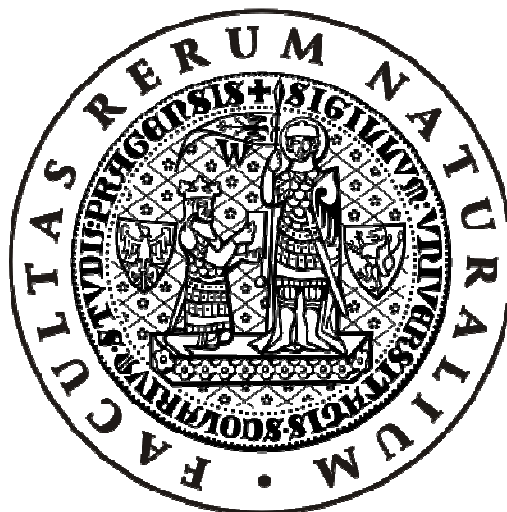


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



**Isolace a charakterisace katechol-1,2-dioxygenasy
kvasinky *Candida tropicalis***

Diplomová práce

**Isolation and characterization of
catechol-1,2-dioxygenase of *Candida tropicalis***

Bc. Jana Jechová

školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

konzultantka: RNDr. Lenka Vilímková

Praha 2011

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

.....

Bc. Jana Jechová

V Praze dne 7.2.2011

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové DrSc. za laskavou pomoc a trpělivost při teoretickém i praktickém zpracování tématu.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Lence Vilímkové za pomoc v laboratoři a cenné rady v průběhu práce a Bc. Zuzaně Koubkové za spolupráci v laboratoři.

Poděkování patří i Prof. Ing. Janu Pácovi DrSc. za to, že nám laskavě dovolil pracovat v jeho laboratoři, a Mgr. Tomáši Vaňkovi za ochotu s jakou nám při kultivaci kvasinek pomáhal.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě podporovala při vzniku této práce i po celou dobu studia.

Abstrakt

Kvasinka *Candida tropicalis* je mikroorganismus vykazující vysokou toleranci vůči fenolu a silnou schopnost jej degradovat. Tato kvasinka je schopná využít fenol jako zdroj uhlíku a energie, aniž by produkovala sekundární polutant. Z kvasinky *C. tropicalis* byla izolována katechol-1,2-dioxygenasa. K purifikaci bylo využito chromatografie na DEAE Sepharose a gelové permeační chromatografie na Sephadexu G-100. Uvedeným postupem byl získán homogenní enzym. Enzymová aktivita byla sledována pomocí HPLC (úbytek katecholu a nárůst *cis,cis*-mukonátu). Na základě měření aktivity při různých teplotách bylo určeno teplotní optimum, jeho hodnota je 30°C. Kinetické charakteristiky byly studovány při různém pH. Hodnota K_m a V_{max} byla 0,52 mM a 17,2 nM/min pro úbytek katecholu a 0,34 mM a 12,6 nM/min pro nárůst *cis,cis*-mukonové kyseliny při optimálním pH reakce, pH 7,6.

Abstract

Candida tropicalis yeast is a microorganism that possesses high tolerance for phenol and strong phenol degrading activity. This yeast is capable of utilizing phenol as the sole source of carbon and energy without formation of any secondary waste product. Catechol-1,2-dioxygenase was isolated from cytosolic fraction of this yeast by the procedure consisting of chromatography on DEAE-Sepharose and gel permeation chromatography on Sephadex G-100. The catechol-1,2-dioxygenase was purified to homogeneity. The enzyme activity was followed by HPLC (catechol consumption and/or *cis,cis*-muconic acid formation). The activity profiles at different temperatures showed temperature optimum of 30°C. Kinetic characterizations were studying in different values of pH. The values of K_m and V_{max} of 0,52 mM and 17,2 nM/min for consumption of catechol, respectively, and 0,34 mM and 12,6 nM/min for formation of *cis,cis*-muconic acid, respectively, were found at optimum pH of the reaction, pH 7,6. (In Czech)

Seznam použitých zkratek & symbolů:

A₂₈₀: absorbance při 280 nm

A₂₆₀: absorbance při 260 nm

BIS: N, N'-metylen-bis-akrylamid

BSA: hovězí sérový albumin

CoA: koenzym A

CYP: cytochrom P450

DEAE Sepharosa: diethylaminoethyl Sepharosa

EDTANa₂: dvojsodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

FAD: flavinadenindinukleotid

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Pressure Liquid Chromatography)

kDa: kilodalton (násobek jednotky molekulové hmotnosti)

K_m: Michaelisova konstanta

MFO: systém oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)

M_r: relativní molekulová hmotnost

M_w: molekulová hmotnost

NADH: redukovaný nikotinamidadenindinukleotid

NADP⁺: nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NADPH: redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát

PAPS: 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát

RPM: otáčky za minutu

SDS: dodecylsírán sodný (sodium dodecylsulphate)

SDS-PAGE: elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

T_f: Teplota tání

T_v: Teplota varu

TEMED: N, N, N', N'-tetramethylendiamin

TRIS: tris(hydroxymethyl)aminomethan

UDP: uridindifosfát

V_{max}: maximální rychlost enzymové reakce

v/v: objemová procenta

w/v: hmotnostní procenta

YNB: yeast nitrogen base

ϵ_{260} : extinkční koeficient při 260 nm

ρ^{25} : hustota při 25°C

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Bioremediace	9
1.1.1	Klasifikace bioremediačních metod.....	9
1.2	Fenol a fenolické látky	11
1.2.1	Obecná charakterizace fenolů	11
1.2.2	Průmyslové využití fenolů	11
1.2.3	Působení fenolů na lidský organismus.....	12
1.3	Metabolismus xenobiotik.....	13
1.4	Kvasinka <i>Candida tropicalis</i>	15
1.4.1	Potenciál <i>C. tropicalis</i> pro bioremediace.....	15
1.5	Enzymy podílející se na degradaci fenolických látek.....	17
1.5.1	NADPH-dependentní fenolhydroxylasa (EC 1.14.13.7)	18
1.5.2	Působení dioxygenas při biodegradaci fenolu a jeho derivátů	20
1.5.3	Katechol-1,2-dioxygenasa (EC 1.13.11.1).....	20
2	Cíl diplomové práce	24
3	Materiál a metody	25
3.1	Použité přístroje	27
3.2	Mikrobiální kmen	28
3.3	Kultivace kvasinek <i>Candida tropicalis</i>	29
3.4	Isolace cytosolární frakce <i>C. tropicalis</i>	30
3.4.1	Desintegrace buněk <i>C. tropicalis</i>	30
3.4.2	Homogenisace buněk <i>C. tropicalis</i>	30
3.4.3	Frakční centrifugace homogenátu buněk <i>C. tropicalis</i>	30
3.5	Isolace katechol-1,2-dioxygenasy a NADPH-dependentní fenolhydroxylasy z cytosolu <i>C. tropicalis</i>	31
3.5.1	Chromatografie cytosolárních proteinů <i>C. tropicalis</i> na sloupci DEAE Sepharosy	31
3.5.2	Rechromatografie katechol-1,2-dioxygenasy a NADPH-dependentní fenolhydroxylasy na sloupci DEAE Sepharosy	32
3.6	Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) jako metoda pro měření aktivity katechol-1,2-dioxygenasy	33

3.7	SDS-elektroforesa na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) vzorků získaných během izolace katechol-1,2-dioxygenasy.....	35
3.8	Gelová permeační chromatografie katechol-1,2-dioxygenasy na koloně Sephadexu G-100.....	37
3.9	Určení kinetických charakteristik katechol-1,2-dioxygenasy při různých hodnotách pH.....	38
3.10	Určení molárního extinkčního koeficientu kyseliny <i>cis,cis</i> -mukonové.....	39
3.11	Stanovení teplotního optima katechol-1,2-dioxygenasy.....	40
4	Výsledky.....	41
4.1	Izolace katechol-1,2-dioxygenasy z cytosolu <i>C. tropicalis</i>	41
4.1.1	Chromatografie cytosolárních proteinů <i>C. tropicalis</i> na sloupci DEAE Sepharosy	42
4.1.2	Rechromatografie katechol-1,2-dioxygenasy na sloupci DEAE Sepharosy ...	43
4.1.3	Gelová permeační chromatografie katechol-1,2-dioxygenasy na koloně Sephadexu G-100	44
4.2	Kinetika oxidace katecholu za vzniku <i>cis,cis</i> -mukonátu katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou	48
4.2.1	Kinetika oxidace katecholu na <i>cis, cis</i> -mukonát katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou při pH 7,6.....	48
4.2.2	Kinetika oxidace katecholu na <i>cis, cis</i> -mukonát katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou při pH 5,5; 6,5 a 8,6.....	50
4.3	Teplotní optimum katechol-1,2-dioxygenasy z <i>C. tropicalis</i>	57
5	Diskuse	58
6	Závěr.....	62
7	Přehled použité literatury	63
8	Přílohy diplomové práce.....	68

1 Úvod

Otázka znečištění životního prostředí je v poslední době stále více diskutována. Již v roce 1979 bylo v časopise *Environmental Science and Technology* publikováno 129 hlavních polutantů prostředí pocházejících z činnosti člověka. Jednu z těchto skupin tvoří fenoly [1]. Jejich největšími producenty jsou petrochemický průmysl, výroba syntetických vláken, výroba barviv. Uvolňovány do prostředí jsou také při zpracování hnědého uhlí. Obsahují je též odpadní vody z koželužního, farmaceutického či textilního odvětví [2,3]. Jelikož tyto látky (a samozřejmě mnoho jiných) představují velkou zátěž pro řadu organismů (většina látek je toxická či karcinogenní), bylo nutné najít vhodné cesty k jejich odstranění.

Dnes využívané fyzikální a chemické metody jako jsou např. adsorpce na různé matrice, chemická oxidace či extrakce rozpouštědlem, mají své nevýhody. Jsou ekonomicky náročné, probíhají v řadě kroků a během degradace dané sloučeniny může vznikat sloučenina stejně či více toxická [4,5]. I proto se jako jedna z nejvýhodnějších možností jeví cesta bioremediací, což jsou procesy vedoucí k přeměně toxické látky na látku netoxickou pomocí metabolismu různých organismů [6].

Z toho důvodu je důležité dobře poznat enzymový aparát různých mikroorganismů a hledat mezi nimi vhodné zástupce, jež by bylo možné využít pro čištění kontaminovaného prostředí. Tomuto problému se věnuje řada laboratoří po celém světě.

1.1 Bioremediace

Pojem bioremediace označuje proces, při němž je nějakým způsobem, zásahem zvenčí, umocněna biodegradace látky přítomné v prostředí. Biodegradace probíhají v prostředí zcela přirozeně. Řada organismů, převážně mikroorganismů je schopna využívat, popř. pouze degradovat, mnoho organických látek, přirozených i syntetických [7].

Aby biodegradace mohla proběhnout, musí existovat mikroorganismus s vhodným enzymovým aparátem, který umožní rozklad polutantu a organismus musí být v daném prostředí přítomný (v dostatečném množství). Také látka, jež má být biodegradována, musí mít vhodné vlastnosti – důležitá je její dostupnost pro mikroorganismus, velkou roli hraje například její rozpustnost ve vodě nebo to, zda je vázána na nějaký pevný materiál. Také se v některých případech musí jednat o látku, jež je schopná prostoupit přes membránu do příslušného mikroorganismu – pokud mikroorganismy používají intracelulární enzymy [7].

V ideálních případech dochází k mineralizaci organické látky - je tedy rozložena na anorganické sloučeniny uhlíku, dusíku, fosforu a síry. Zároveň mohou při biodegradaci vznikat látky pro prostředí škodlivé, toxičtější než látky původní. Takto vzniklé látky se často špatně identifikují a v prostředí dlouhodobě perzistují. Bioremediace, tedy cílená biodegradace, se těmito nežádoucími aspekty snaží vyhýbat. Produkty vznikající při těchto reakcích jsou dopředu známé a jejich vlastnosti sledovány před nasazením dané bioremediační metody. Nejčastěji jsou v bioremediačních technikách využívány mikroorganismy [7].

1.1.1 Klasifikace bioremediačních metod

Bioremediační metody lze provádět dvěma základními metodami. První z nich je **fertilizace**, která spočívá v umocnění již probíhajících biodegradčních dějů v daném prostředí pomocí dodání živin a jiných potřebných látek (např. induktorů enzymů, růstových faktorů). Druhou je tzv. „**seeding**“, při které jsou do kontaminovaného prostředí dodávány vhodné mikroorganismy, jež jsou schopné polutant účinně degradovat. Využívané mikroorganismy jsou většinou izolovány z přirozeného prostředí, k využití geneticky modifikovaných organismů zatím nebylo přistoupeno vzhledem k možnosti

druhotné kontaminace. Zároveň s degradátorem mohou být do prostředí přidány i růstové faktory a živiny, stejně jako u fertilizace [6,7].

Dle místa provedení dělíme bioremediace na procesy *in-situ* a *ex-situ*. Bioremediace *in-situ* je prováděna přímo v místě kontaminace. Příprava takového procesu spočívá zejména v zjištění přítomnosti mikroorganismů, jež jsou schopné polutant biodegradovat. Následuje použití jedné z výše uvedených metod (fertilizace či „seeding“). *Ex-situ* metody spočívají ve vytěžení kontaminovaného materiálu a jeho zpracování v místě k tomu určeném. V takovém prostředí lze zajistit snadněji vhodné podmínky [6].

1.2 Fenol a fenolické látky

1.2.1 Obecná charakterizace fenolů

Fenoly patří mezi hydroxysloučeniny, mají hydroxyskupinu vázanou přímo na aromatickém kruhu [8]. Fenoly jsou stálé krystalické sloučeniny a až na výjimky jsou dobře rozpustné ve vodě. Dělíme je na jednosytné či vícesytné podle počtu hydroxylových skupin v molekule. Mezi jednotlivými molekulami fenolů v roztoku vzniká vodíková vazba, což zvyšuje jejich bod varu. Fenoly mají amfoterní charakter, v roztoku se tedy chovají jako kyseliny i jako zásady v závislosti na složení roztoku. [8].

V přírodě se fenoly podobně jako alkoholy vyskytují poměrně hojně, nejčastěji ve formě glykosidů, ale také v bílkovinách, steroidech či terpenoidech. Některé fenoly jsou součástí extraktů z jedovatých rostlin, jako je břečťan (rod *Toxicodendron*) [8].

Fenol (hydroxybenzen, C_6H_6O) se dříve nazýval kyselina karbolová. V čistém stavu se jedná o bezbarvou pevnou látku nasládlého zápachu. Fenol je dobře rozpustný ve vodě a organických rozpouštědlech, je hořlavý [8].

Důležité fyzikální vlastnosti fenolu [9]:

$$M_r = 94,114$$

$$T_f = 40,90^\circ C$$

$$T_v = 181,84^\circ C$$

$$\rho^{25} = 1,113 \frac{g}{cm^3}$$

1.2.2 Průmyslové využití fenolů

Fenol je v dnešní době důležitý pro řadu výrob. Jeho nitrací vzniká 2,4,6-trinitrofenol (kyselina pikrová), který je silnou kyselinou s explozivními vlastnostmi. Dále slouží jako výchozí sloučenina pro výrobu barviv (stejně tak 1-naftol a 2-naftol), pesticidů, některých vláken, syntetických pryskyřic a plastů [8].

Pentachlorfenol, získávaný chlorací fenolu je důležitý pro konzervaci dřeva. Kresoly se využívají k výrobě desinfekcí [8].

1.2.3 Působení fenolů na lidský organismus

Jelikož jsou fenoly obecně dobře vstřebatelné látky, znamenají pro lidský organismus velké nebezpečí. Při styku s pokožkou ji leptají a také dráždí sliznice [10]. Krátkodobá expozice nízké koncentraci fenolu způsobuje bolesti hlavy, pálení očí a dýchací obtíže [11]. Při akutní intoxikaci dochází k selhávání ledvin, poruchám činnosti srdce či napadení jater. Taková otrava se projeví silnými bolestmi v ústech a oblasti břicha. Chronické otravy fenolem jsou vzácné. Podobně se projevují i otravy kresoly [10,11].

Fenol je poměrně rychle (1 den až týden, podle prostředí) a dobře odbouráván, pokud je do prostředí uvolněn v malé jednorázové dávce. Pokud je ovšem do prostředí uvolňován po delší dobu či ve vyšších dávkách, trvá jeho odstranění podstatně déle [11]. K jeho kumulaci dochází v některých druzích ryb. Kresoly, jsou rychle odbourávány jen v případě, že jsou v prostředí přítomné vhodné mikroorganismy. V podzemních vodách přetrvávají poměrně dlouhou dobu. [11].

I další deriváty fenolů patří mezi látky hepatotoxické, nefrotoxické a neurotoxické [10]. Vícesytné fenoly jsou obvykle toxičtější.

1.3 *Metabolismus xenobiotik*

Xenobiotikum může do živočišného organismu vstoupit různými cestami, ale jeho další osud je vždy stejný. Dojde k uvolnění xenobiotika z látkové formy, ve které bylo přijato, k vstřebání do krevního (či lymfatického) řečiště a k jeho distribuci v organismu. V této chvíli je látka ve větší či menší míře biotransformována a následně vyloučena [12].

Změny, kterým podléhají prakticky všechna xenobiotika v živočišném organismu, mají vést k přeměně látky na netoxickou či méně toxickou, a k usnadnění jejího vyloučení [12]. Dochází ale i k přeměnám, při kterých vzniká látka toxickejší než původní látka, dochází tedy k aktivaci xenobiotika (např. prokarcinogeny). Důležitou vlastností všech xenobiotik je jejich polarita. Obecně lze říci, že hydrofobní látky jsou pro organismus toxickejší, jelikož snadno pronikají buněčnými membránami.

