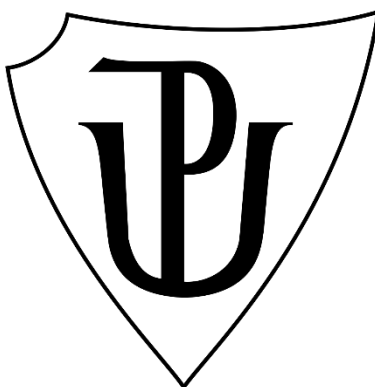


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Aminoacyl-aminoaldehydy jako substráty
rostlinných aminoaldehyddehydrogenas**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Michaela Masopustová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok:	2023

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

V Olomouci dne 24. 4. 2023

Michaela Masopustová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat mému školiteli, prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr., za odborné vedení a cenné rady při psaní diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Martině Kopečné, Ph.D. za poskytnuté rekombinantní enzymy a doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za spolupráci při přípravě syntetických substrátů a naměření jejich NMR spekter.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Michaela Masopustová
Název práce	Aminoacyl-aminoaldehydy jako substráty rostlinných aminoaldehyddehydrogenas
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Teoretická část práce je zaměřena na toxicitu metabolitů polyaminů a nadroдинu enzymů zvaných aldehyddehydrogenasy (ALDH), konkrétně rodiny 7 a 10. Polyaminy jsou organické molekuly s více než dvěma kladně nabitými aminoskupinami. Během katabolismu polyaminů vzniká řada toxických látek, jako například 3-aminopropanal, který může vést i k apoptóze či nekróze buněk. Jako ochrana před negativními účinky aldehydů existují enzymy ALDH, které katalyzují přeměnu aldehydů na jim odpovídající karboxylové kyseliny.

V experimentální části byly připravené syntetické látky odvozené acylací 3-aminopropanalu a 4-aminobutanalu s *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-fenylalaninem a *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-L-tyrosinem testovány jako substráty hrachové aminoaldehyddehydrogenasy izolované ze semenáčků hrachu setého (*PsAMADH*) a rekombinantních aldehyddehydrogenas 7 z hrachu setého (*PsALDH7*) a kukuřice seté (*ZmALDH7*). Čistota enzymů byla testována s využitím SDS-PAGE elektroforézy a pomocí peptidového mapování byla ověřena přítomnost *PsAMADH* v enzymovém roztoku. S využitím absorpční spektroskopie, hmotnostní spektrometrie a nativní elektroforézy byly připravené látky potvrzeny jako substráty *PsAMADH*, *PsALDH7* i *ZmALDH7*. Pro *PsAMADH* byly lepšími substráty látky odvozené od 4-aminobutanalu než látky odvozené od 3-aminopropanalu a pro *ZmALDH7* i *PsALDH7* byly lepšími substráty látky odvozené od 3-aminopropanalu než látky odvozené od 4-aminobutanalu. Byly tak nalezeny nové látky vystupující jako substráty enzymů z rodin ALDH7 a ALDH10.

Klíčová slova	aldehyddehydrogenasy, aminoaldehyddehydrogenasy, aminoacylované aminoaldehydy, kapalinová chromatografie, absorpční spektroskopie, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	71
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Michaela Masopustová
Title	Aminoacyl-aminoaldehydes as substrates of plant aminoaldehyde dehydrogenases
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2023

Abstract

The theoretical part of this work is focused on the toxicity of polyamine metabolites and on the superfamily of enzymes called aldehyde dehydrogenases (ALDH), specifically families 7 and 10. Polyamines are organic molecules with more than two positively charged amino groups. During the catabolism of polyamines, some toxic substances are formed, such as 3-aminopropanal, which can cause apoptosis or necrosis of the cell. ALDH are enzymes that protect cells from the negative effects of aldehydes due to their ability to catalyze the conversion of aldehydes to their corresponding carboxylic acids.

In the experimental part of this work, synthetic substances produced by an acylation of 3-aminopropanal and 4-aminobutanal with *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-phenylalanine and *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-L-tyrosine were prepared and tested as substrates of aminoaldehyde dehydrogenase isolated from pea seedlings (*Ps*AMADH) and recombinant aldehyde dehydrogenases 7 from *Pisum sativum* (*Ps*ALDH7) and *Zea mays* (*Zm*ALDH7). The purity of enzymes was tested using SDS-PAGE, and the presence of *Ps*AMADH in enzyme solution was verified using peptide mass printing. Prepared substances were confirmed as substrates of *Ps*AMADH, *Ps*ALDH7, and *Zm*ALDH7 by absorption spectroscopy, mass spectrometry, and native electrophoresis. The compounds derived from 4-aminobutanal were better substrates of *Ps*AMADH than those derived from 3-aminopropanal, whereas the compounds derived from 3-aminopropanal were better substrates for both *Zm*ALDH7 and *Ps*ALDH7 than those derived from 4-aminobutanal. In summary, novel substances acting as substrates of plant enzymes from the ALDH7 and ALDH10 families were found.

Keywords	aldehyde dehydrogenase, aminoaldehyde dehydrogenase, aminoacyl-aminoaldehydes, liquid chromatography, absorption spectroscopy, mass spectrometry
Number of pages	71
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Polyaminy	2
2.2	Biosyntéza polyaminů	3
2.3	Katabolismus polyaminů	5
2.4	Aminopropanal a jeho vliv na organismus	8
2.5	Reakční mechanismus aldehyddehydrogenas	9
2.6	Aminoaldehyddehydrogenasy	9
2.7	Aminoaldehyddehydrogenasa z hrachu	10
2.8	Substrátová specifita aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu	12
2.9	Aldehyddehydrogenasy rodiny 7	15
2.10	Aldehyddehydrogenasy 7 z kukuřice a hrachu	16
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1	Materiál	19
3.1.1	Biologický materiál	19
3.1.2	Chemikálie	19
3.1.3	Přístroje	20
3.1.4	Pomůcky	21
3.2	Metody	22
3.2.1	Extrakce proteinů a purifikace aminoaldehyddehydrogenasy ze semenáček hrachu	22
3.2.2	Identifikace aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu	23
3.2.3	Syntéza nových substrátů aldehyddehydrogenas	27
3.2.4	Příprava volných aminoacylovaných aminoaldehydů	28
3.2.5	Hmotnostní spektrometrie	29
3.2.6	Nativní elektroforéza	30
3.2.7	Měření enzymové aktivity	31
3.2.8	Určení kinetických parametrů	32
3.2.9	Bradfordova metoda	32
3.2.10	BCA metoda	32
3.2.11	Měření koncentrace proteinů s využitím nanodropu	33
3.2.12	Studium pH optima	33
3.2.13	Molekulové modelování substrátů v aktivním místě enzymů	34
4	VÝSLEDKY	35
4.1	Extrakce proteinů a purifikace aminoaldehyddehydrogenasy	35
4.2	Identifikace aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu	38
4.3	SDS elektroforéza pro kontrolu čistoty rekombinantních enzymů	40
4.4	Příprava volných aminoacylovaných aminoaldehydů	41
4.5	Ověření oxidace volných aminoaldehydů v přítomnosti enzymů	44
4.6	Nativní elektroforéza	45

4.7	Určení kinetických parametrů	47
4.8	Studium pH optima	52
4.9	Molekulové modelování syntetizovaných substrátů v aktivním místě	54
5	DISKUZE	56
6	ZÁVĚR	63
7	LITERATURA	64
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	69

Cíle práce

Cíle teoretické části:

- 1) Metabolismus polyaminů se zaměřením na toxicitu jejich oxidačních produktů.
- 2) Nadrodina enzymů aldehyddehydrogenas se zaměřením na rodiny 7 a 10.

Cíle praktické části:

- 1) Příprava syntetických aldehydových substrátů odvozených od Phe a Tyr.
- 2) Příprava enzymu aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu.
- 3) Měření přeměny substrátů v přítomnosti koenzymu NAD^+ a jeho analogů.
- 4) Stanovení kinetických parametrů k_{cat} a K_m .
- 5) Porovnání výsledků s přirozenými substráty enzymu.

1 ÚVOD

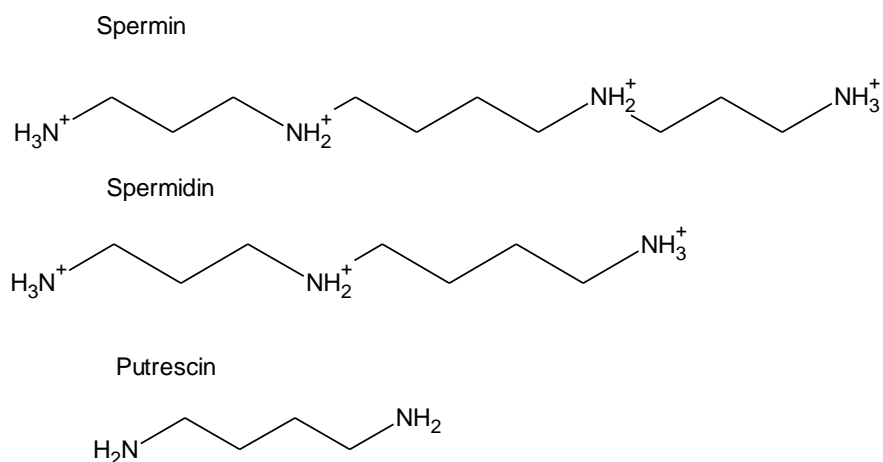
Polyaminy jsou ze strukturního hlediska malé kladně nabitě molekuly obsahující dvě a více aminoskupin které lze nalézt prakticky u všech živých organismů. Mají celou řadu důležitých funkcí, vystupují jako antioxidanty, ovlivňují aktivitu kinas a iontových kanálů, podílí se na ochraně membrán a nukleových kyselin a na regulaci exprese řady genů a tím ovlivňují syntézu nukleových kyselin a proteinů. Hladiny polyaminů a jejich degradačních produktů je třeba přísně regulovat, protože jejich zvýšená koncentrace má toxické účinky pro buňku. Polyaminy narušují buněčný metabolismus díky jejich interakci se záporně nabitými skupinami jiných molekul a tím ovlivňují růst a životaschopnost buněk (Pegg, 2013). Oxidačním produktem degradace polyaminů je například 3-aminopropanal. Jeho přítomnost v buňce vede k poškození lysosomů a vyhlídí jejich obsahu do cytosolu, což ovlivňuje membránový potenciál mitochondrie, a dochází k uvolnění cytochromu *c* do cytosolu. Tyto děje vedou k aktivaci kaspas a vstupu buňky do apoptózy (Yu *et al.*, 2003).

Rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) patří do nadrodiny enzymů nesoucích název aldehyddehydrogenasy (ALDH), které obecně katalyzují přeměnu aldehydů na jim odpovídající karboxylové kyseliny (Brocker *et al.*, 2013). AMADH jsou enzymy, které se konkrétně podílí na přeměně ω -aminoaldehydů na řadu netoxických produktů, jako jsou kyselina γ -aminomáselná či β -alanin. Hrají tedy důležitou roli v katabolismu polyaminů, jelikož spermin a spermidin mohou být jednou z možných cest oxidovány právě na ω -aminoaldehydy 3-aminopropanal a 4-aminobutanal (Stiti *et al.*, 2011). Díky poměrně širokému a strukturně dobře přístupnému aktivnímu místu mají rostlinné AMADH širokou substrátovou specifitu a jako jejich substráty vystupuje i řada syntetizovaných látek (Tylichová *et al.*, 2010). V této práci byly proto jako substráty *Ps*AMADH izolované ze semenáčků hrachu setého (*Pisum sativum*) testovány látky odvozené acylací 3-aminopropanalu a 4-aminobutanalu s *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-fenylalaninem a *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-L-tyrosinem. Takto připravené látky byly testovány také jako substráty rekombinantních enzymů *Ps*ALDH7 z hrachu setého (*Pisum sativum*) a *Zm*ALDH7 z kukuřice seté (*Zea mays*).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Polyaminy

Polyaminy jsou organické látky, které lze nalézt prakticky u všech živých organismů. Jedná se o malé kladně nabitě molekuly, které obsahují více než dvě aminoskupiny, patří proto do skupiny biogenních aminů. Nejčastěji zmiňovanými polyaminy jsou spermin (SPM), spermidin (SPD) a putrescin (PUT) (Sagar *et al.*, 2021). Polyaminy jsou látky známé již po dlouhou dobu, SPD byl objeven již v druhé polovině 17. století ve formě krystalů u rostlinných semen (Gerner & Meyskens, 2004). Polyaminy mají v organismech různé role a mohou ovlivňovat celou řadu biochemických procesů. Díky svému kladnému náboji mohou interagovat s různými molekulami, jako jsou nukleové kyseliny, membránové ale i jiné proteiny, a tím ovlivňovat jejich interakce, funkci a stabilitu (Pegg, 2013). Schopnost interakce polyaminů s nabitými skupinami různých molekul je ovlivněna počtem jejich kladně nabitých aminoskupin. Čím vyšší je jejich počet, tím vyšší je i jejich aktivita. Pokud tedy porovnáme struktury tří nejvýznamnějších polyaminů (Obr. 1), nejreaktivnější je SPM a nejméně reaktivní PUT (Yuan *et al.*, 2001). Procesy, které polyaminy ovlivňují, jsou růst a dělení buněk, oprava extracelulární matrix (Moinard *et al.*, 2005), buněčná signalizace, transkripce, translace, formování buněčných oddílů (Sagar *et al.*, 2021). Fungují také jako antioxidanty a kontrolují aktivitu iontových kanálů (Pegg, 2013). V případě, že v organismu dojde ke snížení hladiny polyaminů dochází například k inhibici proliferace buněk, pokud je hladina polyaminů vyšší, dochází k indukci apoptózy (Moinard *et al.*, 2005).

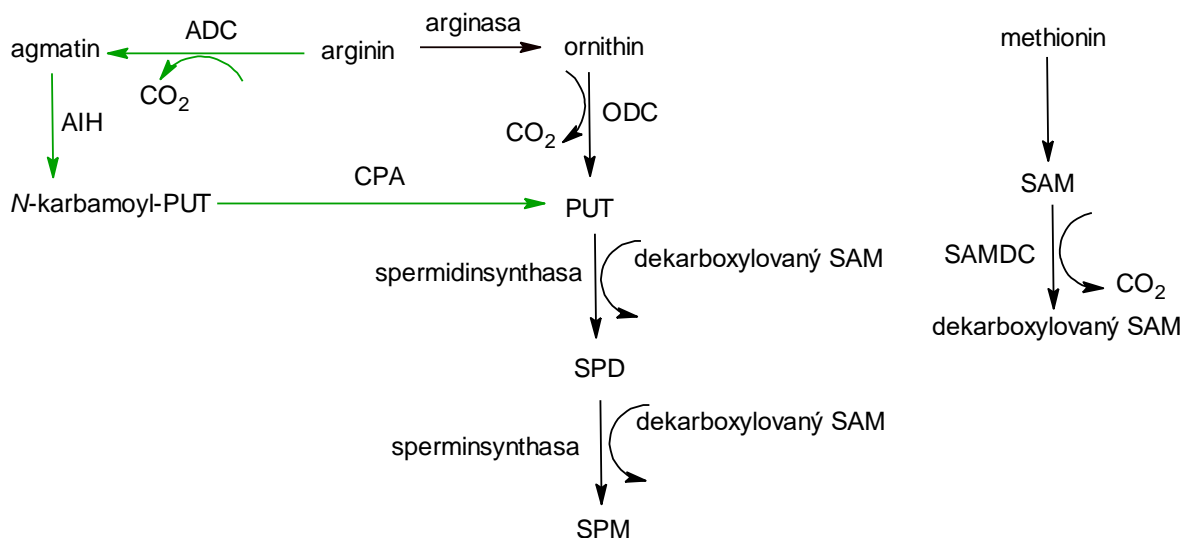


Obr. 1 Strukturální vzorce polyaminů sperminu, spermidinu a putrescinu. Vytvořeno v programu ChemSketch.

2.2 Biosyntéza polyaminů

Biosyntéza polyaminů (Obr. 2) probíhá v cytoplasmě a zapojují se do ní i enzymy močovinového cyklu (Gerner & Meyskens, 2004). Má však ale malý podíl na celkové hladině polyaminů v těle (Sagar *et al.*, 2021). Nejdůležitější je jejich příjem potravou, zejména jsou součástí sýrů a masných výrobků, méně pak rostlinné stravy (Handa *et al.*, 2018). Jsou produkovány také střevní mikroflórou. Na udržení stálé hladiny polyaminů má vliv i jejich transport z/do buněk, kterého se účastní ABC („ATP-binding cassette“) či SLC („solute carrier“) transportéry. Cesty biosyntézy polyaminů jsou odlišné u savců a rostlin či mikroorganismů. U savců jsou produkovány pouze PUT, SPM a SPD, jejichž prekurzorem jsou aminokyseliny Arg a Met (Sagar *et al.*, 2021). PUT je výchozím polyaminem pro syntézu SPM a SPD a jeho syntéza vychází z Arg. Savčí ale také rostlinné buňky či buňky mikroorganismů obsahují enzym arginasu (L-argininamidohydrolasa; EC 3.5.3.1) (systematické názvy enzymů a EC čísla byla převzata z <https://www.enzyme-database.org/>), která katalyzuje přeměnu Arg na ornithin (Dzik, 2014). Ten je následně přeměněn na PUT pomocí ornithindekarboxylasy [L-ornithinkarboxylasa (putrescin tvořící); ODC; EC 4.1.1.17] (Kusano *et al.*, 2007), což je klíčový enzym produkce PUT a je zodpovědný za udržování stálé hladiny polyaminů v organismu (Pegg, 2009). ODC využívá jako kofaktor pyridoxalfosfát (Lee *et al.*, 2007). U rostlin je pro přeměnu Arg na PUT možná také jiná cesta využívající arginindekarboxylasu [L-argininkarboxylasa (agmatin tvořící); ADC; EC 4.1.1.19], která přeměňuje Arg na agmatin a ten poté na PUT pomocí dvou enzymů agmatiniminohydrolasy (AIH; EC 3.5.3.12) a *N*-karbamoylputrescin-amidohydrolasy (CPA; EC 3.5.1.53) (Kusano *et al.*, 2007). Agmatin mohou syntetizovat také některé mikroorganismy, například ty, které jsou součástí střevní mikroflóry (Pegg, 2009). Vzniklý PUT může být přeměněn působením spermidinsynthasy [*S*-adenosyl-3-(methylsulfanyl)propylamin:putrescin-3-aminopropyltransferasa; EC 2.5.1.16] na SPD. Během této reakce dochází k přenosu aminopropylu, který vzniká dekarboxylací *S*-adenosylmethioninu (SAM) katalyzovanou *S*-adenosylmethionindekarboxylasou [*S*-adenosyl-L-methioninkarboxylasa (*S*-adenosyl-3-(methylsulfanyl)propylamin tvořící); SAMDC; EC 4.1.1.50]. SPD může přijmout další aminopropyl a vzniká SPM. Tato reakce je katalyzovaná sperminsynthasou [*S*-adenosyl-3-(methylsulfanyl)propylamin:spermidin-3-aminopropyltransferasa; EC 2.5.1.22] (Kusano *et al.*, 2007). SAMDC využívá pyruvát jako prostetickou skupinu (Pegg *et al.*,

1998). Sperminsyntaxa není esenciální pro rostliny, jelikož SPM není potřebný pro jejich normální růst, na rozdíl od PUT a SPD (Pegg, 2013).

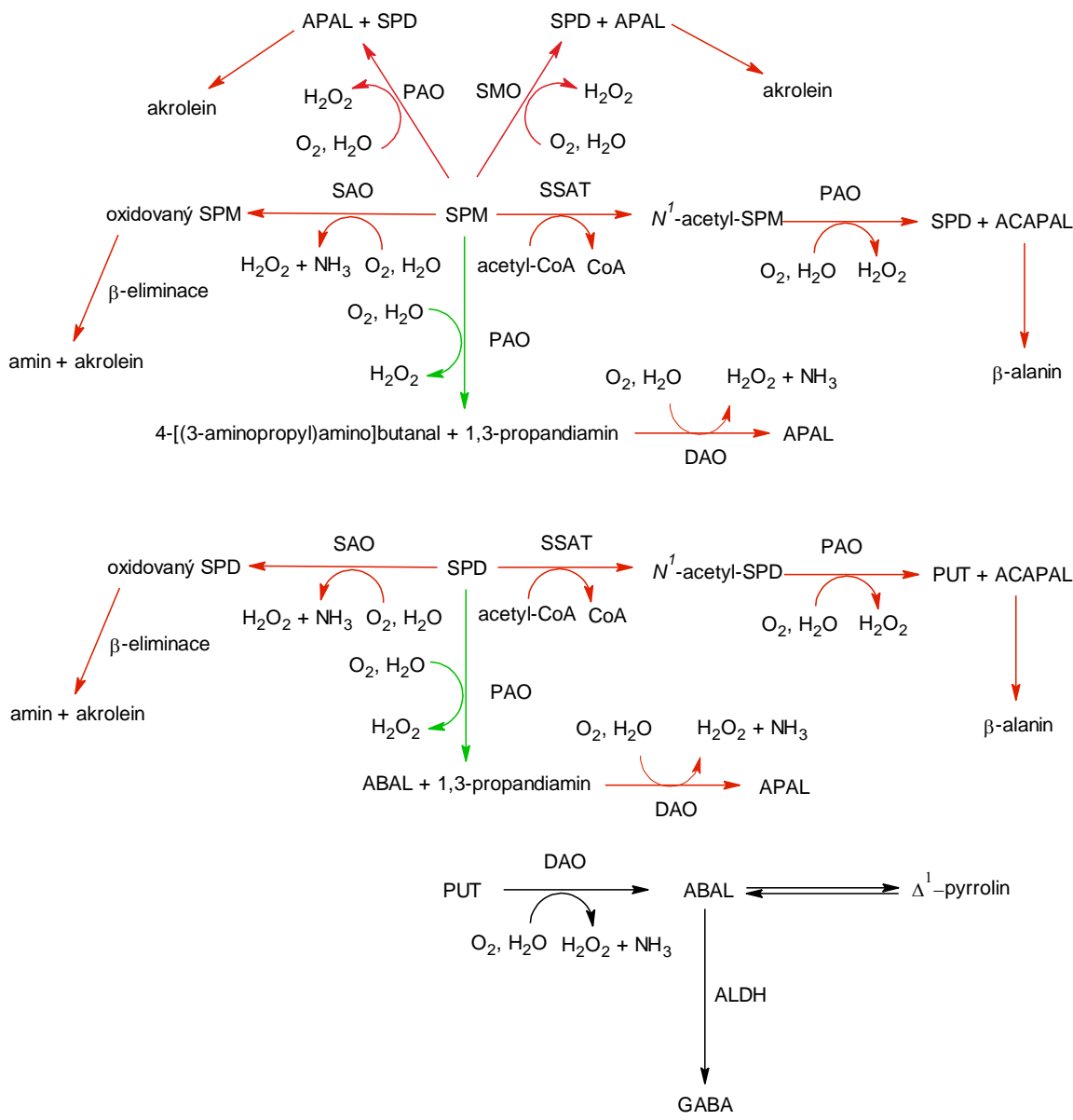


Obr. 2 Schéma biosyntézy polyaminů. Zkratky: ADC – arginindekarboxylasa; AIH – agmatiniminohydrolasa; CPA – *N*-karbamoylputrescin-amidohydrolasa; ODC – ornithindekarboxylasa; PUT – putrescin; SAM – *S*-adenosylmethionin; SAMDC – *S*-adenosylmethionindekarboxylasa; SPD – spermidin; SPM – spermin. Zelená šipka = katabolismus u rostlin; černá šipka = katabolismus u živočichů i rostlin. Vytvořeno v programu ChemSketch. Upraveno dle Sagar *et al.* (2021) a Kusano *et al.* (2007).

2.3 Katabolismus polyaminů

Udržování stálé hladiny polyaminů je esenciální pro správné fungování organismů a vychýlení z rovnováhy může mít vážné dopady. Zvýšení hladiny SPM a SPD ovlivňuje růst a životaschopnost organismů, a to zejména kvůli tvorbě toxických aldehydů a dalších látek spojených s tvorbou oxidačního stresu (Pegg, 2013). Mohou způsobovat oxidační poškození DNA, buněčných oddílů, a dokonce indukovat apoptózu buněk (Battaglia *et al.*, 2013). Přispívají tím tak i k rozvoji různých onemocnění, například Alzheimerovy či Parkinsonovy choroby (Handa *et al.*, 2018). Toxicita polyaminů se projevuje během jejich katabolismu (Obr. 3), kterého se účastní řada enzymů, díky kterým dochází k produkci různých toxických látek. Vzniklý SPM a SPD mohou být přeměněny pomocí cytosolické diaminacetyltransferasy (acetyl-CoA:alkan- α,ω -diamin-*N*-acetyltransferasa; SSAT; EC 2.3.1.57), která katalyzuje reakci, při které vznikají *N*¹-acetylspermin a *N*¹-acetylspermidin. Tyto *N*-acetylované meziprodukty jsou dále přeměňovány oxidační deaminací pomocí polyaminoxidasy [*N*¹-acetylpolyamin:O₂-oxidoreduktasa (3-acetamidopropanal tvořící); PAO; EC 1.5.3.13] (Sessa & Perin, 1994) využívající flavinadenindinukleotid (FAD) jako kofaktor. Konkrétně tento enzym katalyzuje přeměnu *N*¹-acetylsperminu za vzniku SPD a *N*¹-acetylspermidinu za tvorby PUT. Během těchto reakcí dochází také k uvolnění 3-acetamidopropanalu (ACAPAL) a H₂O₂, které vedou k tvorbě oxidačního stresu a tím k dalšímu buněčnému poškození (Seiler, 1995). Vzniklý ACAPAL může být detoxikován až na β -alanin s využitím enzymů aldehyddehydrogenasy (ALDH) a selektivní hydrolasy (Seiler, 2004). Kromě toho je tento enzym zapojen také do přeměny SPM, kdy se tvoří SPD a 3-aminopropanal (APAL) (Seiler, 1995). Substrátem rostlinné PAO [spermidin:O₂-oxidoreduktasa (1,3-propandiamin tvořící); EC 1.5.3.14] je na rozdíl od živočišné kromě SPM také SPD. Oxidací SPM vzniká 4-[(3-aminopropyl)amino]butanal, oxidací SPD 4-aminobutanal (ABAL) a během obou reakcí se uvolňuje také 1,3-propandiamin a H₂O₂ (Kusano *et al.*, 2007). Vzniklý ABAL může samovolně cyklizovat na netoxický Δ^1 -pyrrolin, díky čemuž se snižuje možný toxický účinek ABAL (Pegg, 2013), popřípadě může být také dále oxidován pomocí ALDH za tvorby kyseliny γ -aminomáselné (GABA) (Cona *et al.*, 2006). 1,3-propandiamin vznikající během dosud nejasné degradace polyaminového metabolitu isoptreaninu (Seiler, 2000) může být oxidačně deaminován ledvinovou Cu-diaminoxidasou [histamin:O₂-oxidoreduktasa (deaminující); DAO; EC 1.4.3.22]

za tvorby APAL, H₂O₂ a amoniaku (Elmore *et al.*, 2002). Jako substrát DAO vystupuje kromě jiných diaminů také PUT. Produkty reakce jsou H₂O₂, amoniak a ABAL, či jeho cyklická forma Δ^1 -pyrrolin (Pegg, 2013). Další enzym, který katalyzuje přeměnu polyaminů za tvorby toxických látek je savčí sérová Cu-aminoxidasa [primární-amin:O₂-oxidoreduktasa (deaminující); SAO; EC 1.4.3.21] (Buffoni & Ignesti, 2000). SPM a SPD jsou oxidovány na jim odpovídající aldehydy, *N*, *N'*-bis(3-oxopropyl)butan-1,4-diamin a *N*-(3-oxopropyl)butan-1,4-diamin, H₂O₂ a amoniak (Tabor *et al.*, 1964). Vzniklé aldehydy následně mohou podléhat β -eliminaci či kondenzační reakci za vzniku odpovídajících aminů a akroleinu (Kimes & Morris, 1971a). Sperminoxidasa (spermidin:O₂-oxidoreduktasa; SMO; EC 1.5.3.16) je enzym využívající FAD, která oxiduje SPM na SPD. Současně vzniká také APAL a H₂O₂ (Battaglia *et al.*, 2013). APAL může být samovolně deaminován za uvolnění amoniaku na toxický akrolein (Seiler, 2004), který má prokázané cytotoxické účinky, jelikož inhibuje syntézu nukleových kyselin a proteinů (Kimes & Morris, 1971b). Produkty SMO jsou mnohem nebezpečnější v porovnání s PAO, která je lokalizována v peroxisomech (Seiler, 1995), jelikož jedna z isoform SMO je lokalizována v jádře a může se podílet na oxidačním poškození DNA (Murray-Stewart *et al.*, 2008). Přeměny SPM, SPD a APAL, při kterých dochází k produkci akroleinu, jsou hlavním zdrojem toxicity, a tedy zdrojem poškození buněk. H₂O₂ vznikající při těchto reakcích není tak toxický v porovnání s akroleinem (Sharmin *et al.*, 2001). Hlavním detoxikačním faktorem a ochranou před účinky akroleinu je glutathion, jehož konjugací s tímto aldehydem vzniká kyselina 3-hydroxypropylmerkapturová, která může být vyloučena močí (Yoshida *et al.*, 2012).



