

Téma rigorózní práce: ***Vliv pyridoxalisonikonoylhydrazonu na spektrální vlastnosti alaninaminotferasy***

Jméno studenta, studentky: ***Kamila Vančurová***

Jméno oponenta rigorózní práce: ***Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.***

## I. Posudek oponenta rigorózní práce

Předložená rigorózní práce Mgr. Kamily Vančurové je standardně koncipována a členěna. Po formální stránce je pečlivě a úhledně zpracována.

Teoretická část je věnována hlavně cirkulárnímu dichroismu. Autorka vysvětluje princip metody a podrobně popisuje přístroje, chromofory v proteinech i možnost využití spekter cirkulárního dichroismu při studiu konformací a interakcí proteinů. V teoretické části jsou také představeny aminotferasy, koenzym pyridoxalfosfát a chelátor železa pyridoxalisonikotinoylhydrazon (PIH). Teoretická část je velmi obsáhlá a k jejímu zpracování využila Mgr. Vančurová více než 90 literárních zdrojů.

Cílem experimentální práce bylo zjistit, zda PIH ovlivňuje spektrální vlastnosti alaninaminotferasy. V metodické části jsou popsány přípravy vzorků i vlastní měření absorpčních spekter a spekter cirkulárního dichroismu. Ve výsledkové části je uvedeno velké množství získaných spekter. V diskusi jsou výsledky shrnuty a hodnoceny, v menší míře i srovnávány s literaturou. Následuje kapitoly souhrn, závěr a abstrakt v anglickém jazyce.

Celkově předložená práce splňuje podmínky kladené na rigorózní práci a doporučuji ji k obhajobě.

Připomínky:

- zbytečné znovuuvedení obrázků v diskusi
- závěry by měly odpovídat cílům (jedním ze dvou cílů byla rešerše, v závěru mělo být uvedeno, že rešerše byla udělána a poznatky zpracovány do teoretické části)
- str. 7 DOPA je zkratka a píše se velkými písmeny
- zkratky v úvodu nejsou zavedeny standardním způsobem, v textu jsou střídavě používány pojmy ve zkratkách i v nezkrácené podobě
- nevhodné používání některých zvláštních výrazů (např. divoký protein, strukturální technika) a některých výrazů v angličtině, když se běžně používá český překlad
- str. 47 název podkapitoly neodpovídá obsahu (enzym jste nepřipravovala, pouze jste ho ředila)

Dotazy:

- str. 25 Jaký je mechanismus obnovy kvartérní struktury pomocí glutaraldehydu?
- str. 48 5% DMSO je relativně vysoká koncentrace. Nemůže ovlivnit vlastnosti ALT?
- Spektra 7 a 8 mi připadají dost odlišná, přesto píšete, že dialýza spektra neovlivnila. Prosím vysvětlit.
- Proč se enzym inkuboval se substrátem tak dlouho?
- Zjišťovala jste vy nebo někdo z kolegů inhibiční vliv PIHu na aktivitu ALT?

V Hradci Králové dne: 16.6.2008



Podpis oponenta rigorózní práce

## 7. SOUHRN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 10. ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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