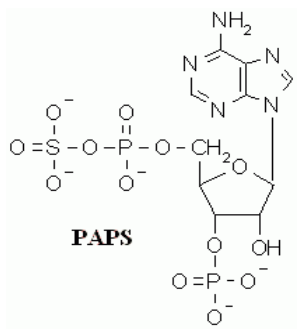
Biotransformace probíhá většinou ve dvou fázích, tzv. derivatizační a konjugační.

V derivatizační fázi dochází, ve většině případů, ke zvýšení polaritě cizorodé látky zavedením vhodné chemické skupiny, což umožňuje snadnější navázání na endogenní látky a následné vyloučení. Této fáze se často účastní enzymy, jež jsou inducibilní a k jejich produkci dochází až v přítomnosti xenobiotika. Patří mezi ně různé monooxygenasy a dioxygenasy (třída oxidoreduktas). Nejvíce jsou produkovány v jaterních buňkách (membrány endoplazmatického retikula, mitochondrie a cytoplazma) [12,13].

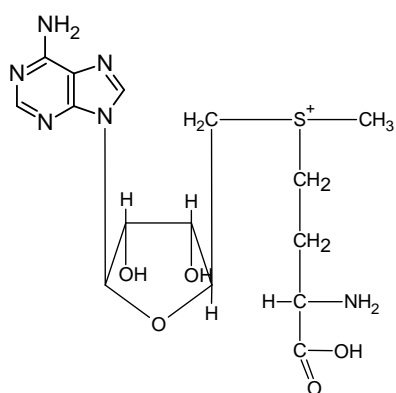
V konjugační fázi dochází ke spojení xenobiotika s endogenní látkou, jež ještě zvyšuje jeho polaritu. Při těchto reakcích je spotřebováána energie a endogenní látky jsou často přítomné v aktivované formě.

S fenolem vhodně konjugují 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS) (Obr. 1, str. 14), S-adenosylmethionin (Obr. 2, str. 14.) či UDP-glukuronát (Obr. 3, str. 14) [12].

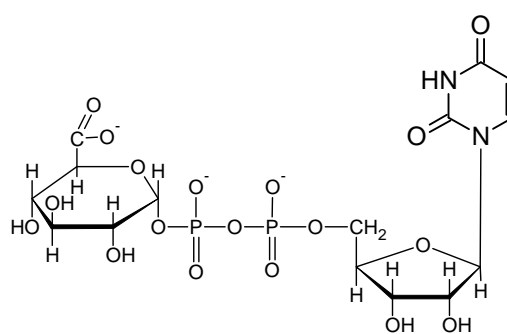
Konjugační fáze není prakticky využívána mikroorganismy, ty většinou xenobiotikum po derivatizační fázi zařadí do svého metabolismu [15]. Této schopnosti je využíváno při bioremediacích.



Obr. 1. 3'-fosfoadenosin-5'fosfosulfát [14]



Obr. 2: S-adenosylmethionin
(vytvoreno v programu ACD/Chemsketch)



Obr. 3: UDP-glukuronát
(vytvoreno v programu ACD/Chemsketch)

1.4 Kvasinka *Candida tropicalis*

V literatuře byla popsána řada mikroorganismů, jež jsou schopny využívat fenol nebo jeho deriváty jako zdroj uhlíku a energie. Z prokaryotických organismů lze jmenovat následující rody: *Pseudomonas* (např. *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. fluorescens*) [16,17,18], *Arthrobacter* (*A. citreus*) [19], *Acinetobacter* (*A. radioresistens*, *A. calcoaceticus*) [20] či *Bacillus* (např. *B. Stearothermophilus*) [21]. Zástupce eukaryotických organismů najdeme například mezi různými rody kvasinek: *Candida* (*C. albicans*, *C. maltosa*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*) [22,23,24], *Cryptococcus* (např. *C. terreus*, *C. terricola*) [25,26] a také zástupce *Rhodotorula* (*R. creatinivora*, *R. ingeniosa*) [25].

Rod *Candida* zahrnuje okolo 200 druhů kvasinek. Jedná se o nepravé kvasinky, jelikož netvoří pohlavní spóry a množí se výhradně nepohlavně. Jsou běžnou mikroflórou na kůži, v ústech, v trávicím ústrojí a genitáliích [27,28,29].

C. tropicalis je aerobním mikroorganismem, jenž je schopný využívat různé sacharidy jako zdroj uhlíku a energie. Před sjednocením názvů bylo možné *C. tropicalis* najít pod názvy *C. nivea*, *C. enterica*, *Monillia candida* a dalšími. Dodnes je v kvasném průmyslu využíváno jejích dalších názvů *C. kefir* či *C. murmanica*. Využívá se pro svou nenáročnost a schopnost produkovat biomasu i z neobvyklých zdrojů. K použití těchto názvů vede zřejmě to, že se jedná o podmíněný patogen. Běžně tuto kvasinku nacházíme ve vodním prostředí a jako součást lidské mikroflóry. Při přemnožení za vhodných podmínek může způsobit velmi nepříjemné dermatomykózy [28,29].

U buněk *C. tropicalis* se setkáváme s různými tvary - jsou kulaté, elipsovité, protáhlé pokud tvoří články pseudomycelia. Setkáváme se i s tvorbou pravého mycelia [28,29].

1.4.1 Potenciál *C. tropicalis* pro bioremediace

Stále častěji jsou některé druhy *Candida*, mezi nimi i *C. tropicalis*, zkoumány vzhledem k různorodosti substrátů (mezi nimi i fenolu), jež jsou schopny využít jako zdroj energie a uhlíku.

Dle studované literatury je *C. tropicalis* schopna degradovat fenol až do koncentrace $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Vyšší koncentrace působí na růst této kvasinky inhibičně. Fyzikální podmínky, za nichž je schopna růst, se mění podle provedení pokusu. Při nižších koncentracích fenolu dobře snáší větší rozsah pH a teplot [30,31]. Dále jsou testovány

schopnosti této kvasinky utilisovat různé deriváty fenolu. Bylo prokázáno [30], že je schopna biodegradovat 4-chlorofenol, je pro ni však více toxický. Zároveň autoři této práce [30] dokázali, že nízké koncentrace fenolu, podporují biodegradaci 4-chlorofenolu, což je vysvětlováno tím, že kvasinka přednostně využije jako zdroje energie fenol. Tím umožní nárůst biomasy, která pak snáze odolává toxickým účinkům 4-chlorofenolu [30].

1.5 Enzymy podílející se na degradaci fenolických látek

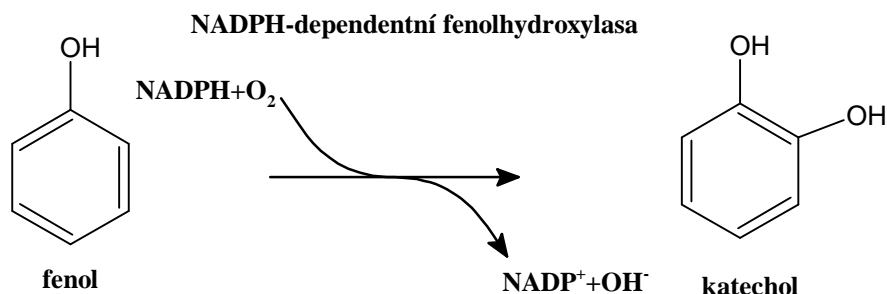
Největší skupinu enzymů, účastnících se biotransformace xenobiotik jako jsou fenoly, tvoří oxygenasy (enzymy patřící do třídy oxidoreduktas využívající molekulární kyslík jako oxidační činidlo). Patří mezi ně zejména monooxygenasy, jež zabudovávají do substrátu jeden atom kyslíku za vzniku vody z druhého atomu kyslíku, a dioxygenasy, jež oba atomy kyslíku zabudovávají do substrátu [32,33]. Důležitá je přítomnost určitých kofaktorů, velmi často jimi bývají flaviny a přechodné kovy [15,35].

C. tropicalis využívá k biodegradaci fenolu monooxygenasu: NADPH-dependentní fenolhydroxylasu (NADPH = nikotinamidadeninukleotidfosfát), na kterou navazuje katechol-1,2-dioxygenasa. Jedná se o cytosolární enzymy. Dále také využívá k biodegradaci xenobiotik (i látek pro organismus přirozených), tedy i fenolu, skupinu oxygenas se smíšenou funkcí (MFO=mixed function oxidases), působící často jako monooxygenasy [34]. Složky tohoto systému tvoří vedle cytochromu P450 (CYP), NADPH:CYP oxidoreduktasa, NADH:cytochrom b₅ oxidoreduktasa (která je složkou fakultativní a nemusí být přítomna) a membránový fosfolipid [15,35,36]. MFO systém je u eukaryotních organismů lokalizován v membráně endoplazmatického retikula [35]. Vzhledem k tomu, že biomasa *C. tropicalis*, která byla využita pro prokázání úlohy CYP v hydroxylaci fenolu [34], ztratila zřejmě díky době zmrazení a skladování velký podíl aktivity mikrosomální frakce, nebylo možné přispěvek MFO systému při biodegradaci fenolu zkoumat do všech detailů [34].

Řada mikroorganismů využívá k degradaci také peroxidasy [37].

1.5.1 NADPH-dependentní fenolhydroxylasa (EC 1.14.13.7)

NADPH-dependentní fenolhydroxylasa katalyzuje zavedení hydroxylové skupiny na aromatický kruh fenolu, tedy jeho přeměnu na katechol (Obr. 4):



Obr. 4. Hydroxylace fenolu na katechol za katalýzy fenolhydroxylasy (vytvořeno v programu ACD/ChemSketch)

Informace o NADPH-dependentní fenolhydroxylase pocházejí především ze studií prováděných na kvasince rodu *Trichosporon cutaneum*.

Základní popis struktury NADPH-dependentní fenolhydroxylasy

Typické žluté zbarvení tohoto enzymu je způsobeno přítomností prosthetické skupiny-flavinadenindinukleotidu (FAD) [38]. Žluté zbarvení je určeno vlnovou délkou absorpčního maxima [39]. Enzym izolovaný z této kvasinky má dimerní strukturu a jeho celková molekulová hmotnost je 152 kDa [40]. Bylo prokázáno [41], že fenolhydroxylasa izolovaná z *C. tropicalis* je homotetramer, jehož molekulová hmotnost je 240 kDa.

NADPH-dependentní fenolhydroxylasa má širokou substrátovou specifitu - mezi možné substráty patří vedle fenolu a již zmiňovaného 4-chlorofenolu, také monomethylované či monofluorované fenoly. [42,43].

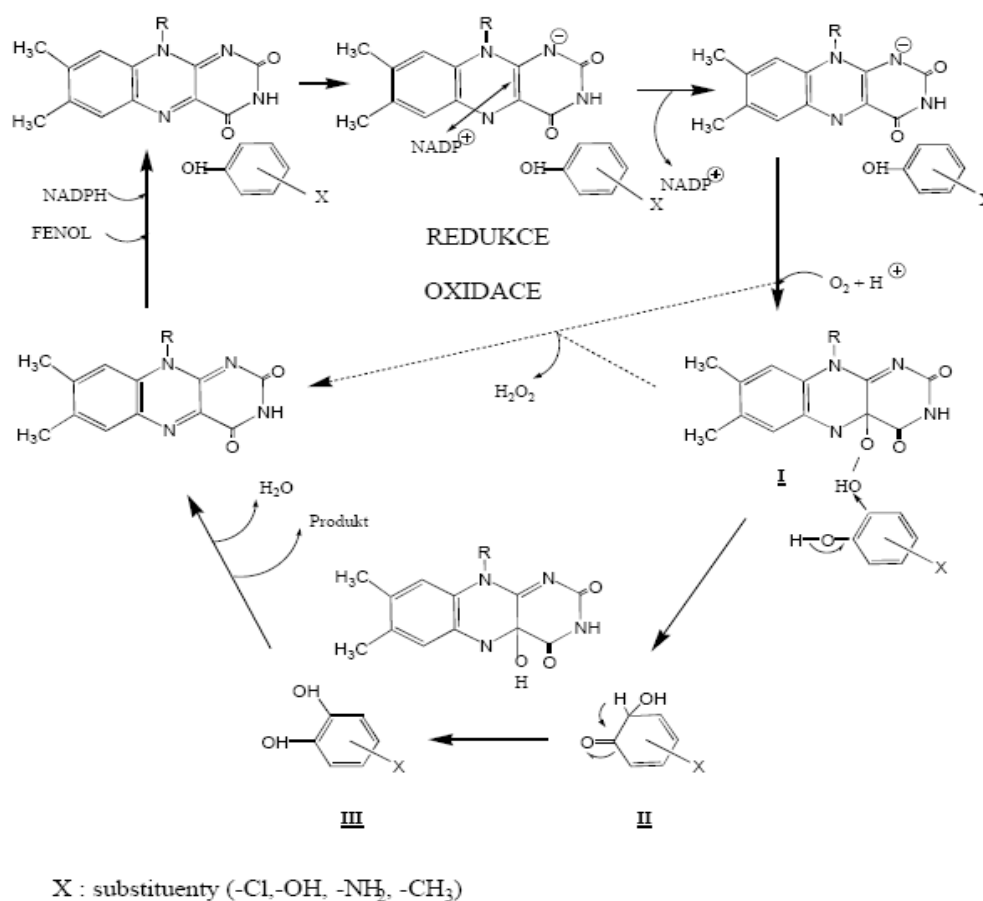
Mechanismus reakcí katalyzovaných fenolhydroxylasou

Oxidace fenolu je prováděna ve dvou krocích (obr. 5, str. 19). V redukční fázi, kdy je FAD v tzv. poloze „out“, tedy ven z proteinu, se na něj díky této skutečnosti váže NADPH, který prosthetickou skupinu redukuje. Konformační změnu FAD indukuje vazba substrátu [44,45].

Druhá (oxidační) fáze, kdy je FAD v poloze „in“, je rozdělena do několika kroků - redukovaný flavin vstupuje do reakce s kyslíkem a vzniká komplex I (Obr. 5), dochází k hydroxylaci substrátu (např. fenolu) za vzniku komplexu II. Vzniklý produkt je dále

přeměňován na komplex III (Obr. 5). Látkou vznikající na konci celého sledu reakcí je katechol, popř. hydroxyderivát vstupující sloučeniny a voda [45].

Alternativní cestou je vyloučení H_2O_2 (Obr. 5), ke které dochází, pokud je substrátem látka nesoucí na svém aromatickém kruhu substituent, který není donorem elektronů. V takovém případě dojde k rozpadu vzniklého flavinového peroxidu na peroxid vodíku a FAD [46].



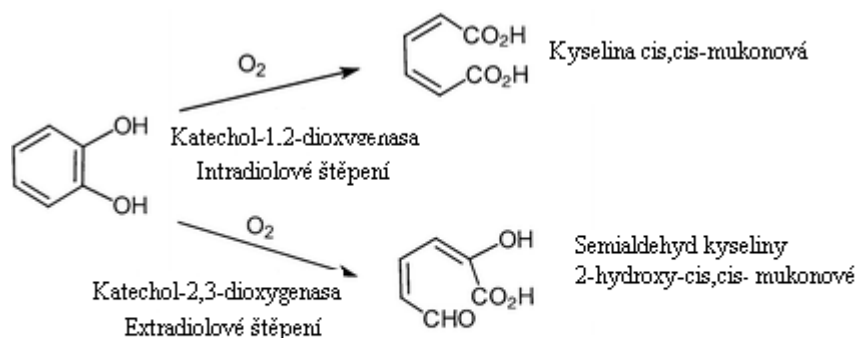
Obr. 5. Mechanismus reakcí katalyzovaných NADPH-dependentní fenolhydroxylasou [45]

1.5.2 Působení dioxygenas při biodegradaci fenolu a jeho derivátů

Při reakci katalyzované NADPH-dependentní fenolhydroxylasou vzniká z fenolu katechol. Ten je dále podroben další enzymové reakci. Tu katalyzuje jedna z dioxygenas.

Katechol-1,2-dioxygenasa (EC 1.13.11.1) štěpí aromatický kruh katecholu intradiolově (*ortho* dráha) za vzniku *cis,cis*-mukonátu (Obr. 6) [47]. Kyselina *cis,cis*-mukonová je dále zařazena do metabolismu organismu a je metabolisována až na acetyl-CoA a sukcinát [48].

Katechol-2,3-dioxygenasa (EC 1.13.11.2) katalyzuje štěpení aromatického kruhu katecholu extradiolově (*meta* dráha) za vzniku semialdehydu kyseliny 2-hydroxy-*cis,cis*-mukonové (Obr. 6), který je dále mikroorganismem metabolisován na kyselinu octovou a acetaldehyd [47,48]. Obě dioxygenasy vyžadují jako kofaktor nehemové železo [49]



Obr. 6. Intradiolové a extradiolové štěpení katecholu dioxygenasami (upraveno dle [50])

1.5.3 Katechol-1,2-dioxygenasa (EC 1.13.11.1)

Kapitola pojednávající o katechol-1,2-dioxygenase se věnuje charakteristikám tohoto enzymu, získaného z různých mikroorganismů, prokaryotních i eukaryotních. Způsob izolace enzymů byl v jednotlivých laboratořích různý.

Katechol-1,2-dioxygenasa izolovaná z bakterie *Acinetobacter radioresistens* S13 vykazuje pH optimum 8,5 pro volný enzym. Pokud je tento enzym imobilizován, posouvá se tato hodnota na pH 9,5. Stejně tak pro optimální teplotu byly zjištěny rozdílné hodnoty pro volný a imobilizovaný enzym. V prvním případě je optimální teplota reakce katalyzované enzymem 30°C a ve druhém 50°C. Bylo prokázáno, že katechol-1,2-dioxygenasa degraduje také 3-methylkatechol, 4-methylkatechol a 4-chlorokatechol. Imobilizovaný enzym vykazoval větší aktivitu při biodegradaci těchto látek [51].

