

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO- TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

Významné enzymy v neurotransmisích

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Leona Kubů**
Osobní číslo: **C09288**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Významné enzymy v neurotransmisích**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**


Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat teoretickou rešerši zabývající se významnými enzymy v neurotransmisích.
2. Zaměřit se na popis podstaty neurotransmise a rozdělení neurotransimterů.
3. Další část věnovat popisu významných enzymů acetylcholinového systému (cholinacetyltransferáza, acetylcholinesteráza) a katecholaminového systému (tyrozinhydroxyláza, DOPA-dekarboxyláza, DOPA- β -hydroxyláza, monoaminoxidáza, katechol-O-methyltransferáza, aldehyddehydrogenáza).


Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **ca 30 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Katarína Vorčáková**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. září 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 20. 6. 2012

Leona Kubů

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat konzultantce své bakalářské práce Mgr. Katarině Vorčákové a vedoucí bakalářské práce Mgr. Šárce Štěpánkové Ph.D., za pomoc a veškerý čas, který mi věnovaly.

ANOTACE

Podněty z vnějšího a vnitřního prostředí jsou přijímány pomocí neuronů. Neurotransmitery zajišťují přenos jednotlivých informací a váží se na specifické receptory. Mezi nejrozšířenější patří acetylcholinové a katecholaminové receptory. Acetylcholinové synapse se účastní cholinacetyltransferáza a acetylcholinesteráza. Katecholaminového systému se účastní mnoho enzymů: tyrozinhydroxyláza, DOPA-dekarboxyláza, DOPA- β -hydroxyláza, monoaminoxidáza, katechol-O-metyltransferáza a aldehyddehydrogenáza. Porucha funkce těchto enzymů vede k mnoha onemocněním, zejména psychickým.

KLÍČOVÁ SLOVA

neurotransmise, acetylcholinesteráza, katecholaminový systém

TITLE

The important enzymes in neurotransmissions

ANNOTATION

The stimuli from outer environment are received by the means of neurons. Neurotransmitters are substances that permit the transfer of different pieces of information and bind to specific receptors. The most common receptors include: acetylcholine receptors, catecholamine receptors. The acetylcholine synapse contains the enzyme choline acetyltransferase and acetylcholinesterase. The catecholamine enzyme system is more complicated, it comprises these enzymes: tyrosine hydroxylase, DOPA-decarboxylase, DOPA- β -hydroxylase, monoamine oxidase, catechol-O-methyl transferase and aldehyde dehydrogenase. The malfunction of these enzymes can lead to severe diseases, especially psychiatric disorders.

KEYWORDS

neurotransmission, acetylcholinesterase, catecholamine system

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

A	adenin
ACH	acetylcholin
ACHE	acetylcholinesteráza
AMK	aminokyseliny
BH ₄	tetrahydropterin
C	cytosin
CK2	kasein kináza II
CNS	centrální nervová soustava
COMT	katechol-O-methyltransferáza
DBH	DOPA- β -hydroxyláza
DDC	DOPA-dekarboxyláza
G	guanin
GPI	glykosylfosfatidylinositová kotva
GTP	G-protein
HIS	histidin
CHAT	cholinacetyltransferáza
L-DOPA	L-3, 4-dihydroxyfenylalanin
MAO	monoaminoxidáza
MB-COMT	membránově vázaná forma COMT
mRNA	messenger ribonukleotidová kyselina
NA	norepinefrin, noradrenalin
OP	orgánofosfáty
PK	protein kináza (skupinu kináz závislých na bílkovinách)
PKA	protein kináza A
PKC	protein kináza C
PLP	pyridoxal-5'-fosfát
S-COMT	rozpustná forma COMT
T	thymin
TcACHE	acetylcholinesteráza (<i>Torpedo californica</i>)
TH	tyrosinhydroxyláza
U	uracil
α -CAMK	α -calcium/ calmodium dependentní protein kinázy II

OBSAH

1. ÚVOD	11
2. NEUROTRANSMISE	12
2.1 NEURON	12
2.2 SYNAPSE.....	13
2.3 MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL.....	16
3. NEUROTRANSMITERY	18
3.1. ACETYLCHOLINOVÝ SYSTÉM.....	18
3.1.1 <i>Cholinacetyltransferáza (EC 2.3.1.6)</i>	20
3.1.1.1 Funkce	21
3.1.1.2 Struktura enzymu	21
3.1.1.3 Varianty.....	22
3.1.1.4 Aktivita.....	23
3.1.2 <i>Acetylcholinesteráza (EC 3.1.1.7)</i>	23
3.1.2.1 Funkce	24
3.1.2.2 Struktura a genová podstata enzymu	25
3.1.2.3 Varianty.....	26
3.1.2.4 Aktivita.....	26
3.2 KATECHOLAMINOVÝ SYSTÉM.....	26
3.2.1 <i>Tyrosinhydroxyláza (EC 1.14.16.2)</i>	29
3.2.1.1 Funkce	29
3.2.1.2 Struktura a genová podstata enzymu	30
3.2.1.3 Varianty.....	30
3.2.1.4 Aktivita.....	31
3.2.2 <i>DOPA-dekarboxyláza (EC 4.1.1.2.8)</i>	31
3.2.2.1 Funkce	32
3.2.2.2 Struktura enzymu	33
3.2.2.3 Varianty.....	33
3.2.2.4 Aktivita.....	33
3.2.3 <i>DOPA-β-hydroxyláza (EC 1.14.17.1)</i>	33
3.2.3.1 Funkce	34
3.2.3.2 Struktura a genová podstata enzymu	34

3. 2. 3. 3 Varianty.....	35
3. 2. 3. 4 Aktivita.....	35
3. 2. 4 <i>Monoaminoxidáza (EC 1.4.3.4)</i>	36
3. 2. 4. 1 Funkce	36
3. 2. 4. 2 Genová podstata	37
3. 2. 4. 3 Varianty.....	37
3. 2. 4. 4 Aktivita.....	38
3. 2. 5 <i>Katechol-O-methyltransferáza (EC 2.1.1.6)</i>	38
3. 2. 5. 1 Funkce	39
3. 2. 5. 2 Genová podstata	39
3. 2. 5. 3 Varianty.....	40
3. 2. 5. 4 Aktivita.....	40
3. 2. 6 <i>Aldehyddehydrogenáza (EC 1.2.1.3)</i>	41
3. 2. 6. 1 Funkce	41
3. 2. 6. 2 Genová podstata	42
3. 2. 6. 3 Aktivita.....	43
4 ZÁVĚR.....	44
5. POUŽITÁ LITERATURA.....	45

1. Úvod

Podněty z vnějšího a vnitřního prostředí jsou přijímány pomocí nervové soustavy, jejíž hlavním stavebním kamenem je neuron. V neuronech se zpracovávají všechny informace, které jsou předávány do výkonných orgánů. Jednotlivé neurony jsou od sebe odděleny synaptickou štěrbinou. Informace jsou přenášeny pomocí různých přenašečů - mediátorů. Neurotransmitery jsou látky, které umožňují přenos přes synaptickou štěrbinu. Na postsynaptické membráně se váží na specifické receptory. Mezi nejvíce rozšířené receptory řadíme cholinergní receptory a adrenergní receptory (adrenoreceptory) [1].

Acetylcholinový systém zprostředkovává přenos nervového vzruchu na svalové vlákno. Mediátorem tohoto systému je acetylcholin (ACH). Enzym podílející se na jeho syntéze se nazývá cholinacetyltransferáza (CHAT). Naopak enzym, který katalyzuje hydrolýzu ACH, se nazývá acetylcholinesteráza (ACHE).

Katecholaminový systém zprostředkovává řadu adrenergních synapsí. Hlavními mediátory jsou katecholaminy (noradrenalin, adrenalin). Syntéza noradrenalinu (NA) a adrenalinu je několika stupňová reakce. Výchozí látka L-tyrozin je hydrolyzován tyrozinyhydroxylázou (TH) na L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Aby reakce proběhla, je zapotřebí přítomnost kyslíku a tetrahydropterinu. DOPA-dekarboxyláza (DDC) následně katalyzuje dekarboxylaci za vzniku dopaminu. Hydroxylací dopaminu dopamin- β -hydroxylázou (DBH) vzniká noradrenalin. V dřeni nadledvin reakce pokračuje přeměnou noradrenalinu na adrenalin. Tuto reakci katalyzuje monoaminoxidáza (MAO) za přítomnosti kyslíku a kyseliny askorbové. Syntéza noradrenalinu začíná v axoplazmě koncového nervového zakončení adrenergních nervových vláken a dokončena je uvnitř sekrečních váčků. Vzniklý noradrenalin je aktivním transportem přepravován do vezikul nervového zakončení. Noradrenalin, který nepodlehne transportu do vezikul, je destruován pomocí dvou enzymů (katechol-O-metyltransferáza, aldehyddehydrogenáza). Reakce s oběma enzymy mohou probíhat v jakémkoliv pořadí. Účinkem enzymů vznikají biologicky neúčinné deriváty, které jsou vylučovány močí.

Polymorfismy nebo nedostatek těchto enzymů způsobuje řadu onemocnění, zejména psychická onemocnění (Alzheimerova choroba, bipolární afektivní porucha,

schizofrenie a další). Studium těchto enzymů má obrovský význam v léčbě řady onemocnění [2].

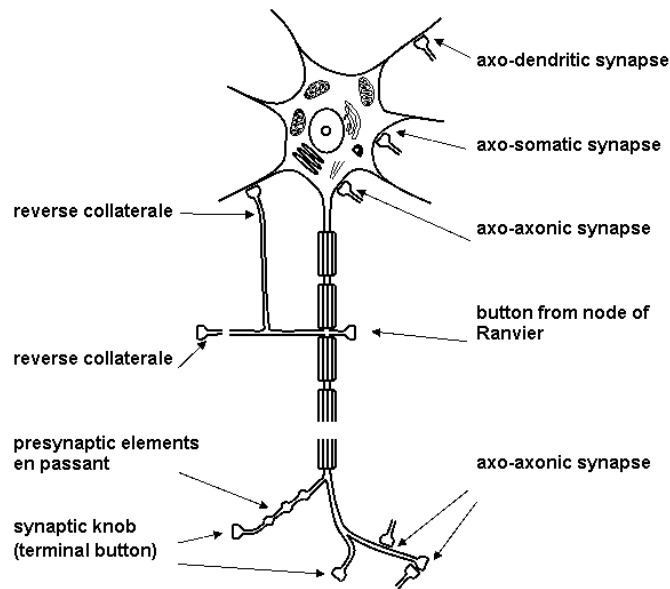
2. Neurotransmise

Neurotransmise neboli synaptický přenos zajišťuje komunikaci mezi neurony. Jedná se o přenos chemických látek i elektrických signálů přes synapse [1].

2.1 Neuron

Neuron je specializovaná jednotka centrálního nervového systému. Specializovanost této buňky spočívá ve schopnosti přijmout určité formy signálu a odpovědět pomocí speciálních signálů. Vývojovým předchůdcem je neuroblast. Svou stavbou a vzájemnými vztahy podněcuje činnost nervové soustavy. Stavba a velikost jednotlivých neuronů se značně liší, avšak některé vlastnosti zůstávají společné. V centrálním nervovém systému vytvářejí prostorovou síť, která je velice komplikovaná a vzájemně mnohočetně propojena. Tyto buňky jsou natolik diferencované, že během života daného jedince nemají schopnost se dále dělit, z čehož vyplývá nevratnost některých mozkových poškození.

Z morfologického hlediska se neuron (obr. 1) skládá z těla, dendritů a axonů. Axony jsou vyčnívající krátké výběžky. Receptivním segmentem neuronu jsou dendrity, které přijímají informace a šíří je do těla neuronu. Axony slouží k vedení vzruchů od těla neuronu. Axony se dělí, dle přítomnosti myelinu, do dvou skupin. Myelizované axony (myelin + Ranvierovy zářezy) jsou větší, kratší a rychleji vedou vzruchy než nemyelizované (menší, delší a pomaleji vedou vzruchy) [3, 4].



