

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium aktivního místa aldehyddehydrogenasy
z kukuřice podílející se na katabolismu prolinu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jarmila Kajánková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radka Končítíková, Ph.D.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské 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 *podpis studenta*

Mé poděkování patří především Mgr. Radce Končítkové, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, objasnění principů, zodpovězení všech mých dotazů, cenné rady při práci, čas a trpělivost. Chtěla bych také poděkovat i ostatním pracovníkům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky za vytvoření příjemného prostředí při práci a rady v laboratoři.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jarmila Kajánková
Název práce	Studium aktivního místa aldehyddehydrogenasy z kukuřice podílejí se na katabolismu prolinu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky
Vedoucí práce	Mgr. Radka Končítíková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt: Tato bakalářská práce se zabývá purifikací a charakterizací kukuřičné aldehyddehydrogenasy z rodiny 12 (ZmALDH12) a porovnáním jejích vlastností se třemi jejími mutanty E205A, K329A a C330A. Všechny čtyři rekombinantní proteiny byly exprimovány v *Escherichia coli* a chromatograficky purifikovány. Bylo stanoveno pH optimum, termostabilita, substrátová specificita a kinetické parametry K_m , V_{lim} a poměr V_{lim}/K_m . Kinetické parametry byly stanovovány pro všechny čtyři enzymy se substráty glutamát- γ -semialdehyd (GSAL) a glutarátsemialdehyd (GRSAL). Na základě poměru V_{lim}/K_m bylo zjištěno, že přirozená ZmALDH12 preferuje jako substrát GSAL, proto by měla být ALDH12 nazývána jako glutamát- γ -semialdehyddehydrogenasa (GSALDH). Analýza kinetických dat poukazuje na to, že residuum E205 hraje zřejmě významnou roli ve vazbě aminoskupiny substrátu GSAL, residuum K329 pravděpodobně interaguje s karboxylovou skupinou substrátu a residuum C330 je katalytickým centrem enzymu.

Klíčová slova	kukuřice, aldehyddehydrogenasa, cystein, glutamát, lysin, termostabilita
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jarmila Kajánková
Title	Aldehyde dehydrogenase involved in proline catabolism
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics
Supervisor	Mgr. Radka Končítíková, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract: This bachelor thesis deals with purification and characterization of plant aldehyde dehydrogenase 12 from maize (*Zea mays*). ZmALDH12 and its three mutant variants E205A, K329A and C330A were expressed in *Escherichia coli* cells and purified by affinity chromatography and gel filtration. Optimal pH, thermo-stability, substrate specificity and kinetic parameters (K_m , V_{lim} and V_{lim}/K_m ratio) were determined. Kinetic parameters were measured with all four recombinant proteins for glutamate γ -semialdehyde (GSAL) a glutarate semialdehyde (GRSAL). It was found that wild-type ZmALDH12 prefers GSAL as a substrate. Therefore, this family should be named as glutamate γ -semialdehyde dehydrogenase (GSALDH). Analysis of the kinetic data suggests that the E205 residue appears to play a significant role in binding of the amino group of GSAL, the K329 residue probably interacts with the carboxyl group of the substrate. It was also proven that C330 residuum is an essential catalytic center of the enzyme.

Keywords	Corn, aldehyde dehydrogenase, cysteine, glutamate, lysine, thermostability
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod	8
2 Současný stav řešené problematiky	9
2.1 Metabolismus prolinu	9
2.1.1 Aminokyselina prolin	9
2.1.2 Metabolismus prolinu	9
2.1.3 Akumulace prolinu jako odpověď na stresové podmínky	11
2.2 Metabolismus argininu v rostlinách	12
2.2.1 Propojení metabolismu prolinu a argininu	14
2.3 Aldehyddehydrogenasová nadrodina	15
2.3.1 Aldehyddehydrogenasová rodina 4	15
2.3.2 Aldehyddehydrogenasová rodina 12	16
2.3.3 Geny aldehyddehydrogenas rodiny 4 a 12	17
2.3.4 Substrátová specifická aldehyddehydrogenas rodin 4 a 12	17
2.3.5 Kinetické vlastnosti aldehyddehydrogenas rodin 4 a 12	17
2.3.6 Reakční mechanismus	19
2.3.7 Struktura aldehyddehydrogenas rodin 4 a 12	21
2.3.8 Bifunkční enzym bakterií pro degradaci prolinu	23
3 Experimentální část	25
3.1 Materiál a chemikálie	25
3.1.1 Biologický materiál	25
3.1.2 Použité chemikálie	25
3.2 Přístrojové vybavení	27
3.3 Použité programy	27
3.4 Metody	27
3.4.1 Expresse rekombinantních proteinů v <i>Escherichia coli</i>	27
3.4.2 Extrakce	28
3.4.3 Purifikace	28
3.4.4 Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou	29
3.4.5 SDS-PAGE	29
3.4.6 Gelová permeační chromatografie	30
3.4.7 Stanovení pH optima	30
3.4.8 Stanovení teplotní stability pomocí cirkulárního dichroismu	30
3.4.9 Stanovení substrátové specifity	31
3.4.10 Stanovení aktivity a kinetických parametrů	31
4 Výsledky	34
4.1 Optimalizace exprese	34
4.2 Gelová permeační chromatografie	35
4.3 pH optimum	36
4.4 Teplotní stabilita	37
4.5 Substrátová specifická	38
4.6 Kinetická měření	39
5 Diskuze	41
6 Závěr	44
7 Literatura	45
8 Seznam použitých zkratk	50

Cíle práce

1. Vypracování rešerše.
2. Expres aldehyddehydrogenasy z rodiny 12 ze *Zea mays* (ZmALDH12) a jejích tří mutantů (C330A, E205A a K329A) v *Escherichia coli*.
3. Purifikace rekombinantních proteinů pomocí afinitní a gelové permeační chromatografie.
4. Charakterizace ZmALDH12.
 - Určení pH optima.
 - Stanovení teplotní stability.
 - Určení substrátové specificity.
 - Stanovení kinetických parametrů (K_m , V_{lim}).

1 ÚVOD

Prolin je v rostlinách akumulován v odpovědi na různé formy environmentálního stresu, například vysokou salinitu, sucho či přítomnost patogenů (Yoshida *et al.*, 1995; Schat *et al.*, 1997; Fabro *et al.*, 2004). Množství prolinu může být při těchto mechanismech regulováno expresí genů kódujících enzymy biosyntetických a degradačních drah. Druhý krok degradační dráhy je katabolizován mitochondriálním enzymem pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasou (P5CDH; EC 1.5.1.12), která se podílí i na odbourávání argininu (Voet *et al.*, 2006).

P5CDH patří mezi aldehyddehydrogenasy (ALDH), neboť jejím přirozeným substrátem je glutamát- γ -semiladehyd (GSAL), který je v roztoku v rovnováze s Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátem (P5C). Rostlinné P5CDH patří do aldehyddehydrogenasové rodiny 12 (ALDH12) a P5CDH z bakterií, hub a živočichů jsou řazeny do aldehyddehydrogenasové rodiny 4 (ALDH4) (Sophos *et al.*, 2001; Inagaki *et al.* 2006; Voet *et al.*, 2006; Brocker *et al.*, 2013). Jelikož obě rodiny preferenčně odbourávají GSAL, měly by se nazývat glutamát- γ -semiladehyddehydrogenasy.

ALDH4/ALDH12 preferují jako substráty pětiuhlíkaté řetězce a semialdehydy upřednostňují před alifatickými řetězci; jako koenzym využívají NAD^+ (Forte-McRobbie a Pietruszko, 1985; Pemberton a Tanner, 2013; Forlani *et al.*, 2015). Podjednotky samotných enzymů se skládávají ze tří domén, a to katalytické, koenzym vazebné a oligomerizační (Srivastava *et al.*, 2012).

Mechanismus reakce katalyzované ALDH4/ALDH12 je pravděpodobně podobný mechanismu ostatních ALDH. Do koenzym vazebné domény se naváže NAD(P)^+ , karboxylová skupina substrátu je napadena nukleofilním atomem síry cysteinového residua a dochází k redukci NAD(P)^+ transferem atomů vodíku ze substrátu. Produkty reakce, karboxylová kyselina a NAD(P)H , na závěr oddisociují z aktivního místa (Jones *et al.*, 1987; Farrés *et al.*, 1995; Perez-Miller a Hurley, 2003; Riveros-Rosas *et al.*, 2013). U různých ALDH byly v aktivním místě dokázány interakce s různými residui (Inagaki *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2012).

V práci bylo pracováno s mutantními enzymy ZmALDH12 bez aminokyselin cysteinu, glutamátu nebo lysinu v aktivním místě pro ověření jejich nezbytnosti při katalýze.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Metabolismus prolinu

2.1.1 Aminokyselina prolin

L-prolin je proteinogenní, pro člověka neesenciální aminokyselina. Prolin oproti ostatním aminokyselinám obsahuje sekundární aminoskupinu; jeho postranní řetězec je cyklický. Prolin se nenachází v α -helixu, je ale významně zastoupen ve speciálních helixech (například kolagenu) a β -ohybech. Prolin se v rostlinách akumuluje spolu s hydroxyprolinem jako odpověď na různé formy stresu (Kodíček *et al.*, 2015).

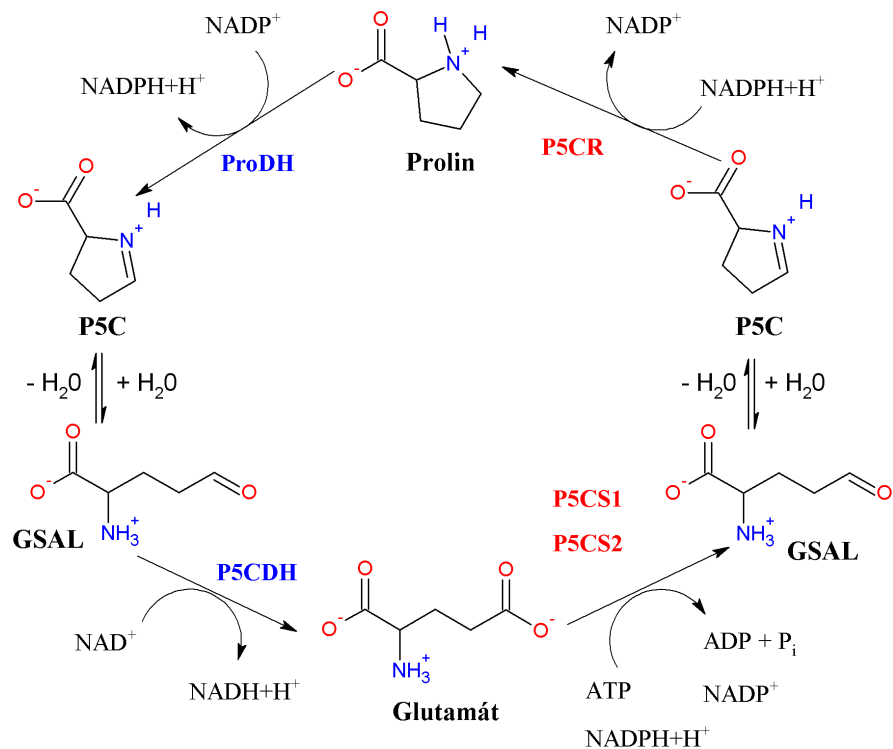
Prolin je nepolární aminokyselina, v elektroneutrálním stavu má hmotnost 97,1 Da. Tvoří průměrně 5,2 % všech proteinů. Disociační konstanta -COOH skupiny pK_1 je 1,95; disociační konstanta -NH₂ skupiny pK_2 je 10,64 (Voet *et al.*, 2006).

2.1.2 Metabolismus prolinu

Prolin je v buňkách biosyntetizován z aminokyseliny glutamátu (Obr. 1). γ -karboxylová skupina glutamátu je přeměněna za rozštěpení ATP na acylfosfátový intermediát, který je následně redukován pomocí enzymu pyrrolin-5-karboxylátsyntasy (P5CS; EC 2.7.2.11, 1.2.1.41) s kofaktorem NADPH+H⁺ na GSAL. GSAL se spontánně cyklizuje za odštěpení molekuly vody na P5C který je biokatalýzou enzymem Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátreduktasou (P5CR, EC 1.5.1.2) s kofaktorem NADPH+H⁺ přeměněn na prolin (Voet *et al.*, 2006).

P5CS je klíčový enzym biosyntézy prolinu, určující její rychlost; je to bifunkční enzym s γ -glutamylkinasovou a GSA-dehydrogenasovou aktivitou. Biosyntéza může být zpomalena zpětnovazebnou alosterickou inhibicí prolinem (Hu *et al.*, 1992). Během vodního stresu schopnost regulace zpětnovazebnou inhibicí prolinem klesá díky konformačním změnám vazebných míst, což vede ke ztrátě schopnosti prolinu alostericky inhibovat enzym. Při salinitním stresu se rychleji exprimují geny pro biosyntézu P5CS (Zhang *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 2000; Choudhary *et al.*, 2005).

V rostlinách jsou přítomny dva typy P5CS, a to P5CS1 a P5CS2. Genová exprese P5CS1 je indukována zejména při osmotickém stresu, P5CS2 je indukována spíše stresem z chladu či v přítomnosti patogenních organismů (Fabro *et al.*, 2004).

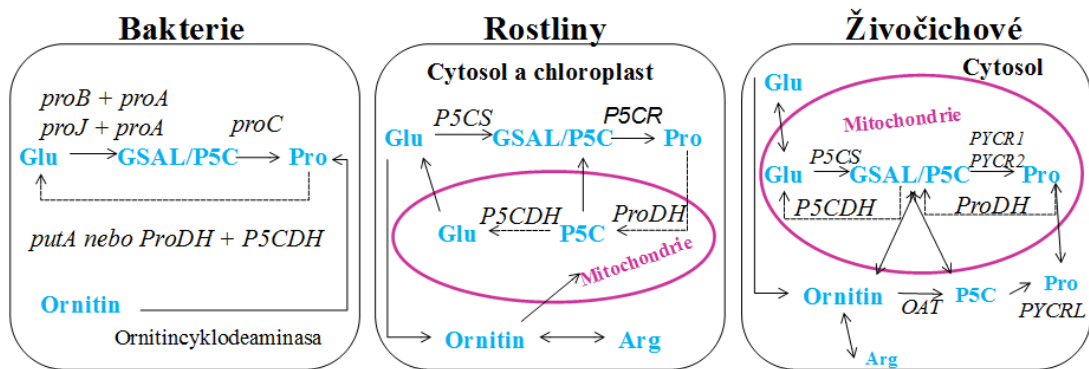


Obr. 1 Schéma metabolismu prolinu. Prolin je za běžných podmínek biosyntetizován z glutamátu. Červeně jsou znázorněny cytoplasmatické enzymy, modře mitochondriální enzymy. Vysvětlivky: GSAL = glutamát- γ -semiladehyd; P5C = Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylát; P5CDH = Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa; ProDH = prolindehydrogenasa. Obrázek vytvořen podle Voeta *et al.* (2006) a Forlaniho *et al.* (2015).

Degradace prolinu začíná jeho přeměnou prolindehydrogenasou (ProDH; EC 1.5.5.2) na P5C za současného přenosu dvou atomů vodíku NADP⁺ za vzniku NADPH+H⁺. P5C je Schiffova báze GSAL a v roztoku se nachází ve vzájemné rovnováze. GSAL je P5CDH s kofaktorem NAD⁺ přeměněn na glutamát (Murray *et al.*, 2012).

Klíčovým enzymem katabolismu je ProDH, jejíž transkripce je vyšší při zvýšeném obsahu prolinu v rostlině. Během osmotického stresu zvýšený obsah prolinu neaktivuje expresi ProDH, čímž je umožněna akumulace prolinu (Fabro *et al.*, 2004). Při salinitním stresu bylo dokázáno i zpomalení exprese genů pro biosyntézu P5CR (Yoshida *et al.*, 1995).