Pro katechol-1,2-dioxygenasu izolovanou z *A. calcoaceticus* byly zjištěny následující údaje. Optimální pH pro reakci má mezi 7-9 a optimální teplotu mezi 35 a 37°C. Při teplotě 47°C ztrácí enzym 90% aktivity po 30 minutách inkubace. Molekulová hmotnost enzymu je 81-85 kDa, přičemž při provedení elektroforesy v přítomnosti dodecylsulfátu byla tato hmotnost 40 kDa, což je hmotnost jedné podjednotky enzymu. Také katechol-1,2-dioxygenasa z *A. calcoaceticus* přeměňuje kromě katecholu také 3-methylkatechol, 4-methylkatechol a 3-isopropylkatechol [52].

Podobně jako z výše uvedených mikroorganismů byla katechol-1,2-dioxygenasa izolována rovněž z gram negativní bakterie *Sphingomonas xenophaga* QYY a byly stanoveny její základní charakteristiky. Optimální pH reakce katalyzované tímto enzymem se pohybuje mezi 7,8-8,8. Optimální teplota byla autory stanovena v rozmezí 40-70°C. Molekulová hmotnost byla učena na základě elektroforesy (v prostředí dodecylsulfátu) – její hodnota byla 34 kDa [53].

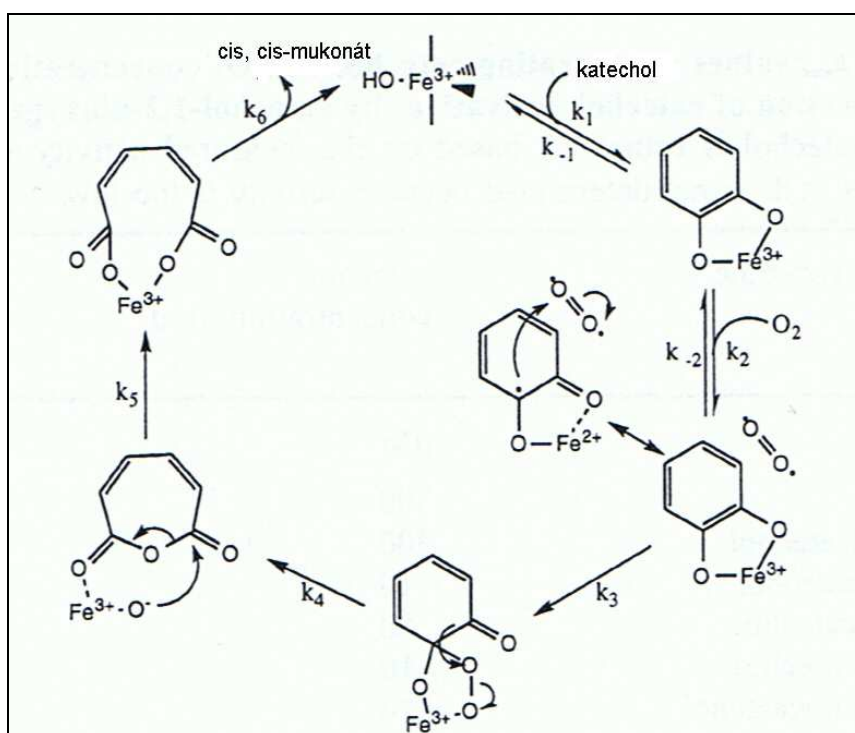
Z kvasinky *Candida albicans* TL3 byla izolována katechol-1,2-dioxygenasa, jejíž molekulová hmotnost byla 64 kDa, přičemž se jedná o homodimer, molekulová hmotnost podjednotek tedy je 32 kDa. Každá z těchto podjednotek obsahuje nehemové železo. Optimální teplota pro aktivitu enzymu je 25°C a optimální pH je 8. Značnou aktivitu vyznačuje kromě přeměny katecholu, také u přeměny 4-methylkatecholu, ale u ostatních derivátů katecholu nebyla aktivita prokázána [54]. Popsané charakteristiky jednotlivých enzymů shrnuje Tab. 1 (str. 22).

Tab. 1: Charakteristiky katechol-1,2-dioxygenas z různých mikroorganismů

katechol-1,2-dioxygenasa z:	pH optimum	teplotní optimum (°C)	molekulová hmotnost (kDa)	počet podjednotek	molekulová hmotnost podjednotky (kDa)	přeměňované substráty
<i>Acinetobacter radioresistens</i> S13[51]	8,5	30	-	-	-	3-methylkatechol 4-methylkatechol 4-chlorokatechol
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> [52]	7 až 9	35 až 37	81 až 85	2	40	3-methylkatechol 4-methylkatechol 3-isopropylkatechol
<i>Sphingomonas xenophaga</i> QYY [53]	7,8 až 8,8	40 až 70	-	-	34	-
<i>Candida albicans</i> TL3 [54]	8,0	25	64	2	32	4-methylkatechol

Mechanismus reakcí katalyzovaných katechol-1,2-dioxygenasou

V diplomové práci prezentovaný mechanismus účinku katechol-1,2-dioxygenasy (Obr. 7) byl publikován v práci popisující enzym z bakterie *Pseudomonas putida* [55]. Při jeho návrhu bylo též čerpáno z prací [56,57,58]. Jedná se zřejmě o mechanismus jímž probíhá intradiolové štěpení substrátu (katecholu) všemi katechol-1,2-dioxygenasami.



Obr. 7. Schéma reakčního mechanismu katechol-1,2-dioxygenasy. Převzato a upraveno dle [55].

Dle dostupné literatury je trojmocný ion železa (Fe^{3+}) v aktivním centru enzymu koordinován 5 ligandy – 2 histidylovými zbytky (na schématu neuvedeny), 2 zbytky tyrosinu (na schématu neuvedeny) a OH^- skupinou pocházející z rozpouštědla [56,57,58]. Spektroskopické studie prokázaly, že substrát je přímo koordinován na Fe^{3+} [59]. Při vazbě substrátu dochází k vyvázání OH^- skupiny a pravděpodobně i k vyvázání jednoho z tyrosylových zbytků. Při této vazbě je přenesen jeden elektron z železnatého iontu na substrát, čímž substrát získává semichinoidní charakter [60]. To pak umožní následný elektrofilní atak molekuly O_2 . Vazba molekuly O_2 způsobí přeskupení dvojných vazeb v systému, zakončené otevřením kruhu za vzniku *cis,cis*-mukonátu a uvolnění enzymu [56,57,58].

2 Cíl diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo rozšířit poznatky o katechol-1,2-dioxygenase kvasinky *Candida tropicalis*, enzymu účastnícího se druhého kroku biodegradace fenolu a jeho derivátů tímto mikroorganismem. Jednalo se o tyto dílčí cíle.

- 1) Isolovat enzym katechol-1,2-dioxygenasu z kvasinky *C. tropicalis* v čistotě a množství dostatečných pro charakterizaci tohoto enzymu.
- 2) Charakterizovat purifikovanou katechol-1,2-dioxygenasu
 - a) Určení kinetiky katechol-1,2-dioxygenasy pro oxidaci katecholu za vzniku *cis,cis*-mukonátu v prostředí o různém pH (5,5; 6,5; 7,6; 8,6)
 - b) Určení teplotního optima katechol-1,2-dioxygenasy

3 Materiál a metody

Lachema (Brno)

Blue Dextran

bromfenolová modř

dihydrogenfosforečnan sodný

ethanol

glukosa

glycerol

hydrogenfosforečnan sodný

hydroxid draselný

chlorid sodný

chymotrypsin

kyselina octová

methanol

ovalbumin

persíran amonný

ribonukleasa A

vínan sodnodraselný

Serva (Německo)

Comassie Brilliant Blue

Fluka,Buchs (Švýcarsko)

akrylamid

dodecylsíran sodný (SDS)

fenol

katechol

methanol

TEMED

Linde (Německo)

plynný a kapalný dusík

VEB Laborchemie (Německo)

kyselina chloristá

Sigma (USA)

hovězí sérový albumin (BSA)

NADPH

„Wide Range“ standardy proteinů pro SDS-PAGE

FAD

Pharmacia Bitech. (Švédsko)

DEAE Sepharose CL6B

Sephadex G-100

3.1 Použité přístroje

Centrifugy:

Janetzki K-24 (Německo), úhlový rotor 6 x 35 ml

Sanyo MicroCentaur MSE (Schiller Instruments, U.K.) úhlový rotor
12x 2 ml

Ultracentrifuga Optima™ LE-80K (Beckman Coulter, USA)
úhlový rotor Ti 45, 6 x 70 ml

Spektrofotometry:

Diod-array Hewlett Packard E8453 (Hewlett-Packard, Německo)

SPEKTROMOM 195 D (MOM Budapešť, Maďarsko)

Váhy:

laboratorní váhy EW600-2M (KERN, Německo)

analytické váhy PESA 40SM-200A (PESA, Švýcarsko)

Sestava HPLC:

pumpa HPG (Dionex-Softron, Německo)

autosampler ASI-100 (Dionex-Softron, Německo)

UV-VIS detektor LCD 2563 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

kolona Nucleosil 100-5 C18 4x250 mm (Merck, Německo)

software: Chromeleon verze 6. 01

Sestava pro elektroforesu: zdroj napětí Elektrophoresis Power Supply-EPS 301

(Amersham Biosciences, USA)

Další použitý materiál: automatické mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japonsko)

homogenizátor dle Pottera a Elvehjema

chromatografické kolony

C 2,6 x 40

C 2,6 x 22

C 1,6 x 30

C 1 x 20 (Pharmacia Biotech. Švédsko)

mikrostříkačka Hamilton (Hamilton Copany, USA)

peristaltická pumpa PP05 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

pH-metr model 370 (ATI Orion, USA)

sběrač frakcí BioLogic Biograf (BIO-RAD, USA)

sonikátor (Ultrasonic Copact cleaner, Teson1, Tesla, ČR)

vortex MS 1 Minishaker (Schiller Pharma Praha, ČR)

vortex MS 2 (IKA, USA)

hlubokomrazící box -80°C (Sanyo Ultra Low, Japonsko)

mrazící box -20°C

3.2 Mikrobiální kmen

Pro experimenty byl použit kmen kvasinek *Candida tropicalis* Ct2, který byl získán z půd znečištěných fenolem. Půda pocházela z Mostecka.

3.3 Kultivace kvasinek *Candida tropicalis*

Kmen *C. tropicalis* (kultura získaná z půd znečištěných fenolem viz. výše) byl kultivován v YNB (yeast nitrogen base) médiu, které jako jediný zdroj uhlíku a energie obsahovalo fenol ($250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Prvotní kultivace, provedená Ing. Alenou Kostečkovou, (VŠCHT, Praha), probíhala v laboratorních fermentorech (LF2 a B.Braun Bitech) o objemu 2 l. Následoval přechod k tzv. „scale-up“ procesu, provedeného Ing. Miroslavem Sobotkou, CSc. (MBÚ AV ČR), kdy byla kultivace prováděna ve velkých fermentorech a jako inokulum sloužila biomasa získaná v předchozím kroku. V posledním kroku byla kultivace prováděna v objemu 1000 litrů. Tento postup byl zvolen, aby bylo získáno dostatečné množství biomasy pro purifikaci enzymů. Po promytí byly buňky uskladněny při teplotách -20°C a -80°C .

3.4 Isolace cytosolární frakce *C. tropicalis*

(prováděna ve spolupráci s RNDr. Vilímkovou a Bc. Koubkovou)

3.4.1 Desintegrace buněk *C. tropicalis*

Každá izolace byla prováděna z 200-400 g zmražených buněk. Zprvu byly brány buňky uchovávané při -80°C, poslední izolace pak byly prováděny z buněk skladovaných při -20°C. Postupně byly buňky desintegrované v třecí misce za přítomnosti kapalného dusíku postupem popsaných v dřívějších pracích naší laboratoře [61].

3.4.2 Homogenisace buněk *C. tropicalis*

Desintegrované buňky byly homogenizovány v chladové místnosti (4-6°C) pomocí homogenisátoru dle Pottera a Elvahjema. Byly použity dva homogenisátory, nejprve méně „těsný“ homogenisátor a takto připravený homogenát byl pak podroben další proceduře pomocí „těsnějšího“ homogenisátoru. V obou případech byl pro homogenisaci buněk použit 50 mM Na-fosfátový pufr (pH = 7,6, cca 150 ml).

3.4.3 Frakční centrifugace homogenátu buněk *C. tropicalis*

Pro získání cytosolární frakce z kvasinky *C. tropicalis* byl připravený homogenát nejprve centrifugován na centrifuze K-24 (úhlový rotor 6 x 35 ml, 13 500 RPM, při 4°C) po dobu 20 minut. Získaný supernatant byl poté odstředován 65 min na ultracentrifuze OptimaTM LE-80K (úhlový rotor 6 x 70 ml, 35 000 RPM) při 105 000g. Takto získaný cytosol (150-200 ml) byl poté, co byly odebrány alikvoty (po 1 ml) pro stanovení aktivity enzymů před chromatografií, popř. pro elektroforesu v prostředí dodecylsírany sodného, zmražen pomocí kapalného dusíku a uložen do mrazicího boxu (-80°C) nebo ihned použit pro izolaci NADPH-dependentní fenolhydroxylasy nebo katechol-1,2-dioxygenasy.

3.5 Isolace katechol-1,2-dioxygenasy a NADPH-dependentní fenolhydroxylasy z cytosolu *C. tropicalis*

(prováděna ve spolupráci s RNDr. Vilímkovou a Bc. Koubkovou)

Pro purifikaci enzymů a sledování tohoto procesu bylo použito několik metod. Jednalo se o kapalinovou chromatografii na iontoměniči, elektroforesu v prostředí dodecylsíranu sodného (SDS-elektroforesu), měření absorbance a vysokotlakou kapalinovou chromatografii (HPLC).

3.5.1 Chromatografie cytosolárních proteinů *C. tropicalis* na sloupci DEAE Sepharosy

Princip metody:

DEAE Sepharosa je slabý anex. Na DEAE (diethylaminoethyl) se váží záporně nabitě ionty, po průchodu roztoku proteinů dochází k výměně anionů a některé proteiny jsou zachyceny na koloně. Separace proteinů na iontoměniči je tedy řízena elektrickými vlastnostmi látek. Uvolnění „zachycených“ látek je řízeno Guldberg-Waagovým zákonem: dostatečnou koncentrací iontů vytvářející slabší vazbu lze vytěsnit ionty pevněji vázané (použití gradientu iontové síly) [62].

Příprava nosiče:

DEAE Sepharosa (cca 200 ml) byla uchovávána v 20% ethanolu. V něm byla před použitím resuspendována, následně přelita do kádinky a 3 krát promyta 250 ml destilované vody. Následně byla rozmíchána v 1 M Na-fosfátovém pufru (pH = 7,6, 250 ml, cyklizační pufr). V něm byla uchovávána přes noc při teplotě 5°C. Cyklizační pufr byl odsát a Sepharosa dále promývána. Nejprve 3 krát 250 ml destilované vody a poté 3 krát 250 ml ekvilibračního pufru (50 mM Na-fosfátový pufr (pH = 7,6) obsahující 1 mM dvojsodnou sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTANa₂, [CHNa₂N(CH₂CO₂H)₂]₂) a 1 μM flavinadeninindinukleotid (FAD)). Následně byla DEAE Sepharosa resuspendována v malém množství tohoto pufru a aplikována na kolonu (C 2,6 x 22 cm Pharmacia Biotech.) za nulového průtoku. Po „usazení“ nosiče (cca 2 hodiny) byla kolona ekvilibrována 50 mM Na-fosfátovým pufrům (pH = 7,6), dokud se nevyrovnalo pH pufru nanášeného na kolonu a pufru z kolony vytékajícího.

Postup izolace katechol-1,2-dioxygenasy a NADPH-dependentní fenolhydroxylasy:

Na připravenou kolonu DEAE Sepharosy bylo pomocí peristaltické pumpy (PP05 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)) nanášeno 200 ml cytosolu (5 ml bylo odebráno na měření aktivity a elektroforesu). Zároveň se sběrem frakcí byla proměřována jejich absorbance (na SPEKTROMOMu 195 D, MOM Budapešť, Maďarsko) při 280 nm a objem. Kolona byla promývána 50 mM Na-fosfátovým pufrům (pH = 7,6) tak dlouho, než měřená absorbance klesla na nulovou hodnotu. Následně byly zachycené proteiny z kolony uvolněny lineárním gradientem NaCl v 50 mM Na-fosfátovém pufru (2 krát 500 ml, 0-0,3 M NaCl). NADPH-dependentní fenolhydroxylasa byla eluována při dosažení 0,12-0,18 M NaCl a katechol-1,2-dioxygenasa při 0,16 – 0,22 M NaCl. U frakcí obsahujících izolované enzymy bylo provedeno měření aktivity pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie a SDS-elektroforesa (pro potvrzení přítomnosti enzymů). Na základě získaných výsledků byly vybrány a spojeny frakce obsahující katechol-1,2-dioxygenasu a frakce obsahující NADPH-dependentní fenolhydroxylasu. Oba roztoky byly dialysovány přes noc proti 8 litrům dialyzačního pufru (50 mM Na-fosfátový, pH = 7,6, v přítomnosti EDTANa₂).

3.5.2 Rechromatografie katechol-1,2-dioxygenasy a NADPH-dependentní fenolhydroxylasy na sloupci DEAE Sepharosy

Princip metody i příprava nosiče odpovídaly skutečností uvedeným v kapitole Chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy. Rechromatografie probíhala paralelně na dvou kolonách. Na první byl pod atmosférickým tlakem nanášen roztok obsahující NADPH-dependentní fenolhydroxylasu a na druhou roztok obsahující katechol-1,2-dioxygenasu. Po poklesu absorbance při 280 nm byly obě kolony promývány lineárním gradientem soli NaCl (2 x 50 ml, 0-0,3 M NaCl) v Na-fosfátovém pufru (50 mM, pH = 7,6). Následně byla měřena aktivita katechol-1,2-dioxygenasy a NADPH-dependentní fenolhydroxylasy pomocí HPLC a provedena SDS-elektroforesa frakcí obsahující tyto enzymy. Po spojení frakcí obsahujících uvedené enzymy byla provedena dialýza proti 8 litrům destilované vody přes noc a následná lyofilisace.