Obr. 1 Struktura neuronu [5]

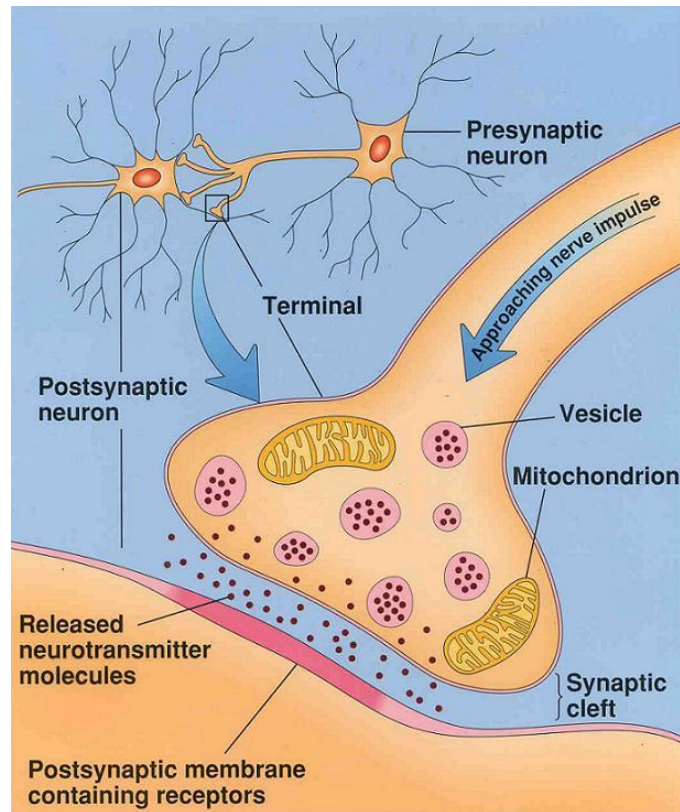
2. 2 Synapse

Synapse zajišťuje komunikaci mezi neurony prostřednictvím přenosu informací. Děj je jednosměrný, avšak jeho účinek může být jak excitační, tak i inhibiční. Jedná se o komunikaci axonu s jiným neuronem, svaalem či žlázou (všechny kontakty mezi membránami dvou buněk, kdy je alespoň jedna neurálního původu).

Rozlišujeme tři základní typy synapsí dle typu kontaktu: interneurální, neuroefektorové a neuroreceptorové. Rychlý přenos signálu nám zprostředkovávají synapse elektrické. U tohoto typu synapse prochází proud bez jakéhokoliv zdržení, protože jednotlivé membrány na sebe těsně přiléhají a jsou propojeny mezerovými spoji. V centrálním nervovém systému dochází především k synapsím chemickým. K přenosu signálu dochází mezi mediátory v presynaptické části. Následuje biologická odpověď zprostředkovaná receptory, které jsou uloženy v postsynaptické a presynaptické části neuronu. Mezi oběma částmi se nachází synaptická štěrbiná o šířce 20 - 30 nm. Mediátor (neurotransmitter) se uvolní a posléze difunduje z presynaptického oddílu do části postsynaptické. Zde se specificky váže na určité receptory, čímž se aktivuje elektrický tok. Koncentrace intracelulárního vápníku zde hraje významnou roli.

Otevřením kalciových kanálů v presynaptické membráně, dochází k transportu extracelulárního kalcia do nitra buňky, čímž dochází k aktivaci transportních proteinů. Vezikuly naplněné mediátorem jsou posouvány kontrakcí mikrotubulů směrem k presynaptické membráně (obr. 2). Exocytózou se mediátor uvolní z váčku a putuje

do synaptické štěrby. Spojením s postsynaptickou částí dochází k navázání mediátoru na receptor. Vznik tohoto komplexu aktivuje adenylátcyklázu, která podněcuje produkci cyklického adenosinmonofosfátu. Dále změna akčního potenciálu vyvolá změnu permeability membrány pro sodné, draselné a chloridové ionty. Zvýšená propustnost pro sodné ionty působí excitačně, zatímco účinek draselných a chloridových iontů je inhibiční. Tato kaskáda je vždy brzy inaktivována a brzy nastupuje odbourávání mediátorů [3, 4, 6].



Obr. 2 Přenos vzruchu synapsí [7]

Mediátory jsou specifické látky. Jejich struktura a specifický receptor určují typ synapse. Signální látky v nervovém systému rozdělujeme do dvou skupin.

➤ Nízkomolekulární mediátory

○ Excitační mediátory

- depolarizace postsynaptické membrány a vyvolání akčního potenciálu
- acetylcholin, noradrenalin.

- Inhibiční mediátory
 - zabránění vzniku akčního potenciálu – hyperpolarizace, což způsobí změnu permeability postsynaptické membrány
 - γ -aminomáselná kyselina, dopamin, glycin [8].

➤ Neuroaktivní peptidy

Neuroaktivní peptidy jsou považovány za mediátory pouze tehdy, když jsou syntetizovány v neuronu. Musí být přítomny v presynaptickém zakončení a pak uvolňovány v takovém množství, které je nutné pro vyvolání účinku na postsynaptickém neuronu či efektoru. Exogenní podání mediátoru musí vyvolat stejnou reakci jako endogenní podnět [8, 9].

Receptory pro mediátory se rozdělují na:

- 1) Cholinergní receptor se podílí na regulaci neuronální aktivity ve velké části mozku. Ovlivňuje jak funkce motorické, tak i chování, paměť a další. Jako mediátor zde působí acetylcholin. Rozlišujeme další dva typy těchto receptorů:

- Muskarinový receptor:
 - citlivý na muskarin (muskarin je kvartérní trimethylamoniová sůl derivátu tetrahydrofuranu, toxin izolovaný jako jedovatá složka muchomůrky *Amanita muscaria*) [10]
 - má dlouhou dobu latence, na kterou navazuje dlouhý účinek působení
 - vazbou ACH na receptor v srdečním svalu dojde k zastavení srdečního stahu během několika sekund
 - vyskytuje se v mozku, myokardu a hladkých svalech.
- Nikotinový receptor
 - citlivý na nikotin (hlavní alkaloid tabákového listu izolovaný z *Nicotiana tabacum*)
 - jedná se o transmembránový protein, který se skládá z pěti podjednotek

- na ACH reaguje rychlou depolarizací postsynaptické membrány během několika milisekund
- způsobují rychlé stahy kosterního svalstva
- výskyt na všech nervosvalových spojeních a v mnoha jiných místech nervové soustavy.

2) Adrenergní receptor (= adrenoreceptor) je membránově vázaný receptor. Rozlišují se α -receptory (1, 2) a β -receptory (1, 2, 3) s odlišnými funkcemi. Jako mediátor zde působí noradrenalin, adrenalin a látky jim podobné [6, 11].

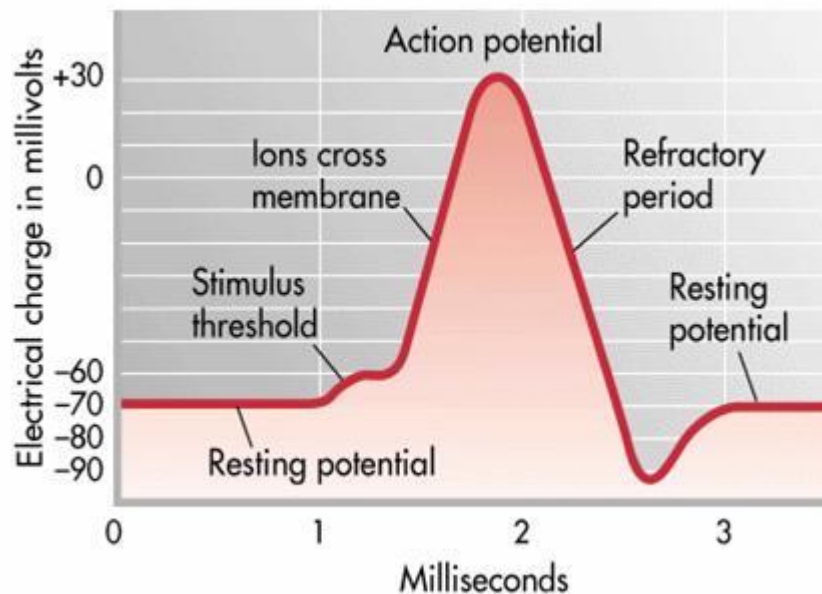
2.3 Membránový potenciál

Funkčním projevem činnosti neuronu je vzruch. Vzrušivá membrána je místem vzniku nervového vzruchu. Na jejím povrchu probíhají iontové změny.

Klidový membránový potenciál vyjadřuje rozdíl elektrochemických potenciálů mezi intracelulární a extracelulární stranou buněčné membrány. Slouží nám k průchodu vzruchu. Jeho hodnota je určena rovnovážným prouděním draselných iontů z a do buňky. Kladný náboj je na vnějším povrchu membrány a záporný na straně vnitřní. Na vnější straně membrány je mnohonásobně větší koncentrace sodných iontů než na její vnitřní straně, zatímco draselné ionty mají vně menší koncentraci, než na straně vnitřní. Koncentrace iontů je vyjadřována napětím. Rozdíl bývá přibližně 40 - 90 mV. Změnou koncentrace iontů na obou stranách membrány dochází k průchodu vzruchu. Konkrétně dochází k výstupu draselných iontů ven a sodných iontů dovnitř nervu. Intracelulární koncentrace vápenatých iontů výrazně ovlivňuje propustnost membrány pro jednotlivé ionty, což se projeví elektronegativnějším povrchem o 40 mV. Mezi tři faktory ovlivňující velikost klidového membránového potenciálu patří:

- rozdílná koncentrace iontů v extracelulární a intracelulární tekutině
- rozdílná propustnost buněčné membrány pro různé ionty
- činností sodno - draselné pumpy (v poměru 3 Na⁺ ven: 2 K⁺ dovnitř).

Akční potenciál je elektrický signál, který vzniká v důsledku pohybu iontů po membráně neuronu. Způsobuje reverzibilní změny membránového potenciálu. Akční potenciál je udáván interakcí mezi Na^+ (popřípadě i Ca^{2+}) a K^+ kanály, které se otevírají v přesném časovém sledu. Na^+ ionty vtékající do nitra buňky, ve směru koncentračního spádu způsobují depolarizaci předtím silně polarizované (axonální - neuronální) membrány. K^+ ionty ji následně repolarizují až na 70 % původní hodnoty membránového potenciálu. Tento rychlý vzestup a sestup potenciálu se nazývá hrotový potenciál (obr. 3). Membránový potenciál dosáhne původní klidové hodnoty během pomalejší následné depolarizace. Poté nastává hyperpolarizace a návrat na hodnotu klidového potenciálu [4, 5].



Obr. 3 Průběh akčního potenciálu [12]

(resting potential = klidový potenciál, stimulus threshold = stimulační práh, action potential = hrotový potenciál, resting potential = klidový potenciál)

Neuronální membrána je drážděna převážně chemicky, kdy reaguje na příslušný mediátor v místech, kde převažují chemicky řízené iontové kanály. Pokud převažují napětově řízené iontové kanály, tak je membrána drážděna elektricky a reaguje na změnu potenciálu [3, 6].

Goldmanova rovnice (2. 1) vyjadřuje permeabilitu membrány. Z rovnice vyplývá, že čím je permeabilita membrány pro daný iont větší, tím více se hodnota klidového membránového potenciálu podobá rovnovážnému potenciálu daného iontu. Goldmanovu rovnici membránového potenciálu lze využít i k výpočtům klidového a akčního potenciálu [9].

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_{out} + P_{Na} [Na^+]_{out} + P_{Cl} [Cl^-]_{in}}{P_K [K^+]_{in} + P_{Na} [Na^+]_{in} + P_{Cl} [Cl^-]_{out}} \quad (2. 1)$$

3. Neurotransmitery

Neurotransmitter je chemická látka uvolňovaná z nervového zakončení na synapsi. Slouží k přenosu impulzu přes synaptickou štěrbinu a umožňuje tak další šíření vzruchu nebo vyvolání určité reakce [13].

3. 1. Acetylcholinový systém

Acetylcholinový systém prostřednictvím svého specifického receptoru zprostředkovává přenos nervového vzruchu na svalové vlákno. Tento děj probíhá v 6-ti fázích.