Obr. 3 Katabolismus polyaminů. Zkratky: ACAPAL – 3-acetamidopropanal; ABAL – 4-aminobutanal; ALDH – aldehyddehydrogenasa; APAL – 3-aminopropanal; CoA – koenzym A; DAO – Cu-diaminoxidasa; GABA – γ -aminomáselná kyselina; N¹-acetyl-SPD – N¹-acetylspermidin; N¹-acetyl-SPM – N¹-acetylspermin; SPD – spermidin; SPM – spermin; PAO – polyaminoxidasa; PUT – putrescin; SAO – sérová Cu-aminoxidasa; SMO – sperminoxidasa; SSAT – cytosolická diaminacetyltransferasa. Červená šipka = katabolismus u živočichů; zelená šipka = katabolismus u rostlin; černá šipka = katabolismus u živočichů i rostlin. Vytvořeno v programu ChemSketch. Upraveno dle Seiler (2000), Cona *et al.* (2006) a Pegg (2013).

2.4 Aminopropanal a jeho vliv na organismus

Řada látek vznikajících během katabolismu polyaminů působí cytotoxicky a může vést buď k apoptóze nebo nekróze. Jednou z takových látek je APAL. Ivanova *et al.* (1998) studovali vliv APAL, který vzniká během ischemického poškození mozku potkanů působením enzymu PAO během katabolismu polyaminů. APAL působil cytotoxicky na gliové buňky, které podléhaly apoptóze, a také na neurony, u kterých vedl k nekróze. Li *et al.* (2003) zjistili, že to, zda dojde k usmrcení buňky působením APAL programovanou buněčnou smrtí, či nekrózou závisí na jeho koncentraci. APAL v koncentraci $75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyvolal u gliomových buněk D384 jejich smrštění a následnou apoptózu, zatímco koncentrace $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vedla k bobtnání buněk a nekróze. Na cytotoxicitě APAL se podílí aldehydová skupina a aminoskupina je zodpovědná za jeho vstup do lysosomu, pravděpodobně díky schopnosti interagovat s thiolovými skupinami (Li *et al.*, 2003).

Mechanismus toxického působení APAL na buňku je následující. V brzké fázi způsobí vstup APAL do lysosomu narušení jeho membrány a dojde k vyjití lysosomálních enzymů do cytosolu. Tyto enzymy mohou například aktivovat fosfolipasu A2 (fosfatidylcholin-2-acylhydrolasa; EC 3.1.1.4) a tím způsobit další poškození lysosomů (Zhao *et al.*, 2003). Z lysosomu se uvolňují také kathepsiny D, B a L, které se podílí na aktivaci kaspasové kaskády (Kågedal *et al.*, 2001). Po vyjití obsahu lysosomu do cytosolu dochází ke změnám v membránovém potenciálu mitochondrie, nárůstu oxidačního stresu a vyjití cytochromu *c* do cytosolu a tím k ještě většímu poškození lysosomů a mitochondrií (Yu *et al.*, 2003). Cytochrom *c* je schopen se vázat na apoptický aktivační faktor a vzniká apoptosom. Díky tomu dojde k aktivaci kaspasy 9, která spouští kaskádu dějů vedoucích k apoptóze (Brunk *et al.*, 2001). Poškozením mitochondrie dochází také k uvolnění antizymu, který se podílí na regulaci ODC. Tento antizym se váže na ODC, čímž se aktivuje 26S proteasom a ODC je degradován. V důsledku toho dojde ke snížení hladiny polyaminů a toto vychýlení rovnováhy může také podpořit děje vedoucí k buněčné smrti (Schipper *et al.*, 2000). Proti toxicitě vznikajícího APAL se organismy mohou bránit jeho oxidací pomocí ALDH, při které vzniká netoxický β -alanin (Seiler, 1995).

2.5 Reakční mechanismus aldehyddehydrogenas

Substrát vstupuje do kanálu vázajícího substrát, na jehož dně se nachází aktivní místo enzymu tvořené několika konzervovanými residui potřebnými pro přeměnu substrátu na produkt. Karbonylový uhlík vstupujícího aldehydového substrátu je atakován aktivovaným konzervovaným katalytickým Cys za vzniku thiohemiacetalového meziprojektu. K aktivaci katalytického Cys dochází pomocí konzervovaného Glu, který plní funkci obecné báze. Tento konzervovaný Glu pravděpodobně atakuje proton molekuly vody za vzniku hydroxidového aniontu, který následně aktivuje katalytický Cys. Atom uhlíku C4 nikotinamidového kruhu koenzymu NAD⁺ poté přijímá proton od vzniklého thiohemiacetalového meziprojektu (Wymore *et al.*, 2004). Tím dochází k tvorbě thioesteru a zároveň k redukci koenzymu na NADH. Následně opět konzervovaný Glu vystupující jako obecná báze přijme proton z molekuly vody. Vzniklý hydroxidový anion atakuje karbonylový uhlík thioesteru za tvorby výsledného produktu. Vzniklá karboxylová kyselina může s využitím molekuly vody reprotonovat katalytický Cys. Po oddisociování vzniklé karboxylové kyseliny a redukovaného koenzymu je enzym regenerován a může katalyzovat přeměnu dalšího substrátu (Hempel *et al.*, 1999).

U BADH izolované z tresčích jater (*Gadus morhua*) byl potvrzen takto probíhající reakční mechanismus. Substrát je vázán v částečně hydrofobním substrátovém kanálu, na jehož dně dochází k interakci aldehydové skupiny s konzervovaným Cys297 (Johansson *et al.*, 1998). U PsAMADH z hrachu setého (*P. sativum*) leží katalytický Cys294 mezi koenzymem a místem vázajícím substrát, jako obecná báze zde vystupuje Glu260. Katalytický Cys294 může existovat také ve formě thiolátu, což usnadňuje nukleofilní atak na karbonylový uhlík substrátu. V této formě ale existuje pouze při pH výrazně vyšším než 8 (Tylichová *et al.*, 2010). Kopečný *et al.* (2013) potvrdili, že Glu260 je u členů rodiny ALDH10 schopen aktivovat katalytický Cys přijmutím protonu z molekuly vody.

2.6 Aminoaldehyddehydrogenasy

Rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy (4-aminobutanal:NAD⁺-1-oxidoreduktasa; AMADH; EC 1.2.1.19) jsou enzymy, které se řadí do nadrodiny enzymů ALDH, konkrétně do rodiny ALDH10. Katalyzují oxidaci ω -aminoaldehydů na jim odpovídající ω -aminokyseliny a jako koenzym využívají NAD(P)⁺. Do rodiny ALDH10 patří také

enzymy označované jako betainaldehyddehydrogenasy (betainaldehyd:NAD⁺-oxidoreduktasa; BADH; EC 1.2.1.8), které jako substrát preferují betainaldehyd (BAL) na rozdíl od ω -aminoaldehydů (Brocker *et al.*, 2013). Jedná se například o enzym z mangrovníku (*Avicennia marina*) (Hibino *et al.*, 2001). Oxidačním produktem BAL je glycinbetain (GB), který hraje důležitou funkci v ochraně rostlin před abiotickým stresem. Vyšší rostliny pak proto mohou být rozděleny na ty akumulující GB a neakumulující GB (Fitzgerald *et al.*, 2009). Mezi rostliny neakumulující GB patří například hrách setý (*P. sativum*) (Charlton *et al.*, 2008), který není schopen oxidovat BAL. Aby měl ale zdroj ochranných osmolytů, je schopen oxidovat ω -aminoaldehydy APAL a ABAL, které jsou přeměňovány na β -alanin a GABA (Šebela *et al.*, 2000). β -Alanin je neproteinogenní aminokyselina, která může být trimetylována za vzniku kompatibilního osmolytu β -alaninbetainu (Stiti *et al.*, 2011). Samotný β -alanin je zapojen například do biosyntézy prekurzoru CoA, kyseliny pantothenové (Raman & Rathinasabapathi, 2004). GABA je také neproteinogenní aminokyselina s celou řadou funkcí. U živočichů funguje jako signální molekula, konkrétně jako inhibiční neurotransmiter vážící se na GABA receptory. U rostlin dochází ke zvýšení hladiny GABA v reakci na pokles pH v cytosolu, teplotní stres, salinitu (Kinnersley & Turano, 2000). Funguje také jako kompatibilní osmolyt a může vstupovat do cyklu trikarboxylových kyselin po její přeměně na kyselinu jantarovou přes sukcinátsemialdehyd (Bouché & Fromm, 2004). AMADH tedy hrají velice důležitou roli v katabolismu polyaminů, jelikož snižují hladiny toxických aldehydů a oxidují je na netoxické látky, které se podílí například na osmoprotekci. Bylo popsáno jejich zapojení do syntézy karnitinu (Peluso *et al.*, 2000) a souvislost s charakteristickou vůní některých rostlin, například rýže basmati (*Oryza sativa*), kde z důvodu mutace genu pro AMADH nedochází k dostatečné oxidaci ABAL či jeho cyklické formy Δ^1 -pyrrolinu a akumuluje se zde 2-acetyl- Δ^1 -pyrrolin (Bradbury *et al.*, 2008).

2.7 Aminoaldehyddehydrogenasa z hrachu

Aminoaldehyddehydrogenasa hrachu setého (*P. sativum*) existuje ve dvou isoformách *PsAMADH1* (Uniprot přístupové číslo Q8VWZ1) a *PsAMADH2* (Uniprot přístupové číslo Q93YB2) s molekulovou hmotností 120 a 117 kDa. Obě jsou ve formě dimeru a každý monomer obsahuje celkem 503 aminokyselin (Obr. 4) (Tylichová *et al.*, 2010). Monomery obou isoenzymů mají, podobně jako jiné ALDH, například BADH z tresčích jater (*G. morhua*) (Johansson *et al.*, 1998), mitochondriální ALDH2 z hovězích jater

(*Bos taurus*) (Steinmetz *et al.*, 1997), tři domény. Jedná se o doménu vázající koenzym, oligomerizační doménu a katalytickou doménu. Na C-konci je přítomna ještě peroxisomální signální sekvence. V blízkosti místa, kam se váže koenzym byla zjištěna přítomnost kationtu, konkrétně Na⁺. Ten pravděpodobně umožňuje zaujmout optimální konformaci pro vazbu koenzymu a podílí se také na stabilizaci vazby NAD⁺ s enzymem (Tylichová *et al.*, 2010). *Ps*AMADH vykazují vysokou homologii s rostlinnými BADH na úrovni primární sekvence. Na rozdíl od BADH ale nejsou schopny oxidovat BAL, ale přeměňují celou řadu ω-aminoaldehydů včetně APAL a ABAL (Šebela *et al.*, 2000).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
Q8VWZ1 MAITVSSRQL FIDGWRVPI LNKRIPIINP STENIIGDIP AATKEDVDLA VDAAKRAISR KNGRDNSAAS GSLRARYLRA IAAKIKEKID 90
Q93YB2 MDIPIPIRQL FINGDWKAPV LNKRIPIINP ATQNIIGDIP AATKEDVDVA VAAAKTALTR NKGADWATAS GAVRARYLRA IAAKVTEKKP 90

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
Q8VWZ1 ELGKLESIDC CKPLEEALAD LDDVVACFEY YAGLAEELDS KQKAFISLEPM DTFKSYILKE FIGVVALITP WNYPFIMATW KIAPALAAGC 180
Q93YB2 ELAKLESIDC CKPLDEAAWD IDDVAGCFEY YADLAEKIDA RQKAFVSLPM DTFKSHVIRE FIGVVGLITP WNYPFIMATW KVAPALAAGC 180

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
Q8VWZ1 AAILKPSELA SVTCLLELGEI CKEVGLPRGV LNIIVTGLGHE AGASLASHPD VDKISFTGSS ATGSKIMTAA AQLVKFVSLE LGGKSPIVVF 270
Q93YB2 AAILKPSELA SLTCLLELGEI CKEVGLPPGV LNILTGLGPE AGAPLATHPD VDKVAFTGSS ATGSKIMTAA AQLVKFVSLE LGGKSPLVVF 270

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
Q8VWZ1 EDVDLDKVAE WTVFGCFFTN GQICSATSRL IVHESIAVEF VDKLVKWAEN IKISDPLEEG CRLGPIVSEA QYKVLNCTIS SAKSEGATIL 360
Q93YB2 EDVDLDKAAE WAIFGCFWTN GQICSATSRL IVHESIAVEF LNRIVKWKIN IKISDPLEEG CRLGPFVVEG QYEKILKFSV NAKSEGATIL 360

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
Q8VWZ1 TGGRRPEHLK KGYFVEPTII TDVTSMQIW REEVFGVLA VKTFSTEEEA INLANDTHYG LGSAVMSNDL ERCERLSKAL QAGIVWINCA 450
Q93YB2 TGGSRPEHLK KGFIEPTII TDVTNMQIW REEVFGVLC VKTFSTEEEA IDLANDIVYG LGAAVISNDL ERCERVTKAF KAGIVWVNC 450

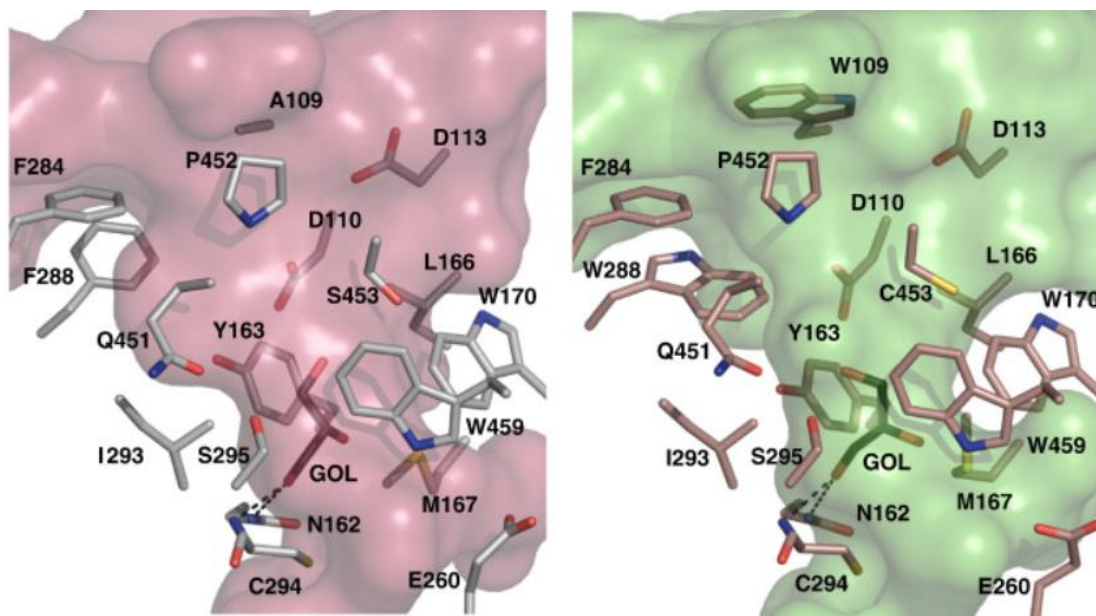
      460     470     480     490     500
Q8VWZ1 QPSFIQAPWG GIKRSGFGRE LGEWGLDNYL SVKQVTRYTS DEPWGWYQPP SKL 503
Q93YB2 PCFTQAPWG GVKRSGFGRE LGEWGLDNYL SVKQVTQYIS EEPWGWYQPP AKL 503

```

Obr. 4 Sekvence *Ps*AMADH1 (UniProt přístupové číslo Q8VWZ1) a *Ps*AMADH2 (UniProt přístupové číslo Q93YB2) upravené pomocí programu BioEdit Sequence Allignment Editor. Sekvence vykazují 80,3% shodu a 92,3% podobnost.

2.8 Substrátová specifita aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu

Aktivní místo enzymu (Obr. 5) se nachází na dně substrátového kanálu každého monomeru, který je 5-8 Å široký a 14 Å hluboký. Je tvořeno katalytickým Cys294, Asn162 a Glu260. Isoenzymy *PsAMADH1* a *PsAMADH2* mají podobnou substrátovou specifitu, ale liší se ve třech residuích, a to Ala/Trp109, Phe/Trp288 a Ser/Cys453 (Tylichová *et al.*, 2010). Aminokyselina v pozici 288 ovlivňuje interakci mezi postranním řetězcem konzervovaného Tyr163 a substrátem a ovlivňuje preferenci enzymu pro APAL nebo 4-trimethylaminobutanal (TMABAL). *PsAMADH2* má v pozici 288 přítomen Trp, díky čemuž tento isoenzym preferuje APAL jako nejlepší substrát. *PsAMADH1* obsahuje v pozici 288 Phe a preferuje TMABAL místo APAL, podobně jako *SlAMADH1* z rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*) či *ZmAMADH2* z kukuřice seté (*Zea mays*), které v této pozici mají přítomen Ala. V pozici 453 se u *PsAMADH1* nachází Ser, u *PsAMADH2* Cys. Postranní polární řetězce obou aminokyselin směřují dovnitř kanálu vázajícího substrát a díky tomu je jejich vnitřní prostor menší než například u *SlAMADH1*, která v této pozici obsahuje Thr a má tak širší substrátovou specifitu než isoenzymy hrachu setého (*P. sativum*) (Kopečný *et al.*, 2013). U vstupu do substrátového kanálu se nachází konzervovaná residua Asp110 a Asp113. Ta jsou zodpovědná za vysokou afinitní vazbu ω -aminoaldehydů (Kopečný *et al.*, 2011). Aromatická residua v substrátovém kanálu Tyr163, Trp170 a Trp459 jsou zodpovědná za vysokou afinitu k ω -aminoaldehydům. Aminokyselina v pozici 444 má poté vliv na aktivitu s BAL. Přítomnost Ile v této pozici, jako je u *PsAMADH*, vede k nízké aktivitě s BAL, jelikož tento Ile stericky brání Trp459 zaujmout vhodnou konformaci (Kopečný *et al.*, 2013).



Obr. 5 Vlevo substrátový kanál *PsAMADH1*. Vpravo substrátový kanál *PsAMADH2*. Vodíkové můstky mezi glycerolem (GOL) a enzymem jsou znázorněny přerušovanými čarami. Převzato z Tylichová *et al.* (2010).

Dle Šebela *et al.* (2000) je AMADH purifikovaná ze semenáčků hrachu setého (*P. sativum*) schopna přeměňovat ω -aminoaldehydy, které mají 3-6 uhlíkatý řetězec a Tylichová *et al.* (2010) zjistili, že přítomnost atomu dusíku v aldehydu je důležitá pro to, aby daná látka byla dobrým substrátem *PsAMADH*. Jako nejlepší substráty vystupují APAL a ABAL a přeměňovány jsou také TMABAL a 4-guanidinobutanal (GBAL) (Tab. 1) (Tylichová *et al.*, 2010). Dle Kopečný *et al.* (2013) jsou přirozenými substráty také ACAPAL a 3-dimethylsulfoniopropanal. Alifatické aldehydy, jako valeraldehyd nebo butanal jsou slabými substráty (Tylichová *et al.*, 2010).

Mezi substráty *PsAMADH* se řadí také řada syntetických látek. Dle Šebela *et al.* (2000) jsou substráty *PsAMADH* některé guanidinderiváty a hydroxyderiváty některých aminoaldehydů. Dále také pyridinkarbaldehydy (PCAL) (Tylichová *et al.*, 2010), *N*-acylderiváty APAL a ABAL (Tab. 2) (Frömmel *et al.*, 2015), aldehydy odvozené od purinu, 7-deazapurinu a pyrimidinu a halogenderiváty PCAL (Tab. 3) (Frömmel *et al.*, 2012). Imidazolové a pyrazolové karbaldehydy jsou také substráty *PsAMADH* (Frömmel *et al.*, 2019). U *N*-acylderivátů APAL a ABAL není důležitá délka acylového řetězce ani jeho větvení, jako spíše schopnost původního aminoaldehydu vystupovat jako substrát daného enzymu. Také záporně nabitý aldehyd, *N*-adipoyl-3-aminopropanal (Adip-APAL), byl popsán jako dobrý substrát *PsAMADH2*

(Frömmel *et al.*, 2015). Schopnost být substrátem u dusíkatých heterocyklických aldehydů závisí na pozici substituentu v heterocyklu nebo na délce postranního aldehydového řetězce (Frömmel *et al.*, 2012).

Tab. 1 Naměřené kinetické parametry K_m a V_{lim} přirozených substrátů s isoenzymy hrachu setého (*P. sativum*) $PsAMADH1$ a $PsAMADH2$ s využitím $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ (Tylichová *et al.*, 2010).

Substrát	Zkratky	AMADH	Michaelisova konstanta K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Limitní rychlost V_{lim} ($\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
3-aminopropanal	APAL	$PsAMADH1$	75	57
		$PsAMADH2$	10	190
4-aminobutanal	ABAL	$PsAMADH1$	170	50
		$PsAMADH2$	29	57
4-trimethylaminobutanal	TMABAL	$PsAMADH1$	10	87
		$PsAMADH2$	21	140
4-guanidinobutanal	GBAL	$PsAMADH1$	11	68
		$PsAMADH2$	7	78
nikotinamidadeninindinukleotid	NAD^+	$PsAMADH1$	40	—
		$PsAMADH2$	55	—

Tab. 2 Naměřené kinetické parametry K_m a k_{cat} přirozených substrátů APAL, ABAL, ACAPAL a syntetických substrátů s isoenzymy hrachu setého (*P. sativum*) $PsAMADH1$ a $PsAMADH2$ s využitím $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ (Frömmel *et al.*, 2015).

Substrát	Zkratky	AMADH	Michaelisova konstanta K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Číslo přeměny k_{cat} (s^{-1})
3-aminopropanal	APAL	$PsAMADH1$	$71,8 \pm 5,75$	$3,65 \pm 0,122$
		$PsAMADH2$	$7,27 \pm 0,46$	$9,42 \pm 0,146$
4-aminobutanal	ABAL	$PsAMADH1$	$153 \pm 15,4$	$3,1 \pm 0,151$
		$PsAMADH2$	$45,9 \pm 6,86$	$3,02 \pm 0,147$
3-acetamidopropanal	ACAPAL	$PsAMADH1$	$268 \pm 31,3$	$3,61 \pm 0,227$
		$PsAMADH2$	$109 \pm 21,7$	$13,9 \pm 1,34$
<i>N</i> -propionyl-3-aminopropanal	Propi-APAL	$PsAMADH1$	$492 \pm 23,3$	$3,4 \pm 0,049$
		$PsAMADH2$	$65,1 \pm 3,77$	$7,72 \pm 0,17$
<i>N</i> -propionyl-4-aminobutanal	Propi-ABAL	$PsAMADH1$	327 ± 14	$1,65 \pm 0,019$
		$PsAMADH2$	$92,7 \pm 7,69$	$1,63 \pm 0,06$
<i>N</i> -valeryl-3-aminopropanal	Valer-APAL	$PsAMADH1$	$120 \pm 11,2$	$2,02 \pm 0,07$
		$PsAMADH2$	$271 \pm 66,8$	$11 \pm 1,56$
<i>N</i> -valeryl-4-aminobutanal	Valer-ABAL	$PsAMADH1$	$629 \pm 35,1$	$1,05 \pm 0,02$
		$PsAMADH2$	304 ± 39	$1,93 \pm 0,07$
<i>N</i> -adipoyl-3-aminopropanal	Adip-APAL	$PsAMADH1$	$431 \pm 39,3$	$1,03 \pm 0,053$
		$PsAMADH2$	$39,2 \pm 3,99$	$8,78 \pm 0,305$

Tab. 3 Naměřené kinetické parametry K_m a V_{lim} syntetických substrátů a nejlepšího přirozeného substrátu APAL s isoenzymem hrachu setého (*P. sativum*) PsAMADH2 s využitím 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD⁺ (Frömmel *et al.*, 2012).

Substrát	Zkratky	Michaelisova konstanta K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Limitní rychlost V_{lim} ($\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
3-aminopropanal	APAL	12 ± 1,2	179 ± 5,1
2-pyridinkarbaldehyd	2-PCAL	77 ± 5,2	2,1 ± 0,03
3-pyridinkarbaldehyd	3-PCAL	754 ± 32,4	7,8 ± 0,13
4-pyridinkarbaldehyd	4-PCAL	33 ± 2,3	2,1 ± 0,04
2,6-dichloro-4-pyridinkarbaldehyd	2,6-diCl-4-PCAL	28 ± 0,5	15 ± 0,5
3-pyridin-2-yl-propanal	P2PAL	171 ± 10,9	42 ± 0,9
3-pyridin-3-yl-propanal	P3PAL	87 ± 8	22 ± 0,8
3-pyridin-4-yl-propanal	P4PAL	29 ± 2,1	70 ± 1,3
3-pyridinylmethylaminobutanal	3-PMet-ABAL	289 ± 16,4	27 ± 0,6
3-bromobenzaldehyd	3-Br-BzAL	13 ± 0,9	1,16 ± 0,02
<i>N</i> -(2,2-dimethoxyethyl)-9 <i>H</i> -purin-6-amin	Pu-AEAL	755 ± 55,2	9,6 ± 0,4

2.9 Aldehyddehydrogenasy rodiny 7

Enzymům řadícím se do rodiny aldehyddehydrogenas 7 [(*S*)-2-amino-6-oxohexanoát:NAD(P)⁺-6-oxidoreduktasa; ALDH7; EC 1.2.1.31] se také jinak říká Δ^1 -piperidein-6-karboxylátdehydrogenasy, α -aminoadipátsemialdehyddehydrogenasy či antikvitiny (Brocker *et al.*, 2013). Název antikvitiny nesou díky jejich vysoké konzervovanosti v rámci evoluce. Lidský antikvitin sdílí 60 % své aminokyselinové sekvence s hrachovým antikvitinem (Lee *et al.*, 1994) a vykazuje 76% homologii své nukleotidové sekvence s antikvitinem z pražmy (*Acanthopagrus schlegelii*) (Tang *et al.*, 2005). Přirozeným a zároveň preferovaným substrátem ALDH7 je α -aminoadipátsemialdehyd (AASAL), který je oxidován na α -aminoadipát. Pokud dojde k mutaci genu pro lidskou hALDH7, tak dochází k akumulaci piperidein-6-karboxylátu, což je cyklická forma AASAL. V důsledku toho dochází k inaktivaci pyridoxal-5'-fosfátu a rozvoji pyridoxin-dependentní epilepsie (Mills *et al.*, 2006). AASAL vzniká jako meziprodukt katabolismu Lys, který může probíhat dvěma cestami. První je dráha kyseliny L-pipekolové, kdy tato kyselina je přeměněna na AASAL pomocí L-pipekolát oxidasy (L-pipekolát:O₂-1,6-oxidoreduktasa; EC 1.5.3.7) (Chang *et al.*, 1990), jejíž aktivita byla detegována v mitochondrii (králík, prase. pes) (Mihalik & Rhead, 1991) a v peroxisomech (potkan) (Rao *et al.*, 1993). V mitochondrii dochází ke katabolismu Lys přes sacharopin na AASAL pomocí bifunkčního enzymu L-lysin- α -ketoglutarát reduktasy/sacharopindehydrogenasy [N^6 -(L-1,3-dikarboxypropyl)-L-lysin:NADP⁺-oxidoreduktasa (L-lysin tvořící); EC 1.5.1.8]

(Markovitz *et al.*, 1984). Lokalizace antikvitinu může být různá. U pražmy (*A. schlegelii*) byla potvrzena lokalizace v cytosolu (Tang *et al.*, 2005), u lidského antikvitinu byla potvrzena lokalizace v cytosolu a v mitochondrii (Wong *et al.*, 2009) a během G₁-S fáze také v jádře, což naznačuje roli tohoto enzymu v buněčném růstu (Chan *et al.*, 2011). Jsou zapojeny také v ochraně organismů před abiotickým stresem, jako je sucho, salinita, těžké kovy, ale také zvýšená koncentrace H₂O₂ nebo kyseliny abscisové (Kotchoni *et al.*, 2006).

2.10 Aldehyddehydrogenasy 7 z kukuřice a hrachu

Rostlinné ALDH7 se řadí do podrodiny ALDH7B. Jsou to například *OsALDH7B6* z rýže seté (*O. sativa*), *AtALDH7B4* z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), *PsALDH7B1* z hrachu setého (*P. sativum*) nebo *ZmALDH7B6* z kukuřice seté (*Z. mays*). Jejich sekvence jsou vysoce konzervované, například *ZmALDH7* sdílí 77 % své identity s *PsALDH7* (Končítíková *et al.*, 2015).

PsALDH7 je tetramerní s molekulovou hmotností monomeru 53 789 Da a délkou sekvence 508 aminokyselin (UniProt přístupové číslo P25795), *ZmALDH7* je také tetramerní enzym s molekulovou hmotností monomeru 54 432 Da a s délkou sekvence 509 aminokyselin (UniProt přístupové číslo W8SNM6) (Obr. 6). Každý monomer obsahuje 3 domény, oligomerizační, katalytickou a doménu vázající koenzym a podobně jako u *PsAMADH* je i zde přítomen kovový ion, konkrétně Na⁺, který je vázán v blízkosti místa vazby koenzymu NAD⁺. Na opačné straně místa vazby koenzymu se nachází substrátový kanál (Obr. 7), kde se v místě vazby substrátu nachází 3 konzervovaná residua Glu120, Arg300, Thr302 specifická pro rodinu ALDH7 (Končítíková *et al.*, 2015). S využitím místně cílené mutace aminokyselin Glu121 a Arg301 hALDH7 Chan *et al.* (2011) zjistili, že Glu121 (Glu 120 u *ZmALDH7*) interaguje s α -aminoskupinou AASAL a Arg301 (Arg300 u *ZmALDH7*) s karboxylovou skupinou AASAL. Thr302 by dle Končítíková *et al.* (2015) mohl interagovat s vedlejším řetězcem substrátu (AASAL) nesoucím karboxylovou skupinu.


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
P25795 MGS-DSNNLG FLKEIGLGAT NIGSFINGQW KANGPTVHSV NPSTNQVIAS VTEATLDDYE EGLRASSEAA KTWRTVPAPK RGEIVRQIGD 89
W8SNM6 MGAFAKEEHQ FLAELGLAQR NPGAFACGAW GSGPTVTST SPTNNQVIAE VVEASVHDYE EGMRACFDAA KTWMAIAPK RGEIVRQIGD 90

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
P25795 ALRAKLDPLG RLVALEMGI LAEGIGEVQE IIDMCDYSVG LSRQLNGSII PSERPBHMMF EVWNPLGIVG VITAFNFPCA VLGWNACIAL 179
W8SNM6 ALRAKLHLG RLVSLEMGI LPEGIGEVQE IIDMCDYAVG LSRQLNGSII PSERPNHMMF EVWNPLGVVG VITAFNFPCA VLGWNACIAL 180

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
P25795 VGGNTVVWKG APTTPLITVA VTKLIAEVFE RNNLPGAIPT ALCGGADIGH AIAKDTRIPL VSPTGSSKVG ALVQQTVSQR FGKTLLELSG 269
W8SNM6 VCGNCVVWKG APTTPLITIA MTKIVASVLE KNNLPGAIPT SFCGGTEIGQ AIALDIRIPL VSPTGSTRAG LMVQQVSAR FGKCLLELSG 270

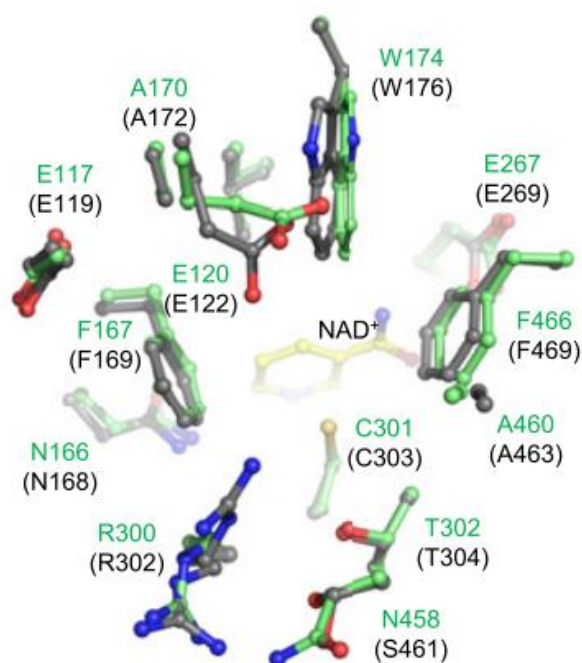
      280     290     300     310     320     330     340     350     360
P25795 NNAIIVMDDA DITLAVRSIF FAAVGTAGQR CTTCRRLYLH ESVYANVLEQ LTALYKQVKI GNPLEEGTLV GPLHTRSAVE NFKNGISAIK 359
W8SNM6 NNAIIVMDDA DIQLAVRSVL FAAVGTAGQR CTTCRRLILH ENIYQTFLDQ LVEVYKQVRI GDPLEKGTLL GPLHTPASKE NFKLGIQTIK 360

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
P25795 SQGGKIVTGG SVLESEGNFV VPTIVEISAD AAVVKEELFA PVLVVMKFKD LEEAIALNNS VPQGLSSSIF TQKPSTIFKW IGPSGSDCGI 449
W8SNM6 SQGGKILPGG SAIESEGNFV QPTIVEITPS APVVKEELFG PVLVVMKFT LKEAIEINNS VPQGLSSSIF TKRPDIIPKW LGHPSGSDCGI 450

      460     470     480     490     500
P25795 VNVNIPTNGA EIGGAFGGEK ATGGGREAGS DSWKQYMRRS TCTINYGSEL PLAQGINFG 508
W8SNM6 VNVNIPTNGA EIGGAFGGEK ATGGGREAGS DSWKQYMRRA TCTINYGSEL PLAQGINFG 509

```

Obr. 6 Sekvence *PsALDH7* (UniProt přístupové číslo P25795) a *ZmALDH7* (UniProt přístupové číslo W8SNM6) upravené pomocí programu BioEdit Sequence Allignment Editor. Sekvence vykazují 77,0% shodu a 85,9% podobnost.