3.6 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) jako metoda pro měření aktivity katechol-1,2-dioxygenasy

Princip metody:

Výhodou HPLC je rychlost a kvalita separace, na druhou stranu jsou však kladeny vyšší nároky na instrumentální zařízení metody.

Separace látek pomocí této metody probíhá díky rozdělování směsi látek mezi dvě fáze - mobilní (kapalnou) a pevnou (stacionární) podle jejich vlastností, látky jsou následně eluovány.

Pomocí této metody byla sledována aktivita katechol-1,2-dioxygenasy (a NADPH-dependentní fenolhydroxylasy – měřeno RNDr. Vilímkovou a Bc. Koubkovou). Metoda byla také využita při určování kinetických charakteristik enzymů (kap. 3.9.). V obou případech byl sledován úbytek substrátu (katecholu resp. fenolu) a přírůstek produktu (*cis,cis*-mukonátu resp. katecholu) v čase.

Měření aktivity katechol-1,2-dioxygenasy:

Analýza byla prováděna na koloně Nucleosil 100-5 C18 4 x 250mm (Merck, SRN). Detekce byla provedena za použití detektoru UV-VIS (LCD 2563, Laboratorní přístroje, Praha) při 275 nm. Obě kolony byly v průběhu měření temperovány na 35°C. Jako mobilní fáze byl používán roztok 40% methanolu v destilované vodě. Průtok mobilní fáze byl řízen pumpou P580 (dionex), pro měření byl nastaven průtok 0,5 ml.min⁻¹. Vzorky byly na kolonu aplikovány dávkovačem v objemu 20 µl.

Příprava vzorků se lišila podle toho, k čemu měření sloužilo. Reakční směs pro katechol-1,2-dioxygenasu vždy obsahovala: vzorek enzymu (cytosol, lyofilisát rozpuštěný v 50 mM Na-fosfátovém pufru (pH = 7,6)), Na-fosfátový pufr (pH a koncentrace se lišila dle prováděného experimentu) a 0 - 2 mM katechol. Reakce byla startována přidáním katecholu a ukončena přidáním 20 µl 0,6 M HClO₄. Inkubace (při 30°C) vzorků byla prováděna 0 - 20 minut dle prováděného experimentu.

Při měření aktivity katechol-1,2-dioxygenasy v průběhu izolace činil objem vzorku 80 µl. V celkovém objemu 100 µl byla koncentrace katecholu 1 mM. Inkubace probíhala v otevřených mikrozkušavkách na třepačkách při teplotě 30°C. Ukončení reakce bylo prováděno přidáním 20 µl 0,6 M HClO₄ v časech 0, 10 a 20 minut. Při měření časové závislosti úbytku katecholu a přírůstku *cis,cis*-mukonátu, při různých hodnotách pH

(upraveno přidáním 1 M Na-fosfátového pufru o příslušném pH), byla reakce zastavována v časech 0, 5, 10, 15 a 20 minut.

Vzorky pro měření kinetických konstant, při různém pH, byly připraveny tak, že k 80 μ l vzorku byl přidán katechol o odpovídající koncentraci (0 - 2 mM) a Na-fosfátový pufr (1 M, pH = 5,5; 6,5; 7,6; 8,6). Inkubace byla ukončena v časech 0, 5 a 7 minut.

Denaturované proteiny byly odstraněny centrifugací (Sanyo MicroCentaur MSE, úhlový rotor) při 13 000 RPM po dobu 3 minut.

Pro určení aktivity kvantifikací plochy píku bylo nejprve nutno provést kalibraci kolony. Ta byla provedena RNDr. Vilímkovou pomocí vzorků o známých koncentracích fenolu, katecholu a *cis,cis*-mukonátu [63].

3.7 SDS-elektroforesa na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) vzorků získaných během izolace katechol-1,2-dioxygenasy

Princip metody:

Výhodou nosiče pro SDS-PAGE (polyakrylamid) je jeho inertnost a možnost připravit gel o přesném složení. Stejně jako u jiných typů elektrofores dochází k dělení nabitých částic podle různých elektroforetických pohyblivostí. Přítomnost dodecylsírany sodného (SDS), který se váže na bílkoviny v poměru 1,4 g SDS na 1g bílkoviny, udílí bílkovinám jednotný náboj a tvar (tyčinky o konstantním průměru, různé délce). Reakce ovšem probíhá u některých bílkovin až po zahřátí na 60°C. Elektroforetické dělení pak probíhá pouze podle relativní molekulové hmotnosti bílkovin ve vzorku. Díky standardům a známé molekulové hmotnosti lze poměrně přesně určit relativní molekulové hmotnosti testovaných bílkovin [64].

V diplomové práci byla elektroforesa používána jako kontrolní metoda přítomnosti enzymů, které byly stanovovány.

Postup experimentu:

Ze vzorků získaných izolací byl odebrán 60 µl alikvot. K němu bylo pipetováno 30 µl vzorkového pufru (4 krát koncentrovaný). Takto připravené vzorky byly krátce povařeny, aby došlo k denaturaci bílkovin a reakci s SDS.

Složení pufrů a roztoků

Pufr A: 0,375 M TRIS/HCl, 0,1 % SDS (w/v), pH 8,8

Polymerační roztok A: 30 % akrylamid (w/v), 0,8 % BIS v pufru A (w/v)

Pufr B: 0,125 M TRIS/HCl, 0,1 % SDS (w/v), 0,0006 % bromfenolová modr (w/v), pH 6,8

Polymerační roztok B: 30 % akrylamid (w/v), 0,8 % BIS v pufru B (v/v)

Elektrodový pufr: 25 mM TRIS, 0,25 M glycin, 0,1 % SDS (w/v), pH 8,3

Vzorkový pufr: 0,063 M TRIS /HCl, 2 % SDS (w/v), 10 % glycerol (v/v),

5 % 2-merkptoethanol (v/v), 0,003 % bromfenolová modr (w/v), pH 6,8

Barvicí lázeň: 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 46 % ethanol (v/v), 9,2 % kyselina octová (v/v)

Odbarvací lázeň: 25 % ethanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Příprava gelů pro elektroforesu probíhala podle následující tabulky (Tab. 2).

Tab. 2.: Složení gelů pro SDS elektroforesu

<i>Dolní 10% separační gel</i>		<i>Horní 3% zaostřovací gel</i>	
složky gelu	množství	složky gelu	množství
polymerační roztok A	4 ml	polymerační roztok B	0,75 ml
pufr A	8 ml	pufr B	6,75 ml
TEMED	0,01 ml	TEMED	0,0075 ml
persíran amonný	1 mg	persíran amonný	1 mg

Mezi skla byl nalit 10% separační gel, převrstven destilovanou vodou a ponechán polymerovat po dobu 30 minut. Po této době byla voda slita a gel opatrně vysušen filtračním papírem. Následovalo převrstvení 3% velkopórovým „zaostřovacím“ gelem. Ihned po nalití gelu byl mezi skla do gelu vsazen „hřebínek“ pro vytvoření jamek na vzorky. Po 30 minutách byl hřeben opatrně vyjmut, skla umístěna do aparatury a byl přidán elektrodový pufr. Připravené, vychladlé vzorky, byly do jamek aplikovány pomocí mikrostříkačky Hamilton, objem vzorku byl 25 μ l. Elektroforesa byla prováděna při konstantním napětí 130 V po dobu cca 2 hodiny.

Po ukončení elektroforesy byl gel opatrně oddělen od skel a vložen do barvicí lázně na cca 45 minut. Následně byl přenesen do odbarvovací lázně a zde ponechán za mírného míchání přes noc. Druhý den byl vysušen v celofánové folii popř. nejprve „naskenován“.

3.8 Gelová permeační chromatografie katechol-1,2-dioxygenasy na koloně Sephadexu G-100

Metoda sloužila jako finální krok purifikace katechol-1,2-dioxygenasy.

Příprava nosiče:

Sephadex G-100 byl resuspendován v destilované vodě a ponechán bobtnat 2 dny při laboratorní teplotě, poté byl 2 - krát promyt 50 mM Na-fosfátovým pufrém (pH = 7,6) a cca 50 ml této suspenze bylo nalito na kolonu (1 x 60cm). Na koloně byl Sephadex G-100 dále promýván cca 100 ml pufru, průtok byl regulován hydrostatickým tlakem vodního sloupce.

Postup chromatografie katechol-1,2-dioxygenasy na koloně Sephadexu G-100

Nosič byl nejprve „kalibrován“ proteiny a látkami o známé molekulové hmotnosti: Blue Dextran (Mw cca 2000 kDa), který byl použit pro určení „mrtvého“ objemu kolony
BSA (Mw = 66,4 kDa)
ovalbumin (Mw = 43 kDa)
chymotrypsin (Mw = 21,6 kDa)
ribonukleasa A (Mw = 13,7 kDa)

Na kolonu byl nanesen 1 mg lyofilisátu obsahujícího katechol 1,2-dioxygenasu, který byl resuspendován ve 100 μ l 50 mM Na-fosfátového pufru (pH = 7,6). Po „zasáknutí“ vzorku byla kolona promývaná 50 mM Na-fosfátovým pufrém (pH = 7,6), který sloužil jako eluční činidlo. Byly jímány frakce o objemu 1 ml, v nich proměřena absorbance při 280 nm a ve vybraných frakcích stanovena enzymová aktivita pomocí HPLC.

Po použití byl gel promyt 1% NaOH a uchován v 20% ethanolu.

3.9 Určení kinetických charakteristik katechol-1,2-dioxygenasy při různých hodnotách pH

Kinetické charakteristiky katechol-1,2-dioxygenasy byly stanovovány pomocí měření závislosti oxidace katecholu na čase a měření závislosti oxidace katecholu na koncentraci substrátu (katecholu) při různých hodnotách pH. Tato měření byla prováděna pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie. První metodou bylo stanovováno v jakém časovém úseku probíhá reakce lineárně. Tuto skutečnost je nutno znát vzhledem k další části experimentu sledující kinetiku reakce katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou v závislosti na koncentraci substrátu.

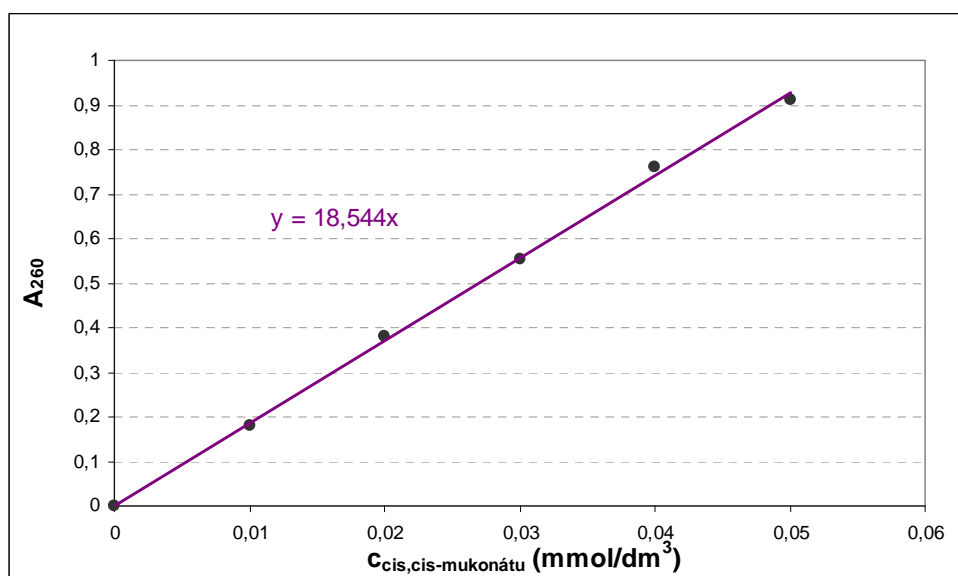
Měření bylo prováděno pomocí HPLC, reakční směs obsahovala vzorek katechol-1,2-dioxygenasy (isolován v srpnu 2009, 20 mg vzorku lyofilisátu bylo rozpuštěno v 2 ml 50 mM Na-fosfátového pufru, pH = 7,6), katechol o koncentraci 0 - 2 mM, a příslušné množství 1 M Na-fosfátového pufru o pH = 5,5; 6,5; 7,6; 8,6. Katechol (10 mM) byl připraven ze zásobního roztoku 100 mM katecholu ředěním 1 M Na-fosfátovým pufrem o příslušném pH. Inkubace byla prováděna v otevřených zkumavkách při teplotě 30°C. Reakce byla ukončena přidáním 20 µl roztoku 0,6 M HClO₄ v časech 0, 5, 10, 15 a 20 resp. 0, 5 a 7 minut. Další postup odpovídal postupu pro měření aktivity enzymu na HPLC (kap. 3.6.).

3.10 Určení molárního extinkčního koeficientu kyseliny *cis,cis*-mukonové

Metoda byla převzata z publikace [54]

Měření extinkčního koeficientu kyseliny *cis,cis*-mukonové:

Pro stanovení enzymové aktivity byla připravena reakční směs obsahující Na-fosfátový pufr (480 μ l; 0,5 M; pH = 7,6), purifikovanou katechol-1,2-dioxygenasu a roztok *cis,cis*-mukonátu o koncentraci 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 mmol/dm³. U těchto roztoků byla měřena absorbance při 260 nm (A_{260}) - absorpční maximum *cis,cis*-mukonátu. Na základě rovnice regrese, získané vynesemím získaných hodnot do grafu (Obr. 8), byla získána hodnota molárního extinkčního koeficientu pro *cis,cis* – mukonát a dané reakční podmínky.



Obr 8: Kalibrační křivka pro *cis,cis*-mukonát sloužící pro určení molárního extinkčního koeficientu. Byla sestavena na základě měření absorbance při 260 nm roztoků o různé koncentraci *cis,cis*-mukonátu.

Na základě regresní rovnice $y = 18,544x$ byl určen molární extinkční koeficient

$$\varepsilon_{260} = 18544 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (zaokrouhleno na } 18500 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$$

3.11 Stanovení teplotního optima katechol-1,2-dioxygenasy

Metoda byla převzata z publikace [54]

Princip metody:

Aktivita katechol 1,2-dioxygenasy byla sledována pomocí změn absorbance při 260 nm, kde absorbuje kromě jiných látek i kyselina *cis,cis* - mukonová (Obr. 8, str. 39), na spektrofotometru Hewlett-Packard (diod array). Tak byl měřen přírůstek *cis,cis*-mukonátu (produkt oxidace katecholu). Pro reakci bylo nutné použít purifikovaný enzym, jelikož řada jiných látek vykazuje stejné absorpční maximum.

Měření teplotního optima katechol-1,2-dioxygenasy:

Reakční směs byla připravena z 480 μl Na-fosfátového pufru (0,5 M, pH = 7,6); 10 μl katecholu (50 mM, výsledná koncentrace katecholu byla 1 mM) a takového množství enzymového preparátu (v tomto měření 0,016 mg), aby absorbance při 260 nm rostla lineárně alespoň po dobu 120 s. Jako „blank“ sloužil pufr s rozpuštěným katecholem. Reakce byla startována přidávkem enzymového preparátu. Přírůstek absorbance byl měřen po dobu 240 s. Měření bylo prováděno při různých teplotách (prostor pro kyvety byl temperován na 20; 30; 40; 50; 60° C). Výpočet aktivity katechol-1,2-dioxygenasy byl prováděn ze změny absorbance (ΔA_{260}) za 60 s, se znalostí hodnoty molárního extinkčního koeficientu kyseliny *cis,cis*-mukonové $\epsilon_{260} = 18500 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (kap. 3.10.).

4 Výsledky

4.1 Isolace katechol-1,2-dioxygenasy z cytosolu

C. tropicalis

Pro určení charakteristik enzymů *C. tropicalis* účastnících se degradace fenolu, tedy NADPH-dependentní fenolhydroxylasy a katechol-1,2 dioxygenasy, je nutné tyto enzymy izolovat. Tato problematika je v laboratoři, kde byla tato práce vypracovávána, řešena již několik let.

Isolace enzymů byla prováděna ve spolupráci s RNDr. Vilímkovou a Bc. Koubkovou, jejichž práce byly rovněž zaměřeny na studium NADPH-dependentní fenolhydroxylasy a katechol-1,2-dioxygenasy. Prvním isolačním krokem byla kapalinová chromatografie na iontoměniči – na sloupci DEAE Sepharosy (kap. 3.5.1). Enzymy „zachycené“ na nosiči byly uvolňovány pomocí gradientu NaCl, proto vždy po chromatografii následovala dialýza frakcí vykazujících enzymovou aktivitu. Pro získání čistšího preparátu a oddělení (separaci) obou enzymů byla chromatografie na sloupci DEAE-Sepharosy ještě jednou opakována, vždy s příslušnými frakcemi, vykazujícími nejvyšší aktivitu fenolhydroxylasy či katechol-1,2-dioxygenasy.

Aktivita enzymů v jednotlivých frakcích byla sledována pomocí HPLC, kde byl v případě NADPH-dependentní fenolhydroxylasy sledován úbytek substrátu enzymu, fenolu, a přírůstek produktu reakce, katecholu. V případě katechol-1,2-dioxygenasy pak byl měřen úbytek substrátu, katecholu, a přírůstek produktu, *cis,cis*-mukonátu. Zároveň byla přítomnost enzymů v jednotlivých frakcích ověřována pomocí SDS-elektroforesy.