V cytosolu nervového zakončení se za katalýzy acetylcholintransferázy syntetizuje acetylcholin z cholinu a acetyl-CoA.

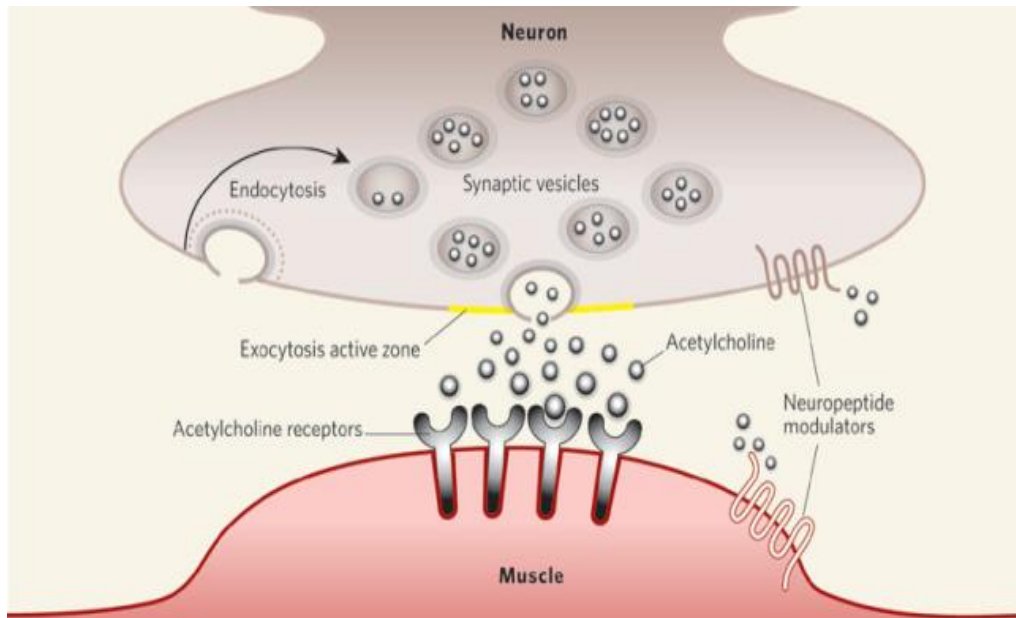
Vzniklý acetylcholin je skladován v sympatických vezikulách, které nasedají na cytoplazmatickou membránu. Jeden synaptický váček obsahuje zhruba 10^4 molekul ACH. K úplné depolarizaci ploténky je zapotřebí asi 400 vezikul. K uvolnění acetylcholinu z vezikul do synaptické štěrbiny dochází exocytózou. Současně také dochází ke splynutí vezikul v presynaptické membráně. V klidovém stavu dochází ke spontánnímu uvolnění mediátoru, které vyvolá malé potenciály na motorické ploténce. Při přenosu nervového impulzu dochází k depolarizaci nervového zakončení, což vede k otevření napěťově řízených vápenatých kanálků. Ca^{2+} putují ze synaptického prostoru do nervového zakončení. Tento děj a především jeho důsledek, přítomnost Ca^{2+} uvnitř, je nutný pro exocytózu uvolňující se acetylcholin. Dochází k vyloučení zhruba 200 vezikul.

Ve spojovacích záhybech se nacházejí specifické receptory, na které se ACH specificky naváže. Acetylcholinový receptor je iontový kanál ovládaný transmitterem. Má klíčovou úlohu při přenosu vzruchu z nervu na sval. Skládá se ze čtyř různých podjednotek ($\alpha_2\beta\gamma$), přičemž jedna je přítomna dvakrát. Všech pět tyčinkovitých podjednotek je uspořádaných symetricky do kruhu. Celý komplex je velmi dlouhý, zasahuje jak do synaptické štěrbin, tak i do cytoplazmy axonu. Na struktuře tohoto receptoru je nejzajímavější centrální kanál, který je napuštěný vodou. Všechny tyto poznatky nám umožňuje rentgenový paprsek a elektronový mikroskop. Jak již bylo výše zmíněno, tak i zde rozlišujeme acetylcholinové receptory muskarinového a nikotinového typu.

Po navázání dvou molekul ACH na receptor, dochází k jeho konformačním změnám, což má za následek otevření transmembránových kanálu, které umožňují proudění kationtů skrz membránu. Otevření těchto iontových kanálů trvá přibližně jednu milisekundu. Depolarizace svalové membrány, způsobená vstupem Na^+ iontů, vede ke vzniku ploténkového potenciálu. Následná depolarizace okolní svalové membrány slouží k vytvoření akčních potenciálů vedoucích ke kontrakci svalového vlákna.

ACH se uvolňuje z vazby na receptor při uzavírání kanálu a podléhá hydrolýze enzymem acetylcholinesterázou, za vzniku kyseliny octové a cholinu. ACHE je velmi významná a vyskytuje se v lamina basalis synaptického kanálu.

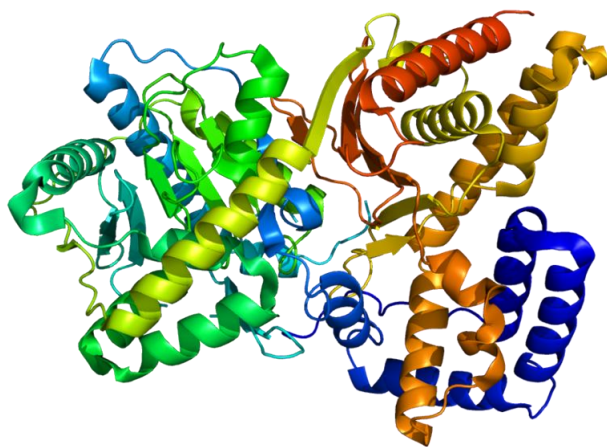
Vzniklý cholin je přenesen aktivním transportem do nervového zakončení, kde může být použit na syntézu ACH [2, 14].



Obr. 4 Přenos vzduchu na acetylcholinové synapsi [15]

3. 1. 1 Cholinacetyltransferáza (EC 2.3.1.6)

Cholinacetyltransferáza (obr. 5) patří k cholin/karnitinové rodině, která obsahuje karnitinacetyltransferázu), karnitinoctanoyltransferázu a karnitinpalmitoyltransferázu. Tato rodina enzymů se podílí na metabolismu mastných kyselin a na zachování hladiny acetyl-CoA [16].



Obr. 5 Struktura cholinacetyltransferázy [17]

3. 1. 1. 1 Funkce

Cholinacetyltransferáza je enzym, který katalyzuje syntézu acetylcholinu. Má zásadní význam na rozvoji a činnosti neuronů cholinergního systému. CHAT katalyzuje přenos acetylové skupiny z acetyl-CoA na cholin, čímž vzniká neurotransmitter acetylcholin. Hladina CHAT pravděpodobně přímo neovlivňuje syntézu ACH [18].

Tato jednkroková reakce je ve velkém kontrastu s procesem biosyntézy katecholaminů, jako je adrenalin a noradrenalin. Tyto látky jsou syntetizovány z thyrosinu ve více krocích zahrnujících mnoho různých enzymů [19].

Cholinergní neurony jsou distribuovány skrz centrální a periferní nervový systém. Zde se podílí na motorických funkcích, autonomním nervovém systému a různých integračních mozkových funkcích jako je učení a paměť. CHAT také katalyzuje syntézu ACH v nonnervových tkáních a i zde jsou považovány za důležité regulační molekuly v mnoha základních buněčných funkcích. I toto podtrhuje význam syntézy ACH a cholinergního systému [16].

Cholinergní neurony jsou zapojeny do neuropsychických funkcí jako je čtení, paměť, vzrušení a spánek. Dále také ovlivňují kardiovaskulární a dýchací systém.

Cholinacetyltransferáza je v současné době nejvíce specifickým ukazatelem funkčního stavu cholinergních neuronů v centrálním a periferním nervovém systému. Poruchy centrálních cholinergních neuronů jsou zapojeny do několika neurodegenerativních chorob jako je Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální sklerosa, u kterých nesouvisí s etiologií, ale spíše s klinickými příznaky. Nedávno byly abnormality CHAT prokázány i u schizofrenie a syndromu náhlého úmrtí kojenců [19].

3. 1. 1. 2 Struktura enzymu

Cholinacetyltransferáza je enzym, který je syntetizován v perikaryonu (oblast buňky přiléhající k jádru) cholinergních neuronů. Vyskytují se v některých jádrech lebečních nervů a také v předních a zadních rožích míšních. Imunochemické studie prokázaly, že imunoreaktivní neurony CHAT se vyskytují v 8 hlavních skupinách: CH1 – CH8. Tato klasifikace platí u popisu lidského centrálního cholinergního systému [16, 19].

Cholinacetyltransferáza je kulovitá jednořetězcová bílkovina obsahující histidin, arginin a zbytky cysteinu v aktivním místě nebo jeho blízkosti. CHAT obsahuje celkem 22 α šroubovic a 18 β vláken, které jsou rozděleny na N a C domény. Obě domény mají $\alpha + \beta$ záhyby a sdílejí společnou základní strukturu ze šesti parametrů β a tří šroubovic, které leží na jedné straně listu. Obě domény jsou strukturálně podobné monomery. Středem molekuly probíhá tunel, který zmenšuje její kontaktní plochu. Mezi β 10 a α 13 se nachází, již dříve identifikovaný, katalytický histidin (His334), který poukazuje na centrální tunel. Tento prostor je označován jako aktivní místo CHAT [16, 19].

Katalytické centrum CHAT je 16 Å dlouhý tunel, který je na rozhraní obou domén. V centru toho tunelu se nachází histidin (His334). Katalytický His334 leží mezi β -hřebenem S8 a šroubovicí H1. Poskytuje vazebné místo substrátu pro acetyl-CoA a acetylové skupiny akceptoru, kterým je cholin na CHAT [18, 19].

3. 1. 1. 3 Varianty

Cholinacetyltransferáza je kódována jedním genem, pro který existuje více přepisů diferenciálního využití a alternativního sestřihu tří nekódovaných exonů (3 – 5). U člověka se 3 ze 4 všech identifikovaných předpisů promítají do stejného 69 kDa proteinu. Iniciační kodon lidské CHAT je ACG. Cyklická DNA lidské CHAT má dva potenciální ACG (AUG pro mRNA) iniciační kodony k překlada, ve kterých se objevuje 324 bází (bp) před a 30 bp aminokyselin. Tyto dvě různé formy můžeme také rozdělovat dle jejich rozdílné atomové hmotnosti na 69 kDa a 82 kDa lidskou CHAT. Obě tyto formy jsou u člověka lokalizovány v mozku a míše. 82 kDa forma se liší o 118 aminokyselin na N- konci. Větší forma se vyskytuje zejména v jádrech buněk, naopak menší v cytoplasmě. Bílkoviny savčích CHAT jsou jedna k druhé vysoce homologní [19].

V cholinergních nervových zakončeních existuje CHAT nejméně ve dvou různých formách: rozpustná forma, která tvoří 80 % celkové aktivity enzymu a zbylý enzym je membránově vázaná neiontová forma. Dosud není zcela jasné na jaké membráně je tato forma CHAT navázána. Bylo zjištěno, že vrchol aktivity potkaní CHAT je v hypocampu ve stejné frakci jako jsou synaptické váčky a některé s nimi jsou dokonce spojeny. Tyto spoje mohou být zprostředkovány glykosylfosfatidylinositovými (PGI) kotvami. Zatímco v hlavě *Drosophila* nejsou

molekuly CHAT připojeny k synaptickým váčkům, ale k plazmatické membráně. S největší pravděpodobností jsou připojeny k určité membránové konstantě. Výsledky studií jsou dosti rozdílné z důvodu obtížného „čištění“ membránově vázané CHAT od rozpustné formy. Mnoho výsledků se nepodařilo potvrdit, a proto funkční význam těchto dvou forem zůstává nejasný [18, 19].