ProDH je vázaná na vnitřní mitochondriální membránu a pravděpodobně předává elektrony do elektronového transportního řetězce, její aktivní místo je natočeno směrem do matrixu mitochondrie. P5CDH je lokalizována v matrixu (Kiyosue *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996).



Obr. 2 Dráhy syntézy a degradace prolinu jsou konzervovány u bakterií, rostlin a živočichů. Syntéza je znázorněna souvislými čarami, degradace pak tečkovanými čarami. GSAL = glutamát- γ -semiladehyd; P5C = Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylát; P5CDH = Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa; P5CS = Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátsyntasa; P5CR = Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátreduktasa; proA = enterobakteriální γ -glutamylfosfátreduktasa; proB = enterobakteriální glutamátkinasa; proC = enterobakteriální Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátreduktasa; ProDH = prolindehydrogenasa; proJ = enterobakteriální γ -glutamylfosfátreduktasa; putA = bifunkční enzym s Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasovou a prolindehydrogenasovou aktivitou; PYCR1 = mitochondriální Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátreduktasa; PYCR2 = mitochondriální Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátreduktasa; PYCRL = cytoplazmatická Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátreduktasa. Převzato a upraveno podle Fichmana et al. (2015).

Rozdíly v biosyntéze a degradaci prolinu u bakterií, rostlin a živočichů jsou znázorněny na Obr. 2.

2.1.3 Akumulace prolinu jako odpověď na stresové podmínky

Rostliny jsou vystaveny mnoha typům environmentálních stresových podmínek (sucho, salinita atd.), což může mít za následek nižší výnosy plodin. Prolin je kompatibilní osmolyt (stejně jako manitol nebo betain) a jeho akumulací se snižuje hladina stresu, neboť se podílí na odstraňování reaktivních forem kyslíku (ROS); úroveň prolinu je zvýšena indukcí P5CR (Heldt *et al.*, 2011). Akumulace prolinu vede také k ochraně enzymů (Solomon *et al.*, 1994) a ochraně buněčných membrán (van Rensburg *et al.*, 1993).

V *Arabidopsis thaliana* byla potvrzena zvýšená exprese genů pro biosyntézu P5CS při dehydrataci, po rehydrataci se úroveň exprese genů pro biosyntézu vrátila na úroveň exprese v rostlinách nevystavených dehydratačním podmínkám. V *Arabidopsis thaliana* byla potvrzena vyšší exprese genů pro biosyntézu P5CS také při vystavení rostliny endogenní kyselině abscisové a lehké zvýšení exprese bylo patrné při vystavení chladu.

Při vystavení rostliny vyšším teplotám nebyla vyšší exprese detekována (Yoshiba *et al.*, 1995). Akumulace prolinu pomáhá udržovat vysoký relativní obsah vody v buňkách, což je nezbytné pro zachování rostlinného růstu a buněčných funkcí. Sucho tolerující ekotypy *Oryza sativa* měly vyšší relativní obsah vody, vyšší obsah prolinu a vyšší aktivitu P5CS než ekotypy citlivé na sucho (Choudhary *et al.*, 2005).

Výhonky rýže a hořčice, které byly vystaveny UV radiaci, kumulovaly ROS, což mělo za následek zpomalení rostlinného růstu a metabolismu. UV radiace zvyšuje lipidovou peroxidaci, čímž se zvyšuje množství ROS. Na to buňky reagují zvýšením množství prolinu, jenž dokáže množství ROS snížit (Pardha Saradhi *et al.*, 1995).

Akumulace prolinu byla prokázána také v souvislosti s těžkými kovy, konkrétně mědí, kadmiumem a zinkem (Schat *et al.*, 1997). Kadmium způsobuje škody v rostlinném těle již při nízkých koncentracích, rostliny jej akumulují zejména v kořenech (Yang *et al.*, 2009).

Vyšší biosyntéza prolinu byla v *Arabidopsis thaliana* dokázána v přítomnosti rostlinných patogenů, akumulace prolinu byla prokázána po 12 hodinách vystavení rostliny virulentní bakterii (Fabro *et al.*, 2004).

Akumulace prolinu v rostlinných pletivech není spojena pouze se stresovými podmínkami. *Arabidopsis thaliana* akumuluje prolin v reprodukčních orgánech, kde tvoří 17–26 % všech obsažených aminokyselin; obsah prolinu ve vegetativních orgánech je 1–3 %. Prolin byl akumulován i při nízkém obsahu vody v orgánech (Chiang a Dandekar, 1995). V rajčeti byla také pozorována významná akumulace prolinu v reprodukčních orgánech jako květ, semeno a tyčinka. V semenech tvoří prolin 70 % všech aminokyselin, kdežto ve vegetativních orgánech nejvýš 5 %. Úloha prolinu v reprodukčních orgánech pravděpodobně spočívá v ochraně proti dehydrataci při vývoji semena a v možnosti posloužit jako zdroj energie (Schwacke *et al.*, 1999).

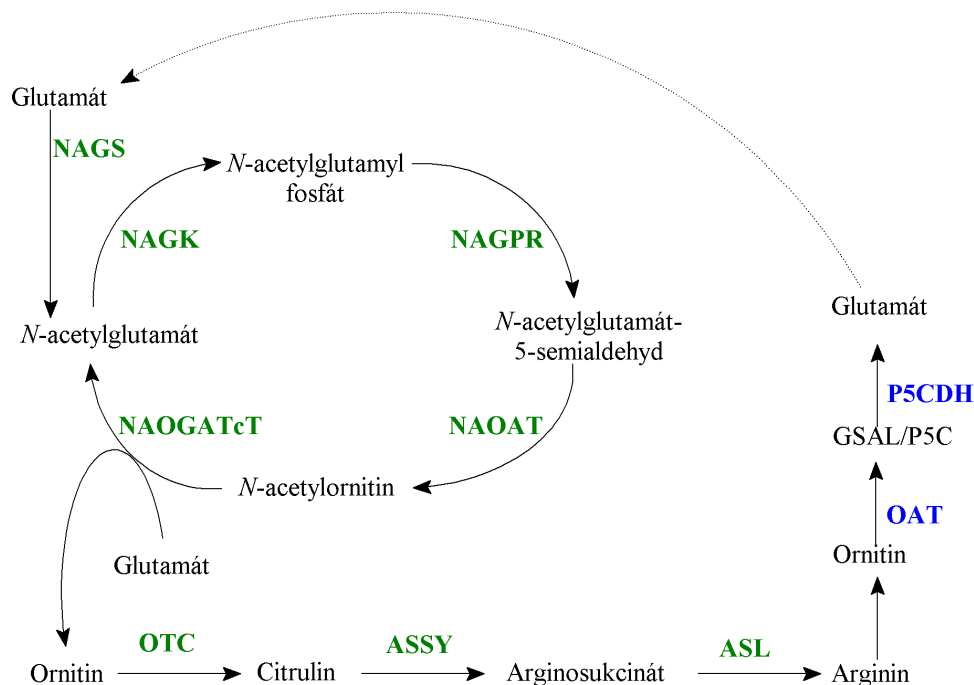
2.2 Metabolismus argininu v rostlinách

Arginin představuje důležitý zdroj dusíku v rostlinném těle a patří mezi nejvíce zastoupené aminokyseliny při klíčení semen (King a Gifford, 1997). Metabolismus argininu je regulován podle obsahu živin v rostlině. Nedostatek cukrů způsobuje zvýšení aktivity arginasy (EC 3.5.3.1), ureasy (EC 3.5.1.5) a arginindekarboxylasy (EC 4.1.1.19) (Borek *et al.*, 2001).

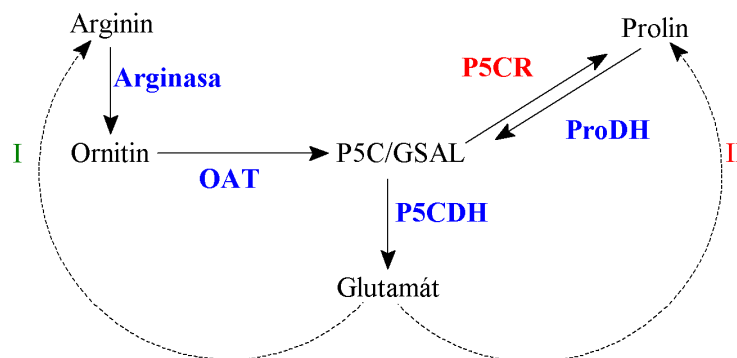
N-acetylglutamátsyntasa (EC 2.3.1.1) katalyzuje vznik N-acetylglutamátu

z glutamátu a acetyl-CoA. *N*-acetylglutamát je fosforylován *N*-acetylglutamátkinasou (EC 2.7.2.8), produkt reakce *N*-acetylglutamát-5-fosfát je redukován na *N*-acetylglutamát-5-fosfát-semialdehyd působením enzymu *N*-acetylglutamát-5-fosfát-reduktasy (EC 1.2.1.38). Reakcí s *N*²-acetylornitin-aminotransferasou (EC 2.6.1.11) je uvolňován *N*²-acetylornitin, který je převeden na ornitin enzymem *N*-acetylornitindeacetylasou (EC 3.5.1.16) za účasti molekuly vody a uvolnění acetátu. Enzymem *N*-acetylornitin:*N*-acetylglutamát-acetyltransferasou (EC 2.3.1.35) může být převeden zpátky na *N*-acetylglutamát.

Ornitin reaguje za působení enzymu ornitinaminotranskARBAMOYLASOU (EC 6.3.5.5) s karbamoylfosfátem, vzniká citrulin za uvolnění fosfátu. Citrulin reaguje s aspartátem za působení arginosukcinátsyntetasy (EC 6.3.4.5), dochází ke štěpení ATP na AMP a PP_i a vzniklý arginosukcinát může být rozložen na arginin a fumarát arginosukcinasou (EC 4.3.2.1) (Slocum, 2005; Heldt *et al.*, 2011).



Obr. 3 Metabolismus argininu u rostlin. Enzymy chloroplastu jsou znázorněny zeleně, enzymy mitochondrie modře. Vysvětlivky: ASL = arginosukcinátlyasa; ASSY = arginosukcinátsyntetasa; GSAL = glutamát- γ -semiladehyd; NAOGAcT = *N*-acetylornitin:*N*-acetylglutamát-acetyltransferasa; NAGS = *N*-acetylglutamátsyntasa; NAGK = *N*-acetylglutamátkinasa; NAGPR = *N*-acetylglutamát-5-fosfát-reduktasa; NAOAT = *N*²-acetylornitin-aminotransferasa; OAT = ornitin- γ -aminotransferasa; OTC = ornitinaminotranskARBAMOYL; P5C = Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylát; P5CDH = Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa. Obrázek vytvořen podle Wintera *et al.* (2015).



Obr. 4 Spojení metabolismu prolinu a argininu v rostlinách. Reakce značené modře probíhají v mitochondrii, zeleně v chloroplastech a červeně v cytosolu. Vysvětlivky: I = osmikroková biosyntéza argininu v chloroplastech; II = dvoukroková biosyntéza prolinu v cytosolu; GSAL = glutamát- γ -semiladehyd; ProDH = prolindehydrogenasa; P5C = Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylát; P5CDH = Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa; OAT = ornitin- γ -aminotransferasa.

Průběh reakcí vedoucích z ornitinu na arginin je shodný s lidským močovinovým cyklem, probíhající částečně v cytosolu a částečně v mitochondrii, během něhož je biosyntetizován arginin (Voet *et al.*, 2006).

Při degradaci je arginin hydrolyzován arginasou na ornitin a močovinu. Ornitin je transaminován za katalýzy ornitin- γ -aminotransferasy (2.6.1.13) na GSAL za současné přeměny 2-oxoglutarátu na glutamát (Murray *et al.*, 2012).

2.2.1 Propojení metabolismu prolinu a argininu

Výchozí molekulou při biosyntéze prolinu a argininu je glutamát, který je redukován na GSAL. GSAL může být za současné přeměny glutamátu na α -ketoglutarát přeměněn na ornitin, který může vést k biosyntéze argininu; po spontánní cyklizaci GSAL na P5C může být jeho redukcí biosyntetizován prolin. Při degradaci prolinu a argininu dochází k převrácení sledu reakcí a obě aminokyseliny jsou katabolizovány na glutamát (Obr. 4) (Voet *et al.*, 2006).

Obě metabolické dráhy biosyntézy prolinu jsou v rostlinách regulovány expresí a aktivitou enzymů. Při salinitním stresu či nedostatku dusíku je prolin biosyntetizován spíše z glutamátu, při nadbytku dusíku nebo klíčení semen je k biosyntéze použit ornitin (Delauney *et al.*, 1993).

2.3 Aldehyddehydrogenasová nadrodina

Aldehyddehydrogenasová (ALDH) nadrodina slučuje rostlinné i živočišné enzymy, které katalyzují přeměnu aldehydů v karboxylové kyseliny. Většina ALDH preferuje jako koenzym NAD^+ , pouze některé využívají NADP^+ (Yoshida *et al.*, 1998; Brocker *et al.*, 2013). Některé ALDH mají širokou substrátovou specifitu, jiné jsou schopny oxidovat více aldehydů (Lindahl, 1992). ALDH jsou přítomny v prokaryotech, bakteriích, rostlinách, houbách i živočiších (Sophos *et al.*, 2001). ALDH se účastní mnohých metabolických drah. Podílejí se na udržování homeostázy a na adaptaci na abiotické stresové podmínky jako salinita nebo dehydratace (Brocker *et al.*, 2013).

Genová exprese ALDH se zvyšuje v odpovědi na stresové podmínky. Při lipidové peroxidaci spolu s volnými radikály vznikají i reaktivní aldehydy, které jsou toxické již při nízkých koncentracích; vzniklé karboxylové kyseliny jako β -alanin, glycinbetain nebo γ -aminomáselná kyselina (GABA) nejsou toxické (Bartels a Sunkar, 2005).

Enzymy ALDH nadrodiny sdílejí některé motivy v primární struktuře a mechanismy katalýzy. Endogenní i exogenní aldehydy jsou odbourávány specifickými enzymy nebo členy ALDH nadrodiny (Saigal *et al.*, 1991).

ALDH rodiny slučují enzymy, které sdílejí 40 % primární struktury a jsou označeny arabskou číslicí; enzymové podrodiny slučují enzymy s 60% shodou v primární struktuře a jsou značeny písmenem (Vasiliou *et al.*, 1999).

ALDH nadrodina slučuje 24 ALDH rodin – v rostlinách jsou zastoupeny rodiny ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24; pro živočichy jsou typické rodiny ALDH1, ALDH2, ALDH3, ALDH4, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH8, ALDH9, ALDH10, ALDH16 a ALDH18. Pouze ALDH11, ALDH12, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24 jsou specifické pro rostliny (Marchitti *et al.*, 2008; Brocker *et al.*, 2013)

2.3.1 Aldehyddehydrogenasová rodina 4

ALDH4 (P5CDH) byla objevena v bakteriích, v houbách a v živočiších (Sophos *et al.*, 2001; Inagaki *et al.*, 2006). Lidská ALDH4 (hALDH4) je lokalizována v matrixu mitochondrie. Nachází se hlavně v játrech, dále podle klesajícího množství také v kosterních svalech, ledvinách, srdci, mozku, plicích, štítné žláze (Hu *et al.*, 1996).

ALDH4 se podílí na ochraně buněk před oxidativním stresem. ROS pravděpodobně vznikají reversibilní přeměnou ProDH prolinu na P5C, jenž může být bez účasti enzymů decyklizován na GSAL; GSAL může být ireversibilně přeměněn ALDH4 na glutamát. ROS vznikající při katalytické reakci ProDH vedou k apoptóze indukované proteinem p-53. Byla dokázána zvýšená exprese *ALDH4* genu endogenním p-53. S vyšší aktivitou ALDH4 dojde ke snížení koncentrace P5C, který by mohl být přeměňován na prolin, což vede k nižší produkci ROS. ALDH4 má negativní účinek na apoptózu vyvolanou proteinem p-53 (Yoon *et al.*, 2004).

Mutace v genech kodující ProDH způsobuje hyperprolinemii typu I, jež se projevuje hromaděním prolinu v plazmě; porucha není dědičná (Jacquet *et al.*, 2002). Prolin je neurotoxický, zvyšuje vzrušivost neuronů a je neurodegenerativní (Nadler *et al.*, 1988). Nedostatečná exprese funkční ProDH je spojena se schizofrenií (Liu *et al.*, 2002).

Mutace v genech pro ALDH4 způsobuje hyperprolinemii typu II, která vede k výraznému hromaděním prolinu a P5C v plazmě, moči a likvoru, což se projevuje neurologicky, konkrétně mentální retardací či záchvaty. Hyperprolinemie typu II typu je autosomálně recesivní onemocnění, tedy vrozená porucha metabolismu prolinu (Geraghty *et al.*, 1998).

2.3.2 Aldehyddehydrogenasová rodina 12

ALDH12 (P5CDH) byla popsána u rostlin a nachází se v mitochondriích (Hare a Cress, 1997; Sophos *et al.*, 2001). Její exprese je regulována exogenním prolinem a salinitou (Rodrigues *et al.*, 2006). Geny kódující ALDH12 byly popsány například v *Zea mays* – *ALDH12A1* (Brocker *et al.*, 2013) a v *Oryza sativa* (*OsALDH12*) – *OsALDH12* (Gao a Han, 2009). Je-li gen kódující ALDH12 poškozen, dochází ke zpomalení buněčného růstu a akumulaci ROS. (Deuschle *et al.*, 2001).

Při vystavení kvasinek vysokým koncentracím NaCl byla detekována nižší exprese *ALDH12*, což umožňuje akumulaci prolinu, takže nedochází k odbourávání P5C. U rostlin, které měly nefunkční gen pro ALDH12, nebyly prokázány změny v katabolismu prolinu při salinitním stresu, a tudíž k akumulaci prolinu nedocházelo (Borsani *et al.*, 2005).

Exogenní prolin vyvolá vyšší expresi *ALDH12*, toxický není pravděpodobně prolin, ale produkt prvního kroku jeho degradace P5C; aplikace exogenního prolinu může vést k buněčné smrti. *ALDH12* je preventivně exprimován ve všech pletivech rostliny,

nejvíce v květech. ALDH12 zastavuje hypersenzitivní odpověď. Exprese *ALDH12* je zvýšena i v odpovědi na napadení rostliny patogenem (Deuschle *et al.*, 2001).

2.3.3 Geny aldehyddehydrogenas rodiny 4 a 12

Některé ALDH rodiny jsou kódovány více geny, jako např. ALDH rodiny 2,3 a 10; jiné pouze jedním genem, např. ALDH rodiny 7 a 12 (Vasiliou a Nebert, 2005; Kotchoni *et al.*, 2010, Brocker *et al.*, 2013).

Gen kodující hALDH4 je umístěn na chromosomu 1, vzniklý funkční protein je pak složen z 563 aminokyselin. hALDH4 sdílí 26–42 % sekvence s ALDH4 prokaryot a nižších eukaryot. Na N-konci se nachází sekvence, která nasměruje enzym do mitochondrie (Hu *et al.*, 1996).

Rostlinné ALDH12 vznikají expresí jednoho genu. Geny pro ALDH12 bývají složené nejčastěji z 15 nebo 16 exonů. ZmALDH12 kódována genem *ZmALDH12A1*, který je umístěn na chromosomu 6 a obsahuje 15 exonů, výsledný protein se skládá z 549 aminokyselin (Brocker *et al.*, 2013). Na N-konci genu *ALDH12* v *Arabidopsis thaliana* (*AtALDH12*) se nachází mitochondriální signální sekvence (Deuschle *et al.*, 2001).

2.3.4 Substrátová specificita aldehyddehydrogenas rodin 4 a 12

Dlouhé alifatické aldehydy nejsou dobrými substráty pro hALDH4, semialdehydy jsou přeměňovány účinněji než alifatické aldehydy (Forte-McRobbie a Pietruszko, 1986). Nejvyšší katalytické účinnosti dosahuje myšičí ALDH4 (MmALDH4) s pětiuhlíkatými substráty jako GSAL (Obr. 1) a glutarátsemialdehyd (GRSAL), nižší pak se čtyřuhlíkatými substráty jako sukcinátsemialdehyd a téměř nulové se tříuhlíkatými substráty (malonátsemialdehyd) a dvouuhlíkatými substráty (glyoxylát) (Pemberton a Tanner, 2013). hALDH4 má i esterásovou aktivitu, účinně přeměňuje p-nitrofenylacetát (při pH 7 $K_m = 83 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Forte-McRobbie a Pietruszko, 1986).

2.3.5 Kinetické vlastnosti aldehyddehydrogenas rodin 4 a 12

Rostlinné ALDH12 preferují jako kofaktor NAD^+ . Navíc kinetická měření ukázala, že se jedná pravděpodobně o jediný kofaktor využívaný *in vivo* v mitochondrii. U OsALDH12 bylo stanoveno K_m pro NAD^+ jako $644 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, K_m pro P5C jako $358 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; V_{lim} pro NAD^+ bylo určeno jako $196 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$, V_{lim} pro P5C bylo stanoveno jako $207 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Forlani *et al.*, 2015). U krysí ALDH4 bylo změřeno K_m

pro NAD^+ $470 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, K_m pro P5C $830 \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Wong *et al.*, 1985).

Hodnota pH optima pro ALDH4 a ALDH12 se podle publikovaných výsledků různí v závislosti na organismu a použitém substrátu. Pro OsALDH12 bylo pH optimum stanoveno jako 6,7 při měření s GSAL (Forlani *et al.*, 2015), krysí ALDH4 ztratila při pH 8 50 % původní aktivity (Wong *et al.*, 1985). pH optimum hALDH4 s GSAL a sukcinátsemialdehydem bylo stanoveno na pH 7, při použití propionaldehydu a GRSAL jako substrátů bylo pH optimum stanoveno na pH 8 (Forte-McRobbie a Pietruszko, 1986).

Teplotní optimum OsALDH12 bylo určeno na 46°C . V přítomnosti substrátu je enzym stabilizovanější a odolnější vyšším teplotám. Bez přítomnosti substrátu při $47,5^\circ\text{C}$ poklesne aktivita enzymu do 10 min na 40 %, do hodiny ztratí OsALDH12 veškerou aktivitu (Forlani *et al.*, 2015).

OsALDH12 je inhibována chloridovými, hydrogenuhličitanovými a dusičnanovými anionty (při koncentracích iontů $10\text{--}1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) Kationty se ukázaly být účinnějšími inhibitory, aktivitu výrazně snižovaly i při mnohem nižších koncentracích (Forlani *et al.*, 2015). Při koncentracích kationtů $100 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byla krysí ALDH4 inhibována z 21 % v přítomnosti draselných kationtů, z 28 % v přítomnosti sodných kationtů, ze 45 % v přítomnosti amonných kationtů, ze 61 % v přítomnosti hořečnatých kationtů; inhibici enzymu nezpůsobovaly vápenaté ionty. Manganaté ionty způsobovaly inhibici z 25 % při koncentraci $1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Wong *et al.*, 1985).

OsALDH12 nebyla inhibována prolinem, ornitinem ani glutamátem v koncentracích $1\text{--}100 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, byla ale inhibována argininem, aktivita se snižovala průběžně s rostoucí koncentrací argininu, IC_{50} bylo dosaženo při $87 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci argininu; inhibice probíhala nekompetitivně (Forlani *et al.*, 2015).

Krysí ALDH4 byla inhibována ze 44 % glutamátem, z 56 % prolinem, 76 % hydroxyprolinem při koncentraci aminokyselin $10 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; GABA z 84 % při koncentraci $5 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Inhibice ornitinem nebyla detekována (Wong *et al.*, 1985). Aktivita MmALDH4 byla kompetitivně inhibována glyoxylátem ($K_i = 0,27 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), sukcinátem ($K_i = 58 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glutarátem ($K_i = 30 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a L-glutamátem ($K_i = 12 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Pemberton a Tanner, 2013).

Aktivita hALDH4 je inhibována 3-hydroxybenzaldehydem (při $1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ z 37 %) a 4-hydroxybenzaldehydem (při $1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ z 88 %). NAD^+ neinhiboval aktivitu

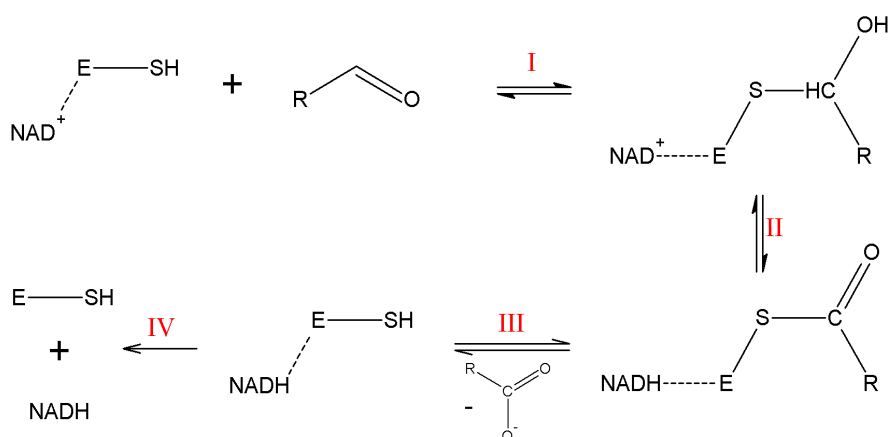
hALDH4 ani při koncentraci $2,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Forte-McRobbie a Pietruszko, 1986).

2.3.6 Reakční mechanismus

Obecný reakční mechanismus pro nadrodinu ALDH je popsán na Obr. 5, katalýza probíhá podle sekvenčního modelu (Wymore *et al.*, 2004).

Členové ALDH nadrodiny sdílí v aktivním místě residua Asn, Cys a Glu, která jsou esenciální pro samotnou katalýzu; residua jsou součástí katalytického místa, jež se nachází ve spodní části substrátového kanálu. Nejprve se do koenzym vazebné domény váže NAD(P)^+ . Karbonylová skupina přístupujícího aldehydu je poté nukleofilně napadena atomem síry z katalytického cysteinu za vzniku thiohemiacetalu, který je stabilizován residuem Asn. Dochází k přesunu atomu vodíku na C4 navázaného nikotinamidového kruhu molekuly NAD(P)^+ (Jones *et al.*, 1987; Farrés *et al.*, 1995; Riveros-Rosas *et al.*, 2013). Molekula vody je aktivována interakcemi s residuem Glu a napadá acyl-sulfurovou vazbu thioesteru jako nukleofilní činidlo (Wang a Weiner, 1995). Z aktivního místa se uvolní nejprve vzniklá karboxylová kyselina a poté NAD(P)H (Obr. 5) (Wang a Weiner, 1995; Sheikh *et al.*, 1997; Perez-Miller a Hurley, 2003; González-Segura *et al.*, 2013).

Perez-Miller a Hurley (2003) navrhli jiný možný průběh reakce, podle něž je nejprve uvolněno NADH a poté karboxylová kyselina, což je přesný opak hypotézy publikované Wymorem *et al.* (2004).

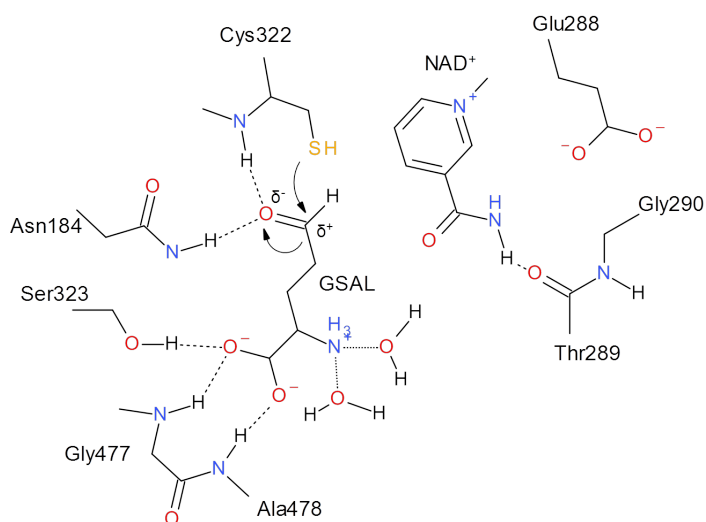


Obr. 5 Obecný mechanismus reakcí katalyzovaných aldehyddehydrogenasami podle Wymora (2004). E-SH je enzym s katalytickým cysteinem, přerušovaná čára ve vazba enzymu s NAD^+ znamená, že koenzym váže jako první. Reakce I = nukleofilní aktivace cysteinu a napadení substrátu, vznik thiohemiacetalu. Reakce II = přesun atomu vodíku z intermediátu na NAD^+ za vzniku NADH a thioesteru. Reakce III = hydrolyza thioesteru a odštěpení karboxylové kyseliny. Reakce IV = odštěpení NADH . Obrázek vytvořen podle Wymora *et al.* (2004).

Mechanismus reakce je pro všechny ALDH4 a ALDH12 stejný. V případě hALDH4 substrát vstupuje do aktivního místa tak, aby aldehydová skupina substrátu GSAL mohla interagovat s katalytickým cysteinem 348. Aminoskupina a karboxylová skupina substrátu vytváří vodíkové vazby s aminokyselinami serinem 349, glycinem 512 a serinem 513. Alifatický řetězec substrátu je stabilizován mezi residua Phe212 a Phe520. Atom kyslíku aldehydové skupiny interaguje kromě katalytického cysteinu 348 také s postranním řetězcem asparaginu 211.

Při vstupu NAD^+ do koenzym vazebného místa reaguje ribosa, vázaná na adenin molekuly NAD^+ , s lysinem 233. Pyrofosfátová skupina NAD^+ je stabilizována vodíkovou vazbou na residua Ser287 a Thr290. Ribosa vázaná na nikotinamid vytváří vodíkovou vazbu s glutamátem 447 (Srivastava *et al.*, 2012).

Vazbu GSAL v aktivním místě ALDH4 u bakterie *Thermus thermophilus* (TtALDH4) znázorňuje Obr. 6. Reakční mechanismus je shodný s obecným principem katalýzy ALDH. Hlavním katabolickým bodem aktivního místa je atom síry aminokyseliny cysteinu 322. Do aktivního místa se nejprve navážou NAD^+ a GSAL. Kyslík na γ -uhlíku GSAL je stabilizován v aktivním místě pomocí vodíkových vazeb v tzv. „oxoaniontové jámě“ (pomocí atomů dusíku aminokyselin Asn211 a Cys322), kde zůstává, dokud nevznikne glutamát. NAD^+ svojí vazbou v aktivním místě omezuje pohyblivost nukleofilního atomu síry.



Obr. 6 Schématické znázornění aktivního místa bakterie *Thermus thermophilus*. Převzato a upraveno podle Inagakiho *et al.* (2006).

Vlivem interakcí GSAL s aminokyselinami v aktivním místě se pravděpodobně zvyšuje elektrofilita γ -uhlíku GSAL, díky čemuž může být snadněji napaden nukleofilním atomem síry. Vzniká hemithioacetalový intermediát. Atom vodíku ve formě hydridového iontu je přenesen na akceptorový uhlík v molekule NAD^+ a vzniklý NADH oddisociuje z aktivního místa. Změnou struktury aktivního místa po odstranění NADH je umožněna hydrolyza thioacetylenzymu (Inagaki *et al.*, 2006).

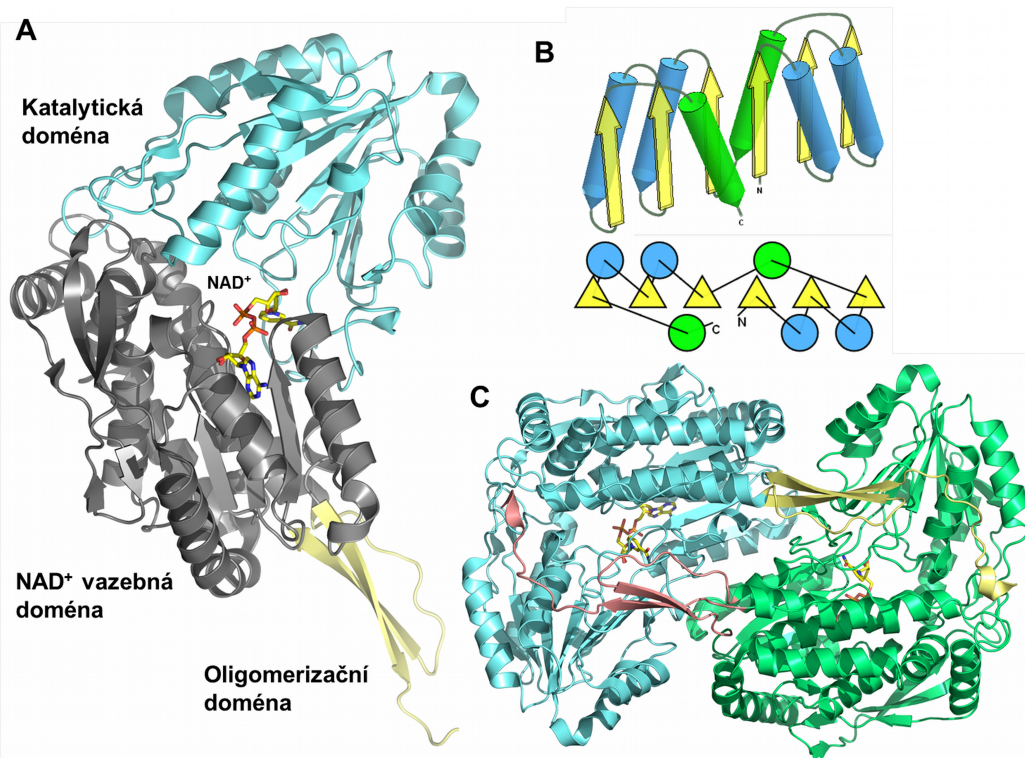
NADP^+ se váže do aktivního místa podobným způsobem jako NAD^+ . Problém s vazbou NADP^+ může nastat v případě, že se v místě vazby ribosy adeninového kruhu vyskytuje záporně nabitě residuum, popř. dochází ke sterickým zábránám a zúžení štěrbin v oblasti kolem residua Lys233. NADP^+ se váže v aktivním místě těsněji než NAD^+ , což při disociaci NADPH více omezuje okolní strukturu. Disociační rychlost NADPH je oproti NADH výrazně nižší (Inagaki *et al.*, 2007).

2.3.7 Struktura aldehyddehydrogenas rodin 4 a 12

Obecně jsou ALDH známy jako homodimery, homotetramery nebo homoexamery, v závislosti na enzymové rodině. Lidská ALDH4A1 má známou dimerní strukturu (PDB ID: 3V9G) s molekulovou hmotností monomeru 61 kDa. Stejně jako MmALDH4 (PDB ID: 3V9K), která vykazuje 92 % shodu s hP5CDH; sekvence v jejich aktivních místech jsou shodné (Srivastava *et al.*, 2012; Pemberton a Tanner, 2013).

Bakteriální TtALDH4 (PDB ID: 2J40) a ALDH4 z *Deinococcus radiodurans* jsou známy jako hexamery složené ze dvou trimerů dimeru (Inagaki *et al.*, 2006). Podobně ALDH4 ze *Sacharomyces cerevisiae* má známou krystalovou strukturu a jedná se o hexamer (PDB ID: 4OE4) (Pemberton *et al.*, 2014). V případě ALDH4 z *Bacillus halodurans* (PDB ID: 3QAN), z *Bacillus licheniformis* (PDB ID: 3RJL) a z *Mycobacterium tuberculosis* (PDB ID: 4LEM) se jedná o dimery (Luo *et al.*, 2013; Lagautriere *et al.*, 2015).

OsALDH12 je homotetramer s molekulovou hmotností monomeru 65 kDa (Forlani *et al.*, 2015). Molekulová hmotnost monomeru AtALDH12 je 60,1 kDa (Deuschle *et al.*, 2001).



Obr. 7 Složení monomeru myši aldehyddehydrogenasy z rodiny 4 (MmALDH4). A) Modře je značena katalytická doména, šedě NAD⁺ vazebná doména, žlutě oligomerizační doména; v NAD⁺ vazebné doméně je navázaný NAD⁺. B) Schématické znázornění „Rossmannova strukturního motivu“. C) Složení dimeru MmALDH4 (PDB ID: 3V9L); první monomer je znázorněn modře, jeho oligomerizační doména je žlutě; druhý monomer je znázorněn zeleně, jeho oligomerizační doména je červeně. Obrázky A a C převzaty a upraveny z publikace Srivastavy *et al.* (2012), obrázek B z (<http://prodata.swmed.edu/Lab/Rossmann3x3.htm>).

Běžně je monomer ALDH složen ze tří podjednotek, a to katalytické domény, NAD(P)⁺ vazebné domény a oligomerizační domény (Obr. 7A). Katalytická doména se nachází na C-konci enzymu a je složena z otevřeného α/β -skládání stočeného sedmivláknového β -listu. NAD⁺ vazebná doména se nachází na N-konci (Srivastava *et al.*, 2012).

V proteinech, které vážou nukleotidy (enzymové kofaktory jako FAD, NAD⁺ a NADP⁺) jako jsou například ALDH, je přítomen Rossmannův strukturní motiv („Rossmann fold“). Nejčastěji se skládá ze šesti paralelních β -vláken, z nichž první tři vlákna jsou navázána na α -helixy, díky čemuž vzniká beta-alfa-beta-alfa-beta struktura. Tento motiv je duplikován, a tím je umožněn vznik invertovaného tandemového opakování obsahující šest vláken (Obr. 7B) (Rao a Rossmann, 1973).

Oligomerizace je velmi důležitá pro funkci ALDH. Všechny ALDH tvoří dimer,

v němž oligomerizační doména jednoho monomeru zachycuje katalytickou doménu dalšího monomeru (Obr. 7C). Dimery některých ALDH (lidská ALDH1 a ALDH2) se skládají v homotetradimery (Rodriguez-Zavala a Weiner, 2002).

Správná oligomerizace je důležitá pro funkci a stabilitu ADLH; například neaktivní ALDH2, která je přítomna u 40 % východoasijské populace, má na povrchu oligomerizační domény místo glutamátu lysin (Larson *et al.*, 2006). Tvorba tetrameru je pravděpodobně esenciální pro reaktivitu ALDH1A1 a ALDH2 (Yoval-Sánchez *et al.*, 2013).

Některé aminokyseliny NAD⁺ vazebné domény jsou u bakteriálních TtALDH4 nezbytné pro vytvoření hexamerů, konkrétně Arg100, Lys10 a Arg111. Mutantní enzymy TtALDH4R100A a TtALDH4R100A/K104/R111A nejsou schopny se spojit v hexamery a v roztoku zůstávají jako dimery, neboť se tyto kladně nabitě aminokyseliny účastní elektrostatických interakcí mezi dimery (Luo *et al.*, 2013).

2.3.8 Bifunkční enzym bakterií pro degradaci prolinu

U některých bakterií se vyskytuje speciální případ ALDH. Jedná se o fúzní protein obsahující domény ProDH a P5CDH. Geny kodující tyto proteiny se označují jako „*prolin utilization A*“ (*PutA*). V *Salmonella typhimurium* nese gen *PutA* (*StPutA*) informaci kódující peptid StPutA, který oxiduje prolin a následně i GSAL. Většina mutací *PutA* vede ke ztrátě obou aktivit, mutantní polypeptid PutA601 má pouze GSAL-dehydrogenasovou aktivitu a mutantní polypeptid PutA609 prolin–oxidasovou aktivitu (Ratzkin a Roth, 1978).

Bylo zjištěno, že PutA ze *Sacharomyces cerevisiae* je vázána na membránu velmi slabou interakcí (Menzel a Roth, 1981). Podobně u PutA z *Escherichia coli* (EcPutA) byly popsány tři hydrofobní oblasti, které se pravděpodobně účastní vazby enzymu na membránu (Ling *et al.*, 1994).

StPutA se vyskytuje jako dimer z podjednotek o molekulové hmotnosti 132 kDa. StPutA je upevněný v membráně poměrně slabou, ale funkční vazbou a interaguje s membránovým elektronovým transportem (Menzel a Roth, 1981).

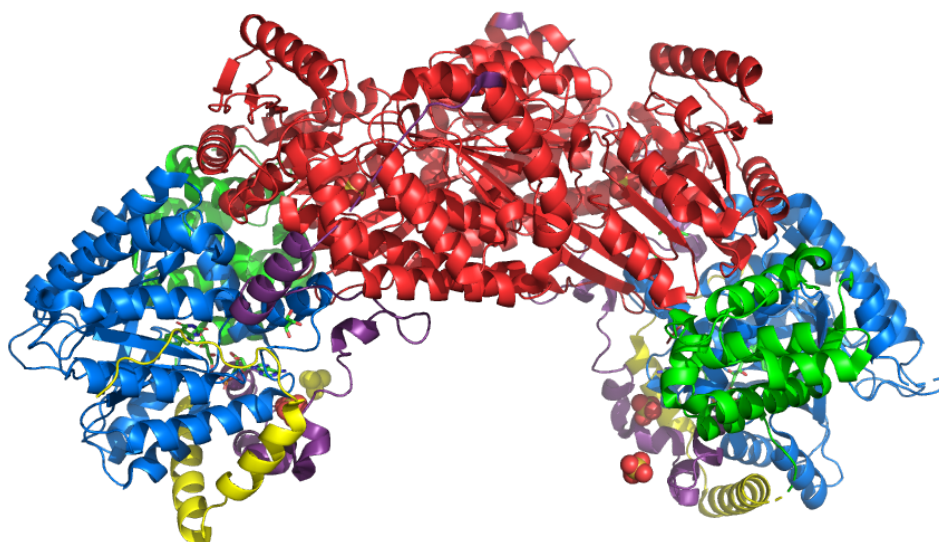
Peptid PutA z *Corynebacterium freiburgense* je monomer (PDB ID: 5UX5) (Korasick *et al.*, 2017). Peptid PutA z *Geobacter sulfurreducens* je homodimer (PDB ID: 4NM9) (Singh *et al.*, 2014).

PutA z *Bradyrhizobium japonicum* (BjPutA) (PDB ID: 4Q71) je tetramer a má

molekulovou hmotnost 442 kDa. Začíná raménkem z 51 aminokyselin, které obtáčí ProDH doménu, šesti vzájemně spojených α -helixů, které spojují dvě katalytické domény (ProDH a P5CDH doménu). Domény jsou odděleny řetězcem z 83 aminokyselin (Obr. 8).

BjPutA má tvar kruhu. P5CDH doména je podobná ostatním ALDH, je složena ze dvou laloků; jeden lalok váže NAD^+ , druhý obsahuje katalytický cystein. Aktivní místa obou domén jsou umístěna naproti sobě, mezi nimi je nepravidelná dutina, jejíž povrch je velmi hydrofilní. GSAL je mezi aktivními místy enzymů přemístován substrátovým kanálem (Srivastava *et al.*, 2010).

PutA je hlavním peptidem v buňkách, které degradují prolin (Menzel a Roth, 1980). Zjednodušený přesun GSAL v substrátovém kanálu je pravděpodobně výhodný proces pro bakterie, které využívají prolin jako zdroj energie (Srivastava *et al.*, 2010). Některé PutA peptidy bývají označovány jako trifunkční – StPutA sám reguluje svoji transkripci, neboť se váže na *put* operátor. Je tedy sám sobě represorem, který reguluje expresi *put* operonu (Ostrovsky de Spicer a Maloy, 1993). Regulace transkripce *put* pomocí bifunkčního enzymu byla potvrzena i u EcPutA (Larson *et al.*, 2006). Bifunkční a trifunkční PutA peptidy mají odlišnou kvartérní strukturu (Srivastava *et al.*, 2010).



Obr. 8: Struktura dimeru bifunkčního enzymu „prolin utilization A“ (PutA) z *Bradyrhizobium japonicum*. Žlutě je raménko z 51 aminokyselin, zeleně řetězec mezi raménkem a prolindehydrogenasovou doménou, která je modrá, fialově je řetězec mezi doménami a červeně Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasová doména. Vytvořeno podle Srivastavy *et al.* (2010).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Biologický materiál

- Bakteriální buňky *E. coli* BL21 nesoucí geny $\Delta ZmALDH12$ a jejích tří mutančních forem; enzymy obsahovaly na N-konci histidinovou kotvu. Rekombinantní buňky byly připraveny vedoucí práce.
- Byly použity mutantní formy C330A (s nahrazenou 330. aminokyselinou cysteinem za alanin), E205A (s nahrazenou 205. aminokyselinou glutamátem za alanin) a K329A (s nahrazenou 329. aminokyselinou lysinem za alanin).

3.1.2 Použité chemikálie

- 1-heptanal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- 3-aminopropionaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- 3-methylbutenal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- 4-aminobutyraldehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- 4-guanidinopropionaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- aminoadipátsemialdehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- benzaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- bis(akryloamino)methan (Bio-Rad, USA)
- boritá kyselina (AMRESCO, USA)
- Bradfordovo činidlo (Thermo Scientist, USA)
- butyraldehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- Coomassie Brilliant Blue (Thermo Scientific, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR)
- DNasa (TopBio, ČR)
- dodecylsírán sodný (Bio-Rad, USA)
- fosforečná kyselina (Lach-Ner, ČR)
- γ -globulin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- glycerol (Lachema, SRN)
- glukosa (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- chloristan sodný monohydrát (Lach-Ner, ČR)

- chlorovodíková kyselina (Lachema, SRN)
- hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR)
- hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR)
- chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- chlorid sodný (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- imidazol (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- inhibitor proteas (Thermo Scientific, USA)
- isobutylaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (Thermo Scientific, USA)
- kapronaldehyd (Honeywell Fluka, USA)
- Laemmliho vzorkovací pufr (BioRad, USA)
- Luria-Bertani médium (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- metanol (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- močovina (Lach-Ner, ČR)
- myoglobin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- n-butanol (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (Bio-Rad, USA)
- nikotinamidadenindinukleotid (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- nonanal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- octová kyselina (Lach-Ner, ČR)
- oktanal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- ovalbumin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- persíran amonný (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- Protein Ladder (10-250 kDa) (New England Biolabs, UK)
- RNasa (TopBio, ČR)
- streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- tyreoglobulin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- valerdehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- vitamín B12 (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)

Substráty glutamát- γ -semialdehyd a glutarátsemialdehyd byly poskytnuty vedoucí.

Glutamát- γ -semiladehyd byl připraven podle Wiliamse a Franka (1975) a glutarátsemialdehyd podle Adamse a Changa (1971).

3.2 Přístrojové vybavení

- analytické váhy (Sartorius, SRN)
- centrifuga (Eppendorf, SRN)
- čistička ultrazvuková (Kraintek, Slovensko)
- elektroforetická cela (Bio-Rad, USA)
- elektromagnetická míchačka (IKA, SRN)
- kapalinový chromatograf (Bio-Rad, USA)
- laminární box (Merci, ČR)
- mikrotitrační reader (BioTek, USA)
- One Shot desintegrátor (Constant Systems, UK)
- pH metr (XS Instruments, Itálie)
- rotační třepačka (IKA, SRN)
- skener (Bio-Rad, USA)
- spektrofotometr (Agilent, USA)
- spektrofotometr (Biochrom WPA, UK)
- spektrometr (Jasco, Japonsko)
- termostat (Sanyo, Japonsko)
- třepačka (Lab-Line, USA)
- třepačka vířivá (Stuart, UK)
- váhy (Ohaus, USA)

3.3 Použité programy

- BioLogic DuoFlow 3.0
- Instrument 1.0
- GraphPad Prism 5.0
- Spectra Manager

3.4 Metody

3.4.1 Exprese rekombinantních proteinů v *Escherichia coli*

Do Erlenmeyerovy baňky o objemu 50 ml bylo dáno 20 ml Luria-Bertani (LB) média, 1% (w/w) glukosa, streptomycin (pro konečnou koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 10 μl kultury

Escherichia coli nesoucí gen pro nadprodukcí rekombinantního proteinu (*ΔZmALDH12* nebo jejích 3 mutantních forem). Prekultura byla inkubována na třepačce při 180 rpm a 37 °C přes noc.

Druhý den byla prekultura zcentrifugována (5000 g, 5 min., 10 °C) a pelet byl rozsuspendován ve 200 ml čistého LB média se streptomycinem (50 μg·ml⁻¹). Kultura byla inkubována při 37 °C v termostatu. Pro ověření dosažení optimální koncentrace množství bakterií byla změřena optická densita při vlnové délce 600 nm, naměřená optická densita by měla být v rozmezí 0,6–1. Do kultury byl přidán isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG; pro koncentraci 0,5 mmol·l⁻¹) pro indukci exprese rekombinantních proteinů. Inkubace probíhala přes noc na třepačce (180 rpm) při 18 °C. Bakterie byly zcentrifugovány (5000 g, 5 min., 10 °C) a pelety byly promyty v 30 ml 0,9 % (w/w) NaCl a zmrazeny na –20 °C pro extrakci.

3.4.2 Extrakce

Pelet z 200 ml bakteriální kultury byl rozsuspendován v 6 ml lyzačního pufru, složeného z 50 mmol·l⁻¹ draselno-fosfátového pufru (KPB) pH 7,0, 10 mmol·l⁻¹ MgCl₂ a 50 μl inhibitorů proteas. Buňky byly rozbity v One Shot desintegrátoru při 27 kpsi, poté byly k lyzátu přidány RNasa a DNasa (pro koncentraci 10 μg·ml⁻¹). Směs byla doplněna na objem 10 ml destilovanou vodou a inkubována 30 min. při 37 °C. Do směsi byl přidán NaCl (pro koncentraci 100 mmol·l⁻¹) a 5 % (w/v) glycerol. Směs byla centrifugována (12000 g, 30 min., 4 °C) a supernatant byl použit při purifikaci.

3.4.3 Purifikace

Enzymy byly purifikovány na kolonkách pro afinitní chromatografii s imobilizovanými Co²⁺ ionty (His selected cobalt gel, Sigma-Aldrich). Co²⁺ ionty vážou histidinovou kotvu, a umožňují tak zachycení enzymu na kolonce.

Kolonky byly nejprve promyty ekvilibračním pufrem (50mmol·l⁻¹ KPB pH 7,0; 20 mmol·l⁻¹ imidazol, 300 mmol·l⁻¹ NaCl, 5% (w/v) glycerol). Poté byl nanesen supernatant z extrakce a kolonky byly inkubovány na rotační třepačce (100 g, 30 min.) v chladové místnosti (4 °C). Následně byly kolonky promyty ekvilibračním pufrem. Kolonky byly dvakrát inkubovány se 4 ml elučního pufru (50mmol·l⁻¹ KPB pH 7,0; 250 mmol·l⁻¹ imidazol, 300 mmol·l⁻¹ NaCl, 5% (w/v) glycerol) a následně inkubovány na rotační třepačce (100 g, 30 min.) v chladové místnosti (4 °C).

Obě frakce byly spojeny a zakoncentrovány pomocí ultracentrifugace na patroně Centrikonu (30 kDa, Centricon, Millipore) za současného přidávání promývacího roztoku (50 mmol·l⁻¹ KPB pH 7,0; 300 mmol·l⁻¹ NaCl, 5% (w/v) glycerol). Purifikovaný enzym byl poté přečištěn gelovou permeační chromatografií nebo ihned zamražen a skladován při -20°C pro měření.

3.4.4 Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí Bradfordovy metody (Bradford, 1976). Byla připravena koncentrační řada hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentracích 25µg/ml–2000µg/ml. Do zkumavek bylo napipetováno 0,05 ml vzorku nebo připravených standardů roztoků BSA a 1,5 ml Bradfordova činidla. Zkumavky byly ihned promíchány a následně inkubovány 5 min. Byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm.

3.4.5 SDS-PAGE

Pro elektroforézu byl odebrán 1 ml z každé bakteriální kultury před indukci, po indukci přes noc a po purifikaci proteinu. Po centrifugaci (5000 g, 5 min., 10 °C) byl pelet rozpuštěn ve 45 µl močoviny (o koncentraci 8 mol·l⁻¹) a 15 µl Laemliho vzorkovacího pufru. Vzorky byly povařeny 5 min. při 100 °C a zcentrifugovány (3000 g, 10 min., 4 °C). Zaostrovací a dělicí gel byl připraven podle Tab. 1, persíran amonný byl přidán před naléváním gelů.

Mezi skla v elektroforetické komůrce byl nalit elektrodový pufr (0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 8,3; 0,025 mol·l⁻¹ glycin; 0,1% (w/w) dodecylsírán sodný). Elektroforéza probíhala při 120 V, dokud vzorky byly v zaostrovacím gelu. Jakmile vzorky přešly do dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Tab. 1 Složení zaostrovacího a dělicího gelu pro SDS-page. Vysvětlivky: AA = akrylamid; APS = persíran amonný; BIS = bis(akryloamino)methan; SDS = dodecylsírán sodný; TEMED = *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin.

	AA (w=0,3)/BIS (w=0,08), [ml]	Tris-HCl (c=1,5 mmol·l ⁻¹ ; pH 8,8), [ml]	H ₂ O , [ml]	SDS (w=0,1), [ml]	APS (w=0,1), [ml]	TEMED, [ml]
Zaostrovací gel (12%)	0,65	1,25	2,95	0,10	0,06	0,01
Dělicí gel (4%)	4,00	2,50	3,20	0,10	0,05	0,01

Gel byl přes noc ponořen do barvicího roztoku (0,025 % (w/w) Comassie Brilliant Blue, 40 % (w/w) metanol, 7 % (w/w) octová kyselina) za současného míchání na třepače. Druhý den byl gel ponořen do odbarvovacího roztoku (5 % (w/w) metanol, 7 % (w/w) octová kyselina) a následně byl vyfocen. Byla vytvořena kalibrační závislost logaritmu molekulové hmotnosti pásů markeru na vzdálenosti pásů markeru od startu (v cm) a byla odečtena molekulová hmotnost monomeru $\Delta ZmALDH12$.

3.4.6 Gelová permeační chromatografie

Kolona Superdex 200 HR 10/30 byla promyta ekviliračním pufr (50 mmol·l⁻¹ KPB pH 7,0; 150 mmol·l⁻¹ NaCl). Jako standardy pro určení molekulové hmotnosti byly použity tyreoglobulin (669 kDa), hovězí γ -globulin (158 kDa), kuřecí ovalbumin (44 kDa), koňský myoglobin (17 kDa) a vitamin B12 (1,35 kDa). Analýza probíhala při tlaku v rozmezí 25–29 psi a průtokové rychlosti 0,7 ml·min⁻¹. Proteiny byly detekovány při vlnové délce 280 nm.

Z chromatogramů byly odečteny retenční časy analyzovaných látek, byla vytvořena kalibrační křivka závislosti logaritmu molekulové hmotnosti standardů na poměru elučního a mrtvého objemu. Byla zjištěna molekulová hmotnost $\Delta ZmALDH12$.

3.4.7 Stanovení pH optima

Hodnota pH optima byla stanovována na mikrotitrační destičce. Reakční směs o objemu 0,2 ml obsahovala Britton-Robinsonův pufr (0,04 mmol·l⁻¹ kyselina boritá; 0,04 mmol·l⁻¹ fosforečná a 0,04 mmol·l⁻¹ octová; 0,2 mmol·l⁻¹ NaOH a přídavek NaClO₄), 2 mmol·l⁻¹ NAD⁺, 250 μ mol·l⁻¹ substrát GSAL; reakční směs byla doplněna destilovanou vodou.

3.4.8 Stanovení teplotní stability pomocí cirkulárního dichroismu

Z rozdílu absorbcí pravotočivé a levotočivé složky molekuly po ozáření polarizovaným světlem lze stanovit konformační změny makromolekul, interakce mezi proteiny a sekundární struktury proteinů; rozdíl absorbcí se měří cirkulárním dichroismem. Do křemenné kyvety byl napipetován enzym $\Delta ZmALDH12$ (0,3 mg ml⁻¹) nebo mutantní formy enzymu $\Delta ZmALDH12$ (0,4 mg ml⁻¹) a destilovaná voda. Směs byla inkubována při teplotách 20–90 °C a byla sledována absorpce na spektrometru při vlnových délkách 200–300 nm. Byly vytvořeny grafy závislosti první derivace eliplicity na hodnotě teploty a byly určeny teploty tání enzymů (T_m).

Tab. 2 Příprava substrátů pro měření substrátové specifinity. Substráty, připravované s HCl, byly povařeny 10 min. při 100 °C.

	V (substrát) nebo m (substrát)	V (HCl o koncentraci 0,2 mol·l ⁻¹ nebo etanol)
3-aminopropionaldehyd (APAL)	16,7 μl	983,3 μl HCl
4-aminobutyrate (ABAL)	19,8 μl	980,2 μl HCl
4-guanidinopropionaldehyd (GBAL)	26,5 mg	1000 μl HCl
butyraldehyd	9,2 μl	990,8 μl etanolu
valeraldehyd	11,0 μl	989,0 μl etanolu
hexanal	12,7 μl	987,3 μl etanolu
1-heptanal	14,7 μl	985,3 μl etanolu
oktanal	15,8 μl	984,2 μl etanolu
nonanal	18,1 μl	981,9 μl etanolu
isobutyraldehyd	9,3 μl	990,7 μl etanolu
3-methylbutyraldehyd	11,3 μl	988,7 μl etanolu
3-methyl-2-butenal	9,9 μl	990,1 μl etanolu
Aminoadipátsemialdehyd (AASAL)	19,1 mg	1000 μl HCl
benzaldehyd	10,3 μl	989,7 μl etanolu

3.4.9 Stanovení substrátové specifinity

Pro porovnání substrátové specifinity byly připraveny substráty podle Tab. 2. Substráty rozpuštěné v 0,2 mol l⁻¹HCl byly 10 min. povařeny na 100 °C.

Reakční směs o objemu 2 ml obsahovala 100 mmol·l⁻¹ PPB pH 7,5; 2 mmol·l⁻¹ NAD⁺, 1 mmol·l⁻¹ substrát, enzym ΔZmALDH12 o vhodné koncentraci; reakční směs byla doplněna destilovanou vodou. Reakce byla startována přidávkem enzymu. Jako blank byla použita reakční směs bez enzymu a absorbance reakční směsi byla měřena během 10 min. v pravidelných intervalech o délce 10 s. Teplota reakční směsi byla udržována při 30 °C.

Aktivita ΔZmALDH12 byla určena pomocí rovnice 1 (viz. kapitola 3.4.10) a získané hodnoty byly vyneseny do sloupcového grafu spolu s určenými směrodatnými odchylkami.

3.4.10 Stanovení aktivity a kinetických parametrů

Aktivita enzymů byla stanovována spektrofotricky pomocí Warburgova optického testu, v němž je sledováno zvýšení koncentrace NADH vznikajícího enzymatickou reakcí. NADH má absorpční maximum při vlnové délce 340 nm (Tylichová *et al.*,

2008).

Při stanovování saturační křivky pro substrát GRSAL v kyvetě o objemu 2 ml reakční směs obsahovala $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PPB pH 7,5; $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ ; $20\text{--}1000 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ GRSAL; reakční směs byla doplněna destilovanou vodou na objem 2 ml. Reakce byla startována přidavkem enzymu o vhodné koncentraci a absorbance reakční směsi byla měřena během 300 s v pravidelných intervalech o délce 10 s. Jako blank byla použita reakční směs bez enzymu. Během měření byla teplota reakční směsi udržována při $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Saturační křivka pro GSAL byla měřena na mikrotitrační destičce, reagentie do reakční směsi o objemu 0,2 ml byly přidány pro stejné koncentrace jako při měření se substrátem GRSAL. Reakce byla startována přidavkem enzymu a absorbance reakční směsi byla měřena během 16 min. v pravidelných intervalech o délce 20 s.

Při stanovování saturační křivky pro koenzym NAD^+ reakční směs obsahovala $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PPB pH 7,5; $0,01\text{--}4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ , $250 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ GRSAL. Reakční směs byla doplněna destilovanou vodou na 2 ml. Reakce byla startována přidavkem enzymu $\Delta\text{ZmALDH12}$. Jako blank byla použita reakční směs bez enzymu.

Naměřené hodnoty absorbance byly vyneseny do grafu závislosti absorbance na čase, směrnice lineární části této závislosti byla využita při výpočtu specifické aktivity enzymu podle vztahu (rovnice 1):

$$\text{specifická aktivita} [\text{nkat} / \text{mg}] = \frac{\text{směrnice} \cdot V [\text{l}]}{m [\text{mg}] \cdot \epsilon_{340} [\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]} \cdot 10^{12} \quad (1)$$

Směrnice je směrnice rovnice lineárního nárůstu zvyšující se absorbance reakční směsi v závislosti na čase, ϵ_{340} je molární absorpční koeficient enzymu $\Delta\text{ZmALDH12}$ při vlnové délce 340 nm ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), m je hmotnost proteinu v kyvetě, V je objem reakční směsi.

Naměřené aktivity byly vyneseny do grafu závislosti specifické aktivity na koncentraci substrátu, případně koenzymu a pomocí nelineární regrese za přiblížení dat rovnici Michaelise–Mentenové byly v softwaru GraphPad Prism 5.0 vyhodnoceny kinetické parametry K_m a V_{lim} spolu se směrodatnými odchylkami.

V případě naměřené inhibice substrátem byla data ve stejném softwaru vyhodnocena nelineární regresí podle vztahu (rovnice 2):

$$v = \frac{V_{\text{lim}} + [S]}{K_m + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{1 + K_i}\right)} \quad (2)$$

v je počáteční rychlost, V_{lim} je limitní rychlost, $[S]$ je koncentrace substrátu, K_m je Michaelisova konstanta a K_i je inhibiční konstanta.

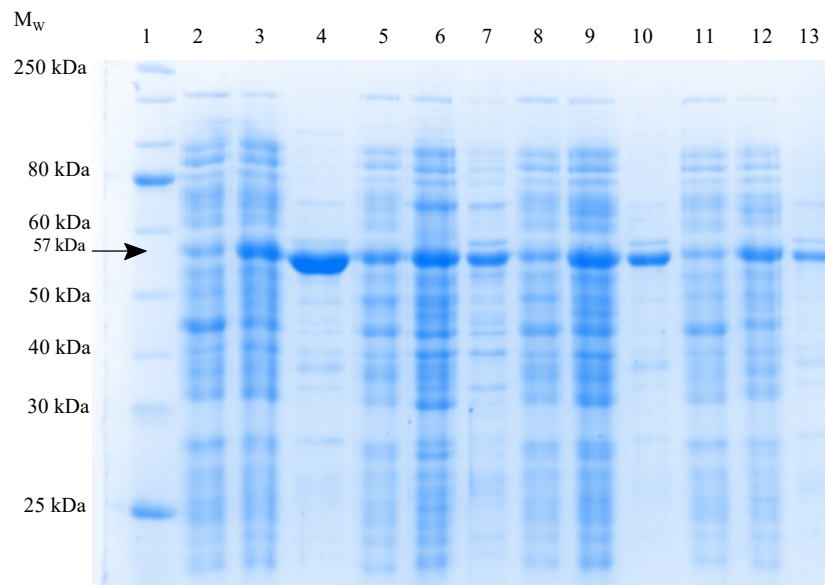
4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace exprese

Expres $\Delta ZmALDH12$ a jejích tří mutantních forem byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Podle sekvence uložené v databázi by měla být molekulová hmotnost (M_w) monomeru 60,3 kDa.

Z elektroferogramu (Obr. 9) je patrná přítomnost exprimovaných proteinů jak po indukci $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ IPTG, tak i po afinitivní purifikaci s imobilizovanými Co^{2+} ionty. Molekulová hmotnost (M_w) monomeru 56,5 kDa.

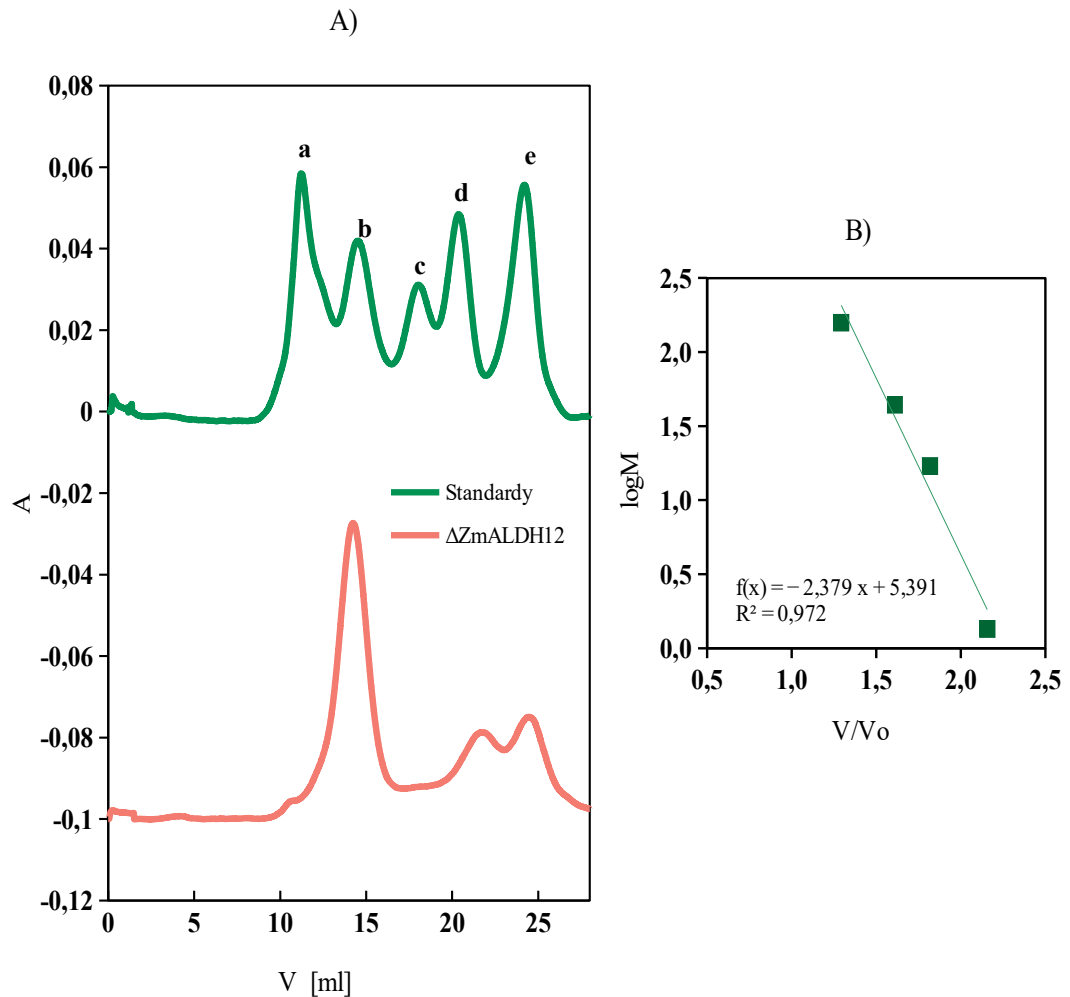
Na základě těchto výsledků je patrné, že indukce exprese genů $\Delta ZmALDH12$ i jejích mutantních forem a následná purifikace enzymů proběhly úspěšně.



Obr. 9 Elektroferogram na důkaz indukce exprese genů a purifikace. Do jamky 1 byl nanesen marker. Do jamky 2 byl nanesen vzorek buněčné kultury před spuštěním exprese kukuřičné aldehyddehydrogenasy rodiny 12 ($\Delta ZmALDH12$), do jamky 3 vzorek kultury po spuštění exprese $\Delta ZmALDH12$ a do jamky 4 vzorek purifikovaného proteinu po zakoncentrování. Ve stejném pořadí byly do jamek 5–7 naneseny vzorky E205A, do jamek 8–10 vzorky C330A a do jamek 11–13 K329A. Zvětšení fotografie je 1 : 1,2. Vysvětlivky: C330A = $\Delta ZmALDH12$ s nahrazeným cysteinem 330 za alanin; E205A = $\Delta ZmALDH12$ s nahrazeným glutamátem 205; K329A = $\Delta ZmALDH12$ s nahrazeným lysinem 329 za alanin; M_w = molekulová hmotnost.

4.2 Gelová permeační chromatografie

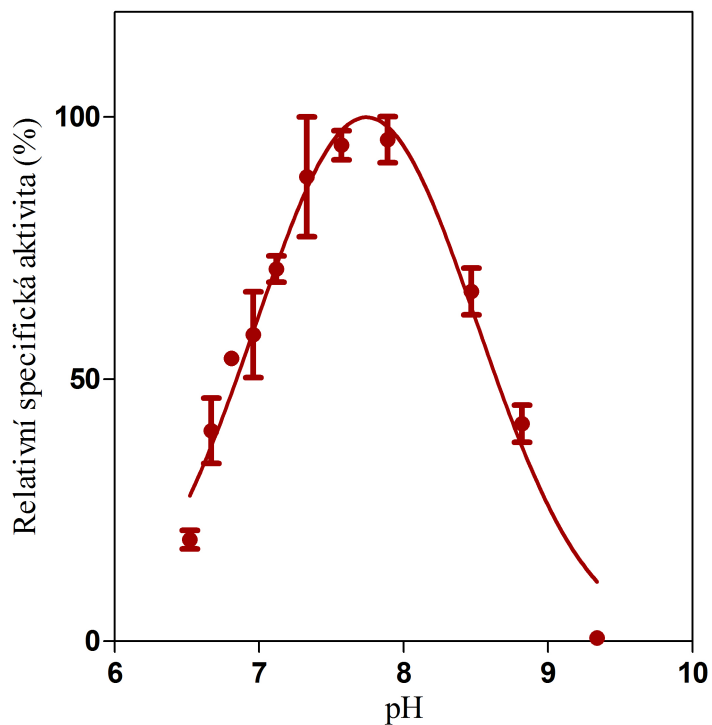
Na základě retenčního objemu $\Delta ZmALDH12$ (Obr. 10) byla stanovena její molekulová hmotnost jako 232,34 kDa. Oligomerizační status $\Delta ZmALDH12$ byl zjištěn porovnáním s předpokládanou hmotností monomeru podle sekvence v databázi jako homotetramer.



Obr. 10 A) Chromatogram $\Delta ZmALDH12$ závislosti absorbance (A) roztoku látek při vlnové délce 280 nm na elučním objemu (V). Zjištěné hodnoty pro $\Delta ZmALDH12$ byly na ose y posunuty o $-0,1$ pro vyšší přehlednost. Jako standardy byly použity tyreoglobulin (669 kDa; pík a), hovězí γ -globulin (158 kDa; pík b), kuřecí ovalbumin (44 kDa; pík c), koňský myoglobin (17 kDa; pík d) a vitamínu B12 (1,35 kDa; pík e). B) Kalibrační křivka standardů se závislostí logaritmu jejich molekulové hmotnosti ($\log M$) a podílu elučního a mrtvého objemu (V/V_0).

4.3 pH optimum

Ke stanovení pH optima byla použita sada Britton-Robinsonových pufrů o pH 6,6–9,5. Nejvyšší aktivitu vykazovala Δ ZmALDH12 při pH 7,74 (Obr. 11).

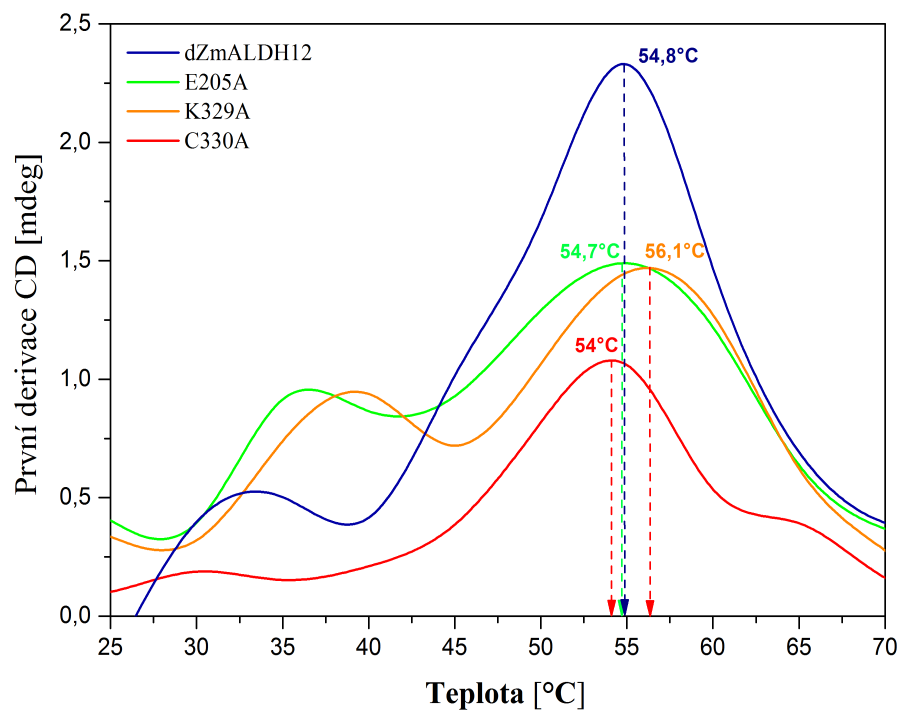


Obr. 11 Výsledky pH optima, vynesené v grafu závislosti relativní aktivity (%) na hodnotě pH; hodnoty aktivit byly porovnávány vzhledem k nejvyšší zjištěné aktivitě.

4.4 Teplotní stabilita

Teplotní stabilita byla měřena se všemi čtyřmi rekombinantními proteiny v rozmezí teplot 20–80 °C (Obr. 12). Byly staveny hodnoty T_m , při nichž dochází k rozvolnění 50 % struktury studovaného enzymu.

Hodnota T_m byla stanovena na 54,8 °C pro Δ ZmALDH12; 54 °C pro C330A; 54,7 °C pro E205A a 56,1 °C pro K329A.

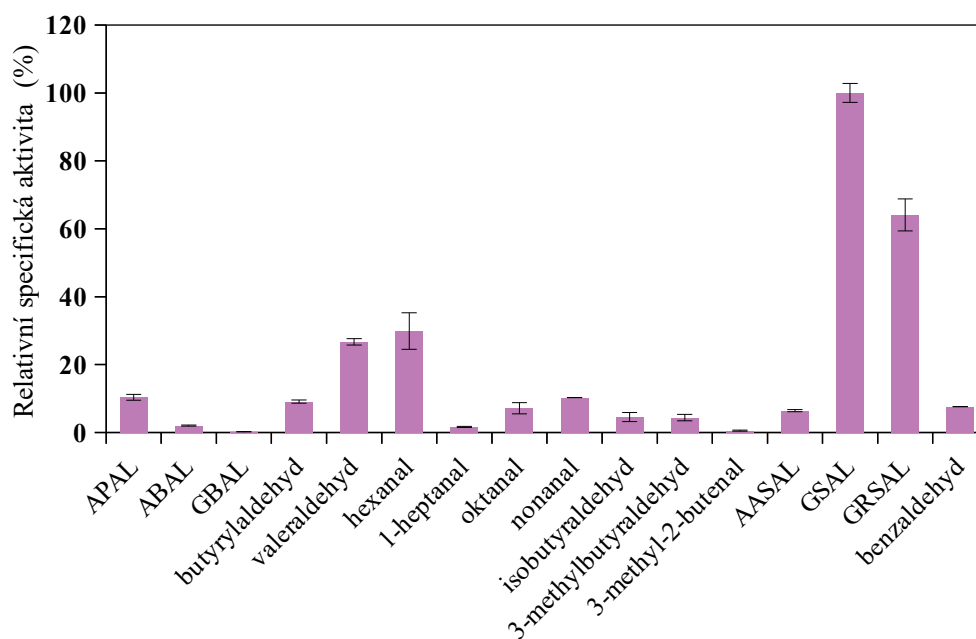


Obr. 12 Výsledky termostability. V grafu jsou vyznačeny teploty, při nichž byla zjištěna denaturace poloviny struktury (T_m). Vysvětlivky: C330A = Δ ZmALDH12 s nahrazeným cysteinem 330 za alanin; dZmALDH12 = aldehyddehydrogenasa rodiny 12 ze *Zea mays*; E205A = Δ ZmALDH12 s nahrazenou glutamát 205; K329A = Δ ZmALDH12 s nahrazeným lysinem 329 za alanin.

4.5 Substrátová specifická

Substrátová specifická byla stanovena se substráty (viz. Tab. 2) o koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Porovnání specifických aktivit s různými aldehydy je vyneseno v grafu (Obr. 13); nejvyšší aktivitu vykazovala $\Delta\text{ZmALDH12}$ se substrátem GSAL, tato aktivita byla vzata jako 100 % pro porovnání ostatních aktivit.

Aminoaldehydy, přirozené substráty aminoaldehydogenas, nejsou $\Delta\text{ZmALDH12}$ dobře oxidovány. Alifatické aldehydy jsou $\Delta\text{ZmALDH12}$ odbourávány z 30 % vůči GSAL (platí například pro hexanal).



Obr. 13 Výsledky substrátové specifické vztahované k nejvyšší průměrné naměřené aktivitě $\Delta\text{ZmALDH12}$ získané s glutamát- γ -semialdehydem (GSAL). Vysvětlivky: APAL = 3-aminopropinaldehyd, ABAL = 4-aminobutyraldehyd, GBAL = 4-guanidino-2-propionaldehyd, AASAL = aminoadipáldsemialdehyd, GRSAL = glutarátsemialdehyd.

4.6 Kinetická měření

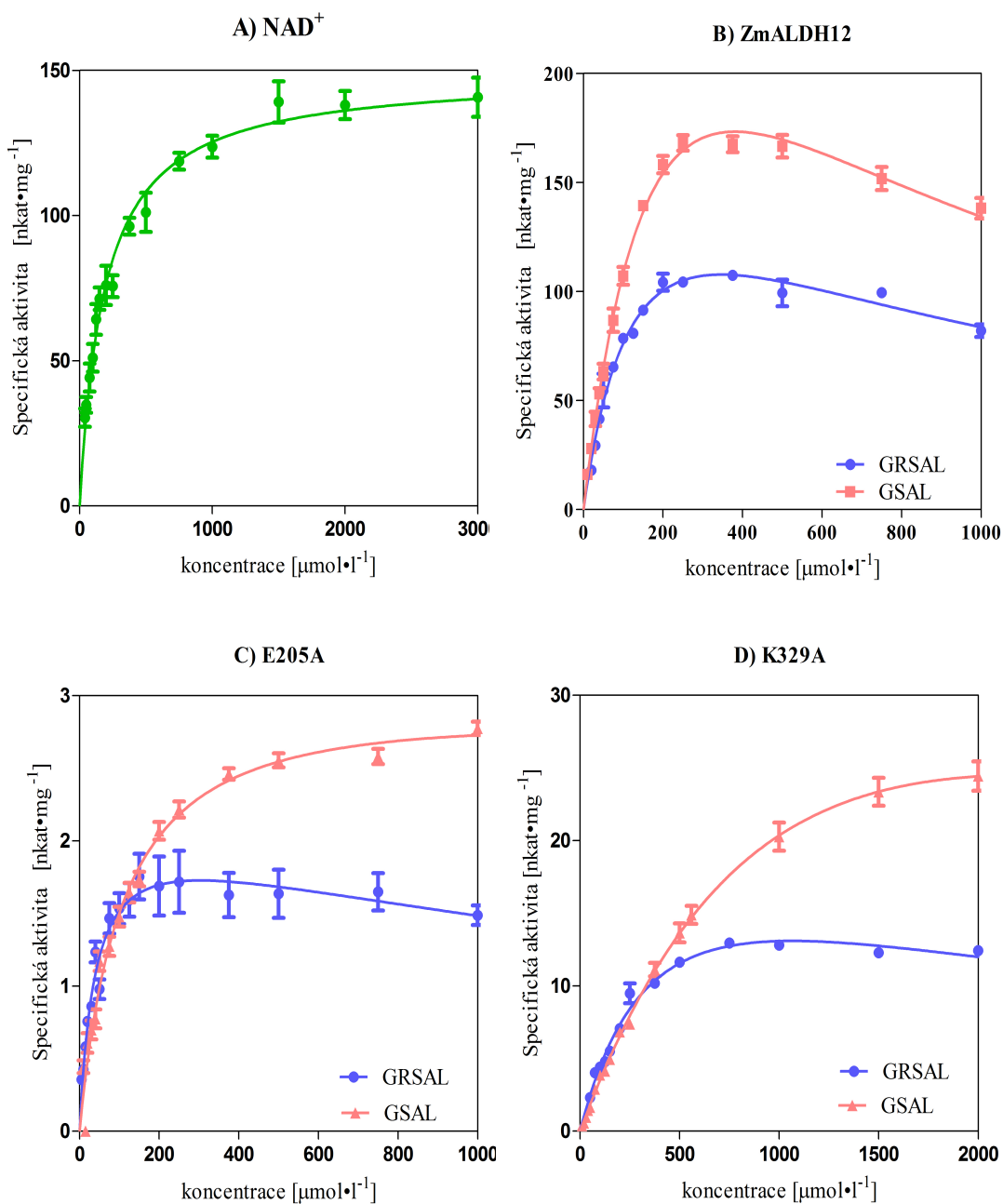
Kinetické parametry (K_m a V_{lim}) byly stanoveny nejen pro $\Delta ZmALDH12$, ale i pro její dvě mutantní formy E205A a K329A. Specifická aktivita mutantní formy C330A s $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ GSAL byla určena jako $9,02\cdot 10^{-3} \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$, proto se dá mutant C330A považovat za neaktivní a nebyl dále charakterizován.

Saturační křivky NAD^+ substrátem GRSAL a $\Delta ZmALDH12$, E205A a K329A se substráty GSAL a GRSAL jsou vyneseny v grafech na Obr. 14, vyhodnocené kinetické parametry enzymů jsou shrnuty v Tab. 3. Hodnota K_m pro NAD^+ se substrátem GRSAL byla stanovena jako $(188,5\pm 11) \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a V_{lim} jako $(149\pm 2,7) \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Zjištěná specifická aktivita s $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ GRSAL při měření s $\Delta ZmALDH12$ byla stanovena jako $82 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$; s E205A $1,49 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ a s K329A $12,8 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Tab. 3 Tabulka zjištěných kinetických parametrů enzymů. Vysvětlivky: C330A = $\Delta ZmALDH12$ s nahrazeným cysteinem 330 za alanin; E205A = $\Delta ZmALDH12$ s nahrazeným glutamátem 205; GSAL=glutamát- γ -semialdehyd; GRSAL = glutarátsemialdehyd; K329A = $ZmALDH12$ s nahrazeným lysinem 329 za alanin; $\Delta ZmALDH12$ = aldehydogenasa rodiny 12 ze *Zea mays*.

	GSAL			GRSAL		
	K_m [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	V_{lim} [$\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$]	V_{lim}/K_m	K_m [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	V_{lim} [$\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$]	V_{lim}/K_m
$\Delta ZmALDH12$	262±25	410±28	1,6	162±23	211±19	1,3
E205	111±16	2,7±0,23	0,02	39±0,12	2,2±0,21	0,06
K329A	1596±250	59±7,7	0,04	428±26	24±2,7	0,06



Obr. 14 Saturační křivky. A) Saturační křivka NAD⁺. B), C) a D) Saturační křivky aldehyddehydrogenasy rodiny 12 ze *Zea mays* (ZmALDH12), E205A a K329A se substráty (GSAL) a glutarátsemialdehydem (GRSAL). Vysvětlivky: C330A = ZmALDH12 s nahrazeným cysteinem 330 za alanin; E205A = ZmALDH12 s nahrazenou glutamátem 205; GSAL=glutamát- γ -semialdehyd; GRSAL = glutarátsemialdehyd; K329A = ZmALDH12 s nahrazeným lysinem 329 za alanin; Δ ZmALDH12 = aldehyddehydrogenasa rodiny 12 ze *Zea mays*.

5 DISKUZE

Pomocí gelové permeační chromatografie bylo zjištěno, že $\Delta ZmALDH12$ se vyskytuje v nativním stavu jako homotetramer (223 kDa; 56,5 kDa monomer; Obr. 10 a Obr. 9), což je v souladu s výsledky publikovanými i pro jiné rostlinné ALDH12, např. OsALDH12 (240 kDa; 60,1 kDa monomer) (Forlani *et al.*, 2015) a ALDH12 z brambor (239 kDa; 59,9 kDa) (Forlani *et al.*, 1997).

$\Delta ZmALDH12$ je mitochondriální enzym (Hare a Cress, 1997), pH matrixu mitochondrie je přibližně 7,8 (Porcelli *et al.*, 2005). Zjištěné pH optimum 7,74 pro $\Delta ZmALDH12$ je podobné naměřenému pH optimu 8 pro hALDH4 (Forte-McRobbie a Pietruszko, 1986) a ALDH12 ze sazenic hrachu, kukuřice, fazolí a dýně a brambor (pH 7,3–8,3) (Forlani *et al.*, 1997). Hodnoty pH optima pro rýžovou ALDH12 jsou oproti tomu výrazně nižší (pH 6,7) (Forlani *et al.*, 2015).

$\Delta ZmALDH12$ je při 54,8 °C z poloviny denaturována. Mutanti E205A, K329A a C330A nevykazují výrazné změny v teplotní stabilitě ve srovnání s $\Delta ZmALDH12$. Je zřejmé, že tyto mutace nemají vliv na stabilitu proteinu a že výrazný pokles v aktivitě je způsoben absencí residua v aktivním místě.

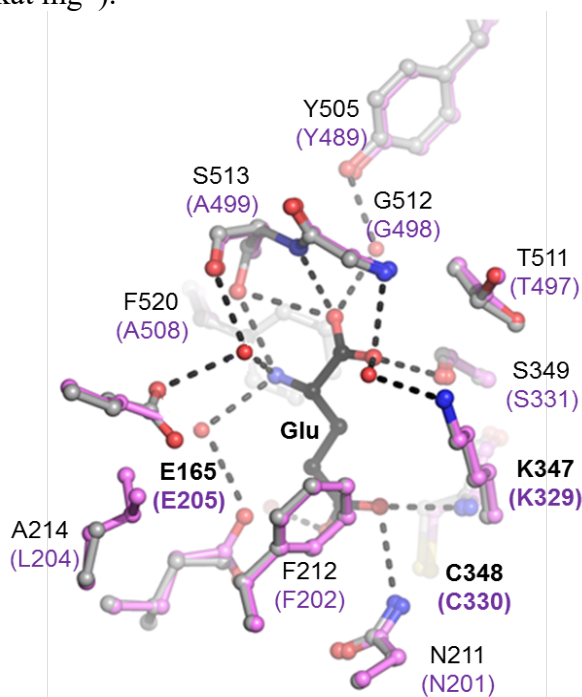
Z grafu substrátové specificity (Obr. 13) je zřejmé, že nejvyšší aktivitu $\Delta ZmALDH12$ vykazuje s GSAL. Aminoaldehydy (3-aminopropionaldehyd, 4-aminobutyraldehyd, 4-guanidino-2-propionaldehyd) nejsou $\Delta ZmALDH12$ účinně přeměňovány; aktivita s 3-aminopropionaldehydem dosahovala 9,1 %. Stejně jako u hALDH4 (Forte-McRobbie a Pietruszko, 1986) nejsou dlouhé alifatické řetězce vhodnými substráty pro $\Delta ZmALDH12$. $\Delta ZmALDH12$ podobně jako MmALDH4 (Pemberton a Tanner, 2013) dobře oxiduje pětiuhlíkaté substráty (GRSAL 62,9 %; valeraldehyd 26,7 %), relativně vysoká aktivita byla zjištěna i s hexanalem (29,8 %), jehož řetězec je o uhlík delší než přirozený substrát GSAL. AASAL, přirozený substrát pro rodinu ALDH7 (Končítíková *et al.*, 2015), je oxidován jen z 6,4 % vůči substrátu GSAL.

Pro stanovení dalších kinetických parametrů byly použity substráty GSAL a GRSAL a výsledky porovnány se třemi mutanty E205A, C330A a K329A (Obr. 15). Se všemi studovanými rekombinantními enzymy byla pozorována inhibice substrátem. Inhibice substrátem je známá i pro krysí ALDH4 (Wong *et al.*, 1985) a hALDH4 (Small a Jones, 1990).

Enzymy z rodin ALDH4/ALDH12 vykazují vysokou míru odlišnosti mezi jednotlivými rostlinnými druhy, co se naměřených kinetických parametrů týče. Hodnota $K_m = 262 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ stanovená pro GSAL je nižší než hodnota K_m stanovené pro OsALDH12 ($K_m = 358 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Forlani *et al.*, 2015), krysí ALDH4 ($K_m = 830 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Wong *et al.*, 1985) a bramborové ALDH12 ($K_m = 464 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Forlani *et al.*, 1997), ale zároveň vyšší než hodnota K_m stanovené pro hALDH4 ($K_m = 170 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Small a Jones, 1990). Podobně hodnota $K_m = 162 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ stanovená pro GRSAL je vyšší než hodnota K_m stanovené pro hALDH4 ($K_m = 44 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Small a Jones, 1990). Obecně platí, že enzymy rodin ALDH12/ALDH4 mají vyšší afinitu k substrátu GRSAL než GSAL. Pokud ale porovnáme relativní poměry V_{lim}/K_m , je patrné, že GSAL je lepším substrátem než GRSAL (Tab. 3).

Aminokyseliny cystein a glutamát jsou napříč ALDH rodinami vysoce konzervovány v aktivním místě (Jones *et al.*, 1987; Farrés *et al.*, 1995; Riveros-Rosas *et al.*, 2013). Při odstranění residua Cys330 poklesla aktivita na 0,011 %, cystein 330 je tedy katalytickým centrem $\Delta\text{ZmALDH12}$ stejně jako cysteiny u hALDH4 (Srivastava *et al.*, 2012) nebo TtALDH4 (Inagaki *et al.*, 2006), nukleofilně napadající substrát.

Po nahrazení glutamátu 205 za alanin ztrácí rekombinantní protein vodíkovou vazbu na aminoskupinu substrátu GSAL. Tato mutace se projevuje výrazně na rychlosti reakce samotné ($V_{\text{lim}} = 2,2 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$).



Obr. 15 Model aktivního místa hALDH4. Černě jsou napsána residua aktivního místa hALDH4, fialově pak residua $\Delta\text{ZmALDH12}$, účastníci se v aktivním místě stejné interakce.

Lysin 329 tvoří vodíkovou vazbu s karboxylovou skupinou substrátu GSAL (GRSAL). V případě, že lysin je nahrazen alaninem, substrát není v aktivním místě stabilizován, což potvrzuje vyšší naměřená hodnota K_m ($K_{m \text{ GSAL}}=1596 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $K_{m \text{ GRSAL}}=427,7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Podobně je zřejmé i z rychlosti přeměny ($V_{\text{lim GSAL}}=23,6 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$; $V_{\text{lim GRSAL}}=59,2 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$), že mutant K329A nekatalyzuje reakci se stejnou účinností jako přirozená $\Delta\text{ZmALDH12}$.

Z porovnání relativních poměrů V_{lim}/K_m je zřejmé, že GRSAL je lepším substrátem než GSAL pro oba mutanty E205A i K329A.

Na základě naměřených dat můžeme říct, že nejen cystein 330 je pro aktivitu esenciální residuum, ale i glutamát 205 a lysin 329 hrají důležitou roli při vazbě substrátu.

6 ZÁVĚR

- Byla vypracována literární rešerše zadané problematiky, zahrnující metabolismus prolinu a jeho regulace, metabolismus argininu a enzymy ALDH4 a ALDH12, přesněji jejich kinetické vlastnosti, substrátovou specificitu, mechanismus reakce a strukturu.
- Enzym $\Delta ZmALDH12$ i její mutantní formy byly úspěšně exprimovány v *Escherichia coli* a následně purifikovány afinitivní a gelovou permeační chromatografií.
- Přečištěné enzymy byly dále charakterizovány – bylo určeno pH optimum a teplotní stabilita, byla změřena substrátová specificita a byly stanoveny kinetické parametry se substráty GRSAL a GSAL, s nimiž studované enzymy vykazovaly nejvyšší aktivitu.
- Bylo zjištěno, že cystein 330 je nezbytný pro katalýzu, neboť po jeho odstranění byly naměřené aktivity téměř nulové. Pro katalýzu jsou důležité i residua glutamátu 205 a lysinu 329, ne však nezbytná.

7 LITERATURA

- Adams E., Chang Y.F. (1971): Preparation and assay of glutaric semialdehyde. *Methods in Enzymology* **17**, 171-173.
- Bartels D., Sunkar R. (2005): Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* **24**, 23-58.
- Borek S., Morkunas I., Ratajczak W., Ratajczak L. (2001): Metabolism of amino acids in germinating yellow lupin seeds III. Breakdown of arginine in sugar-starved organs cultivated *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum* **23**, 141-148.
- Borsani O., Zhu J., Verslues P.E., Sunkar R., Zhu J.K. (2005): Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* **123**, 1279-1291.
- 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**, 248-254.
- Brocker 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**, 189-210.
- Chiang H.-H., Dandekar A.M. (1995): Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant, Cell & Environment* **18**, 1280-1290.
- Choudhary N.L., Sairam R.K., Tyagi A. (2005): Expression of Δ^1 -pyrroline 5-carboxylate synthase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **42**, 366-370.
- Delauney A.J., Hu C.A., Kavi Kishor P. B., Verma D.P.D. (1993): Cloning of ornithine δ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 18673-18678.
- Deuschle K., Funck D., Hellmann H., Däschner K., Binder S., Frommer W.B. (2001): A nuclear gene encoding mitochondrial Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The Plant Journal* **4**, 345-355.
- Fabro G., Kovács I., Pavet V., Szabados L., Alvarez M.E. (2004): Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interaction Journal* **17**, 343-350.
- Farrés J., Wang T.T.Y., Cunningham S.J., Weiner H. (1995): Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**, 2592-2598.
- Fichman Y., Gerdes S.Y., Kovács H., Szabados L., Zilberstein A., Csonka L.N. (2015): Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biological Reviews* **90**, 1065-1099.
- Forlani G., Bertazzini M., Zarattini M., Funck D. (2015): Functional characterization and expression analysis of rice δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase provide new insight into the regulation of proline and arginine catabolism. *Frontiers in Plant Science* **6**:591. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00591/full>.
- Forlani G., Scainelli D., Nielsen E. (1997): Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from cultured cells of potato. *Plant Physiology* **113**, 1413-1418.
- Forte-McRobbie C.M., Pietruzsko R. (1986): Purification and characterization of human liver „high K_m “ aldehyde dehydrogenase and its identification as glutamic gamma-semialdehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* **261**, 2154-2163.
- Gao C., Han B. (2009): Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in rice (*Oryza sativa*). *Gene* **431**, 86-94.

- Geraghty M.T., Vaughn D., Nicholson A.J., Lin W.W., Jimenez-Sanchez G., Obie C., Flynn P.M., Valle D., Hu C.A. (1998): Mutations in the Δ^1 -pyrroline 5-carboxylate dehydrogenase gene cause type II hyperprolinemia. *Human Molecular Genetics* **7**, 1411-1415.
- González-Segura L., Riveros-Rosas H., Díaz-Sánchez A.G., Julián-Sánchez A., Muñoz-Clares R.A. (2013): Potential monovalent cation-binding sites in aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions* **202**, 41-50.
- Grishin Lab: <http://prodata.swmed.edu/Lab/Rossmann3x3.htm> (18.3.2018).
- Hare P.D., Cress W.A. (1997): Metabolic implication of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**, 79-102.
- Heldt H.W., Piechulla B., Heldt F. (2011): *Plant biochemistry*. 4th ed., Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko, 622 stran.
- Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z., Verma D.P.S. (2000): Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* **122**, 1129-1136.
- Hu C.A., Delauney A.J., Verma D.P.S. (1992): A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **89**, 9354-9358.
- Hu C.A., Lin W.W., Valle D. (1996): Cloning, characterization, and expression of cDNAs encoding human Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 9795-9800.
- Inagaki E., Ohshima N., Sakamoto K., Babayeva N. D., Kato H., Yokoyama S., Tahirov T. H. (2007): New insights into the binding mode of coenzymes: structure of *Thermus thermophilus* Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase complexed with NADP⁺. *Acta Crystallographica* **63**, 462-465.
- Inagaki E., Ohshima N., Takahashi H., Yokoyama C.K.S., Tahirov T.H. (2006): Crystal structure of *Thermus thermophilus* Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology* **362**, 490-501.
- Jacquet H., Raux G., Thibaut F., Hecketsweiler B., Houy E., Demilly C., Haouzir S., Allio G., Fouldrin G., Drouin V., Bou J., Petit M., Campion D., Frébourg T. (2002): PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Human Molecular Genetics* **11**, 2243-2249.
- Jones K.H., Lindahl R., Baker D.C., Timkovich R. (1987): Hydride transfer stereospecificity of rat liver aldehyde dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 10911-10913.
- King J.E., Gifford D.J. (1997): Amino acid utilization in seeds of poplar pine during germination and early seedling growth. *Plant Physiology* **113**, 1125-1135.
- Kiyosue T., Yoshida Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1996): A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **8**, 1323-1335.
- Kodíček M., Valentová O., Hýnek R. (2015): *Biochemie chemický pohled na biologický svět*. 1st ed., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, Česká republika, 399 stran.
- Končítiková R., Vigouroux A., Kopečná M., Andree T., Bartoš T., Šebela M., Moréra S., Kopečný D (2015): Role and structural characterization of plant aldehyde dehydrogenases from family 2 and family 7. *Biochemical Journals* **468**, 109-123.
- Korasick D.A., Gamage T.T., Christgen S., Stiers K.M., Beamer L.J., Henzl M.T., Becker, D.F., Tanner, J.J. (2017): Structure and characterization of a class 3B proline utilization A: Ligand-induced dimerization and importance of the C-terminal domain for catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 9652-9665.
- Kotchoni S.O., Jimenez-Lopez J.C., Gao D., Edwards V., Gachomo E.W., Margam V.M., Seufferheld M.J. (2010): Modeling-dependent protein characterization of the rice aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily reveals distinct functional and structural features. *PLOS One* **5**:7 <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0011516>.
- Lagautriere T., Bashiri G., Baker E.N (2015): Use of a "silver bullet" to resolve crystal lattice

- dislocation disorder: A cobalamin complex of Delta (1)-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Structural Biology* **189**, 153-157
- Larson J.D., Jenkins J.L., Schuermann J.P., Zhou Y., Becker D.F., Tanner J.J. (2006): Crystal structures of the DNA-binding domain of *Escherichia coli* proline utilization A flavoprotein and analysis of the role of Lys9 in DNA recognition. *Protein Science* **15**, 2630-2641.
- Lindahl R. (1992): Aldehyde Dehydrogenases and Their Role in Carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 283-335.
- Ling M., Allen S.W., Wood J.M. (1994): Sequence analysis identifies the proline dehydrogenase and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase domains of the multifunctional *Escherichia coli* PutA protein. *Journal of Molecular Biology* **243**, 950-956.
- Liu H., Heath S.C., Sobin C., Roos J.L., Galke B.L., Blundell M.L., Lenane M., Robertson M., Wijsman E.M., Rapoport J.L., Gogos J.A., Karayiorgou M. (2002): Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **99**, 3717-3722.
- Luo M., Singh R.K., Tanner J.J. (2013): Structural determinants of oligomerization of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase: identification of a hexamerization hot spot. *Journal of Molecular Biology* **17**, 3106-3120.
- Marchitti S.A., Brocker C., Stagos D., Vasiliou V. (2008): Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **4**, 697-720.
- Menzel R., Roth J. (1981): Purification of the putA gene product. A bifunctional membrane-bound protein from *Salmonella typhimurium* responsible for the two-step oxidation of proline to glutamate. *The Journal of Biological Chemistry* **256**, 9755-9761.
- Murray R.K., Bender D.A., Botham K., Kennelly P.J., Rodwell V.W., Weil P.A. (2012): *Harperova ilustrovaná biochemie*. Přeložil Bohuslav Matouš. 5. české vydání, 1. v nakladatelství Galén, Galén, Praha, Česká republika, 730 stran.
- Nadler J.V., Wang A., Hakim A. (1988): Toxicity of L-proline toward rat hippocampal neurons. *Brain Research* **456**, 168-172.
- Ostrovsky de Spicer P., Maloy S. (1993): PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **90**, 4295-4298.
- Pardha Sahardi P., Alia Alora S., Prasad K.V.S.K. (1995): Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **209**, 1-5.
- Pemberton T.A., Srivastava D., Sanyal N., Henzl M.T., Becker D.F., Tanner J.J. (2014): Structural studies of yeast Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (ALDH4A1): active site flexibility and oligomeric state. *Biochemistry* **53**, 1350-1359.
- Pemberton T.A., Tanner J.J. (2013): Structural basis of substrate selectivity of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (ALDH4A1): Semialdehyde chain length. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **538**, 34-40.
- Peng Z., Lu Q., Verma S.D.P. (1996): Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Molecular Genetics and Genomics* **253**, 334-341.
- Perez-Miller S.J., Hurley T.D. (2003): Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **42**, 7100-7109.
- Porcelli A.M., Ghelli A., Zanna C., Pinton P., Rizzuto R., Rugolo M. (2005): pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **326**, 799-804.
- Rao S.T., Rossmann M.G. (1973): Comparison of Super-secondary Structures in Proteins. *Journal of Molecular Biology* **76**, 241-250.
- Ratzkin B., Roth J. (1978): Cluster of genes controlling proline degradation in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **133**, 744-754.

- Riveros-Rosas H., González-Segura L., Julián-Sánchez A., Díaz-Sánchez A.G., Muñoz-Clares R.A. (2013): Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions* **202**, 51-61.
- Rodrigues S.M., Andrade M.O., Gomes A.P.S., DaMatta M.F., Baracat-Pereira M.C., Fontes E.P.B. (2006): Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1909-1918.
- Rodríguez-Zavala J.S., Weiner H. (2002): Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. *Biochemistry* **41**, 8229-8237.
- Saigal D., Cunningham S.J., Farrés J., Weiner H. (1991): Molecular cloning of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene of *Saccharomyces cerevisiae* by genetic complementation. *Journal of Bacteriology* **173**, 3199-3208.
- Schat H., Sharma H.S., Vooijs S.R. (1997): Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **101**, 477-482.
- Schwacke R., Grallath S., Breikreuz K.E., Stransky E., Stransky H., Frommer B.F., Rentsch D. P. (1999): LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and γ -amino butyric acid in tomato pollen. *The Plant Cell* **11**, 377-391.
- Sheikh S., Ni L., Hurley T.D., Weiner H. (1997): The potential roles of the conserved amino acids in human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 18817-18822.
- Singh H., Arentson B.W., Becker D.F., Tanner, J.J. (2014): Structures of the PutA peripheral membrane flavoenzyme reveal a dynamic substrate-channeling tunnel and the quinone-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **111**, 3389-3394.
- Slocum R.D. (2005): Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 729-745.
- Small W.C., Jones M.E. (1990): Pyrroline 5-carboxylate dehydrogenase of the mitochondrial matrix of rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 18668-18672.
- Solomon A., Beer S., Waisel Y., Jones G.P., Paleg L.G. (1994): Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. *Physiologia Plantarum* **90**, 198-204.
- Sophos N.A., Pappa A., Ziegler T.L., Vasiliou V. (2001): Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chemico-Biological Interactions* **130**, 323-337.
- Srivastava D., Schuermann J.P., White T.A., Krishnan N., Sanyal N., Hura G.L., Tan A., Henzl M.T., Becker D.T., Tanner J.J. (2010): Crystal structure of the bifunctional proline utilization A flavoenzyme from *Bradyrhizobium japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **16**, 2878-2883.
- Srivastava D., Singh R.K., Moxley M.A., Henzl M.T., Becker D.F., Tanner J.J. (2012): The three-dimensional structural basis of type II hyperprolinemia. *Journal of Molecular Biology* **420**, 176-189.
- Tylichová M., Briozzo P., Kopečný D., Ferrero J., Morera S., Joly N., Snégaroff J., Šebela M. (2008): Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum*. *Acta Crystallographica* **64**, 88-90.
- van Rensburg L., Krüger G.H.J., Krüger H. (1993): Proline accumulation as drought-tolerance selection criterion: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology* **141**, 188-194.
- Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K.F., Nebert D.W. (1999): Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping, *Pharmacogenetics* **9**, 421-434.
- Vasiliou V., Nebert D.W. (2005): Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human Genomics* **2**, 138-143.
- Verbruggen N., Hua X.J., May M., Van Montagu M. (1996): Environmental and developmental

- signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **93**, 8787-8791.
- Voet D., Voet J.G., Pratt Ch.W. (2006): *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 2nd ed., John Wiley and Sons, Hoboken, U.S.A., 1130 stran.
- Wang X., Weiner H. (1995): Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**, 237-243.
- Williams I., Frank L. (1975): Improved chemical synthesis and enzymatic assay of N -pyrroline-5-carboxylic acid. *Analytical Biochemistry* **64**, 85-97.
- Winter G., Todd C.D., Trovato M., Forlani G., Funck D. (2015): Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**:524. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00534/full>.
- Wong P.T.-H., Teo W.L., Leong S.F. (1985): Some characteristics of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in rat cerebellum. *Neurochemistry International* **7**, 45-49.
- Wymore T., Hempel J., Cho S.S., MacKerell A.D., Jr., Nicholas H.B., Jr., Deerfield D.W. (2004): Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenase and mechanism of nucleophile activation. *Proteins* **57**, 758-771.
- Yang Y., Zhang F.-S., Li H.-F., Jiang R.-F. (2009): Accumulation of cadmium in the edible parts of six vegetable species grown in Cd-contaminated soils. *Journal of Environmental Management* **90**, 1117-1122.
- Yoon K.-A., Nakamura Y., Arakawa H. (2004): Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *Journal of Human Genetics* **49**, 134-140.
- Yoshihara Y., Kiyosue T., Katagiri T., Ueda H., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Harada Y., Shinozaki K. (1995): Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase and accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal* **7**, 751-760.
- Yoshida A., Rzhetsky A., Hsu L.C., Chang C. (1998): Human aldehyde dehydrogenase gene family. *European Journal of Biochemistry* **251**, 549-557.
- Yoval-Sánchez B., Pardo J.P., Rodríguez-Zavala J.S. (2013): New insights into the half-of-the-sites reactivity of human aldehyde dehydrogenase 1A1. *Proteins* **81**, 1330-1339.
- Zhang C., Lu Q., Verma D.P.S. (1995): Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 20491-20496.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALDH4	aldehyddehydrogenasa rodiny 4
ALDH12	aldehyddehydrogenasa rodiny 12
AtALDH12	aldehyddehydrogenasa rodiny 12 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
BjPutA	peptid „prolin utilization A“ z <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
BSA	hovězí sérový albumin
C330A	aldehyddehydrogenasa rodiny 12 ze <i>Zea mays</i> s nahrazeným cysteinem 330 za alanin
E205A	aldehyddehydrogenasa rodiny 12 ze <i>Zea mays</i> s nahrazeným glutamátem 205 za alanin
EcPutA	peptid „prolin utilization A“ z <i>Escherichia coli</i>
GABA	γ -aminomaselná kyselina
GSAL	glutamát- γ -semialdehyd
GRSAL	glutarátsemialdehyd
hALDH4	lidská aldehyddehydrogenasa rodiny 4
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
KPB	draselno-fosfátový pufr
LB	médium Luria-Bertani
MmALDH4	myší aldehyddehydrogenasa rodiny 4
K329A	aldehyddehydrogenasa rodiny 12 ze <i>Zea mays</i> s nahrazeným lysinem 329 za alanin
kat	katal, jednotka katalytické aktivity, 1 kat = 1 mol·s ⁻¹
OsALDH12	aldehyddehydrogenasa rodiny 12 z <i>Oryza sativa</i>
P5C	pyrrolin-5-karboxylát
P5CDH	pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa
P5CS	pyrrolin-5-karboxylátsyntasa
P5CR	pyrrolin-5-karboxylátreduktasa
PPB	pyrofosfátový pufr
ProDH	prolindehydrogenasa
psi	jednotka tlaku („pound per square inch“); 1 psi = 6894,76 Pa
PutA	peptid „prolin utilization A“
ROS	reaktivní formy kyslíku
StPutA	peptid „prolin utilization A“ z <i>Salmonella typhimurium</i>
T _m	teplota tání enzymu
TtALDH4	aldehyddehydrogenasa rodiny 4 z <i>Thermus thermophilus</i>
ZmALDH12	aldehyddehydrogenasa rodiny 12 ze <i>Zea mays</i>