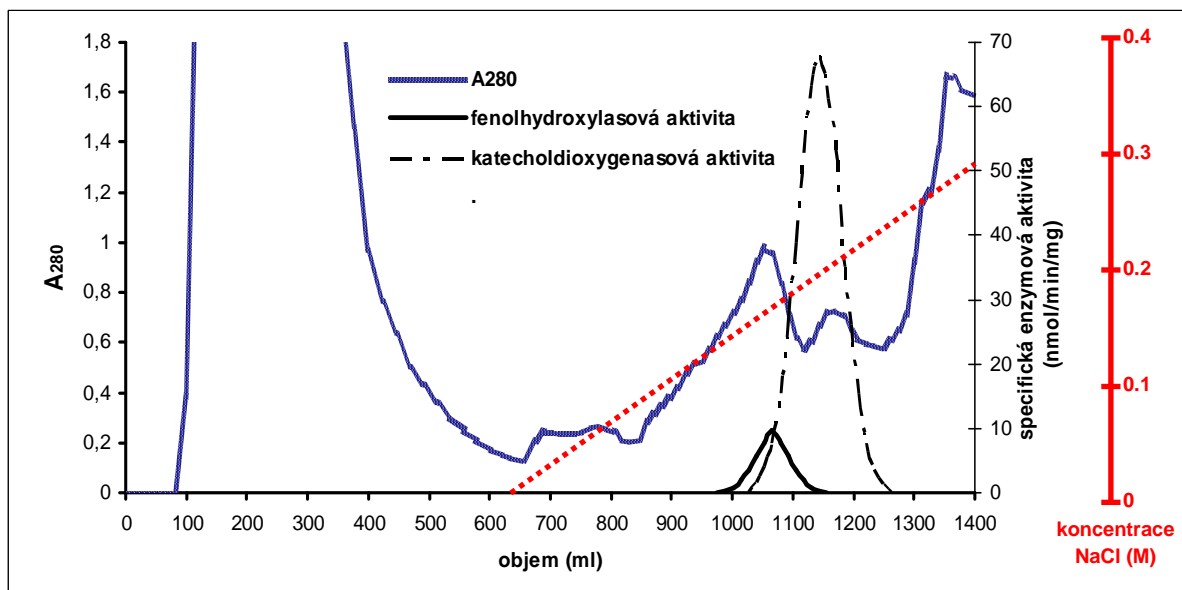
Výsledky experimentů prokázaly, že se pomocí jedné chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy nedaří oba enzymy zcela oddělit. Proto byla pro získání čisté katechol-1,2-dioxygenasy provedena další chromatografie na tomto nosiči (DEAE Sepharose) a dále též permeační gelová chromatografie na Sephadexu G-100.

4.1.1 Chromatografie cytosolárních proteinů *C. tropicalis* na sloupci DEAE Sepharosy

Na kolonu DEAE Sepharosy bylo pomocí peristaltické pumpy nanášeno 200 ml cytosolu izolovaného z *C. tropicalis* (viz. kap. 3.4.). Rychlost nanášení byla 1,2 ml/min. Během aplikace byly jímány eluované frakce, u kterých byl měřen objem a absorbance při 280 nm (A_{280}), pomocí které bylo sledováno množství eluovaných proteinů. Měření pokračovalo po aplikaci veškerého množství cytosolu, kolona byla dále promývána 50 mM Na-fosfátovým pufrům (pH = 7,6) až do okamžiku poklesu absorbance na nulovou hodnotu. To signalizovalo vymytí nezachycených (balastních) proteinů. Následovalo promývání kolony pufrům s lineárním gradientem 0-0,3 M NaCl v 50 mM Na-fosfátovém pufru o pH = 7,6 (2 x 500 ml). Tento gradient sloužil k eluci proteinů „zachycených“ (vázaných) na koloně.

Na základě zjištěných hodnot absorbance při 280 nm byly vybrány frakce, u nichž byla měřena aktivita katechol-1,2-dioxygenasy a fenolhydroxylasy a provedena SDS-elektroforesa. Po vyhodnocení těchto výsledků byly vybrány frakce, jež obsahují katechol-1,2-dioxygenasu a NADPH-dependentní fenolhydroxylasu, slity (zvláště pro jednotlivé enzymy), dialysovány proti 8 litrům 50 mM Na-fosfátového pufru (pH = 7,6) a následně dále purifikovány.

Průběh výše popsané chromatografie proteinů cytosolu izolovaného z buněk *C. tropicalis* na sloupci DEAE Sepharosy a zjištěné hodnoty aktivity pro oba enzymy znázorňuje Obr. 9 (str. 43). K eluci katechol-1,2-dioxygenasy ze sloupce DEAE Sepharosy dochází při dosažení 0.16 - 0.22 M koncentrace NaCl (Obr. 9).



Obr. 9: Chromatografie cytosolárních proteinů *C. tropicalis* na koloně DEAE Sepharosy. Experimentální podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.5. Upraveno dle [63].

Na základě uvedených výsledků (Obr. 9) a příslušných elektroforez byly spojeny frakce obsahující NADPH-dependentní fenolhydroxylasu a frakce obsahující katechol-1,2-dioxygenasu, a dialysovány pro další purifikační krok.

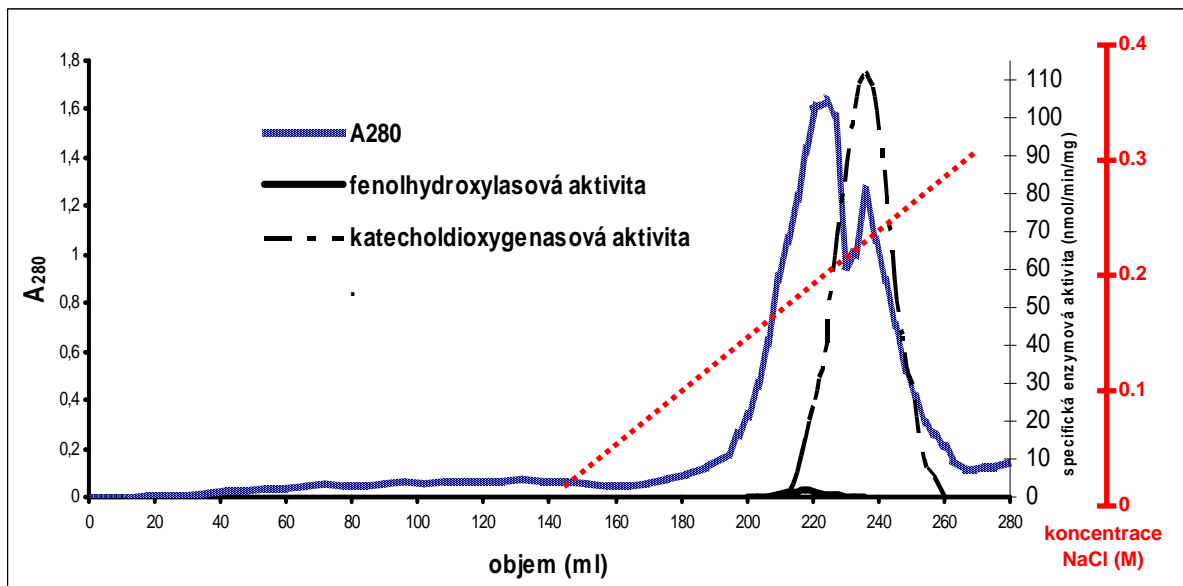
NADPH-dependentní fenolhydroxylasa byla dále purifikována a charakterizována Bc. Koubkovou jako součást její diplomové práce.

4.1.2 Rechromatografie katechol-1,2-dioxygenasy na sloupci DEAE

Sepharosy

Rechromatografie částečně purifikované katechol-1,2-dioxygenasy na sloupci DEAE Sepharosy byla provedena za podmínek odpovídajících chromatografii proteinů cytosolu (kap. 3.5.2.). Enzym byl z kolony opět eluován gradientem 0-0,3 M NaCl v 50 mM Na- fosfátového pufru o pH = 7,6 (2 x 50 ml). Na základě „elučního profilu“ byly vybrány frakce, u nichž byla zjištěna aktivita katechol-1,2-dioxygenasy a provedena kontrolní SDS-elektroforeza. Frakce obsahující katechol-1,2-dioxygenasu byly dialysovány přes noc proti 8 litrům destilované vody.

Průběh rechromatografie částečně purifikované katechol-1,2-dioxygenasy je znázorněn na Obr. 10. Ten je doplněn o hodnoty aktivity katechol-1,2-dioxygenasy a také fenolhydroxylasy, která nebyla původní chromatografií proteinů cytosolu zcela oddělena. Výsledky byly doplněny o analýsu proteinů pomocí SDS-elektroforesy.



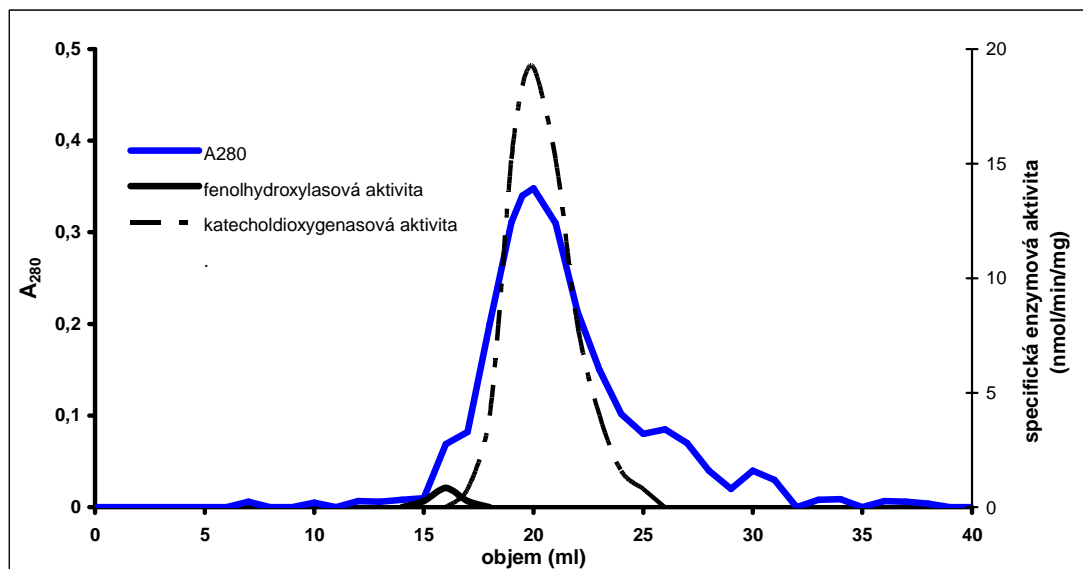
Obr 10: Rechromatografie katechol-1,2-dioxygenasy na koloně DEAE Sepharosy. Graf je doplněn o vynesení hodnot aktivity katechol-1,2-dioxygenasy a NADPH-dependentní fenolhydroxylasy. Reakční podmínky jsou uvedeny v kap. 3.5. Upraveno dle [63].

Frakce obsahující katechol-1,2-dioxygenasu byly spojeny a dialysovány proti destilované vodě a lyofilisovány.

4.1.3 Gelová permeační chromatografie katechol-1,2-dioxygenasy na koloně Sephadexu G-100

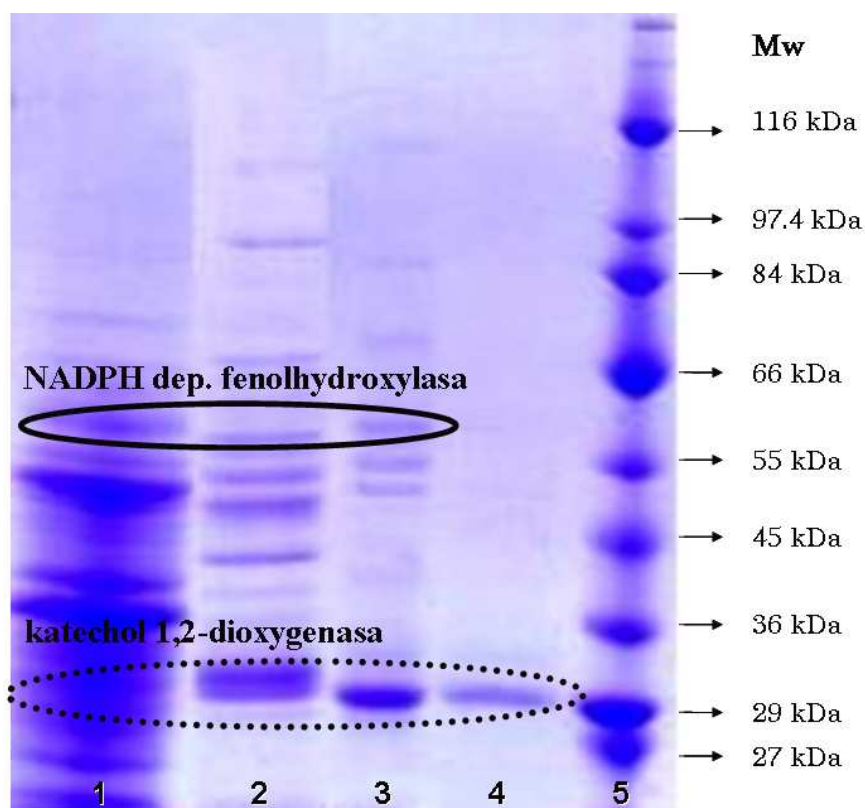
Použitím této metody byla RNDr. Vilímkovou určena molekulová hmotnost katechol-1,2-dioxygenasy, která má hodnotu $30 \text{ kDa} \pm 2 \text{ kDa}$ [63]. V této diplomové práci byla metoda používána jako závěrečný krok purifikace tohoto enzymu.

Na Obr. 11 je uveden chromatogram získaný měřením absorpance při 280 nm frakcí eluovaných z kolony Sephadexu G-100. Vzhledem k rozdílné velikosti molekul katechol-1,2-dioxygenasy a NADPH-dependentní fenolhydroxylasy, došlo k jejich oddělení.



Obr. 11: Gelová permeační chromatografie katechol-1,2-dioxygenasy na sloupci Sephadexu G-100. Experimentální podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.8. Upraveno dle [63].

Průběh jednotlivých isolačních kroků katechol-1,2-dioxygenasy a úroveň dosažené čistoty izolovaných preparátů ilustruje SDS-elektroforesa (Obr. 12, str. 46). Po chromatografiích provedených na sloupci DEAE Sepharosy jsou na elektroforese stále dobře patrné oblasti typické pro NADP-dependentní fenolhydroxylasu, což svědčí o neúplnosti purifikace katechol-1,2-dioxygenasy. Po gelové permeační chromatografii na Sephadexu G-100 fenolhydroxylasa ve vzorku purifikované katechol-1,2-dioxygenasy již nebyla přítomna. Shrnutí průběhu izolace katechol-1,2-dioxygenasy poskytuje Tab. 3 (str. 47).



Obr. 12: SDS elektroforesa ilustrující složení proteinových frakcí získaných jednotlivými purifikačními kroky: 1 - cytosol izolovaný z *C. tropicalis*, 2 - frakce obsahující catechol-1,2-dioxygenasu po chromatografii na DEAE Sepharose, 3 - frakce obsahující catechol-1,2-dioxygenasu po rechromatografii na DEAE Sepharose, 4 - purifikovaná catechol-1,2-dioxygenasa po chromatografii na Sephadexu G-100, 5 - marker molekulových hmotností (Wide Range, Sigma Aldrich) (Upraveno dle [63])

Tab. 3: Průběh izolace a purifikace katechol-1,2-dioxygenasy z *C. tropicalis* (upraveno dle [63]).

Purifikační krok	Frakce	Objem (ml)	Proteiny (mg/ml)	Aktivita (nmol katecholu /min)	Specifická aktivita (nmol katecholu /min/mg)	Výtěžek (%)
1	cytosol	200	25	13250	2.65	100
2	eluát, chromatografie na DEAE Sepharose	130	0.7	6288	69.10	47.45
3	eluát, re-chromatografie na DEAE	46	0.98	5175	114.8	39
4	eluát, gelová chromatografie na Sephadexu G-100	10	0.7	840	120.0	6.34

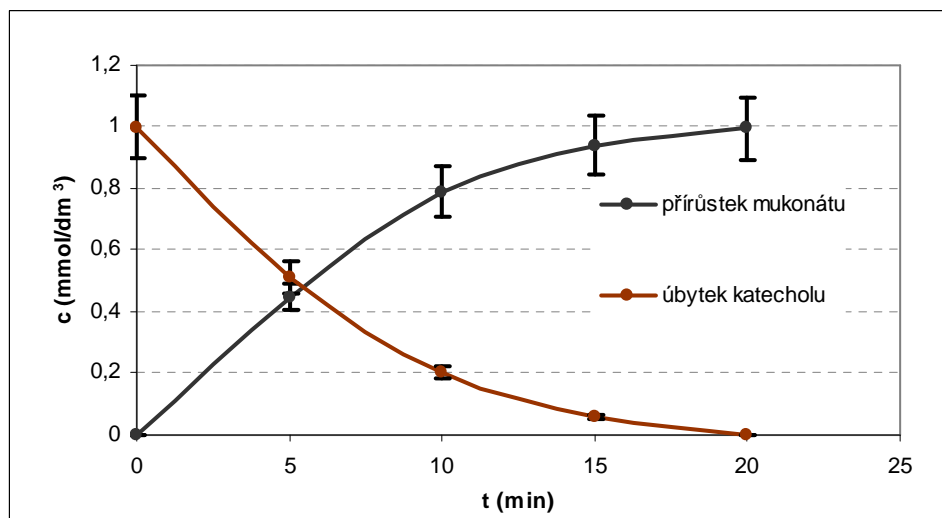
4.2 Kinetika oxidace katecholu za vzniku *cis,cis*-mukonátu katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou

Katechol-1,2-dioxygenasa izolovaná z kvasinky *C. tropicalis* katalyzuje oxidaci katecholu za vzniku *cis,cis*-mukonátu (kap. 1.5.2). Při inkubaci katecholu s enzymem dochází k úbytku katecholu a odpovídajícímu nárůstu *cis,cis*-mukonátu.