Obr. 7 Porovnání substrátových kanálů s přítomnými residui enzymů *ZmALDH7* (zeleně) a *hALDH7* (šedě) (Končítíková *et al.*, 2015).

Substrátová specifita isoformem *ZmALDH7* a *PsALDH7* není příliš široká a jejich nejvíce preferovaným přirozeným substrátem je AASAL (Tab. 4). ω -aminoaldehydy APAL a ABAL, které jsou preferovanými substráty ALDH10, jsou také substráty *ZmALDH7* i *PsALDH7*, ale jejich afinita k tomuto enzymu je velmi nízká. Důvodem je pravděpodobně nepřítomnost karboxylové skupiny ve strukturním vzorci substrátu. Podobně BAL, TMABAL a GBAL mohou být přeměňovány těmito enzymy, velmi špatně jsou přeměňovány alifatické aldehydy jako malondialdehyd. Rostlinné ALDH7 jsou tedy schopny poskytovat ochranné osmolyty jako GABA či betainalanin a GB, ale v mnohem menší míře než členové rodiny ALDH10 (Končítíková *et al.*, 2015).

Tab. 4 Naměřené kinetické parametry K_m a k_{cat} vybraných přirozených substrátů *ZmALDH7* a *PsALDH7* s využitím $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ (Končítíková *et al.*, 2015).

Substrát	Zkratky	ALDH7	Michaelisova konstanta K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Číslo přeměny k_{cat} (s^{-1})
α -aminoadipátsemialdehyd	AASAL	<i>ZmALDH7</i>	97 ± 7	$2,56 \pm 0,043$
		<i>PsALDH7</i>	89 ± 3	$3,32 \pm 0,027$
methylester- α -aminoadipátsemialdehydu	MASAL	<i>ZmALDH7</i>	126 ± 21	$0,09 \pm 0,004$
		<i>PsALDH7</i>	147 ± 17	$0,026 \pm 0,009$
4-guanidinobutanal	GBAL	<i>ZmALDH7</i>	2767 ± 146	$1,43 \pm 0,029$
		<i>PsALDH7</i>	2551 ± 159	$2,22 \pm 0,071$
betainaldehyd	BAL	<i>ZmALDH7</i>	120 ± 3	$0,03 \pm 0,001$
		<i>PsALADH7</i>	111 ± 7	$0,03 \pm 0,001$
4-aminobutanal	ABAL	<i>ZmALDH7</i>	4371 ± 116	$0,027 \pm 0,005$
		<i>PsALDH7</i>	5167 ± 162	$0,046 \pm 0,007$
3-aminopropanal	APAL	<i>ZmALDH7</i>	1280 ± 59	$0,15 \pm 0,002$
		<i>PsALADH7</i>	1698 ± 81	$0,34 \pm 0,007$
4-pyridinkarbaldehyd	4-PCAL	<i>ZmALDH7</i>	537 ± 51	$0,22 \pm 0,007$
		<i>PsALADH7</i>	321 ± 10	$0,27 \pm 0,005$
nikotinamidadeninukleotid	NAD^+	<i>ZmALDH7</i>	358 ± 24	$2,68 \pm 0,030$
		<i>PsALADH7</i>	393 ± 21	$3,46 \pm 0,046$

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Pro přípravu PsAMADH byly použity sedmidenní semenáčky hrachu setého (*P. sativum*) pěstované ve tmě při 23 °C a zalévané kohoutkovou vodou. Sklizeny byly pouze nadzemní části, materiál byl skladován při -28 °C. Rekombinantní enzymy PsALDH7 z hrachu setého (*P. sativum*) a ZmALDH7 z kukuřice seté (*Z. mays*), připravené v *Escherichia coli* (Končítíková *et al.*, 2015), byly získány od Mgr. Martiny Kopečné, Ph.D. Syntetické substráty odvozené acylací ABAL, APAL a 2-aminoethanalu (AEAL) s *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-fenylalaninem (Boc-Phe-OH) a *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-L-tyrosinem (Boc-Tyr(*t*Bu)-OH) byly z důvodu pandemických opatření připraveny školitelem ve spolupráci s doc. RNDr. Miroslavem Souralem, Ph.D., který zajistil také NMR analýzu na katedře organické chemie PřF UP.

3.1.2 Chemikálie

- acetonitril (Merck, Německo)
- akrylamid/*N*, *N'*-metylenbisakrylamid 30% roztok 29:1 (AA/BIS; Bio-Rad, USA)
- δ -aminoadipátsemialdehyd ethylenacetal (*S*)-2-amino-5-(1,3-dioxolan-2-yl)-pentanová kyselina (Chiralix, Nizozemí)
- 4-aminobutyraldehyd diethylacetal (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- 1-amino-3,3-diethoxypropan (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- amoniak (Lach-Ner, Česká republika)
- barvivo QC koloidní Coomassie (Bio-Rad, USA)
- bicin (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- Bis-Tris (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- cetyltrimethylamonium bromid (CTAB; Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- deionizovaná voda (připravena na zařízení Milli-Q od firmy Merck Millipore)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- dihydrogenuhlíčitán amonný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- dithiothreitol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- dodecylsíran sodný (SDS; Serva, Německo)
- ethanol (Merck, Německo)
- fenazin methosulfát (PMS; Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- glycerol (Lach-Ner, Česká republika)

- glycin (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- hovězí sérový albumin (BSA; Sigma, USA)
- hydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- hydrogenuhličitan amonný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- hydrochlorid tryptaminu (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- hydroxid sodný (Merck, Německo)
- chlorid manganatý (Fluka Chemie, Švýcarsko)
- 2-jodacetamid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- kyselina bicinchoninová (BCA; Sigma-Aldrich Chemie; Sigma, Německo)
- kyselina ethylendiamintetraoctová disodná sůl (EDTA; Sigma-Aldrich Chemie; Sigma, Německo)
- kyselina chlorovodíková (VWR, Francie)
- kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA; Bruker Daltonik, Německo)
- kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- kyselina octová 96% (Merck, Německo)
- kyselina trifluoroctová (TFA; Merck, Německo)
- kyselina trihydrogenfosforečná (Lach-Ner, Česká republika)
- Laemmliho vzorkový pufr (Bio-Rad, USA)
- 2-merkaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- methanol absolutní – LC-MS (Biosolve Chimie, Francie)
- monohdrát kyseliny citronové (Lach-Ner, Česká republika)
- mravenčan amonný (Fluka, Švýcarsko)
- β -nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺; Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- octan amonný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- persíran amonný (APS; Bio-Rad, USA)
- Precision Plus Protein™ Standards All Blue, katalog #161-0373 10-250 kDa (Bio-Rad, USA)
- protamin sulfát (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- pyrofosfát sodný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- sacharosa (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- síran amonný (Merck, Německo)
- síran měďnatý (Lach-Ner, Česká republika)
- SOLu trypsin (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- standard pro kolonu Enrich SEC 650 (Bio-Rad, USA)
- *N, N, N', N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED; Bio-Rad, USA)
- thiazolyl blue tetrazolium bromid (MTT; Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- triethylamin (Merck, Německo)
- trihydrát octanu sodného (Fluka Chemie, Švýcarsko)
- Tris (MP Biomedicals, USA)
- uhličitan amonný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)

3.1.3 Přístroje

- analytické váhy XA 110/2X (RADWAG, Polsko)
- automatický nástřikový ventil AVR7-3 (Bio-Rad, USA)

- centrifuga nízkorychlostní (OHAUS, USA)
- centrifuga stolní chlazená Multifuge X3R (Thermo Fisher Scientific, USA)
- elektroforetická komůrka Mini PROTEAN 3 cell (Bio-Rad, USA)
- elektromagnetická míchačka C-MAG HS 7 (IKA WERKE, Německo)
- hmotnostní spektrometr microflex LRF 20 (Bruker Daltonik, Německo)
- hmotnostní spektrometr ultrafleXtreme (Bruker Daltonik, Německo)
- homogonizátor Ultra Turrax T50 basic (IKA WERKE, Německo)
- inkubátor MD-01 (Major Science, USA)
- inkubátor Thermomixer Comfort S (Eppendorf, Německo)
- kapalinový střednětlaký chromatograf BioLogic Duo Flow (Bio-Rad, USA)
- laminární box (Merci, Česká republika)
- laserový skener Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie)
- magnetická míchačka lab disc white (IKA WERKE, Německo)
- magnetická míchačka MST (IKA WERKE, Německo)
- membránová vývěva (KNF Laboport, Německo)
- minicentrifuga Mikrospin 12 (Biosan, Lotyšsko)
- nanodrop nanoready Touch Micro UV-VIS spektrofotometr (LifeReal, Čína)
- peristaltická pumpa (Kouřil, Česká republika)
- pH metr (XS Instruments, Itálie)
- spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, Velká Británie)
- teplotní čidlo IKA-TRON (IKA WERKE, Německo)
- třepačka IKA KS 130 (IKA WERKE, Německo)
- ultrafiltrační cela Amicon (Merck, Německo)
- ultrazvuková lázeň K-5LM (Kraintek, Česká republika)
- UV-1 monitor (Pharmacia, Švédsko)
- UV-VIS detektor BioLogic QuadTec (Bio-Rad, USA)
- vakuový koncentrátor (Eppendorf, Německo)
- vodní lázeň digitální SUB 6 (Grant Instruments, Velká Británie)
- vortex (Chromservis, Česká republika)
- zapisovač REC 112 2-CH 230V (Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie)
- zdroj napětí k elektroforéze Power (Bio-Rad, USA)

3.1.4 Pomůcky

- filtr s limitem do 10 kDa (Merck-Millipore, USA)
- kolona ENrich SEC 650 (Bio-Rad, USA)
- kolona Mono Q HR 5/5 (Pharmacia, Švédsko)
- MSP BigAnchor 96 MALDI destička (Bruker Daltonik, Německo)
- MTP AnchorChip 384 MALDI destička (Bruker Daltonik, Německo)
- skleněná kolona 1 × 10 cm (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) naplněná stacionární fází 5'-AMP Sepharose 4B (Pharmacia Biotech, Švédsko)
- skleněná kolona 2,5 × 20 cm (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) naplněná stacionární fází DEAE-Sepharose (Amersham Biosciences, Švédsko)
- skleněná kolona 2,5 × 50 cm (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) naplněná stacionární fází Sephadex G-25 Medium (Pharmacia, Švédsko)

- ZipTip špičky s C₁₈ fází (Merck, Německo)

3.2 Metody

3.2.1 Extrakce proteinů a purifikace aminoaldehyddehydrogenasy ze semenáčků hrachu

Postup extrakce proteinů a purifikace *PsAMADH* byl proveden dle Šebela *et al.* (2000). Některé kroky však byly upraveny na základě možností a potřeb v rámci laboratoře. Zmrazené etiolované semenáčky hrachu (1 kg) byly homogenizovány pomocí homogenizátoru Ultra Turrax T50 ve 2 l 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátového pufru (pH 7,0) obsahujícího 15 mmol·l⁻¹ 2-merkptoethanol, 1 mmol·l⁻¹ EDTA a 10% (w/v) sacharózu po dobu 10 min. Vzniklý homogenát byl zfiltrován přes nylonovou tkaninu. Filtrát byl centrifugován po dobu 30 min při 4200 g a k odebranému supernatantu byla za míchání na elektromagnetické míchačce přidána 5% suspenze protaminsulfátu (pH upraveno na 6,5 kyselinou fosforečnou), a to tak, že 1 g protaminsulfátu odpovídal 10 g proteinu v supernatantu. Po posledním přidavku a 10 min míchání následovala centrifugace po dobu 30 min při 4200 g. Supernatant byl srážen postupnými přidavky 0,5 mol·l⁻¹ MnCl₂, aby byla výsledná koncentrace 7,5 mmol·l⁻¹. Vše probíhalo za neustálého míchání a po 30 min od posledního přidavku byl roztok opět centrifugován po dobu 30 min při 4200 g. K supernatantu byl následně za míchání přidán jemně práškový (NH₄)₂SO₄ (430 g/l) pro vysrážení zbylých proteinů z extraktu. Po posledním přidavku následovalo 30 min míchání a pak byla provedena centrifugace po dobu 30 min při 4200 g.

Sediment obsahující precipitované proteiny byl uchováván zmrazený při -28 °C, případně byl rovnou suspendován do maximálního rozpuštění ve 40 ml pufru A: 20 mmol·l⁻¹ fosforečnan draselný (pH 6,0) obsahující 5 mmol·l⁻¹ 2-merkptoethanol, 1 mmol·l⁻¹ EDTA a 5% (w/v) glycerol. Následovalo odsolení pomocí kolony se Sephadexem G-25, která byla ekvilibrována puftrem A. Průtoková rychlost zajištěná peristaltickou pumpou byla 2 ml·min⁻¹, separace byla monitorována při 280 nm pomocí monitoru UV-1 a zaznamenávána na zapisovači REC 112. Odsolený roztok proteinů byl nanesen na kolonu obsahující DEAE-Sepharosu jako stacionární fázi ekvilibrovanou puftrem A s průtokovou rychlostí 2 ml·min⁻¹. Po nanesení roztoku probíhalo promývání kolony puftrem A, dokud nebyly vymyty nezachycené proteiny. Eluce proběhla s využitím lineárního gradientu (50 ml) od 0 do 100 % pufru A obsahujícího 1 mol·l⁻¹

NaCl. Frakce eluátu s aktivitou *PsAMADH* byly spojeny a obsažené proteiny byly precipitovány jemně práškovým $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (430 g/l). Po posledním přidavku následovalo 30 min míchání a pak byla provedena centrifugace po dobu 30 min při 4200 g. Precipitát byl skladován zmrazený při $-28\text{ }^\circ\text{C}$.

Precipitát po nízkotlaké chromatografii byl rozpuštěn v 0,5 ml pufru B: $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Bis-Tris/HCl (pH 6,0) obsahující $5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 2-merkптоethanol, $1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA a 5% w/v glycerol. Následovala centrifugace po dobu 3 min při 10400 g a přečištění pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) na koloně ENrich SEC 650 ekvilibrované pufrem B s rychlostí průtoku $0,75\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Pro tento účel byl k dispozici střednětlaký chromatograf Bio-Logic Duo Flow s detektorem QuadTec a automatickým ventilem ovládaným počítačem. Alikvoty byly nanášeny prostřednictvím 500 μl smyčky. Sbírány byly frakce, které vykazovaly nejvyšší enzymovou aktivitu s APAL. Po spojení byl roztok zahuštěn ultrafiltrací (filtr s limitem 10 kDa) na celkový objem 5,5 ml. Následovalo přečištění pomocí iontoměničové chromatografie (IEC) na koloně Mono Q HR 5/5 ekvilibrované pufrem B s průtokovou rychlostí $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovací smyčka měla objem 1 ml. Eluce proběhla s využitím gradientu iontové síly v mobilní fázi. Eluční pufr byl připraven přidavkem $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl do pufru B. Frakce s nejvyšší enzymovou aktivitou byly opět spojeny a zahuštěny ultrafiltrací na celkový objem zhruba 2 ml. Pro dočištění *PsAMADH* byla využita afinitní chromatografie (AC) na 5'-AMP Sepharose 4B ekvilibrované pufrem B. Vzorek byl nanesen při průtokové rychlosti $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Po promytí proběhla eluce pomocí pufru B s přidavkem NAD^+ o výsledné koncentraci $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Sbírána byla také nezachycená frakce.

3.2.2 Identifikace aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu

Vzorky získané elucí z kolon ENrich SEC 650, Mono Q HR 5/5 a 5'-AMP Sepharose 4B spolu s nezachycenou frakcí z 5'-AMP Sepharosy 4B byly koncentrovány ultrafiltrací. Pro posouzení čistoty enzymu byly tyto vzorky separovány pomocí SDS-PAGE v diskontinuálním uspořádání, proteiny štěpeny na peptidy a následně proběhla identifikace s využitím MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Čistota enzymů s využitím SDS-PAGE a barvením gelu byla určena také pro vzorky rekombinantních enzymů *PsALDH7* a *ZmALDH7*, které poskytla Mgr. Martina Kopečná, Ph.D.

Dělicí gel (12%) a zaostřovací gel (4%) byly připraveny dle tabulky (Tab. 5), tloušťka byla 1 mm. Rozměr separačního gelu činil 5 (výška) x 8 (šířka) cm.

Při přípravě obou gelů byl nejdříve roztok AA/BIS, gelového pufru a destilované vody odvzdušňován pomocí membránové vývěvy v uzavřené odsávací Erlenmeyerově baňce. Poté byl přidán 10% roztok SDS, TEMED a 10% roztok APS, kterým byla zahájena polymerace gelů. Koncentrované vzorky enzymu byly smíchány v poměru 1:1 s 2X Laemmliho vzorkovým pufrům a zahřívány 5 min při 100 °C. Jako standard byl využit Precision Plus Protein™ Standard All Blue v rozsahu 10-250 kDa. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu téměř 1,5 h s použitím Tris-glycinového elektrodového pufru (pH 8,3) o složení 0,025 mol·l⁻¹ Tris, 0,192 mol·l⁻¹ glycin a 0,1% SDS. K barvení gelu bylo použito QC koloidní Coomassie barvivo a probíhalo na třepačce přes noc. Gely byly následně odbarvovány destilovanou vodou a naskenovány na kalibrovatelném skeneru s využitím programu LabScan. Úprava obrázků (jas, kontrast, oříznutí) proběhla s pomocí programu PaintShop Pro 8.0.

Tab. 5 Pipetované objemy (ml) jednotlivých složek roztoků pro přípravu 12% dělicího a 4% zaostřovacího gelu pro provedení SDS-PAGE v diskontinuálním uspořádání.

Složka (ml)	AA/BIS (30/3,3 %)	Tris-HCl pufr (pH 8,8)	Tris-HCl pufr (pH 6,8)	Deionizovaná voda	SDS (10%)	TEMED	APS (10%)
Dělicí gel	4	2,5	-	3,2	0,1	0,015	0,05
Zaostřovací gel	0,65	-	1,25	2,95	0,1	0,01	0,06

Po promytí gelu deionizovanou vodou byly obarvené pásy gelu vyříznuty skalpelem pro identifikaci přítomných proteinů. Vyříznuté pásy byly vloženy do mikrozkmavek a pomocí skalpelu rozřezány na menší kousky. Následovala krátká centrifugace s využitím nízkorychlostní centrifugy OHAUS. Pro odbarvení kousků gelu bylo přidáno 180 μl roztoku získaného smísením 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4HCO_3 a acetonitrilu, 1:1 (v/v). Po promíchání na vortexu proběhla inkubace 2 h při laboratorní teplotě. Vzorky byly krátce centrifugovány a modrý roztok byl odpipetován. Následovala dehydratace vzorku přidavkem 180 μl acetonitrolu a inkubace 15 min při 37 °C a 1100 rpm. Po krátké centrifugaci vzorků byl acetonitril odpipetován a bylo přidáno 100 μl 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dithiotreitolu, který byl rozpuštěn v 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4HCO_3 , pro zredukování disulfidových vazeb v proteinech. Vzorky byly krátce promíchány na vortexu a inkubovány 30 min při 60 °C a 400 rpm. Následovala krátká centrifugace, opětovné odpipetování roztoku a dehydratace vzorků. Po odpipetování acetonitrilu byl přidán 55 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 2-jodacetamid rozpuštěný v 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4HCO_3 pro alkylation cysteinových zbytků. Vzorky byly inkubovány 20 min ve tmě. Po odpipetování roztoku a propláchnutí 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4HCO_3 byly vzorky opět dehydratovány acetonitrem. Po odpipetování roztoku proběhlo štěpení proteinů v gelu s využitím SOLu trypsinu, který byl naředěn vychlazeným 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4HCO_3 . Výsledná koncentrace trypsinu byla 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po 1 h inkubaci v ledové tříšti byl roztok odpipetován a nahrazen 40 μl 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4HCO_3 . Vzorky byly inkubovány přes noc při 37 °C a 400 rpm. Po proběhnutém štěpení proteinů v gelu následovala extrakce získaných peptidů s využitím 100 μl extrakčního roztoku, který byl připraven smísením 5% kyseliny mravenčí a acetonitrilu, 1:2 (v/v). Směs byla inkubována 30 min při 37 °C a 800 rpm. Roztoky s extrahovanými peptidy byly odpipetovány do čistých mikrozkmavek a odpařeny s využitím vakuového koncentrátoru při 45 °C. Získané odparky byly následně rozpuštěny v 10 μl 0,1% TFA, 5 min inkubovány v ultrazvukové lázni a krátce centrifugovány. Pro odsolení vzorků byly použity špičky ZipTip s C_{18} fází. Nejdříve byly špičky 2x promyty zvlhčujícím roztokem (100% acetonitril) a poté ekvilibračním/promývacím roztokem (0,1% TFA). Následně byl 10x nasát a opět vypuštěn vzorek, aby mohlo dojít k navázání peptidů na obrácenou fázi. Poté byly špičky promyty ekvilibračním roztokem a následně elučním roztokem (0,1% TFA/50% acetonitril). Získané roztoky byly opět odpařeny pomocí vakuového koncentrátoru a rozpuštěny v 10 μl 0,1% roztoku TFA. Peptidové roztoky byly využity k identifikaci proteinů pomocí MALDI-TOF peptidového mapování na hmotnostním spektrometru

Microflex případně ultrafleXtreme. Měřilo se v pozitivním módu, spektra byla akumulována z 1000-2000 laserových impulsů. V obou případech byla jako matrice použita 50 mmol·l⁻¹ CHCA ve směsi acetonitril:2,5% TFA, 7:3 (v/v). Na destičku bylo pipetováno 0,5 µl roztoku peptidů v 0,1% TFA a následně 0,5 µl matrice. Měření proběhlo po odpaření a krystalizaci, využit byl software flexControl 3.4 od výrobce přístroje. Parametry pro měření jsou uvedeny níže (Tab. 6 a 7). Naměřená hmotnostní spektra byla vyhodnocena v programu flexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonik; odečtení *m/z* hodnot peptidových signálů) a po exportu do programu BioTools 3.2 (Bruker) proběhlo vyhledávání pomocí programu Mascot 2.4 (Matrix Science, Velká Británie) s použitím sekvencí hrachových proteinů získaných z databáze NCBI Protein. V potaz byla vzata karbamidomethylace Cys jako globální modifikace, oxidace Met, deamidace Asn a Gln plus acetylace N-konce jako variabilní modifikace. Použitým enzymem byl trypsin, zařazeno 1 možné vynechané štěpení, tolerance 100 ppm (Microflex) nebo 25 ppm (ultrafleXtreme).

Tab. 6 Parametry MALDI-TOF hmotnostního spektrometru Microflex LRF20 pro peptidové mapování. ACTH – adrenokortikotropní hormon.

		Kalibrační standardy	[M+H] ⁺
Iontový zdroj 1	17,5 kV	Bradykinin (1-7)	757,3992
Iontový zdroj 2	15,1 kV	Angiotensin II	1046,5418
Čočka	8,5 kV	Angiotensin I	1296,6848
Reflektor	19,00 kV	Substance P	1347,7354
Pulzní iontová extrakce	300 ns	Bombesin	1619,8223
Napětí na detektoru	1591 V	Renin	1758,9326
Rozsah <i>m/z</i>	500 – 6000	ACTH (1-17)	2093,0862
Relativní energie laseru	30 %	ACTH (18-39)	2465,1983
Suprese iontů matrice pod 450 Da	zapnuta	Somatostatin 28	3147,4710

Tab. 7 Parametry MALDI-TOF hmotnostního spektrometru ultrafleXtreme pro peptidové mapování. ACTH – adrenokortikotropní hormon.

		Kalibrační standardy	[M+H] ⁺
Iontový zdroj 1	25 kV	Bradykinin (1-7)	757,3992
Iontový zdroj 2	22,25 kV	Angiotensin II	1046,5418
Čočka	7,75 kV	Angiotensin I	1296,6848
Reflektor	25,95 kV	Substance P	1347,7354
Reflektor 2	13,20 kV	Bombesin	1619,8223
Pulzní iontová extrakce	100 ns	Renin	1758,9326
Napětí na detektoru	2406 V	ACTH (1-17)	2093,0862
Rozsah <i>m/z</i>	500 – 3500	ACTH (18-39)	2465,1983
Relativní energie laseru	37 %	Somatostatin	3147,4710
Suprese iontů matrice pod 500 Da	zapnuta		

3.2.3 Syntéza nových substrátů aldehyddehydrogenas

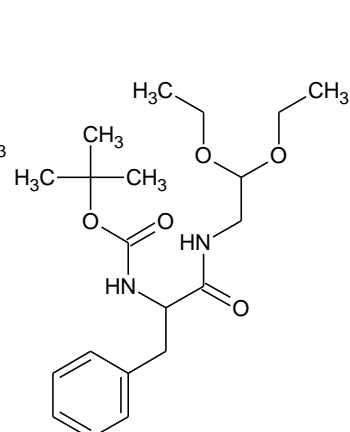
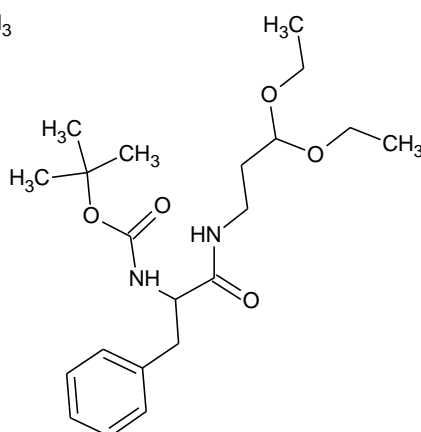
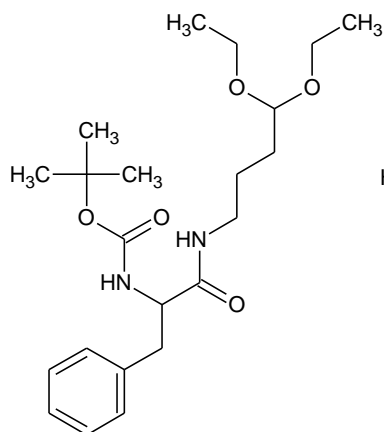
V této práci byly testovány syntetizované acetyly s chránicími skupinami. Jejich hydrolyzou se získají volné aminoacylované aminoaldehydové sloučeniny odvozené od Phe či Tyr, které byly testovány jako substráty nativní *Ps*AMADH a rekombinantních enzymů *Ps*ALDH7 a *Zm*ALDH7. Konkrétně se jednalo o 4-[*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*L*-fenylalanyl]aminobutanal diethylacetal (Boc-Phe-ABAL diethylacetal), 3-[*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*L*-fenylalanyl]aminopropanal diethylacetal (Boc-Phe-APAL diethylacetal), 2-[*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*L*-fenylalanyl]aminoethanal diethylacetal (Boc-Phe-AEAL diethylacetal), 4-[*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-*L*-tyrosyl]aminobutanal diethylacetal (Boc-Tyr(*t*Bu)-ABAL diethylacetal) a 3-[*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-*L*-tyrosyl]aminopropanal diethylacetal (Boc-Tyr(*t*Bu)-APAL diethylacetal) (Obr. 8). Jako příklad je níže uveden postup syntézy Boc-Phe-APAL diethylacetalu. Všechny syntetické látky byly připraveny školitelem ve spolupráci s doc. RNDr. Miroslavem Souralem, Ph.D., a to z důvodu pandemických opatření.

Boc-Phe-OH (1,592 g; 6 mmol) a 1,3-dicyklohexylkarbodiimid (0,619 g; 3 mmol), byly rozpuštěny v 50 ml dichlormethanu. Připravený roztok byl míchán po dobu 30 min na elektromagnetické míchačce. Vytvořený bílý precipitát byl odstraněn filtrací s využitím papírového filtru a do roztoku bylo za stálého míchání po kapkách přidáváno 970 μ l 6 mmol APAL diethylacetalu po dobu 30 min. Takto získaný roztok byl míchán dalších 30 min. Reakční směs byla přečištěna třepáním v dělicí nálevce s 50 ml 10% kyseliny octové, 50 ml vody, 50 ml 5% NaHCO₃ a nakonec opět 50 ml vody. Dichlormethanová fáze byla přes noc vysušena díky přidavku bezvodého Na₂SO₄. Další den byl bezvodý Na₂SO₄ odfiltrován na Büchnerově nálevce s papírovým filtrem a poté byl navíc promyt dichlormethanem. Ten byl z filtrátu následně odstraněn s využitím rotační vakuové odparky, čímž došlo k získání medovité tekutiny s precipitátem, která byla ponechána v digestoři pro úplné vysušení. Výsledný Boc-Phe-APAL diethylacetal je bílá až slabě nažloutlá pevná látka. Výtěžek byl 50%. Analogickým postupem byly připraveny všechny syntetické aminoaldehydy.

Molekulová hmotnost: 394,505
Sumární vzorec: C₂₁H₃₄N₂O₅

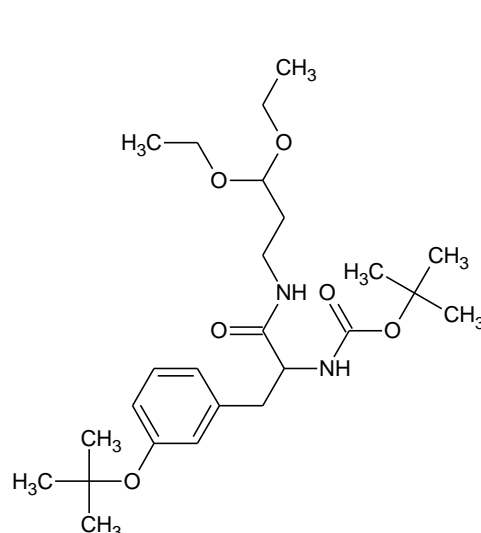
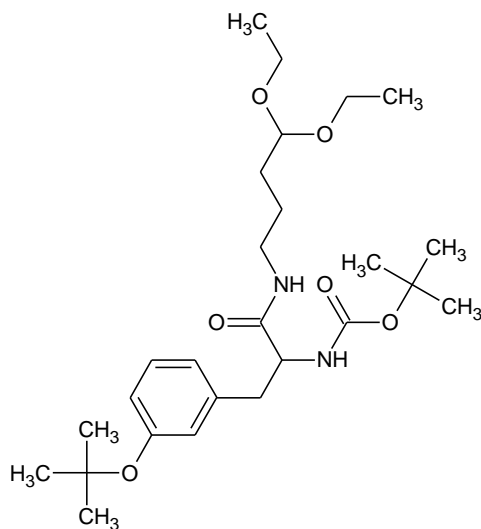
Molekulová hmotnost: 408,531
Sumární vzorec: C₂₂H₃₆N₂O₅

Molekulová hmotnost: 380,478
Sumární vzorec: C₂₀H₃₂N₂O₅



Molekulová hmotnost: 480,64(2)
Sumární vzorec: C₂₆H₄₄N₂O₆

Molekulová hmotnost: 466,61(2)
Sumární vzorec: C₂₅H₄₂N₂O₆



Obr. 8 Strukturální vzorce syntetizovaných látek. Nahoře zleva Boc-Phe-ABAL diethylacetal, Boc-Phe-APAL diethylacetal, Boc-Phe-AEAL diethylacetal. Dole zleva Boc-Tyr(tBu)-ABAL diethylacetal, Boc-Tyr(tBu)-APAL diethylacetal. Vytvořeno v programu ChemSketch.

3.2.4 Příprava volných aminoacylovaných aminoaldehydů

Přirozené substráty *Ps*AMADH, APAL a ABAL, a nejlepší substrát *Ps*ALDH7 a *Zm*ALDH7, AASAL, jsou dostupné komerčně ve formě diethylacetalů. Syntetizované aminoaldehydy byly získány také ve formě diethylacetalů s přítomnou Boc chránicí skupinou pro ochranu NH₂ skupiny během syntézy peptidové vazby mezi karboxylovou skupinou dané aminokyseliny a NH₂ skupinou daného aminoaldehydu. Deriváty Tyr navíc obsahují ještě *tert*-butylovou skupinu chránící OH skupinu této aminokyseliny

během reakce. Bylo proto třeba podrobit tyto látky konverzi na volné aldehydy, aby mohly vystupovat jako substráty použitých enzymů.

Příprava 60 mmol·l⁻¹ APAL byla následující. Diethylacetal 1-amino-3,3-diethoxypropanu (10 μl) byl smíchán s 0,5 ml 0,5 mol·l⁻¹ HCl a reakční směs byla zahřívána po dobu 10 min při 100 °C. Následně byl pro neutralizaci vodného roztoku přidán 25% NH₄OH (15 μl), vše bylo doplněno na celkový objem 1 ml deionizovanou vodou. Obdobný postup byl použit při přípravě 50 mmol·l⁻¹ ABAL a 30 mmol·l⁻¹ roztoků derivátů odvozených od Phe, kde byla ale doba zahřívání zvýšena na 15 min. Při přípravě 30 mmol·l⁻¹ roztoků derivátů odvozených od Tyr bylo nutno ještě v prvním kroku přidat 50 μl absolutního methanolu z důvodu jejich špatné rozpustnosti v 0,5 mol·l⁻¹ HCl. Příprava 100 mmol·l⁻¹ AASAL byla následující: ethylenacetal δ-aminoadipátsemialdehydu (19 mg) byl smíchán s 0,6 ml 0,5 mol·l⁻¹ HCl. Roztok byl zahříván po dobu 15 min při 100 °C a následně byl přidán 25% NH₄OH (15 μl) a vše bylo doplněno na 1 ml deionizovanou vodou. Volné aminoacylované aminoaldehydy připravené hydrolyzou acetalových a chránících skupin byly dále využity pro kinetická měření.

3.2.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF v pozitivním módu byla provedena pro ověření konverze diethylacetalů syntetizovaných aminoaldehydů s chránícími skupinami na volné aminoacylované aminoaldehydy v kyselém prostředí. Dále posloužila pro ověření enzymové oxidace volných aminoaldehydů na odpovídající aminokyseliny. Jako matrice byla použita 0,1 mol·l⁻¹ CHCA ve směsi s CTAB v molárním poměru 1000:1 (Guo *et al.*, 2002). Připravené roztoky volných aminoacylovaných aminoaldehydů v koncentraci 30 mmol·l⁻¹ byly 10x naředěny. Na destičku MSP BigAnchor 96 byl nanesen 1 μl matrice. Po zaschnutí byly krystalky převrstveny 1 μl ředěného roztoku aminoaldehydu a ponechány vysušit. Parametry měření jsou uvedeny v tabulce (Tab. 8). Změřená hmotnostní spektra byla vyhodnocena pomocí programu flexAnalysis 3.4 a zpracována v programu Origin 2017. Pro ověření enzymové oxidace volných aminoacylovaných aminoaldehydů byla připravena reakční směs, která obsahovala 1 ml 50 mmol·l⁻¹ NH₄HCO₃, 30 μl 30 mmol·l⁻¹ roztoku volného aminoaldehydu a 25 μl 40 mmol·l⁻¹ NAD⁺. Nakonec bylo přidáno 10 μl enzymu (*Ps*AMADH, *Ps*ALDH7, nebo *Zm*ALDH7). Tato směs byla inkubována 1 h při 37 °C

a 400 rpm v inkubátoru Thermomixer. Následovalo nanesení na destičku, nejdříve 1 μ l matrice a po zaschnutí 1 μ l reakční směsi. Měření a analýza dat byly provedeny, jak je specifikováno výše.

3.2.6 Nativní elektroforéza

Elektroforéza v diskontinuálním uspořádání v nativních podmínkách byla využita k ověření enzymové aktivity nativní *PsAMADH* a rekombinantní *ZmALDH7* se studovanými substráty. Dělicí gel (12%) a zaostřovací gel (4%) byly připraveny dle tabulky (Tab. 9) a jejich tloušťka byla 1 mm. Rozměr separačního gelu byl shodný jako v případě SDS-PAGE. Po smíchání AA/BIS, pufru a destilované vody byl roztok 5 min odvzdušňován pomocí membránové vývěvy. Až poté byl přidán TEMED a 10% roztok APS, kterým byla zahájena polymerace gelů.

Tab. 8 Parametry MALDI-TOF hmotnostního spektrometru Microflex LRF20. Týká se měření v pozitivním módu pro ověření konverze diethylacetalů syntetizovaných aminoaldehydů s chránicími skupinami na volné aminoacylované aminoaldehydy v kyselém prostředí a pro ověření enzymové oxidace volných aminoacylovaných aminoaldehydů.

Iontový zdroj 1	19 kV
Iontový zdroj 2	16,2 kV
Čočka	8,9 kV
Reflektor	20 kV
Pulzní iontová extrakce	100 ns
Napětí na detektoru	1672 V
Rozsah m/z	0 – 2100
Relativní energie laseru	14 %
Suprese iontů matrice pod 500 Da	vypnuta
Kalibrace $[M+H]^+$	190,04987
Kalibrace $[2M+H]^+$	379,09246

Tab. 9 Pipetované objemy (ml) jednotlivých složek roztoků pro přípravu 12% dělicího a 4% zaostřovacího gelu pro provedení nativní elektroforézy v diskontinuálním uspořádání.

Složka (ml)	AA/BIS (30% T/ 3,3% C)	Tris-HCl (1,5 mol·l ⁻¹ , pH 8,8)	Tris-HCl (0,5 mol·l ⁻¹ , pH 6,8)	Deionizovaná voda	TEMED	APS (10%)
Dělicí gel	4	2,5	-	3,3	0,01	0,05
Zaostřovací gel	0,65	-	1,25	3,05	0,01	0,06

Enzymový roztok byl smíchán v objemovém poměru 1:1 s 50% glycerolem, který byl připraven smísením 1 ml 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 6,8), 2 ml glycerolu, 1 ml deionizované vody a bromfenolové modři v množství na špičku špachtle. Připravená směs byla pipetována do jamek koncentračního gelu v objemu maximálně 30 µl. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V za neustálého chlazení (nádobka umístěna do vody s ledem) s použitím Tris-glycinového elektrodového pufru (pH 8,3) o složení 0,025 mol·l⁻¹ Tris, 0,192 mol·l⁻¹ glycin, 0,1% SDS. Separace proteinů byla ukončena ve chvíli, kdy bromfenolová modř doputovala na spodní okraj gelu. Barvení gelu bylo provedeno barvicím roztokem, který obsahoval 0,15 mol·l⁻¹ Tris-HCl pufr (pH 9,0) vyhřátý na 37 °C, 1 mmol·l⁻¹ NAD⁺, 1 mmol·l⁻¹ MTT, PMS na špičku špachtle a 1 mmol·l⁻¹ APAL, AASAL, či syntetizovaný aminoaldehyd. Celkový objem barvicího roztoku byl 40 ml. Gely byly inkubovány bez přístupu světla na třepačce. Barvení v přítomnosti APAL a AASAL trvalo 2 h, ostatní gely byly barveny přes noc. Po obarvení byly gely na 10 min vloženy do 7% roztoku kyseliny octové pro zastavení reakce (Šebela *et al.*, 2001). Gely byly naskenovány na kalibrovatelném skeneru s využitím programu LabScan a úprava obrázků (jas, kontrast, oříznutí) proběhla s pomocí programu PaintShop Pro 8.0. Gely byly dále barveny na proteiny pomocí QC koloidního Coomassie barviva.

3.2.7 Měření enzymové aktivity

Měření bylo prováděno v křemenné kyvetě při 340 nm po dobu 3 min (interval po 30 s a se zpožděním 5 s). Při měření s *PsAMADH* bylo vždy pipetováno 1790 µl 0,168 mol·l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 9,0) vytemperovaného na 37 °C a 50 µl 40 mmol·l⁻¹ NAD⁺. K tomuto roztoku byl přidán enzym a deionizovaná voda. Takto připravená reakční směs byla použita jako blank. Reakce byla zahájena přidáním substrátu, APAL, ABAL či syntetizovaného aminoaldehydu o výsledné koncentraci 1 mmol·l⁻¹. Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 2 ml. Enzymová aktivita byla analogicky měřena také

s rekombinantními enzymy *PsALDH7* a *ZmALDH7*, rozdílem bylo použití Na-pyrofosfátového pufru (pH 8,1) o výsledné koncentraci 0,1 mol·l⁻¹. Jako referenční substrát byl použit 1 mmol·l⁻¹ AASAL. Všechna měření byla prováděna vždy ve třech opakováních. Enzymová aktivita byla vyjádřena s využitím Lambert-Beerova zákona, kde a je enzymová aktivita (kat), ΔA je změna absorbance, V je objem reakční směsi (l), t je doba reakce (s), ε je molární absorpční koeficient (l·mol⁻¹·cm⁻¹), l je délka kyvety (cm). Absorpční koeficient koenzymu NAD⁺ je 6220 l·mol⁻¹·cm⁻¹.

$$a[\text{kat}] = \Delta A \cdot \frac{V}{t \cdot \varepsilon \cdot l}$$

3.2.8 Určení kinetických parametrů

Hodnoty kinetických parametrů byly určeny spektrofotometricky s využitím sady různých koncentrací substrátů v rozmezí 0,005 – 2 mmol·l⁻¹. Pro porovnání stanovených kinetických parametrů syntetizovaných substrátů Phe-ABAL, Phe-APAL, Phe-AEAL, Tyr-ABAL, Tyr-APAL byl použit nejlepší přirozený substrát *PsAMADH* APAL (Tylichová *et al.*, 2010). Kinetické parametry byly měřeny také s rekombinantními enzymy *PsALDH7* a *ZmALDH7*, jejichž nejlepším přirozeným substrátem je AASAL (Končítíková *et al.*, 2015). Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.2.9 Bradfordova metoda

Bradfordova metoda je založena na tvorbě adsorpční vazby barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 s molekulou proteinu za vzniku modrého zbarvení roztoku, jehož absorpční maximum je při 595 nm (Bradford, 1976). 2 ml Bradfordova činidla, které obsahovalo H₃PO₄, ethanol a barvivo, bylo vždy smíšeno se vzorkem enzymu o maximálním objemu 10 µl. Následovala inkubace po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Jako blank byla použita deionizovaná voda. Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí přídatku standardu v rozmezí 5 – 50 µg (roztok BSA, 1 mg·ml⁻¹).

3.2.10 BCA metoda

Metoda pro stanovení proteinů v roztoku s využitím BCA funguje na principu tvorby barevného komplexu s absorpčním maximem při 562 nm, který vzniká reakcí kyseliny s Cu⁺ ionty. Ty se tvoří redukcí Cu²⁺ iontů vlivem interakce s peptidovou vazbou proteinů. Reagent A (1% disodná sůl BCA, 2% Na₂CO₃ · H₂O, 0,16% vinan disodný, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO₃) a Reagent B (4% CuSO₄ · 5H₂O v deionizované vodě)

byly smíchány v poměru 100:2. Vzniklo tak S-WR („Standard Working Reagent“) činidlo (Smith *et al.*, 1985). Reakční směs byla připravena smícháním 2 ml S-WR činidla s 5 nebo 10 μl vzorku daného enzymu. Reakční směs byla inkubována 30 min při laboratorní teplotě a následně byla měřena absorbance při 562 nm proti blanku (S-WR činidlo). Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí přidavku standardu v rozmezí 5 – 30 μg (roztok BSA, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

3.2.11 Měření koncentrace proteinů s využitím nanodropu

Přístroj nanodrop nanoready Touch Micro UV-VIS byl použit k odhadu koncentrace proteinů ve vzorku *PsAMADH* po 2. fázi purifikace (kroky na střednětlakém chromatografu) a po afinitní chromatografii. Jako blank byl použit pufr B (složení viz. kapitola 3.2.1). Byl pipetován 1 μl enzymového roztoku. Měření bylo provedeno ve dvou opakováních při vlnové délce 280 nm, použitý extinkční koeficient ve shodě se sekvencemi isoenzymů *PsAMADH1* a 2 byl 90,000 $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.2.12 Studium pH optima

pH optima pro *PsAMADH* reakci se syntetizovanými substráty byla stanovena spektrofotometricky pomocí sady pufrů v rozsahu pH 4,5 – 10,0. Reakční směs obsahovala 1790 μl 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pufru (Tab. 10) vytemperovaného na 37 °C a 50 μl 40 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ . K tomuto roztoku byl přidán enzym a deionizovaná voda. Takto připravená reakční směs byla použita jako blank. Reakce byla zahájena přidáním 33,3 μl 60 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ APAL či 66,7 μl 60 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ syntetizovaného aminoaldehydu. Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 2 ml.

Kromě spektrofotometrického měření bylo pH optimum studováno také pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF v pozitivním módu s využitím těkavých pufrů (Tab. 11) v rozmezí hodnot pH 3 – 10. Reakční směs obsahovala 1 ml 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pufru, 30 μl 30 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ syntetizovaného aminoaldehydu, 25 μl 40 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ . Reakce byla zahájena přidáním 10 μl *PsAMADH*. Následovala inkubace reakční směsi v inkubátoru Thermomixer po dobu 1 h při 37 °C a 400 rpm. Jako matrice byla použita 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CHCA s přidavkem CTAB v molárním poměru 1000:1, obsahující 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ tryptamin. Na destičku byl nanesen 1 μl matrice a po zaschnutí byl nanesen 1 μl reakční směsi a ponechán odpařit. Obdobně se postupovalo i s rekombinantními enzymy *PsALDH7* a *ZmALDH7*.

Tab. 10: Pufry použité pro spektrofotometrické stanovení pH optima testovaných látek.

Pufr	pH	Koncentrace (mol·l ⁻¹)
Acetát sodný	4,5	0,05
Citrátový pufr	4,5	0,05
Acetát sodný	5,5	0,05
Citrátový pufr	5,5	0,05
KPB	6,5	0,05
Bis-Tris	6,5	0,05
KPB	7,5	0,05
Bis-Tris	7,5	0,05
Bicinový pufr	8,3	0,05
Tris-HCl	9,0	0,168
Glycinový pufr	10,0	0,05

Tab. 11 Pufry použité pro stanovení pH optima testovaných látek s využitím MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie v pozitivním módu.

Pufr	pH	Koncentrace (mol·l ⁻¹)
Mravenčan amonný	3,0	0,05
	4,0	0,05
Octan amonný	4,0	0,05
	5,0	0,05
	6,25	0,05
Triethylamin acetát	6,0	0,05
	7,0	0,05
Hydrogenuhlíčan amonný	8,0	0,05
	9,0	0,05
Uhlíčan amonný	9,0	0,05
	10,0	0,05

3.2.13 Molekulové modelování substrátů v aktivním místě enzymů

Souřadnice proteinových struktur byly získány z databáze PDB, <https://www.rcsb.org/pdb> (přístupová čísla: 1IWJ, 1IWK). Před modelováním byly soubory upraveny na monomerní struktury a byly odstraněny ligandy s pomocí PDB programu PyMOL Viewer. 3-D struktury zkoumaných aldehydových ligandů byly získány jako soubory ve formátu .pdb prostřednictvím serveru PRODRG provozovaného na univerzitě v Dundee, Skotsko, <https://www.sites.google.com/site/vanaaltenlab/prodrgr> (Schüttelkopf a van Aalten, 2004). Vlastní modelování ligandů do krystalových struktur ALDH pak bylo automatické s využitím Achilles Blind Docking serveru, Katolická univerzita v Murcii, Španělsko, <http://bio-hpc.eu/software/blind-docking-server/> (Sánchez-Linares *et al.*, 2012).

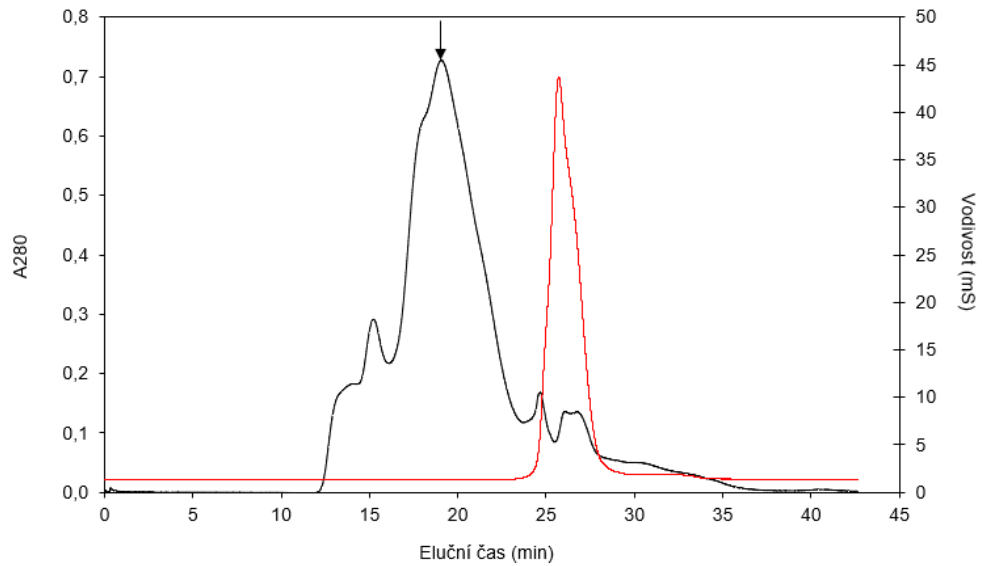
4 VÝSLEDKY

4.1 Extrakce proteinů a purifikace aminoaldehyddehydrogenasy

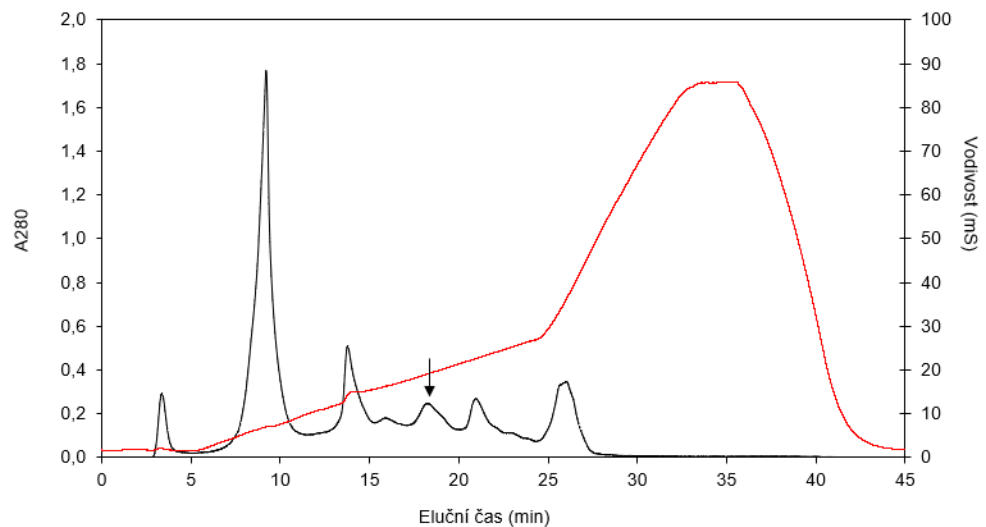
Purifikace *Ps*AMADH z extraktu semenáčků hrachu setého (*P. sativum*) probíhala podle dříve publikovaného postupu, avšak se změnami, kdy byly zařazeny alternativní chromatografické kroky na modernějších stacionárních fázích. Průběh purifikace je shrnut v purifikačním schématu (Tab. 12), enzym byl připravován celkem třikrát. Separace na kolonách ENrich SEC 650 a Mono Q HR 5/5 probíhala na střednětlakém chromatografu BioLogic Duo Flow a bylo tak možné exportovat chromatogramy (Obr. 9 a 10). Cestou GPC se zároveň docílilo odsolení. Byla pak snaha dočistit enzym s použitím AC na koloně 5'-AMP Sepharose 4B. Tímto způsobem však bylo získáno pouze malého množství čistého enzymu (směs isoenzymů *Ps*AMADH1 a *Ps*AMADH2, viz dále), kvůli nízkému výtěžku však nebyl tento krok dále využíván.

Tab. 12 Purifikační schéma přípravy *Ps*AMADH. Vycházelo se z 600 g rostlinného materiálu.

Pořadí	Purifikační krok	Objem (ml)	Aktivita (nkat)	Proteiny (mg)	Specifická aktivita (nkat·mg ⁻¹)	Stupeň přečištění	Výtěžek (%)
1.	Hrubý extrakt	1280	3500	4150	0,84	1,0	100
2. + 3.	Precipitace protaminsulfátem a MnCl ₂	1290	3320	2720	1,22	1,5	95
4.	Precipitace (NH ₄) ₂ SO ₄ (65% saturace), odsolení na Sephadexu G-25	110	1645	1104	1,49	1,8	47
5.	IEC, DEAE-Sepharose	63	1130	670	1,68	2,0	33
6.	GPC, ENrich SEC 650	5,5	593	65	9,12	10,9	17
7.	IEC, Mono Q HR	2	137	9,8	14	16,7	4

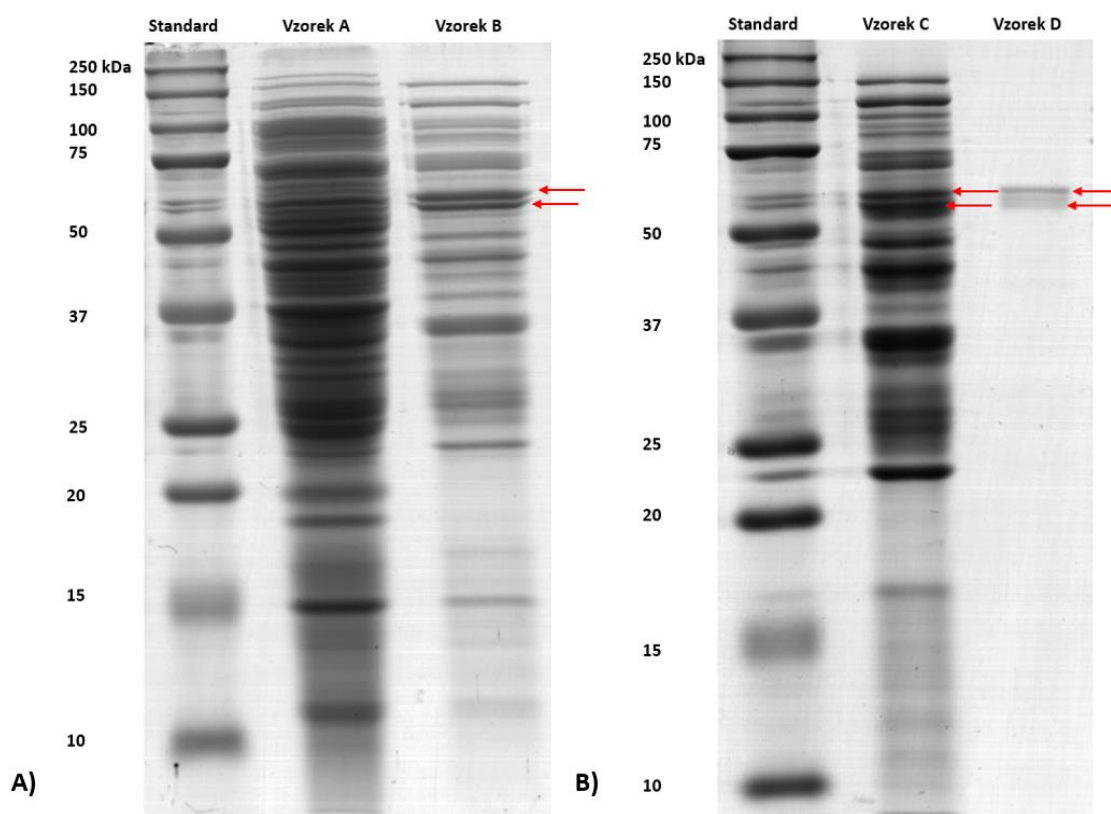


Obr. 9 Chromatogram eluce proteinů během GPC na koloně ENrich SEC 650. Naneseno bylo 5,3 mg proteinu. Černá křivka ukazuje závislost absorbance při 280 nm na elučním čase (min). Červená křivka ukazuje změnu vodivosti (mS) v závislosti na elučním čase (min). Šipka ukazuje frakci s *Ps*AMADH aktivitou, sbírána byla v časovém rozmezí 18-20 min.



Obr. 10 Chromatogram eluce proteinů během IEC na koloně Mono Q HR 5/5. Naneseno bylo 6 mg proteinu. Černá křivka ukazuje závislost absorbance při 280 nm na elučním čase (min). Červená křivka ukazuje změnu vodivosti (mS) v závislosti na elučním čase (min). Šipka ukazuje frakci s *Ps*AMADH aktivitou, sbírána byla v časovém rozmezí 18-20 min.

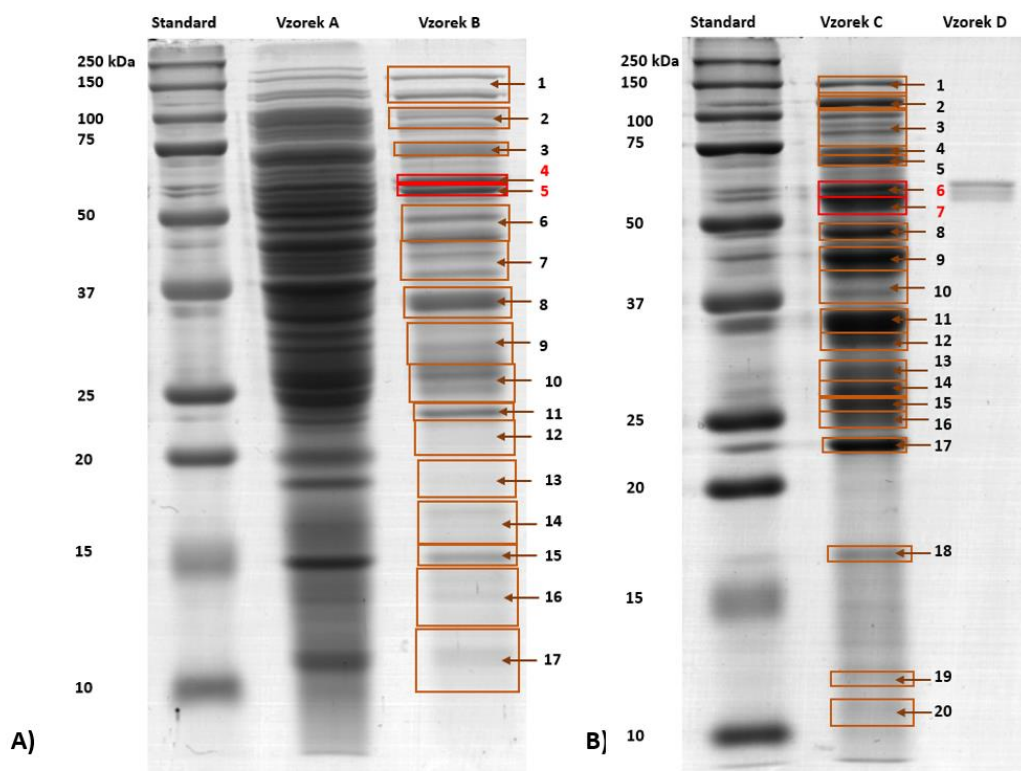
Pro potvrzení čistoty *PsAMADH* ve finálních krocích purifikace byla provedena SDS-PAGE v diskontinuálním uspořádání s následným barvením gelu pomocí QC koloidního Coomassie barviva na přítomnost proteinů (Obr. 11). Aplikovány byly zahuštěné vzorky získané elucí z kolon ENrich SEC 650 (vzorek A), Mono Q HR 5/5 (vzorek B, C) a 5'-AMP Sepharose 4B (vzorek D). Jak je vyznačeno šipkami, a bylo následně prokázáno MALDI-TOF peptidovým mapováním, vzorky obsahují oba hrachové isoenzymy *PsAMADH1* a *PsAMADH2*. Sekvencím nativních isoenzymů (UniProt přístupová čísla Q8VWZ1 a Q93YB2) odpovídají molekulové hmotnosti 54,8 respektive 54,5 kDa. Díky vyšší molekulové hmotnosti je tedy isoenzym *PsAMADH1* vizualizován na gelu výše.



Obr. 11 SDS-PAGE gely vzorků *PsAMADH* po chromatografické separaci. Barveno bylo na přítomnost proteinů pomocí QC koloidního Coomassie barviva. Na první gel (panel A) byly aplikovány vzorky získané elucí z kolon ENrich SEC 650 (vzorek A; 59 μ g) a Mono Q HR 5/5 (vzorek B; 25 μ g). Na druhý gel (panel B) byly aplikovány vzorky získané elucí z kolony Mono Q HR 5/5 (vzorek C; 56 μ g) a kolony 5'-AMP Sepharose 4B (vzorek D; 1,4 μ g). Šipky označují přítomnost *PsAMADH1* (nahore) a *PsAMADH2* (dole) prokázanou MALDI-TOF peptidovým mapováním.

4.2 Identifikace aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu

Enzymové roztoky získané elucí z kolony Mono Q HR 5/5 byly pro kontrolu separovány SDS-PAGE. Z prvního gelu bylo vyřezáno 17 pásů (Obr. 12A) a přítomné proteiny byly štěpeny na peptidy a identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie s využitím proteinových sekvencí z hrachu (*P. sativum*) získaných z volně přístupné databáze NCBI. Pomocí programu Mascot 2.4 pro databázové vyhledávání bylo potvrzeno, že v pásu 4 je přítomna *PsAMADH1* a v pásu 5 *PsAMADH2*. Na základě intenzity barvení s využitím softwaru GelAnalyzer bylo zjištěno, že obsah *PsAMADH* po přečištění IEC kolonou Mono Q HR 5/5 je asi 15 – 20 %. Z jiného gelu bylo vyřezáno 20 pásů (Obr. 12B) a analýza proběhla stejným způsobem. Následující tabulka (Tab. 13) popisuje výsledky identifikace proteinů ve vyříznutých pásech (označeny 1 – 20). V pásech 6 a 7 byla potvrzena přítomnost *PsAMADH1* a 2. Nebyla detegována ALDH7, nebo jiné enzymy, které by významně rušily kinetická měření se studovanými substráty.



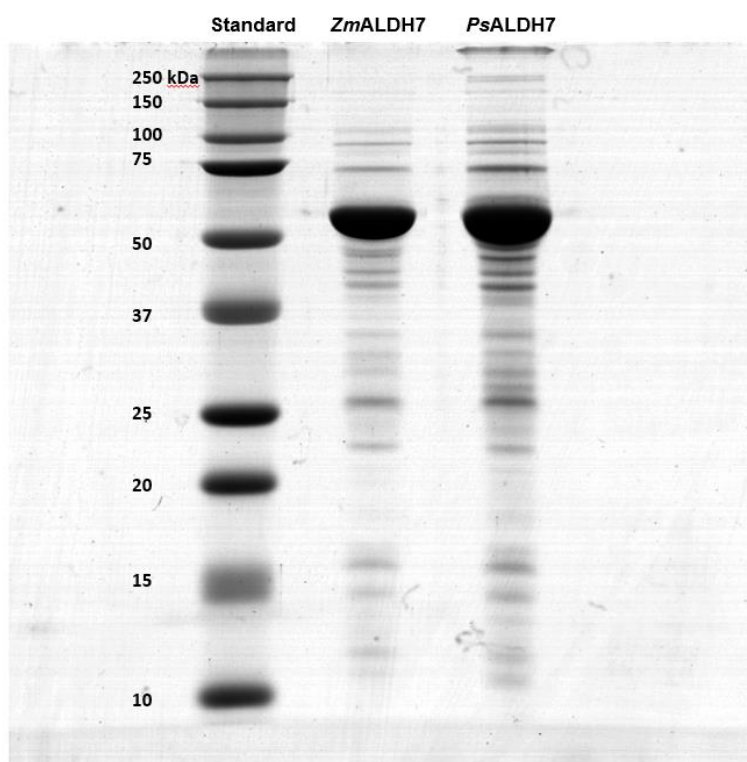
Obr. 12 SDS-PAGE gely vzorků *PsAMADH* po chromatografické separaci barvené pomocí QC koloidního Coomassie barviva. Gely jsou totožné s těmi na obrázku 11, zde jsou však vyznačeny pásy, jež byly vyřezány pro štěpení proteinů v gelu trypsinem, přečištění peptidů a následnou analýzu MALDI-TOF peptidovým mapováním.

Tab. 13 Hlavní proteiny přítomné v pásech 1 – 20 v SDS-PAGE gelu vzorku *PsAMADH* po přečištění IEC na koloně Mono Q HR 5/5 (viz Obr. 12B). Identifikace proběhla peptidovým mapováním pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a proteinových sekvencí z hrachu (*Pisum sativum*) získaných z volně přístupné databáze NCBI s využitím programu Mascot 2.4 pro databázové vyhledávání. Vysvětlivky: A – pořadí na gelu; B – přístupové číslo; C – název proteinu; D – skóre; E – molekulová hmotnost (kDa); F – pokrytí sekvence (%); G – počet identifikovaných peptidů.

A	B	C	D	E	F	G
1	gi 2274005396	fosforibosylformylglycinamidinsynthasa, chloroplastová/mitochondriální (<i>Pisum</i>)	102	156	15,8	20
2	gi 2314236931	presekvence proteasa 1, podobná chloroplastové/mitochondriální isoformě X2 (<i>Pisum</i>)	200	119	30,4	28
3	gi 2314236931	presekvence proteasa 1, podobná chloroplastové/mitochondriální isoformě X2 (<i>Pisum</i>)	75	119	19	20
4	gi 2274039047	Nudix hydrolasa 3 (<i>Pisum sativum</i>)	101	89,6	21,3	15
5	gi 2274054951	domnělý mediátor transkripční podjednotky 37c RNA polymerasy II (<i>Pisum sativum</i>)	107	71,2	39,9	29
6	gi 284055632	Řetězec A, Aminoaldehyddehydrogenasa 1 (<i>Pisum sativum</i>)	158	55,4	61,8	26
7	gi 284055630	Řetězec A, Aminoaldehyddehydrogenasa 2 (<i>Pisum sativum</i>)	133	55,1	57,3	20
8	gi 2274006766	Rab GDP disociační inhibitor alfa (<i>Pisum sativum</i>)	85	50	38,3	15
9	gi 2274063190	enzym podobný acetylornithindeacetylase (<i>Pisum sativum</i>)	71	48,4	47,9	15
10	gi 2274010943	UDP-D-apiosa/UDP-D-xylosa synthasa 2 (<i>Pisum sativum</i>)	86	44,1	52,8	19
11	gi 169037	aldolasa, neúplná (<i>Pisum sativum</i>)	116	38,7	50,6	16
12	gi 169037	aldolasa, neúplná (<i>Pisum sativum</i>)	124	38,7	49,2	16
13	gi 2274010451	fruktosa-bisfosfát aldolasa 1, chloroplastová (<i>Pisum sativum</i>)	69	43,4	34,9	12
14	gi 2314246458	necharakterizovaný protein LOC127081901 (<i>Pisum sativum</i>)	52	31,7	27	11
15	gi 2314207019	necharakterizovaný protein LOC127131081 (<i>Pisum sativum</i>)	53	52,5	44,2	17
16	gi 2274060979	enzym podobný glutathion-S-transferase U17 (<i>Pisum sativum</i>)	50	25,5	38,4	9
17	gi 2314243010	superoxiddismutasa [Mn], mitochondriální (<i>Pisum sativum</i>)	95	26,5	65,8	14
18	gi 2274051937	domnělá 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarátaldolasa 2 (<i>Pisum sativum</i>)	111	18	70,5	11
19	gi 2274040619	RNA-vázající protein cp31b (<i>Pisum sativum</i>)	67	32,8	37,3	9
20	gi 2274066945	protein podobný MAIN-LIKE 1 (<i>Pisum sativum</i>)	60	22,3	20,6	6

4.3 SDS elektroforéza pro kontrolu čistoty rekombinantních enzymů

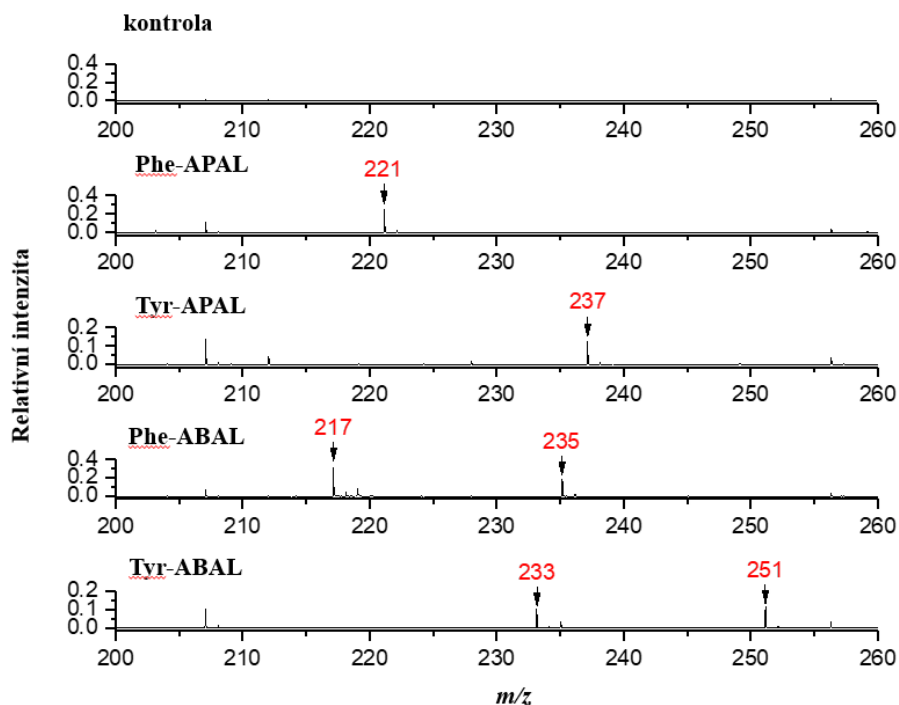
Byla provedena SDS-PAGE v diskontinuálním uspořádání. Barvení na proteiny ukázalo přítomnost silných pásů (Obr. 13) v oblastech odpovídajícím molekulovým hmotnostem monomerů obou enzymů po porovnání s použitým standardem. Pro *PsALDH7* i *ZmALDH7* je teoretická molekulová hmotnost podjednotky 54 – 57 kDa (počítáno ze sekvencí UniProt P25795, respektive C0PHD8). Pomocí MALDI-TOF peptidového mapování byla prokázána *ZmALDH7* (gi:770386322, skóre 113, pokrytí sekvence 49 %, 21 identifikovaných peptidů) i *PsALDH7* (gi:118514, skóre 105, pokrytí sekvence 34 %, 10 identifikovaných peptidů). Rekombinantní enzymy mají s histidinovou kotvou v sekvenci molekulovou hmotnost podjednotky 56 kDa (Končítíková *et al.*, 2015). Specifická aktivita měřená s AASAL byla pro *PsALDH7* 7,5 nkat·mg⁻¹ a pro *ZmALDH7* 13,2 nkat·mg⁻¹.



Obr. 13 Gel barvený pomocí QC koloidního Coomassie barviva na přítomnost proteinů pro určení čistoty rekombinantních enzymů *PsALDH7* a *ZmALDH7* získaný s využitím SDS-PAGE v diskontinuálním uspořádání. Přítomné dominantní pásy odpovídají molekulovým hmotnostem monomerů. Množství proteinu aplikované do jamek bylo pro *ZmALDH7* 8,6 µg a pro *PsALDH7* 10,6 µg.

4.4 Příprava volných aminoacylovaných aminoaldehydů

Čistota syntetických aminoaldehydů odvozených acylací APAL a ABAL s Boc-Phe-OH a Boc-Tyr(tBu)-OH byla potvrzena na základě NMR analýzy provedené na katedře organické chemie PŘF UP doc. RNDr. Miroslavem Souralem, Ph.D. Pro ověření konverze syntetizovaných diethylacetalů aminoaldehydů na volné aminoaldehydy v kyselém prostředí byla použita hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF v pozitivním módu. Naměřené hodnoty m/z (Obr. 14) odpovídají pseudomolekulárním iontům $[M+H]^+$ jednotlivých substrátů a byly následující: $[Phe-APAL+H]^+$ 221; $[Tyr-APAL+H]^+$ 237; $[Phe-ABAL+H]^+$ 235 a pro cyklizovanou formu Phe-ABAL po ztrátě vody 217; $[Tyr-ABAL+H]^+$ 251 a pro cyklizovanou formu Tyr-ABAL po ztrátě vody 233. Tyto hodnoty odpovídají molekulovým hmotnostem jednotlivých látek zvýšeným o hmotnost protonu. Látky odvozené od ABAL existují v rovnováze se svou cyklickou formou, která vzniká samovolnou cyklizací po ztrátě molekuly vody, čímž se molekulová hmotnost snižuje o 18 jednotek. Strukturální vzorce volných aminoaldehydových substrátů s jejich molekulovými hmotnostmi jsou na obrázcích (Obr. 15 a 16).



Obr. 14 Hmotnostní spektra syntetických substrátů a kontroly pro ověření konverze syntetických diethylacetalů aminoaldehydů na volné aldehydy v kyselém prostředí získaná s využitím MALDI-TOF v pozitivním módu. Zjištěné hodnoty m/z odpovídají hodnotám $[M+H]^+$ použitých substrátů. Látky odvozené od ABAL existují také v cyklické formě, kdy dochází ke ztrátě molekuly vody a snížení hodnoty m/z o 18 jednotek.

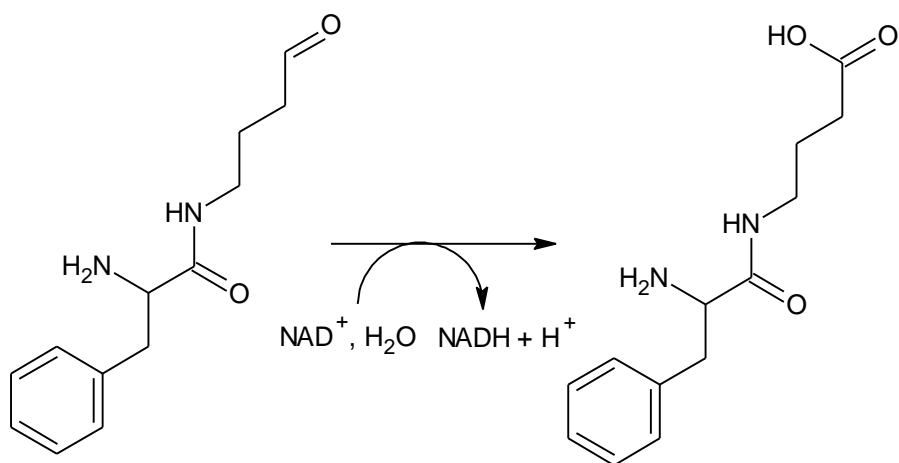
Phe-ABAL

Molekulová hmotnost: 234,29

Sumární vzorec: $C_{13}H_{18}N_2O_2$

Molekulová hmotnost: 250,29

Sumární vzorec Phe-APAL: $C_{13}H_{18}N_2O_3$



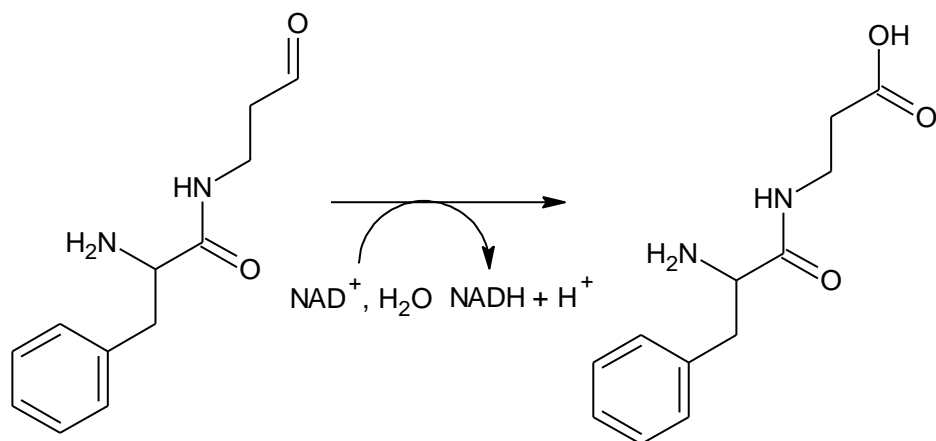
Phe-APAL

Molekulová hmotnost: 220,27

Sumární vzorec: $C_{12}H_{16}N_2O_2$

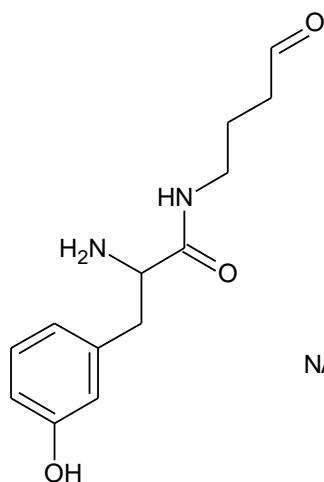
Molekulová hmotnost: 236,27

Sumární vzorec: $C_{12}H_{16}N_2O_3$

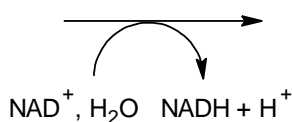
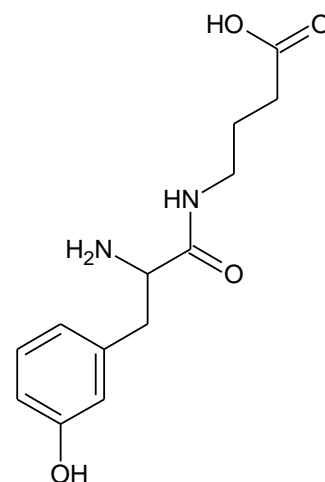


Obr. 15 Strukturní vzorce syntetizovaných aminoaldehydů Phe-ABAL a Phe-APAL a odpovídajících oxidačních produktů (aminokyselin) tvořených v přítomnosti koenzymu NAD^+ s odpovídajícími molekulovými hmotnostmi a jejich sumárními vzorci. Volné aminoacylované aminoaldehydy byly získány kyselou hydrolyzou acetalové a chránící skupiny pomocí zředěné HCl a teploty 100 °C. Kyselý roztok volného aldehydu byl neutralizován vodným roztokem amoniaku. Vytvořeno v programu ChemSketch.

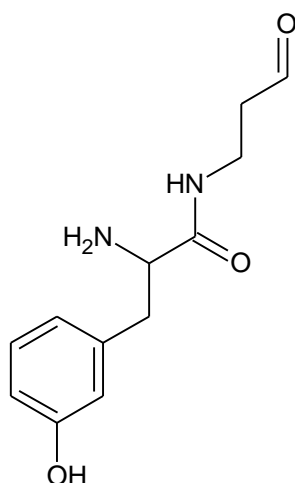
Tyr-ABAL
Molekulová hmotnost: 250,29
Sumární vzorec: C₁₃H₁₈N₂O₃



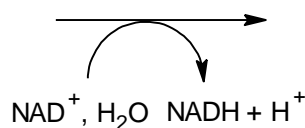
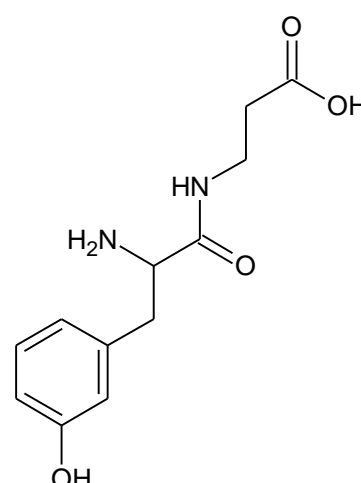
Molekulová hmotnost: 266,29
Sumární vzorec: C₁₃H₁₈N₂O₄



Tyr-APAL
Molekulová hmotnost: 236,27
Sumární vzorec: C₁₂H₁₆N₂O₃



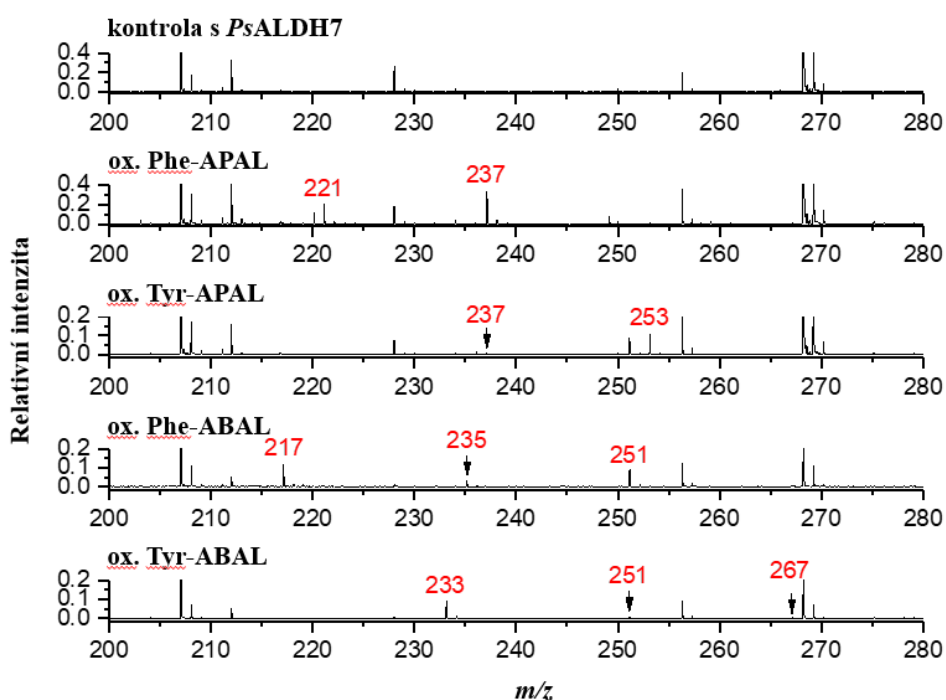
Molekulová hmotnost: 252,27
Sumární vzorec: C₁₂H₁₆N₂O₄



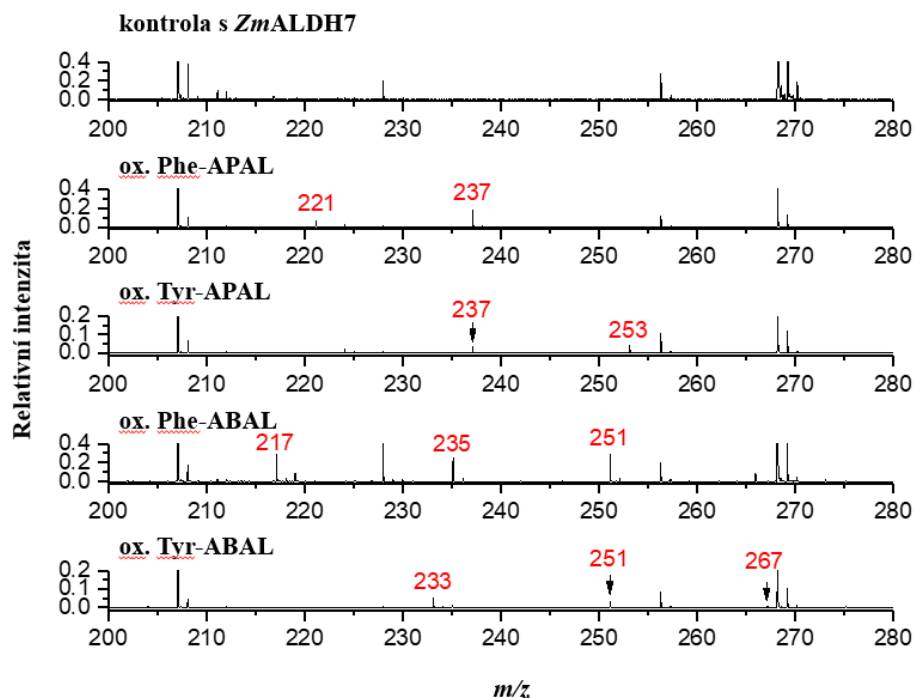
Obr. 16 Strukturální vzorce syntetizovaných aminoaldehydů Tyr-ABAL a Tyr-APAL a odpovídajících oxidačních produktů (aminokyselin) tvořených v přítomnosti koenzymu NAD⁺ s odpovídajícími molekulovými hmotnostmi a jejich sumárními vzorci. Volné aminoacylované aminoaldehydy byly získány kyselou hydrolyzou acetalové a chránící skupiny pomocí zředěné HCl a teploty 100 °C. Kyselý roztok volného aldehydu byl neutralizován vodným roztokem amoniaku. Vytvořeno v programu ChemSketch.

4.5 Ověření oxidace volných aminoaldehydů v přítomnosti enzymů

Pro ověření oxidace volných aminoaldehydů na jim odpovídající aminokyseliny v přítomnosti daného enzymu byla využita MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie v pozitivním módu. Uvedena jsou hmotnostní spektra získaná po inkubaci reakčních směsí jednotlivých aminoaldehydů s *Ps*ALDH7 (Obr. 17) a s *Zm*ALDH7 (Obr. 18). Hodnoty m/z byly pro oxidované aminoaldehydy vždy o 16 jednotek vyšší než pro nepřeměněné aldehydy z důvodu oxidace aldehydové skupiny na karboxylovou (Obr. 15 a 16).



Obr. 17 MALDI-TOF hmotnostní spektra reakčních směsí a kontroly (bez přítomnosti substrátu). Takto byla ověřena oxidace volných aminoaldehydů na jim odpovídající aminokyseliny po inkubaci v přítomnosti *Ps*ALDH7. Měřilo se v pozitivním módu. Zjištěné hodnoty m/z odpovídají hodnotám $[M+H]^+$ nepřeměněných aminoaldehydů a produktům oxidace. Látky odvozené od ABAL existují také v cyklické formě, kdy dochází ke ztrátě molekuly vody a snížení hodnoty m/z o 18 jednotek.

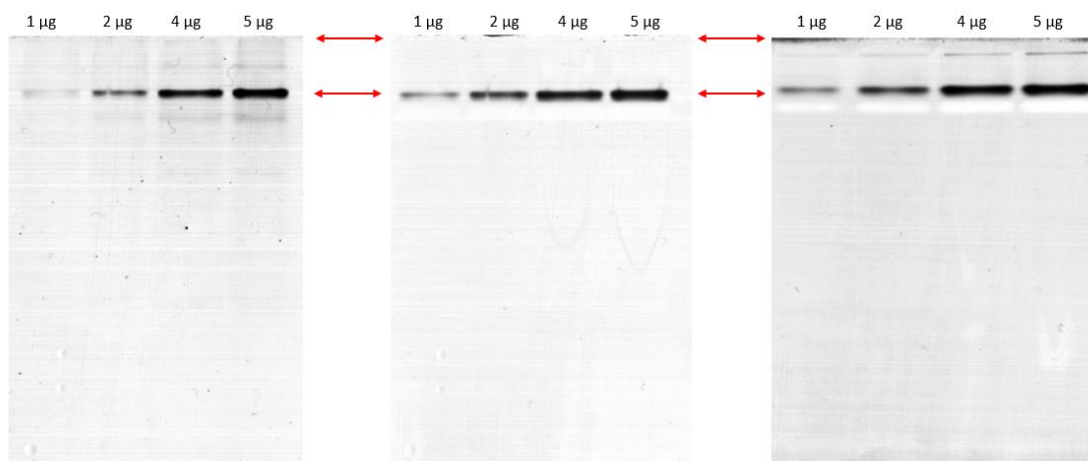


Obr. 18 MALDI-TOF hmotnostní spektra reakčních směsí a kontroly (bez přítomnosti substrátu). Takto byla ověřena oxidace volných aminoaldehydů na jim odpovídající aminokyseliny po inkubaci v přítomnosti *ZmALDH7*. Měřilo se v pozitivním módu. Zjištěné hodnoty m/z odpovídají hodnotám $[M+H]^+$ nepřeměněných aminoaldehydů a produktům oxidace. Látky odvozené od ABAL existují také v cyklické formě, kdy dochází ke ztrátě molekuly vody a snížení hodnoty m/z o 18 jednotek.

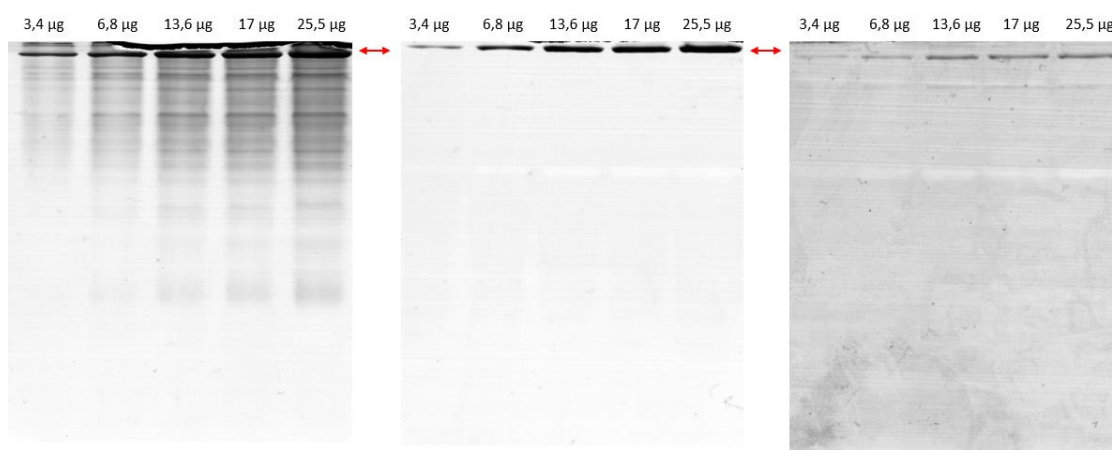
4.6 Nativní elektroforéza

Pro další potvrzení přeměny aminoacylovaných substrátů *PsAMADH* byla provedena nativní elektroforéza enzymu s barvením gelu na aktivitu v přítomnosti substrátu a umělých akceptorů elektronů PMS a MTT. Při pozitivní reakci vzniká redukcí MTT červenofialově (nachově) zbarvený formazan (Šebela *et al.*, 2001). Gel barvený v přítomnosti APAL (Obr. 19 uprostřed) ukazuje výrazné pásy potvrzující schopnost *PsAMADH* přeměňovat tento přirozený substrát. Zvyšující se intenzita pásů zleva doprava koreluje se zvyšujícím se množstvím nanášeného enzymu (1 – 5 μg). Pro kontrolu byly nativní gely barveny rovněž na přítomnost proteinu (Obr. 19 vlevo). Jako příklad výsledků se syntetizovanými aminoaldehydy je uveden gel barvený v přítomnosti Phe-ABAL (Obr. 19 vpravo). Intenzita pásů je porovnatelná s APAL, avšak barvení probíhalo v tomto případě podstatně delší dobu. Zvyšující se intenzita pásů zleva doprava opět koreluje se zvyšujícím se množstvím nanášeného vzorku (1 – 5 μg). Barvení na aktivitu *PsAMADH* bylo provedeno také v přítomnosti Phe-

APAL a Tyr-APAL. Pro potvrzení aktivity *ZmALDH7* se syntetizovanými substráty bylo provedeno barvení v přítomnosti AASAL (Obr. 20 uprostřed) a Phe-APAL (Obr. 20 vpravo). Intenzita pásů pro přirozený substrát byla vyšší než pro syntetizovaný substrát. Gel obarvený na proteiny (Obr. 20 vlevo) ukazuje všechny proteiny přítomné ve vzorku rekombinantní *ZmALDH7*. Zvyšující se intenzita pásů zleva doprava koreluje se zvyšujícím se množstvím nanášeného vzorku (3,4 – 25,5 μg).



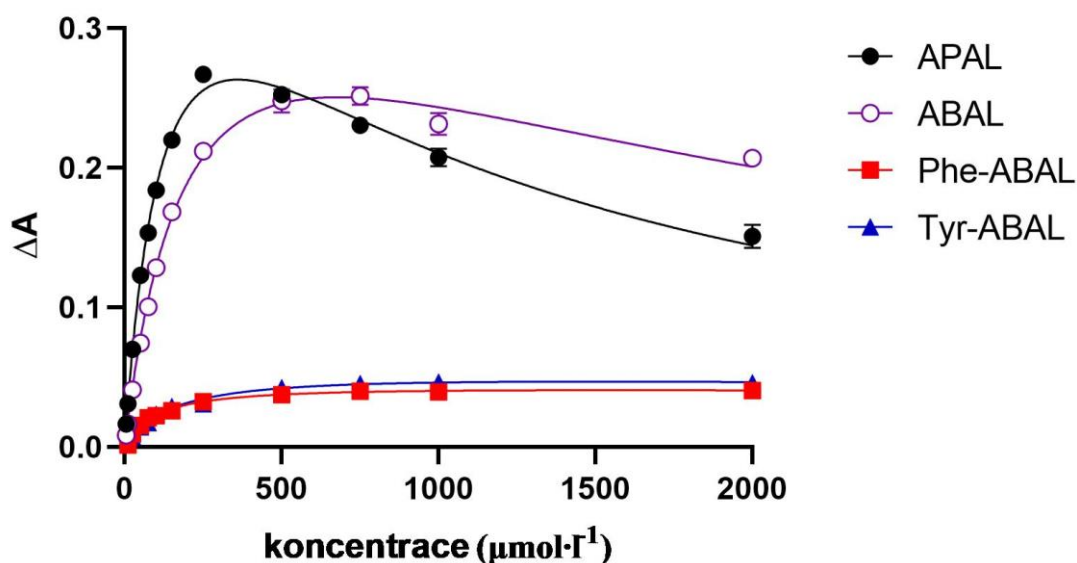
Obr. 19 Gel vzorku *PsAMADH* získaný pomocí nativní elektroforézy a barvený na aktivitu s $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ APAL (uprostřed) a $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phe-ABAL (vpravo), případně na proteiny (vlevo). Jednotlivé pásy zobrazují koncentrační řadu v rozsahu zleva od 1 – 5 μg . Negativně barvené pásy pravděpodobně zobrazují minoritní proteiny bez AMADH aktivity, které brání obarvení pozadí gelu.



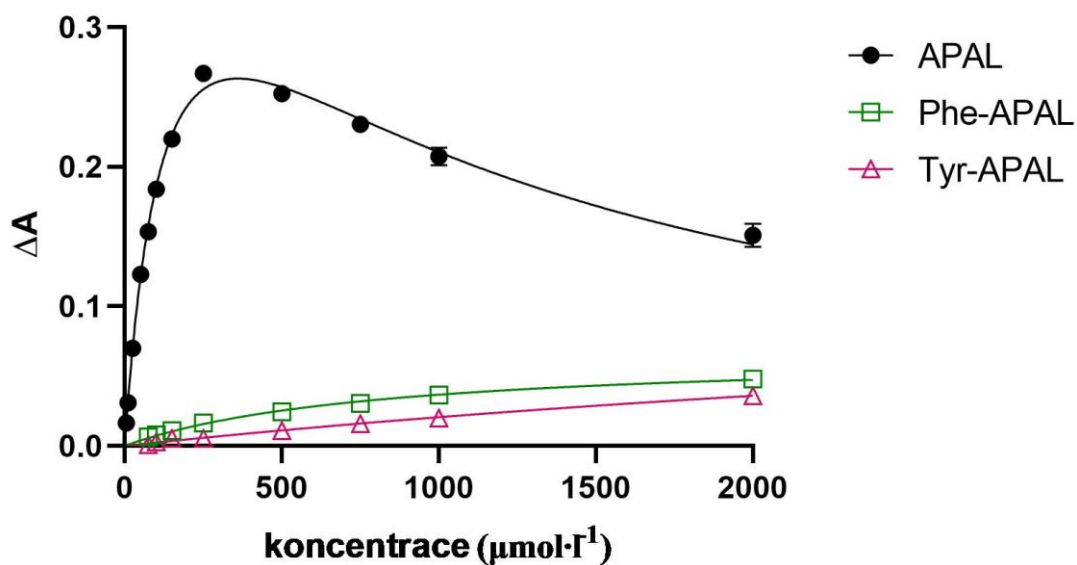
Obr. 20 Gel vzorku *ZmALDH7* získaný pomocí nativní elektroforézy a barvený na aktivitu s $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ AASAL (uprostřed) a $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phe-APAL (vpravo), případně na proteiny (vlevo). Jednotlivé pásy zobrazují koncentrační řadu v rozsahu od 3,4 – 25,5 μg . Negativně barvené pásy pravděpodobně zobrazují minoritní proteiny bez AMADH aktivity, které brání obarvení pozadí gelu.

4.7 Určení kinetických parametrů

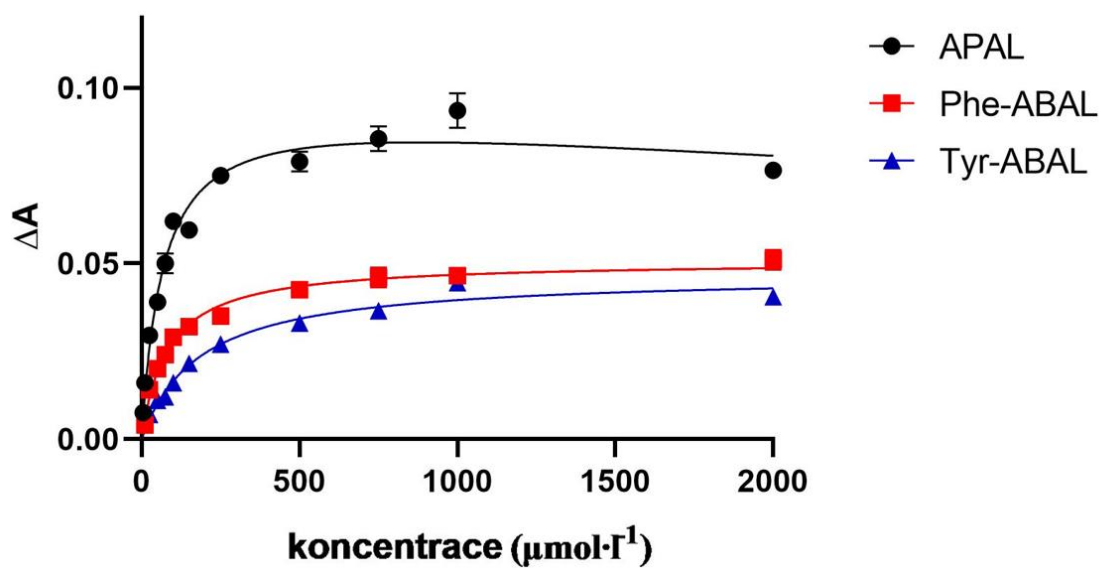
Kinetické parametry (Tab. 14) byly stanoveny s využitím programu GraphPad Prism na základě vynesení závislosti naměřených hodnot absorbance při 340 nm na koncentraci substrátu v maximálním rozmezí 5 – 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. 21-27). Výsledky byly vyhodnoceny na základě nelineární regrese a byla uvažována inhibice nadbytkem substrátu. Pro *Ps*AMADH získané elucí z DEAE Sepharose kolony s jednotlivými substráty byly určeny hodnoty K_m , poměr $k_{\text{cat}(\text{substrát})}/k_{\text{cat}(\text{APAL})}$ a relativní rychlost reakce, jelikož enzym byl jen částečně přečištěný (Obr. 21, 22). S vysoce přečištěným enzymem *Ps*AMADH získaným elucí z kolony Mono Q HR 5/5 byly určeny hodnoty K_m a k_{cat} pouze pro látky odvozené od ABAL, které byly lepšími substráty než látky odvozené od APAL (Obr. 23). Na základě výsledků identifikace proteinů a intenzit barvených pásů po SDS-PAGE (program GelAnalyzer) byl obsah *Ps*AMADH ve vzorku odhadnut na 15 – 20 %.



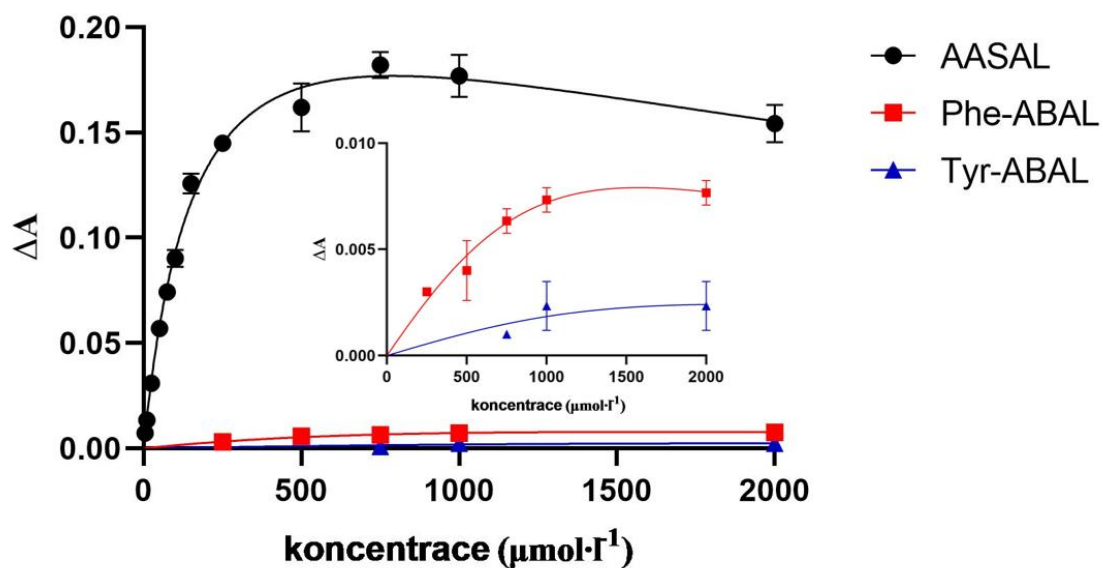
Obr. 21 Graf křivek znázorňujících kinetiku Michaelise a Mentenové v přítomnosti nativní *Ps*AMADH (částečně přečištěný enzym) s Phe-ABAL a Tyr-ABAL v porovnání s referenčními substráty APAL a ABAL.



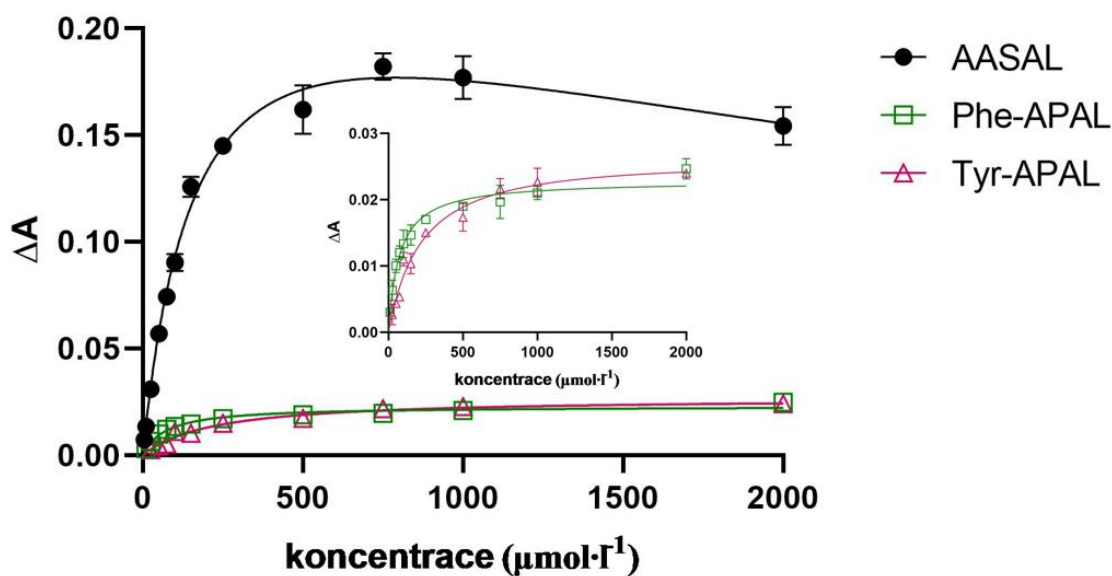
Obr. 22 Graf křivek znázorňujících kinetiku Michaelise a Mentenové v přítomnosti nativní *PsAMADH* (částečně přečištěný enzym) s Phe-APAL a Tyr-APAL v porovnání s referenčním substrátem APAL.



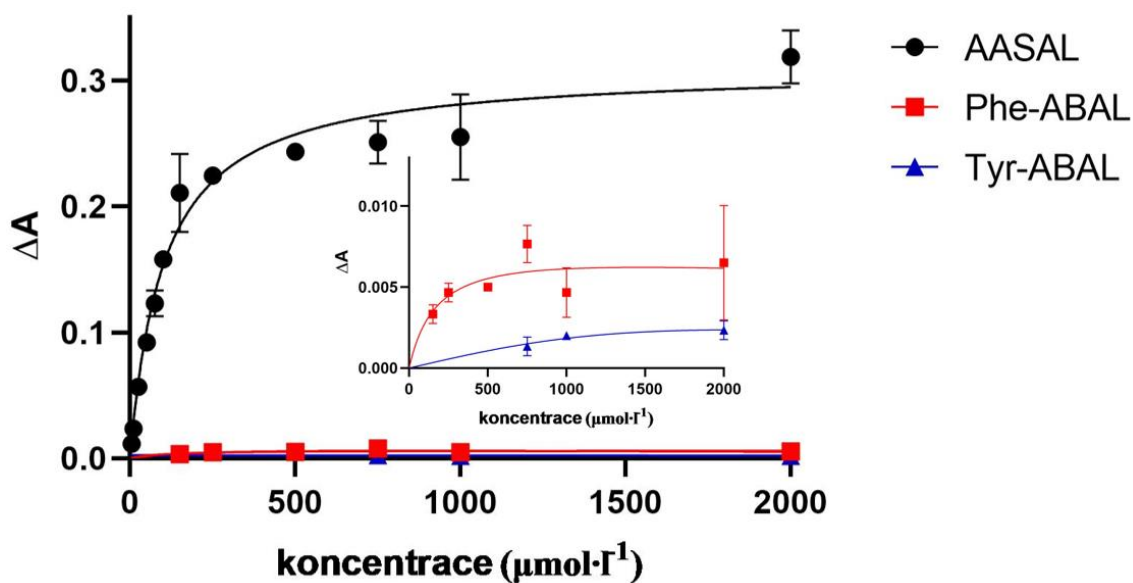
Obr. 23 Graf křivek znázorňujících kinetiku Michaelise a Mentenové v přítomnosti nativní *PsAMADH* (vysoce přečištěný enzym) s Phe-ABAL a Tyr-ABAL v porovnání s referenčním substrátem APAL.



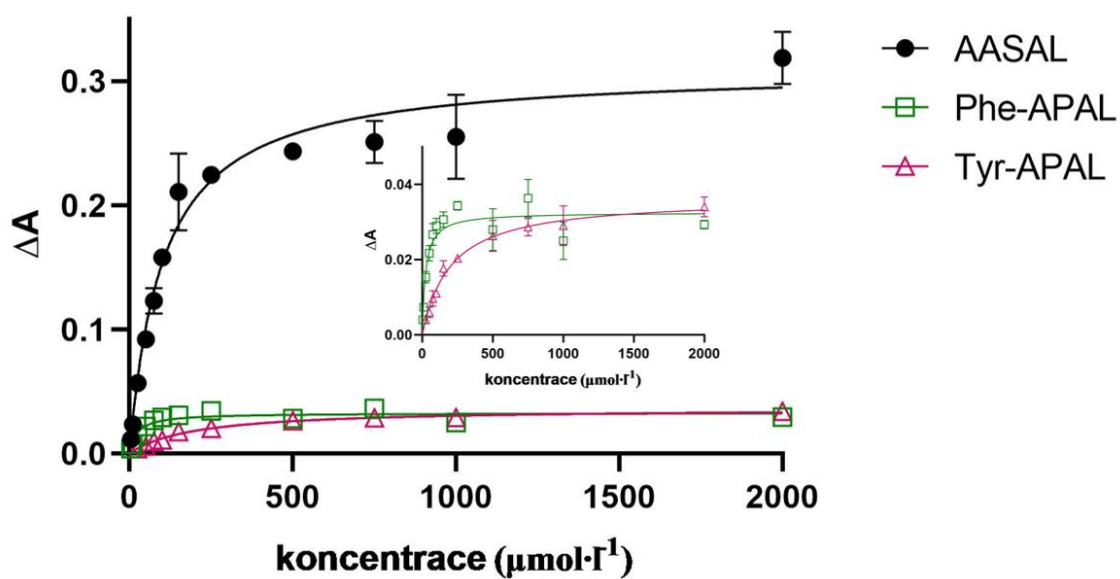
Obr. 24 Graf křivek znázorňujících kinetiku Michaelise a Mentenové v přítomnosti *PsALDH7* s Phe-ABAL a Tyr-ABAL v porovnání s referenčním substrátem AASAL.



Obr. 25 Graf křivek znázorňujících kinetiku Michaelise a Mentenové v přítomnosti *PsALDH7* s Phe-APAL a Tyr-APAL v porovnání s referenčním substrátem AASAL.



Obr. 26 Graf křivek znázorňujících kinetiku Michaelise a Mentenové v přítomnosti *ZmALDH7* s Phe-ABAL a Tyr-ABAL v porovnání s referenčním substrátem AASAL.



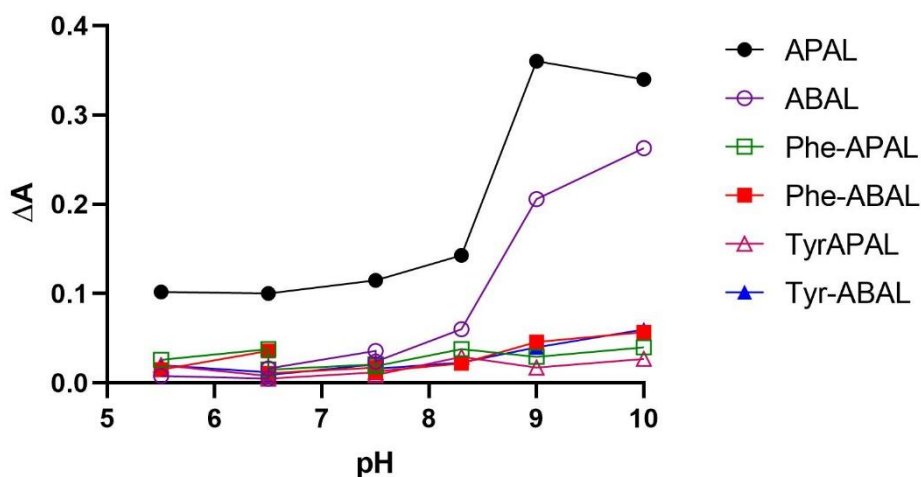
Obr. 27 Graf křivek znázorňujících kinetiku Michaelise a Mentenové v přítomnosti *ZmALDH7* s Phe-APAL a Tyr-APAL v porovnání s referenčním substrátem AASAL.

Tab. 14 Naměřené kinetické parametry přirozených referenčních substrátů a syntetizovaných substrátů s nativní *PsAMADH* a rekombinantními enzymy *PsALDH7* a *ZmALDH7*. Vysvětlivky: *PsAMADH* (a) – částečně přečištěný enzym získaný elucí z kolony DEAE Sepharose; *PsAMADH* (b) – vysoce přečištěný enzym získaný elucí z kolony Mono Q HR 5/5; x – látka byla špatným substrátem enzymu a nebylo možno určit kinetické parametry.

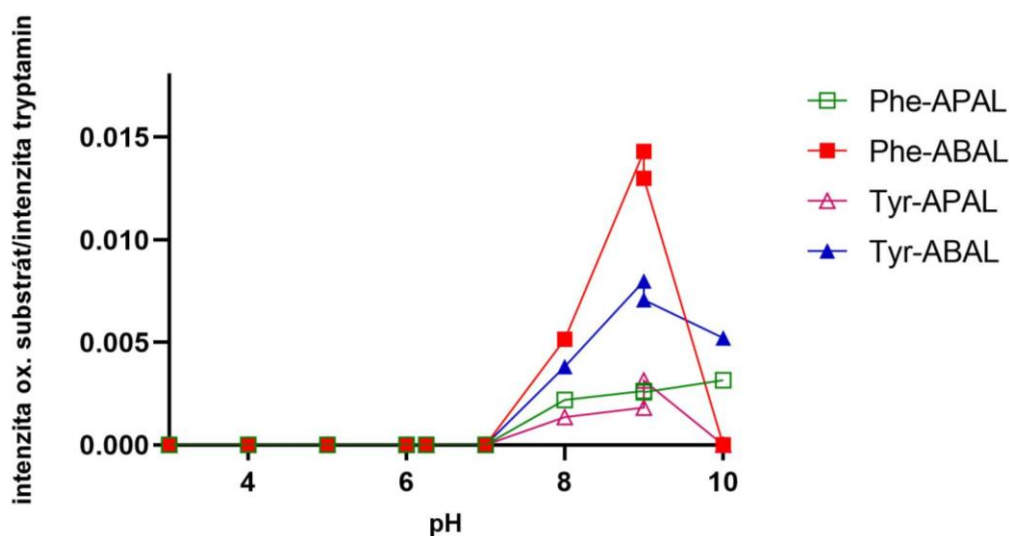
<i>PsAMADH</i> (a)	Michaelisova konstanta K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Poměr $k_{cat}(\text{substrát})/k_{cat}(\text{APAL})$	Relativní rychlost (%)
APAL	143	1	100
ABAL	212	0,58	58
Phe-APAL	818	0,06	5,7
Phe-ABAL	101	0,04	3,9
Tyr-APAL	5850	0,03	2,9
Tyr-ABAL	154	0,05	4,8
<i>PsAMADH</i> (b)	Michaelisova konstanta K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Číslo přeměny k_{cat} (s^{-1})	poměr k_{cat}/K_m ($\text{l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
APAL	75	1,1	0,015
Phe-ABAL	84	0,6	0,007
Tyr-ABAL	211	0,5	0,002
<i>PsALDH7</i>	Michaelisova konstanta K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Číslo přeměny k_{cat} (s^{-1})	poměr k_{cat}/K_m ($\text{l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
AASAL	148	0,54	$37\cdot 10^{-4}$
Phe-APAL	82	0,05	$6,7\cdot 10^{-4}$
Phe-ABAL	x	x	x
Tyr-APAL	207	0,06	$3\cdot 10^{-4}$
Tyr-ABAL	x	x	x
<i>ZmALDH7</i>	Michaelisova konstanta K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Číslo přeměny k_{cat} (s^{-1})	poměr k_{cat}/K_m ($\text{l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
AASAL	103	0,9	$8,7\cdot 10^{-3}$
Phe-APAL	33	0,11	$3,2\cdot 10^{-3}$
Phe-ABAL	347	0,03	$8,4\cdot 10^{-5}$
Tyr-APAL	178	0,1	$5,8\cdot 10^{-4}$
Tyr-ABAL	x	x	x

4.8 Studium pH optima

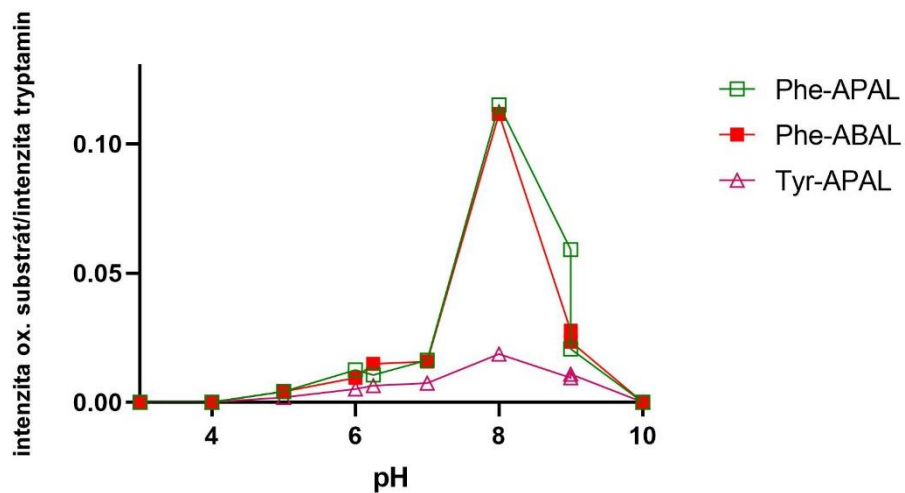
Pro enzym *PsAMADH* bylo pH optimum se substráty studováno spektrofotometricky, kdy pro APAL odpovídalo hodnotě 9 – 10, pro ABAL a syntetizované substráty bylo spíše v oblasti pH 10 (Obr. 28). S využitím MALDI-TOF byla studována pH optima určením poměru intenzity signálu produktu a signálu tryptaminu jako vnitřního standardu v reakčních směsích v těkavých pufrch o pH 3 – 10. Pro *PsAMADH* odpovídala pH optima se syntetizovanými substráty hodnotě 9 kromě Phe-APAL, kdy bylo blíže pH 10 (Obr. 29). Pro rekombinantní enzymy *PsALDH7* a *ZmALDH7* byla pH optima stanovena se všemi syntetizovanými substráty na hodnotu 8 (Obr. 30 a 31).



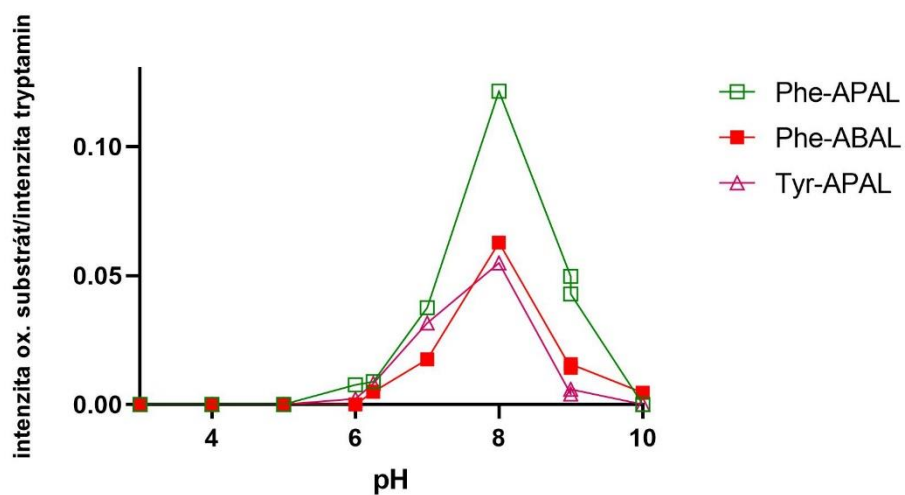
Obr. 28 Studium pH optima pomocí spektrofotometrie. Graf závislosti časové změny absorbance při 340 nm na pH pro *PsAMADH* (částečně přečištěný enzym).



Obr. 29 Studium pH optima pomocí MALDI-TOF. Graf závislosti poměru intenzity signálu produktu oxidace a standardu tryptaminu na pH pro *PsAMADH* (vysoce přečištěný enzym).



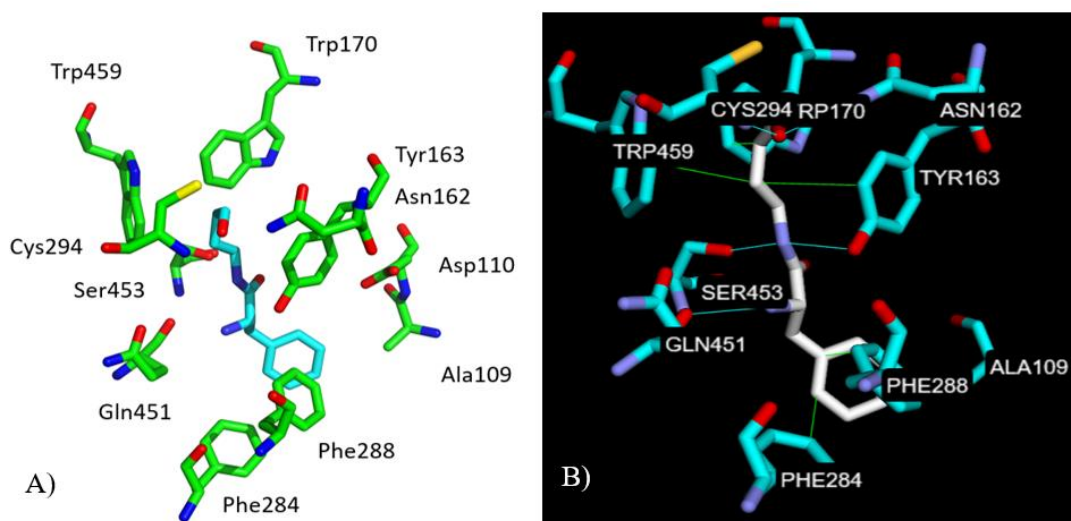
Obr. 30 Studium pH optima pomocí MALDI-TOF. Graf závislosti poměru intenzity signálu produktu oxidace a standardu tryptaminu na pH pro *PsALDH7*.



Obr. 31 Studium pH optima pomocí MALDI-TOF. Graf závislosti poměru intenzity signálu produktu oxidace a standardu tryptaminu na pH pro *ZmALDH7*.

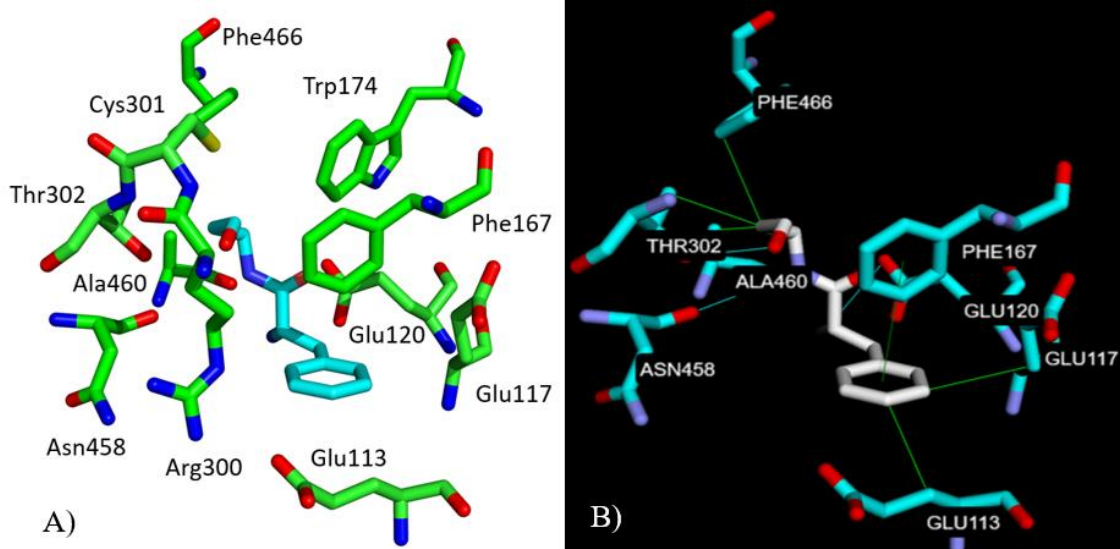
4.9 Molekulové modelování syntetizovaných substrátů v aktivním místě

Vazba syntetických aminoaldehydů odvozených od Phe a Tyr do aktivního místa *PsAMADH1*, *PsAMADH2* a *ZmALDH7* byla modelována s využitím Achilles Blind Docking serveru (Sánchez-Linares *et al.*, 2012). Phe-ABAL vázaný v aktivním místě *PsAMADH1* má aldehydovou skupinu orientovanou směrem ke katalytickému Cys294 (vazebná energie $-6,70 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Do hydrofobní interakce fenylové skupiny a alifatického řetězce substrátu se zapojují residua Ala109, Phe284, Phe288 a Tyr163 s Trp459 (Obr. 32). Primární aminoskupina Phe-ABAL vykazuje vazebnou interakci s kyslíkem hlavního řetězce Gln451, zatímco amidový vodík Phe-ABAL vytváří vodíkovou vazbu s kyslíky postranních řetězců Tyr163 a Ser453. Aldehydový kyslík substrátu se zapojuje do vodíkové vazby s amidovou skupinou postranního řetězce Asn162. Podobně se také Asn162, Tyr163, Trp170 a Trp 459 zapojují při vazbě Tyr-ABAL v aktivním místě *PsAMADH1* (vazebná energie $-6,20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Phe-APAL byl v aktivním místě vázán tak, že jeho aldehydová skupina byla odkloněna od katalytického Cys294. U Tyr-APAL se nepodařilo modelovat jeho vazbu do aktivního místa *PsAMADH1*. Podobně u žádné ze studovaných látek se nepodařilo modelovat jejich vazbu do aktivního místa *PsAMADH2* tak, aby vytvářela typickou substrátovou vazebnou interakci zahrnující Tyr163 a Trp288.



Obr. 32 Syntetický substrát Phe-ABAL v aktivním místě *PsAMADH1*. Aldehydová skupina Phe-ABAL je orientována směrem ke katalytickému Cys294. Vypočítaná vazebná energie odpovídá hodnotě $-6,70 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. A) – Atomy uhlíku residuí *PsAMADH1* jsou značeny zeleně, atomy uhlíku substrátu Phe-ABAL tyrkysově, atomy dusíku tmavě modře, atomy kyslíku červeně a atomy síry žlutě. B) – Atomy uhlíku residuí *PsAMADH1* jsou značeny tyrkysově, atomy uhlíku substrátu Phe-ABAL bíle, atomy dusíku fialově, atomy kyslíku červeně a atomy síry žlutě.

Molekula Phe-APAL modelovaná do aktivního místa *ZmALDH7* má svou aldehydovou skupinu orientovanou směrem ke katalytickému Cys301 (vazebná energie $-6,20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Primární aminoskupina Phe-APAL se zapojuje do interakce náboj-náboj s Glu120 a dusík amidové skupiny interaguje s Asn458. Do hydrofobních interakcí mohou být zapojeny Glu113, Glu117, Phe167, Thr302, Ala460 a Phe466 (Obr. 33). Dokovací server poskytl také model vazby Phe-ABAL v aktivním místě *ZmALDH7* (vazebná energie $-6,30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Aldehydová skupina této sloučeniny ale nebyla vhodně orientována vůči katalytickému Cys301. Hydroxylová skupina Tyr-ABAL vázaného v aktivním místě *ZmALDH7* (vazebná energie $-6,30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) interaguje s Lys109, Thr296 a Arg300. U molekuly Tyr-APAL se nepodařilo modelovat jeho vazbu do aktivního místa *ZmALDH7*.



Obr. 33 Syntetický substrát Phe-APAL v aktivním místě *ZmALDH7*. Aldehydová skupina Phe-APAL je orientována směrem ke katalytickému Cys301. Vypočítaná vazebná energie odpovídá hodnotě $-6,20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. A) – Atomy uhlíku residuí *ZmALDH7* jsou značeny zeleně, atomy uhlíku substrátu Phe-APAL tyrkysově, atomy dusíku tmavě modře, atomy kyslíku červeně a atomy síry žlutě. B) – Atomy uhlíku residuí *ZmALDH7* jsou značeny tyrkysově, atomy uhlíku substrátu Phe-APAL bíle, atomy dusíku fialově, atomy kyslíku červeně.

5 DISKUZE

PsAMADH byla extrahována a purifikována ze sedmidenních semenáčků hrachu až po krok využívající AC na koloně 5'-AMP Sepharose 4B (Obr. 11B), kdy přítomné pásy odpovídaly svými molekulovými hmotnostmi isoenzymům *PsAMADH1* a 2. Výtěžek byl nízký, pro potřeby spektrofotometrických měření by bylo nutné zpracovat velké množství rostlinného materiálu, proto byl pro tyto potřeby využíván enzym purifikovaný pomocí IEC na koloně Mono Q HR 5/5 (Obr. 11). Tento enzym měl celkovou aktivitu 137 nkat a specifickou aktivitu 14 nkat·mg⁻¹ s celkovým 4% výtěžkem (Tab. 12). *PsAMADH* purifikovaná Šebelou *et al.* (2000) z 1 kg semenáčků vykazovala po purifikaci IEC celkovou aktivitu 390 nkat a specifickou aktivitu 86,7 nkat·mg⁻¹ s celkovým 16% výtěžkem. S využitím peptidového mapování byla *PsAMADH* identifikována a byla potvrzena přítomnost isoenzymů *PsAMADH1* a 2. Majoritně byly přítomny v pásích 4 a 5 (Obr. 12A) a v pásích 6 a 7 (Obr. 12B). Minoritně byly ale přítomny také v dalších pásích, například v pásích 5, 8 a 9 (Obr. 12B). V žádném pásu nebyly přítomny proteiny s interferující aktivitou, která by rušila další měření (Tab. 13). S využitím softwaru GelAnalyzer byl obsah *PsAMADH* po přečištění IEC odhadnut z intenzity pásů na 15 – 20 %. Čistota rekombinantních enzymů byla potvrzena s využitím SDS-PAGE s barvením pomocí QC koloidního Coomassie barviva na základě silných pásů odpovídajících svou molekulovou hmotností monomerům *PsALDH7* a *ZmALDH7* (Obr. 13). Také identifikace využívající peptidového mapování prokázala *ZmALDH7* i *PsALDH7*.

Celkem 5 syntetizovaných aminoacyovaných aminoaldehydů bylo testováno jako substráty enzymů z rodin ALDH7 a ALDH10. Pouze čtyři z pěti látek vystupovaly jako substráty těchto enzymů. Phe-AEAL nebyl substrátem ani jednoho testovaného enzymu, což bylo ověřeno na základě spektrofotometrických měření. Proto tato látka nebyla zahrnuta do jiných experimentů. Frömmel *et al.* (2012) studovali některé deriváty AEAL, například 4-pyridinylmethylaminoethanal (4-PMet-AEAL) byl substrátem *PsAMADH2* s hodnotou $K_m=0,7$ mmol·l⁻¹ a $V_{lim}=3,4$ nmol·s⁻¹·mg⁻¹ (pro APAL $K_m=0,012$ mmol·l⁻¹ a $V_{lim}=179$ nmol·s⁻¹·mg⁻¹) a *SIAMADH1* s hodnotou $K_m=0,2 - 0,4$ mmol·l⁻¹ a $V_{lim}=34$ nmol·s⁻¹·mg⁻¹ (pro APAL $K_m=0,02$ mmol·l⁻¹ a $V_{lim}=167$ nmol·s⁻¹·mg⁻¹), která má širší substrátovou specifitu (Kopečný *et al.*, 2013). Pomalu byl přeměňován *N*-(2,2-dimethoxyethyl)-9*H*-purin-6-amin (Pu-AEAL) pomocí

PsAMADH2 (7% relativní reakční rychlost vůči APAL), lépe byl přeměňován *SlAMADH1* (30% relativní reakční rychlost vůči APAL) (Frömmel *et al.*, 2012).

Identita volných aminoacylovaných aminoaldehydů získaných hydrolyzou v kyselém prostředí byla potvrzena na základě MALDI-TOF hmotnostních spekter jednotlivých látek. A to díky porovnání hodnot m/z odpovídajících pseudomolekulárním iontům $[M+H]^+$ s molekulovými hmotnostmi jednotlivých látek. Pro detekci aminokyselinových produktů získaných oxidací volných aminoacylovaných aminoaldehydů v přítomnosti daného enzymu byla provedena analýza reakčních směsí s využitím MALDI-TOF. Pro všechny testované látky byly se všemi enzymy nalezeny píky odpovídající svou hodnotou m/z pseudomolekulárním iontům $[M+H]^+$ oxidovaných forem jednotlivých substrátů. Nejvyšší relativní intenzita v přítomnosti *PsALDH7* a *ZmALDH7* byla naměřena pro oxidovanou formu Phe-APAL, zatímco nejnižší intenzitu vykazoval pro obě ALDH7 Tyr-ABAL. V přítomnosti *PsAMADH* byla nejvyšší relativní intenzita naměřena pro oxidované formy látek odvozených od ABAL. Frömmel *et al.* (2015), kteří testovali *N*-acylderiváty APAL a ABAL jako substráty *PsAMADH*, použili pro detekci aminokyselinových produktů reakční směsi obsahující *PsAMADH* v přítomnosti koenzymu NAD^+ a daného substrátu. Ultrafiltráty reakčních směsí po inkubaci byly analyzovány pomocí UHR-Q-TOF hmotnostního spektrometru v pozitivním módu v kombinaci s ESI iontovým zdrojem. Frömmel *et al.* (2012) použili pro identifikaci produktů v reakčních směsích při testování aromatických derivátů APAL a ABAL jako substrátů AMADH LC-MS s APCI iontovým zdrojem.

Pro vizualizaci enzymové aktivity *PsAMADH* a *ZmALDH7* s vybranými syntetizovanými substráty byla využita nativní elektroforéza s barvením gelu v přítomnosti substrátu a umělých akceptorů elektronů PMS a MTT. Gely, na které byla aplikována *PsAMADH*, byly po elektroforetické separaci barveny v přítomnosti APAL, Phe-APAL, Phe-ABAL a Tyr-APAL. Nejvyšší intenzitu pásů vykazoval gel barvený v přítomnosti přirozeného substrátu APAL po dobu 2 h. Podobnou intenzitu vykazoval také gel barvený v přítomnosti Phe-ABAL, zde ale barvení probíhalo přes noc. Obarvené pásy gelů barvených v přítomnosti Phe-APAL a Tyr-APAL nebyly tak intenzivní jako po barvení v přítomnosti Phe-ABAL, ale byla potvrzena schopnost *PsAMADH* přeměňovat oba substráty. Gely pro vizualizaci aktivity *ZmALDH7* byly barveny v přítomnosti AASAL, kde velmi intenzivní pásy potvrdily vysokou aktivitu enzymu se substrátem. Phe-APAL poskytoval méně intenzivní pásy v porovnání

s barvením v přítomnosti AASAL, ale byla potvrzena schopnost enzymu tuto látku přeměňovat. Metoda vizualizace aktivity BADH ze špenátu byla popsána Arakawou *et al.* (1992), kteří využili PMS a nitro blue tetrazolium (NBT) jako akceptory elektronů. Pro AMADH byl tento postup optimalizován Šebelou *et al.* (2001), kteří NBT nahradili ve vodě lépe rozpustným MTT, díky čemuž se zvýšila citlivost a zkrátila doba barvení. Aktivita na gelu je vizualizována díky schopnosti AMADH redukovat umělé akceptory elektronů, díky čemuž vzniká nerozpustný červenofialově zbarvený formazan.

Substrátový kanál *PsAMADH1* je 5-8 Å široký a 14 Å dlouhý, díky čemuž je aktivní místo dobře přístupné řadě strukturně odlišných aldehydů (Tylichová *et al.*, 2010). Na základě toho byly syntetizované aminoaldehydy testovány jako substráty tohoto enzymu. Byla potvrzena schopnost *PsAMADH* přeměňovat 4 z 5 testovaných syntetizovaných látek. Phe-AEAL nebyl přeměňován. Látky odvozené od ABAL vystupovaly jako lepší substráty *PsAMADH* než látky odvozené od APAL. Jako nejlepší substrát pak vystupoval Phe-ABAL, ke kterému měla *PsAMADH* srovnatelnou afinitu jako vůči APAL. Schopnost enzymu přeměňovat tento substrát byla asi 2x nižší v porovnání s APAL. Podobně také schopnost *PsAMADH* přeměňovat Tyr-ABAL byla asi 2x nižší než v porovnání s APAL a afinita enzymu k Tyr-ABAL byla 2x nižší než k APAL. Preference enzymu k Phe-ABAL na základě poměru k_{cat}/K_m byla 2x nižší než k APAL a téměř 8x nižší k Tyr-ABAL než k APAL. Hodnota K_m přirozených substrátů *PsAMADH* APAL a ABAL odpovídá dříve publikovaným hodnotám pro *PsAMADH1* (Tab. 15), hodnota k_{cat} pro APAL byla asi 2x nižší ve srovnání s *PsAMADH1*. Důvodem mohl být nadhodnocený obsah *PsAMADH*, který byl s využitím GelAnalyzeru určen na 15 – 20 %, obsah mohl být nižší, kolem 10 %. Jako substráty *PsAMADH* i dalších rostlinných AMADH, jako je *SlAMADH1*, byla testována řada syntetizovaných aldehydů. Příkladem jsou například aromatické aldehydy odvozené od purinu či pyridinu (Tab. 15) (Frömmel *et al.*, 2012). Dalším příkladem může být Adip-APAL (Tab. 15), ke kterému měla *PsAMADH2* nejvyšší afinitu z testovaných *N*-acylderivátů APAL (Frömmel *et al.*, 2015). Naměřené kinetické parametry (Tab. 14, 15, 16) pro látky testované v této práci jako substráty výše uvedených enzymů nemají uvedenou hodnotu SD, jelikož software používaný pro vyhodnocení naměřených hodnot absorbance vycházel vždy ze tří měření pro každou koncentraci a výsledné kinetické parametry jsou již zprůměrovanou nejlepší hodnotou daného parametru.

Tab. 15 Porovnání naměřených kinetických parametrů pro *PsAMADH* s parametry naměřenými v literatuře. Vysvětlivky: *PsAMADH* (a) – částečně přečištěný enzym získaný elucí z kolony DEAE Sepharose; *PsAMADH* (b) – vysoce přečištěný enzym získaný elucí z kolony Mono Q HR 5/5; x – neurčená hodnota kinetického parametru.

Substrát	Zdroj	AMADH	Michaelisova konstanta K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Číslo přeměny k_{cat} (s^{-1})
APAL	Měřené výsledky	<i>PsAMADH</i> (b)	75	1,1
	Frömmel <i>et al.</i> (2015)	<i>PsAMADH1</i>	$71,8 \pm 5,75$	$3,65 \pm 0,122$
		<i>PsAMADH2</i>	$7,27 \pm 0,46$	$9,42 \pm 0,146$
ABAL	Měřené výsledky	<i>PsAMADH</i> (a)	211	x
	Tylichová <i>et al.</i> (2010)	<i>PsAMADH1</i>	170	x
Phe-APAL	Měřené výsledky	<i>PsAMADH</i> (a)	818	x
Tyr-APAL	Měřené výsledky	<i>PsAMADH</i> (a)	5850	x
Phe-ABAL	Měřené výsledky	<i>PsAMADH</i> (b)	84	0,6
Tyr-ABAL	Měřené výsledky	<i>PsAMADH</i> (b)	211	0,5
Adip-APAL	Frömmel <i>et al.</i> (2015)	<i>PsAMADH2</i>	$39,2 \pm 3,99$	$8,78 \pm 0,305$
4-PCAL	Frömmel <i>et al.</i> (2012)	<i>PsAMADH2</i>	$33 \pm 2,3$	x
2,6-diCl-4-PCAL	Frömmel <i>et al.</i> (2012)	<i>PsAMADH2</i>	$28 \pm 0,5$	x
P3PAL	Frömmel <i>et al.</i> (2012)	<i>PsAMADH2</i>	87 ± 8	x
3-PMet-ABAL	Frömmel <i>et al.</i> (2012)	<i>PsAMADH2</i>	$289 \pm 16,4$	x
3-Br-BzAL	Frömmel <i>et al.</i> (2012)	<i>PsAMADH2</i>	$13 \pm 0,9$	x
Pu-AEAL	Frömmel <i>et al.</i> (2012)	<i>PsAMADH2</i>	$755 \pm 55,2$	x
4-PMet-AEAL	Frömmel <i>et al.</i> (2012)	<i>PsAMADH2</i>	$761 \pm 59,4$	x

Dále byly připravené látky testovány jako substráty enzymů z rodiny ALDH7, které nevykazují příliš širokou substrátovou specifitu (Tab. 16) (Končítíková *et al.*, 2015). Přesto byly některé testované látky potvrzeny jako jejich substráty. Konkrétně látky odvozené od APAL byly lepšími substráty než látky odvozené od ABAL. Pro *PsALDH7* látky odvozené od ABAL prakticky nebyly substráty, na základě čehož nemohly být určeny ani kinetické parametry. Pro *ZmALDH7* Tyr-ABAL prakticky nebyl substrátem. Phe-ABAL byl pro *ZmALDH7* lepším substrátem, ale schopnost přeměňovat tuto látku byla 30x nižší než u AASAL. Jako nejlepší substrát obou rekombinantních enzymů vystupoval Phe-APAL s nižší hodnotou K_m než AASAL. Schopnost *PsALDH7* přeměňovat Phe-APAL byla 10x nižší než pro AASAL, pro *ZmALDH7* byla asi 8x nižší než pro AASAL. Preference *PsALDH7* vůči Phe-APAL byla 5,5x nižší než vůči AASAL a pro *ZmALDH7* 2,7x nižší. Porovnání hodnot K_m s nejlepším přirozeným substrátem AASAL s výsledky Končítíkové *et al.* (2015) bylo pro *ZmALDH7* odpovídající, pro *PsALDH7* bylo téměř 2x vyšší (Tab. 16). Hodnoty k_{cat} byly ale pro oba enzymy výrazně nižší (přibližně 3x). Důvodem mohlo být použití $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ při spektrofotometrických měřeních. I když bylo ověřeno,

že aktivity enzymů s AASAL v přítomnosti 1 mmol·l⁻¹ NAD⁺ a 2,5 mmol·l⁻¹ NAD⁺, kterou používali Končítíková *et al.* (2015), byly srovnatelné.

pH optimum *PsAMADH* v přítomnosti APAL bylo s využitím spektrofotometrického měření určeno v rozmezí hodnot 9 – 10, což odpovídá hodnotě pH standardně používaných pufrů pro měření aktivity AMADH (Šebela *et al.*, 2000). Tylichová *et al.* (2010) stanovili pH optima pro *PsAMADH1* s APAL na hodnotu 9,7 a pro *PsAMADH2* s APAL na hodnotu 10,2. pH optima *PsAMADH* se syntetizovanými substráty vyšla s využitím spektrofotometrického měření i s využitím MALDI-TOF v rozmezí pH 9 – 10. I přesto, že pH optima některých látek vycházela více bazická, tak byl pro kinetická měření používán Tris-HCl pufr (pH 9,0), který je standardně využíván. Zároveň u spektrofotometrických měření byla v nízkých hodnotách pH naměřena vyšší absorbance, než bylo očekáváno, což bylo pravděpodobně způsobeno probíhající neenzymatickou reakcí, proto jsou v grafech uváděny hodnoty absorbancí až od pH 5,5. pH optima *PsALDH7* i *ZmALDH7* se všemi syntetizovanými substráty odpovídala hodnotě 8, což odpovídá hodnotě pH standardně používaných pufrů pro měření aktivity ALDH7 (Končítíková *et al.*, 2015).

Tab. 16 Porovnání naměřených kinetických parametrů pro *PsALDH7* a *ZmALDH7* s parametry naměřenými v literatuře. Vysvětlivky: x – látka byla špatným substrátem enzymu a nebylo možno určit kinetické parametry.

Substrát	Zdroj	ALDH7	Michaelisova konstanta K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Číslo přeměny k_{cat} (s^{-1})
AASAL	Měřené výsledky	<i>PsALDH7</i>	148	0,54
		<i>ZmALDH7</i>	103	0,9
	Končítíková <i>et al.</i> (2015)	<i>PsALDH7</i>	89 ± 3	$3,32 \pm 0,027$
		<i>ZmALDH7</i>	97 ± 7	$2,56 \pm 0,043$
Phe-APAL	Měřené výsledky	<i>PsALDH7</i>	82	0,05
		<i>ZmALDH7</i>	33	0,11
Tyr-APAL	Měřené výsledky	<i>PsALDH7</i>	207	0,06
		<i>ZmALDH7</i>	178	0,1
Phe-ABAL	Měřené výsledky	<i>PsALDH7</i>	x	x
		<i>ZmALDH7</i>	347	0,03
APAL	Končítíková <i>et al.</i> (2015)	<i>PsALDH7</i>	1698 ± 81	$0,34 \pm 0,007$
		<i>ZmALDH7</i>	1280 ± 59	$0,15 \pm 0,002$
ABAL	Končítíková <i>et al.</i> (2015)	<i>PsALDH7</i>	5167 ± 162	$0,046 \pm 0,007$
		<i>ZmALDH7</i>	4371 ± 116	$0,027 \pm 0,005$
MASAL	Končítíková <i>et al.</i> (2015)	<i>PsALDH7</i>	147 ± 17	$0,026 \pm 0,009$
		<i>ZmALDH7</i>	126 ± 21	$0,09 \pm 0,004$
4-PCAL	Končítíková <i>et al.</i> (2015)	<i>PsALDH7</i>	321 ± 10	$0,27 \pm 0,005$
		<i>ZmALDH7</i>	537 ± 51	$0,22 \pm 0,007$

S využitím serveru Achilles se podařilo modelovat do aktivního místa *PsAMADH1* Phe-ABAL (vazebná energie $-6,70 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), ke kterému měl na základě výsledků kinetických měření tento enzym nejvyšší afinitu a vykazoval také nejlepší schopnost přeměňovat tento substrát v porovnání s ostatními testovanými látkami. Navíc na základě výsledků MALDI-TOF hmotnostních spekter vykazoval pík odpovídající oxidované formě Phe-ABAL nejvyšší relativní intenzitu oproti ostatním testovaným látkám a vizualizace aktivity s využitím nativní elektroforézy ukázala nejvyšší intenzitu pásů pro *PsAMADH* po barvení v přítomnosti Phe-ABAL. Do aktivního místa *PsAMADH1* se podařilo namodelovat také Tyr-ABAL (vazebná energie $-6,20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), který byl na základě výše uvedených výsledků druhým nejlepším substrátem tohoto enzymu. Phe-APAL se sice na rozdíl od Tyr-APAL do aktivního místa podařilo namodelovat, obě látky nebyly tak dobrými substráty *PsAMADH*, avšak orientace nebyla vhodná pro přeměnu. Aktivní místo rostlinných ALDH7 je dobře popsáno díky Končítikové *et al.* (2015), kteří vyřešili krystalovou strukturu *ZmALDH7*. Pro *PsALDH7* není dosud k dispozici žádná krystalová struktura, ale tyto 2 enzymy jsou vysoce homologní (UniProt přístupová čísla W8SNM6 pro *ZmALDH7* a P25795 pro *PsALDH7*), sdílí 77 % své identity a jejich aktivní místa jsou tvořena konzervovanými residui. Do aktivního místa *ZmALDH7* se podařilo modelovat Phe-APAL (vazebná energie $-6,20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), který byl na základě výsledků vyhodnocen jako nejlepší substrát obou rekombinantních enzymů a také Phe-ABAL a Tyr-ABAL. Tyr-APAL, který byl druhým nejlepším substrátem, se však do aktivního místa *ZmALDH7* modelovat nepodařilo.

Z pěti studovaných látek byly 4 z nich potvrzeny jako substráty *PsAMADH*, lepšími substráty byly látky odvozené od ABAL, což bylo potvrzeno na základě výše uvedených výsledků. Nejlepším substrátem byl Phe-ABAL. Aromatické látky popsané jako substráty *PsAMADH* (Frömmel *et al.*, 2012) byly ve většině případů lépe přeměňovány *SlAMADH1*, která má širší substrátovou specifitu. Bylo by tedy možné látky otestovat jako substráty tohoto enzymu. Některé připravené látky byly také potvrzeny jako substráty enzymů z rodiny ALDH7. Lépe byly přeměňovány látky odvozené od APAL, nejlépe byl oběma enzymy přeměňován Phe-APAL, což bylo opět potvrzeno na základě výše uvedených výsledků. Byly tedy nalezeny další látky, které jsou přeměňovány enzymy z rodiny ALDH7 i ALDH10, podobně jako je enzymy z obou rodin přeměňován například 4-PCAL. Nedávno bylo zjištěno, že enzym PauC

(=ALDH) z *Pseudomonas aeruginosa*, který působí v dráze odbourávání polyaminů, oxiduje netoxický 3-[(L- γ -glutamyl)amino]propanal (vzniká z glutamylovaných polyaminů) mnohem účinněji než APAL (Cardona-Cardona *et al.*, 2022). Glutamylyace polyaminů je mechanismem, kterým bakterie eliminuje cytotoxické účinky jejich oxidačních produktů. APAL se proto může hromadit a vykazovat toxicitu vůči této bakterii zejména tehdy, je-li aktivita PauC enzymu nízká nebo inhibovaná. Inhibice PauC by se tak mohla využívat jako doplňková antibakteriální terapie při léčbě antibiotiky.

6 ZÁVĚR

Látky připravené peptidovou syntézou, Phe-ABAL, Phe-APAL, Phe-AEAL, Tyr-ABAL a Tyr-APAL byly testovány jako substráty rostlinných ALDH. Jako substráty *PsAMADH*, která byla úspěšně izolována a purifikována ze semenáčků hrachu setého, byly potvrzeny všechny látky kromě Phe-AEAL. Jako substráty rekombinantní *PsALDH7* byly potvrzeny Phe-APAL a Tyr-APAL a jako substráty *ZmALDH7* Phe-APAL, Tyr-APAL a Phe-ABAL. Na základě porovnání výsledků získaných detekcí produktů v reakčních směsích enzymu, koenzymu a substrátu pomocí MALDI-TOF, vizualizací aktivity enzymu se substráty pomocí nativní elektroforézy a změření kinetických parametrů bylo zjištěno, že *PsAMADH* lépe přeměňuje látky odvozené od ABAL, v čele s Phe-ABAL, a *ALDH7* lépe přeměňuje látky odvozené od APAL, v čele s Phe-APAL. Žádná látka nebyla lepším substrátem než přirozené substráty enzymů, i když k Phe-ABAL měl *PsAMADH* srovnatelnou afinitu jako k APAL a Phe-APAL měl s oběma *ALDH7* dokonce nižší K_m než s AASAL. Byla studována také pH optima syntetizovaných látek pro přeměnu s enzymy. Do aktivního místa *PsAMADH* se podařilo modelovat Phe-ABAL a Tyr-ABAL, které byly potvrzeny jako nejlepší substráty *PsAMADH*. Do aktivního místa *ZmALDH7* se podařilo modelovat Phe-APAL, který byl na základě výsledků nejlepším substrátem obou *ALDH7*, a též Phe-ABAL a Tyr-ABAL. Byly tedy nalezeny nové látky vystupující jako substráty enzymů z rodin *ALDH7* a *ALDH10*.

7 LITERATURA

- Arakawa, K., Mizuno, K., Kishitani, S., & Takabe, T. (1992). Immunological Studies of Betaine Aldehyde Dehydrogenase in Barley. *Plant and Cell Physiology*, 33(7), 833-840. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078331>.
- Battaglia, V., DeStefano Shields, C., Murray-Stewart, T., & Robert A. Casero, Jr., R. A. (2013). Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention. *Amino Acids*, 46(3), 511-519. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1529-6>.
- Bouché, N., & Fromm, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*, 9(3), 110-115. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.01.006>.
- Bradbury, L. M. T., Gillies, S. A., Brushett, D. J., Waters, D. L. E., & Henry, R. J. (2008). Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant Molecular Biology*, 68(4-5), 439-449. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9381-x>.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brockner, C., Vasiliou, M., Carpenter, S., Carpenter, C., Zhang, Y., Wang, X., Kotchoni, S. O., Wood, A. J., Kirch, H. -H., Kopečný, D., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2013). Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta*, 237(1), 189-210. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1749-0>.
- Brunk, U. T., Neuzil, J., & Eaton, J. W. (2001). Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Report*, 6(2), 91-97. <https://doi.org/10.1179/135100001101536094>.
- Buffoni, F., & Ignesti, G. (2000). The Copper-Containing Amine Oxidases: Biochemical Aspects and Functional Role. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71(4), 559-564. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3098>.
- Cardona-Cardona, Y. V., Regla, I., Juárez-Díaz, J. A., Carrillo-Campos, J., López-Ortiz, M., Aguilera-Cruz, A., Mújica-Jiménez, C., & Muñoz-Clares, R. A. (2022). The critical role of the aldehyde dehydrogenase PauC in spermine, spermidine, and diaminopropane toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*: Its possible use as a drug target. *The FEBS Journal*, 289(9), 2685-2705. <https://doi.org/10.1111/febs.16277>.
- Chan, C. -L., Wong, J. W. Y., Wong, C. -P., Chan, M. K. L., & Fong, W. -P. (2011). Human antiquitin: Structural and functional studies. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1-3), 165-170. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.12.019>.
- Chang, Y. -F., Ghosh, P., & Rao, V. V. (1990). L-Pipecolic acid metabolism in human liver: L- α -amino adipate δ -semialdehyde oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1038(3), 300-305. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(90\)90241-7](https://doi.org/10.1016/0167-4838(90)90241-7).
- Charlton, A. J., Donarski, J. A., Harrison, M., Jones, S. A., Godward, J., Oehlschlager, S., Arques, J. L., Ambrose, M., Chinoy, C., Mullineaux, P. M., & Domoney, C. (2008). Responses of the pea (*Pisum sativum* L.) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics*, 4(4), 312-327. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0128-0>.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., & Tavliadoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11(2), 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.009>.
- Dzik, J. M. (2014). Evolutionary Roots of Arginase Expression and Regulation. *Frontiers in Immunology*, 5(544), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00544>.
- Elmore, B. O., Bollinger, J. A., & Dooley, D. M. (2002). Human kidney diamine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7(6), 565-579. <https://doi.org/10.1007/s00775-001-0331-1>.
- Fitzgerald, T. L., Waters, D. L. E., & Henry, R. J. (2009). Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biology*, 11(2), 119-130. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00161.x>.
- Frömmel, J., Soral, M., Tylichová, M., Kopečný, D., Demo, G., Wimmerová, M., & Šebela, M. (2012). Plant aminoaldehyde dehydrogenases oxidize a wide range of nitrogenous

- heterocyclic aldehydes. *Amino Acids*, 43(3), 1189-1202. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1174-x>.
- Frömmel, J., Šebela, M., Demo, G., Lenobel, R., Pospíšil, T., Soral, M., & Kopečný, D. (2015). *N*-acyl- ω -aminoaldehydes are efficient substrates of plant aminoaldehyde dehydrogenases. *Amino Acids*, 47(1), 175-187. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1853-5>.
- Frömmel, J., Končítíková, R., Kopečný, D., Soral, M., & Šebela, M. (2019). Oxidation of imidazole- and pyrazole-derived aldehydes by plant aldehyde dehydrogenases from the family 2 and 10. *Chemico-Biological Interactions*, 304, 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.02.008>.
- Gerner, E. W., & Meyskens Jr, F. L. (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 781-792. <https://doi.org/10.1038/nrc1454>.
- Guo, Z., Zhang, Q., Zou, H., Guo, B., & Ni, J. (2002). A Method for the Analysis of Low-Mass Molecules by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(7), 1637-1641. <https://doi.org/10.1021/ac010979m>.
- Handa, A. K., Tahira Fatima, F., & Mattoo, A. K. (2018). Polyamines: bio-molecules with diverse functions in plant and human health and disease. *Frontiers in Chemistry*, 6(10), 1-18. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00010>.
- Hempel, J., Perozich, J., Chapman, T., Rose, J., Boesch, J. S., Liu, Z. -J., Lindahl, R., & Wang, B. -C. (1999). Aldehyde Dehydrogenase Catalytic Mechanism. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 7, 53-59. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4735-8_7.
- Hibino, T., Meng, Y. -L., Kawamitsu, Y., Uehara, N., Matsuda, N., Tanaka, Y., Ishikawa, H., Baba, S., Takabe, T., Wada, K., Ishii, T., & Takabe, T. (2001). Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine-aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Plant Molecular Biology*, 45(3), 353-363. <https://doi.org/10.1023/A:1006497113323>.
- Ivanova, S., Botchkina, G. I., Al-Abed, Y., Meistrell, M., Batliwalla, F., Dubinsky, J. M., Iadecola, C., Wang, H., Gregersen, P. K., Eaton, J. W., & Tracey, K. J. (1998). Cerebral Ischemia Enhances Polyamine Oxidation: Identification of Enzymatically Formed 3-Aminopropanal as an Endogenous Mediator of Neuronal and Glial Cell Death. *Journal of Experimental Medicine*, 188(2), 327-340. <https://doi.org/10.1084/jem.188.2.327>.
- Johansson, K., Ramaswamy, S., Eklund, H., El-Ahmad, M., Hjelmqvist, L., & Jörnvall, H. (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Science*, 7(10), 2106-2117. <https://doi.org/10.1002/pro.5560071007>.
- Kågedal, K., Johansson, U., & Öllinger, K. (2001). The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *The FASEB Journal*, 15(9), 1592-1594. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0708fje>.
- Kimes, B. W., & Morris, D. R. (1971a). Preparation and stability of oxidized polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 228(1), 223-234. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(71\)90562-4](https://doi.org/10.1016/0005-2787(71)90562-4).
- Kimes, B. W., & Morris, D. R. (1971b). Inhibition of nucleic acid and protein synthesis in *Escherichia coli* by oxidized polyamines and acrolein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 228(1), 235-244. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(71\)90563-6](https://doi.org/10.1016/0005-2787(71)90563-6).
- Kinnersley, A. M., & Turano, F. J. (2000). Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Plant Responses to Stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(6), 479-509. <https://doi.org/10.1080/07352680091139277>.
- Končítíková, R., Vigouroux, A., Kopečná, M., Andree, T., Bartoš, J., Šebela, M., Moréra, S., & Kopečný, D. (2015). Role and structural characterization of plant aldehyde dehydrogenases from family 2 and family 7. *Biochemical Journal*, 468(1), 109-123. <https://doi.org/10.1042/BJ20150009>.
- Kopečný, D., Tylichová, M., Snegaroff, J., Popelková, H., & Šebela, M. (2011). Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *FEBS Journal*, 278(17), 3130-3139. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08239.x>.

- Kopečný, D., Končítíková, R., Tylichová, M., Vigouroux, A., Moskalíková, H., Soral, M., Šebela, M., & Moréra, S. (2013). Plant ALDH10 Family. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9491-9507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.443952>.
- Kotchoni, S. O., Kuhns, C., Ditzer, A., Kirch, H. -H., & Bartels, D. (2006). Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, Cell and Environment*, 29(6), 1033-1048. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01458.x>.
- Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T., & Takahashi, Y. (2007). Advances in polyamine research in 2007. *Journal of Plant Research*, 120(3), 345-350. <https://doi.org/10.1007/s10265-007-0074-3>.
- Lee, J., Michael, A. J., Martynowski, D., Goldsmith, E. J., & Phillips, M. A. (2007). Phylogenetic Diversity and the Structural Basis of Substrate Specificity in the β/α -Barrel Fold Basic Amino Acid Decarboxylases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 27115-27125. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704066200>.
- Lee, P., Kuhl, W., Gelbart, T., Kamimura, T., West, C., & Beutler, E. (1994). Homology between a Human Protein and a Protein of the Green Garden Pea. *Genomics*, 21(2), 371-378. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1279>.
- Li, W., Yuan, X. -M., Ivanova, S., Tracey, K. J., Eaton, J. W., & Brunk, U. T. (2003). 3-Aminopropanal, formed during cerebral ischaemia, is a potent lysosomotropic neurotoxin. *Biochemical Journal*, 371(2), 429-436. <https://doi.org/10.1042/bj20021520>.
- Markovitz, P. J., Chuang, D. T., & Cox, R. P. (1984). Familial hyperlysinemias. Purification and characterization of the bifunctional amino adipic semialdehyde synthase with lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase activities. *Journal of Biological Chemistry*, 259(19), 11643-11646. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)71252-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)71252-4).
- Mihalik, S. J., & Rhead, W. J. (1991). Species variation in organellar location and activity of L-pipecolic acid oxidation in mammals. *Journal of Comparative Physiology B*, 160(6), 671-675. <https://doi.org/10.1007/BF00571266>.
- Mills, P. B., Struys, E., Jakobs, C., Plecko, B., Baxter, P., Baumgartner, M., Willemsen, M. A. A. P., Omran, H., Tacke, U., Uhlenberg, B., Weschke, B., & Clayton, P. T. (2006). Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nature Medicine*, 12(3), 307-309. <https://doi.org/10.1038/nm1366>.
- Moinard, C., Cynober, L., & de Bandt, J. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24(2), 184-197. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.11.001>.
- Murray-Stewart, T., Wang, Y., Goodwin, A., Hacker, A., Meeker, A., & Casero Jr, R. A. (2008). Nuclear localization of human spermine oxidase isoforms – possible implications in drug response and disease etiology. *FEBS Journal*, 275(11), 2795-2806. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06419.x>.
- PDB 1IWJ. <https://www.rcsb.org/structure/1IWJ>. (10. 4. 2023).
- PDB 1IWK. <https://www.rcsb.org/structure/1IWK>. (10. 4. 2023).
- Pegg, A. E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, 61(9), 880-894. <https://doi.org/10.1002/iub.230>.
- Pegg, A. E. (2013). Toxicity of Polyamines and Their Metabolic Products. *Chemical Research in Toxicology*, 26(12), 1782-1800. <https://doi.org/10.1021/tx400316s>.
- Pegg, A. E., Xiong, H., Feith, D. J., & Shantz, L. M. (1998). S-Adenosylmethionine decarboxylase: structure, function and regulation by polyamines. *Biochemical Society Transactions*, 26(4), 580-586. <https://doi.org/10.1042/bst0260580>.
- Peluso, G., Barbarisi, A., Savica, V., Reda, E., Nicolai, R., Benatti, P., & Calvani, M. (2000). Carnitine: An Osmolyte That Plays a Metabolic Role. *Journal of Cellular Biochemistry*, 80(1), 1-10. [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20010101\)80:1<1::AID-JCB10>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20010101)80:1<1::AID-JCB10>3.0.CO;2-W).
- Raman, S. B., & Rathinasabapathi, B. (2004). Pantothenate synthesis in plants. *Plant Science*, 167(5), 961-968. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.06.019>.
- Rao, V. V., Tsai, M. J., Pan, X., & Chang, Y. -F. (1993). L-Pipecolic acid oxidation in rat: subcellular localization and developmental study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -

- Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1164(1), 29-35. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90108-4](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90108-4).
- Sagar, N. A., Tarafdar, S., Agarwal, S., Tarafdar, A., & Sharma, S. (2021). Polyamines: Functions, Metabolism, and Role in Human Disease Management. *Medical Sciences*, 9(2), 1-21. <https://doi.org/10.3390/medsci9020044>.
- Sánchez-Linares, I., Pérez-Sánchez, H., Cecilia, J. M., & García, J. M. (2012). High-Throughput parallel blind Virtual Screening using BINDSURF. *BMC Bioinformatics*, 13(S14). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S14-S13>.
- Schipper, R. G., Penning, L. C., & Verhofstad, A. A. J. (2000). Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Seminars in Cancer Biology*, 10(1), 55-68. <https://doi.org/10.1006/scbi.2000.0308>.
- Schüttelkopf, A. W., & van Aalten, D. M. F. (2004). PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(8), 1355-1363. <https://doi.org/10.1107/S0907444904011679>.
- Seiler, N. (1995). Chapter 33 Polyamine oxidase, properties and functions. *Current Neurochemical and Pharmacological Aspects of Biogenic Amines – Their Function, Oxidative Deamination and Inhibition*, 106, 333-344. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61229-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61229-7).
- Seiler, N. (2000). Oxidation of Polyamines and Brain Injury. *Neurochemical Research*, 25(4), 471-490. <https://doi.org/10.1023/A:1007508008731>.
- Seiler, N. (2004). Catabolism of polyamines. *Amino Acids*, 26(3). <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0070-z>.
- Sessa, A., & Perin, A. (1994). Diamine oxidase in relation to diamine and polyamine metabolism. *Agents and Actions*, 43(1-2), 69-77. <https://doi.org/10.1007/BF02005768>.
- Sharmin, S., Sakata, K., Kashiwagi, K., Ueda, S., Iwasaki, S., Shirahata, A., & Igarashi, K. (2001). Polyamine Cytotoxicity in the Presence of Bovine Serum Amine Oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(1), 228-235. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4569>.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H., & Hurley, T. D. (1997). Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure*, 5(5), 701-711. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00224-4).
- Stiti, N., Missihoun, T. D., Kotchoni, S. O., Kirch, H. -H., & Bartels, D. (2011). Aldehyde dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: biochemical requirements, metabolic pathways, and functional analysis: Biochemical Requirements, Metabolic Pathways, and Functional Analysis. *Frontiers in Plant Science*, 2(65), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00065>.
- Šebela, M., Brauner, F., Radová, A., Jacobsen, S., Havliš, J., Galuszka, P., & Peč, P. (2000). Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1480(1-2), 329-341. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00086-8).
- Šebela, M., Luhová, L., Brauner, F., Galuszka, P., Radová, A., & Peč, P. (2001). Light microscopic localisation of aminoaldehyde dehydrogenase activity in plant tissues using nitroblue tetrazolium-based staining method. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(10), 831-839. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01304-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01304-3).
- Tabor, C. W., Tabor, H., & Bachrach, U. (1964). Identification of the Aminoaldehydes Produced by the Oxidation of Spermine and Spermidine with Purified Plasma Amine Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2194-2203. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)82220-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)82220-0).
- Tang, W. -K., Chan, C. -B., Cheng, C. H. K., & Fong, W. -P. (2005). Seabream antiquitin: Molecular cloning, tissue distribution, subcellular localization and functional expression. *FEBS Letters*, 579(17), 3759-3764. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.070>.

- Tylichová, M., Kopečný, D., Moréra, S., Briozzo, P., Lenobel, R., Snégaroff, J., & Šebela, M. (2010). Structural and Functional Characterization of Plant Aminoaldehyde Dehydrogenase from *Pisum sativum* with a Broad Specificity for Natural and Synthetic Aminoaldehydes. *Journal of Molecular Biology*, 396(4), 870-882. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.015>.
- UniProt C0PHD8. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/C0PHD8/entry> (29. 12. 2022).
- UniProt P25795. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P25795/entry> (29. 12. 2022).
- UniProt Q8VWZ1. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8VWZ1/entry> (29. 12. 2022).
- UniProt Q93YB2. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q93YB2/entry> (29. 12. 2022).
- UniProt W8SNM6. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/W8SNM6/entry> (28. 3. 2023).
- Wong, J. W. -Y., Chan, C. -L., Tang, W. -K., Cheng, C. H. -K., & Fong, W. -P. (2009). Is antiquitin a mitochondrial enzyme? *Journal of Cellular Biochemistry*, 109(1), 74-81. <https://doi.org/10.1002/jcb.22381>.
- Wymore, T., Hempel, J., Cho, S. S., MacKerell, A. D., Nicholas, H. B., & Deerfield, D. W. (2004). Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenase and mechanism of nucleophile activation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 57(4), 758-771. <https://doi.org/10.1002/prot.20256>.
- Yoshida, M., Mikami, T., Higashi, K., Saiki, R., Mizoi, M., Fukuda, K., Nakamura, T., Ishii, I., Nishimura, K., Toida, T., Tomitori, H., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2012). Inverse correlation between stroke and urinary 3-hydroxypropyl mercapturic acid, an acrolein-glutathione metabolite. *Clinica Chimica Acta*, 413(7-8), 753-759. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.01.020>.
- Yu, Z., Li, W., & Brunk, U. T. (2003). 3-Aminopropanal is a lysosomotropic aldehyde that causes oxidative stress and apoptosis by rupturing lysosomes. *APMIS*, 111(6), 643-652. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.1110607.x>.
- Yuan, Q., Ray, R. M., Viar, M. J., & Johnson, L. R. (2001). Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(1), 130-138. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.1.G130>.
- Zhao, M., Antunes, F., Eaton, J. W., & Brunk, U. T. (2003). Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome *c* release and apoptosis. *European Journal of Biochemistry*, 270(18), 3778-3786. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03765.x>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AASAL	α -aminoadipátseміaldehyd
ABAL	4-aminobutanal
ABC transportér	„ATP-binding cassette“ transportér
3-Br-BzAL	3-bromobenzaldehyd
ACAPAL	3-acetamidopropanal
ADC	arginindekarboxylasa [L-argininkarboxylyasa (agmatin tvořící); EC 4.1.1.19]
Adip-APAL	<i>N</i> -adipoyl-3-aminopropanal
AIH	agmatin-iminohydrolasa (EC 3.5.3.12)
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALDH2	aldehyddehydrogenasy z rodiny 2
ALDH7	aldehyddehydrogenasy z rodiny 7 [(<i>S</i>)-2-amino-6-oxohexanoát:NAD(P) ⁺ -6-oxidoreduktasa; EC 1.2.1.31]
ALDH10	aldehyddehydrogenasy z rodiny 10
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa (4-aminobutanal:NAD ⁺ -1-oxidoreduktasa; EC 1.2.1.19)
APAL	3-aminopropanal
<i>At</i> ALDH7	aldehyddehydrogenasa 7 z huseníčku rolního (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
BADH	betainaldehyddehydrogenasa (betainaldehyd:NAD ⁺ -oxidoreduktasa; EC 1.2.1.8)
BAL	betainaldehyd
CPA	<i>N</i> -karbamoylputrescin-amidohydrolasa (EC 3.5.1.53)
DAO	Cu-diaminoxidasa [histamin:O ₂ -oxidoreduktasa (deaminující); EC 1.4.3.22]
2,6-diCl-4-PCAL	2,6-dichloro-4-pyridinkarbaldehyd
FAD	flavinadenindinukleotid
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GB	glycinbetain
GBAL	4-guanidinobutanal
GOL	glycerol
hALDH7	lidská aldehyddehydrogenasa z rodiny 7
MASAL	methylester- α -aminoadipátseміaldehydu

ODC	ornithindekarboxylasa [L-ornithinkarboxylyasa (putrescin tvořící); EC 4.1.1.17]
<i>Os</i> ALDH7	aldehyddehydrogenasa 7 z rýže seté (<i>Oryza sativa</i>)
PAO	polyaminoxidasa živočišná [<i>N</i> ¹ -acetylpolyamin:O ₂ -oxidoreduktasa (3-acetamidopropanal tvořící); EC 1.5.3.13] rostlinná [spermidin:O ₂ -oxidoreduktasa (1,3-propandiamin tvořící); EC 1.5.3.14]
PCAL	pyridinkarbaldehyd
2-PCAL	2-pyridinkarbaldehyd
3-PCAL	3-pyridinkarbaldehyd
4-PCAL	4-pyridinkarbaldehyd
3-PMet-ABAL	3-pyridinylmethylaminobutanal
4-PMet-AEAL	4-pyridinylmethylaminoethanal
P2PAL	3-pyridin-2-yl-propanal
P3PAL	3-pyridin-3-yl-propanal
P4PAL	3-pyridin-4-yl-propanal
Propi-ABAL	<i>N</i> -propionyl-4-aminobutanal
Propi-APAL	<i>N</i> -propionyl-3-aminopropanal
<i>Ps</i> ALDH7	aldehyddehydrogenasa 7 z hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>)
<i>Ps</i> AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa z hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>)
Pu-AEAL	<i>N</i> -(2,2-dimethoxyethyl)-9 <i>H</i> -purin-6-amin
PUT	putrescin
SAM	<i>S</i> -adenosylmethionin
SAMDC	<i>S</i> -adenosylmethionindekarboxylasa [S-adenosyl-L-methioninkarboxylyasa (S-adenosyl-3-(methylsulfanyl)propylamin tvořící); EC 4.1.1.50]
SAO	sérová Cu-aminoxidasa [primární-amin:O ₂ -oxidoreduktasa (deaminující); EC 1.4.3.21]
<i>Sl</i> AMADH1	aminoaldehyddehydrogenasa 1 z rajčete jedlého (<i>Solanum lycopersicum</i>)
SLC transportér	„solute carrier“ transportér
SMO	sperminoxidasa (spermidin:O ₂ -oxidoreduktasa; EC 1.5.3.16)
SPD	spermidin

SPM	spermin
SSAT	cytosolická diaminacetyltransferasa (acetyl-CoA:alkan- α,ω -diamin- <i>N</i> -acetyltransferasa; EC 2.3.1.57)
TMABAL	4-trimethylaminobutanal
Valer-ABAL	<i>N</i> -valeryl-4-aminobutanal
Valer-APAL	<i>N</i> -valeryl-3-aminopropanal
<i>Zm</i> ALDH7	aldehyddehydrogenasa 7 z kukuřice seté (<i>Zea mays</i>)
<i>Zm</i> AMADH2	aminoaldehyddehydrogenasa 2 z kukuřice seté (<i>Zea mays</i>)