezi biologicky aktivní látky. Hlavní funkcí těchto sloučenin je regulace růstu buněk zejména u rostlin, kde významně ovlivňují další procesy jako je např. diferenciaci pletiv, vývoj plodů a květu nebo odolnost proti nepříznivým podmínkám

(Kusano, 2008; Takahashi, 2009) a stresu (Bouchereau et al., 1999). V životě buňky se dále uplatňují i při tvorbě chromatinu při buněčném dělení nebo translaci a transkripci (Peng, 1999).

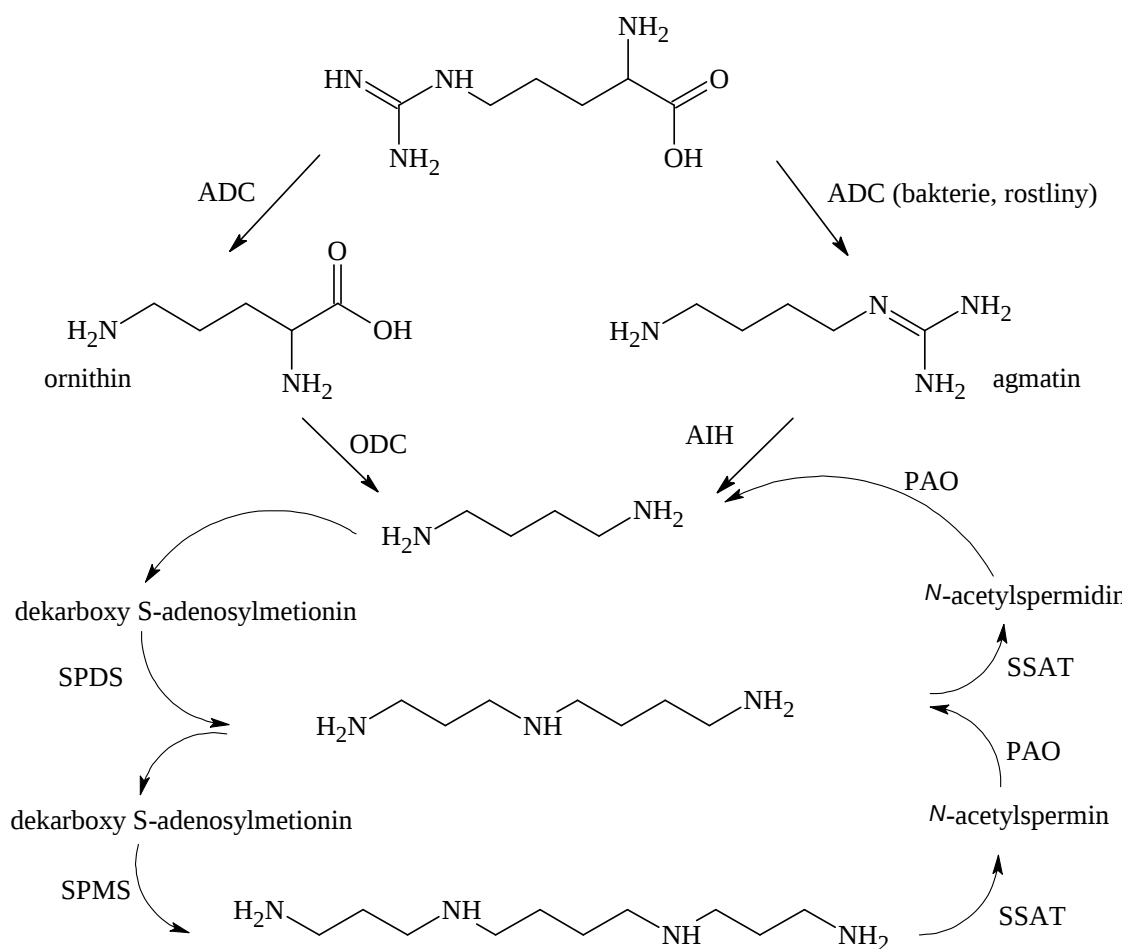
Za fyziologického pH dochází u molekul polyaminů k protonizaci primární a sekundární aminoskupiny, čímž se jejich molekuly stávají pozitivně nabitě a umožňuje jim to elektrostatickou interakci s jinými opačně nabitými složkami buněk např. molekulami DNA (Gosule & Schellman, 1978). Koncentrace volných polyaminů v cytosolu je z toho důvodu nízká a je přísně regulována.

Množství polyaminů v buňkách může být regulováno čtyřmi mechanismy: a to při jejich tvorbě, vzájemné přeměně, degradaci nebo transportu z buněk (Casero, 1993). Vysoká koncentrace polyaminů je pro buňku toxická a může vést až k apoptóze. U savčích buněk naopak nedostatek polyaminů negativně ovlivňuje dělení (Nishimura et al., 2005).

Nejběžnějšími zástupci jsou diamin putrescin (PUT, butan-1,4-diamin), triamin spermidin [SPD, N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin] a tetraamin spermin [SPM, N,N'-bis-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin]. Známým metabolitem je i „mrtvolný jed“ kadaverin (KAD, pentan-1,5-diamin). Četnost výskytu různých polyaminů závisí na druhu organismu. U prokaryotních organismů převládá výskyt PUT a SPD, zatímco u eukaryotních buněk je to SPD spolu se SPM a výskyt PUT je menší.

2.1 Metabolismus polyaminů

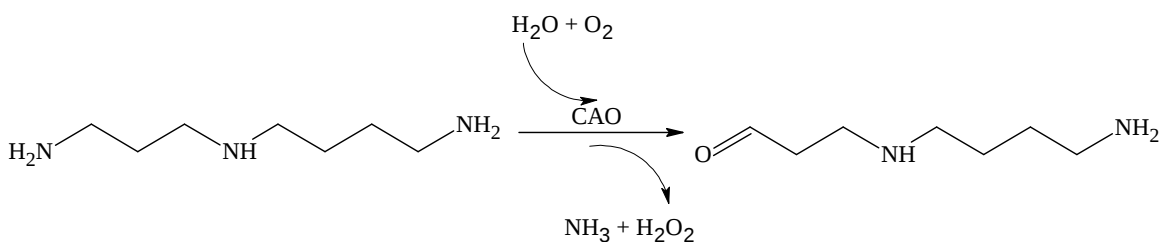
Metabolismus polyaminů začíná vznikem putrescinu, který je produktem dekarboxylace ornithinu ornithindekarboxylasou (ODC, EC 4.1.1.17). U rostlin může být PUT vytvořen alternativně druhou cestou dekarboxylací argininu arginindekarboxylasou (ADC, EC 4.1.1.19) přes agmatin přeměnou agmatiniminohydrolasou (AIH, EC 3.5.3.12) na *N*-karbamoylputrescin, který je nakonec *N*-karbamoylputrescin hydrolasou (CPA, EC 3.5.1.53) přeměněn na PUT. Z putrescinu navázáním aminopropylové skupiny z dekarboxylovaného *S*-adenosylmetioninu spermidinsyntasou (SPDS, EC 2.5.1.16) vzniká spermidin. Podobně za účasti sperminsyntasy (SPMS, EC 2.5.1.22) vzniká ze SPD polyamin SPM. SPD i SPM mohou být metabolizovány spermidin/spermin *N*¹-acetyltrasferasou (SSAT) a poté vyloučeny z buňky nebo přeměněny zpět až na PUT polyaminoxidasou (Obr. 10). Při těchto reakcích, přeměně *N*-acetylsperminu na SPD a *N*-acetylspermidinu na PUT, jako další produkt vzniká 3-acetamidopropanal (AcAPAL) (Ernestus, 2001).



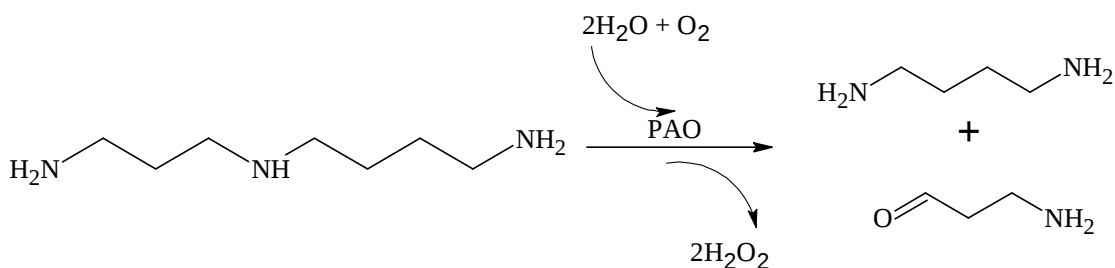
Obr. 10 Schéma metabolické syntézy polyaminů a jejich vzájemné přeměny

2.1.1 Polyaminoxidasy

Polyaminy jsou odbourávány aminoxidasami, které můžeme rozdělit na dvě skupiny. První skupinu tvoří měď vázající aminoxidasy (CAO, EC 1.4.3.21 a 1.4.3.22) (Obr. 11). Do druhé jsou zařazeny flavinadenindinukleotid (FAD) využívající aminoxidasy (PAO, EC 1.5.3.13, 1.5.3.14 a 1.5.3.17) (Obr. 12). CAO katalyzují oxidativní deaminační reakci polyaminů na primární aminoskupině. Při této reakci vznikají amonné ionty, peroxid vodíku a z původního aminu ω -aminoaldehyd. Reakci na sekundární aminoskupině uvnitř řetězce katalyzují některé PAO (Moschou et al., 2008). Reakčními produkty jsou v tomto případě ω -aminoaldehyd, kratší polyamin, a stejně jako u CAO peroxid vodíku.



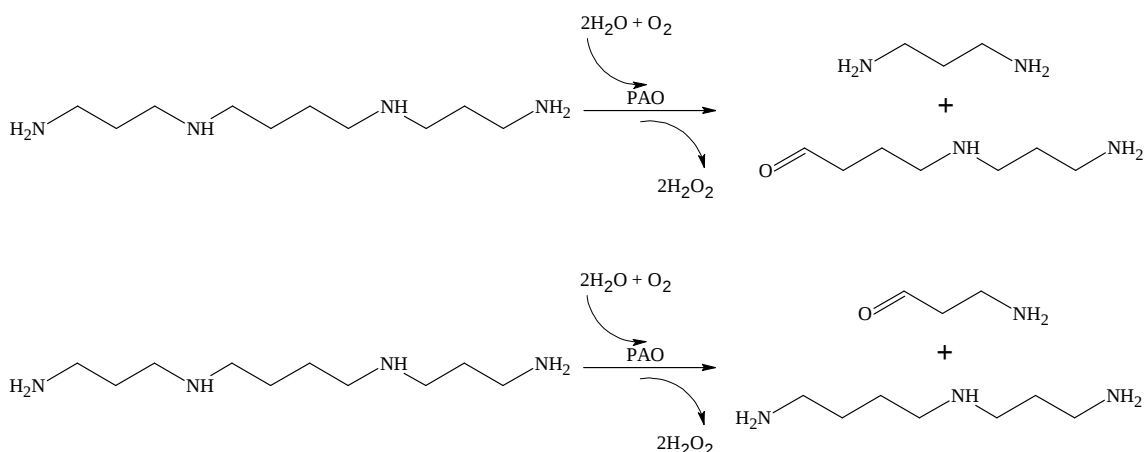
Obr. 11 Příklad reakce katalyzované CAO



Obr. 12 Příklad reakce katalyzované PAO

CAO jsou enzymy vyskytující se, jak v prokaryotních, tak v eukaryotních buňkách. Všechny dosud popsané CAO jsou dimery. V každé podjednotce se nachází jedno aktivní místo, které obsahuje měďnatý iont a organický kofaktor 2,4,5-trihydroxyfenylalanin chinon (topachinon, TPQ), který vzniká posttranslační modifikací tyrosinového zbytku (Janes et al., 1990). Katalýza CAO probíhá ping-pongovým mechanismem, kdy je primární amin přeměněn na odpovídající aldehyd za redukce kofaktoru TPQ. Poté je redukovaný TPQ reoxidován molekulou kyslíku. CAO v buňkách různých organismů může plnit různé funkce. U prokaryot je primární aminoskupina využita ve formě amonného iontu jako zdroj dusíku. Produkty reakce rostlinných CAO vyskytujících se ve velkém množství hlavně u dvouděložných a aktivita těchto enzymů je regulována jak vnitřními, tak vnějšími vlivy a světlem (Cona et al., 2006). Savčí CAO jsou spojeny s buněčným růstem, apoptosou, detoxifikačními procesy a buněčnou signalizací. Podle specifčnosti vůči různým aminům a jejich lokalizace je možno savčí CAO rozdělit na 4 typy, pro něž byly nalezeny kódující geny. Prvním typem je sérová aminosidasa oxidující hlavně SPM, SPD a jednoduché primární aminy, ale i benzylamin (Yamada & Yasunobu, 1962). Tento enzym vzniká v játrech, kde je sekretován do krevního oběhu. Dalším typem je CAO vykazující velkou afinitu k diaminům PUT a KAD, proto nazývaná diaminosidasa (DAO), vyskytující se hlavně ve střevech, ledvinách a placentě. Vysokou afinitu DAO vyazuje také k histaminu, naopak velmi málo oxiduje sekundární a terciální polyaminy. Třetím typem CAO u savců je aminosidasa objevená v oční sítnici, kde byl její největší výskyt zjištěn u gangliových buněk (Imamura et al., 1996), přičemž poškození těchto buněk může přímo ovlivnit funkci oka. Čtvrtým typem savčí CAO je vaskulární adhezivní protein-1, vznikající v endoteliálních buňkách, buňkách hladkého svalstva a adipocytech (Schwelberger, 2010). S výjimkou DAO, všechny tyto enzymy deaminují primární aminy s krátkým alifatickým řetězcem jako jsou methylamin, aminoaceton, benzylamin nebo dopamin a podílejí se na mnoha metabolických procesech, např. ovlivňují transport glukosy a zpomalují glykolýzu v tukových buňkách (Morin et al., 2001; Magyar et al., 2001).

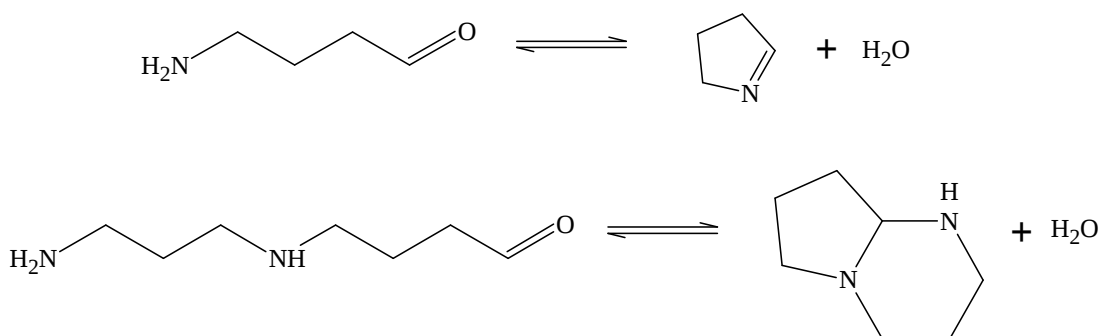
PAO jsou monomerní enzymy používající jako kofaktor nekovalentně vázaný flavinadenindinukleotid (FAD) (Šebela et al., 2001). Savčí PAO oxidují SPM na SPD a PUT. Ze SPD vzniká stejnou reakcí PUT a APAL. Rostlinné a bakteriální PAO oxidují SPD a SPM na ABAL respektive 4-(3-aminopropyl)-aminobutanal, dále vzniká propan-1,3-diamin a peroxid vodíku. Oxidační reakce u živočišných a rostlinných PAO probíhá tedy na jiných místech u SPM i SPD (Obr. 13). Rostlinné PAO katalyzují oxidaci na vnějším uhlíku k sekundární aminoskupině, zatímco živočišné a PAO kvasinek oxidují vnitřní uhlíkový atom (Stránska et al., 2007). Zajímavostí je, že některé PAO izolované z modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* přeměňují SPD a SPM stejným způsobem jako živočišné PAO (Tavladoraki et al., 2006). Stejná schopnost byla objevena i pro SPM oxidasu (FMS1) izolovanou z kvasinek. Tato reakce je prvním krokem pro zpětnou přeměnu polyaminů, kdy bez SSAT může být SPM i SPD převeden zpět na PUT.



Obr. 13 PAO oxidace SPM na vnějším (horní reakce) a vnitřním uhlíku (dolní reakce) vzhledem k sekundární aminoskupině

2.1.2 Cyklizace produktů polyaminoxidasy

Produkty metabolismu aminoxidasy mohou samovolně cyklizovat. ω -Aminoaldehydy ABAL a 4-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal při odštěpení molekuly vody cyklizují na 1-pyrrolin a diazabicyklononan (Obr. 14). APAL heterocyklus netvoří (Tylichová et al., 2007). Z cyklizačního produktu ABAL 1-pyrrolinu se po acetylaci na dusíkovém atomu vytváří 2-acetyl-1-pyrrolin (Bradbury et al., 2008).



Obr. 14 Cyklizace ABAL, cyklizace 4-(3-aminopropyl)-4-aminobutanalu

2.1.3 Vlastnosti některých ω -aminoaldehydů vznikajících z polyaminů

Hlavním produktem metabolismu polyaminů je ω -aminoaldehyd je APAL (Wood et al., 2006). Jeho negativní vliv byl prokázán v nervové soustavě živočichů. Zvyšující se koncentrace APAL byla zjištěna u krys 2 hodiny po trvalém nedostatečném prokrvení mozku. Poté došlo k apoptóze gliových buněk a nekróze neuronů (Ivanova et al., 1998). Dále byla zjištěna toxicita APAL pro gliové buňky sítnice a myši makrofágové buňky (Wood et al., 2006). Cytotoxické účinky APAL jsou umožněny přítomností aminoskupiny i aldehydové skupiny. K jejich projevu ale dochází až po dosažení určité koncentrace při akumulaci v lysosomech. Prasknutí a vylití obsahu lysosomu do prostředí buňky poté může vést až k smrti buňky (Li et al., 2003).

Nepřímým produktem degradace polyaminů je také akrolein. Akrolein vzniká samovolně z produktů vzniklých oxidací sérovou aminosidasou. Při oxidaci SPD je zdrojem akroleinu vzniklý APAL (Stevens & Maier, 2008) v případě SPM je to [N,N'-bis(3-propionaldehyd)-1,4-butandiamin] (Averil-Bates et al., 2005). Jiným zdrojem akroleinu jsou membránové lipidy, kde vzniká při peroxidační reakci (Uchida et al., 1998). Toxicita akroleinu spočívá v jeho vazbě k různým sloučeninám. Akrolein může reagovat s lysinovými, cysteinovými a histidinovými aminokyselinovými zbytky proteinů, ale i DNA. Účinky akroleinu tak mohou být mutagenní (Kehrer & Biswal, 2000). K detoxifikaci akroleinu dochází jeho navázáním na redukovaný glutation reakcí katalyzovanou glutation-S-transferasou (Averil-Bates et al., 2005).

Ostatní ω -aminoaldehydy s delším uhlíkovým řetězcem, které nemohou tvořit cyklizační produkty, jsou toxické díky přítomnosti volné aminoskupiny, stejně jako u APAL. Oproti tomu AcAPAL jako produkt metabolismu acetylovaných polyaminů toxický není (Wood et al., 2006).

Významným produktem oxidace polyaminů je 2-acetyl-1-pyrrolin. Jeho akumulace způsobuje příjemnou vůni rýže odrůdy basmati a jasmín. Charakteristickou vůni dodává tato

sloučenina i mnoha jiným potravinám jako je kukuřice, sýr nebo zelený čaj (Bradbury et al., 2008).

3. Aminoaldehyddehydrogenasy

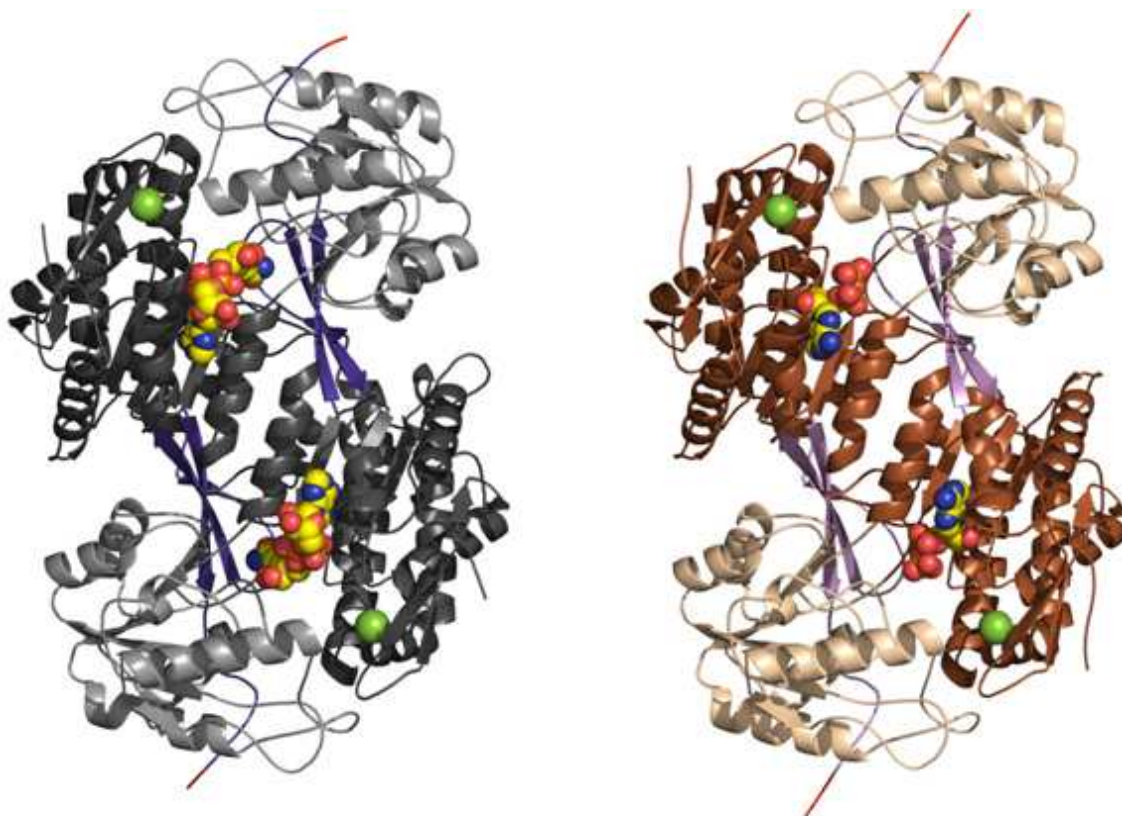
Aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) tvoří skupinu enzymů spadající do rodiny aldehyddehydrogenas (ALDH; E.C. 1.2.x.x) třídy 9 a 10 (Sophos et al., 2000). Obecně ALDH oxidují velmi široké spektrum látek vzniklých z endogenních i exogenních prekurzorů a můžeme je nalézt u bakterií, rostlin i živočichů. Rozdělení ALDH je možné na základě substrátu který oxidují a využívaného kofaktoru NAD^+ nebo NADP^+ . AMADHs katalyzují přeměnu ω -aminoaldehydů na příslušné ω -aminokyseliny. Svou činností navazují na metabolismus polyaminů. Substráty AMADH mohou být jak alifatické tak aromatické aminoaldehydy i řada látek jim strukturně podobných (Frömmel et al., 2011). Nejvýznamnějšími substráty jsou látky nesoucí primární aminoskupinu, kvartérní amoniovou skupinu nebo guanidinovou skupinu. Důležitost takto vzniklých sloučenin je dána jejich dalším využitím buňkami, jako intermediátů různých metabolických drah. Nejvíce zastoupenými primárními aminy oxidovanými AMADH jsou APAL a ABAL, které vznikají jako produkty oxidace většiny polyaminů (Šebela et al., 2000a). Nejlépe oxidovanými sloučeninami nesoucí kvartérní aminoskupinu jsou betainaldehyd (BAL) a trimethylamoniumbutyraldehyd (TMABAL) (Brauner et al., 2003). Všechny dosud zkoumané rostlinné AMADHs vykazují větší nebo stejnou afinitu k APAL, ABAL než k BAL (Šebela et al., 2000b). Z tohoto hlediska je možno méně specifické AMADH oddělit od výrazně BAL upřednostňujících betainaldehyddehydrogenas (BADH; EC 1.2.1.8) a AMADH rozdělit na aminobutyraldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.19), trimethylamino-butyraldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.47) a guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.54).

3.1 Aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu

Nejlépe prostudovaným enzymem z rodiny AMADH vykazující širokou substrátovou specifitu je PsAMADH (Tylichová et al., 2010). Tento enzym izolovaný z hrachu (*Pisum sativum*) se vyskytuje v přírodě ve dvou isoformách označených PsAMADH1 a PsAMADH2. Obě isoformy jsou složeny z 503 aminokyselin jejichž sekvence je z 80% shodná (Šebela et al., 2000b; Brauner et al., 2003). Aktivní forma obou PsAMADH je homodimer (Obr. 15). A stejně jako ostatní ALDH i PsAMADH při disociaci obou podjednotek ztrácí svou katalytickou funkci (Tylichová et al., 2010).

V aktivním místě těchto enzymů interaguje substrát s aminokyselinovými zbytky C294, nacházejícím se mezi místem vazby kofaktoru NAD^+ a místem pro vazbu substrátu. Zbývajícími interagujícími rezidui aktivního místa pro substrát jsou N162 a E260 nacházející se na dně

substrátového tunelu. Stavba substrátového tunelu u obou PsAMADH je téměř stejná a liší se pouze třemi aminokyselinovými zbytky. Substrátová specifita obou isoformů tohoto enzymu je proto velmi podobná (Tylichová et al., 2010). Cílenou mutagenézou byl u těchto enzymů zjištěn významný efekt interakce aminokyselinových zbytků se substrátem při vstupu do katalytického tunelu PsAMADH a uvnitř něj. Záměnou za alanin byl při vstupu objeven vliv aromatické aminokyseliny tryptofanu W288 na substrátovou specifitu. Na tomto místě dochází k interakci π elektronů W288 s protonovanou pozitivně nabitou aminoskupinou skupinou vstupujícího aminoaldehydu. Touto záměnou významně klesla afinita PsAMADH2 k nejběžnějším substrátům APAL a ABAL. Afinita naopak vzrostla u molekul TMABAL a GBAL obsahujících kvartérní dusík. Zároveň při stejné záměně bylo u PsAMADH1, která na stejném místě běžně obsahuje fenylalanin zjištěno zúžení vstupu do substrátového kanálu. Dalšími mutacemi aminokyselinových zbytků aspartátu D100 a D113 za alanin také blízko vstupu do substrátového kanálu bylo dosaženo změny aktivity a afinity PsAMADH2 vůči jednotlivým substrátům. Optimální orientace substrátu před vazbou do aktivního místa tohoto enzymu je pak zajišťována nepolárními postranními řetězci L166 a M167 (Kopečný et al., 2011).



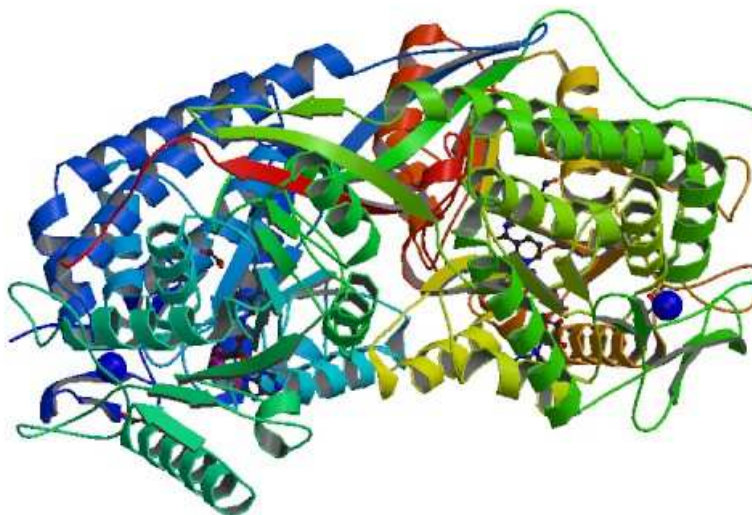
Obr. 15 Struktura PsAMADH, vlevo PsAMADH1, vpravo PsAMADH2 (převzato z Tylichová et al., 2010)

Nejllepšími substráty obou enzymů jsou alifatické (amino)aldehydy s krátkým uhlíkovým řetězcem. U PsAMADH1 je to APAL, v případě PsAMADH2 je to 3-

kyanopropionaldehyd. Aminoaldehydy s řetězcem kratším než 3 uhlíky, jako BAL obsahující pouze 2C řetězec, nejsou již oxidovány téměř vůbec (Tylichová et al., 2010).

3.2 Aminoaldehydehydrogenasy z kukuřice

Nedávno izolovány a popsány byly AMADH z kukuřice (*Zea mays*). Oproti dvěma zástupcům z hrachu byly u tohoto enzymu nalezeny 3 isoformy. Dva z těchto enzymů jsou téměř shodné a ve své struktuře se liší pouze 13ti aminokyselinami při 97% shodě sekvence. Označeny byly jako ZmAMADH1a a ZmAMADH1b. Třetí isoformou je ZmAMADH2 shodující se vlastní sekvencí s prvními dvěma ze 75 %. Struktura vazebného místa pro koenzym je u všech tří kukuřičných AMADH obdobná jako u PsAMADH a upřednostňováno je NAD^+ před NADP^+ . Velmi podobná je také stavba substrátového tunelu odpovídající uspořádání popsanému u PsAMADH2 (Tab. 1). Změna v aminokyselinové sekvenci byla nalezena na pozicích 288 a 453, vztaženo k PsAMADH. Díky přítomnosti alaninu namísto tryptofanu W288 u ZmAMADH2 pravděpodobně u tohoto enzymu nedochází k silné inhibici substrátem již při nízkých koncentracích jako to je u obou zbylých kukuřičných AMADH. Od ostatních ZmAMADH a PsAMADH se schopností dobře oxidovat betainaldehyd výrazně odlišuje ZmAMADH1a (Obr. 16), což je způsobeno přítomností cysteinu namísto isoleucinu na pozici 444 (Kopečný et al., 2013).



Obr. 16 Struktura ZmAMADH1a (převzato z databáze RSCB-Protein Data Bank; doi: 10.2210/pdb4i8p/pdb)

3.3 Lidská aminoaldehyddehydrogenasa

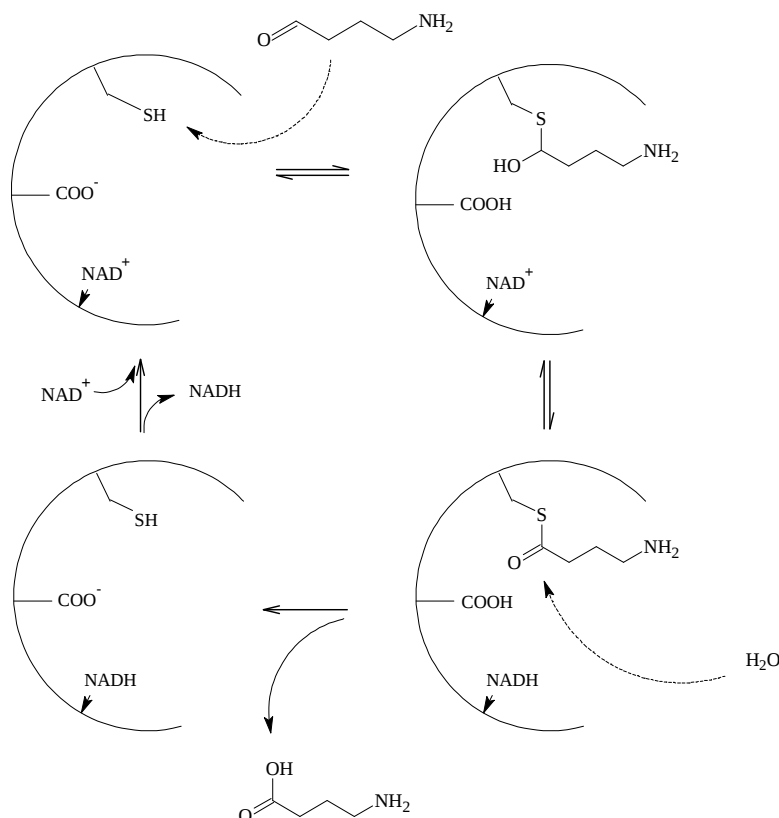
Pro srovnání, lidská aminoaldehyddehydrogenasa (ALDH9A1) vyskytující se ve třech isoformách je cytosolární enzym identifikovaný jako γ -trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasa. Strukturně jde o homotetramer. Tento enzym je zapojen do biosyntézy karnitinu (Vaz et al., 2000) a také do alternativní biosyntézy γ -aminomáselné kyseliny (GABA) (Kurys et al., 1993). Při této syntéze je PUT za účasti DAO přeměněn na ABAL, který je ALDH9A1 následně oxidován na GABA.

Tab. 1 Srovnání aminokyselinové sekvence v aktivním místě pro PsAMADH a ZmAMADH (převzato a upraveno z Kopečný et al., 2013)

	W109	D110	D113	N162	Y163	L166	M167	W170	E260	F284	W288	I293	C294	S295	I444	Q451	P452	C453	W459	C-konec
PsAMADH2	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	I	Q	P	C	W	AKL
PsAMADH1	A	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	F	I	C	S	I	Q	P	S	W	SKL
ZmAMADH1a	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	I	Q	P	C	W	SKL
ZmAMADH1b	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	I	Q	P	C	W	SKL
ZmAMADH2	G	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	A	V	C	S	I	Q	P	C	W	SKL

3.4 Průběh reakce katalyzované aminoaldehyddehydrogenasami

Oxidace aminoaldehydu na příslušnou kyselinu probíhá přes řadu meziproductů kovalentně vázaných k enzymu. Prvním krokem je vazba koenzymu NAD^+ případně NADP^+ do hydrofobní kapsy ohraničené dvěma α -helixy. Aminoaldehyd se až poté váže ke katalytickému reziduu cysteinu za tvorby thiohemiacetalu. Dále dochází k přenosu vodíkového atomu z vázaného meziproductu na NAD^+ a jeho redukci. Thiohemiacetal je tak přeměněn na thioester. Ten je hydrolýzou molekulou vody uvolněn ve formě odpovídající aminokyseliny. Nakonec své vazebné místo opouští redukovaný koenzym (Šebela et al., 2000b; Tylichová et al., 2010) (Obr. 17).



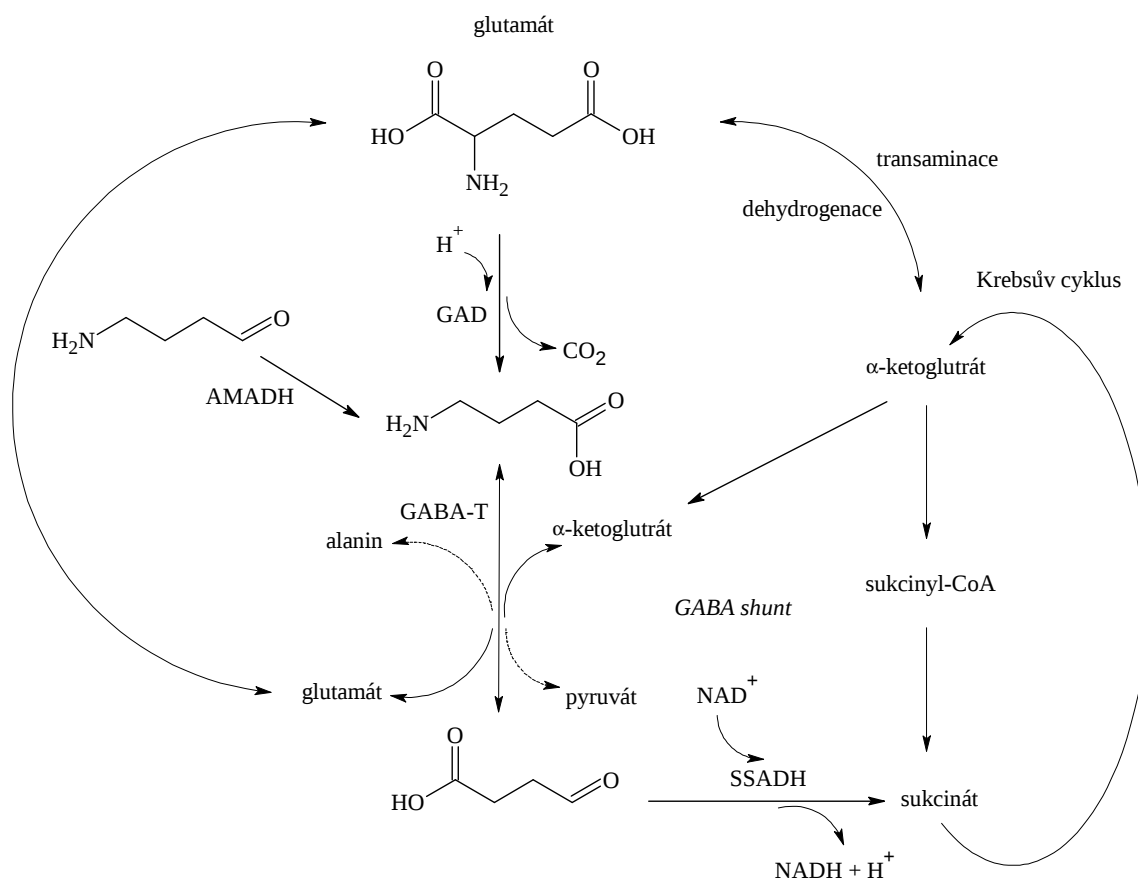
Obr. 17 Reakční mechanismus oxidace AMADHs (převzato a upraveno z Tylichová et al., 2007)

3.5 Produkty oxidace ω -aminoaldehydů aminoaldehyddehydrogenasami

APAL a AcAPAL mohou být ALDH oxidovány na β -alanin případně *N*-acetyl- β -alanin. *N*-acetyl- β -alanin je pak přeměněn na β -alanin specifickou hydrolasou (EC 3.5.1.21) (Seiler, 2004). Dále může být na β -alanin metabolizován β -alanin *N*-methyltransferasou (EC 2.6.1.19) na betain β -alaninu, který je významným osmoprotektantem u rostlin z rodiny *Plumbaginaceae* (Cona et al., 2006). U kvasinek bylo prokázáno zapojení β -alaninu původem ze SPM, který byl oxidován FMS1 na APAL a poté ALDH, do metabolismu kyseliny pantotenové, která je prekurzorem koenzymu A (White et al., 2001).

ABAL vzniklý oxidací z PUT nebo u rostlin ze SPD je metabolizován ALDH na γ -aminomáselnou kyselinu (GABA) (Šebela et al., 2000b). U živočichů má GABA významnou roli hlavně jako neurotransmiter. Význam u rostlin je v metabolické dráze vyskytující se i u živočichů a nazývané „GABA shunt“, kdy GABA vzniká během přeměny glutamátu na sukcinát. Tato dráha je tvořena třemi enzymovými reakcemi. První je vznik GABA ireverzibilní dekarboxylací glutamátu glutamátdekarboxylasou (GAD, EC 4.1.1.15). Tento krok probíhá v cytosolu a aktivita GAD je regulována komplexem Ca^{2+} -kaldmodulin. GABA je poté transportována do mitochondrie kde je GABA transaminasou (GABA-T, EC 2.6.1.19) přeměněna na sukcinátsemialdehyd. Akceptorem aminoskupiny při této reakci je pyruvát nebo

GABA je tak zapojena do přenosu a ukládání dusíku v buňkách. U bakterií je „GABA shunt“ dráha využita pro odčerpávání protonů z cytosolu. To umožňuje větší toleranci na kyselé prostředí. K podobnému jevu dochází u rostlin, kdy se hromadí GABA v reakci na okyselení cytosolu. Další možné zapojení GABA je v ochraně proti oxidativnímu stresu. Při tom přeměnou sukcinátsemialdehydu na sukcinát dochází k redukci NAD^+ , jež je poté využito v dýchacím řetězci (Bouché et al., 2003). Díky dobré rozpustnosti ve vodě může GABA plnit funkci osmoregulátoru. Ke zvýšení koncentrace GABA u rostlin dochází také při mechanickém poškození. Při narušení rostlinného těla hmyzem se předpokládá funkce GABA jako insekticidu působícího neurogenerativně na další vývoj parazita (Shelp et al., 1999).



Obr. 18 Zapojení GABA shunt do ostatních metabolických drah (převzato a upraveno z Shelp et al., 1999)

Oxidací betainaldehydu BADH vzniká účinný osmolyt glycinbetain, který chrání rostliny při nedostatku vody a před vysokou koncentrací solí (McNeil et al., 1999).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie

Většina chemikálií byla zakoupena od firmy Sigma-Aldrich (USA), případně Merck Millipore (USA).

4.2 Použité enzymy

Pro měření byly použity enzymy ZmAMADH1a, ZmAMADH1b, ZmAMADH2 a PsAMADH2 izolované, jako rekombinantní proteiny z bakterie *E. coli* (Tylichová et al., 2008). Purifikované enzymy byly získány od Adély Hýlové a Jana Vilíma (Tab. 2).

Tab. 2 Koncentrace použitých enzymů

	koncentrace [mg/ml]
ZmAMADH1a	5,81
ZmAMADH1b	12,98
ZmAMADH2	8,91
PsAMADH2	5,43

4.3 Použité přístroje

- digitální pH metr (Multical WTW, SRN)
- digitální váhy (Kern, SRN)
- chlazená centrifuga Centrifuge 5430 (Eppendorf, SRN)
- kapalinový oběhový termostat s řídicí jednotkou Polystat CC1 (Huber, SRN)
- lyofilizátor Lyovac GT2 (GEA Lyophil, SRN)
- míchačka elektromagnetická C-MAG HS 10 (IKA, SRN)
- NMR spektroskop JEOL ECA-500 (JEOL, Japonsko)
- rotační vakuová odparka R-200 s lázní R-490 (Büchi Labortechnik AG, Švýcarsko)
- spektrofotometr Agilent model 8453 (Agilent Technologies, USA)

Dále byly použity automatické pipety Eppendorf o objemech 2,5, 10, 20, 100, 200, 1000 a 5000 μ l, běžné laboratorní sklo, plastové mikrozkuřavky, lžičky, špachtle, magnetická míchadla, parafilm.

4.4 Příprava substrátů

Pro přípravu možných *N*-acetylovaných substrátů bylo využito acetanhydridu kyseliny octové. Ostatní sloučeniny byly připraveny *N*-acylací za použití katalyzátoru KF-celitu.

Acetylace APAL i ABAL na *N*-konci probíhaly následovně. Do vychlazené kádinky s míchadlem na ledové lázni 0-4°C bylo napipetováno 1,6 ml (0,0106 mol) 97% diethylacetalu 3-aminopropanalu nebo 1,9 ml (0,0106) 90% diethylacetalu 4-aminobutanalu diacetátu a přidáno 10 ml bezvodého pyridinu. Během 25 minut bylo za stálého míchání postupně přidáno ekvimolární množství acetanhydridu. Směs byla ponechána na ledové lázni dalších 30 minut a poté byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Po odpaření rozpouštědla v lyofilizátoru byl získán výsledný produkt ve formě diethylacetalu. Takto byly připraveny AcAPAL a AcABAL.

Pro další *N*-acylační reakce byl připraven katalyzátor KF-celit. Dle postupu bylo nejprve smícháno 20 g celitu 545 s 20 g KF rozpuštěném v 0,5 l vody. Po důkladném promíchání byla většina vody odpařena na rotační vakuové odparce (RVO) při 50-60°C. Získaný produkt byl poté extrahován do 100 ml acetonitrilu. Extrakce byla ještě 2x zopakována. Nakonec byl produkt ve formě bílého prášku získán vysušením v exsikátoru.

Pro přípravu bylo poté do 100ml Erlenmeyerovy baňky odváženo 5 g najemno rozetřeného KF-celitu a přidáno 50 ml acetonitrilu. Obsah byl 15 minut ponechán míchat na elektromagnetické míchačce. Poté byl napipetován 1 ml výchozího ω -aminoaldehydu ve formě diethylacetalu. Pro přípravu byly takto použity APAL, ABAL a 2-aminoethanal (ACAL). Směs byla nechána opět 15 minut míchat. Samotná acylace probíhala vždy od 15 do 20 minut, kdy byl za stálého míchání a po malých částech přidáván do reakční směsi propionylchlorid nebo butyrylchlorid v ekvimolárním množství k výchozímu aminoaldehydu. Všechny reakce probíhaly za laboratorní teploty bez potřeby chlazení reakční směsi. Po přidání chloridů kyselin byla směs ponechána dalších 15 minut míchat. Nakonec byl obsah baňky zfiltrován a produkt zahuštěn na RVO. Pomocí této procedury byly připraveny diethylacetyly *N*-propionylaminopropanalu (PropAPAL), *N*-propionylaminobutanalu (PropABAL), *N*-propionylaminoethanal (PropACAL), *N*-butyrylaminopropanalu (ButAPAL), *N*-butyrylaminobutanalu (ButABAL) a *N*-butyrylaminoethanal (ButACAL). U získaných konečných produktů byla změřena ^1H - a ^{13}C NMR spektra na přístroji Jeol (500 MHz) za použití deuterovaného DMSO nebo CDCl_3 , jako rozpouštědla. Standardem byl tetramethylsilan.

Převedení na volný aldehyd proběhlo vždy před začátkem měření kyselou hydrolyzou HCl, tak že bylo 50 mmoldiethylacetalu smícháno s 0,2M HCl o objemu odpovídajícím čtyřnásobku molárního množství hydrolyzovaného diethylacetalu. Po promíchání byl 1 ml takto připravené směsi v mikrozkuhavce o objemu 2 ml umístěn na 10 min do blokového termostatu vyhřátého na 100°C. Po provedení hydrolyzy byla zkuhavka vždy ponechána pozvolna se ochladit na laboratorní teplotu, před prvním měřením se ponechala vychladit a mezi měřeními byla uchovávána na ledové lázni.

4.5 Měření aktivity a kinetických parametrů

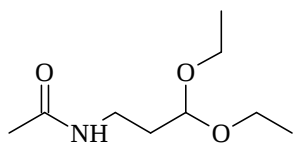
Rychlost enzymové přeměny jednotlivých substrátů byla monitorována detekcí redukovaného NADH vznikajícího v průběhu reakce. Detekce probíhala spektrofotometricky na přístroji Agilent Technologies 8453 při vlnové délce světla 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Reakční směs byla napipetována vždy v křemenných kyvetách, jejichž obsah byl během 360 sekund měření neustále míchán a vyhříván na 30°C. Pro měření bylo do kyvety napipetováno 1550 μl 0,15M Tris-HCl pufru o pH 9 a 50 μl 20mM vodného roztoku NAD^+ . Zbytek byl doplněn do celkového objemu 2000 μl roztokem substrátu, enzymu a destilované vody. Pro stanovení relativní aktivity byla celková koncentrace substrátu v kyvetě 500 μM a bylo použito 10 μl roztoku 100x zředěného enzymu, pro PsAMADH2 54,3 $\mu\text{g/ml}$ a 58,1, 129,8 a 89,1 $\mu\text{g/ml}$ pro ZmAMADH1a, 1b a 2. Přidávaný roztok substrátu měl koncentraci 50 mM. Pro měření kinetických parametrů bylo použito 10 – 30 μl roztoku enzymu a 2mM zásobní roztok substrátu. Takto byla změřena koncentrační řada obvykle od 10 μM po 1mM nebo 2mM výsledná koncentrace substrátu v reakční směsi. Získaná data byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism 5, kde byla vypočtena hodnota Michaelisovy konstanty K_m a limitní rychlosti V_{lim} pro jednotlivé substráty. V případě inhibice enzymu substrátem byla zjištěna inhibiční konstanta K_{si} . Získanými hodnotami závislosti počáteční rychlosti na koncentraci substrátu byla proložena nejlépe odpovídající křivka charakterizována jednou z rovnic:

$$\text{a) } v = \frac{V_{\text{lim}} \cdot [S]}{K_m + [S]} \qquad \text{b) } v = \frac{V_{\text{lim}} \cdot [S]}{K_m + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_{\text{si}}}\right)}$$

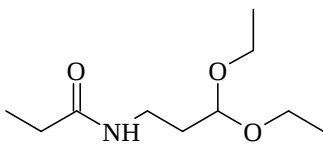
Rovnice a) byla využita při průběhu odpovídající popisu dle Michaelise a Mentenové, rovnice b) byla využita při zjištění inhibice enzymu substrátem. Počáteční koncentrace substrátu v reakci je označena [S].

5 Výsledky a diskuse

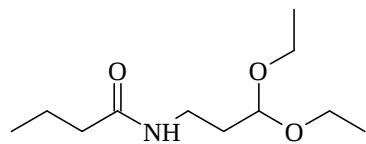
Popsanými acylačními metodami byly připraveny *N*-acylované deriváty 3-aminopropanalu diethylacetalu, 4-aminobutanalu diethylacetalu a 2-aminoethanalu diethylacetalu (Obr. 19).



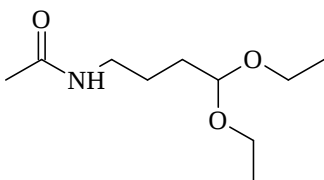
diethylacetal AcAPAL



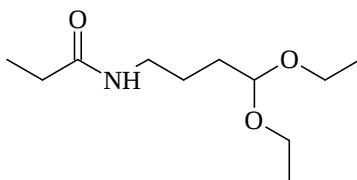
diethylacetal PropAPAL



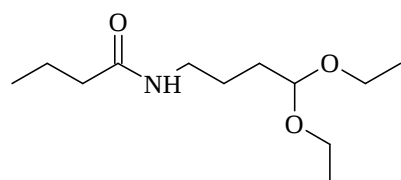
diethylacetal ButAPAL



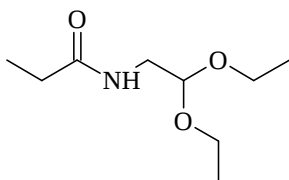
diethylacetal AcABAL



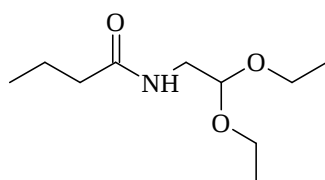
diethylacetal PropABAL



diethylacetal ButABAL



diethylacetal PropACAL



diethylacetal ButACAL

Obr. 19 Strukturní vzorce připravených látek. 3-propionylamidopropanal (PropAPAL), 3-butyrylamidopropanal (ButAPAL), 4-propionylamidobutyral (PropABAL), 4-butyrylamidobutyral (ButABAL), 2-propionylamidoethanal (PropAC), 2-butyrylamidoethanal (ButACAL). Zkratky označují aminoaldehydy připravené hydrolýzou vyobrazených diethylacetalů a použité pro spektrofotometrická měření.

5.1 NMR spektra

Čistota syntetických diethylacetalů *N*-acylovaných aminoaldehydů byla ověřena měřením ^1H a ^{13}C NMR spekter. Měření provedl Dr. Tomáš Pospíšil z Oddělení chemické biologie a protetiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PŘF UP. Následující text shrnuje výsledky měření ^{13}C spekter.

Přehled ^1H NMR spekter doplněný odpovídajícími softwarovými predikcemi je podán graficky (Obr. 20 – Obr.27).

Diethylacetal AcAPAL

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 15.8, 23.1, 33.9, 35.3, 61.2, 101.0, 169.5

Diethylacetal AcABAL

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 15.8, 23.1, 25.1, 31.4, 38.9, 61.0, 102.5, 169.5

Diethylacetal PropAPAL

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 10.5, 15.9, 29.0, 33.9, 35.2, 61.2, 101.0, 173.2

Diethylacetal ButAPAL

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 14.1, 15.9, 19.2, 34.0, 35.1, 37.9, 61.2, 101.0, 172.3

Diethylacetal PropABAL

^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ ppm 10.0, 15.4, 24.7, 29.8, 31.1, 39.2, 61.5, 102.8, 173.7

Diethylacetal ButABAL

^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ ppm 13.8, 15.4, 19.3, 31.1, 38.8, 39.2, 61.5, 102.7, 173.0

Diethylacetal PropACAL

^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ ppm 9.8, 15.3, 29.6, 41.9, 62.9, 100.8, 174.0

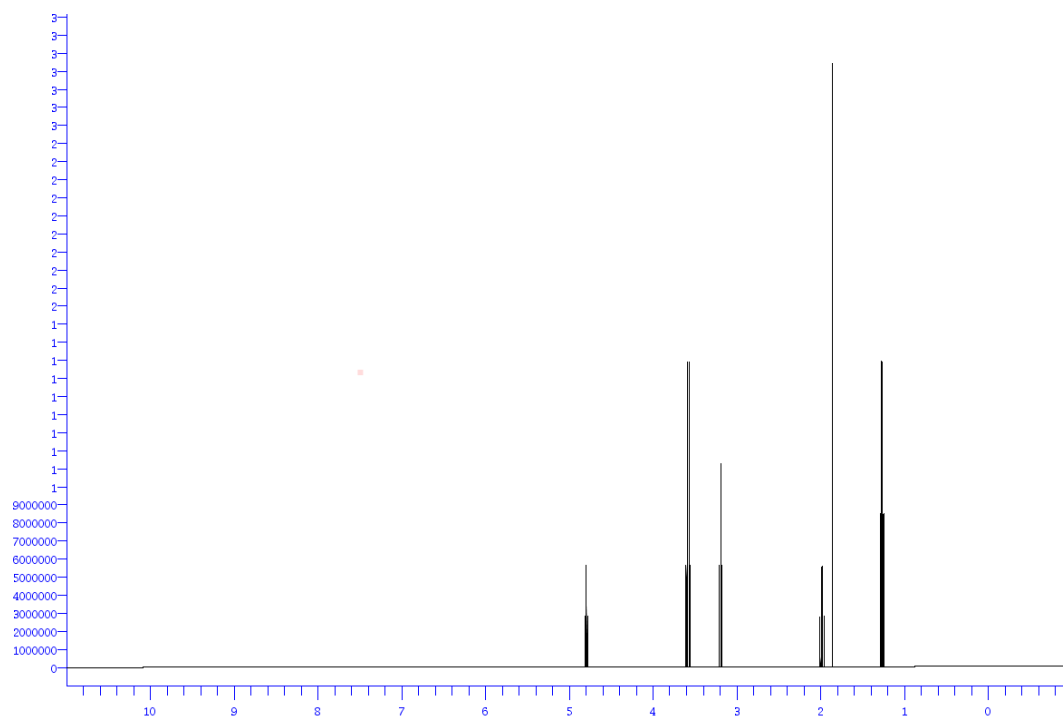
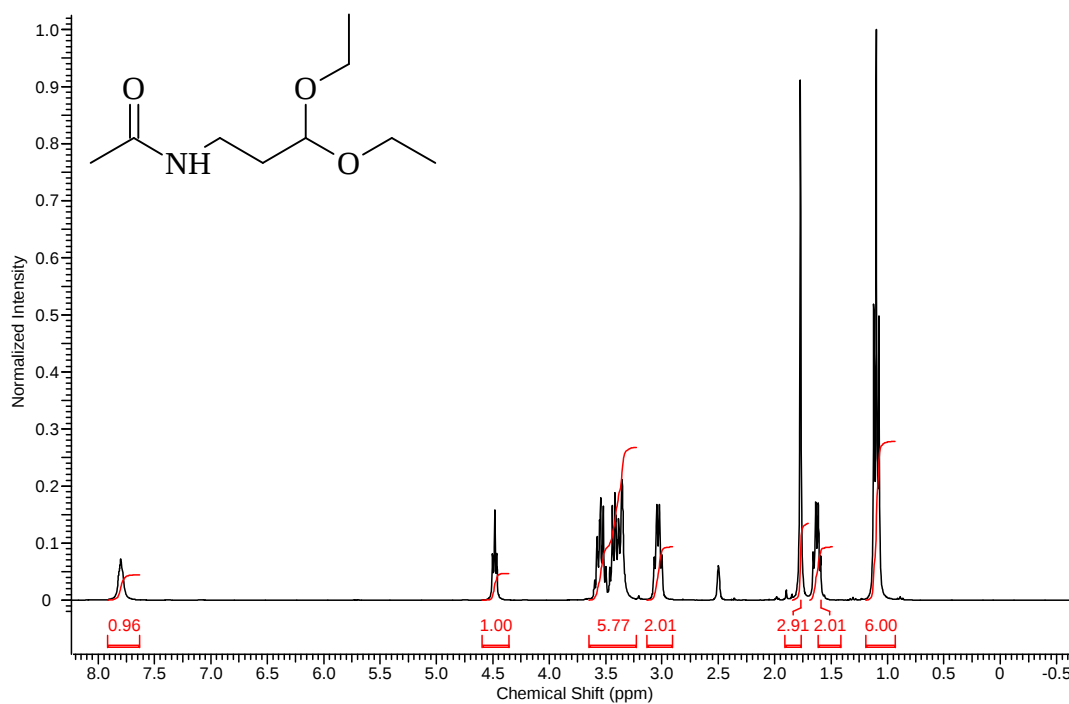
Diethylacetal ButACAL

^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ ppm 13.7, 15.3, 19.1, 38.6, 41.8, 62.9, 100.8, 173.2

Vyobrazení a popis naměřených ^1H NMR spekter

Diethylacetal AcAPAL

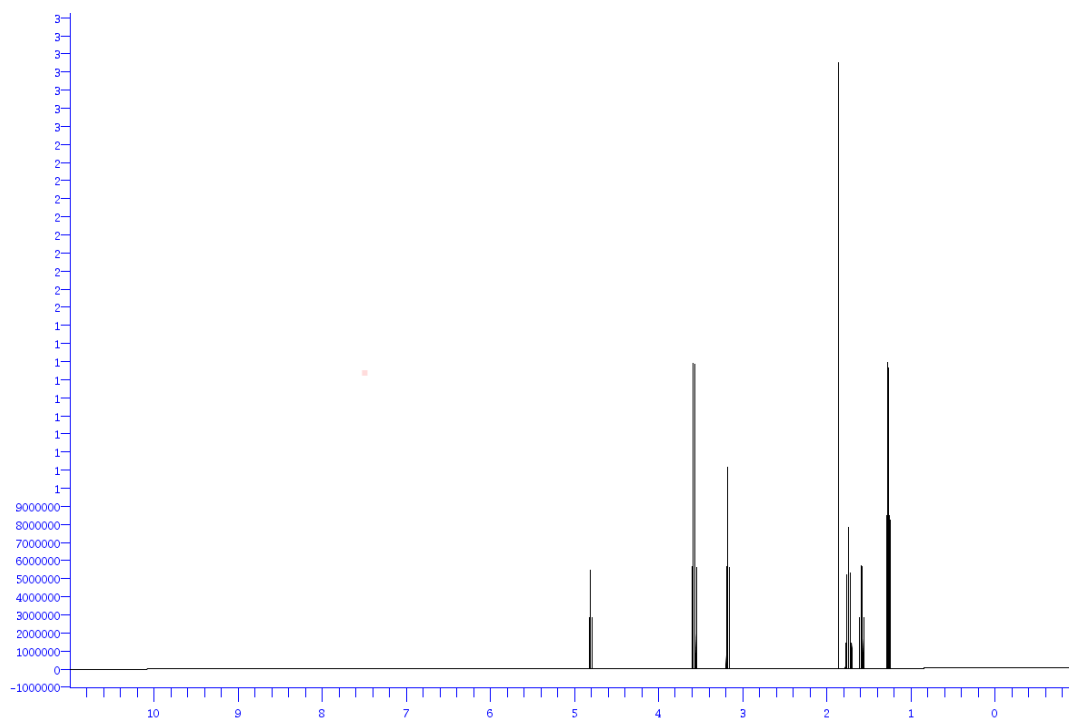
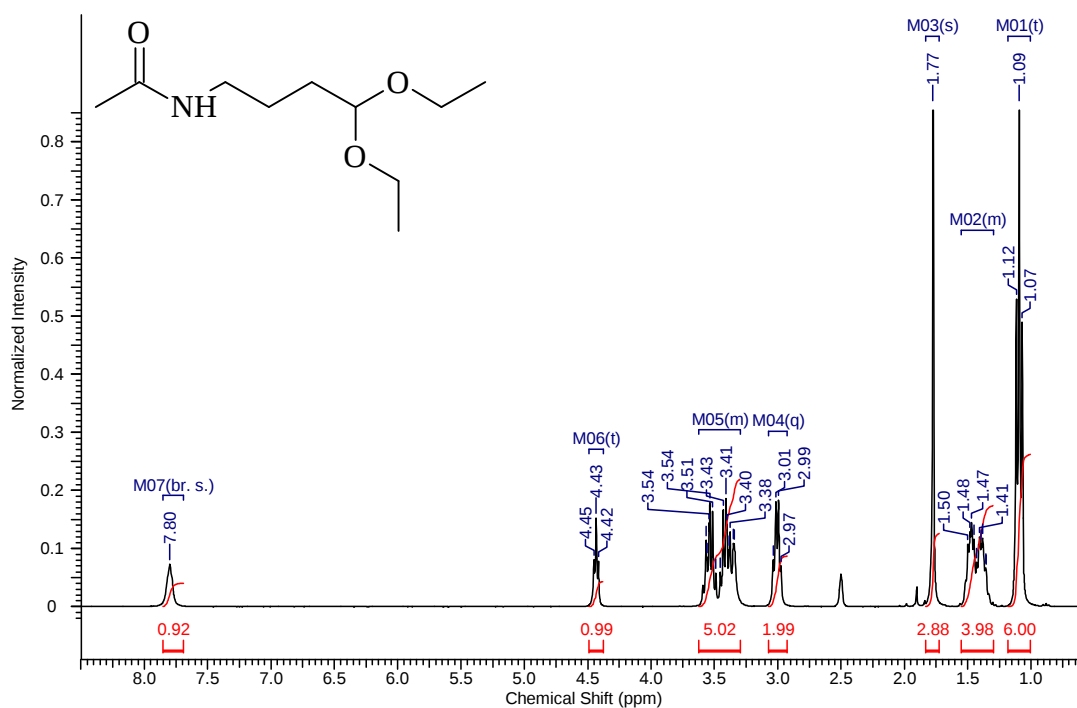
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.10 (t, $J=7.04$ Hz, 6 H) 1.63 (q, $J=6.65$ Hz, 2 H) 1.77 (s, 3 H) 3.03 (q, $J=6.71$ Hz, 2 H) 3.29 - 3.62 (m, 4 H) 4.48 (t, $J=5.58$ Hz, 1 H) 7.80 (br. s., 1 H).



Obr. 20 ^1H NMR spektrum diethylacetalu AcAPAL, experiment (nahore) a predikce (dole)

Diethylacetal AcABAL

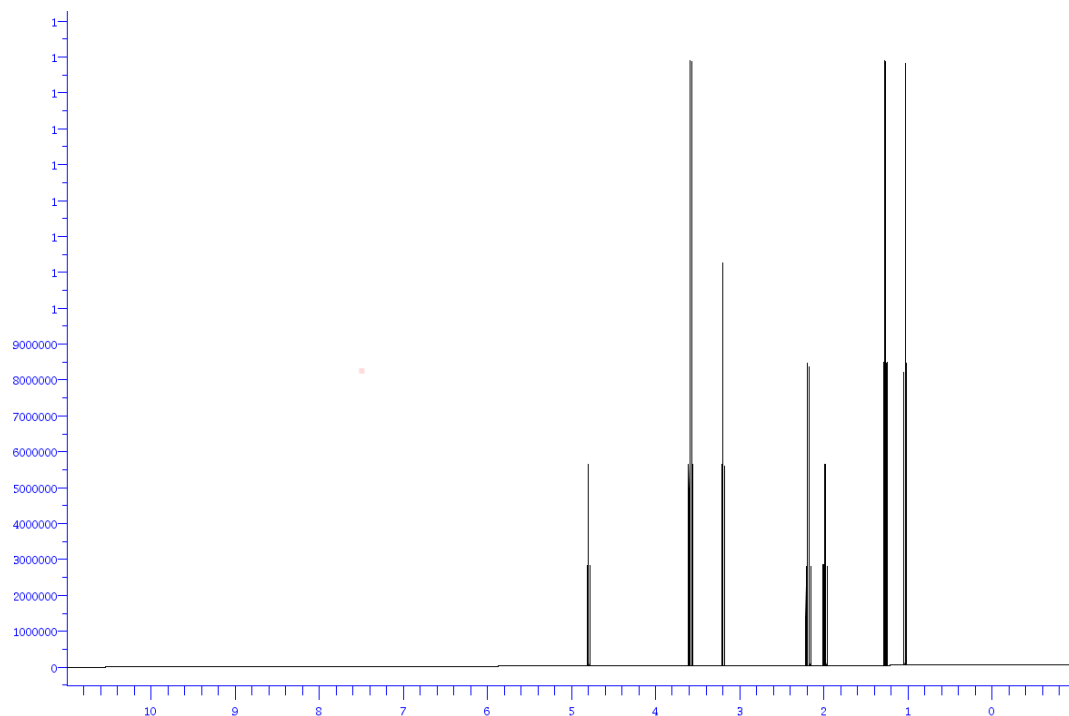
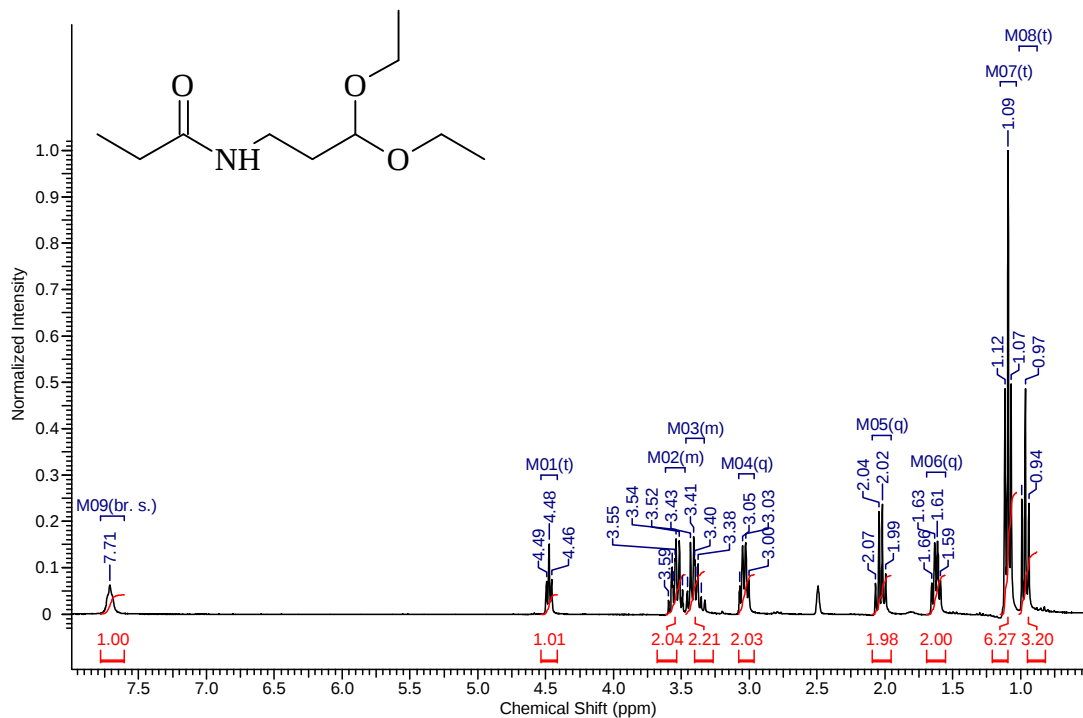
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.09 (t, $J=6.95$ Hz, 6 H) 1.30 - 1.55 (m, 4 H) 1.77 (s, 3 H) 3.00 (q, $J=6.34$ Hz, 2 H) 3.30 - 3.63 (m, 4 H) 4.43 (t, $J=5.31$ Hz, 1 H) 7.80 (br. s., 1 H).



Obr. 21 ^1H NMR spektrum diethylacetalu AcABAL, experiment (nahore) a predikce (dole)

Diethylacetal PropAPAL

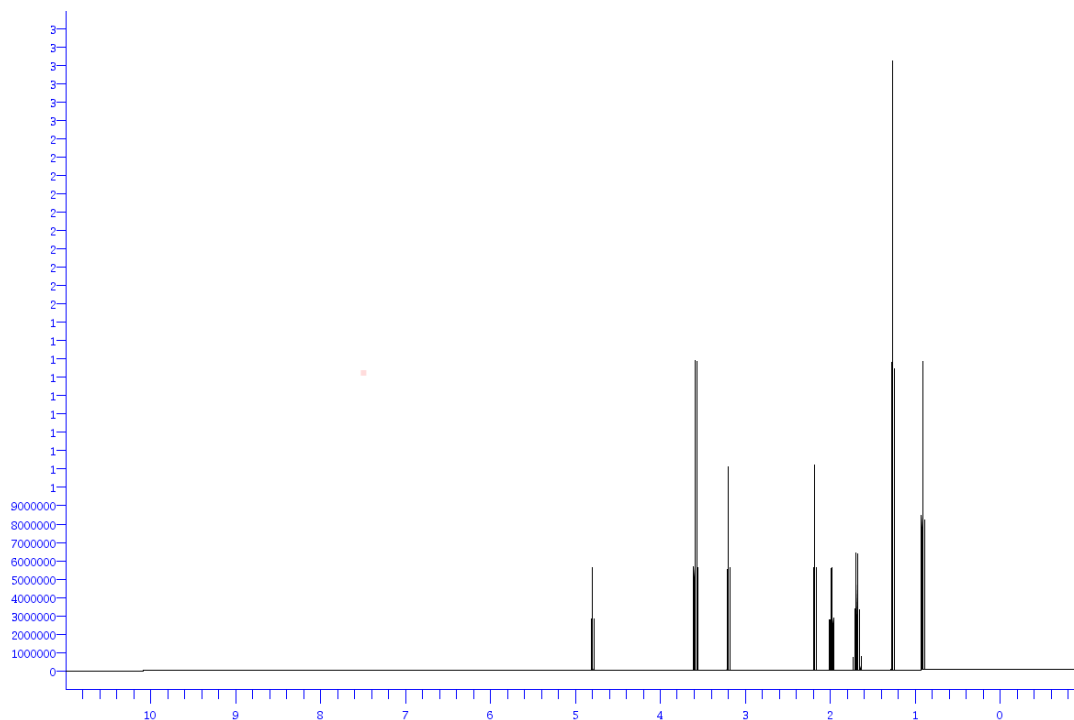
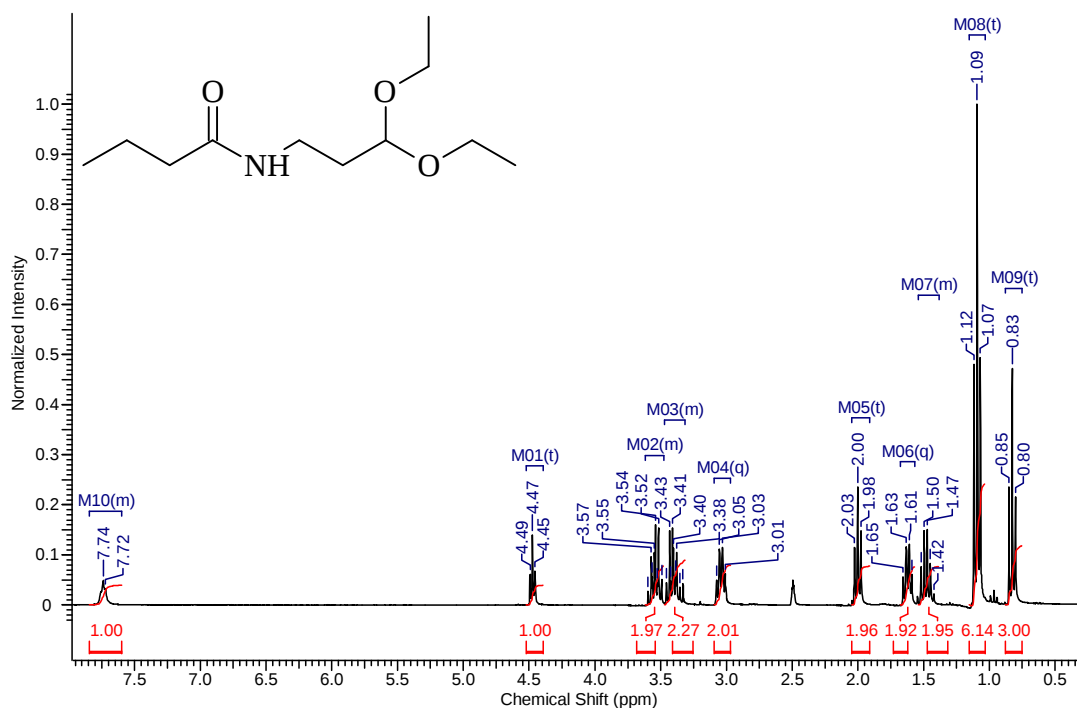
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0.97 (t, $J=7.59$ Hz, 3 H) 1.09 (t, $J=7.04$ Hz, 6 H) 1.62 (q, $J=6.71$ Hz, 2 H) 2.03 (q, $J=7.68$ Hz, 2 H) 3.04 (q, $J=6.77$ Hz, 2 H) 3.33 - 3.47 (m, 2 H) 3.47 - 3.62 (m, 2 H) 4.48 (t, $J=5.58$ Hz, 1 H) 7.71 (br. s., 1 H)



Obr. 22 ^1H NMR spektrum diethylacetaluPropAPAL, experiment (nahore) a predikce (dole)

Diethylacetal ButAPAL

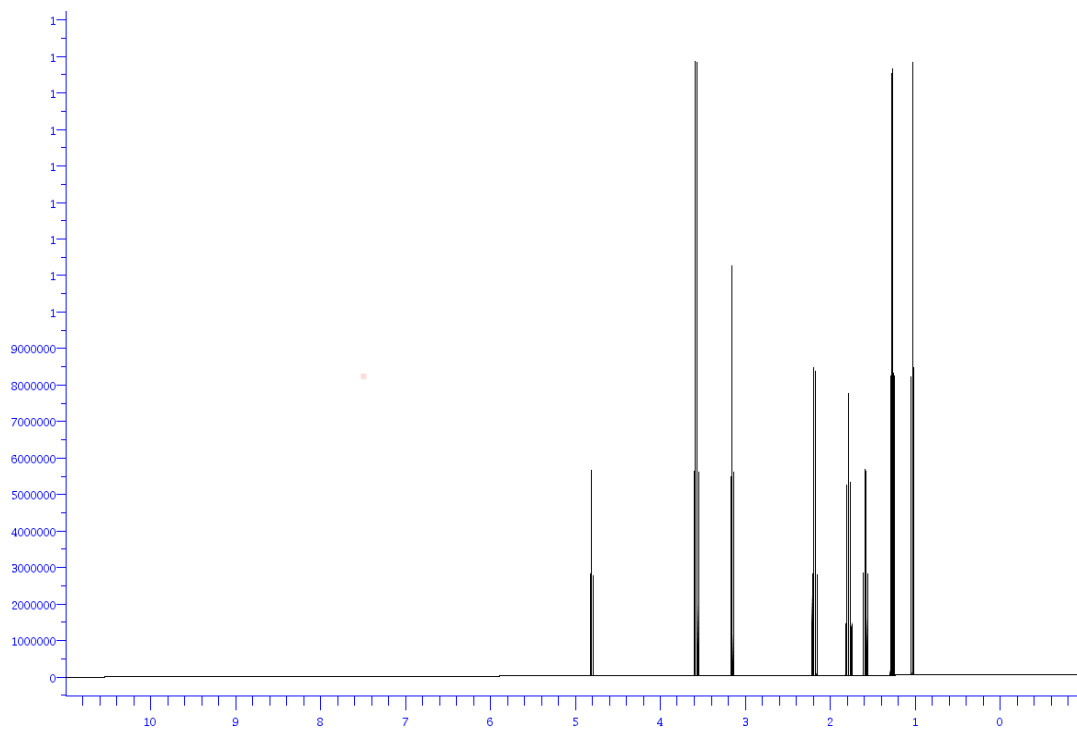
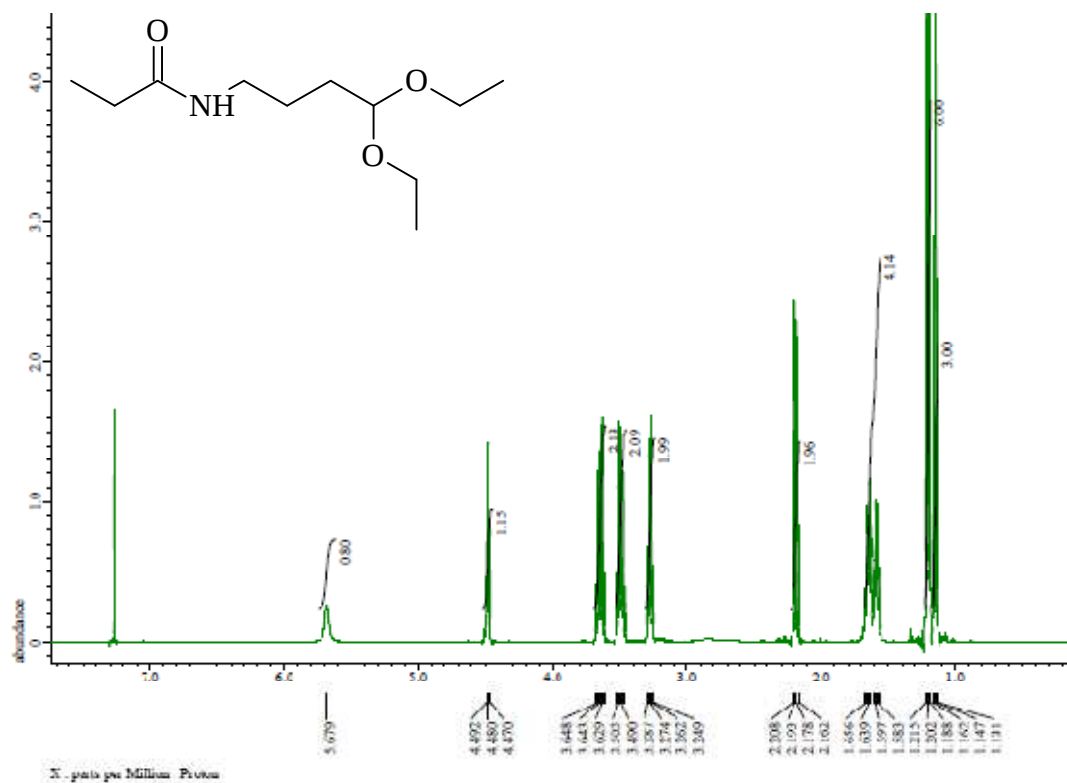
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 0.83 (t, $J=7.04$ Hz, 6 H) 1.09 (t, $J=7.04$ Hz, 6 H) 1.38 – 1.54 (m, 2 H) 1.62 (q, $J=6.71$ Hz, 2 H) 2.00 (t, $J=7.32$ Hz, 2 H) 3.04 (q, $J=6.53$ Hz, 2 H) 3.31 – 3.47 (m, 2 H) 3.48 – 3.62 (m, 2 H) 4.47 (t, $J=5.67$ Hz, 1 H) 7.60 – 7.84 (m, 1 H)



Obr. 23 ^1H NMR spektrum diethylacetalu ButAPAL, experiment (nahore) a predikce (dole)

Diethylacetal PropABAL

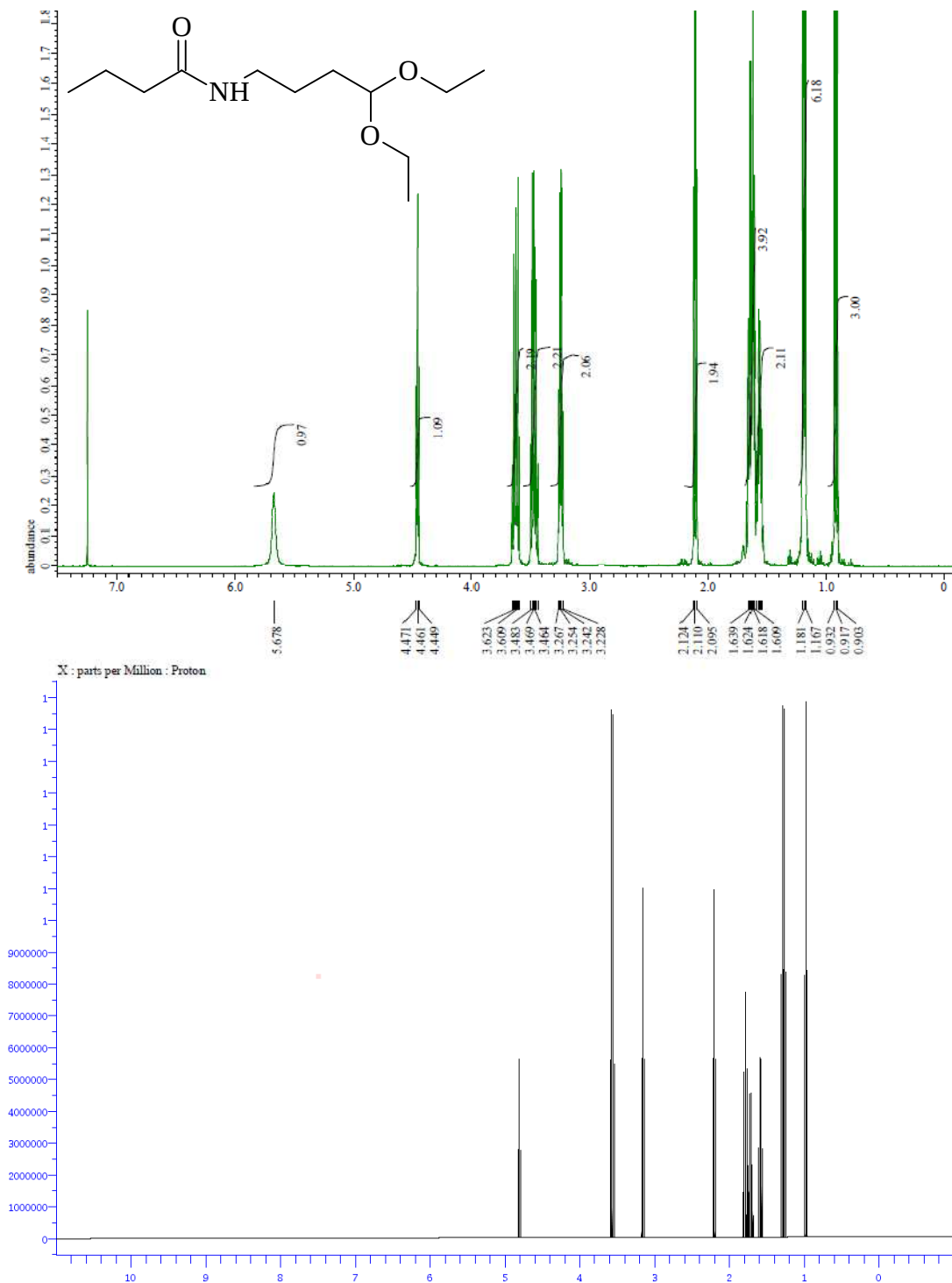
^1H (500 MHz, CDCl_3): 1.15 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 1.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H), 1.56-1.61 (m, 2H), 1.62-1.67 (m, 2H), 2.18 (q, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.37 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.46-3.52 (m, 2H), 3.62-3.68 (m, 2H), 4.48 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 5.68 (bs, 1H)



Obr. 24 ^1H NMR spektrum diethylacetaluPropABAL, experiment (nahore) a predikce (dole)

Diethylacetal ButABAL

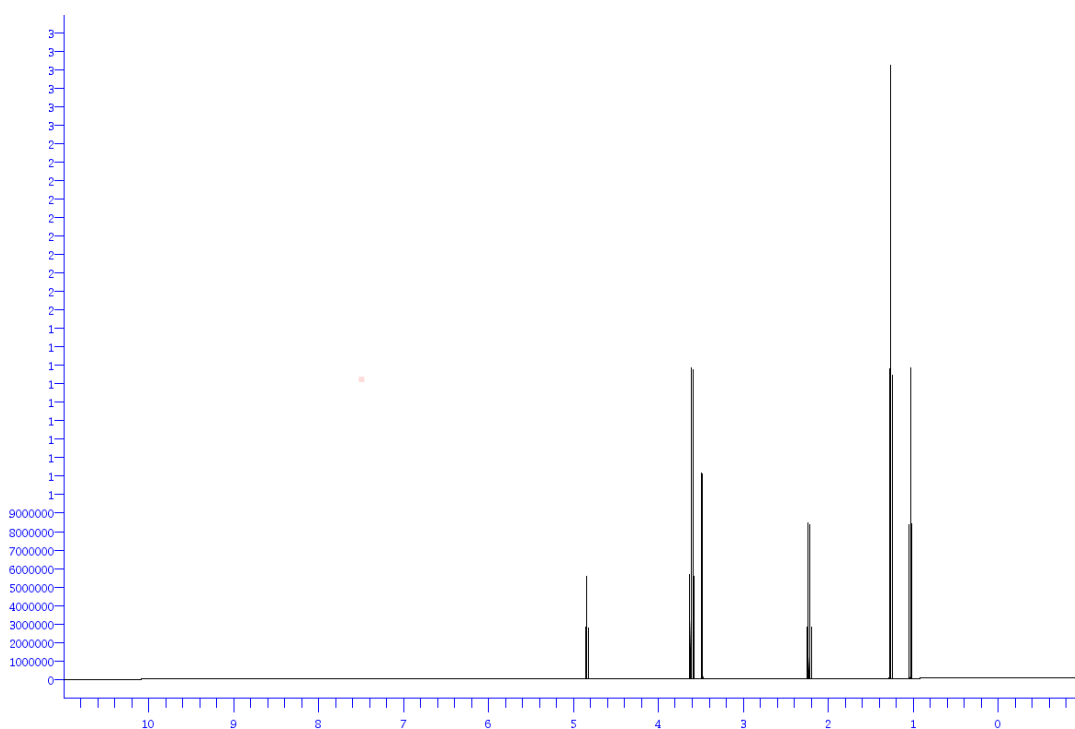
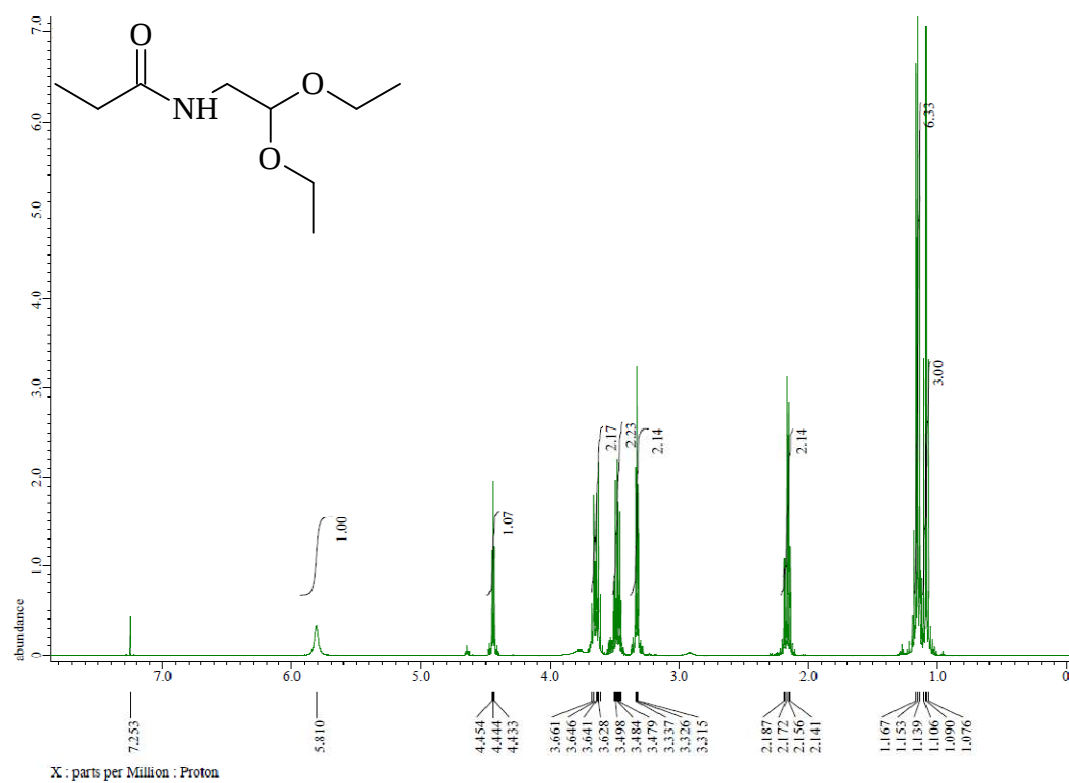
^1H (500 MHz, CDCl_3): 0.91 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 1.18 (t, $J = 7.5$ Hz, 6H), 1.54 – 1.59 (m, 2H), 1.60 – 1.65 (m, 4H), 2.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.25 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.44-3.50 (m, 2H), 3.60-3.66 (m, 2H), 4.46 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.67 (bs, 1H)



Obr. 25 ^1H NMR spektrum diethylacetalu ButABAL, experiment (nahore) a predikce (dole)

Diethylacetal PropAC

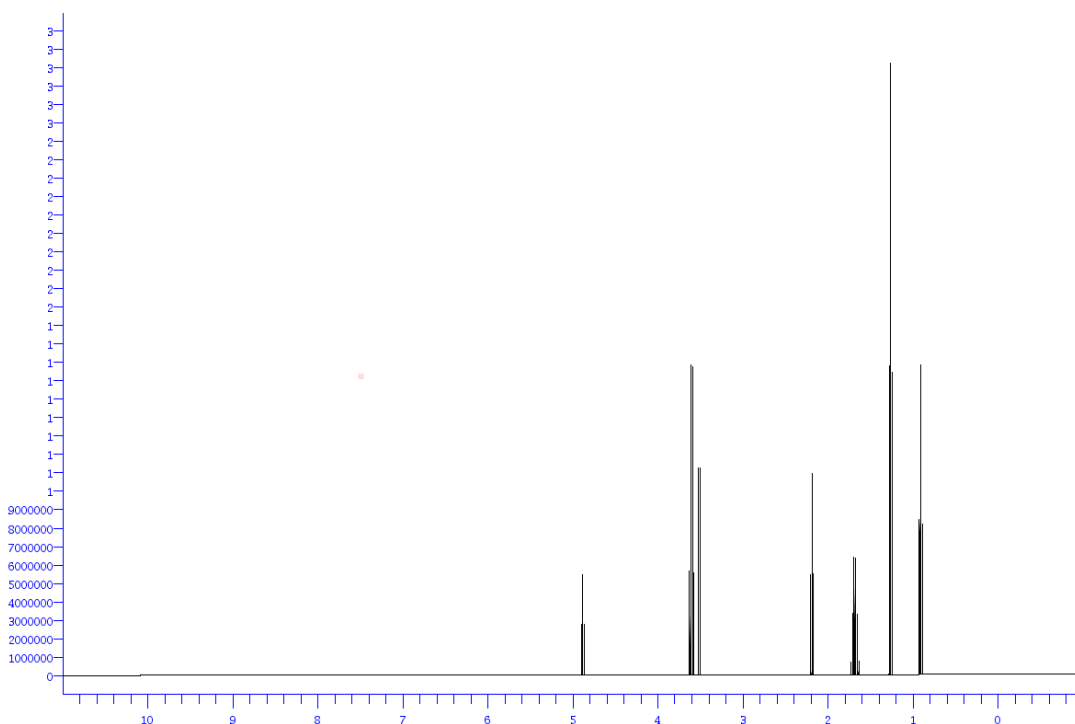
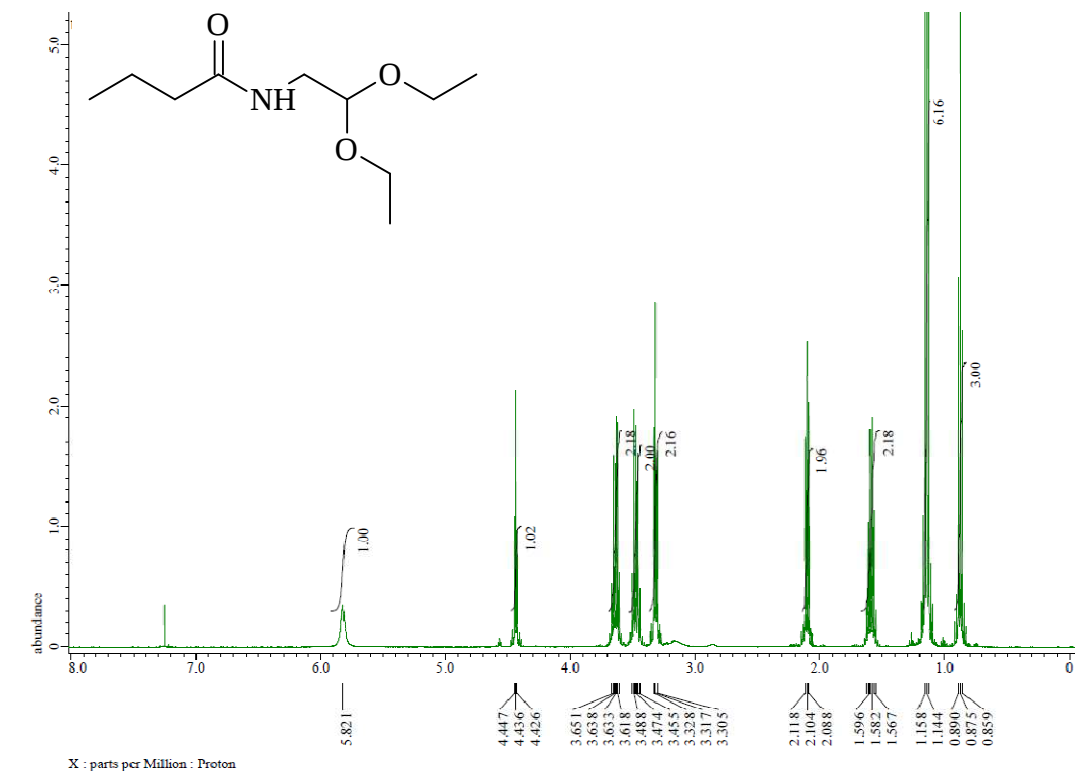
^1H (500 MHz, CDCl_3): 1.09 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.15 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H), 2.16 (q, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.32 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.46-3.51 (m, 2H), 3.61-3.67 (m, 2H), 4.44 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.81 (bs, 1H)



Obr. 26 ^1H NMR spektrum diethylacetalu PropACAL, experiment (nahore) a predikce (dole)

DiethylacetalButAC

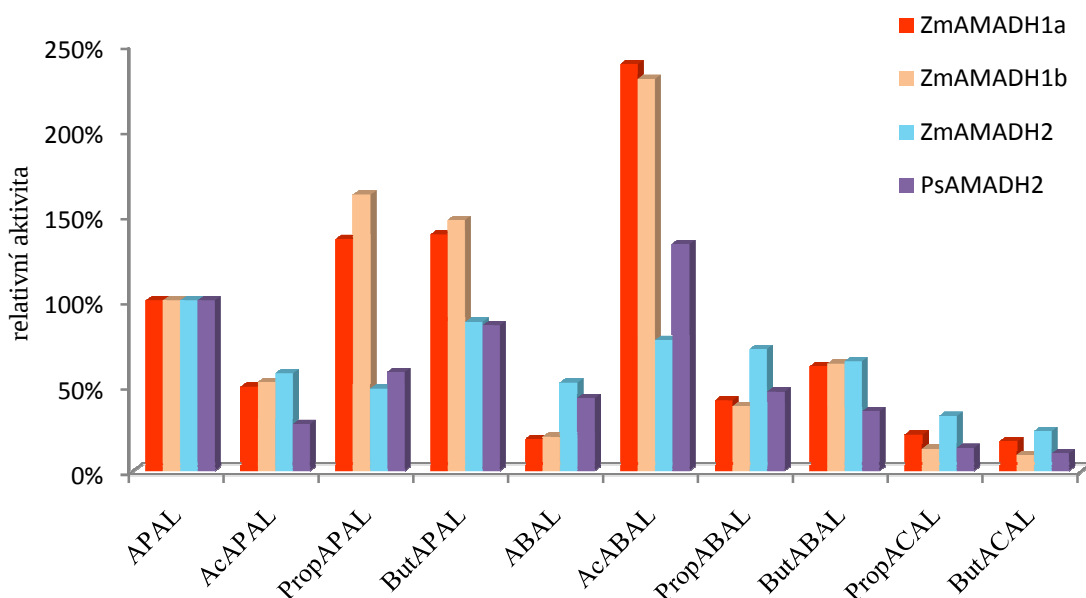
^1H (500 MHz, CDCl_3): 0.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 1.14 (t, $J = 7.5$ Hz, 6H), 1.58 (sex, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.10 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.32 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.44-3.50 (m, 2H), 3.60-3.66 (m, 2H), 4.43 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.82 (bs, 1H)



Obr. 27 ^1H NMR spektrum diethylacetaluButACAL, experiment (nahore) a predikce (dole)

5.2 Substrátová specifičnost

Pro všechny připravené sloučeniny bylo možné předpokládat enzymovou přeměnu působením rostlinných AMADH. Byly proto testovány jako substráty a měřena aktivita enzymů ZmAMADH1a, ZmAMADH1b, ZmAMADH2 a PsAMADH2. Pro srovnání byla aktivita změřena i s fyziologickými substráty APAL a ABAL (Obr. 28). Přehledněji jsou tato data také uvedena ve formě tabulky (Tab. 3).



Obr. 28 Graf srovnání relativní aktivity použitých enzymů při koncentraci substrátů 500 μ M vztažené k aktivitě pro APAL měřené za stejných podmínek

Tab. 3. Přehled relativních aktivit měřených substrátů pro všechny použité enzymy. Hodnoty vztaženy k relativní aktivitě při oxidaci APAL.

	APAL	AcAPAL	PropAPAL	ButAPAL	PropACAL
ZmAMADH1a	100%	49%	136%	139%	21%
ZmAMADH1b	100%	52%	162%	147%	13%
ZmAMADH2	100%	57%	48%	88%	32%
PsAMADH2	100%	27%	58%	85%	13%

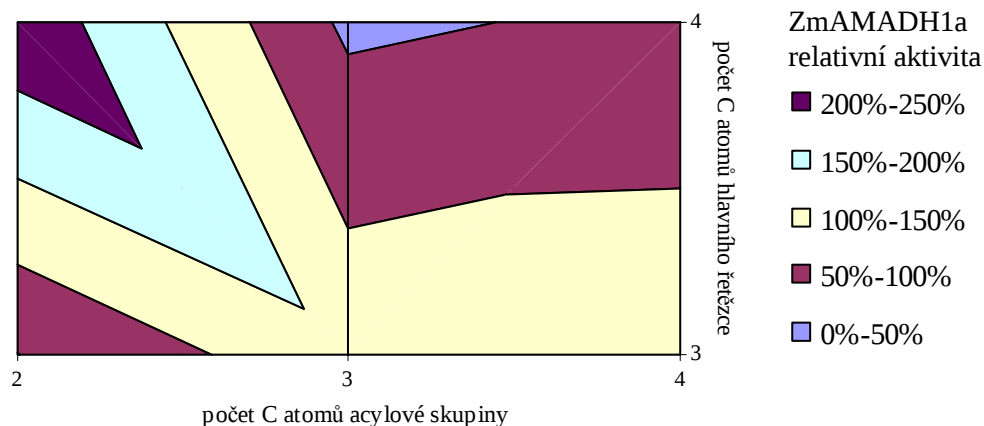
	ABAL	AcABAL	PropABAL	ButABAL	ButACAL
ZmAMADH1a	19%	239%	41%	61%	17%
ZmAMADH1b	20%	230%	38%	63%	9%
ZmAMADH2	52%	77%	71%	64%	23%
PsAMADH2	43%	133%	46%	35%	10%

Z tohoto srovnání vyplynulo, že všechny připravené látky byly použitými enzymy ve větší či menší míře dobře oxidovány. Nejrychleji oxidovaným substrátem byl AcABAL, který byl u isoform ZmAMADH1a a ZmAMADH1b oxidován více než dvojnásobnou relativní rychlostí oproti APAL (239 % pro ZmAMADH1a, 230 % pro ZmAMADH1b). Pro tento substrát

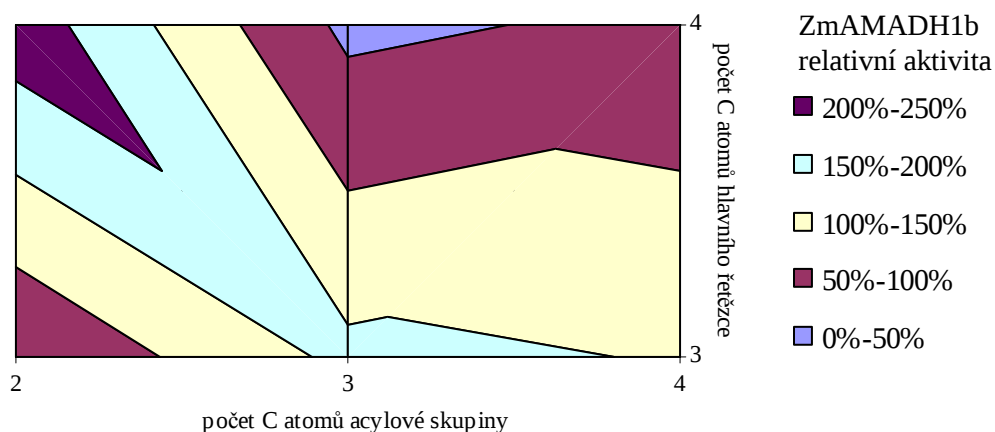
vykazovaly vysokou aktivitu i zbylé enzymy, u ZmAMADH2 byla aktivita vztažena k APAL 77 % u PsAMADH2 133 %. Naopak nejméně byly oxidovány deriváty dvouuhlíkatého aminoethanalu. Pro ButACAL byly zjištěny hodnoty 17, 9 a 23 % měřením se ZmAMADH 1a, 1b a 2 a 10 % u PsAMADH2.

Při porovnání chování jednotlivých enzymů s různými substráty je možné pozorovat velkou podobnost mezi kukuřičnými isoformami ZmAMADH1a a ZmAMADH1b. Zajímavé je srovnání hodnot relativních rychlostí přeměny naměřených se substráty AcABAL a PropABAL pro tyto enzymy s výsledky hrachové AMADH. Ve všech případech byl pozorován stejný trend zvýšení nebo snížení relativní aktivity s těmito látkami. Zjištěná podobnost chování těchto tří enzymů je pravděpodobně způsobena velkou homologií v aminokyselinové sekvenci jejich aktivního místa. Hodnoty relativní aktivity ZmAMADH2 pro většinu připravených látek se mezi sebou výrazně neodlišovaly. Tento enzym oxidoval velmi dobře jinými AMADH méně přeměňované substráty hlavně ABAL a PropABAL. Naopak, ve srovnání se zbylými kukuřičnými isoformami, hůře oxidoval látky, které pro ně byly dokonce lepšími substráty než APAL.

Podle délky hlavního řetězce a počtu uhlíků v *N*-acylové skupině se pro ZmAMADH1a a ZmAMADH1b jeví jako vhodnější substráty sloučeniny s tříuhlíkatým hlavním řetězcem. Rychlost přeměny u obou enzymů vzrůstá s rostoucím počtem uhlíkových atomů *N*-acylové skupiny derivátů APAL (Obr. 29, Obr. 30). Výjimku tvoří AcABAL, který byl oběma enzymy oxidován přesvědčivě nejrychleji ze všech použitých substrátů.

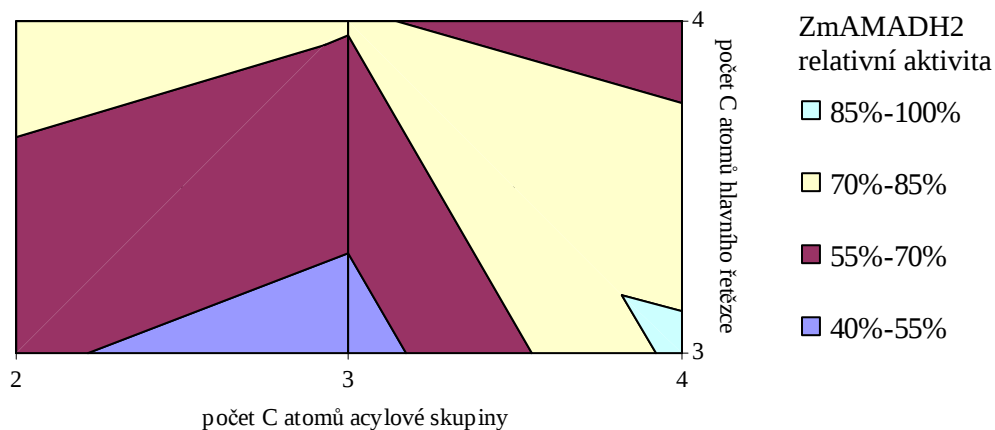


Obr. 29 Graf závislosti relativní rychlosti přeměny *N*-acylovaných substrátů oproti APAL pro ZmAMADH1a na délce jejich hlavního řetězce a počtu uhlíkových atomů acylové skupiny



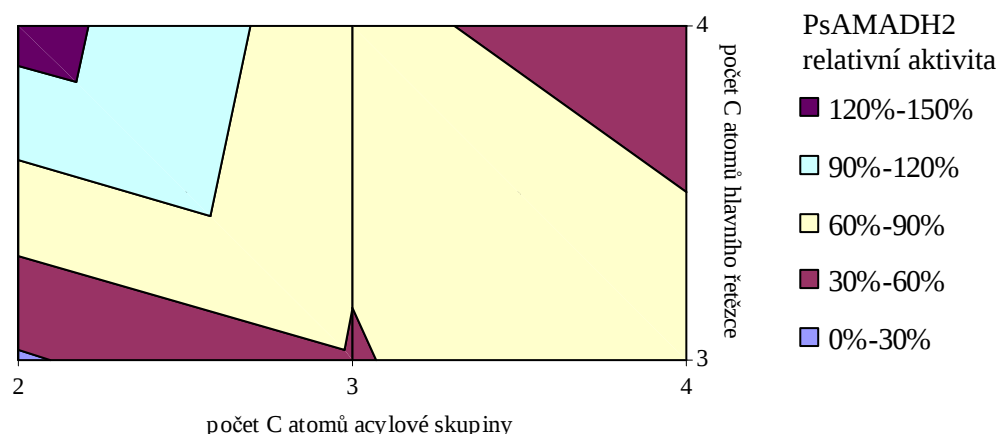
Obr. 30 Graf závislosti relativní rychlosti přeměny *N*-acylovaných substrátů oproti APAL pro ZmAMADH1b na délce jejich hlavního řetězce a počtu uhlíkových atomů acylové skupiny

Pro třetí isoformu kukuřičné AMADH byly dobrými substráty deriváty ABAL. U těchto substrátů s čtyřuhlíkatým hlavním řetězcem relativní rychlost oxidace mírně klesala s přibývajícím atomy *N*-acylové skupiny. Pro sloučeniny odvozené od APAL nebyl pozorován jednotný trend. Dobře byl ZmAMADH2 přeměňován AcAPAL vznikající fyziologicky jako produkt oxidace acetylovaných polyaminů. Největší relativní aktivita byla u tohoto enzymu naměřena pro nejdelší připravený derivát 3-aminopronalu ButAPAL (Obr. 31).



Obr. 31 Graf závislosti relativní rychlosti přeměny *N*-acylovaných substrátů oproti APAL pro ZmAMADH2 na délce jejich hlavního řetězce a počtu uhlíkových atomů acylové skupiny

Relativní rychlost přeměny substrátů hrachovou AMADH se u derivátů APAL zvyšovala s rostoucí délkou acylové skupiny, zatímco u látek odvozených od ABAL byla situace přesně opačná (Obr. 32). Nejlepším substrátem pro tento enzym byl stejně jako pro ZmAMADH1a ZmAMADH1b AcABAL.



Obr. 32 Graf závislosti relativní rychlosti přeměny *N*-acylovaných substrátů oproti APAL pro PsAMADH2 na délce jejich hlavního řetězce a počtu uhlíkových atomů acylové skupiny

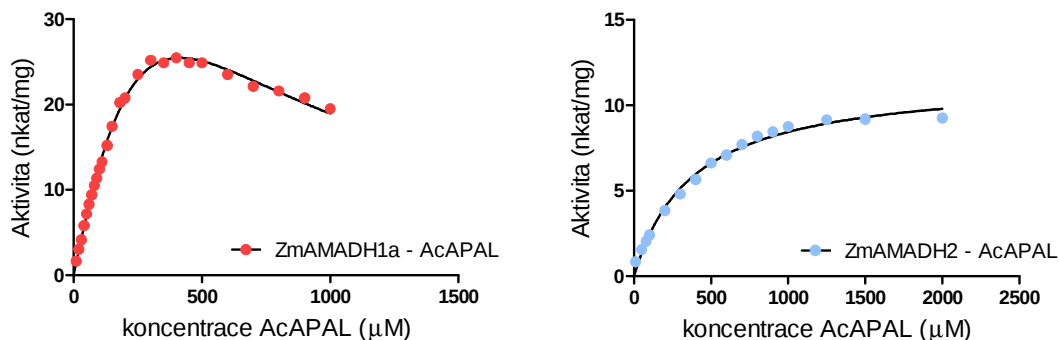
5.3 Stanovení kinetických parametrů

Pro stanovení Michaelisovy konstanty, limitní rychlosti, případně inhibiční konstanty (inhibice nadbytkem substrátu) byly vybrány enzymy ZmAMADH1a a ZmAMADH2. Jako substráty byly zvoleny připravené deriváty APAL u nichž byla pozorována odlišnost v relativní rychlosti oxidace oběma enzymy.

AcAPAL se u ZmAMADH2 choval jako normální substrát a byla u něj pozorována reakční závislost dle Michaelise a Mentenové. Při měření se ZmAMADH1a byla zjištěna inhibice substrátem, objevující se při překročení přibližně 450 μM koncentrace substrátu, kdy začala klesat aktivita enzymu (Obr 33., Tab. 4.). ZmAMADH1a k této sloučenině vykazoval vůbec nejmenší afinitu oproti substrátům s delšími řetězci PropAPAL a ButAPAL.

Tab. 4 Kinetické parametry AcAPAL se ZmAMADH1a a ZmAMADH2

AcAPAL	K_m (μM)	V_{lim} ($\text{nmol.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	K_{si} (μM)
ZmAMADH1a	1014 ± 182	150 ± 24	169 ± 33
ZmAMADH2	381 ± 31	$12 \pm 0,33$	-

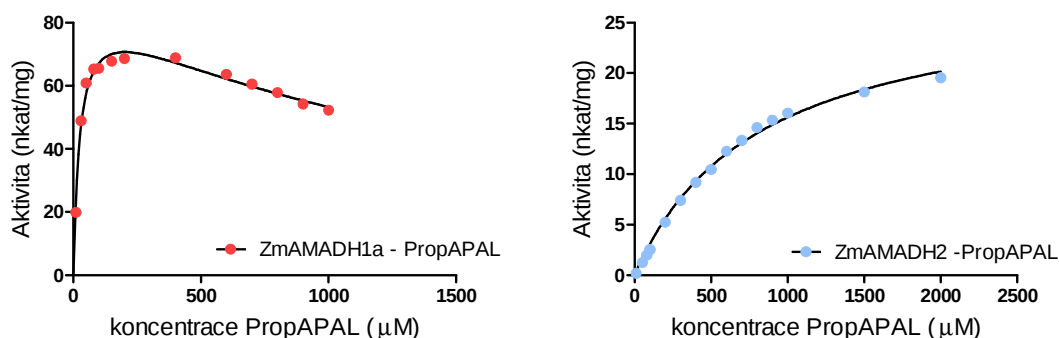


Obr. 33 Grafy závislosti aktivity enzymu na koncentraci substrátu AcAPAL. Vlevo pro ZmAMADH1a, vpravo pro ZmAMADH2.

U PropAPAL byly ve srovnání s AcAPAL a v případě ZmAMADH2 naměřena více než dvojnásobně menší afinita k enzymu, ale limitní rychlost byla asi 2,3 krát větší. Tento substrát byl tedy slaběji vázán do aktivního místa enzymu. Pro ZmAMADH1a naopak afinita u tohoto substrátu oproti AcAPAL významně vzrostla a to více než 35 krát. Limitní rychlost přitom neklesla ani o polovinu. Jako v předchozím případě byla opět zjištěna inhibice tohoto enzymu substrátem a to asi při 300 μM koncentraci (Tab. 5, Obr. 34).

Tab. 5 Kinetické parametry PropAPAL se ZmAMADH1a a ZmAMADH2

PropAPAL	K_m (μM)	V_{lim} (nmol.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	K_{si} (μM)
ZmAMADH1a	26 ± 3,5	89 ± 3,6	1544 ± 216
ZmAMADH2	819 ± 57	28 ± 1,0	-

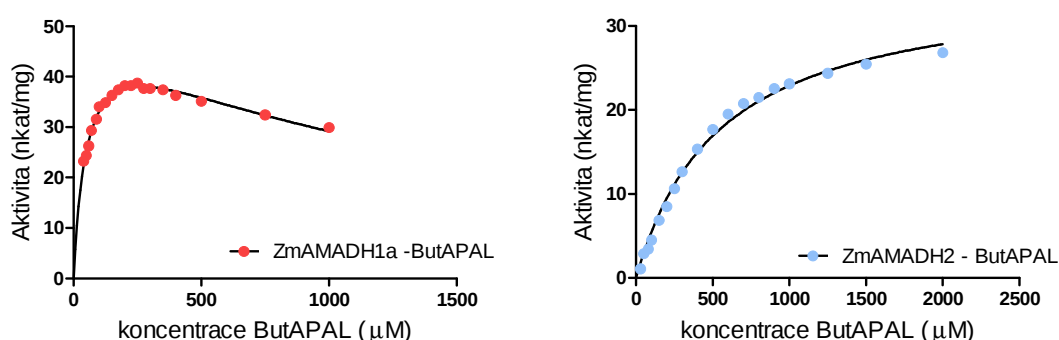


Obr. 34 Grafy závislosti aktivity enzymu na koncentraci substrátu PropAPAL. Vlevo pro ZmAMADH1a, vpravo pro ZmAMADH2.

Pro ButAPAL a ZmAMADH2 byl opět zjištěn reakční průběh dle Michaelise a Mentenové a i při 2000 μ M koncentraci substrátu byl pozorován zřetelný růst aktivity (Obr. 35). Ve srovnání s AcAPAL a PropAPAL byla u tohoto substrátu zjištěna nejvyšší limitní rychlost. V případě ZmAMADH1a byla naopak limitní rychlost nejnižší a dvojnásobně klesla afinita ve srovnání s PropAPAL.

Tab. 6 Kinetické parametry ButAPAL se ZmAMADH1a a ZmAMADH2

ButAPAL	K_m (μ M)	V_{lim} (nmol.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	K_{si} (μ M)
ZmAMADH1a	56 $\pm$ 3,4	54 $\pm$ 1,3	1259 $\pm$ 102
ZmAMADH2	549 $\pm$ 39	35 $\pm$ 1	-



Obr. 35 Grafy závislosti aktivity enzymu na koncentraci substrátu ButAPAL. Vlevo pro ZmAMADH1a, vpravo pro ZmAMADH2.

Nejlepším substrátem ZmAMADH2 z měřené trojice připravených derivátů APAL byl dle naměřených hodnot ButAPAL, přičemž žádná ze studovaných látek nebyla tímto enzymem přeměňována rychleji než APAL. Relativní oxidační rychlost ButAPAL byla 88 % oproti APAL a při porovnání blízko dvojnásobku velikosti oxidace oproti PropAPal a AcAPAL. Podobné hodnoty byly získány i měřením a porovnáním kinetických parametrů těchto látek. Nejlepšími substráty z derivátů APAL pro ZmAMADH1 byly po porovnání reakční rychlostí PropAPAL i ButAPAL, které byly oxidovány 136 respektive 139 % relativní rychlosti oproti APAL. Rychlost oxidace přitom byla téměř trojnásobná k AcAPAL. Při měření kinetických parametrů byl však zjištěn rozdíl více než šestinásobný k ButAPAL a dvacetinásobný k PropAPAL (Tab. 7). Na těchto výsledcích má pravděpodobně vliv inhibice nadbytkem substrátu pozorovaná u tohoto enzymu.

Tab. 7 Porovnání relativních poměrů limitních rychlostí a Michaelisovy konstanty pro deriváty APAL. Relativní hodnoty poměrů V_{lim}/K_m APAL pro ZmAMADH1a a ZmAMADH2 byly 1,316 a 1,026. Data pro APAL byla experimentálně zjištěna a poskytnuta Janem Vilímem.

V_{lim}/K_m relativní	AcAPAL	PropAPAL	ButAPAL
ZmAMADH1a	0,109	3,338	0,711
ZmAMADH2	0,031	0,033	0,062

6 Závěr

Pomocí popsaných metod organické syntézy bylo připraveno osm látek, které byly testovány jako možné substráty AMADH z kukuřice a hrachu. Struktura všech připravených sloučenin byla následně ověřena NMR spektroskopii, získaná NMR spektra se shodovala s predikovanými. Všechny látky byly také shledány jako možné substráty AMADH. Pro některé byly naměřeny velmi neobvyklé hodnoty relativní rychlosti přeměny AMADH oproti běžným substrátům APAL a ABAL. Nejrychleji oproti APAL byl oxidován AcABAL 239 % enzymem ZmAMADH1a a deriváty APAL, PropAPAL 162 % a ButAPAL 147 % (obě hodnoty naměřeny oproti APAL s enzymem ZmAMADH1b). Dále byly pro substráty AcAPAL, PropAPAL a ButAPAL změřeny kinetické parametry u ZmAMADH1a a ZmAMADH2. U všech látek byla při měření se ZmAMADH1a pozorována inhibice substrátem a kromě K_m a V_{lim} byla získána i hodnota inhibiční konstanty K_{si} . Porovnáním poměrů K_m a V_{lim} při přeměně derivátů APAL byla potvrzena rozdílná substrátová specifita ZmAMADH1a a ZmAMADH2. V případě ZmAMADH1a byl zjištěn výrazný rozdíl v rychlosti oxidace AcAPAL oproti delším analogům APAL. Nejvyšší poměr podílu limitní rychlosti a Michaelisovy konstanty byl zjištěn pro PropAPAL, kdy relativní hodnota této veličiny (někdy označována jako katalytická účinnost enzymu) se ZmAMADH1a byla 3,338. Nejlepším substrátem z derivátů APAL pro ZmAMADH2 byl ButAPAL, který byl oxidován s katalytickou účinností 0,062 oproti APAL.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Andersson L. & Wolfenden R. (1982) A general method of α -aminoaldehyde synthesis using alcohol dehydrogenase, *Anal. Biochem.* **124**, 150-157
- Ando T. & Yamawaki J. (1979) Potassium fluoride on celite. A versatile reagent for C-, N-, O-, and S-alkylations, *Chem. Lett.* **85**, 45-46
- Aoyagi Y., Katano K., Suguna H., Primeau J., Chang L. H., Hecht S. M. (1982) Total synthesis of bleomycin, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 5537-5538
- Averill-Bates D. A., Chérif A., Agostinelli E., Tanel A., Fortier G. (2005) Anti-tumoral effect of native and immobilized bovine serum amine oxidase in a mouse melanoma model, *Biochem. Pharmacol.* **69**, 1693-1704
- Béven L., Adenier H., Kichenama R., Homand J., Redeker V., Le Caer J. P., Ladant D., Chopineau J. (2001) Ca^{2+} -myristoyl switch and membrane binding of chemically acylated neurocalcins, *Biochemistry* **40**, 8152-8160
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant. Sci.* **140**, 103-125
- Bouché N., Fait A., Bouchez D., Møller S. G., Fromm H. (2003) Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants, *Plant Biol.* **100**, 6843-6848
- Bradbury L. M., Gillies S. A., Brushett D. J., Waters D. L., Henry R. J. (2008) Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice, *Plant Mol. Biol.* **68**, 439-449
- Brauner F., Šebela M., Snégaroff J., Peč P., Meunier J.-C. (2003), Pee seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues, *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 1-10
- Casero R. A. & Pegg A. E. (1993) Spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase – the turning point in polyamine metabolism, *Faseb J.* **7**, 653-661
- Cona A, Rea G., Angellini R., Federico R., Tvaladoraki P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence, *Trends Plant Sci.* **11**, 80-88
- DeMar Jr J.C., Rundle D. R., Wensel T. G., Anderson R. E. (1999) Heterogeneous N-terminal acylation of retinal proteins, *Prog. Lipid Res.* **38**, 49-90
- Dess. D. B. & Martin J. C. (1983) Readily accessible 12-I-5¹oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones, *J. Org. Chem.* **48**, 4155-4156
- Ernestus R. I., Röhm G., Els T., Klekner Á., Paschen W., Klug N. (2001) Polyamine metabolism in brain tumours: diagnostic relevance of quantitative biochemistry, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **71**, 88-92
- Frömmel J., Soral M., Tylichová M., Kopečný D., Demo G., Wimmerová M., Šebela M. (2012) Plant aminoaldehyde dehydrogenases oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydes, *Amino Acids* **43**, 1189-1202

- Gabriel S. (1887) Über eine Darstellung primärer Amine aus den entsprechenden Halogenverbindungen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **20**, 2224
- Garner P. & Park J. M. (1986) The synthesis and configurational stability of differentially protected p-hydroxy- α -amino aldehydes, *J. Org. Chem.* **52**, 2361-2364
- Gosule, L. C. & J. A. Schellman. (1978) DNA condensation with polyamines I. Spectroscopic studies., *J. Mol. Biol.* **121**, 311-326
- Imamura Y., Kubota R., Wang Y., Asakawa S., Kudoh J., Mashima Y., Oguchi Y., Shimizu N. (1997) Human retina-specific amine oxidase (RAO): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping, *Genomics* **40**, 277-283
- In K. J., Lee S. M., Lee W. M., Kwak H. J., Lee H., Hong T. J., Chung Y., Choi Y., Jung K. J. (2007) Stereoselective synthesis of (E)- and (Z)-enol ethers from β -amino aldehydes, *Arch. Pharm. Res.* **30**, 695-700
- Ireland R. E. & Liu L. (1992) An improved procedure for the preparation of the Dess-Martin periodinane, *J. Org. Chem.* **58**, 2899
- Ivanova S., Botchkina G. I., Al-Abed Y., Meistrell M., Batliwalla F., Dubinsky J. M., Iadecola C., Wang H., Gregersen P. K., Eaton J. W., Tracey K. J. (1998) Cerebral ischemia enhances polyamine oxidation: identification of enzymatically formed 3-Aminopropanal as an endogenous mediator of neuronal and glial cell death, *J. Exp. Med.* **188**, 327-340
- Janes S. M., Mu D., Wemmer D., Smith A. J., Kaur S., Maltby D., Burlingame A. L., Klinman J. P. (1990) A new redox cofactor in eukaryotic enzymes: 6-hydroxydopa at the site of bovine serum amine oxidase, *Science* **248**, 981-987
- Kehrer J. P., Biswal S. S. (2000) The toxicological effects of acrolein, *Toxicol. Sci.* **57**, 6-15
- Kopečný D., Končítíková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Soral M., Šebela M., Moréra S. (2013) Plant ALDH10 family: identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate, *J. Biol. Chem.* **288**, 9491-9507
- Kopečný D., Tylichová M., Snegaroff J., Popelková H., Šebela M. (2011) Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of α -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases, *FEBS J.* **278**, 3130-3139
- Kusano T., Berberich T., Tateda C., Yakahashi Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival, *Planta* **228**, 367-381
- Kurys G., Shah P. C., Kikonyogo A., Reed D., Ambroziak W., Pietruszko R. (1993) Human aldehyde dehydrogenase. cDNA cloning and primary structure of the enzyme that catalyzes dehydrogenation of 4-aminobutyraldehyde, *Eur. J. Biochem.* **218**, 311-320
- Li W., Yuan X. M., Ivanova S., Tracey K. J., Eaton J. W., Brunk U. T. (2003) 3-Aminopropanal, formed during cerebral ischaemia, is a potent lysosomotropic neurotoxin, *Biochem. J.* **371**, 429-436
- Liu Ch., Ng J. S., Behling J. R., Yen Ch. H., Campbell A. L., Fuzail K. S., Yonan E. E., Mehrotra D. V. (1997) Development of a large-scale process for an HIV protease Inhibitor, *Org. Process Res. Dev.* **1**, 45-54
- Magyar K., Mészáros Z., Mátyus P. (2001) Semicarbazide-sensitive amine oxidase. Its physiological significance, *Pure Appl. Chem.* **73**, 1393-1400

- Mancuso, A. J., Huang, S. L., Swern, D. (1977) Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide "activated" by oxalyl chloride, *J. Org. Chem.* **43**, 2480–2482
- Mannich C. & Krösche W. (1912), Ueber ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin., *Arch. Pharm* **250**, 647–667
- McMurry J., (2007) Organická chemie, pp. 903-904, VUTIUM, Brno, ČR
- McNeil S. D., Nuccio M. L., Hanson A. D. (1999) Betaines and related osmoprotectants. Target for metabolic engineering of stress resistance., *Plant Physiol.* **120**, 945-949
- Morin N., Lizcano J. M., Fontana E., Marti L., Smih F., Rouet P., Prevot D., Zorzano A., Unzeta M., Carpené Ch. (2001) Semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates stimulate glucose transport and inhibit lipolysis in human adipocytes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 563-572
- Moschou P. N., Paschalidis K. A., Roubelakis-Angelakis A., Plant polyamine catabolism, *Plant Signal Behav* **12**, 1066-1066
- Müller A., Pöhlmann T., Seiferling B. (1996) Crosslinked tinted polymers, EP 0807268.
- Myers A. G., Kung D. W., Zhong B., Kung D. W., Movassaghi M., Lanman B. A., Kwon S. (2000) Synthesis of C-protected α -amino aldehydes of high enantiomeric excess from highly epimerizable N-protected α -amino aldehydes, *Org. Lett.* **21**, 3337-3340
- Myers A. G., Kung D. W., Zhong B., Movassaghi M., Kwon S. (1999) Preparation of chiral, C-protected α -amino aldehydes of high optical purity and their use as condensation components in a linear synthesis strategy, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8401-8402
- Nishimura K., Murozumi K., Shirahata A., Park M. H., Kashiwagi K., Igarashi K. (2005) Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation, *Biochem. J.* **385**, 779-785
- Pace V., Martínez F. Fernández M., Sinisterra J. V., Alcántara A. R. (2007) Effective monoallylation of anilines catalyzed by supported KF, *Org. Lett.* **9**, 2661-2664
- Peng H. F., Jackson V. (2000) *In vitro* studies on the maintenance of transcription-induced stress by histones and polyamines, *J. Biol. Chem.* **276**, 667-668
- Perrier J., Durand A., Giardina T., Puigserver A. (2005) Catabolism of intracellular N-terminal acetylated proteins: involvement of acylpeptide hydrolase and acylase, *Biochimie* **87**, 673-685
- Reetz M. T. & Lee W. K. (2001) New uses of amino acids as chiral building blocks in organic synthesis, *Org. Lett.* **3**, 3119-3120
- Rittle K. E., Homnick C. F., Ponticello G. S., Evans B. E. (1982) A synthesis of statine utilizing an oxidative route to chiral α -amino aldehydes, *J. Org. Chem.* **47**, 3016-3018
- Sheehan J. C. & Bolhofer W. A. (1950) An improved procedure for the condensation of potassium phthalimide with organic halides, *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 2786–2788
- Shelp B. J., Bown A. W., McLean M. D. (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid, *Trends Plant Sci.* **4**, 446-451

- Schwelberger H. G. (2010) Structural organization of mammalian copper-containing amine oxidase genes., *Inflamm. Res.* **59**, 223-225
- Sophos NA, Vasiliou V (2003) Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact* **143**, 5–22
- Stránská J., Šebela M., Tarkowski P., Řehulka P., Chmelík J., Popa I., Peč P. (2007) Inhibition of plant amine oxidases by a novel series of diamine derivatives, *Biochimie* **89**, 135-144
- Stevens J. F. & Maier C. S. (2008) Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease, *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 7-25
- 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 Sci.* **160**, 197-207
- Šebela M., Frébort I., Lemr K., Brauner F., Peč P. (2000a) A study on the reactions of plant copper amine oxidase with C3 and C4 aliphatic diamines. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**, 88-99
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000b) Characterization of homogenous plant aminoaldehyde dehydrogenase *Biochim. Biophys. Acta* **1480**, 329-341
- Takahashi T. & Kadehi J. I. (2010), Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses, *Ann. Bot.* **105**, 1-6
- 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 Physiol.* **141**, 1519-1532
- Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M. (2007) Aminoaldehyde dehydrogenases: has the time now come for new interesting discoveries?, *Curr. Topics Plant Biol.* **8**, 45-70
- Tylichová M., Briozzo P., Kopečný D., Ferrero J., Moréra S., Joly N., Snégaroff J., Šebela M. (2008) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction study of a recombinant plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum*., *Acta Cryst.* **64**, 88-90
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010) Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes., *J. Mol. Biol.* **396**, 870-882
- Uchida K., Kanematsu M., Morimitsu Y., Osawa T., Noguchi N., Niki E. (1998) Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction, formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins, *J. Biol. Chem.* **273**, 16058-16066
- Vaz F. M., Fouchier S. W., Ofman R., Sommer M., Wanders R. J. A. (2000) Molecular and biochemical characterization of rat γ -trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis, *J. Biol. Chem.* **276**, 7390-7394

White H. W., Gunyuzlu P. L., Toyn J. H. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* is capable of *de novo* pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of β -alanine production from spermine, *J. Biol. Chem.* **276**, 10794-10800

Wood P. L., Khan A. M., Moskal J. R., (2006) The concept of “aldehyde load” in neurodegenerative mechanisms: cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line, *Brain Res.* **1145**, 150-156

Yamada H. & Yasunobu K. T. (1962) Monoamine Oxidase I. Purification, crystallization, and properties of plasma monoamine oxidase, *J. Biol. Chem.* **237**, 1511-1516

Zlatoidsky P. (1994) An easy and fast conversion of N^2 -[(*tert*-butoxy)carbonyl]-L-amino acids to corresponding amino-aldehydes., *Helv. Chim. Acta* **77**, 575–578

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALDH	aldehydhydrogenasa
AMADH	aminoaldehydhydrogenasa
AcABAL	4-acetamidobutyrál
ACAL	2-aminoethanal
AcAPAL	3-acetamidopropanal
ADC	arginindekarboxylasa (EC 4.1.1.19)
AIH	agmatiniminohydrolasa (EC 3.5.3.12)
APAL	3-aminopropanal
BADH	betainaldehydhydrogenasa
BAL	betainaldehyd
Bn	benzyl
Boc ₂ O	ditercbutylbikarbonát
ButACAL	2-butyrylamidoethanal
ButABAL	4-butyrylamidobutyrál
ButAPAL	3-butyrylamidopropanal
CAO	měď vázající aminoxidas (EC 1.4.3.21 a 1.4.3.22)
CPA	<i>N</i> -karbamoylputrescinhydrolasa (EC 3.5.1.53)
DAO	diaminoxidasa (EC 1.4.3.22)
DIBAL	diisobutylaluminium hydrid
DMSO	dimethylsulfoxid
ET ₃ N	triethylamin
Fmoc	fluorenylmethoxykarbonyl chlorid
FMS1	polyaminoxidasa FMS1 (EC 1.5.3.17)
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GABA-T	transaminasa γ -aminomáselné kyseliny (EC 2.6.1.19)

GAD	glutamátkarboxylasa (EC 4.1.1.15)
GBAL	guanidinobutyraldehyd
[Me ₂ C(OMe) ₂]	2,2-bismethoxypropan
MsCl	methylsulfonyl chlorid
ODC	ornithindekarboxylasa (EC 4.1.1.17)
PAO	polyaminoxidasy (EC 1.5.3.13, 1.5.3.14 a 1.5.3.17)
PropABAL	4-propionylamidobutyral
PropACAL	2-propionylamidoethanal
PropAPAL	3-propionylamidopropanal
PsAMADH	aminoaldehyddehydogenasa z hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>)
Put	butan-1,4-diamin (putrescin)
RVO	rotační vakuová odparka
SPD	<i>N</i> -(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin (spermidin)
SPDS	spermidinsyntasa (EC 2.5.1.16)
SPM	<i>N,N'</i> -bis-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin (spermin)
SPMS	sperminsyntasa (EC 2.5.1.22)
SSADH	semialdehydsukcinátdehydogenasa (EC 1.2.1.16)
SSAT	spermidin/spermin <i>N</i> ¹ -acetyltrasferasa (EC 2.3.1.57)
TMABAL	trimetylamoniumbutyraldehyd
TPQ	2,4,5-trihydroxyfenylalanin chinon (topachinon)
TsOH	p-toluensulfonová kyselina
ZmAMADH	aminoaldehyddehydogenasa z kukuřice (<i>Zea Mays</i>)