Kinetické charakteristiky byly určeny z měření závislosti úbytku katecholu a přírůstu *cis,cis*-mukonátu na době inkubace a závislosti enzymové aktivity (oxidace katecholu v čase, nárůst *cis,cis*-mukonátu v čase) na koncentraci substrátu (katecholu). Kinetické parametry byly určovány jak pro pH optimum reakce, pH 7,6 (určené RNDr. Vilímkovou, [63]), tak i pro další pH (pH 5,5; 6,5; 8,6;).

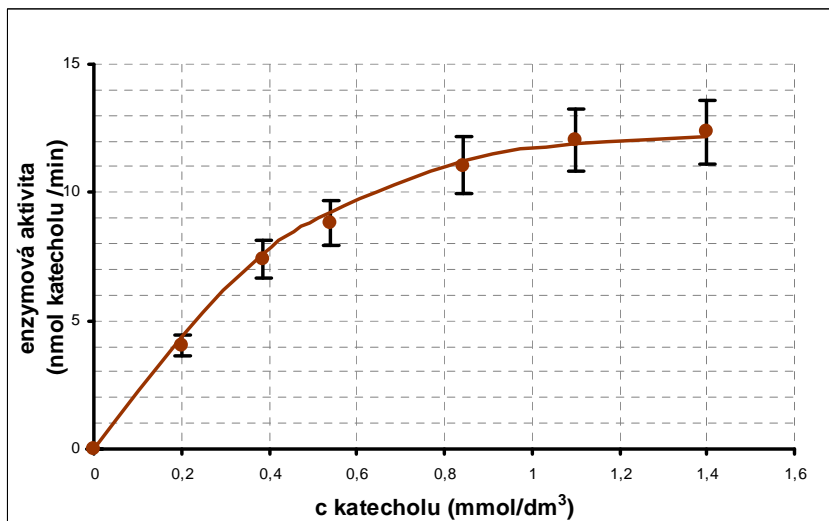
4.2.1 Kinetika oxidace katecholu na *cis,cis*-mukonát katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou při pH 7,6

Při měření závislosti úbytku katecholu a nárůstu *cis,cis*-mukonátu bylo zjištěno, že katechol ubývá lineárně do 7 minut reakce. Ve 20 minutě byl zcela přeměněn na *cis,cis*-mukonát (Obr. 13).

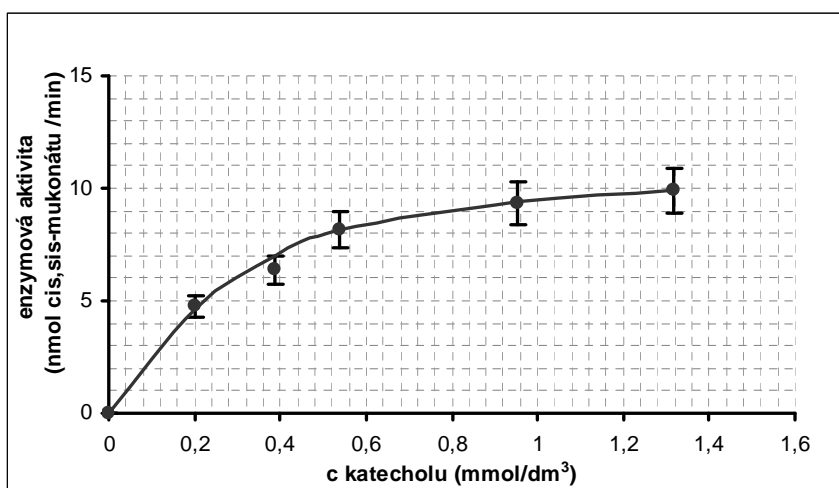


Obr 13 : Závislost oxidace katecholu, katalyzovaná katechol-1,2-dioxygenasou, na době inkubace. Reakční směs obsahovala lyofilisát katechol-1,2-dioxygenasy (20 mg rozpuštěno ve 2 ml Na-fosfátového pufru (50 mM, pH = 7,6)), 1 mM katechol, a Na-fosfátový pufr (50 mM, pH = 7,6). Reakce byly ukončeny v 0, 5, 10, 15 a 20 minutě.

Spotřeba katecholu katechol-1,2-dioxygenasou a tvorba *cis,cis*-mukonátu byly sledovány v závislosti na koncentraci substrátu (katecholu) v reakční směsi (Obr. 14 a 15). Doba inkubace byla 7 min.



Obr. 14: Aktivita katechol-1,2-dioxygenasy v závislosti na koncentraci substrátu (katecholu). Měřen byl úbytek katecholu během reakce. Reakční směs obsahovala katechol-1,2-dioxygenasu, 0-2 mM katechol, 50 mM Na-fosfátový pufr (pH = 7,6).



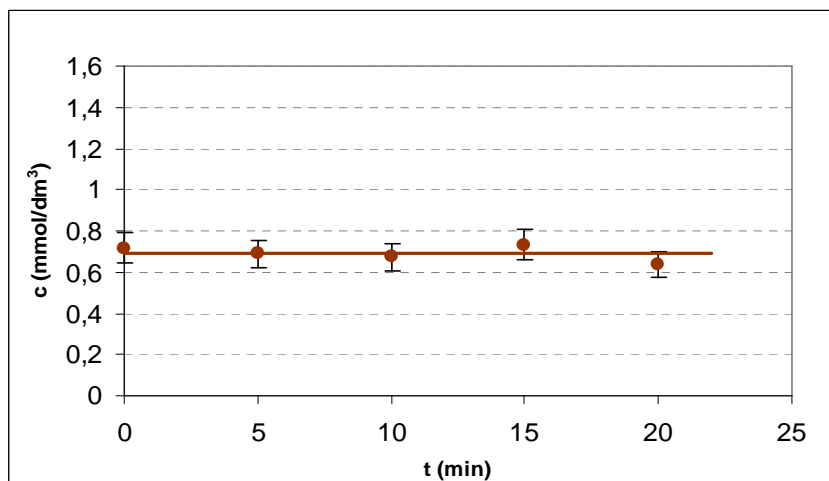
Obr. 15: Aktivita katechol-1,2-dioxygenasy v závislosti na koncentraci substrátu (katecholu). Měřena byla tvorba *cis,cis*-mukonátu během reakce. Reakční směs obsahovala katechol-1,2-dioxygenasu, 0-2 mM katechol, 50 mM Na-fosfátový pufr (pH = 7,6).

Z dvojnásobných recipročních vynesení rychlostí přeměny katecholu katechol-1,2-dioxygenasou na *cis,cis*-mukonát byly určeny kinetické charakteristiky – Michaelisova konstanta K_m a maximální rychlost reakce V_{max} . Hodnoty pro všechny kinetické parametry jsou shrnuty v Tab. 4 (str. 55).

4.2.2 Kinetika oxidace katecholu na *cis, cis*-mukonát katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou při pH 5,5; 6,5 a 8,6

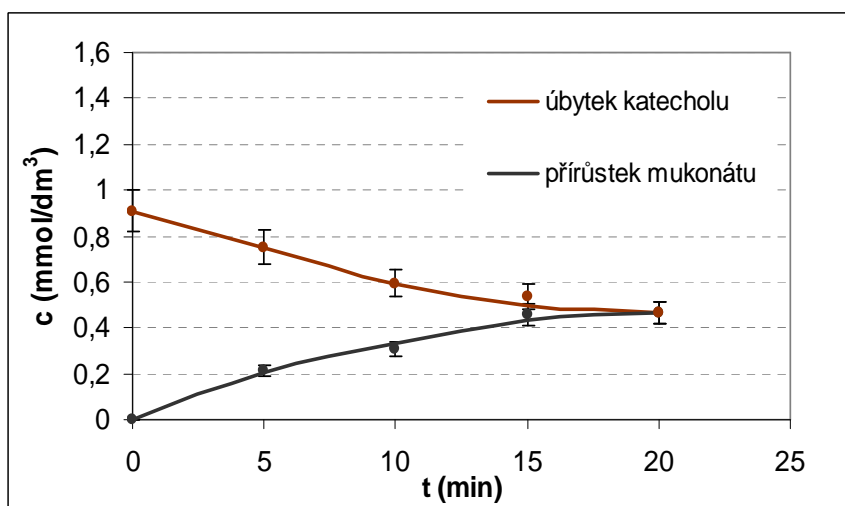
Pro zjištění hodnot kinetických charakteristik při pH odlišném od pH optimálního pro reakci (pH = 7,6; které zajišťuje při práci s těmito enzymy 50 mM Na-fosfátový pufr) bylo nutné zajistit stálost zvoleného pH v inkubační směsi. Vzhledem ke stabilitě enzymu byl lyofilisát, obsahující katechol-1,2-dioxygenasu, rozpouštěn v 50 mM Na-fosfátovém pufru pH 7,6 (opět 20 mg lyofilisátu ve 2 ml pufru). Ovšem 10 mM katechol, jež slouží jako zásobní roztok pro přípravu 1 mM katecholu (koncentrace při reakci), byl připraven ze 100 mM katecholu, tak, že byl ředěn 1 M Na-fosfátovým pufrem pH = 5,5 v poměru 1:9 (u dalších měření pufrem o pH 6,5 nebo 8,6). Tato koncentrace Na-fosfátu pak byla vhodná pro zajištění požadovaného pH. Pufr o příslušném pH byl také přidán do reakční směsi pro dosažení požadované koncentrace katecholu. Stejný postup byl použit i při přípravě reakční směsi pro měření závislosti aktivity katechol-1,2-dioxygenasy na koncentraci jejího substrátu (katecholu), kdy byly připraveny různé směsi o rozdílné koncentraci katecholu (0 - 2 mM).

Obr. 16 (str. 51) znázorňuje úbytek katecholu v závislosti na čase v přítomnosti katechol-1,2-dioxygenasy. Jak je z tohoto obrázku patrné, v kyselém prostředí (pH = 5,5) reakce neprobíhá; k přeměně katecholu nedochází (Obr. 16), a ani přítomnost (produkce) *cis, cis*-mukonátu nebyla detekována (data nejsou uvedena). Hodnoty koncentrací látek byly měřeny v čase 0, 5, 10, 15 a 20 minut.



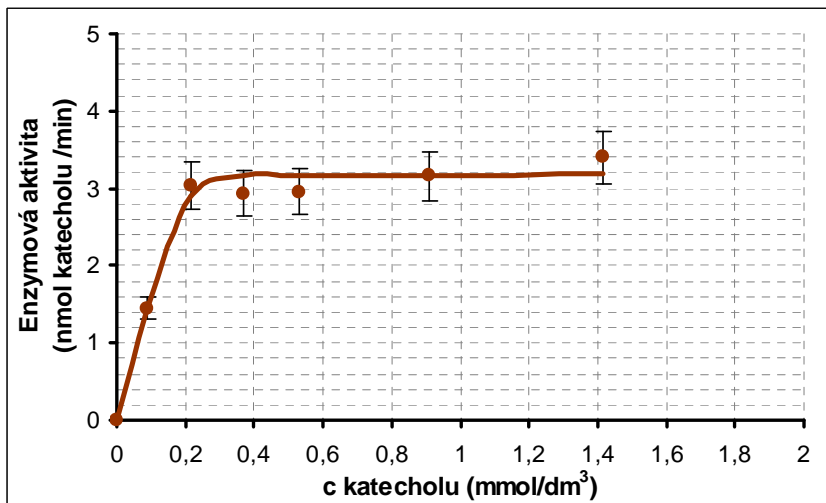
Obr. 16: Závislost oxidace katecholu (úbytek katecholu), katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou, na době inkubace při pH = 5,5. Reakční směs obsahovala katechol-1,2-dioxygenasu, 1 mM katechol a 1 M Na-fosfátový pufr (pH = 5,5).

Obr. 17 ilustruje oxidaci katecholu katechol-1,2-dioxygenasou za vzniku *cis,cis*-mukonátu při pH = 6,5. Sledován byl úbytek katecholu a nárůst *cis,cis*-mukonátu. Katechol během reakce ubývá lineárně do 10. minuty reakce. Reakce byla sledována do 20. minuty. Během inkubace nedošlo k úplné přeměně katecholu.

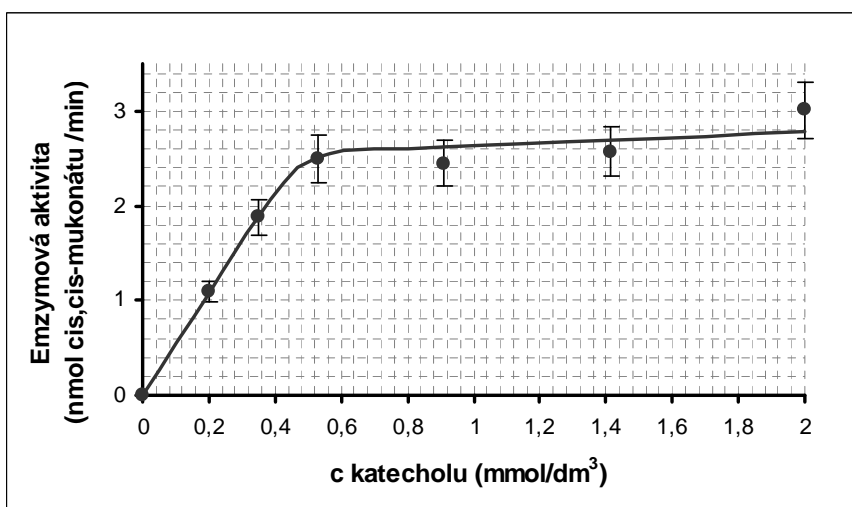


Obr. 17: Závislost oxidace katecholu, katalyzovaná katechol-1,2-dioxygenasou, na době inkubace za vzniku *cis,cis*-mukonátu. Reakční směs obsahovala katechol-1,2-dioxygenasu, 1 mM katechol a 1M Na-fosfátový pufr (pH = 6,5).

Závislost oxidace katecholu katechol-1,2-dioxygenasou na koncentraci katecholu zobrazuje Obr. 18. Sledován byl úbytek katecholu během reakce, koncentrace katecholu byla měřena v čase 0, 5 a 7 minut. Na Obr. 19 je znázorněna stejná závislost, při tomto experimentu byl ovšem sledována produkce metabolitu katecholu, *cis,cis*-mukonátu.

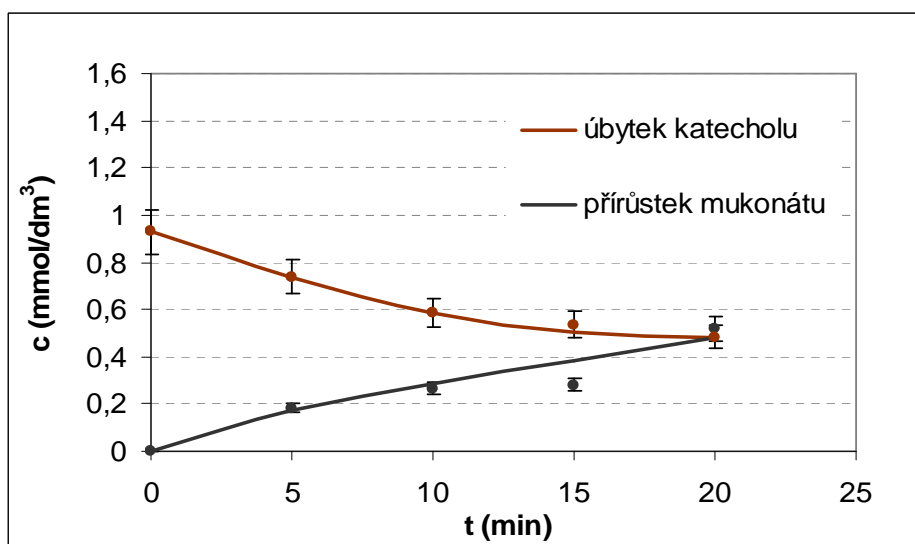


Obr. 18: Závislost aktivity katechol-1,2-dioxygenasy na koncentraci substrátu (katecholu). Měřena byla spotřeba katecholu, reakční směs obsahovala katechol-1,2-dioxygenasu katechol (0-2 mM) a 1 M Na-fosfátový pufru (pH = 6,5). Inkubace probíhala 7 minut.



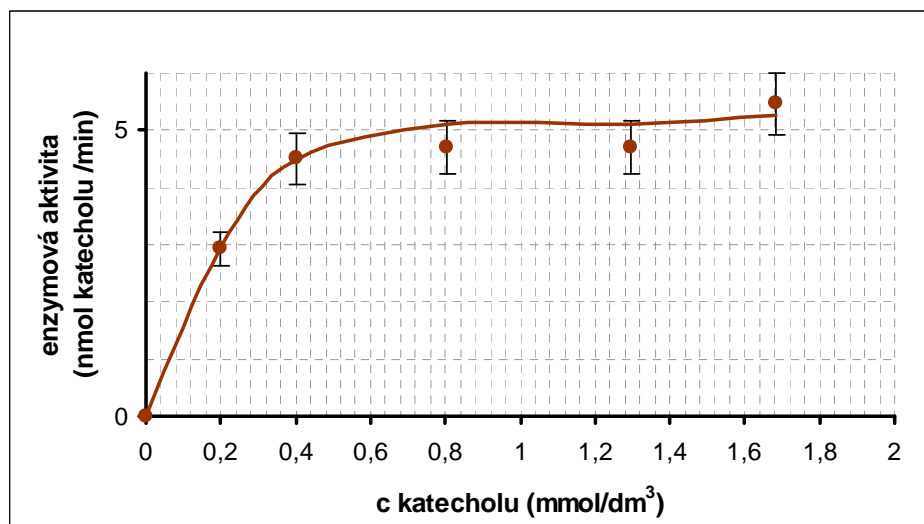
Obr. 19: Závislost enzymové aktivity katechol-1,2-dioxygenasy na koncentraci substrátu (katecholu). Měřena byla tvorba *cis,cis*-mukonátu, reakční směs obsahovala katechol-1,2-dioxygenasu katechol (0-2 mM) a 1 M Na-fosfátový pufru (pH = 6,5). Inkubace probíhala 7 minut.