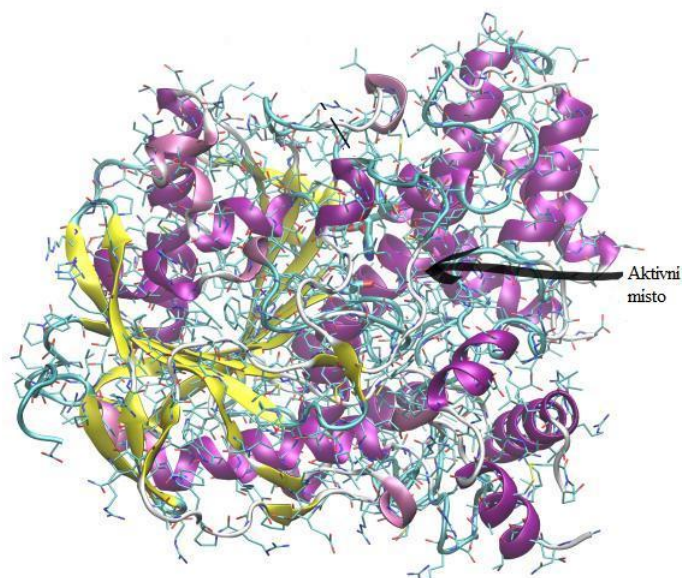
3. 1. 1. 4 Aktivita

Studie *in vitro* ukázaly, že rekombinantní enzym 69 kDa je substrátem pro syntézu protein kinázy C (PKC), kasein kinázy II (CK2) a α -calcium/calmodium dependentní protein kinázy II (α -CAMK), ale ne pro skupinu kináz závislých na bílkovinách (PK). Fosforylace CK2 a PKC zvyšuje aktivitu enzymu.

Enzym 82 kDa je podkladem pro PKC a CK2, ale ne pro PKA nebo α -CAM kinázy. Pouze u PKC může dojít ke zvýšení aktivity. Defosforylací obou forem enzymu alkalické fosfatázy dochází ke snížení jejich aktivity. Tato studie tedy ukazuje, že katalytická činnost CHAT je zvyšována fosforylací [20].

3. 1. 2 Acetylcholinesteráza (EC 3.1.1.7)

Acetylcholinesteráza (obr. 6) patří do rodiny cholinesteráz, což jsou enzymy hydrolyzující cholin rychleji než ostatní enzymy za optimálních podmínek. Patří sem hydrolázy serinu, které jsou v rodině esteráz vyšších eukaryot působících na různé typy karboxylových esterů. V lidském těle se vyskytují pouze dva typy těchto cholinesteráz, acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza [21, 22].



Obr. 6 Struktura acetylcholinesterázy [23]

3. 1. 2. 1 Funkce

Acetylcholinesteráza je enzym, který hydrolyzuje mediátor ACH. Je to membránově vázaný glykoprotein vyskytující se v několika různých formách. Přítomný je zejména v nervosvalových spojeních a cholinergních synapsích v centrálním nervovém systému, kde zakončuje synaptický přenos. Dále se také vyskytuje v erytrocytech, plicích, slezině, játrech, hladkých svalech, střevě, slinivce a bílé hmotě mozku [21].

Hydrolyza ACH začíná vytvořením esterové vazby mezi cholinem a aktivním místem enzymu. Imidazolový dusík histidinu katalytické triády může tvořit přechodnou vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou serinu, která podporuje nukleofilní reakce. Po vytvoření této vazby může imidazolová skupina usnadňovat přenos acetylové skupiny hydroxyly s vodou ze serinu. Dále následuje rychlá hydrolyza acetylovaného enzymu produkujícího kyselinu octovou a obnovování esterové části [21, 22].

Četné studie naznačují, že ACHE plní mimo svou „klasickou“ funkci i funkce „neklasické“. Mezi které se zahrnuje např.: hydrolyza ACH v nesynaptických částech, diferenciace hematopoetických buněk. Také může působit jako adhezivní bílkovina ovlivňující vývoj a údržbu synapsí, nebo se může zapojovat do růstu neuritů [22].

3. 1. 2. 2 Struktura a genová podstata enzymu

Molekulová hmotnost ACHE je kolem 60- 70 kDa má elipsoidní tvar. Skládá se z 12 spletených, centrálně smíšených β listů, které jsou obklopeny 14-ti α šroubovicemi a nejdůležitější strukturou je úzká soutěska vedoucí na aktivní místo, která je lemována 14-ti aromatickými konzervovanými prstenci. V rámci studie této bílkoviny byly prokázány dvě odlišné domény katalyticky aktivního místa a to sice aromatická (esterová) prohlubeň a aniontová část katalyticky aktivního místa. Esterová část obsahuje katalytickou triádu: Ser 200, His 400 a Glu 327. Tato trojice se odlišuje od jiných serinových proteáz svým třetím členem Glu, na rozdíl od Asp. Aniontová část je definována: Trp 84, Phe 330 a Phe 331. Jejím úkolem je orientovat nabitou část substrátu vstupujícího do aktivního místa. Tuto úlohu obstarává zejména Trp zbytek. Aktivní katalytické místo ACHE je umístěno hluboko do prohlubně a i přesto se jedná o tak rychlý enzym. Bylo prokázáno, že vazebné místo je, jak pro kvartérní ligandy (edrophonium, N-methylakridinium), které působí jako kompetitivní inhibitory, tak kvartérní oximy, které slouží jako efektivní reaktivátory ACHE inhibované organofosfáty [21, 22, 24].

Na acetylcholinestráze bylo prokázáno jedno nebo více vazebných míst pro další ACH a jiné kvartérní struktury. Jsou označovány jako „periferní aniontová místa“.

První krystaly ACHE byly získány z tetramerové struktury očištěním tkáně elektrického orgánu *Electrophorus electricus*. Byla hlášena předběžná charakteristika, ale žádné strukturní údaje nebyly získány. V roce 1991 byla jako první určena krystalová struktura acetylcholinesteráza *Torpedo californica* (TcACHE). TcACHE je připojena k homodimeru plazmatické membrány prostřednictvím GPI kotvy. GPI je kovalentně připojeno k C-konci každého monomeru a fosfatidylová polovina slouží jako hydrofobní kotva. Dimer lze selektivně vyčistit od bakteriální fosfatidylové poloviny specifickou fosfolipázou C [24, 25].

Díky alternativnímu sestřihu C-konce acetylcholinesterázové mRNA vznikají různé isoformy. Acetylcholinestráza-T (koncová) se vyskytuje mozku a svalech dospělých savců. Na konci nervosvalové pleteně se nacházejí jedna až tři tetramerové podjednotky ACHE-T. ACHE-H (=E, erytrocytární) přepis vytváří GPI ukotvené dimery, které se u vyšších obratlovců vyskytují především v zárodečné tkáni a na povrchu krevních buněk. ACHE-R („readthrough“) vzniká v důsledku

nedostatku spojovacího proudu společných konstitutivních exonů kódujících katalytickou doménu, vznikají rozpustné monomery, které se uplatňují při stresu [22, 26].

Lidská acetylcholinesteráza je kódována jedním genem, který je lokalizovaný na 7. chromozomu a skládá se ze šesti exonů.

3. 1. 2. 3 Varianty

Acetylcholinesteráza může existovat v různých globulárních formách: G1-monomerní, G2-dimerní a G4-tetramerní, což jsou katalytické podjednotky lišící se v glykosylaci. Globulární formy se mohou dále dělit dle typu připevnění k buněčné membráně. Stejně tak se mohou rozlišovat i formy kolagenní na A4, A8 a několik asymetrických forem A12, které se vážou k bazální membráně [21].

3. 1. 2. 4 Aktivita

Enzym acetylcholinesteráza vykazuje zvýšenou aktivitu zejména v cholinergních synapsích CNS, nervových spojeních, ale i v membránách erytrocytů.

Od 30. let 20. století jsou zkoumány organofosfátové (OP) inhibitory, vůči kterým je ACHE velmi citlivá. OP blokuje serinový hydroxyl enzymu, jedná se o nevratnou (irreverzibilní) inhibici, která vede k nahromadění ACH v periferních efektech, vegetativních gangliích a nervosvalovém spojení. Zejména nervově paralytické látky jsou velmi nebezpečnou skupinou OP [27].

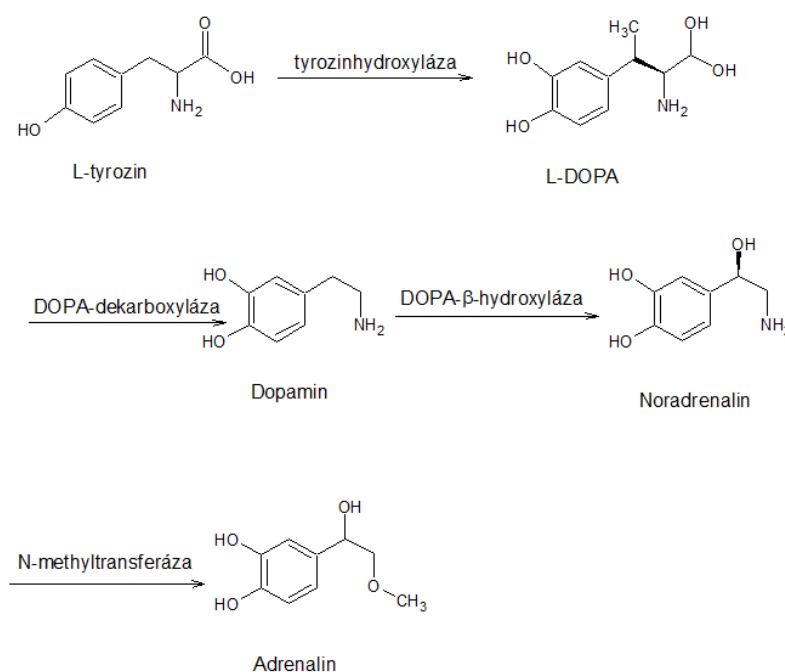
Acetylcholinesteráza je dále cílem řady přírodních toxinů a umělých jedů, ale také léků používaných k léčbě neuromuskulárních poruch a k první generaci léků proti Alzheimerově chorobě. Tyto blokátory enzymu ACHE způsobují vratnou (reverzibilní) inhibici [22].

3. 2 Katecholaminový systém

Mediátorem většiny adrenergních synapsí je noradrenalin (. Spolu s adrenalinem a dopaminem patří mezi katecholaminy, což jsou 3,4-hydroxyderiváty fenylethylaminu. Jejich syntéza probíhá v chromafinních buňkách dřeně nadledvin, ale také v srdci,

játrech, ledvinách, gonádách a adrenergních neuronech. Všechny tyto deriváty jsou významnými prvky v reakci na těžký stres.

Syntéza noradrenalinu (obr. 7) začíná v axoplazmě koncového nervového zakončení adrenergních nervových vláken a dokončena je uvnitř sekrečních váčků. NA vzniká z tyrozinu v několikastupňové reakci. Nejprve L-tyrozin podléhá hydroxylaci kruhu účinkem cytoplazmatické tyrozinhydroxylázy (tyrozin-3-monooxygenáza) za vzniku 3,4-dihydroxyfenylalaninu (DOPA). Tato reakce potřebuje přítomnost kyslíku a tetrahydropterinu. DOPA následně podléhá dekarboxylaci účinkem dekarboxyláz aromatických L-aminokyselin (DOPA-dekarboxyláza) a vzniká dopamin. Hydroxylací dopaminu za katalýzy dopamin- β -hydroxylázy vzniká noradrenalin. V dřeni nadledvin tato reakce pokračuje ještě o krok dále k přeměně asi 80 % noradrenalinu na adrenalin, a to sice N-metylací za katalýzy monoaminoxidázou a za účasti vitamínu C (kyselina askorbová) a kyslíku. Vzniklý NA je aktivním transportem přepraven do vezikul nervového zakončení [2, 28].



Obr. 7 Syntéza adrenalinu a noradrenalinu [27]

Noradrenalin je uvolňován z vezikul do synaptické štěrbině podobným mechanismem jako ACH. Difuzí překonává synaptickou štěrbinu a na postsynaptické membráně interaguje s adrenergním receptorem, který je spřažený s G-proteinem - GTP. GTP jsou pravděpodobně nejkomplexnější skupinou membránových kanálů,

protože jsou ovlivněny nejen neurotransmitery a hormony, ale i různými pachy, účinkem světla a řadou dalších faktorů. Také regulují některé metabolické děje v buňce např. genovou expresi, složení cytoskeletu a růst buněk. Mají důležitý fyziologický význam. Vazba NA s receptorem nevede k uniformní odpovědi [8, 29].

Rozlišují se dva druhy receptorů, α a β . Rozdíl spočívá v rozdílném způsobu přenosu vzruchu. α -receptory jsou stejně citlivé k adrenalinu i noradrenalinu. Rozlišujeme α_1 a α_2 adrenoreceptory. V lidském těle převažují α_1 a obvykle způsobují kontrakci buněk hladké svaloviny. α_2 -receptory se nacházejí v presynaptických terminálech adrenergických nervů. Fungují jako negativní zpětná vazba výdeje neurotransmiterů. β -receptory jsou stimulovány především adrenalinem, ale účinek je stejný (adrenalin i NA). β_1 se nacházejí v srdečním svalu, kde zvyšují srdeční frekvenci a kontraktilitu, a v ledvinách, kde podporují uvolňování reninu z ledvin. β_2 jsou lokalizovány v hladkých svalových buňkách a stěnách bronchů. β_3 byly nalezeny v tukové tkáni a podporují lipolýzu [30].

Až 90 % uvolněného NA je zpětně aktivně transportováno do vezikul. Zbytek katecholaminů (adrenalin a noradrenalin) je rychle destruován dvěma enzymy: katechol-O-metyltransferázou (COMT- catechol-O-methyltransferase) a monoaminoxidázou. Reakce s oběma enzymy mohou nastávat v jakémkoliv pořadí. Játra jsou bohatá na oba enzymy, a proto spolurozhodují o rychlosti eliminace katecholaminů.

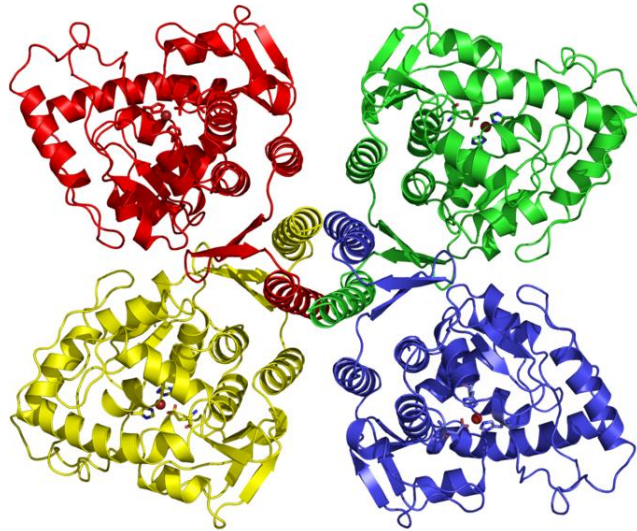
Katechol-O-methyltransferáza se nachází v cytosolu mimo adrenergní receptory. Metylací katecholaminu na *m*-hydroxyskupině vzniká normetanefrin (metanefrin), který již nemá sympatomimetické účinky.

Monoaminoxidáza se vyskytuje v mitochondriích adrenergických neuronů a jiných buňkách. Oxidativně deaminuje normetanefrin za vzniku aldehydů, které se působením aldehyddehydrogenáz rychle přeměňují na deriváty kyseliny mandlové. Vzniklé deriváty jsou biologicky neúčinné a vylučují se močí.

Většina postgangliových neuronů jsou adrenergního typu. Tyto postgangliové neurony jsou také označovány jako synaptický vysílač, protože podmiňuje téměř všechna synaptická vylučování v nervové tkáni [28, 29].

3. 2. 1 Tyrozinhydroxyláza (EC 1.14.16.2)

Tyrozinhydroxyláza patří do rodiny aromatických aminokyselinových hydroxyláz. Do této skupiny dále patří: fenylalaninhydroxyláza a tryptofanhydroxyláza. Enzymy této rodiny jsou strukturně a katalyticky příbuzné. Všechny vyžadují pro svou katalýzu kofaktor tetrahydropterin (BH_4), železo (Fe^{2+}) a kyslík [31, 32].



Obr. 8 Struktura tyrozinhydroxylázy [33]

3. 2. 1. 1 Funkce

Tyrozinhydroxyláza působí jako oxidoreduktáza a je limitujícím enzymem, při biosyntéze katecholaminů. Určuje rychlost jejich biosyntézy. Tento enzym se vyskytuje v rozpustné, ale i vázané formě, ale pouze ve tkáních, kde probíhá syntéza katecholaminů.

Enzym ovlivňuje průběh mnoha fyziologických procesů, má vliv také na emoční stabilizaci, stárnutí a vzdělávání [31, 34].

Tyrozinhydroxyláza katalyzuje první krok syntézy katecholaminů (obr. 7) v přítomnosti kyslíku, železa a BH_4 . TH přeměňuje L-tyrozin na L-DOPA.

Nedostatek tyrozinhydroxylázy vede k deficitu neurotransmiterů: dopaminu, noradrenalinu a adrenalinu, což může způsobit vývojové zpoždění, centrální a periferní hypotonii, teplotní nestabilitu a mnoho dalších komplikací. Diagnóza deficitu TH je

založena na měření neurotransmitterových metabolitů a pterinů v mozkomíšním moku [32].

Tyrosinhydroxyláza může hydroxylací fenylalaninu tvořit tyrozin, který je pak převeden na L-DOPA. Tato alternativní syntéza může mít význam při léčbě pacientů trpících fenylketonurií, což je stav, při kterém je funkce fenylaalaninhydroxylázy v útlumu [35].

3. 2. 1. 2 Struktura a genová podstata enzymu

Tyrosinhydroxyláza je homokvarterní molekula, která se skládající se ze tří strukturních domén: N-koncové regulační domény, C-koncové tetramerizační domény a katalytické domény. Katalytická TH doména (tvořena zbytky 185- 486) se skládá ze 13 α šroubovic, šesti vláken β a množství dlouhých smyček. Regulační doména zvyšuje substrátovou specifitost katalytické domény. Aktivním místem je prohlubeň ve středu katalytické domény. Prohlubeň je lemována především čtyřmi α šroubovicemi: α - 6, 7, 8 a 9 [31, 32].

Gen tyrosinhydroxylázy člověka je lokalizován na krátkém raménku 11. chromozomu. Tato oblast je velice bohatá na daný gen. U člověka je syntetizován pouze jeden typ přepisu genu TH. TH peptidy jsou kódovány alternativním sestřihem mRNA. Jednotlivé peptidy se od sebe liší délkou aminokyselinového řetězce a počtem fosforylovaných míst, které určují kinetické vlastnosti, stabilitu a aktivaci enzymu [31, 34].

3. 2. 1. 3 Varianty

U člověka se vyskytují čtyři druhy mRNA, které vznikají na základě alternativního sestřihu jednoho primárního přepisu. Čtyři formy lidské TH (hTH1, hTH2, hTH3, hTH4) mají rozdílné a specifické enzymatické vlastnosti. Všechny izoformy hTH jsou různě rozloženy ve tkáních. hTH1 a hTH2 jsou detekovány zejména v mozku a dření nadledvin, hTH3 a hTH4 v lidských nádorech feochromocytomech [31, 32, 34, 36].

3. 2. 1. 4 Aktivita

Účinek tyrozinhydroxylázy je regulován zpětnovazebnou inhibicí a inaktivací katecholaminů a aktivována je fosforylací. Regulace aktivity TH probíhá třemi způsoby:

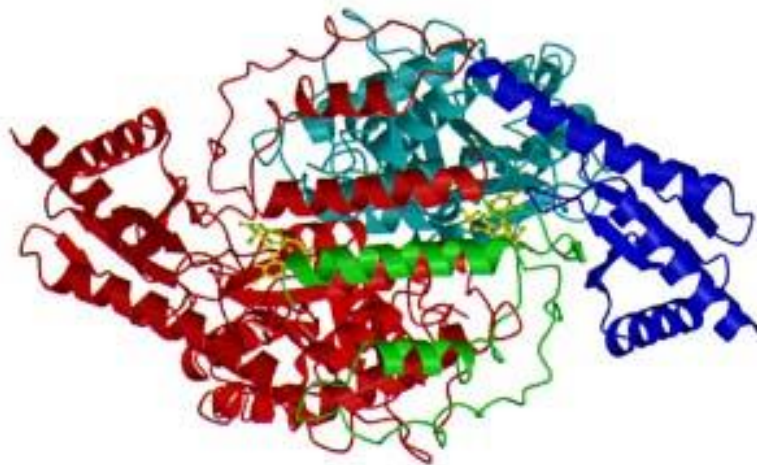
- 1) přesně definovaná allosterická inhibice, při které soutěží o vazebné místo na pterinovém kofaktoru katecholaminy s TH
- 2) inaktivace deriváty tyrozinu
- 3) nově objevená inaktivace v důsledku vazby katecholaminu na Fe^{3+} v aktivním místě enzymu.

Aktivaci TH způsobuje fosforylace: serinových zbytků různými proteinkinázami. Tato místa mohou být fosforylována nejméně 9 proteinkinázami, jako je např. proteinkináza A a C, Ca^{2+} /kalmulin dependentní kinázy II, ale potřebují proteinové aktivátory. Fosforylace Ser-40 cAMP (bílkovina závislá na bílkovinné kináze PKA) je nejvýznamnějším aktivátorem TH [37].

3. 2. 2 DOPA-dekarboxyláza (EC 4.1.1.2.8)

DOPA-dekarboxyláza je pevně spojený α 2-dimerní enzym patřící do třídy aromatických L-aminokyselinových dekarboxyláz II. skupiny. Tento enzym se nachází v cytoplazmě a je vylučován do neuronálních i nonneurálních tkání.

DOPA-dekarboxyláza katalyzuje dekarboxylaci DOPA na dopamin i přeměnu L-5-hydroxytryptofanu na serotonin, což jsou důležité neurotransmitery. Dále se také podílí jako jediný enzym na syntéze biogenních (stopových) aminů: 2- fenylthylamin, p-tyramin a tryptamin, které působí jako modulátory centrální neurotransmise [38].



Obr. 9 Struktura DOPA-dekarboxylázy [39]

Bylo prokázáno, že geny podílející se na dopaminergním systému hrají hlavní úlohu při predispozici k mnoha neurologickým onemocněním: porucha pozornosti s hyperaktivitou, bipolární afektivní porucha, Parkinsonova choroba, schizofrenie a deprese.

3. 2. 2. 1 Funkce

DOPA-dekarboxyláza je enzym, jehož účinek je závislý na pyridoxal-5'-fosfátu (PLP). Katalyzuje dekarboxylaci L-3,4-dihydroxyfenylalaninu na dopamin. Dále také dekarboxylaci L-5-hydroxytryptofanu na serotonin. Hladina PLP určuje poměr mezi apoenzymem a holoenzymem, tedy reguluje aktivitu enzymu.

Na rozdíl od jiných reakcí biosyntézy katecholaminů, které jsou omezené pouze v synaptických nervových zakončeních a v dřeni nadledvin, probíhá dekarboxylace na dopamin lokálně, např. většina dopaminu v moči pochází z dekarboxylace kolujícího DOPA v tubulech ledvin.

DOPA-dekarboxyláza se vyskytuje v mozku. PLP přechází hematoencefalickou bariéru ve formě prekurzoru vitamínu B: pyridoxal, pyridoxin, nebo pyridoxamina pak je opět fosforylován pyridoxal kinázou. Při nedostatku vitamínu B₆ v CNS, nebo při dědičných vadách pyridoxal kinázy, dochází ke změnám v rovnováze mezi apo- a holo- enzymem a představují příčinu některých neurologických chorob (např. epilepsie, psychiatrické poruchy) [40, 41].

3. 2. 2. 2 Struktura enzymu

Skupina II dekarboxylázy jsou homodimery, každý monomer se skládá ze tří domén. První velká doména (L-dopamin) je tvořena centrální pleťí sedmi β -listů, které jsou obklopeny α -helixem. Druhá velká doména je C-terminální doména, která obklopuje L-dopamin. Obě tyto domény jsou typické pro rodinu aspartátaminotransferáz. Třetí terminální doménou je N-doména, která je tvořena třemi α -šroubovicemi a záhybem, který je potřebný k navázání PLP a je charakteristický pro skupiny II dekarboxylázy. Ve strukturách holoenzymu je aktivní místo hluboko v centrální části dimeru a je přístupné pouze prostřednictvím úzké rokle [41].

Mutace v kódování nebo promotorových oblastech tohoto genu by mohly změnit funkci nebo množství enzymu, a proto vést k produkci abnormálních hladin dopaminu [38].

3. 2. 2. 3 Varianty

Rozlišujeme pět alternativních konformací aktivního místa. Všechny rozdíly jednotlivých konformací jsou v posledních sedmi reziduích. První konformace je uzavřený holoenzym DDC. Další čtyři struktury se rozlišují dle obsazenosti aktivního místa otevřeného monomeru PLP od 0 po 1 [38].

3. 2. 2. 4 Aktivita

DOPA-dekarboxyláza je široce distribuovaný enzym. Nachází se v nervových tkáních, kde se účastní biosyntézy neurotransmiteru, ale také v non-neuronálních tkáních jako jsou nadledviny, ledviny, játra, zažívací trakt a plíce [42].

3. 2. 3 DOPA- β -hydroxyláza (EC 1.14.17.1)

DOPA- β -hydroxyláza existuje v dimerní i tetramerní formě se dvěma atomy mědi na monomerní podjednotce. Podobně jako TH i DBH je exprimován pouze ve tkáních, které syntetizují a uskladňují katecholaminy ve vezikulách sympatických nervových zakončení a v chromafinních granulích (chromafinní buňky dřeně

nadledvin). Dále byla zjištěna přítomnost v některých periferních orgánech, jako jsou játra, nadledviny a leukocyty u potkanů a člověka.

Solubilní frakce DBH je uvolňována společně s katecholaminy během neurosekrečních procesů. Na rozdíl od noradrenalinu není zpětně vychytávána do nervových zakončení [43].

3. 2. 3. 1 Funkce

Enzym není substrátově specifický, protože oxiduje téměř každý fenylethylamin. Dopamin- β -hydroxyláza katalyzuje beta-hydroxylaci dopaminu, ze kterého vzniká noradrenalin. DBH vyžaduje vitamin C jako donor iontů vodíku, měď a molekulární kyslík. DBH se strukturálně podobá TH a inhibuje její účinek [43].

Protože DOPA- β -hydroxyláza se nachází v synaptických váčcích, tak konečný krok v syntéze NE probíhá zde. Ve váčku je zabalen NE společně s ATP a dalšími surovinami, které jsou potřebné pro případnou expresi.

Nedostatek DOPA- β -hydroxylázy je velmi vzácná forma primárního autonomního selhání. Vyznačuje se naprostou absencí noradrenalinu a adrenalinu spolu se zvýšenou hladinou dopaminu v plazmě. Tento syndrom je způsoben různorodými změnami v genu DBH a dědičným autozomálně recesivním onemocněním. Prevalence deficitu DBH není známa. Nedostatek DBH je charakterizován zejména kardiovaskulárními poruchami a těžkou ortostatickou hypotenzí.

Zatímco deficit DOPA- β -hydroxylázy je vzácné onemocnění u dospělých, mnohem častěji se vyskytuje v perinatálním období. Deficit způsobuje hypotenzi, hypoglykemie a podchlazení. Předpokládá se, že jeho nedostatek je zodpovědný za řadu potratů a úmrtí novorozenců.

Obnovy hladiny systémového NE do fyziologického rozmezí lze dosáhnout systematickou léčbou předchůdcem NE, L-threo-dihydroxyfenylserinem [44].

3. 2. 3. 2 Struktura a genová podstata enzymu

DOPA- β -hydroxyláza se nachází v dimerní i tetramerní formě. Každá podjednotka monomeru obsahuje dva atomy mědi. Čtyři podjednotky jsou spojeny

disulfidovými můstky do dvou dimerů. Tyto dimery jsou propojeny nekovalentními vazbami.

DOPA- β -hydroxyláza je kódována pouze jedním genem. Skládá se z 12 exonů, které poskytují dvě skupiny alternativní polyadenylace.

Geny kódující DOPA- β -hydroxylázu a tyrozinhydroxylázu obsahují společné regulační elementy a reagují souběžně na nervový růstový faktor, glukokortikoidy a cAMP [43].

3. 2. 3. 3 Varianty

DOPA- β -hydroxyláza je přítomna v chromafinních buňkách nadledvin ve dvou imunologicky zcela nerozeznatelných formách: rozpustné a membránově vázané. Tyto dvě odlišné formy mohou být odděleny pouze zkříženou elektroforézou. Rozlišujeme rozpustnou formu (relativní M = 73 kDa) a membránově vázanou formu (relativní M = 77 kDa). Obě formy se vyskytují přibližně ve stejném množství. Rozpustný enzym je v době vezikulární exocytózy uvolňován a je pravděpodobně zdrojem enzymu přítomného v krvi.

Bylo prokázáno, že z membránově vázané DBH vzniká její rozpustná forma. Tato skutečnost značí, že pocházejí ze společného genu. Rozložení těchto forem DBH je ovlivňováno extracelulárními signály. Tímto způsobem by mohla být regulována aktivita daného enzymu [43, 45].

Analýzou klonů DBH byly odhaleny dva typy cyklické DNA DBH: typ A a typ B. Poměr typu A a B mRNA v chrochromocytomech byl 5:1. Oba druhy mají stejnou aminokyselinovou sekvenci, ale liší se v délce cDNA o 300 bp [43, 46].

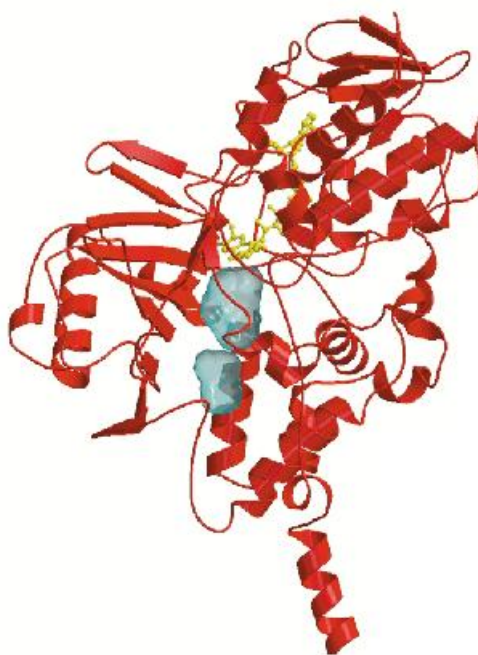
3. 2. 3. 4 Aktivita

DOPA- β -hydroxyláza je přítomna v chromafinních buňkách nadledvin. Rozlišujeme osoby s nízkou a vysokou aktivitou plazmatické formy DBH. Vyšší méně stabilní tlak se vyskytuje u osob s vyšší hladinou plazmatické DBH.

Aktivita DOPA- β -hydroxylázy v plazmě je užitečným indexem andrenergní funkce. Dalším užitečným ukazatelem je měření imunologické aktivity, avšak použité protilátky musí pocházet s lidských zdrojů [43].

3. 2. 4 Monoaminoxidáza (EC 1.4.3.4)

Monoaminoxidáza (obr. 10) je membránově vázaný enzym, který katalyzuje oxidační deaminaci aminů a inhibuje neurotransmitery a hormony. Monoaminergní systém je považován za jeden z klíčových mechanismů pro modulaci emocí a nálady [47].



Obr. 10 Struktura monoaminoxidázy B [48]

3. 2. 4. 1 Funkce

Monoaminoxidáza se nachází ve vnější mitochondriální membráně. Katalyzuje rozklad monoaminů (včetně serotoninu, noradrenalinu, dopaminu a phenylethylaminu) na odpovídající aldehydy, které jsou poté přeměněny na oxidované kyseliny aldehyddehydrogenázami nebo na alkoholy či glykoly aldehydreduktázami. MAO přednostně oxiduje serotonin, noradrenalin, dopamin [47, 49].

Vedlejší produkty těchto reakcí zahrnují řadu potenciálně neurotoxických látek jako je peroxid vodíku a amoniak. Zejména peroxid vodíku může vyvolat tvorbu

reaktivních forem kyslíku, které mohou vyvolat poškození mitochondriálních neuronů a apoptózu [47, 49].

Monoaminoxidáza hraje rozhodující roli v některých psychiatrických a neurologických poruchách včetně deprese a Parkinsonovy nemoci. Inhibice MAO zvyšuje hladinu neurotransmiterů v centrálním nervovém systému. Hledání efektivních inhibitorů představuje jednu z možností vedoucích k rozvoji nových léků daných nemocí [50].

Farmaceutické a akademické laboratoře vyvinuly inhibitory MAO, které se využívají v klinické praxi. Patří mezi ně sedm různých MAO inhibitorů, které jsou schválené americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA (Food and Drug Administration).

Studium tohoto enzymu má obrovský význam v léčbě rezistentní deprese a atypické deprese (podtyp depresivní poruchy charakterizovaný bulimií) [49, 51].

3. 2. 4. 2 Genová podstata

Gen pro monoaminoxidázu se skládá z 15 exonů, které jsou umístěny na desátém chromozomu p11.23. MAO obsahuje flavinadenindinukleotid, který je kovalentně vázán na zbytek cysteinu prostřednictvím 8 α -(S-cysteiny)-riboflavinové vazby [52].

3. 2. 4. 3 Varianty

Rozlišujeme solubilní a membránově vázanou formu enzymu. Rozdíl spočívá v mutaci jednoho zbytku smyčky aminokyselin. Tento zbytek je daleko od aktivního centra. Rozpustná forma má menší účinnost než membránově vázaná forma. Flexibilní smyčka 108-118 usnadňuje ukotvení v membráně.

Monoaminoxidáza má dva podtypy, MAO A a MAO B. Oba geny jsou lokalizovány na 10. chromozomu, avšak v opačném směru s opačnou orientací. Mají stejný počet exonů (15) a intronů. Jejich aminokyselinové sekvence jsou až v 70 % stejné. Primární sekvence je velmi důležitá k určení rozdílů v katalytické aktivitě mezi MAO A a B. Strukturní rozdíly mezi MAO A a MAO B vyplývají zejména z Ile335

v MAO A vs. Tyr326 v MAO B. Obě struktury mají C-terminální transmembránový helix [53].

Každý enzym má svůj jedinečný substrát a inhibitor. Bylo zjištěno, že substrátová a inhibitorová specifčnost obou forem je dána rozdílností ve vnitřní části. MAO A je selektivně inhibována clorgylinem, zatímco aktivita MAO B je potlačována deprenylem.

Gen monoaminoxidázy B je umístěn na 13. intronu, který je spojen s enzymatickými aktivitami v mozku. Tento gen obsahuje polymorfismus [47, 54].

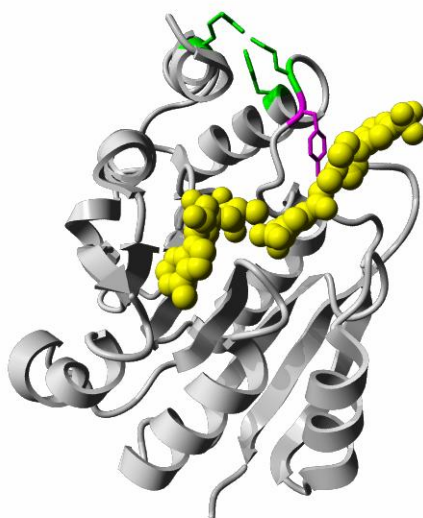
3. 2. 4. 4 Aktivita

Monoaminooxidáza A preferuje oxidační deaminaci serotoninu, adrenalinu a noradrenalinu, zatímco MAO B přednostně katalyzuje přeměnu benzylaminu a fenylethylaminu.

V mozku a katecholaminergních neuronech je převážně lokalizována MAO A, zatímco MAO B je v serotonergních a histaminergních neuronech a astrocytech [47].

3. 2. 5 Katechol-O-methyltransferáza (EC 2.1.1.6)

Katechol-O-methyltransferáza (obr. 11) je jedním z enzymů podílejících se na inaktivaci dopaminu a noradrenalinu. Dále má také velký význam ve farmakologii [55].



Obr. 11 Struktura katechol-O-methyltransferázy [56]

3. 2. 5. 1 Funkce

Katechol-O-methyltransferáza katalyzuje hlavní degradativní cestu katecholaminových neurotransmiterů (adrenalin, noradrenalin). K tomu, aby proběhla tato reakce je za potřeby přítomnosti bivalentního kationtu S-adenosylmethioninu, jako donora methylové skupiny, a hořčík. COMT přenáší methylové skupiny z S-adenosylmethioninu na příslušné přenašeče. Katalyzuje předání methylové skupiny, nejčastěji do polohy *meta* benzenového kruhu příslušného katecholaminu. COMT je paralelně omezován MAO při přeměně kyseliny 3,4-dihydroxyfenylmandlové na kyselinu homovanylmandlovou. Dále z noradrenalinu vzniká normetanefrin, z adrenalinu metanefrin.

Katechol-O-methyltransferáza působí také jako detoxikační enzymatická bariéra mezi krví a další tkání a chrání je před škodlivými účinky hydroxylovaných cizorodých látek [46, 57].

3. 2. 5. 2 Genová podstata

Gen kódující COMT je umístěn na 22. chromozomu. Skládá se ze šesti exonů. Dva exony jsou nekódující a dva kódující, kdy jeden kóduje solubilní COMT a druhý membránově vázanou COMT.

Gen katechol-O-methyltransferázy kóduje dvě rozdílné bílkoviny: rozpustnou (S-COMT) a membránově vázanou formu (MB-COMT). MB-COMT se vyskytuje zejména v mozkových neuronech (ve všech oblastech CNS), zatímco S-COMT je přítomen zejména v jiných orgánech jako jsou játra, krev a ledviny. MB-COMT má vyšší afinitu k substrátu, ale nižší katalytickou aktivitu než má S-COMT.

Zařazení valinu nebo methioninu na 158. místě řetězce bílkoviny kódující enzym ovlivňuje přítomnost kodominantní alely G nebo A [55, 57, 58].

3. 2. 5. 3 Varianty

U katechol-O-methyltransferázy rozlišujeme dvě skupiny: P1 a P2, které mají dva různé přepisy mRNA. P1 (kratší mRNA) kóduje S-COMT, zatímco P2 (delší mRNA) kóduje zejména MB-COMT.

Membránová vázaná katechol-O-methyltransferáza je primárně zapojena do ukončení dopaminergní a noradrenergní neurotransmise. S-COMT je zodpovědná především za eliminaci biologicky aktivních nebo toxických metabolitů [59].

Funkční polymorfismy COMT jsou spojeny s mnoha neuropsychiatrickými poruchami jako je schizofrenie, bipolární porucha, úzkostné poruchy, poruchy pozornosti s hyperaktivitou, závislost, mentální anorexie apod. Dále také s mnoha neurodegenerativními onemocněními (Parkinsonova choroba), rovněž i s rozvojem poruch jako jsou kardiovaskulární choroby a estrogenem vyvolávané rakoviny (rakovina prsu) [57,58, 60].

3. 2. 5. 4 Aktivita

Enzymová aktivita COMT je dvojího druhu, dle aminokyseliny umístěné na 158. pozici proteinové sekvence. COMT s nízkou aktivitou obsahuje v rozhodující pozici methionin. COMT s vysokou aktivitou má v dané pozici valin.

Bylo prokázáno, že MB-COMT má vyšší afinitu k substrátům katecholaminů a nižší K_M (Michaelisova konstanta) hodnotu pro dopamin, než S-COMT. S-COMT je vysokokapacitní izoforma enzymu, která má V_{max} (mezní rychlost) větší než MB-COMT.

Nízká aktivita COMT může být rizikovým faktorem pro vznik rakoviny prsu [46, 57, 58].

3. 2. 6 Aldehyddehydrogenáza (EC 1.2.1.3)

Nadčeleď lidských aldehyddehydrogenáz (obr. 12) obsahuje 19 enzymů, které se podílejí na oxidaci aldehydů za vzniku odpovídajících karboxylových kyselin. Jsou NAD(P)⁺-dependentní. Tyto enzymy hrají rozhodující roli v řadě fyziologických procesů. Účinně metabolizují širokou řadu endogenních a exogenních aldehydů, čímž napomáhají udržení buněčné redox rovnováhy. Nadměrné nahromadění enzymu působí cytotoxicky [61].

3. 2. 6. 1 Funkce

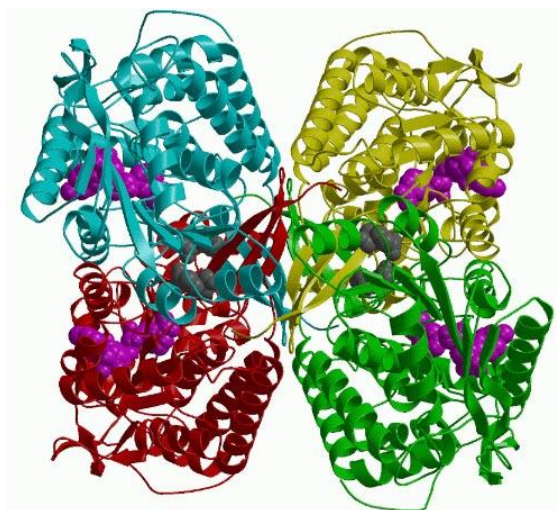
Klíčovým detoxikačním enzymem aldehyddehydrogenáz je ALDH2. Jedná se o membránově vázaný tetramerní enzym. Vyskytuje se hojně v játrech a plicích a dále v orgánech, ve kterých je vysoká oxidační generace adenosintrifosfátu (ATP) jako je mozek a srdce.

Aldehyddehydrogenáza 2 katalyzuje oxidaci acetaldehydu na acetát při metabolismu etanolu. ALDH2 může také působit jako esteráza, reduktáza nebo se může účastnit biotransformací. Toto vše se děje v závislosti na druhu substrátu [62].

Aldehyddehydrogenáza 4A1 oxiduje glutamát γ -semialdehyd, který existuje v rovnováze s Δ 1-pyrrolin-5-karboxylátem.

Aldehyddehydrogenáza 5A1 metabolizuje semialdehyd siccinylu a metabolity GABA.

Aldehyddehydrogenáza 6A1 katalyzuje oxidační dekarboxylaci malonátu a semialdehydu methylmalonátu na acetyl- a propionyl-CoA [63].



Obr. 12 Struktura aldehyddehydrogenázy [64]

3. 2. 6. 2 Genová podstata

V lidském genomu bylo mapováno devatenáct genů ALDH. Z nichž 17 izoenzymů je různě distribuováno do tkání, kde mohou být substrátově specifické. Všechny ALDH geny jsou kódovány v jádře, ale nejméně pět izoenzymů se nachází a pracuje v mitochondriích.

Struktura mitochondriální formy ALDH2 byla stanovena z ovčích jater, které sdílí 95% sekvenční identitu s lidským enzymem. Skládá se z 500 AMK. Jednotlivé podjednotky obsahuje tři domény. Dvě větší α/β dinukleotidové vazebné domény a menší domény, které se účastní oligomerace [63].

Genetický polymorfismus v genu ALDH2 vede k inaktivaci katalytické ALDH2. Tento polymorfismus ALDH2 je spojován, kromě ochrany proti rozvoji alkoholismu, se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny jícnu, žaludku, tlustého střeva a plic.

Mutace v ALDH3A2 má za následek zhoršení metabolismu středně dlouhých a dlouhých řetězců mastných aldehydů. Tyto aldehydy jsou odvozené od mastných alkoholů a kyseliny fytanové, glycerolipidového éteru a leukotrienů B4. Daná mutace je molekulární podstatou Sjögren-Larssonova syndromu.

Mutace v ALDH4A1 způsobuje hyperprolinémii, autozomálně recesivní onemocnění charakterizované neurologickými projevy

Mutace v ALDH5A1 způsobuje γ -hydroxymáselnou acidúrii. Jedná se o vzácnou autozomálně recesivní poruchu v metabolismu GABA.

Se ztrátou funkce ALDH6A1 je spojena vrozená metabolická porucha, která vede k vývojovému zpoždění [63].

3. 2. 6. 3 Aktivita

Aktivita ALDHs je měřena na základě oxidace 3,4-dihydroxyfenylacetaldehydu případně i 3,4-dihydroxyfenylglykoaldehydu. Vysoká aktivita K_M byla lokalizována v mitochondriální membráně, zatímco nízká aktivita K_M byla nalezena v mitochondriální matrix.

V cytosolu bylo zjištěno vyšší procento celkové činnosti ALDH pro DOPAL. A proto bylo navrženo, že ALDH uskutečňuje oxidaci biogenních aminů především v tomto subcelulárním prostoru [63].

4 Závěr

V této práci jsem se věnovala katecholaminovému a cholinergnímu systému. Mediátorem (neurotransmiterem) cholinergního systému je acetylcholin. Cholinacetyltransferáza je enzym, který daný mediátor syntetizuje a acetylcholinesteráza jej naopak degraduje. Noradrenalin je hlavním neurotransmiterem adrenergního systému. Vícekrokové syntézy noradrenalinu se účastní tyto enzymy: tyrozinhydroxyláza, DOPA-dekarboxyláza a DOPA- β -hydroxyláza. Monoaminoxidáza a ketyl-O-methyltransferáza katalyzují odbourávání mediátoru.

Nedostatek, snížená aktivita či mutace jednotlivých enzymů způsobují řadu onemocnění. Velkou část tvoří psychické poruchy jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, schizofrenie či bipolární afektivní porucha.

Inhibitory acetylcholinesterázy jsou využívány k léčbě Alzheimerovy choroby. Některé enzymy jsou spojovány s rakovinou prsu, prostaty, žaludku a podobně.

5. POUŽITÁ LITERATURA:

1. R. DOUGLAS FIELDS, B. STEVENS- GRAHAM: *New Insights into Neuron-Glia Communication*, SCIENCE. 2002 OCTOBER 18; 298(5593): 556–562.
2. R. K. MURRAY, D. K. GRANNER, P. A. MAYES et al: *Harperova biochemie*, rok vydání: 2002, s562-565, s781-786, ISBN: 80-7319-013-3
3. O. KITTNAR et al: *Lékařská fyziologie*, 1. VYDÁNÍ PRAHA 2011, s68, ISBN: 9788024730684
4. R. STUFFLEBEAM: *Neurons, Synapses, Action Potentials, and Neurotransmission*. In: STUFFLEBEAM, Robert. [online]. [cit. 2012-05-20]. Dostupné z: <http://www.mind.ilstu.edu/curriculum/nonStdItem.php?modGUI=233&compGUI=1825&itemGUI=3154>
5. Z. FIŠAR: *Introduction to Biological Psychiatry. Multimedia support in the education of clinical and health care disciplines*. PORTAL OF 1-ST FACULTY OF MEDICINE - CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE [online] [cit. 2012-05-20]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/bpen/neurobiology.htm>
6. S. TROJAN et al: *Lékařská fyziologie*, VYDÁNÍ ČTVRTÉ, PŘEPSANÉ A DOPLNĚNÉ, PRAHA 2003, s59-64 ISBN: 80-247-0512-5
7. *Struktura chemické synapse*. In: [online]. [cit. 2012-06-11]. Dostupné z <http://www.unc.edu/~ejw/synapse.html> B. MATOUŠ et al: *Základy lékařské chemie a biochemie*, 1. VYDÁNÍ 2010, s405-410, ISBN 9788072627028
8. Z. FIŠAR: *Introduction to Biological Psychiatry. Multimedia support in the education of clinical and health care disciplines*. PORTAL OF 1-ST FACULTY OF MEDICINE - CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE [online] [cit. 2012-05-20]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/bpen/default.htm>
9. *Velký lékařský slovník: Muscarin* [online]. [cit. 2012-05-20]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/muskarin-1/>
10. *Velký lékařský slovník: Afrenergní receptor/adrenoreceptor* [online]. [cit. 2012-05-20]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/adrenergni-receptor-adrenoreceptor>

11. *The Neuron and the Action Potential: AN OVERVIEW* [online]. [cit. 2012-05-20].
Dostupné z: <http://faculty.weber.edu/lfowler/images/Intro/Homework/The%20Neuron%20and%20the%20Action%20Potential.htm>
12. M. VOKURKA, J. HUGO et al: *Praktický slovník medicíny*, 5. vyd., rozšířené, Praha, 1998 s306, ISBN 80-85800-81-0
13. D. VOET, J. G. VOETOVÁ: *Biochemie*, 1. vyd. Victoria publish., 1995 Praha, s1314-1317, ISBN 80-85605-44-9
14. *Signal transmission at the neuromuscular junction (the synapse)*. In: [online]. [cit. 2012-05-20]. Dostupné z:
http://www.nature.com/nature/journal/v436/n7050/fig_tab/436473a_F1.html
15. Y. CAI, C. N. CRONIN, A. G. ENGEL ET AL: *Choline acetyltransferase structure reveals distribution of mutations that cause motor disorders*, THE EMBO JOURNAL (2004) 23, 2047–2058
16. *Structure of the CHAT protein*. In: [online]. [cit. 2012-06-11]. Dostupné z:
<http://www.answers.com/topic/choline-acetyltransferase>
17. L. GOVINDASAMY, B. PEDERSEN, W. LIAN et al: *Structural insights and functional implications of choline acetyltransferase*, JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY 148 (2004) 226–235
18. Y. ODA: *Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system*, PATHOLOGY INTERNATIONAL 1999; 49: 921–937
19. T. DOBRANSKY., W. L. DAVIS., G.-H. XIAO: *Expression, purification and characterization of recombinant human choline acetyltransferase : phosphorylation of the enzyme regulates catalytic activity*, BIOCHEMICAL SOCIETY (2000) 349, 141-151
20. J. PATOČKA, K. KUČA, D. JUN: *Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase—important enzymes of human body*, ACTA MEDICA (Hradec Kralove) 2004;47(4):215–228
21. I. SILMAN, J. L. SUSSMAN: *Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology*, CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY 2005, 5:293–302

22. *Acetylcholinesterase*. In: [online] [cit. 2012-06-11]. Dostupné z:
http://www.ncbr.muni.cz/pict/research/acetylcholinesterase_01.png
23. H. DVIR, I. SILMAN, M. HAREL et al: *Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function*, CHEM BIOL INTERACT. 2010 SEPTEMBER 6; 187(1-3): 10–22
24. I. SILMAN, J. L. SUSSMAN: *Acetylcholinesterase: How is structure related to function?*, CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS 175 (2008) 3–10
25. Y. HASIN, N. AVIDAN, D. BERCOVICH et al: *Analysis of Genetic Polymorphisms in Acetylcholinesterase as Reflected in Different Populations*, CURRENT ALZHEIMER RESEARCH, 2005, 2, 207-218
26. R. PAVLÍKOVÁ, J. MAREK, K. MUSÍLEK et al: *Nové biskvarterní inhibitory acetylcholinesterasy jakožto profylaktika při otravě organofosfáty*, VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY ROČNÍK 46 LXXIX, 2010, Č. 2
27. H. LÜLLMANN, K. MOHR, M. WEHLING: *Farmakologie a toxikologie, Podtitul: Překlad 15., zcela přepracovaného vydání*, datum vydání: 19. 11. 2004, s98-107, ISBN: 80-247-0836-1
28. A. C. GUYTON, J. E. HALL: *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 12th Edition*. PUBLISHED: 19 JUL 2010, s748-760, ISBN: 9781416045748
29. J. PATLAK: *Anatomic nervous system: Transmission*. [online]. [cit. 2012-05-20]. Dostupné z: http://physioweb.uvm.edu/ans_physiology/transmission_frame/adrenergic_receptors.htm
30. A. C. CALVO, A. L. PEY, A. MIRANDA-VIZUETE et al: *Divergence in enzyme regulation between Caenorhabditis elegans and human tyrosine hydroxylase, the key enzyme in the synthesis of dopamine*, BIOCHEM. J. (2011) 434, 133–141
31. L. B. MØLLER, A. ROMSTAD, M. PAULSEN et al: *Pre- and postnatal diagnosis of tyrosine hydroxylase deficiency*, PRENAT DIAGN 2005; 25: 671–675.
32. *Tyrosine hydroxylase*. In: [online]. [cit. 2012-06-11]. Dostupné z:
<http://igemwatch.net/?p=360>
33. D. J. WAXMAN, C. O'CONNOR: *Growth Hormone Regulation of Sex-Dependent Liver Gene Expression*, MOL ENDOCRINOL, NOVEMBER 2006, 20(11):2613–2629

34. G. J. SIEGEL, B. W. AGRANOFF, R. W. ALBERS et al: *Basic Neurochemistry, 6th edition: Molecular, Cellular and Medical Aspects* [online]. 1999 [cit. 2012-05-20]. ISBN-10: 0-397-51820-X, dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27988/>
35. J. ALTERIO, P. RAVASSARD, J. HAAVIK et al: *Human Tyrosine Hydroxylase Isoforms*, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 273, NO. 17, ISSUE OF APRIL 24, PP. 10196–10201, 1998
36. H. FUJISAWA, S. OKUNO: *Regulatory mechanism of tyrosine hydroxylase activity*, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 338 (2005) 271–276
37. Z. HAWI, D. FOLEY, A. KIRLEY et al: *Dopa decarboxylase gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): no evidence for association in the Irish population*, MOLECULAR PSYCHIATRY (2001) 6, 420–424
38. *DOPA decarboxylase*. In: [online]. [cit. 2012-06-11]. Dostupné z:
<http://www.ims.uconn.edu/~pburkhard/ddc.html>
39. BØRGLUM , BRUUN , KJELDENSEN et al: *Two novel variants in the DOPA decarboxylase gene: association with bipolar affective disorder*, MOLECULAR PSYCHIATRY [1999, 4(6):545-51]
40. G. GIARDINA, R. MONTIOLI, S. GIANNI et al: *Open conformation of human DOPA decarboxylase reveals the mechanism of PLP addition to Group II decarboxylases*, EDITED BY HARRY B. GRAY, CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY, PASADENA, CA, AND APPROVED OCTOBER 3. 2011 (RECEIVED FOR REVIEW JULY 14, 2011)
41. K. MARGIOTTI, L. A. WAFI, H. CHENG et al: *Androgen-regulated genes differentially modulated by the androgen receptor coactivator L-dopa decarboxylase in human prostate cancer cells*, MOLECULAR CANCER 2007, 6:38 DOI:10.1186/1476-4598-6-38
42. D. ROBERTSON, V. HAILE, S. E. PERRY et al: *Dopamine β -Hydroxylase Deficiency, A Genetic Disorder of Cardiovascular Regulation*, HYPERTENSION VOL 18, NO 1 JULY 1991

43. J-M. SENARD, P ROUET, *Dopamine beta-hydroxylase deficiency*, PUBLISHED: 30 MARCH 2006 ORPHANET JOURNAL OF RARE DISEASES 2006, 1:7 DOI:10.1186/1750-1172-1-7
44. E. L. SABBAN, M. GOLDSTEIN et al: *Regulation of the Multiple Forms of Dopamine β Hydroxylase by Nerve Growth Factor, Dexamethasone, and Dibutyryl Cyclic AMP in the PC12 Pheochromocytoma Cell Line*, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 258, NO. 12, ISSUE OF JUNE 25, PP. 7819-7823, 1983 PRINTED IN U.S.A.
45. ŠERÝ O., ŠTAIF R., DIDDEN W: *Neurobiologie hyperkinetické poruchy*, ČES. A SLOV. PSYCHIAT., 103, 2007, NO. 1, PP. 28–46
46. M. BORTOLATO, K. CHEN et al: *Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics*, ADV DRUG DELIV REV. 2008; 60(13-14): 1527–1533
47. *Monoamine oxidase A*. In: [online]. [cit. 2012-05-20]. Dostupné z: <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2002/MX/MX1>
48. J. B. Wu, K. Chen, Y. Li et al: *Regulation of monoamine oxidase A by the SRY gene on the Y chromosome*, FASEB J. 23, 4029–4038 (2009)
49. P. BURKHARD, P. DOMINICI, C. BORRI-VOLTATTORNI et al: *Structural insight into Parkinson's disease treatment gained from drug-inhibited DOPA decarboxylase*, [cit. 2012-05-20]. Dostupné z: http://hasyweb.desy.de/science/annualreports/2001_report/part2/contrib/72/5205.pdf
50. M. B.H. YUJIM, Y. S. BAKHLE: *Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness*, BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY (2006) 147, S287–S296
51. S-Y. SON, J. MA, Y. KONDOU et al: *Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors*, 2008 BY THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, PNAS _ APRIL 15, 2008 VOL. 105 NO. 15 5739–5744

52. M. BORTOLATO, S. C. GODAR, S. DAVARIAN et al: *Behavioral disinhibition and reduced anxiety-like behaviors in monoamine oxidase B deficient mice*, NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY. 2009 DECEMBER ; 34(13): 2746–2757
53. B. CAMARENA, A. FRESÁN, A. AGUILAR et al: *Monoamine Oxidase A and B Gene Polymorphisms and Negative and Positive Symptoms in Schizophrenia*, INTERNATIONAL SCHOLARLY RESEARCH NETWORK, ISRN PSYCHIATRY, VOLUME 2012, ARTICLE ID 852949, 5 PAGES DOI:10.5402/2012/852949
54. L. HOSÁK, A. HANUŠOVÁ, M. BERÁNEK et al: *Polymorfismus Val158Met genu pro katechol-O-methyltransferázu a psychotické příznaky u závislosti na metamfetaminu*, ČES. A SLOV. PSYCHIAT., 104, 2008, NO. 3, PP. 109–114.
55. *Catechol-O-methyl transferase*. In: [online]. [cit. 2012-06-11]. Dostupné z: http://www.cmbi.ru.nl/~hvensela/catechol/catech_3.html
56. E. M. TUNBRIDGE, P. J. HARRISON et al: *Catechol-o-Methyltransferase, Cognition, and Psychosis: Val158Met and Beyond*, BIOL PSYCHIATRY 2006;60:141–151
57. M. KÄENMÄKI, A. TAMMIMÄKI, J. A. GARCIA-HORSMAN et al: *Importance of membrane-bound catechol-O-methyltransferase in L-DOPA metabolism: a pharmacokinetic study in two types of Comt gene modified mice*, BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY (2009) 158 1884–1894
58. J. CHEN, B. K. LIPSKA, N. HALIM et al: *Functional Analysis of Genetic Variation in Catechol-O-Methyltransferase (COMT): Effects on mRNA, Protein, and Enzyme Activity in Postmortem Human Brain*, AM. J. HUM. GENET. 75:807–821, 2004
59. A. G. NACKLEY, S. A. SHABALINA, J. E. LAMBERT et al: *Low Enzymatic Activity Haplotypes of the Human Catechol-O-Methyltransferase Gene: Enrichment for Marker SNPs*, PLOS ONE, APRIL 2009 | VOLUME 4 | ISSUE 4 | E5237
60. CH. BROCKER, N. LASSEN, T. ESTEY et al: *Aldehyde Dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) Is a Novel Enzyme Involved in Cellular Defense against Hyperosmotic Stress*, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 285, NO. 24, PP. 18452–18463, JUNE 11, 2010 PRINTED IN THE U.S.A.

61. CH-H. CHEN, L. SUN, D MOCHLY-ROSEN: *Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases*, *CARDIOVASCULAR RESEARCH* (2010) 88, 51–57
62. S. A. MARCHITTI, R. A. DEITRICH, V. VASILIOU: *Neurotoxicity and Metabolism of the Catecholamine- Derived 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyde: The Role of Aldehyde Dehydrogenase*, *PHARMACOL REV* 59:125–150, 2007
63. *Aldehyde dehydrogenase*. In: [online]. [cit. 2012-05-20]. Dostupné z: <http://biochemistry.iu.edu/files/9712/8881/3887/xray-4.jpg>