Obr. 20 ilustruje oxidaci katecholu katechol-1,2-dioxygenasou za vzniku *cis,cis*-mukonátu při pH = 8,6. Opět byl sledován úbytek katecholu a nárůst produktu reakce *cis,cis*-mukonátu. Katechol během reakce ubývá lineárně do 7. minuty reakce. Reakce byla sledována do 20. minuty. Během inkubace při pH 8,6 opět nedošlo k úplné přeměně katecholu.

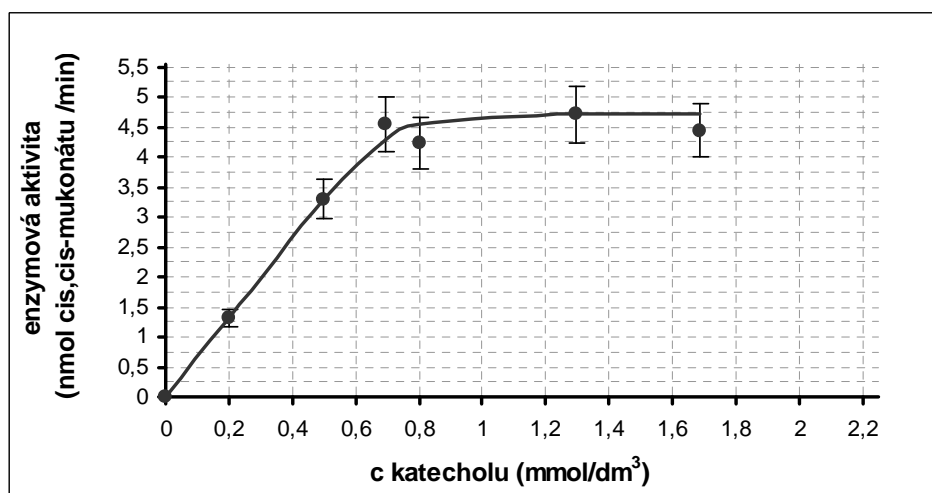


Obr. 20: Časová závislost úbytku katecholu a přírůstku *cis,cis*-mukonátu při reakci katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou při pH = 8,6. Reakční směs obsahovala katechol-1,2-dioxygenasu, 1 mM katechol, 1 M Na-fosfátový pufr o pH = 8,6. Reakce byla zastavena v čase 0, 5, 10, 15 a 20 minut.

Na základě získaných hodnot (Obr. 20) byla při dalším experimentu reakční směs inkubována 7 minut. Obr. 21 (str. 54) znázorňuje závislost oxidace katecholu katechol-1,2-dioxygenasou na koncentraci katecholu v reakční směsi. Sledován byl úbytek katecholu do 7. minuty reakce. Reakce dosahuje své maximální rychlosti při relativně nízké koncentraci katecholu – cca 0,8 mM. Obr. 22 (str. 54) znázorňuje stejnou závislost, měřena však byla tvorba *cis,cis*-mukonátu během reakce. I v tomto případě dosáhla reakce své maximální rychlosti při koncentraci katecholu cca 0,8 mM.



Obr. 21: Závislost enzymové aktivity katechol-1,2-dioxygenasy na koncentraci substrátu (katecholu). Měřena byla spotřeba katecholu, reakční směs obsahovala katechol-1,2-dioxygenasu katechol (0-2 mM) a 1 M Na-fosfátový pufru (pH = 8,6). Inkubace probíhala 7 minut.



Obr. 22: Závislost enzymové aktivity katechol-1,2-dioxygenasy na koncentraci substrátu (katecholu). Měřena byla tvorba *cis,cis*-mukonátu, reakční směs obsahovala katechol-1,2-dioxygenasu katechol (0-2 mM) a 1 M Na-fosfátový pufru (pH = 8,6). Inkubace probíhala 7 minut.

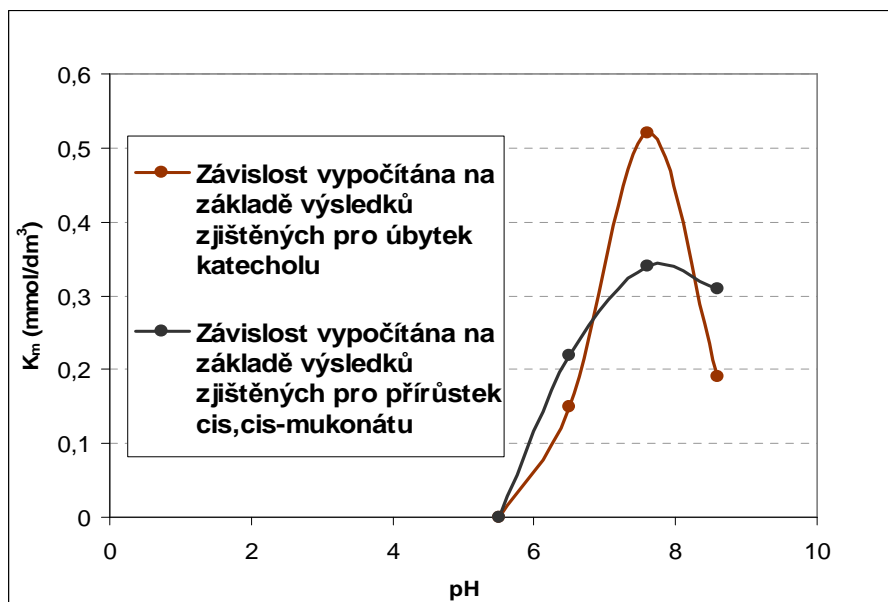
Na základě dvojnásobného reciprokého vnesení experimentálních hodnot (dle Lineweavera a Burka [65]) byly získány hodnoty kinetických charakteristik K_m a V_{max} katechol-1,2-dioxygenasy. Tyto výsledky shrnuje tab. 4. Jsou v ní uvedeny hodnoty kinetických parametrů K_m a V_{max} zjištěných při různých hodnotách pH (5,5; 6,5; 7,6; 8,6) – výpočet na základě úbytku katecholu a nárůstu *cis,cis*-mukonátu.

Tab. 4: Kinetické parametry oxidace katecholu na *cis,cis*-mukonát katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou při různých hodnotách pH.

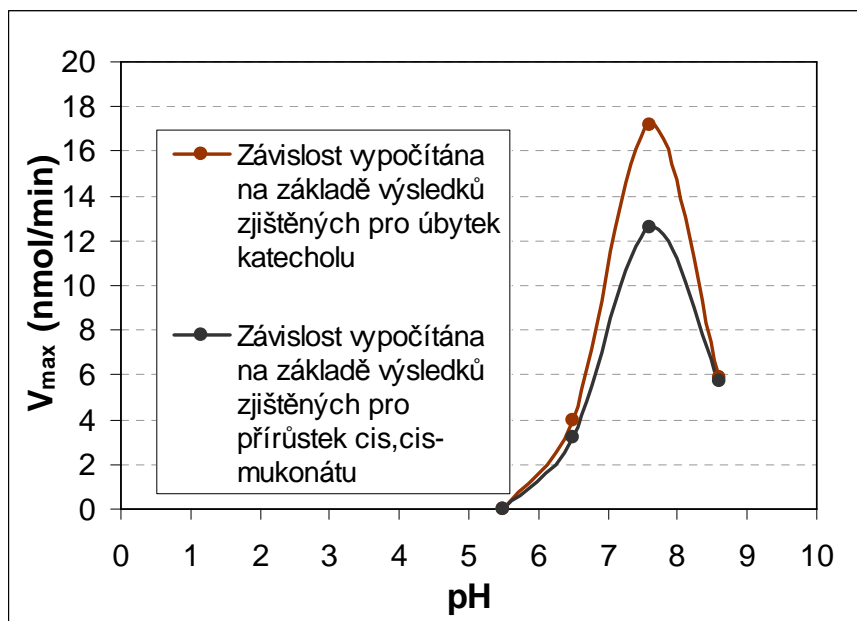
pH	K_m (úbytek katecholu) (mmol/dm ³)	K_m (přírůstek <i>cis,cis</i> -mukonátu) (mmol/dm ³)	V_{max} (úbytek katecholu) (nmol/min)	V_{max} (přírůstek <i>cis,cis</i> -mukonátu) (nmol/min)
5,5	N	N	N	N
6,5	0,15±0,02	0,22±0,02	4,0±0,4	3,2±0,3
7,6	0,52±0,05	0,34±0,03	17,2±1,7	12,6±1,3
8,6	0,19±0,02	0,31±0,03	5,9±0,6	5,7±0,6

N- reakce neprobíhá

Obr. 23 a 24 (str. 56) jsou vnesením závislostí hodnot kinetických parametrů katechol-1,2-dioxygenasy, vypočítaných na základě provedených měření, na hodnotě pH. V grafu jsou zaneseny hodnoty vypočítané na základě úbytku katecholu během reakce i nárůstu *cis,cis*-mukonátu během reakce katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou.



Obr. 23: Závislost hodnot K_m pro katechol-1,2dioxygenasu na pH.

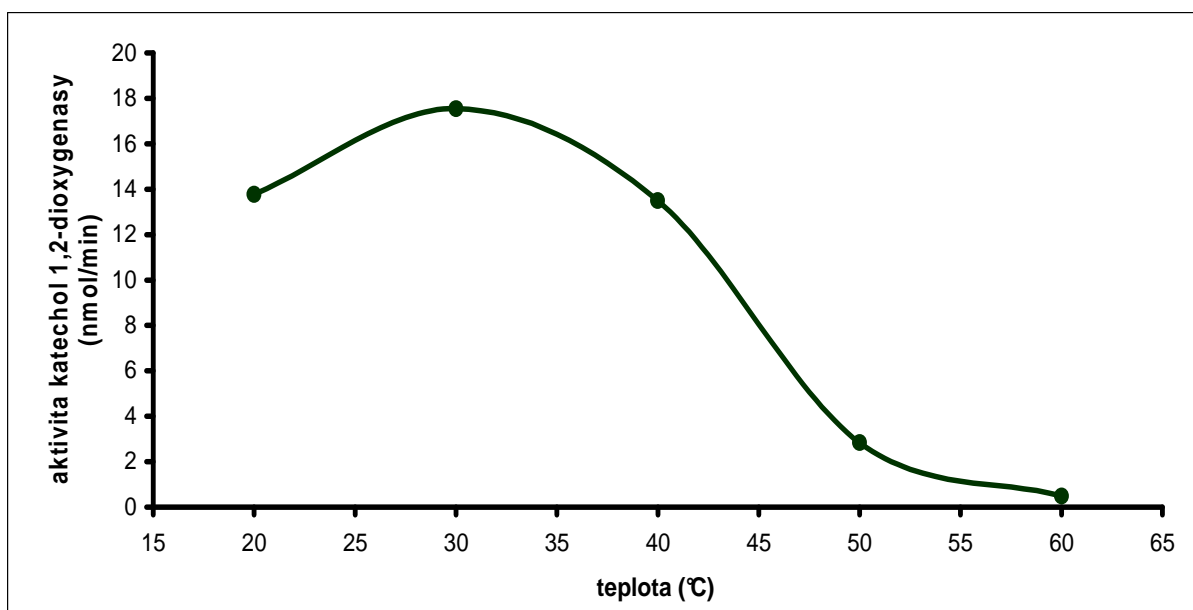


Obr. 24: Závislost maximální rychlosti enzymové reakce (V_{\max}) katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou na pH.

Dosažené výsledky potvrzují, že pH optimum reakce katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou je pH 7,6 [63]. Při tomto pH reakce katalyzovaná katechol-1,2-dioxygenasou probíhá nejvyšší maximální rychlostí (V_{\max}).

4.3 Teplotní optimum katechol-1,2-dioxygenasy z *C. tropicalis*

Závislost oxidace katecholu katalyzovaná katechol-1,2-dioxygenasou izolovanou z kvasinky *C. tropicalis* je znázorněna na Obr. 25. Dle získaných výsledků je optimální teplota pro aktivitu tohoto enzymu 30°C. Při teplotě 60°C dochází ke snížení rychlosti reakce, pravděpodobně degradací enzymu.



Obr. 25: Závislost aktivity katechol-1,2-dioxygenasy na teplotě. Reakční směs obsahovala purifikovanou katechol-1,2-dioxygenasu, 1 mM katechol a Na-fosfátový pufr (0,5 M, pH = 7,6) (Upraveno dle [63])

5 Diskuse

Životní prostředí je dnes stále víc znečišťováno řadou cizorodých látek. Ty představují výraznou zátěž i pro člověka. Podstatnou skupinu polutantů představují i fenolické látky. Proto je nutné hledat nová řešení pro likvidaci environmentálních polutantů. Bylo zjištěno, že řada mikroorganismů je schopná tato xenobiotika metabolizovat. Mnoho z nich cizorodou látku dokáže využít jako zdroj uhlíku a energie pro svůj růst, mezi nimi i kvasinka *C. tropicalis*. Tato kvasinka je schopná oxidovat fenol a některé jeho deriváty [47]. Snaha o rozšíření informací o možnostech biodegradace fenolu touto kvasinkou, se zaměřením na enzym účastnící se druhého kroku této degradace, katechol-1,2-dioxygenasu, byla cílem této práce, která navazuje na předešlý několikaletý výzkum v laboratoři na katedře biochemie PřF UK. Zkoumaný kmen Ct2 kvasinky *C. tropicalis* pocházel z půdy kontaminované fenolem v oblasti Mostecka. Kultivován byl ve spolupráci s laboratořemi profesora Pácy (VŠCHT) a Ing. Sobotky (MBÚ AVČR). Vzhledem k tomu, že v laboratoři studujeme funkce biotransformačních enzymů participujících na metabolismu fenolu, je nutné tyto enzymy purifikovat do vysokého stupně čistoty. Pro takové purifikace je pochopitelně nutné připravit značné množství biomasy studované kvasinky. Dostatečné množství biomasy studované kvasinky jsme získali díky spolupráci s Ing. Sobotkou, na jehož pracovišti byla provedena kultivace kvasinky ve velkých fermentorech.

Jedním z cílů předkládané diplomové práce bylo izolovat a purifikovat katechol-1,2-dioxygenasu v dostatečné čistotě a množství pro provedení experimentů vedoucích k její charakterizaci. Optimalizaci izolace jak tohoto enzymu, tak i enzymu katalyzujícího první krok biodegradace fenolu v *C. tropicalis*, NADPH-dependentní fenolhydroxylasy, byla provedena v úzké součinnosti s RNDr. Vilímkovou [41, 66, 67]. Základním krokem purifikace katechol-1,2-dioxygenasy byla kapalinová chromatografie cytosolárních proteinů na sloupci iontoměniče DEAE Sepharosy, následovaná rechromatografií obou enzymů studovaných v naší laboratoři, NADPH-dependentní fenolhydroxylasy a katechol-1,2-dioxygenasy, na témže nosiči. Tyto kroky úspěšně odstranily veškeré balastní proteiny z preparátů enzymů, ale nevedou k totální separaci těchto dvou enzymů. Tato skutečnost byla potvrzena jak měřením aktivity enzymů v eluovaných frakcích, tak i pomocí SDS-elektroforesy vybraných vzorků. Jako další krok purifikace katechol-1,2-dioxygenasy byla

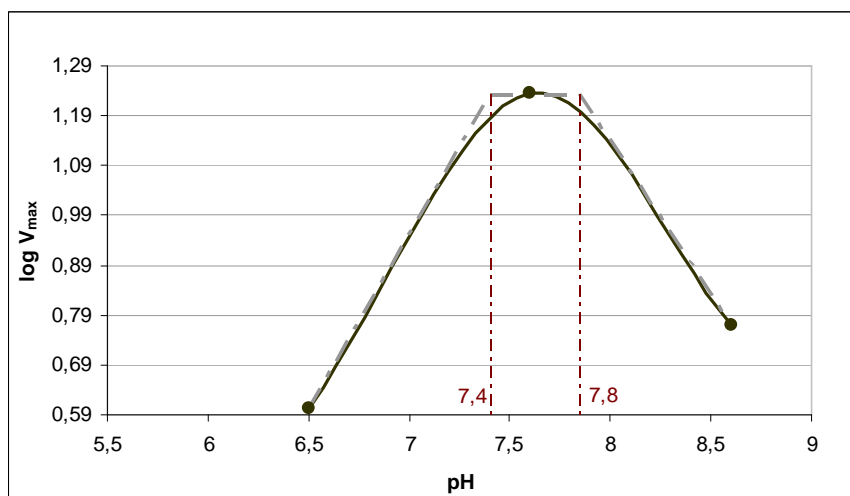
tedy zařazena gelová permeační chromatografie preparátu katechol-1,2-dioxygenasy na sloupci Sephadexu G-100. Jelikož je tento krok založen na separaci proteinů dle molekulových hmotností, byly od sebe NADPH-dependentní fenolhydroxylasa ($M_w=240$ kDa [41]) a katechol-1,2-dioxygenasa ($M_w=60$ kDa [63]) zcela odděleny. Tento výsledek byl opět potvrzen pomocí SDS-elektroforesy a měřením aktivit v jednotlivých frakcích získaných chromatografií.

Katechol-1,2-dioxygenasa byla charakterizována z hlediska kinetiky reakcí katalyzovaných tímto enzymem. Byla provedena řada experimentů vedoucích k určení kinetických charakteristik, konkrétně K_m a V_{max} pro oxidaci katecholu a tvorbu *cis,cis*-mukonátu, přičemž bylo měněno pH, při kterém byl experiment proveden. Reakce ve všech testovaných pH, kde reakce probíhala, vykazovaly kinetiku Michaelise a Mentenové. Za použití pufru s nejnižším pH (pH 5,5) byl enzym v reakci zcela neúčinný. Je diskutabilní, zda je při tomto pH ionizace aminokyselin v aktivním centru nevhodná pro reakci nebo zda dochází k denaturaci enzymu. Nejvyšší aktivitu vykazovala katechol-1,2-dioxygenasa při pH 7,6, což je v souladu s výsledky zjištěnými RNDr. Vilímkovou, která určila pH optimum enzymu, které je 7,6 [63]. Hodnoty kinetických charakteristik zjištěné pro oxidaci katecholu (měřeno spotřebou katecholu) a pro tvorbu *cis,cis*-mukonátu při jednotlivých experimentech (pro jedno pH) byly prakticky shodné. Dle zjištěných výsledků lze soudit, že enzym je aktivnější a stabilnější v neutrálním (resp. bazickém) prostředí (pH 7,6). Tento předpoklad odpovídá i zjištěnému pH optimu určenému pro enzymy z jiných organismů, z nichž byl tento enzym izolován [51,52,53,54]. Tak je tomu v případě katechol-1,2-dioxygenasy izolované z kvasinky *C. albicans* [54] a bakterií *Acinetobacter* [68,69] a *Pseudomonas* [70].

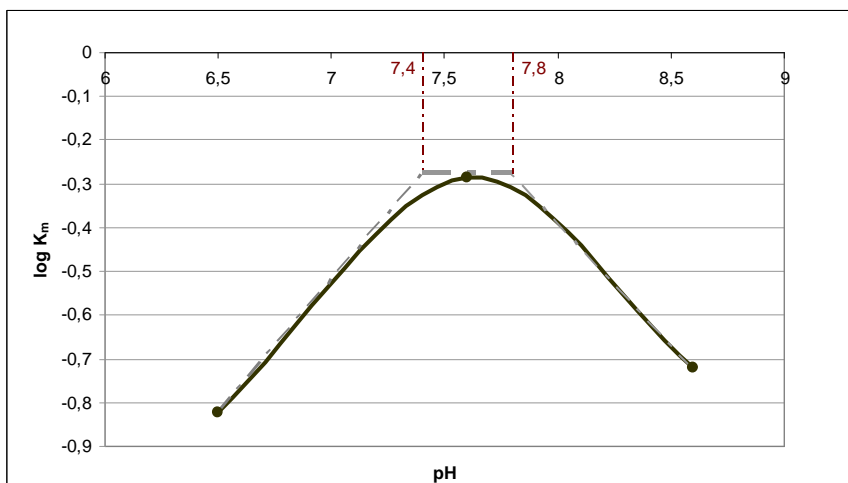
Dalším cílem předkládané diplomové práce bylo určit teplotní optimum pro oxidaci katecholu za vzniku *cis,cis*-mukonátu katalyzovanou katechol-1,2-dioxygenasou izolovanou z kvasinky *C. tropicalis*. Zjistili jsme, že reakce nejlépe probíhá při teplotě 30°C. Toto teplotní optimum je vyšší než u katechol-1,2-dioxygenasy kvasinky *C. albicans* TL3, u které byla jako optimální teplota této reakce zjištěna teplota 25°C [54]. Naopak u ostatních mikroorganismů, jež byly popsány v úvodní části diplomové práce, je teplotní optimum často i výrazně vyšší [51,52,53]. Při teplotě 60°C dochází patrně k denaturaci katechol-1,2-dioxygenasy.

Výsledky získané v diplomové práci rozšiřují poznatky o metabolismu fenolu v kvasince *C. tropicalis*. Jmenovitě o druhém kroku jeho oxidačního metabolismu, přeměny katecholu na *cis,cis*-mukonát. Enzym, který tuto reakci katalyzuje, byl vůbec poprvé izolován v naší laboratoři [tato práce a 63]. Část výsledků získaných při vypracovávání diplomové práce je součástí publikace [63], která je uvedena jako příloha (příloha č. 1) této diplomové práce. V další části výzkumu tohoto enzymu se naše laboratoř zaměří na studium interakcí vedoucích k tvorbě funkčního proteinu (tedy dimeru katechol-1,2-dioxygenasy [63]) a na studium struktury izolované katechol-1,2-dioxygenasy. Taková studie může přinést nové poznatky o uspořádání aktivního centra enzymu a o participaci aminokyselin tohoto aktivního centra na katalýze.

V předkládané diplomové práci byl na základě získaných výsledků proveden odhad hodnot pK_a aminokyselin přítomných v aktivním centru katechol-1,2-dioxygenasy. Při určování těchto hodnot se vycházelo z grafů závislosti $\log V_{max}$ (používané pokud je koncentrace substrátu výrazně vyšší než hodnota K_m) resp. $\log K_m$ na pH (Obr. 26 a 27, str. 61). Ze získaných křivek pak byly získány hodnoty pH, jenž odpovídají pK_a aminokyselin v aktivním centru enzymu.



Obr. 26: Určení hodnot pK_a aminokyselin v aktivním centru pomocí logaritmické závislosti V_{max} na pH.



Obr. 27: Určení hodnot pK_a aminokyselin v aktivním centru pomocí logaritmičké závislosti K_m .

Hodnoty pK_a aminokyselin nejsou v závislosti na způsobu určení příliš odlišné. Hodnoty 7,4; 7,8 ani 7,85 samozřejmě neodpovídají pK_a žádné volné aminokyseliny, neboť jsou v proteinu tyto hodnoty posunuty. Nejvíce se zjištěné hodnoty blíží pK_a postranního řetězce (-SH skupiny) cysteinu ($pK_a \cong 8$) popř. imidazolového kruhu histidinu ($pK_a = 6,1$). Přítomnost cysteinu v aktivním centru katechol-1,2-dioxygenasy (z různých mikroorganismů) nebyla dosud ve studované literatuře popsána, ovšem přítomnost histidinu byla zjištěna u katechol-1,2-dioxygenasy izolované z *A. radioresistens* [71]. Dva histidiny koordinují nehemové železo v aktivním centru enzymu spolu s dvěma zbytky tyrosinu a OH skupinou pocházející z rozpouštědla.

6 Závěr

Cíle předkládané diplomové práce, jež zahrnovaly izolaci, purifikaci a částečnou charakterizaci katechol-1,2-dioxygenasy z kvasinky *Candida tropicalis*, lze považovat za splněné. Byly zjištěny následující poznatky:

- 1) Postupem sestávajícím z kapalinové chromatografie na iontoměničce DEAE Sepharose, rechromatografie na stejném nosiči a gelové permeační chromatografie na Sephadexu G-100 byla purifikována elektroforeticky homogenní katechol-1,2-dioxygenasa kvasinky *C. tropicalis*.
- 2) Purifikovaná katechol-1,2-dioxygenasa byla částečně charakterizována:
 - a) Kinetika enzymové oxidace katecholu za vzniku *cis,cis*-mukonátu, která je katalyzována katechol-1,2-dioxygenasou, odpovídá reakční kinetice dle Michaelise a Mentenové pro všechna měřená pH (pH 6,5; 7,6; 8,6).
 - b) Hodnota Michaelisovy konstanty (K_m) enzymu při pH optimu reakce (pH 7,6) je 0,52 mM pro oxidaci katecholu a 0,34 mM pro tvorbu *cis,cis*-mukonátu. Hodnota maximální rychlosti (V_{max}) oxidace katecholu (pH = 7,6) se rovná 17,2 nmol/min a pro vznik *cis,cis*-mukonátu 12,6 nmol/min.
 - c) Při pH 5,5 katechol-1,2-dioxygenasa katechol neoxiduje.
 - d) Na základě hodnot Michaelisových konstant a maximálních rychlostí enzymové reakce katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou zjištěných při pH 6,5; 7,6 a 8,6 bylo potvrzeno, že pH optimum enzymu je pH 7,6.
 - e) Teplotní optimum oxidace katecholu na *cis,cis*-mukonát katalyzované katechol-1,2-dioxygenasou je 30°C.

Část výsledků získaných při řešení diplomové práce je součástí publikace [63], která je uvedena jako příloha č. 1 diplomové práce.

7 Přehled použité literatury

- [1] Keith, L.H., Telliard W.A.: *Environ. Sci. Technol.*, 13, 416-423, (1979)
- [2] Braniš, M.: v knize *Základy ekologie a ochrany životního prostředí*, Informatorium, Praha, str. 114-124, (2004)
- [3] OECD, *Enviromental Outlook. OECD*, Paris (2001)
- [4] Spiker, K., Crawford, L.: *Appl. Microb. Biotechnol.*, 37, 518-523, (1992)
- [5] Jiang, H. L., Tay, J. H., Maszenan, A. M., Tay, S. T. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 6767-6775, (2004)
- [6] <http://www.vscht.cz/uchop/CDmartin/8-nejcasteji/3-1.html> 14.8.10, 15:46
- [7] Horáková, D., *Bioremediace*, skriptum PřF Masarykova univerzita, Brno, str. 5-6 (2006), dostupný z WWW:
http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3062932/bioremediace_FRVS_2006-2.pdf
- [8] McMurry, J.: v knize *Organic chemistry-fifth edition*, Brooks/Cole, Pacific Grove, str. 654-692, (2000)
- [9] Vohlídal J. a kol.: *Chemické tabulky*, SNTL, Praha, (1982)
- [10] Tichý M.: v knize *Toxikologie pro chemiky-Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*, Karolinum, Praha, str. 90 (2004)
- [11] <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts115.html>, 14.8. 2010, 16:19
- [12] Vodrážka, Z., v knize *Biochemie-kniha třetí*, Academia, Praha, str. 145-150, (2002)
- [13] <http://che1.lf1.cuni.cz/html/Xenobiochemie.pdf>, 14.8.2010, 16:26
- [14] http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=paps ; (14.8 2010, 16:30)
- [15] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J.: *Bull. Čes. Spol. Biochem. Mol. Biol.*, 28, 57-73 (2000)
- [16] Cafaro, V., Izzo, V., Scognamiglio, R., Notomista, E., Capasso, P., Casbarra, A., Pucci, P., Donato, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2211-2219, (2004)
- [17] Hinteregger, C., Leitner, R., Loidl, M., Ferchi, A., Streichsbier, F.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 252-259, (1992)

- [18] Merimaa, M., Heinaru, E., Liivak, M., Vedler, E., Heinaru A.: *Arch. Microbiol.*, 186, 287-296, (2006)
- [19] Karigar, Ch., Mahesh, A., Nagenahalli, M., Yun, D. J.: *Biodegradation*, 17, 47-55, (2006)
- [20] Kim, M. H., Hao, O. J., Wang, N. S.: *Microbiol. Ecol.*, 23, 217-227, (1997)
- [21] Gurujeyalakshmi, G., Oriol, P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 500-502, (1989)
- [22] Rocha, L., L., Cordeiro, R. A., Cavalcante, R. M., do Nascimento, R.F., Martins, S. C. S., Santaella, S. T., Mělo, V. M. M.: *Mycopathologia*, 164, 183-188, (2007)
- [23] Failova, A., Boschke, E., Bley, T.: *Int. Biodet. Biodeg.* 54, 69-76, (2004)
- [24] Jiang, Y., Wen, J. P., Li, H. M., Yang, S. L., Hu, Z. D.: *Biochem. Eng. J.* 24, 243-247, (2005)
- [25] Bergauer, P., Fonteyne, P. A., Nolard, N., Schinner, F., Margesin, R.: *Chemosphere* 59, 909-918, (2005)
- [26] Krallish, I., Gonta, S., Savenkova, L., Bergauer, P., Margesin, R.: *Extremophiles*, 10, 441-449, (2006)
- [27] Bendová, O., Janderová, B.: *Základy biologie kvasinek*, skriptum PřF UK Praha, str. 49, (1985)
- [28] Kocková-Kratochvílová, A.: v knize *Kvasinky a kvasinkové mikroorganizmy*, Alfa, Bratislava, str. 416-426, (1982)
- [29] Kocková-Kratochvílová, A.: v knize *Taxonómia kvasinek a kvasinkových mikroorganizmov*, Alfa, Bratislava, str. 376-399, (1990)
- [30] Jiang, Y., Wen, J., Lan, L., Hu, Z.: *Biodegradation*, 18, 719-729 (2007)
- [31] Chang, Y. H., Li, Ch. T., Chang, M. C., Shieh, W. K.: *Biotechnol. Bioeng.*, 60, 391-395, (1998)
- [32] Eling, T. E., Thompson, D. C., Foureman, G. L., Curtis, J. F., Hughes, M.F.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30, 1-45, (1990)
- [33] Vodrážka, Z., v knize *Biochemie-kniha druhá*, Academia, Praha, str. 32, (2002)

- [34] Stiborová, M., Suchá, V., Mikšanová, M., Páca, J, JR, Páca J.: *Gen. Physiol. Biophys.*, 22, 167-179 (2003)
- [35] Williamson, D. G., O'Donne, V. J.: *Biochemistry*, 8, 1289-1300, (1969)
- [36] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. Listy*, 93, 229-237, (1999)
- [37] Stiborová, M., Mikšanová, M., Martínek, V., Frei, E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 65, 297-325(2000)
- [38] Košťř, J.: v knize *Chemie a fyzika živých soustav*, Státní zdravotnické nakladatelství, Praha, str. 197-201, (1965)
- [39] Neujahr, H. Y., Gaal, A.: *Eur. J. Biochem.*, 35, 386-400, (1973)
- [40] Sejlitz, T., Wernstedt, Ch., Engström, A., Neujahr, H. Y.: *Eur. J. Biochem* 187, 225-228, (1990)
- [41] Páca, J. Jr., Kremláčková, V., Turek, M., Vilímková L., Suchá, V., Páca, J., Halecký, M., Stiborová, M.: *Enzyme Microb. Technol.* 40, 919-926, (2007)
- [42] Neujahr, H. Y., Kjellen, K. G.: *J. Biol. Chem.* 253, 8835-8841, (1978)
- [43] Hao, O. L., Kim, M. H., Seagren, E. A., Kim, H.: *Chemosphere*, 46, 797-807, (2002)
- [44] Nakamura, S., Ogura, Y., Yano, K., Higashi, N., Arima, K.: *Biochemistry* 9, 3235-3242, (1970)
- [45] Dong, X., Ballou, D. P., Massey, V.: *Biochemistry*, 40, 12369-12378, (2001)
- [46] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. Jr., Martínek, V., Páca, J.: *Chem. Listy*, 98, 876-890, (2004)
- [47] Krug, M., Straube, G.: *J. Basic Microbiol.*, 26, 271-281, (1986)
- [48] Tsai, S. Ch., Tsai, L. D., Li, Y. K.: *ios. Biotechnol. Biochem.*, 69, 2358-2367, (2005)
- [49] Nozaki, M.: *Top. Curr. Chem.*, 78, 145-186, (1979)

- [50] <http://www.rsc.org/ej/DT/2001/b0085111/b0085111-f1.gif> ,15.8.2010, 10:53)
- [51] Di Nardo, G., Roggero, C., Campolongo, S., Valetti, F., Trotta, F., Gilardi, G.: *Dalton Trans.*, 6507-6512, (2009)
- [52] Patel, R.N., Hou, C.T., Felix, A., Lillard, M.O.: *J. Bacteriol.*, 127, 536-544, (1976)
- [53] Gou, M., Qu, Y., Y., Zhou, J., Li, A., Uddin, M.S.: *Sci. China, Ser. B:Chem.*, 52, 615-620, (2009)
- [54] Tsai, S. Ch., Li, Y. K.: *Arch. Microbiol.*, 187, 199-206, (2007)
- [55] Ridder, L., Briganti, F., Boersma, M.G., Boeren, S., Vis, E.H., Scozzafa, A., Veeger, C., Rietjens, I.M.C.M.: *Eur. J. Biochem.*, 257, 92-100, (1998)
- [56] Lipscomb, J.D., Orville, A.M.: *Metal Ions Biol. Syst.*, 28, 243-298, (1992)
- [57] Que, L., Ho, R.Y.N.: *Chem. Rev.*, 96, 2606-2624, (1996)
- [58] Walsh, T.A., Ballou, D.P., Mayer, R., Que, L.: *J. Biol. Chem.*, 258, 14422-14427, (1983)
- [59] Que, Jr. L., Heistand, R.H.: *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 2219-2221, (1979)
- [60] Que, L., Lipscomb, J.D., Münck, E., Wood, J.M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 485, 60-74, (1977)
- [61] Kremláčková, V.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha, str. 40, (2005)
- [62] Brdička, R., Dvořák, J.: v knize *Základy fyzikální chemie*, Academia, Praha, str. 519-520, (1977)
- [63] Vilímková, L., Jechová, J., Koubková, Z., Páca, J. Jr, Kremláčková, V., Poljaková, J., Páca, J., Stiborová, M.: *Neuro Endocrinol. Lett.*, 30 (Suppl. 1), 80-87, (2009)
- [64] Anzenbacher, P., Kovář, J.: v knize *Metody chemického výzkumu pro biochemiky*, Čs. redakce VN MON, Praha, (1986)
- [65] Lineweaver, H., Burk, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658-666, (1934)
- [66] Vilímková, L., Páca, J. Jr., Kremláčková, V., Páca, J., Stiborová, M.: *Interdisc Toxicol.*, 1, 101-106 (2008)
- [67] Vilímková, L.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha, str. 60-69, (2006)
- [68] Kim, S. I., Song, S. Y., Kim, K. W., Ho, E. M., Oh, K. H.: *Res. Microbiol.*, 154, 697-703, (2003)
- [69] Briganti F., Pessione E., Giunta C, Mazzoli R., Scozzafava A.: *FEBS Lett.*, 416, 61-64, (1997)
- [70] Nakai. C., Nakazawa T., Nozaki, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 267, 701-713, (1988)

- [71] Caglio, R., Valetti, F., Caposio, P., Gribaudo, G., Passione, E., Guinta, C.:
ChemBioChem, 10, 1015-1024, (2009)

8 Přílohy diplomové práce

Příloha č. 1

(Vilímková, L., Jechová, J., Koubková, Z., Páca, J. Jr, Kremláčková, V., Poljaková, J., Páca, J., Stiborová, M.: *Neuro Endocrinol. Lett.* 30 (Suppl. 1), 80-87, (2009))

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka