

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium aktivního místa aldehyddehydrogenasy 2A z mechu *Physcomitrella patens*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Tereza Libigerová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Rok:	2018

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

.....

Tereza Libigerová

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu práce Mgr. Davidu Kopečnému, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při zpracování diplomové práce. Děkuji také Mgr. Martině Kopečné, Ph.D., Mgr. Evě Hájkové a Mgr. Radce Končitíkové, Ph.D. za všestrannou pomoc při plnění experimentální části práce. Práce byla podpořena projekty GAČR 15-22322S a 18-07563S a studentské grantové soutěže UP IGA_PrF_2017_016 a IGA_2018_033.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Libigerová
Název práce	Studium aktivního místa aldehyddehydrogenasy 2A z mechu <i>Physcomitrella patens</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá studiem aktivního místa aldehyddehydrogenasy 2A (ALDH2A) z mechu *Physcomitrella patens*. Teoretickou část tvoří rešerše znalostí o mechu *P. patens*, nadrodině rostlinných aldehyddehydrogenas, rodině rostlinných aldehyddehydrogenas 2 a metabolismu aldehydů. V praktické části byla provedena místně-řízená mutageneze genu $\Delta PpALDH2A$, exprese mutantů v *Escherichia coli* a purifikace rekombinantních proteinů afinitní chromatografií. U všech rekombinantních variant PpALDH2A byla ověřena sekundární struktura a teplotní stabilita. Dále byla studována jejich substrátová specificita k vybraným alifatickým a aromatickým aldehydům. Pro dva nejvýznamnější substráty byly změřeny saturační křivky a určeny hodnoty K_m , V_{lim} a katalytická účinnost (V_{lim}/K_m). Ve výsledcích je diskutován význam jednotlivých aminokyselinových reziduí v aktivním místě enzymu.

Klíčová slova	Aldehyddehydrogenasa 2A, <i>Physcomitrella patens</i> , metabolismus aldehydů, mutageneze, enzymová kinetika
Počet stran	68
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Tereza Libigerová
Title	Study on the active site of aldehyd dehydrogenase 2A from moss <i>Physcomitrella patens</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

The diploma thesis is focused on a study of the active site of aldehyde dehydrogenase 2A from moss *Physcomitrella patens*. The theoretical part summarizes the knowledge of the moss *P. patens*, plant aldehyde dehydrogenase superfamily, plant aldehyde dehydrogenase from family 2 and metabolism of aldehydes. The practical part is aimed at site-directed mutagenesis of $\Delta PpALDH2A$ gene, mutant expression in *Escherichia coli* and purification of recombinant proteins by affinity chromatography. Secondary structure and thermal stability of recombinant variants of PpALDH2A were verified. Moreover, substrate specificity towards aliphatic and aromatic aldehydes was studied. Saturation curves for the two most significant substrates were measured and kinetic parameters K_m , V_{lim} and a catalytic efficiency (V_{lim}/K_m) were determined. A significance of the individual amino acid residues in the active site of enzyme is discussed in results.

Keywords	Aldehyde dehydrogenase 2A, <i>Physcomitrella patens</i> , aldehyde metabolism, mutagenesis, enzyme kinetics
Number of pages	68
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod	9
2 Současný stav řešené problematiky	10
2.1 <i>Physcomitrella patens</i>	10
2.1.1 Životní cyklus	10
2.1.2 Studium evoluce rostlin	11
2.2 Aldehyddehydrogenasy	13
2.2.1. ALDH ve <i>Physcomitrella patens</i>	15
2.2.2 ALDH2	16
2.3 Aldehydy	21
2.3.1 Biosyntéza aldehydů	21
2.3.1.1 Lipidová peroxidace	21
2.3.1.2 Katabolismus polyaminů	24
2.3.1.3 Ústřední metabolické dráhy	24
2.4 Kinetická měření využívající NAD	28
3 Experimentální část	29
3.1. Materiál	29
3.1.1 Biologický materiál	29
3.1.2 Chemikálie	29
3.1.3 Návodů a kity	30
3.1.4 Přístrojové vybavení	30
3.1.5 Další materiál	31
3.2 Metody	32
3.2.1 Místně specifická mutace genu $\Delta PpALDH2A$	32
3.2.1.1 Mutageneze pomocí PCR	32
3.2.1.2 Amplifikace vektorů v bakteriích	34
3.2.1.3 Screening klonů	34
3.2.2 Produkce rekombinantních proteinů v bakteriích	34
3.2.2.1 Transformace expresních buněk	34
3.2.2.2 Exprese genu $\Delta PpALDH2A$ a jeho mutantních variant	36
3.2.2.3 Optimalizace podmínek exprese	36
3.2.3 Extrakce a purifikace proteinů	37
3.2.3.1 Extrakce proteinů	37
3.2.3.2 Purifikace proteinů	37
3.2.3.3 Stanovení koncentrace proteinů	38
3.2.4 Western blotting a detekce proteinů	39
3.2.5 Gelová permeační chromatografie	39
3.2.6 Cirkulární dichroismus	40
3.2.7 Testování substrátové specificity	40
3.2.8 Stanovení kinetických parametrů	41
3.2.9 Teplotní stabilita	42
4 Výsledky	43
4.1 Místně specifická mutace genu $\Delta PpALDH2A$	43
4.1.1 Mutageneze pomocí PCR	43
4.1.2 Screening plazmidové DNA	43
4.2 Optimalizace podmínek exprese	44
4.3 Purifikace rekombinantních proteinů a jejich detekce	45
4.4 Gelová permeační chromatografie	46
4.5. Stanovení sekundární struktury	47

4.6 Teplotní stabilita	48
4.7 Substrátová specificita	50
4.8 Kinetické parametry	52
5 Diskuse	56
6 Závěr	61
7 Literatura	62
8 Seznam použitých zkratek	65

CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše se zaměřením na mech *Physcomitrella patens*, nadrodinu rostlinných aldehyddehydrogenas, rodinu rostlinných aldehyddehydrogenas 2 a metabolismus aldehydů
- Místně řízená mutageneze genu $\Delta PpALDH2A$, produkce mutantních variant v *Escherichia coli* a purifikace rekombinantních proteinů afinitní chromatografií
- Charakterizace kinetických a molekulových vlastností mutantních variant $\Delta PpALDH2A$

1 ÚVOD

Aldehydy obsahují silně elektrofilní karbonylovou skupinu, díky níž patří mezi vysoce reaktivní molekuly vystupující jako meziprodukty v metabolických drahách. Problémem se stává jejich nadměrné množství, které může být toxické. Z toho důvodu existuje řada enzymů, zejména aldehyddehydrogenasy (ALDH). ALDH jsou NAD(P)⁺-dependentní enzymy, které katalyzují oxidaci aldehydické skupiny na skupinu karboxylovou, metabolizují tak široké spektrum alifatických a aromatických aldehydů na jejich méně reaktivní formy. Hrají tak podstatnou roli v mnoha metabolických procesech.

Physcomitrella patens je první zelený mech, jehož genom byl kompletně sekvencován. Jedná se o modelový organismus s jednoduchým a krátkým životním cyklem, u kterého převládá haploidní fáze, proto je vhodný ke genetickým experimentům. Řadí se mezi mechorosty, které jsou nejstaršími suchozemskými rostlinami, a kromě mechů (*Bryophyta*) do nich spadají také hlevíky (*Anthocerotophyta*) a játrovky (*Marchantiophyta*). *P. patens* má fylogeneticky významnou pozici mezi řasami a semennými rostlinami, což z něj vytváří ideální organismus pro studium evoluce různých druhů rostlin a jejich adaptace na suchozemské podmínky.

Tato diplomová práce se zabývá studiem aktivního místa aldehyddehydrogenasy 2A (ALDH2A) z *P. patens*, jež oxiduje alifatické a aromatické aldehydy. Místně-řízenou mutagenézí genu $\Delta PpALDH2A$ bylo připraveno celkem osm mutantních variant (E174A, A223F, Y226A, Q248A, Q248E, Y348A, M353A a L511A), u kterých byla bodovou mutací nahrazena určitá aminokyselina v aktivním místě enzymu. Tato rezidua byla vybrána na základě analýzy dosud nepublikované krystalové struktury enzymu. Na základě struktury vazebného místa pro koenzym bylo vybráno aminokyselinové reziduum Q248. Následným srovnáním přirozené a mutantní formy lze určit úlohu konkrétních aminokyselin v proteinu, které se podílí na jeho kinetických vlastnostech. Mutantní varianty byly produkovány v bakteriálním expresním systému a purifikovány afinitní chromatografií. Dostatečná čistota proteinů byla potvrzena pomocí SDS-PAGE a sekundární struktura byla ověřena cirkulárním dichroismem. Spektrofotometricky byly testovány změny v substrátové specificitě, teplotní stabilitě a kinetických parametrech u jednotlivých mutantních forem.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Physcomitrella patens*

Physcomitrella patens neboli čepenka odstálá je druhem zeleného mechu, který patří do čeledi zkrutkovité (*Funariaceae*), řádu zkrutkotvaré (*Funariales*), třídy mechy (*Bryopsida*) a oddělení mechorosty (*Bryophyta*). *P. patens* je široce rozšířen v mírném podnebném pásu, zejména v Severní Americe a Evropě (včetně České republiky), ale také v Japonsku a jižní Austrálii. Jedná se o efemérní druh, jenž se vyskytuje především v okolí vlhkých míst, jako jsou břehy rybníků, jezer a řek (McDaniel *et al.*, 2010; Prigge a Bezanilla, 2010).

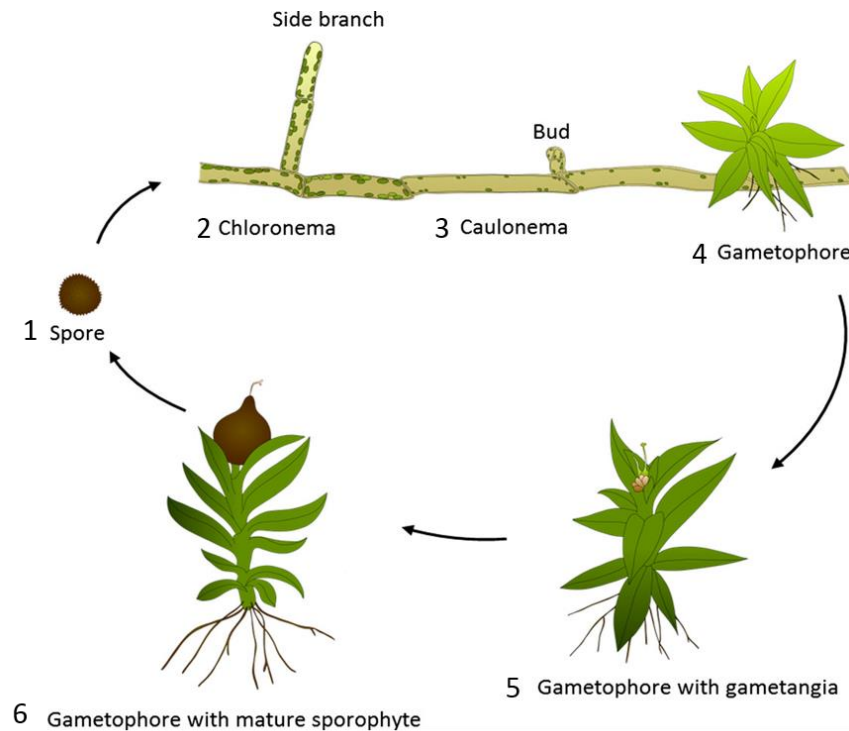
P. patens patří mezi významné modelové organismy. Jedná se o první mech s kompletně osekvcovaným genomem (Rensing *et al.*, 2008), který se využívá například ke studiu evoluce rostlin nebo biologických procesů v rostlinách, jako je sekundární metabolismus či mechanismus rezistence vůči stresu (Müller *et al.*, 2016).

2.1.1 Životní cyklus

U rostlin dochází ke střídání generací mezi diploidním sporofytem a haploidním gametofytem. Na rozdíl od cévnatých rostlin, u kterých převažuje sporofyt, jehož funkcí je tvorba a distribuce spor, u mechů převládá gametofyt. Jeho primárním úkolem je tvorba pohlavních orgánů (Müller *et al.*, 2016).

P. patens má jednoduchý a krátký životní cyklus (Obrázek 1). Fáze gametofytu začíná uvolněním haploidní spory z tobolek. Spora za příznivých okolních podmínek klíčí ve vláknité protonema (prvoklíček). Existují dva typy protonematu. Prvním je chloronema, jehož buňky obsahují velké množství chloroplastů. Druhým typem je caulonema, tvořící delší a užší buňky, které jsou na chloroplasty chudé. Protonema se prodlužují mitotickým dělením apikálních buněk a větví se dělením subapikálních buněk, což vede k tvorbě pupenu, který vytváří gametofor (rostlinku). Gametofor lze rozdělit na útvary analogické s orgány vyšší rostlin, a to rhizoidy (přichytná vlákna), kaluloid (lodyžka) a fylويدy (lístky). Na gametoforech dochází k tvorbě gametangií (pohlavních orgánů). Samčím gametangiem je antheridium neboli pelatka, produkující samčí pohlavní buňky, dvojbičíkaté spermatozoidy. Samičím gametangiem je archegonium neboli zárodečník, produkující samičí pohlavní buňku, nepohyblivou oosféru. Jeden gametofor produkuje jak samčí, tak samičí pohlavní buňky. Díky

přítomnosti bičíků se spermatoziody ve vodním prostředí pohybují k oosféře a dochází tak k oplození. Z haploidních gamet vzniká diploidní zygota, čímž začíná fáze diploidního sporofytu. Sporofyt je formován na vrcholu gametofytu, kde vyrostе ve štět s tobolkou, kde se meiózou vytváří spory. Zralé sporofyty se otevírají prasknutím, čímž dojde k uvolnění spory a opakování celého cyklu (Strotbek *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2016; Lang *et al.*, 2018).

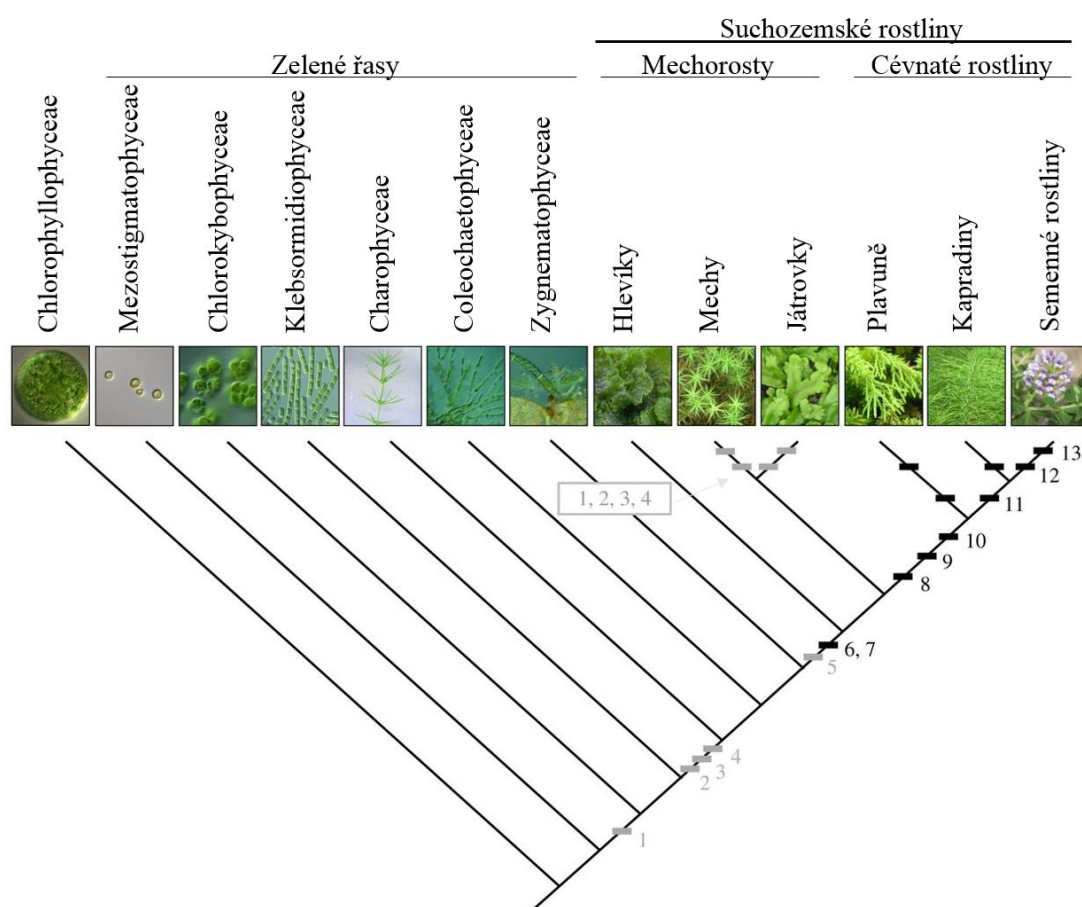


Obrázek 1. Schéma životního cyklu *P. patens*. (1) Spora, (2, 3) protonema skládající se z chloronematu a caulonematu s pupenem, (4) gametofor, (5) gametofor s gametangii, (6) gametofyt se sporofytem (převzato z Lang *et al.*, 2018).

2.1.2 Studium evoluce rostlin

Kolonizace souše rostlinami neboli terestrializace byla jednou z nejvýznamnějších událostí v oblasti historie života na Zemi. Datuje se přibližně do dob před 450-480 miliony let. Tato událost vedla k významným změnám prostředí a iniciovala vývoj celého suchozemského ekosystému, včetně suchozemských organismů. K vývoji prvních suchozemských rostlin (*Embryophyta*) došlo ze zelených řas skupiny *Charophyta* (Obrázek 2). Nejstaršími půdními rostlinami jsou mechorosty (*Bryophyta*), do kterých patří hlevíky, játrovky a mechy. Z mechorostů se později vyvinuly cévnaté rostliny (*Tracheophytes*), a tak nad haploidním gametofytem začal převládat diploidní sporofyt (Wellman *et al.*, 2003; Bowman *et al.*, 2017).

P. patens se od jednobuněčných řas a kvetoucích rostlin oddělil před více než 400 miliony let a jeho pozice z hlediska fylogeneze z něj vytváří ideální modelový organismus pro studium adaptací rostlin spojených s přechodem z vody na souš, jako jsou změny způsobené abiotickým stresem - nedostatek vody, sluneční svit, výkyvy teplot (Brocker *et al.*, 2013). Mech snáší i vyschnutí (desikaci), čímž je oproti cévnatým rostlinám dobře adaptován na nedostatek vody. Srovnávání genomů u různých druhů rostlin představuje různé kroky evoluce a umožňuje rozlišovat rodiny genů, které jsou vysoce konzervované, od nových genomových rodin, které se vyvinuly procesem adaptace.



Obrázek 2. Fylogenetické vztahy zelených rostlin. K vývoji prvních suchozemských rostlin došlo ze zelených řas. Nejstaršími půdními rostlinami jsou mechorosty, do kterých se řadí hlevíky, mechy a játrovky. Poté došlo k vývoji cévnatých rostlin. Na obrázku jsou vyznačeny důležité inovace gametofytu (šedě) a sporofytu (černě). (1) Mnohobuněčnost, (2) plasmodezmata, (3) apikální růst, (4) rhizoidy, (5) 3D růst, (6, 7) spory a sporofyt, (8) rozvětvení sporofytu, (9) axiální (osové) formy, (10) převaha sporofytu, (11) kořeny, (12) listy. (13) axilární (úžlabní) pupeny (převzato a upraveno dle Harrison, 2017).

2.2 Aldehyddehydrogenasy

Aldehyddehydrogenasy (ALDH, EC 1.2.1.3) jsou NAD(P)⁺-dependentní enzymy, které oxidací aldehydicke skupiny na skupinu karboxylovou metabolizují široké spektrum alifatických a aromatických aldehydů na méně reaktivní formy. Hrají tak podstatnou roli v mnoha metabolických procesech. Redukované kofaktory (NADH/NADPH), vzniklé při reakcích katalyzovaných ALDH, slouží k udržování redoxní rovnováhy v buňce. Jejich struktura je typicky dimerická nebo tetramerická a skládá se ze tří domén – katalytické (vázající substrát), kofaktorové a oligomerizační domény. ALDH se vyskytují u všech tří taxonomických domén (*Archaea*, *Bacteria*, *Eukarya*) a jsou hojně zastoupeny prakticky ve všech druzích rostlin. Rostlinné ALDH se nacházejí v různých buněčných kompartmentech, jako jsou mitochondrie, plastidy, endoplasmatické retikulum, peroxisomy a mikrosomy, včetně cytosolu. Rostliny a živočichové, ačkoli jsou evolučně velmi vzdálení, sdílí mnoho *ALDH* genů, které jsou vysoce konzervované, rovněž ale obsahují *ALDH* geny, které jsou pro ně unikátní (Steinmetz *et al.*, 1997; Marchitti *et al.*, 2008; Brocker *et al.*, 2013).

Vasiliou *et al.* (1999) založil systém, podle kterého se ALDH všech prokaryotických i eukaryotických organismů dělí do rodin či podrodin na základě shodnosti aminokyselinových sekvencí proteinů. Proteiny, jejichž sekvence se shodují z více než 40 %, spadají do stejné rodiny. Do stejné podrodiny se řadí proteiny s identitou sekvencí nad 60 %. Základem názvu je symbol ALDH, poté arabská číslice označující rodinu, velké písmeno značící podrodinu a číslo odpovídající jednotlivému genu. Součástí názvu je předpona, která se skládá z prvních písmen latinského rodového a druhového jména, v němž byl daný gen (protein) identifikován. V případě genů se název píše kurzívou. Například *PpALDH2A* označuje aldehyddehydrogenasu z rodiny 2, podrodiny A, z mechu *Physcomitrella patens* a *PpALDH2A* je gen, který ji kóduje.

Na základě podobnosti proteinových sekvencí bylo dodnes klasifikováno 14 rodin rostlinných ALDH, mezi které patří: ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24. Rodiny ALDH10, ALDH12, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24 jsou specifické pro rostliny, kdežto k ostatním existují savčí ortology (Hou a Bartels, 2015). ALDH *Arabidopsis thaliana* byly popsány v Kirch *et al.* (2004), *Oryza sativa* byla dokončena v roce 2010 (Kotchoni *et al.*) a z mechu *Physcomitrella*

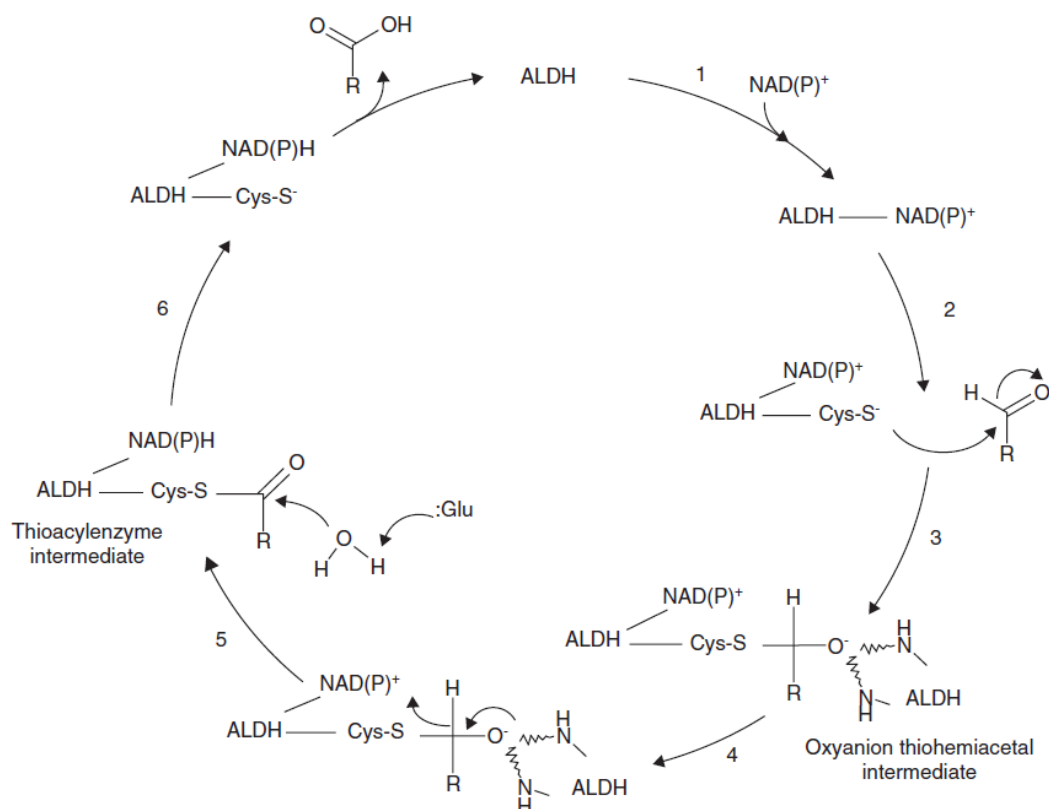
patens a zelených řas *Chlamydomonas reinhardtii* v roce 2009 (Wood a Duff). Celkový počet *ALDH* genů se u daných druhů rostlin značně liší (Tabulka 1), a bylo prokázáno, že se s komplexností rostlin zvyšuje. Mechy a cévnaté rostliny mají přibližně dvojnásobný počet *ALDH* genů ve srovnání s jednobuněčnými řasami (Brocker *et al.*, 2013).

Počet genů narůstal po kolonizaci souše rostlinami. V mnoha případech docházelo k rozšíření počtu genů, které je spojeno se zvyšující se složitostí organismu. Obecně převládaly duplikace genů, ale docházelo také k subfunkcionalizacím (odlišením funkce nového genu od genu ancestrálního) a neofunkcionalizacím (nová funkce nového genu) (Force *et al.*, 1999).

Obecný katalytický mechanismus (Obrázek 3) vychází z krystalografických struktur *ALDH* (Marchitti *et al.*, 2008). Navázáním kofaktoru dochází ke konformační změně a aktivaci katalytického cysteinu, který je umístěn v aktivním místě. Katalytický cystein se chová jako nukleofil, napadá aldehydickou skupinu substrátu a vytváří oxyanion thiohemiacetalový meziprodukt, který je stabilizován pomocí dvou NH skupin asparaginových reziduí. Negativně nabitý kyslík oxyanionového thiohemiacetalového meziproduktu usnadňuje přenos hydridového anionu na koenzym (NAD^+ nebo NADP^+), který je tím redukován a vzniká thioacylenzymový meziprodukt. Glutamát v aktivním místě se chová jako obecná báze, katalyzuje hydrolýzu thioacylového meziproduktu, což vede k uvolnění oxidovaného substrátu (karboxylová kyselina). Nakonec od enzymu oddisociuje redukováný kofaktor. Aminokyselinová rezidua, nezbytná pro vazbu kofaktoru a katalýzu, jsou ve struktuře *ALDH* vysoce konzervovaná (Perozich *et al.*, 2001).

Tabulka 1. Počet genů *ALDH* z rodiny 2 a všech *ALDH* genů identifikovaných u různých druhů rostlin. *ALDH* mechu jsou zvýrazněny tučně (převzato a upraveno dle Brocker *et al.*, 2013).

Druh	Oddělení	<i>ALDH2</i>	<i>ALDH</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i> (huseníček rolní)	Krytosemenné	3	16
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Zelené řasy	1	9
<i>Oryza sativa</i> (rýže setá)	Krytosemenné	5	20
<i>Physcomitrella patens</i> (čepenka odstálá)	Mechorosty	2	21
<i>Populus trichocarpa</i> (topol chlupatoplodý)	Krytosemenné	4	26
<i>Volvox carteri</i>	Zelené řasy	1	7
<i>Zea mays</i> (kukuřice setá)	Krytosemenné	6	22



Obrázek 3. Obecné schéma mechanismu katalýzy ALDH. (1) Navázání koenzymu vedoucí k aktivaci katalytického cysteinu, (2) thiolová skupina atakuje karbonyl substrátu, (3) stabilizovaný oxyanion thiohemiacetalový meziprodukt, (4) přesun hydridového anionu na koenzym, (5) hydrolýza thioacylenzymového intermediátu katalytickým glutamátém, (6) uvolnění produktu a redukováného koenzymu. ALDH - aldehyddehydrogenasa (převzato z Marchitti *et al.*, 2008).

2.2.1. ALDH ve *Physcomitrella patens*

Možnost charakterizovat nové geny se dostavila s kompletním osekvcováním genomu *P. patens*. *P. patens* má mezi řasami a semennými rostlinami fylogeneticky velmi zajímavé postavení, což jej činí důležitým pro genomické analýzy sloužící ke srovnávání evoluce různých druhů rostlin (Rensing *et al.*, 2008). Wood a Duff (2009) poprvé charakterizovali celkem 20 *PpALDH* genů, které rozdělili do deseti rodin. Autoři uvádí, že devět z deseti rodin, do kterých byly *PpALDH* rozčleněny, zahrnují ALDH jak z vodních, tak suchozemských rostlin. Novější studie, vytvořena v roce 2013 (Brocker *et al.*), uvádí, že genom *P. patens* obsahuje 21 *PpALDH* genů, které jsou rozděleny do jedenácti rodin a čtyři z nich (ALDH2, ALDH3, ALDH5 a ALDH11) zahrnují více jak jeden gen (Tabulka 2). V *P. patens* byly identifikovány pouze dva geny *ALDH2*. Nově nalezeným genem je oproti předchozím studiím *PpALDH18*.

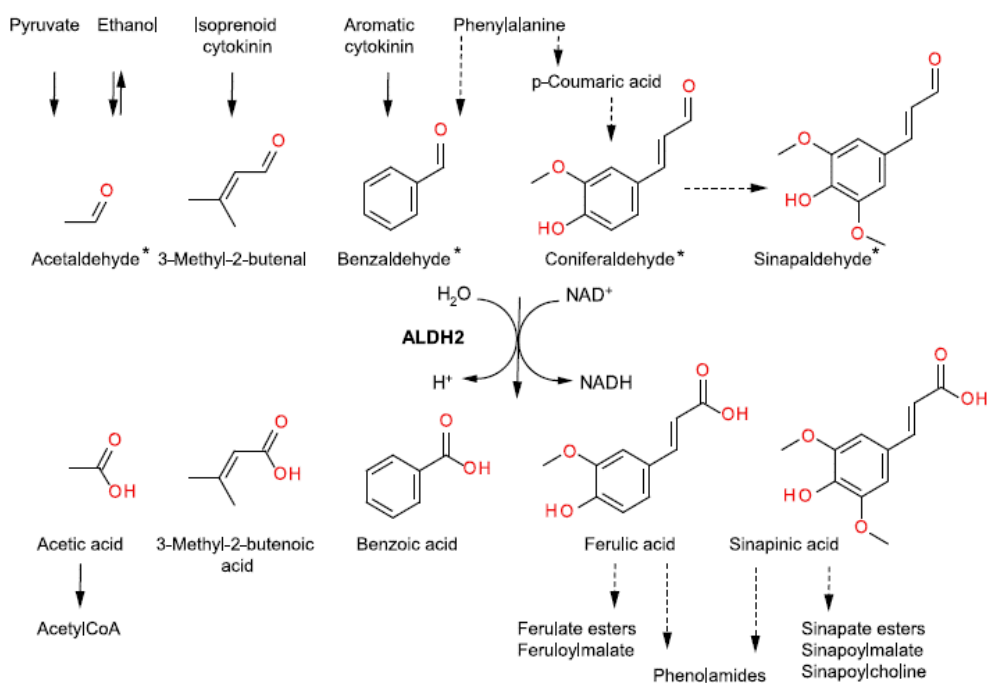
Tabulka 2. Informace o genech a proteinech nadrodiny rostlinných ALDH identifikovaných v *P. patens*. Rodina ALDH2 je zvýrazněna tučně (převzato a upraveno dle Brocker *et al.*, 2013).

Rodina	Název genu	Jiný název	NCBI ID genu	NCBI ID proteinu	Počet AMK
2	<i>ALDH2B1</i>	Pp_Aldh2A	5930606	XP_001767457	553
	<i>ALDH2B2</i>	Pp_Aldh2B	5948865	XP_001785650	535
3	<i>ALDH3H1</i>	Pp_Aldh3A	5928120	XP_001764841	492
	<i>ALDH3H2</i>	Pp_Aldh3E	5943334	XP_001780129	583
	<i>ALDH3K1</i>	Pp_Aldh3B	5920386	XP_001757163	497
	<i>ALDH3K2</i>	Pp_Aldh3D	5930362	XP_001767194	485
	<i>ALDH3K3</i>	Pp_Aldh3C	5933556	XP_001770374	467
5	<i>ALDH5F1</i>	Pp_Aldh5B	5916037	XP_001752876	492
	<i>ALDH5F2</i>	Pp_Aldh5A	5943671	XP_001780466	498
6	<i>ALDH6B1</i>	Pp_Aldh6A	5920495	XP_001757403	574
7	<i>ALDH7B4</i>	Pp_Aldh7A	5941578	XP_001778351	511
10	<i>ALDH10A1</i>	Pp_Aldh10A	5919866	XP_001756623	559
11	<i>ALDH11A5</i>	Pp_Aldh11E	5935487	XP_001772261	504
	<i>ALDH11A1</i>	Pp_Aldh11A	5928282	XP_001765101	503
	<i>ALDH11A2</i>	Pp_Aldh11B	5918399	XP_001755163	496
	<i>ALDH11A3</i>	Pp_Aldh11D	5916920	XP_001753784	496
	<i>ALDH11A4</i>	Pp_Aldh11C	5923860	XP_001760657	496
12	<i>ALDH12A1</i>	Pp_Aldh12A	5923366	XP_001760169	571
18	<i>ALDH18B1</i>	-	5919578	XP_001756289	757
21	<i>ALDH21A1</i>	Pp_Aldh21A	5932362	XP_001769187	497
23	<i>ALDH23A1</i>	Pp_Aldh23A	5918738	XP_001755511	494

2.2.2 ALDH2

Rodina rostlinných ALDH2 (EC 1.2.1-) zahrnuje mitochondriální (mtALDH2) a cytosolické (cALDH2) izoformy, které se dělí do dvou podrodin - ALDH2B a ALDH2C. Strukturně se jedná o homotetramery, které jsou typické svou relativně širokou substrátovou specifitou (Marchitti *et al.*, 2008). S lidskou ALDH2 (HsALDH2), která patří do podrodiny ALDH2A, sdílejí asi 54 - 63 % aminokyselinové sekvence. HsALDH2 figuruje v metabolismu ethanolu, kde katalyzuje přeměnu acetaldehydu na acetát (Klyosov, 1996; Končítíková *et al.*, 2015).

Geny ALDH2 byly studovány u mnoha rostlinných druhů. V kukuřici byly první nalezené *ALDH2* geny popsány jako geny obnovující fertilitu - *RF2* (*RF* - fertility restorer) (Cui *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2001). Liu *et al.* (2001) prokázali, že *RF2* (později nazván *RF2A*) je mtALDH2. V kukuřici byly identifikovány celkem 2 geny - *RF2A* a *RF2B*, které kódují homotetramerní mtALDH. Kinetická měření prokázala, že proteiny RF2A a RF2B mají zcela odlišnou substrátovou specifitu. RF2A oxiduje širokou škálu alifatických a aromatických aldehydů, kdežto RF2B oxiduje pouze alifatické aldehydy s krátkým řetězcem (Liu a Schnable, 2002). Jiné dva *mtALDH2* geny se hojně vyskytují v květenství (lata) rýže *O. sativa* (Nakazono *et al.*, 2000). U tabáku *Nicotiana tabacum* se dvě mtALDH2 akumulují v reprodukčních orgánech a podílejí se na vývoji pylu (op den Camp a Kuhlemeier, 1997). MtALDH2 také můžeme najít u *A. thaliana* (Skibbe *et al.*, 2002). Long *et al.* (2009) charakterizovali mtALDH2 z hledíku většího (*Antirrhinum majus*), která vykazuje benzaldehyddehydrogenasovou aktivitu. Hlavní funkcí všech rostlinných mtALDH2 je katalýza konverze acetaldehydu, který je produkován při fermentaci ethanolu na acetát (Obrázek 4), který je dále využíván na syntézu acetyl-CoA a obchází tak enzym pyruvátdehydrogenasu (Nakazono *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2009).

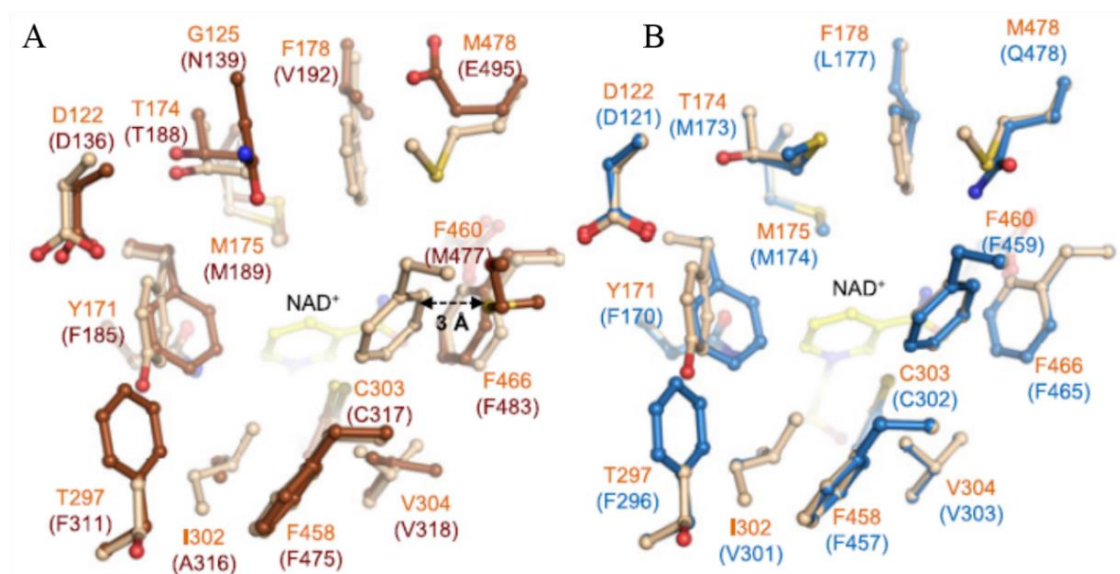


Obrázek 4. Konverze acetaldehydu, 3-methyl-2-butenalu, benzaldehydu, coniferylaldehydu a sinapaldehydu katalyzovaná rostlinnými ALDH2 (převzato z Končítiková *et al.*, 2015). Substráty, které jsou označeny hvězdičkou, byly potvrzeny *in vivo* (Nair *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2009; Mittasch *et al.*, 2013).

Cytosolická ALDH2C4 byla popsána u *A. thaliana* a *Brassica napus* (brukev řepka). Je kódována genem *ref1* (*snižená epidermální fluorescence 1*) a oxidací coniferylaldehydu a sinapaldehydu *in vivo*, které vznikají ve fenylypropanoidové dráze, se tak podílí na biosyntéze ferulové a sinapové kyseliny, které hrají významnou roli při tvorbě esterů ferulátu a sinapátu. Tím je tato cALDH2 spojená se syntézou buněčné stěny a lignifikací (Obrázek 4). Nair *et al.* (2004) prokázali, že *ref1* mutantní rostliny mají redukované hladiny ferulátových esterů v buněčné stěně, a to až o 50 % ve srovnání s wild-typem (WT). Tito mutanti vykazovali snížení aktivity sinapaldehyddehydrogenasy na 20 % oproti WT. Byl vytvořen *fah1* mutant, který postrádá gen kódující ferulát-5-hydroxylasu (ta je zapotřebí k syntéze esterů sinapové kyseliny) a nehromadí metabolity kyseliny sinapové (Chapple *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1996), ale bylo zjištěno, že akumuluje stopová množství feruloylmalátu (Hemm *et al.*, 2003). Dále byly analyzovány extrakty z listů dvojitého mutantu *fah1 ref1* a bylo zjištěno, že neobsahují žádný feruloylmalát (Nair *et al.*, 2004). Tyto experimenty potvrdily, že *ref1* je nezbytný pro syntézu esterů sinapové a ferulové kyseliny, které se podílejí na tvorbě buněčné stěny (Grabber *et al.*, 2000). Nair *et al.* (2004) analyzovali i další rostliny, jako jsou *N. tabacum* a *Raphanus sativus* (ředkev setá), aby potvrdili jejich schopnost syntézy ferulové a sinapové kyseliny z coniferylaldehydu a sinapaldehydu.

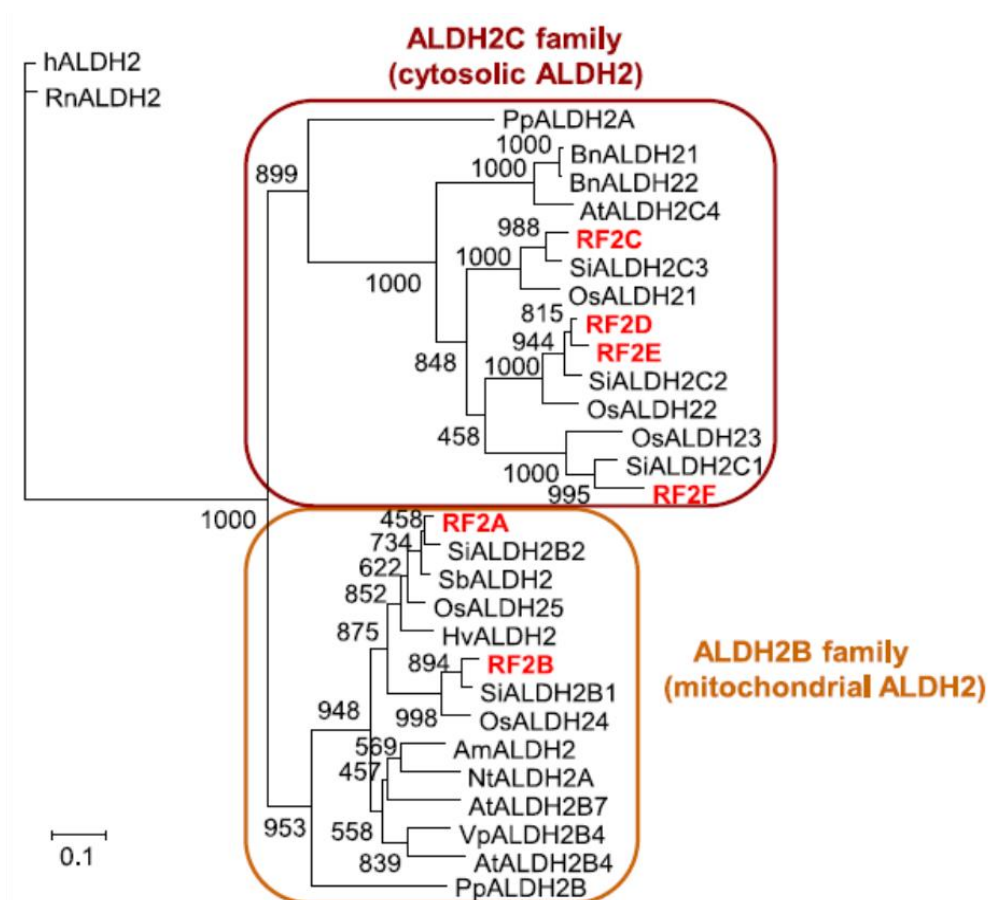
Končítíková *et al.* (2015) analyzovali čtyři kukuřičné cALDH2 izoformy (RF2C, RF2D, RF2E a RF2F) a studovali jejich kinetické vlastnosti s různými aldehydy. Nejlepšími substráty pro RF2C byly hexanal a cinnamaldehyd, zatímco enzymy RF2D a RF2E preferovaly *p*-anisaldehyd a benzaldehyd. Zbývající enzym RF2F přednostně oxidoval fenylacetaldehyd. Aromatické aldehydy patřily obecně mezi dobré substráty. Benzaldehyd a fenylacetaldehyd, těkavé sloučeniny, odpovědné za typickou vůni *Petunia hybrida* (petúnie zahradní), pochází z fenylyalaninu, který může vznikat šikimátovou drahou (Tzin a Galili, 2010). cALDH2 izoformy vykazovaly aktivity i s coniferylaldehydem a sinapaldehydem, které vznikají fenylypropanoidovou drahou, která vede k mnoha sekundárním metabolitům, jako jsou na příklad monolignol (součást biosyntézy ligninu), chalkony, kumariny a flavonoidy. Při tvorbě monolignolu vznikají meziprodukty - kyselina kávová, ferulová a sinapová. Koniferylaldehyd a sinapaldehyd byly dříve prokázány jako *in vivo* substráty pro ALDH2C v *A. thaliana* a *B. napus* (Nair *et al.*, 2004; Mittasch *et al.*, 2013).

Krystalové sktruktury dvou kukuřičných cALDH2 - RF2C a RF2F již byly vyřešeny (Končítíková *et al.*, 2015) a významně se mezi sebou liší (Obrázek 5). Místo pro vazbu substrátu RF2C je úzké a tvořené klastrem aromatických aminokyselin (Y171, F178, F458 a F460) a dalšími nepolárními rezidui, jako jsou I302, V304, M175 a T297. Vazebné místo u RF2F je širší kvůli přítomnosti menších aminokyselin V192 a M477, které odpovídají aromatickým zbytkům F178 a F460 u RF2C. Právě tento fakt pravděpodobně vede k slabším nepolárním interakcím mezi RF2F a nepolárními různými substráty, což se projevuje vysokými hodnotami K_m . Rezidua aktivních míst RF2D a RF2E se neliší, a proto mají podobné kinetické vlastnosti. Model RF2E byl vytvořen podle předlohy RF2C za využití SWISS-MODEL serveru k modelování homologních struktur proteinů (<https://swissmodel.expasy.org/>). Kavita pro vazbu substrátu je v případě RF2E mírně širší kvůli přítomnosti L177 (P178 u RF2C). Pouze RF2C obsahuje T297, zatímco další tři izoformy mají ve stejné pozici fenylalanin. T297 zabírá méně prostoru a může být důležitý pro plasticitu a specifitu vazby substrátu (Končítíková *et al.*, 2015).



Obrázek 5. Složení aktivních míst kukuřičných cALDH2. (A) Pohled shora na místo pro vazbu substrátu RF2C. Rezidua jsou zobrazena ve světle hnědém zbarvení a popsána oranžově. Rezidua RF2F jsou tmavě hnědá a číslování aminokyselin je uvedeno v závorkách. (B) Složení aktivního místa RF2E (modrá), vytvořeného pomocí modelovacího serveru SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) a RF2C (světle hnědá) jako templátu (převzato z Končítíková *et al.*, 2015).

Fylogenetické analýzy ukazují (Obrázek 6), že kukuřičné RF2A a RF2B patří do podrodiny ALDH2B, která se skládá z mtALDH2 *O. sativa*, *A. thaliana*, *N. tabacum*, včetně BALDH *A. majus* a dalších. Zbývající čtyři enzymy RF2C, RF2D, RF2E a RF2F sdílejí asi 70% sekvenční identitu a řadí se do podrodiny ALDH2C, čítající členy cALDH2 včetně ALDH2C4 (nazývaná sinapaldehyddehydrogenasa nebo coniferylaldehyddehydrogenasa) z *A. thaliana*. Rýže a další jednoděložné rostliny obsahují dva geny kódující mtALDH2 izoformy a různý počet genů, které kódují izoformy cALDH2 (Končítíková *et al.*, 2015).



Obrázek 6. Fylogenetický strom studovaných rostlinných ALDH2. Fylogenetický strom znázorňující příbuznost kukuřičných ALDH2 s jinými ALDH ze stejné rodiny. Schéma bylo vytvořeno programy MUSCLE v3.8 (Edgar, 2004), Gblocks (Castresana, 2000) a PhyML v3.0 (Guindon a Gascuel, 2003). Byly vybrány sekvence dříve studovaných ALDH2, mezi které patří *Antirrhinum majus* (FJ151199), *Arabidopsis thaliana* (At3g48000, At1g23800 a At3g24503), *Brassica napus* (FN995990 a FN995991), *Homo sapiens* (AY621070), *Hordeum vulgare* (BAB62757), *Nicotiana tabacum* (CAA71003), *Oryza sativa* (Os06g15990, Os02g49720, Os01g40860, Os01g40870 a Os06g39230), *Physcomitrella patens* (XP_001767457 a XP_001785650), *Rattus norvegicus* (P11884), *Sorghum bicolor* (BAB92019), *Vitis pseudoreticulata* (DQ150256), *Setaria italica* (XM_004953741, XM_004965148, XM_004965940, XM_004968994 a XM_004968990) (převzato z Končítíková *et al.*, 2015).

2.3 Aldehydy

Aldehydy jsou organické sloučeniny, které obsahují silně elektrofilní karbonylovou skupinu, díky níž patří mezi vysoce reaktivní molekuly. Vystupují jako meziprodukty v mnoha metabolických drahách a na biologické systémy mohou působit různě (Vasiliou *et al.*, 1999). Vysoká reaktivita aldehydů, zejména se sloučeninami se sulfanylovou a aminoskupinou, může mít cytotoxické, mutagenní nebo karcinogenní účinky, a proto je třeba aldehydy metabolizovat na méně reaktivní formy (Vasiliou a Nebert, 2005). K tomu existuje řada enzymů, mezi které patří například ALDH a aldehydoxidasy (AOX, EC 1.2.3.1).

Některé aldehydy, účastníci se biologických, fyziologických a farmakologických procesů, mohou být velmi důležité. Například retinal, který je nezbytný pro zrak a jehož oxidační produkt - kyselina retinová slouží jako ligand pro receptory, které zprostředkovávají genovou expresi pro růst a vývoj organismu. Nebo také γ -aminobutyraldehyd, ze kterého vzniká kyselina γ -aminomáselná, která slouží jako důležitý neurotransmitter (Vasiliou a Nebert, 2005).

Aldehydy mohou být endogenního nebo exogenního původu. K syntéze endogenních aldehydů dochází v celé řadě metabolických drah, například při metabolismu aminokyselin, sacharidů, lipidů, biogenních aminů, vitamínů a steroidů (Vasiliou a Nebert, 2005). Exogenní aldehydy vznikají při metabolismu xenobiotik, biotransformacemi drog, léčiv (cyklofosfamid, ifosfamid) nebo látek z životního prostředí, jako je smog, výfukové plyny vozidel, cigaretový kouř, pesticidy nebo potravinářská barviva (Singh *et al.*, 2013).

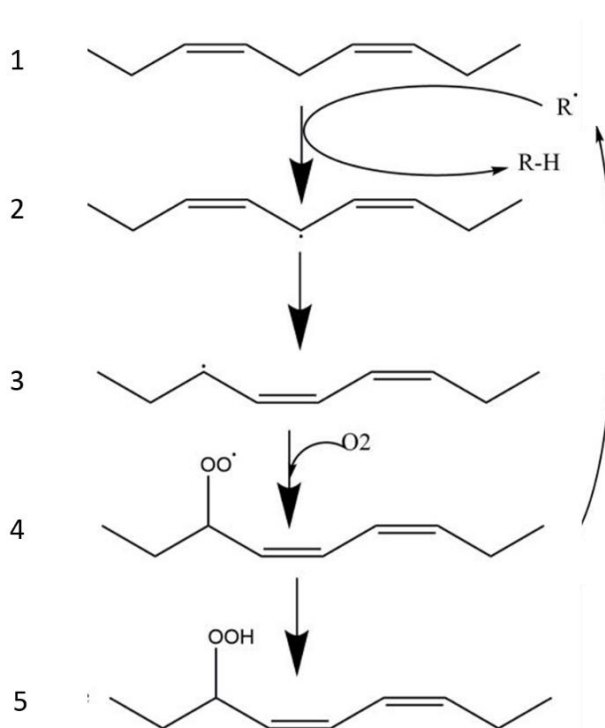
2.3.1 Biosyntéza aldehydů

2.3.1.1 Lipidová peroxidace

V současnosti je peroxidace lipidů (oxidační degradace lipidů) považována za komplexní proces, který zahrnuje oxidační poškození buněčných struktur a toxicitu vedoucí ke smrti buněk. Lipidová peroxidace může být neenzymatická, iniciovaná přítomností molekulárního kyslíku, a enzymatická, která je katalyzována rodinou lipoxygenas (LOX, EC 1.13.11.12). Tyto procesy vytváří více než 200 druhů aldehydů, z nichž mnohé jsou vysoce reaktivní a toxické. Snadno tvoří adukty s fyziologicky důležitými nukleofily, poškozují proteiny a mohou modifikovat aminokyselinová

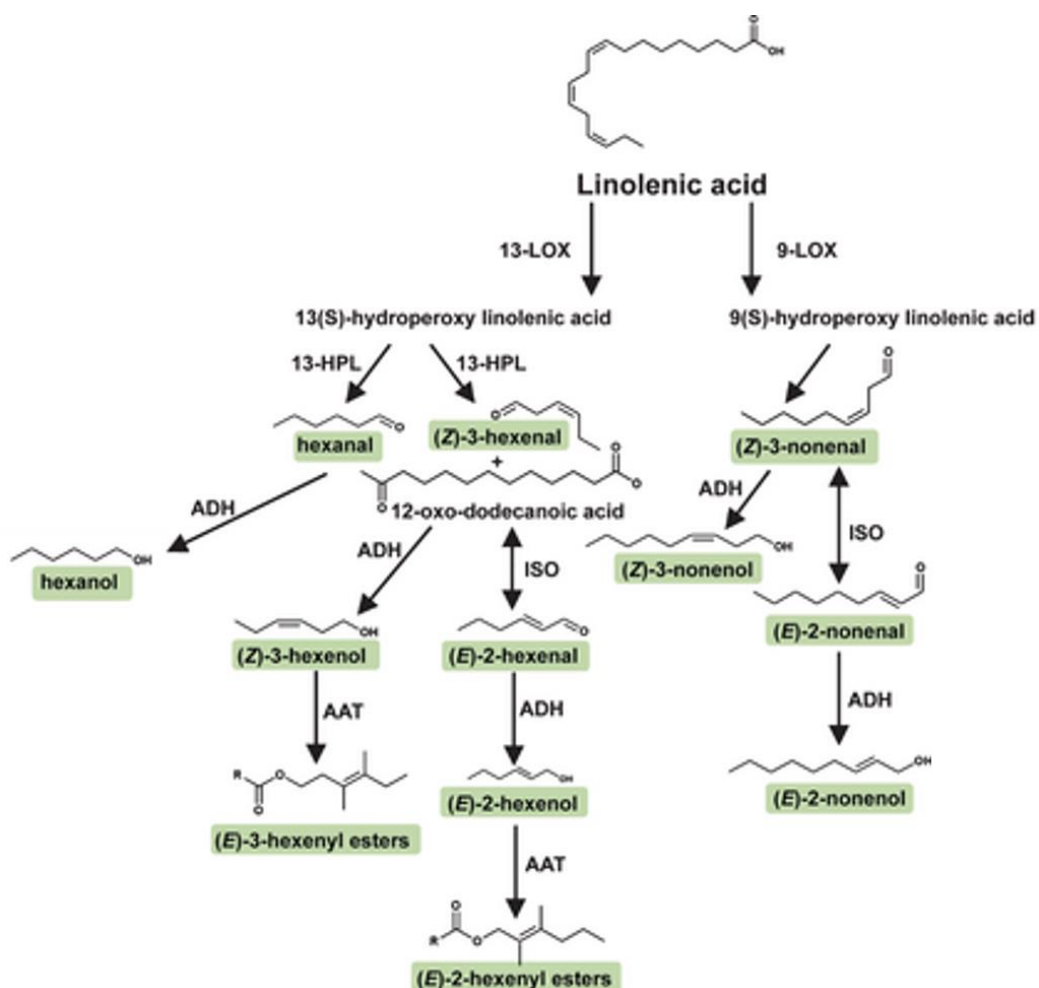
rezidua, čímž dochází ke změnám v jejich biologické funkci nebo dokonce úplné inaktivaci (Brocker *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013).

V rostlinách dochází vlivem stresových podmínek (jako je sucho, zasolení půdy, přítomnost těžkých kovů aj.) k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), mezi něž patří hydroxylový, hydroperoxilový, peroxilový a superoxidový radikál. Tyto radikály způsobují oxidativní degradaci lipidových membrán (Piterková *et al.*, 2005). Lipidová peroxidace je iniciována radikálem R[•], který napadá polynenasycenou mastnou kyselinu v místě methylenové skupiny sousedící s dvojnou vazbou (Obrázek 7). Tím dojde k oddělení vodíku a vzniku radikálu na nenасыceném řetězci. V uhlovodíkovém řetězci dochází k přeskupení elektronů a vzniká konjugovaný dien, který reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu. Peroxylový radikál má schopnost reagovat s dalšími molekulami polynenasycených mastných kyselin a sebe přeměňovat na hydroperoxid. Hydroperoxidové meziproducty mohou být redukovány pomocí kovových iontů na alkoxylové radikály, které se rozkládají na velké množství nebezpečných produktů, mezi které patří právě aldehydy, zejména hexanal, nonanal, 4-oxononenal a 4-hydroxynonenal (Marnett, 1999; Brocker *et al.*, 2013).



Obrázek 7. Schéma počátečních reakcí neenzymatické lipidové peroxidace. (1) Polynenasycená mastná kyselina reaguje s radikálem, (2) lipidový radikál, (3) konjugovaný dien, (4) vstup molekulárního kyslíku za vzniku peroxylového radikálu, (5) hydroperoxidový produkt (upraveno dle Marnett, 1999).

Metabolismus polynenasycených mastných kyselin, na kterém se podílejí LOX, je souhrnem reakcí, které jsou nazývány lipoxygenázovou dráhou. LOX katalyzují oxidaci polynenasycených mastných kyselin, jako je kyselina linolová a linolenová. Kyselina linolenová je oxidována buď na atomu uhlíku 9 nebo v poloze 13 uhlovodíkové kostry mastné sloučeniny, což vede ke dvěma skupinám sloučenin - 9(S)-hydroperoxy- a 13(S)-hydroperoxyderivátům mastných kyselin, které jsou dále metabolizovány za vzniku těkavých sloučenin (Obrázek 8). Hydroxyperoxylyasa převádí oba typy derivátů hydroperoxidových mastných kyselin na aldehydy. Vznikají tak nasycené i nenasycené aldehydy, které jsou obvykle syntetizovány v zelených orgánech rostlin v reakci na zranění. Tyto těkavé sloučeniny dávají ovoci a zelenině jejich charakteristickou vůni (Feussner *et al.*, 1997; Dudareva *et al.*, 2013).



Obrázek 8. Biosyntéza některých alifatických aldehydů. Kyselina linolenová vstupuje do lipoxygenázové dráhy, poskytuje 9(S)-hydroperoxy- a 13(S)-hydroperoxy meziproducty, které jsou pomocí hydroxyperoxylyas převáděny na těkavé látky. (13-LOX) 13-lipoxygenasa, (13-HPL) 13-hydroxyperoxylyasa, (9-LOX) 9-lipoxygenasa, (AAT) alkoholacyltransferasa, (ADH) alkoholdehydrogenasa, (ISO) isomerasa (převzato z Dudareva *et al.*, 2013).

2.3.1.2 Katabolismus polyaminů

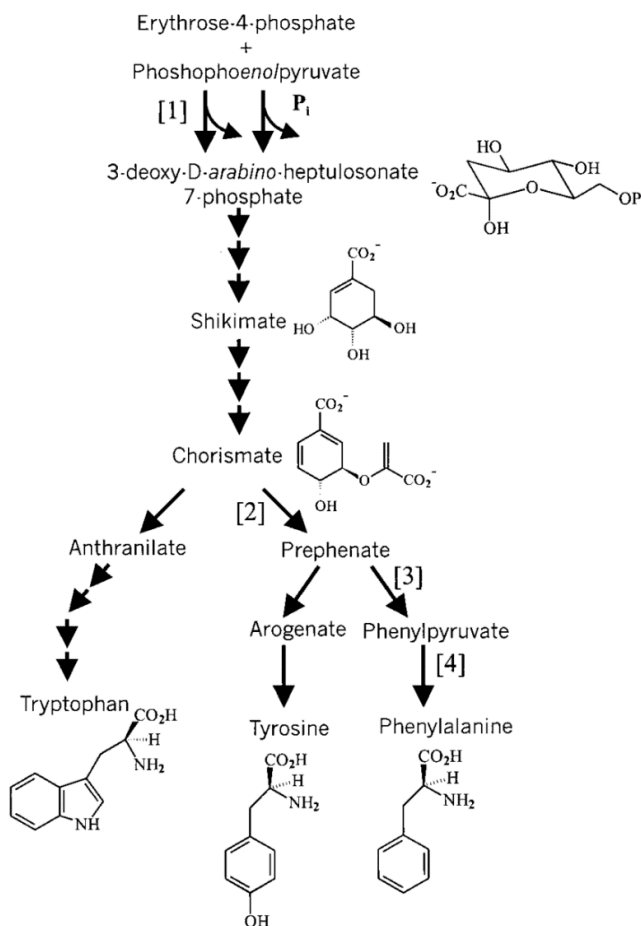
Polyaminy jsou skupinou alifatických aminů, které se nacházejí v prokaryotických i eukaryotických buňkách. V rostlinných buňkách se nejhojněji vyskytují diamin putrescin, triamin spermidin a tetramin spermin, a to jak v cytoplazmě, tak v organelách (mitochondrie, chloroplasty, vakuoly). Mezi méně známé rostlinné polyaminy patří kadaverin, který se vyskytuje zejména v luštěninách. Polyaminy se podílejí na fyziologických procesech, jako je diferenciaci a proliferaci buněk nebo na obranných mechanismech (Yoshimoto *et al.*, 2016).

Katabolismus polyaminů probíhá oxidační deaminací za katalýzy aminoxidas, produkty těchto degradací jsou aldehydy. U rostlin se jedná o dvě skupiny enzymů – aminoxidasy obsahující měď (CAO, EC 1.4.3.22, dříve EC 1.4.3.6) a polyaminoxidasy obsahující flavinový kofaktor (PAO, EC 1.5.3.14) (Kopečný *et al.*, 2013). CAO katalyzují oxidaci primárních aminoskupin diaminů a polyaminů, kdežto PAO působí na sekundární aminoskupiny substrátů. CAO bývají nazývány také jako diaminoxidasy (DAO), protože k jejich nejběžnějším substrátům patří diaminy (Šebela *et al.*, 2000). Nejvýznamnějšími substráty CAO jsou putrescin a kadaverin. Oxidací putrescinu vzniká 4-aminobutanal (ABAL), který samovolně cyklizuje na Δ^1 -pyrrolin, kdežto kadaverin poskytuje 5-aminovaleraldehyd (AVAL) cyklizující na Δ^1 -piperidin (Kopečný *et al.*, 2013). Savčí PAO katalyzují transformaci sperminu na spermidin a spermidinu na putrescin a 3-aminopropanal (APAL). Naopak rostlinné a bakteriální PAO katalyzují přeměnu spermidinu a sperminu na ABAL, 1-(3-aminopropyl)4-aminobutanal a 1,3-diaminopropan (DAP) (Šebela *et al.*, 2001).

2.3.1.3 Ústřední metabolické dráhy

U rostlin, bakterií a hub je ústřední metabolickou dráhou vzniku aromatických látek šikimátová dráha (Obrázek 9), která převádí primární metabolity – fosfoenolpyruvát a erythrosa-4-fosfát na šikimát a chlorismát. Biosyntéza chlorismátu probíhá v sedmi krocích a je lokalizována v chloroplastech. Ústředním enzymem této dráhy je 3-deoxy-*D*-arabinoheptulosonát-7-fosfátsyntasa (DAHP), která katalyzuje kondenzaci erythrosa-4-fosfátu a fosfoenolpyruvátu na 3-deoxy-*D*-arabinoheptulosonát-7-fosfát. Produktem dalších reakcí je šikimát, jenž může dále pokračovat v šikimátové dráze nebo poskytovat fenolové kyseliny, jako je kyselina gallová nebo protokatechová. Šikimátová dráha dále vede k chlorismátu, který slouží jako prekurzor pro aromatické

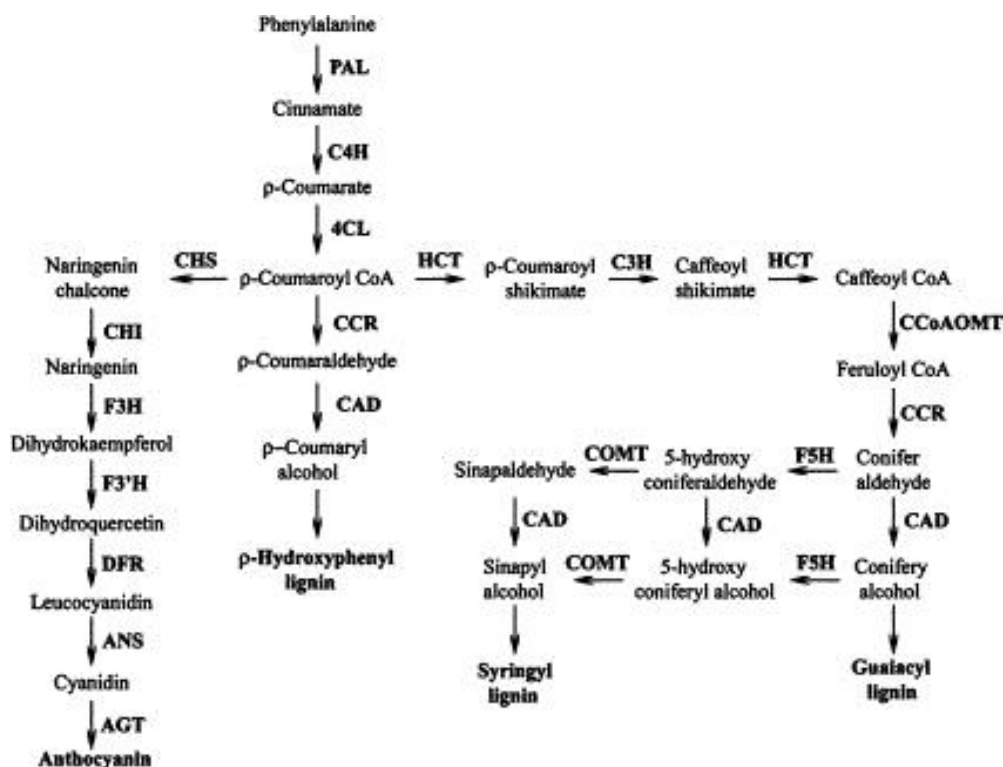
aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin a tryptofan) a fenolové kyseliny (4-hydroxybenzoová, gentisová a salicylová) (Herrmann, 1995; Mustafa a Verpoorte, 2005).



Obrázek 9. Šikimátová dráha. Ústřední metabolická dráha vedoucí k aromatickým aminokyselinám. (1) 3-deoxy-*D*-arabinoheptulosonát-7-fosfátsyntasa, (2) chlorismátmutasa, (3) prefenátdehydratasa, (4) fenylalaninaminotransferasa (převzato z Kloosterman *et al.*, 2003).

Na šikimátovou dráhu navazuje dráha fenylpropanoidová (Obrázek 10), ve které je fenylalanin dále metabolizován na benzenové a fenolové sloučeniny. Prvním krokem je deaminace fenylalaninu za vzniku kyseliny *trans*-skořicové enzymem fenylalaninamoniaklyasou - PAL. Jestliže je prekurzorem tyrosin, tak vzniká *p*-kumarová kyselina za účasti enzymu tyrosinamoniaklyasy - TAL. Kyselina skořicová je enzymem cinnamát-4-hydroxylasou převedena na kyselinu *p*-kumarovou a dále na *p*-kumaroyl-CoA enzymem *p*-kumaroyl-CoA-ligasou, kde se tato cesta větví. Působením chalkonsyntasy vzniká flavonoidní skelet vedoucí k anthokyaninům. Další dvě větve směřují ke třem monolignolům (*p*-hydroxyfenyl lignin, syringyl lignin, guaiacyl lignin) - esenciálních prekurzorů pro syntézu ligninu. Ligniny jsou aromatickými

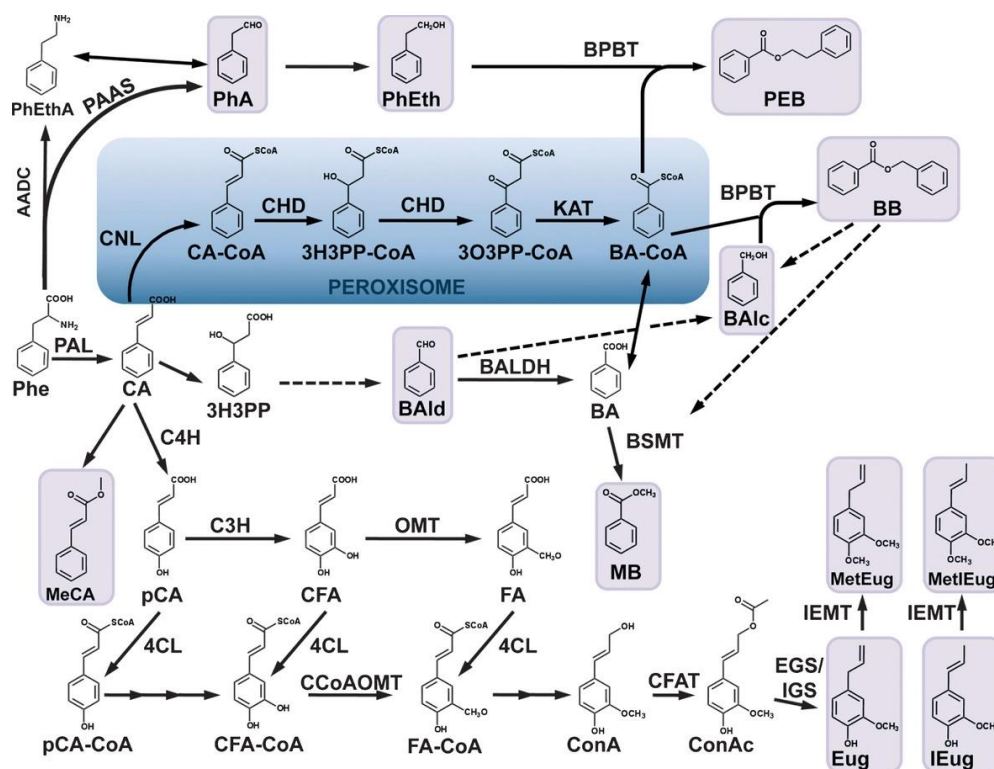
heteropolymery, které jsou zabudovány do buněčných stěn rostlinných buněk, čímž zajišťují mechanickou oporu. *p*-Kumaroyl-CoA je řadou reakcí převeden na cafeoyl-CoA, který je metylován na feruoyl-CoA, z něhož redukcí vzniká coniferylaldehyd. Jeho hydroxylací a metylací v poloze 5 vzniká sinapaldehyd. Cinnamylalkoholdehydrogenasa je schopna katalyzovat přeměnu obou aldehydů na příslušné alkoholy - coniferyl- a sinapalkohol, které patří mezi monomerní jednotky ligninu (Peng *et al.*, 2008; Dudareva *et al.*, 2013).



Obrázek 10. Fenylypropanoidová dráha. Metabolická dráha vedoucí k syntéze anthokyaninů a monolignolů, na jejímž spojení se nachází *p*-kumaroyl-CoA. Coniferyl- a sinapaldehyd slouží jako prekurzory pro syntézu ligninů. (PAL) fenylalaninamoniaklyasa, (C4H) cinnamát-4-hydroxylasa, (4CL) *p*-kumaroyl-CoA-syntasa, (CHS) chalkonsyntasa, (CHI) chalkonflavanoniserasa, (F3H) flavanon-3-hydroxylasa, (F3'H) flavanon-3'-hydroxylasa, (DFR) dihydroflavanon-4-reduktasa, (ANS) anthocyanidinsynthasa, (AGT) anthocyaninglykosyltransferasa, (HCT) hydroxycinnamoyl-CoA:šikimáthydroxycinnamoyltransferasa, (C3H) *p*-kumarát-3-hydroxylasa, (CCoAOMT) cafeoyl-CoA-3-*O*-methyltransferasa, (CCR) cinnamoyl-CoA-reduktasa, (F5H) ferulát-5-hydroxylasa, (COMT) cafeoyl-*O*-methyltransferasa, (CAD) cinnamylalkoholdehydrogenasa (převzato z Peng *et al.*, 2008).

Kyselina skořicová může být rovněž prekurzorem pro sloučeniny benzenu (Obrázek 11), které mohou vznikat CoA-dependentní β -oxidací, lokalizovanou v peroxisomu, která je analogická k β -oxidaci mastných kyselin. Tato cesta zahrnuje aktivaci kyseliny skořicové enzymem cinnamoyl-CoA-ligasou na esterovou formu

cinnamoyl-CoA, následovanou hydratací na 3-hydroxy-3-fenylpropionylCoA a oxidací na 3-oxo-3-fenylpropionylCoA, jejíž konečným štěpením dochází ke vzniku benzoyl-CoA. Alternativní dráhou může z fenylalaninu vznikat benzaldehyd, čemuž předchází hydratace kyseliny skořicové na 3-hydroxy-3-fenylpropionovou kyselinu (Boatright *et al.*, 2004).



Obrázek 11. Vznik některých aromatických aldehydů. Výchozí látkou je fenylalanin, který je řadou různých reakcí přeměněn na cinnamaldehyd, benzaldehyd a koniferylaldehyd, prekursor sinapaldehydu. Peroxisomální (modré pozadí) a alternativní cesta vedou k tvorbě kyseliny benzoové. Prerušované šipky znázorňují kroky, které nebyly doposud přesně popsány, skládané šipky vícekrokové reakce. Fialovým pozadím jsou označeny těkavé sloučeniny. (AADC) aromatická-*L*-aminokyselinadekarboxylasa, (BA) kyselina benzoová, (BA-CoA) benzoyl-CoA, (BAic) benzylalkohol, (BAld) benzaldehyd, (BALDH) benzaldehyddehydrogenasa, (BB) benzylbenzoát, (BPBT) benzoyl-CoA-benzylalkoholbenzoyltransferasa / 2-fenylethanolbenzoyltransferasa, (BSMT) benzoylkarboxymethyltransferasa / salicylkarboxymethyltransferasa, (CA) kyselina skořicová, (CA-CoA) cinnamoyl-CoA, (CFA) kyselina kávová, (CFA-CoA) kafeoyl-CoA, (CFAT) koniferylalkoholacetyltransferasa, (C3H) *p*-kumarát-3-hydroxylasa, (C4H) cinnamát-4-hydroxylasa, (CCoAOMT) kafeoyl-CoA-3-*O*-methyltransferasa, (ConA) koniferylalkohol, (ConAc) koniferylacetát, (4CL) 4-kumaroyl-CoA-ligasa, (CNL) cinnamoyl-CoA-ligasa, (EGS) eugenolsyntasa, (Eug) eugenol, (FA) ferulová kyselina, (FA-CoA) feruloyl-CoA, (IEug) isoeugenol, (IEMT) isoeugenol-*O*-methyltransferasa, (IGS) isoeugenolsyntasa, (3H3PP) kyselina 3-hydroxy-3-fenylpropionová, (3H3PP-CoA) 3-hydroxy-3-fenylpropionyl-CoA, (KAT) 3-ketoacyl-CoA-thiolasa, (MeCA) methylcinnamát, (MB) methylbenzoát, (3O3PP-CoA) 3-oxo-3-fenylpropionyl-CoA, (OMT) *O*-methyltransferasa, (PAAS) fenylacetaldehydsynthasa, (PAL) fenylalaninamoniaklyasa, (pCA) kyselina *p*-kumarová, (pCA-CoA) *p*-kumaroyl-CoA, (PEB) fenylethylbenzoát, (PhA) fenylacetaldehyd, (Phe) fenylalanin, (PhEth) 2-fenylethanol, (PhEthA) fenylethylamin (převzato z Duderava *et al.*, 2013).

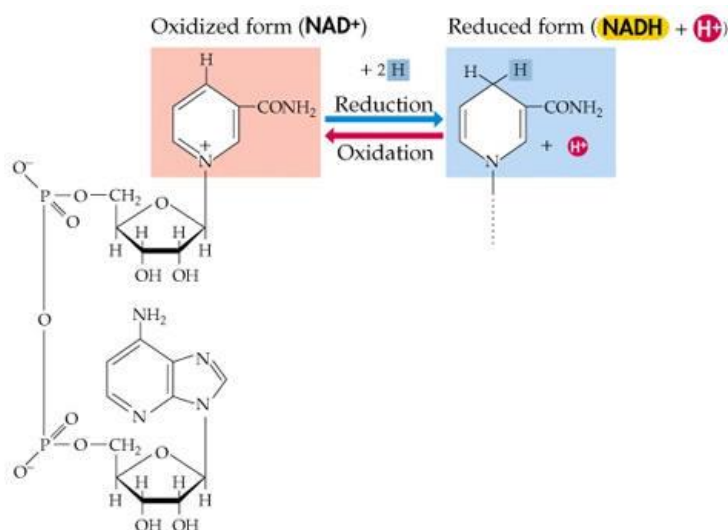
2.4 Kinetická měření využívající NAD

Enzymová aktivita je definována jako rychlost katalyzované reakce a základní jednotkou je katal. 1 katal udává množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za 1 s. Enzymová aktivita byla v této práci měřena na základě Warburgova optického testu (Awal *et al.*, 1997). Při reakci dochází současně k oxidaci substrátu a redukci kofaktoru (NAD^+ na $\text{NADH} + \text{H}^+$) (Obrázek 12). Přeměna koenzymu (substrátu) je sledována v čase a stanovena spektrofotometricky při 340 nm. Vznik redukované formy je doprovázen změnou absorpčního maxima při 340 nm, zatímco výchozí NAD^+ má absorpční maximum při 260 nm. Aktivitu enzymu lze vypočítat dle vzorce:

$$a(\text{kat}) = \frac{\Delta A_{340}}{\Delta t (\text{s})} \cdot \frac{V (\text{l})}{\varepsilon (\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot l (\text{cm})}$$

kde ΔA_{340} je změna absorbance při 340 nm, Δt je reakční čas, V je objem reakční směsi, ε je molární extinkční koeficient kofaktoru (hodnota pro NAD(P)H je $6220 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a l je délka optické dráhy.

Druhou možností je spektrofluorometrické měření při excitaci 365 nm a emisi 460 nm, které se používá zejména při měření s aromatickými látkami, jejichž absorpční maxima interferují s měřenou vlnovou délkou 340 nm při spektrofotometrickém měření (Končítíková *et al.*, 2015).



Obrázek 12. Oxidačně-redukční reakce. Přeměna NAD^+ na NADH redukcí, oxidací v opačném směru. Vznik redukované formy je doprovázen změnou absorpčního maxima při 340 nm, zatímco výchozí NAD^+ má absorpční maximum při 260 nm (převzato z Garrett a Grisham, 1999).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

3.1.1 Biologický materiál

- Plazmid pCDFDuet (Novagen, Německo)
- Kompetentní buňky NEB5 α *Escherichia coli* (NEB, USA)
- Kompetentní buňky T7 Express *Escherichia coli* (NEB, USA)

3.1.2 Chemikálie

- 6x Loading Dye (NEB, USA)
- AccurPrime *Pfx* Polymerasa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- AccurPrime *Pfx* Supermix (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Agarosa (Sigma-Aldrich, USA)
- Akrylamid (Bio-Rad, USA)
- Aldehydy (Sigma-Aldrich, USA)
- BamHI-HF (NEB, USA)
- *n*-butanol (Lach-Ner, ČR)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)
- DNAsa I (Amresco, USA)
- Dodecylsulfát sodný (Amresco, USA)
- Ethanol (Merck, Německo)
- Ethidium bromid (Acros Organics, Dánsko)
- Gene Ruler 1kB DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Glycerol (Lach-Ner, ČR)
- Glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- Guanidin-HCl (AppliChem, Německo)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, ČR)
- Imidazol (Alfa Aesar, Německo)
- Inhibitor proteas SIGMAFAST (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina octová (Lach-Ner, ČR)
- Laemmliho pufr (Bio-Rad, USA)
- Luria-Broth agar (Roth, Německo)

- Luria-Broth médium (Roth, Německo)
- Methanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Močovina (Lach-Ner, ČR)
- NAD⁺ (AppliChem, Německo)
- NADP⁺ disodná sůl (AppliChem, Německo)
- Nuclease-free voda (5Prime, Německo)
- Persíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)
- Primery (Sigma-Aldrich, USA)
- Protein Ladder 10-250 kDa (NEB, USA)
- Pufr Cut Smart (NEB, USA)
- RNAsa A (Amresco, USA)
- SOC Outgrowth Medium (NEB, USA)
- Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
- TAE pufr (VWR, ČR)
- Tetramethylethylendiamin (Bio-Rad, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, USA)
- Tween (Thermo Fisher Scientific, USA)
- XhoI (NEB, USA)

3.1.3 Návod y a kity

- Bicinchoninic Acid kit (Sigma-Aldrich, USA)
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- HisProbeTM-HRP (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Quick Ligase Kit (NEB, USA)
- Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)

3.1.4 Přístrojové vybavení

- Autokláv (Tuttnauer, Německo)
- AmershamTM imager 600 (GE Life Sciences, USA)
- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- CD spektrometr Jasco-J815 (Jasco, Japonsko)

- Cell Disruptor – One Shot Model (Constant Systems, UK)
- Centrifuga (Sigma-Aldrich, USA)
- Centrifuga 5430 R (Eppendorf, Německo)
- Digestoř (Merci, ČR)
- Digitální předvážky (OHAUS, Švýcarsko)
- Elektroforetický systém (Bio-Rad, ČR)
- Flow box SafeFast Elite (Faster, Itálie)
- FluoroLog-3 spektrofluorometr (Horiba Scientific, USA)
- Imager Gel Doc EZ (Bio-Rad, ČR)
- Inkubátor Sanyo (Schoeller, ČR)
- Magnetická míchačka RET Basic C (IKA, Německo)
- Minicentrifuga BLUE (Labnet, USA)
- PCR cykler (Eppendorf, Německo)
- pH metr 1000L (VWR, Belgie)
- Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Německo)
- Rotátor Multi Bio RS-24 (Biosan, Lotyšsko)
- Sada pipet (Eppendorf, Německo)
- Spektrofotometr Cary 8454 UV-Vis (Agilent Technologies, USA)
- Termostat blokový (Labnet, USA)
- Termostat láznový (Huber, Německo)
- Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA)
- Třepačka MaxQ 4000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- UV transluminátor (East Port, ČR)
- Vortex (IKA, Německo)

3.1.5 Další materiál

- Centrifugační filtry Centricon 50 kDa (Merck, Německo)
- Kolony HisPur Cobalt Spin Columns (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Mikrozkmavky 1,5 ml a 2 ml (Eppendorf, Německo)
- PCR stripy 0,2 ml (Eppendorf, Německo)
- Spektrofotometrické křemenné kyvety (Agilent Technologies, USA)

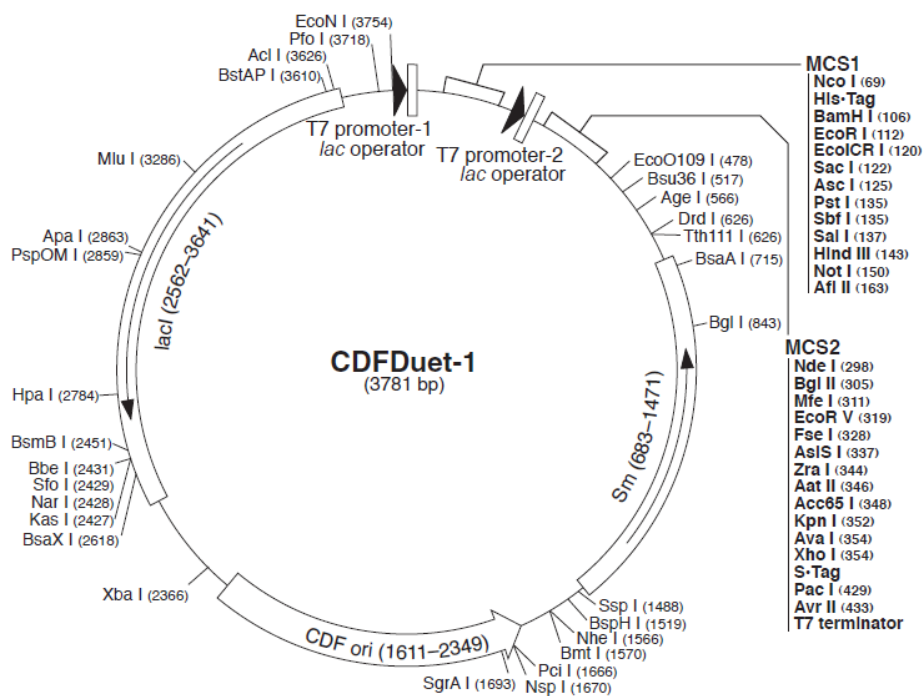
3.2 Metody

3.2.1 Místně specifická mutace genu $\Delta PpALDH2A$

3.2.1.1 Mutagenese pomocí PCR

Výchozím materiálem byl plazmid pCDFDuet (Obrázek 13) nesoucí gen $\Delta PpALDH2A$, dříve připravený studentkou Adélou Hýlovou (Hýlová, 2015). Symbol Δ značí delecí sekvence na 5-konci, a díky tomu je produkce kódovaného proteinu mnohem vyšší v *E. coli* do rozpustné fáze.

Místně řízená mutagenese aktivního místa $\Delta PpALDH2A$ byla provedena pomocí PCR s použitím AccurPrime *Pfx* polymerasy (Invitrogen, USA) a specifických 5'-fosforylovaných primerů (Tabulka 3), nesoucích záměnu jednoho kodonu (a vedoucí k záměně jedné aminokyseliny), které byly navrženy spolu s vedoucím práce a syntetizovány firmou Sigma. PCR obsahovala 0,5 μ l plazmidové DNA, 0,5 μ l forward primeru, 0,5 μ l reverse primeru, 22,5 μ l AccurPrime *Pfx* Supermixu (Invitrogen, USA) a směs byla doplněna na 25 μ l vodou. PCR reakce byla zahájena počáteční denaturací DNA při 95 °C po dobu 5 min, následovalo 30 cyklů tvořených třemi kroky - denaturace DNA při 95 °C po dobu 30 s, hybridizace neboli nasedání primerů při 50 - 59,7 °C po dobu 30 s a extenze při 68 °C po dobu 5 min 30 s. Nakonec proběhla finální extenze při 68 °C po dobu 10 min.



Obrázek 13. Schéma expresního vektoru pCDFDuet.

Tabulka 3. Sekvence a teplota nasedání primerů použitých při PCR mutagenези *ΔPpALDH2A*.

Mutantní varianta	Sekvence primerů	T _a (°C)
E174A	FP: 5'-P-CAGCACCTCTTGCTATCGGGTTAT-3' RP: 5'-P-CTCCCAGTCGTGCCATGTCGTA-3'	62,7 63,9
A223F	FP: 5'-P-TTTCCATTTTATCTTCTGGCAATGA-3' RP: 5'-P-ATTCCACGGCAAATTGAAC-3'	56,4 53,2
Y226A	FP: 5'-P-GCGCTTCTGGCAATGAAAGTAG-3' RP: 5'-P-AAATGGAGCATTCCACGGC-3'	60,2 56,6
Q248A	FP: 5'-P-GCCCAGAGCCCTCTTTCTGCACTTT-3' RP: 5'-P-TGCTGGTTTGAGGACAATG-3'	66,2 54,4
Q248E	FP: 5'-P-GAACAGAGCCCTCTTTCTGCACTTT-3' RP: 5'-P-TGCTGGTTTGAGGACAATG-3'	62,9 54,4
Y348A	FP: 5'-P-GCCAATCAGGGACAAATGTGCG-3' RP: 5'-P-GAAAATAGCTTGGTGTGC-3'	62,1 51,3
M353A	FP: 5'-P-GCATGCGTAGCCGGATCACGGACATT-3' RP: 5'-P-TTGTCCCTGATTGTAGAAAATAGC-3'	67,9 57,6
L511A	FP: 5'-P-GCGACACCGTCGGCTCCGTTTG-3' RP: 5'-P-AATGCCGTATGTATTGACCCA-3'	67,6 55,9

T_a – teplota nasedání primeru (annealing)

K PCR produktu byl přidán vzorkovací pufr 6x Loading Dye (NEB, USA). Elektroforéza byla provedena v 0,8% agarosovém gelu v TAE pufu (0,04 mol l⁻¹ Tris, 0,02 mol l⁻¹ kyselina octová, 0,001 mol l⁻¹ EDTA, pH 8,4 s 0,04% ethidium bromidem) při napětí 100 V po dobu asi 45 min. Jako standard byl použit Gene Ruler 1 kB DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA). Výsledek byl vizualizován pomocí UV transluminátoru a gel byl vyfocen přístrojem Gel Doc EZ Imager za použití softwaru Image Lab 5.1 (Bio-Rad, USA). Amplifikovaná DNA příslušné velikosti byla z gelu vyříznuta pomocí skalpelu a byla štěpena přidavkem 0,5 μl DpNI přes noc při teplotě 37 °C.

Plazmidová DNA byla purifikována kitem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Pás odpovídající velikosti byl vyříznut z gelu a bylo k němu přidáno příslušné množství Membrane Binding Solution (10 μl roztoku na 10 mg gelu), směs byla inkubována při 60 °C a vortexována, dokud se gel nerozpustil. Purifikační minikolonka byla vložena do sběrné zkumavky a byla do ní napipetována směs rozpuštěného gelu, inkubována po dobu 1 min a centrifugována při 16 000 x g při laboratorní teplotě. Minikolonka byla promyta pomocí 700 μl Membrane Wash Solution a centrifugována při 16 000 x g a laboratorní teplotě. Následovalo opakované promytí 500 μl Membrane Wash Solution a centrifugace při 16 000 x g po dobu 5 min. Minikolonka byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky a bylo na ni napipetováno 30 μl

Nuclease-free vody. Po 1 min inkubaci proběhla eluce DNA centrifugací při 16 000 x g a 1 min. Purifikovaná plazmidová DNA byla ligována pomocí kitu Quick Ligase Kit (NEB) a zmrazena při teplotě -20 °C.

3.2.1.2 Amplifikace vektorů v bakteriích

Pro transformaci plazmidové DNA pomocí teplotního šoku byly použity buňky *E. coli* NEB5 α . Ke 100 μ l bakteriálních buněk bylo přidáno 22,4 μ l ligačního produktu (100 ng DNA) a směs byla inkubována na ledu po dobu 20 min. Poté byla přemístěna na 30 s na vodní lázeň o teplotě 42 °C a následně na 2 min na led. Ke směsi bylo přidáno 200 μ l SOC média, se kterým byly buňky inkubovány na rotátoru při 37 °C po dobu asi 1 h. Poté byly transformované buňky rozetřeny na LB médium s agarem a streptomycinem (25 μ g ml⁻¹) a kultivovány přes noc při 37 °C. Vybrané jednotlivé klony byly naočkovány do LB média obsahující antibiotikum streptomycin (25 mg ml⁻¹) a inkubovány přes noc při 37 °C na třepače o rychlosti 160 otáček/min.

3.2.1.3 Screening klonů

Pro ověření přítomnosti inzertu byla provedena purifikace plazmidů a následný digest screening mutantních plazmidů pomocí endonukleas. Do zkumavky bylo napipetováno 10 μ l plazmidové DNA, 0,3 μ l XhoI, 0,3 μ l BamHI-HF a 1,2 μ l Cut Smart pufru (NEB). Směs byla inkubována přes noc při 37 °C. Naštěpené plazmidy byly separovány pomocí agarosové elektroforézy. Pozitivní plazmidy byly sekvenovány firmou SEQme (Dobříš, Česká republika) k ověření přítomnosti bodové mutace a správnosti sekvence (Obrázek 14).

3.2.2 Produkce rekombinantních proteinů v bakteriích

3.2.2.1 Transformace expresních buněk

Pozitivní plazmidy byly použity k produkci rekombinantních proteinů. Ke 100 μ l T7 expresních buněk *E. coli* byly přidány 3 μ l plazmidové DNA a směs byla umístěna na led po dobu 20 min. Poté byl proveden teplotní šok ve vodní lázni při 42 °C a 30 s. Buňky byly ponechány 2 min na ledu, bylo k nim přidáno 200 μ l SOC média a byly inkubovány při 37 °C po dobu 1 h. Poté byly buňky rozetřeny na Petriho misky s LB agarem a streptomycinem (25 μ g ml⁻¹) a kultivovány přes noc při 37 °C.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
dPpALDH2A MGSSHHHHHSQDPAVLATEQVEAPIKSPFFVQYTKLFINNSFVDSVSGKTFPSIDPRSEEVAVEVAQAAEDVDRAVKA
E174A      MGSSHHHHHSQDPAVLATEQVEAPIKSPFFVQYTKLFINNSFVDSVSGKTFPSIDPRSEEVAVEVAQAAEDVDRAVKA
A223F      MGSSHHHHHSQDPAVLATEQVEAPIKSPFFVQYTKLFINNSFVDSVSGKTFPSIDPRSEEVAVEVAQAAEDVDRAVKA
Y226A      MGSSHHHHHSQDPAVLATEQVEAPIKSPFFVQYTKLFINNSFVDSVSGKTFPSIDPRSEEVAVEVAQAAEDVDRAVKA
Q248A      MGSSHHHHHSQDPAVLATEQVEAPIKSPFFVQYTKLFINNSFVDSVSGKTFPSIDPRSEEVAVEVAQAAEDVDRAVKA
Q248E      MGSSHHHHHSQDPAVLATEQVEAPIKSPFFVQYTKLFINNSFVDSVSGKTFPSIDPRSEEVAVEVAQAAEDVDRAVKA
Y348A      MGSSHHHHHSQDPAVLATEQVEAPIKSPFFVQYTKLFINNSFVDSVSGKTFPSIDPRSEEVAVEVAQAAEDVDRAVKA
M353A      MGSSHHHHHSQDPAVLATEQVEAPIKSPFFVQYTKLFINNSFVDSVSGKTFPSIDPRSEEVAVEVAQAAEDVDRAVKA
L511A      MGSSHHHHHSQDPAVLATEQVEAPIKSPFFVQYTKLFINNSFVDSVSGKTFPSIDPRSEEVAVEVAQAAEDVDRAVKA

      90      100     110     120     130     140     150     160
dPpALDH2A ARKAFEEGPPWRMPGGERAGIMNRIADLLDEHKDELSDLTLMNGKVYDMARLGEAPLAIGLFRYYAGWCDKAQGMTLPT
E174A      ARKAFEEGPPWRMPGGERAGIMNRIADLLDEHKDELSDLTLMNGKVYDMARLGEAPLAIGLFRYYAGWCDKAQGMTLPT
A223F      ARKAFEEGPPWRMPGGERAGIMNRIADLLDEHKDELSDLTLMNGKVYDMARLGEAPLAIGLFRYYAGWCDKAQGMTLPT
Y226A      ARKAFEEGPPWRMPGGERAGIMNRIADLLDEHKDELSDLTLMNGKVYDMARLGEAPLAIGLFRYYAGWCDKAQGMTLPT
Q248A      ARKAFEEGPPWRMPGGERAGIMNRIADLLDEHKDELSDLTLMNGKVYDMARLGEAPLAIGLFRYYAGWCDKAQGMTLPT
Q248E      ARKAFEEGPPWRMPGGERAGIMNRIADLLDEHKDELSDLTLMNGKVYDMARLGEAPLAIGLFRYYAGWCDKAQGMTLPT
Y348A      ARKAFEEGPPWRMPGGERAGIMNRIADLLDEHKDELSDLTLMNGKVYDMARLGEAPLAIGLFRYYAGWCDKAQGMTLPT
M353A      ARKAFEEGPPWRMPGGERAGIMNRIADLLDEHKDELSDLTLMNGKVYDMARLGEAPLAIGLFRYYAGWCDKAQGMTLPT
L511A      ARKAFEEGPPWRMPGGERAGIMNRIADLLDEHKDELSDLTLMNGKVYDMARLGEAPLAIGLFRYYAGWCDKAQGMTLPT

      170     180     190     200     210     220     230     240
dPpALDH2A NGPFHAYTLHEPIGVVGSILPWNAPFLLAMKVPALACGNTIVLKPAQOSPLSALLIAKLAEEAGLPGDGLNVVVTGYGD
E174A      NGPFHAYTLHEPIGVVGSILPWNAPFLLAMKVPALACGNTIVLKPAQOSPLSALLIAKLAEEAGLPGDGLNVVVTGYGD
A223F      NGPFHAYTLHEPIGVVGSILPWNAPFLLAMKVPALACGNTIVLKPAQOSPLSALLIAKLAEEAGLPGDGLNVVVTGYGD
Y226A      NGPFHAYTLHEPIGVVGSILPWNAPFLLAMKVPALACGNTIVLKPAQOSPLSALLIAKLAEEAGLPGDGLNVVVTGYGD
Q248A      NGPFHAYTLHEPIGVVGSILPWNAPFLLAMKVPALACGNTIVLKPAQOSPLSALLIAKLAEEAGLPGDGLNVVVTGYGD
Q248E      NGPFHAYTLHEPIGVVGSILPWNAPFLLAMKVPALACGNTIVLKPAQOSPLSALLIAKLAEEAGLPGDGLNVVVTGYGD
Y348A      NGPFHAYTLHEPIGVVGSILPWNAPFLLAMKVPALACGNTIVLKPAQOSPLSALLIAKLAEEAGLPGDGLNVVVTGYGD
M353A      NGPFHAYTLHEPIGVVGSILPWNAPFLLAMKVPALACGNTIVLKPAQOSPLSALLIAKLAEEAGLPGDGLNVVVTGYGD
L511A      NGPFHAYTLHEPIGVVGSILPWNAPFLLAMKVPALACGNTIVLKPAQOSPLSALLIAKLAEEAGLPGDGLNVVVTGYGD

      250     260     270     280     290     300     310     320
dPpALDH2A TGMHIASHMDVDKVAFTGSTQVGRQIMQAAAQSNLKPVNLELGGKSPFIIFGDADMDAAVESAHQAIFBYNQGMQCVAGSR
E174A      TGMHIASHMDVDKVAFTGSTQVGRQIMQAAAQSNLKPVNLELGGKSPFIIFGDADMDAAVESAHQAIFBYNQGMQCVAGSR
A223F      TGMHIASHMDVDKVAFTGSTQVGRQIMQAAAQSNLKPVNLELGGKSPFIIFGDADMDAAVESAHQAIFBYNQGMQCVAGSR
Y226A      TGMHIASHMDVDKVAFTGSTQVGRQIMQAAAQSNLKPVNLELGGKSPFIIFGDADMDAAVESAHQAIFBYNQGMQCVAGSR
Q248A      TGMHIASHMDVDKVAFTGSTQVGRQIMQAAAQSNLKPVNLELGGKSPFIIFGDADMDAAVESAHQAIFBYNQGMQCVAGSR
Q248E      TGMHIASHMDVDKVAFTGSTQVGRQIMQAAAQSNLKPVNLELGGKSPFIIFGDADMDAAVESAHQAIFBYNQGMQCVAGSR
Y348A      TGMHIASHMDVDKVAFTGSTQVGRQIMQAAAQSNLKPVNLELGGKSPFIIFGDADMDAAVESAHQAIFBYNQGMQCVAGSR
M353A      TGMHIASHMDVDKVAFTGSTQVGRQIMQAAAQSNLKPVNLELGGKSPFIIFGDADMDAAVESAHQAIFBYNQGMQCVAGSR
L511A      TGMHIASHMDVDKVAFTGSTQVGRQIMQAAAQSNLKPVNLELGGKSPFIIFGDADMDAAVESAHQAIFBYNQGMQCVAGSR

      330     340     350     360     370     380     390     400
dPpALDH2A TFFVHESVYDEYLERAKARAEKRVVGD PFKPGVEQGPQADEAQFNKVMSYIRAGKDEGARLITGGERVSGKGYIIOPTIFS
E174A      TFFVHESVYDEYLERAKARAEKRVVGD PFKPGVEQGPQADEAQFNKVMSYIRAGKDEGARLITGGERVSGKGYIIOPTIFS
A223F      TFFVHESVYDEYLERAKARAEKRVVGD PFKPGVEQGPQADEAQFNKVMSYIRAGKDEGARLITGGERVSGKGYIIOPTIFS
Y226A      TFFVHESVYDEYLERAKARAEKRVVGD PFKPGVEQGPQADEAQFNKVMSYIRAGKDEGARLITGGERVSGKGYIIOPTIFS
Q248A      TFFVHESVYDEYLERAKARAEKRVVGD PFKPGVEQGPQADEAQFNKVMSYIRAGKDEGARLITGGERVSGKGYIIOPTIFS
Q248E      TFFVHESVYDEYLERAKARAEKRVVGD PFKPGVEQGPQADEAQFNKVMSYIRAGKDEGARLITGGERVSGKGYIIOPTIFS
Y348A      TFFVHESVYDEYLERAKARAEKRVVGD PFKPGVEQGPQADEAQFNKVMSYIRAGKDEGARLITGGERVSGKGYIIOPTIFS
M353A      TFFVHESVYDEYLERAKARAEKRVVGD PFKPGVEQGPQADEAQFNKVMSYIRAGKDEGARLITGGERVSGKGYIIOPTIFS
L511A      TFFVHESVYDEYLERAKARAEKRVVGD PFKPGVEQGPQADEAQFNKVMSYIRAGKDEGARLITGGERVSGKGYIIOPTIFS

      410     420     430     440     450     460     470     480
dPpALDH2A DVQDDMKICREEIFGPMVSVIKFKTVEEVIQRSNQSEYGLGATVMSKNVDIINTVTRSLKAGI VVWNTYGIITPSAPFGG
E174A      DVQDDMKICREEIFGPMVSVIKFKTVEEVIQRSNQSEYGLGATVMSKNVDIINTVTRSLKAGI VVWNTYGIITPSAPFGG
A223F      DVQDDMKICREEIFGPMVSVIKFKTVEEVIQRSNQSEYGLGATVMSKNVDIINTVTRSLKAGI VVWNTYGIITPSAPFGG
Y226A      DVQDDMKICREEIFGPMVSVIKFKTVEEVIQRSNQSEYGLGATVMSKNVDIINTVTRSLKAGI VVWNTYGIITPSAPFGG
Q248A      DVQDDMKICREEIFGPMVSVIKFKTVEEVIQRSNQSEYGLGATVMSKNVDIINTVTRSLKAGI VVWNTYGIITPSAPFGG
Q248E      DVQDDMKICREEIFGPMVSVIKFKTVEEVIQRSNQSEYGLGATVMSKNVDIINTVTRSLKAGI VVWNTYGIITPSAPFGG
Y348A      DVQDDMKICREEIFGPMVSVIKFKTVEEVIQRSNQSEYGLGATVMSKNVDIINTVTRSLKAGI VVWNTYGIITPSAPFGG
M353A      DVQDDMKICREEIFGPMVSVIKFKTVEEVIQRSNQSEYGLGATVMSKNVDIINTVTRSLKAGI VVWNTYGIITPSAPFGG
L511A      DVQDDMKICREEIFGPMVSVIKFKTVEEVIQRSNQSEYGLGATVMSKNVDIINTVTRSLKAGI VVWNTYGIITPSAPFGG

      490     500     510
dPpALDH2A YKSSGFGRENGAYALANYQQVKS VIMPI CNPPYL
E174A      YKSSGFGRENGAYALANYQQVKS VIMPI CNPPYL
A223F      YKSSGFGRENGAYALANYQQVKS VIMPI CNPPYL
Y226A      YKSSGFGRENGAYALANYQQVKS VIMPI CNPPYL
Q248A      YKSSGFGRENGAYALANYQQVKS VIMPI CNPPYL
Q248E      YKSSGFGRENGAYALANYQQVKS VIMPI CNPPYL
Y348A      YKSSGFGRENGAYALANYQQVKS VIMPI CNPPYL
M353A      YKSSGFGRENGAYALANYQQVKS VIMPI CNPPYL
L511A      YKSSGFGRENGAYALANYQQVKS VIMPI CNPPYL

```

Obrázek 14. Porovnání aminokyselinových sekvencí proteinu ΔPpALDH2A a jeho mutantních variant E174A, A223F, Y226A, Q248A, Q248E, Y348A, M353A a L511A. Místa mutací aminokyselin jsou vyznačena červeně.

3.2.2.2 Exprese genu *ΔPpALDH2A* a jeho mutantních variant

Prekultury byly připraveny naočkováním transformovaných T7 expresních buněk do 20 ml LB média se streptomycinem (25 mg ml⁻¹). Prekultury byly inkubovány na třepačce při 37 °C přes noc. Následující den byly centrifugovány při 4 000 x g a teplotě 20 °C po dobu 5 min. Sediment obsahující bakterie byl rozpuštěn ve 400 ml LB média se streptomycinem (25 mg ml⁻¹). Ty byly kultivovány na třepačce při 30 °C do nárůstu optické hustoty při 600 nm (OD₆₀₀) nad hodnotu 0,6. Poté byl odebrán 1 ml kultury (vzorek před indukcí), který byl centrifugován při 5 000 x g 5 min a sediment byl zmrazen na -20 °C.

Ke kultuře byl přidán 0,3 mmol l⁻¹ IPTG, který indukuje expresi proteinu. Kultura byla dále inkubována při 20 °C přes noc (podmínky zjištěné při optimalizaci exprese). Po ukončení exprese byly bakterie centrifugovány při 5 000 x g, teplotě 10 °C po dobu 20 min a poté byl bakteriální sediment promyt 0,9% (w/v) NaCl a uschován při -20°C pro následnou extrakci proteinů.

3.2.2.3 Optimalizace podmínek exprese

K optimalizaci podmínek exprese byl nejprve proveden screening produkce rekombinantních proteinů. Kultury byly po přidání 0,3 mmol l⁻¹ IPTG, k indukci exprese proteinu, inkubovány při 20 °C na třepačce. Po 2 h inkubaci byl odebrán vzorek kultury, jenž byl naředěn na hodnotu odpovídající OD₆₀₀, naměřenou před indukcí. Proběhla centrifugace při 5 000 x g, 5 min a sediment byl zamražen. Stejný krok byl proveden také po 4 h inkubaci a na druhý den ráno.

Vzorky sedimentů před indukcí, 2 h, 4 h a přes noc po indukci byly rozpuštěny v 8 mol l⁻¹ močovíně, díky níž došlo k rozpuštění membrán. Vzorky byly smíchány se vzorkovacím pufrem (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad) obsahujícím merkaptoethanol a inkubovány v blokovém termostatu 10 min při 100 °C. Poté byly analyzovány pomocí diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Jako standard byl použit Protein Ladder 10-250 kDa (NEB, USA). Elektrodový pufr (pH 8,3) obsahoval 25 mmol l⁻¹ Tris, 192 mmol l⁻¹ glycin a 0,1% SDS. Dle tabulky 4 byl připraven dělicí a zaostřovací gel. Vznik polyakrylamidového gelu je podmíněn polymerací akrylamidu (AA) a *N,N'*-metylenbisakrylamidu (BIS), zahájeného přidávkem roztoku persíranu amonného (APS) za přítomnosti stabilizátoru tetramethylethyldiaminu (TEMED). Elektroforéza

probíhala pod napětím 120 V po dobu asi 1 h. Gel byl barven přes noc v barvicím roztoku Coomassie Brilliant Blue (0.0025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 40% (v/v) methanol, 7% (v/v) kyselina octová) a následně odbarven v roztoku obsahujícím 30% methanol (v/v) a 10% (v/v) kyselinu octovou.

Tabulka 4. Složení SDS-PAGE gelů.

Složka	Dělicí gel 12% (ml)	Zaostřovací gel 4% (ml)
AA/BIS (30%/0,8%)	4	0,65
Tris-HCl 1,5 mol l ⁻¹ , pH 8,8	2,5	-
Tris-HCl 0,5 mol l ⁻¹ , pH 6,8	-	1,25
SDS (10%)	0,1	0,1
TEMED	0,015	0,015
H ₂ O	3,2	2,95
APS (10%)	0,050	0,060

Proteiny v rozpustné fázi byly z bakteriálních sedimentů extrahovány dle postupu 3.2.3.1. Konečná centrifugace probíhala 30 min při 7 100 x g a 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky (rozpustná fáze). Sediment byl dvakrát promyt v 50 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru, pH 7,5 a rozpuštěn v 8 mol l⁻¹ močovně (nerozpustná fáze). Tyto vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

3.2.3 Extrakce a purifikace proteinů

3.2.3.1 Extrakce proteinů

Bakteriální sediment byl rozsuspendován v 6 ml extrakčního pufru, který obsahoval 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 a 50 µl inhibitoru proteas. Buňky byly lyzovány pomocí přístroje Cell Disruptor - One Shot Model (Constant Systems, UK) při 25 kpsi. K lyzátu byly přidány 4 µl RNAsy (10 µg ml⁻¹) a 4 µl DNAsy (10 U µl⁻¹). Směs byla inkubována při 37 °C na 30 min, poté bylo přidáno 750 µl 1 mol l⁻¹ NaCl a 750 µl 50% glycerolu. Následovala centrifugace při 7 100 x g, 4 °C a 45 min. K purifikaci proteinů byl použit supernatant, ve kterém se nachází rozpustné proteiny.

3.2.3.2 Purifikace proteinů

Rekombinantní proteiny s histidinovou značkou byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie na centrifugačních kolonkách s imobilizovanými kobaltnatými ionty při 4 °C a nízkých otáčkách 300 x g po dobu 30 - 60 s. Kolonky byly nejprve třikrát promyty vodou a ekvilibračním pufrem o složení 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5,

300 mmol l⁻¹ NaCl, 5% glycerol a 10 mmol l⁻¹ imidazol. Na kolonky byl nanesen supernatant obsahující extrahované proteiny a kolonky byly inkubovány na rotátoru při 4 °C 1 h. Poté byla z kolonek centrifugací odstraněna flow-through (FT) frakce, která obsahovala nezachycené proteiny. Kolonky byly třikrát promyty 5 ml ekvilibračního pufru. Poté byla dvakrát provedena eluce pomocí elučního pufru, který obsahoval 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5, 300 mmol l⁻¹ NaCl, 5% glycerol a 250 mmol l⁻¹ imidazol. Kolonky byly inkubovány při 4 °C na rotátoru po dobu 30 min. Kolonky byly nakonec promyty promývacím roztokem bez imidazolu (20 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 1% glycerol). Dvě eluční frakce byly spojeny a takto získaný enzym byl zakonzentrován na centrifugačním filtru (Millipore) o velikosti 50 kDa na objem 0,5-1,5 ml. Kolonky byly na závěr promyty elučním pufrem, vodou a 6 mol l⁻¹ guanidinem HCl pro eluci zbylých nečistot. Nakonec byl přidán 20% ethanol, ve kterém se kolonky uchovávají.

3.2.3.3 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace purifikovaných proteinů byla stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou (BCA). Metoda je založena na tvorbě modrofialového komplexu bicinchoninátu sodného s Cu⁺ ionty, které vznikají reakcí peptidových vazeb enzymu s Cu²⁺ ionty, které pochází ze CuSO₄. Pracovní roztok byl připraven smícháním roztoku A (1 g bicinchoninát sodný, 2 g Na₂CO₃, 0,16 g vřan sodný, 0,4 g NaOH, 0,95 g NaHCO₃ ve 100 ml deionizované vody, pH upraveno pomocí NaOH na 11,25) s roztokem B (4 g CuSO₄ ve 100 ml deionizované vody) v poměru 50:1. Kalibrační křivka byla sestavena za pomoci roztoku hovězího albuminu (BSA) o koncentraci 1 mg ml⁻¹. Jako slepý vzorek byl použit pracovní roztok. Vzorky byly inkubovány 30 min při 37 °C a poté byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Z naměřených hodnot absorbance byla sestavena kalibrační přímka jejich vynesáním proti hmotnosti BSA v reakční směsi a užití lineární regrese.

Ke 2 ml pracovního roztoku byl napipetován pětkrát a desetkrát ředěný a neředěný vzorek proteinu. Po inkubaci byla naměřená hodnota absorbance dosazena do rovnice kalibrační přímky, ze které byla vypočítána hmotnost proteinu v reakci, dále přepočítána na 1 ml vzorku a zprůměrována.

3.2.4 Western blotting a detekce proteinů

K potvrzení přítomnosti purifikovaných rekombinantních proteinů bylo použito konjugátu HisPróby-HRP (Thermo Fisher Scientific) a chemiluminiscence. Proteiny byly z akrylamidového gelu přeneseny na polyvinilidendifluoridovou (PVDF) membránu. PVDF membrána byla ponořena do 100% (v/v) ethanolu, poté do vody a do blotovacího pufru dle Bjerruma a Schafer-Nielsen (48 mmol l⁻¹ Tris, 192 mmol l⁻¹ glycin, 20% (v/v) ethanol a 1,3 mmol l⁻¹ SDS, pH 9,2), ve kterém byly ponořeny i blotovací papíry. Na dno blotovací kazety byly položeny dva zvlhčené blotovací papíry, PVDF membrána, SDS-PAGE gel a další dva blotovací papíry. Vzduchové bubliny mezi blotovacími papíry, gelem a membránou byly odstraněny pomocí válečku. Kazeta byla uzavřena víkem a vložena do přístroje Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) po dobu 7 min při napětí 25 V.

PVDF membrána byla ponechána přes noc v blokovacím pufru (50 mmol l⁻¹ Tris, 150 mmol l⁻¹ NaCl, 0,05% Tween, 2,5% BSA, pH 7,6). Další den byla po dobu 1 hod inkubována s konjugátem HisPróby-HRP (2 ug ml⁻¹) v blokovacím pufru. Poté byla membrána po dobu 10 min promývána v roztoku TBST (50 mmol l⁻¹ Tris-HCl, 150 mmol l⁻¹ NaCl, 0,05% Tween, pH 7,6). Poslední krok byl opakován pětkrát. Následovalo vyvíjení v roztoku vzniklého smícháním luminolu a peroxidu (1:1). Membrána byla vyfocena na přístroji AmershamTM Imager 600 (GE Life Sciences, USA).

3.2.5 Gelová permeační chromatografie

Byl použit kapalinový chromatograf pro střednětlakou chromatografii BioLogic DuoFlow (Bio-Rad) s kolonou Superdex 200 10/300 HR. Mobilní fáze byla tvořena 50 mmol l⁻¹ fosfátovým pufr (pH 7,0) obsahujícím 150 mmol l⁻¹ NaCl. Jako standardy byly použity thyroglobulin (670 kDa), gama-globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) a B12 (1,35 kDa). Průtoková rychlost byla 0,7 ml/min. V pórovitém gelu dochází ke sterickému vyloučení větších molekul, kdežto malé molekuly pronikají do nitra částic gelů a zpožďují se tak.

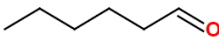
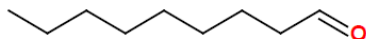
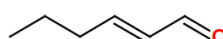
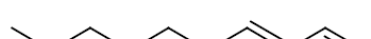
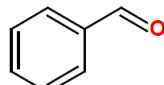
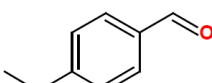
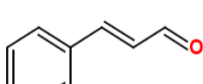
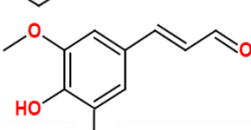
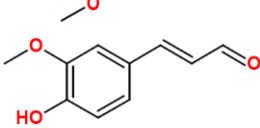
3.2.6 Cirkulární dichroismus

Pomocí cirkulárního dichroismu byla ověřena sekundární struktura studovaných proteinů. Při měření cirkulárního dichroismu (CD) se měří se rozdíl mezi absorbancí levostranně a pravostranně orientovaného cirkulárně polarizovaného světla pro definovaný rozsah vlnových délek. Tento rozdíl lze vyjádřit pomocí několika veličin. Například z Lambert-Beerova zákona lze odvodit molární cirkulární dichroismus $\Delta\epsilon$, jež se udává v jednotkách $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Dalšími veličinami jsou elipticita θ či molární elipticita $[\theta]$. Sekundární struktura proteinů se stanovuje měřením CD spekter ve vzdálené UV oblasti, kde je chromoforem peptidová vazba. Struktury α -helixu, β -skládaného listu a náhodné smyčky poskytují charakteristické spektrum. Pro měření byl použit spektrometr Jasco-J815 a křemenné kyvety s délkou optické dráhy 0,2 cm. Vzorky byly naředěny na koncentraci asi $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ a byly změřeny spektra v rozsahu vlnových délek 195 - 250 nm. CD spektrum bylo získáno vynesemím elipticity θ v milistupních (mdeg) oproti vlnové délce.

3.2.7 Testování substrátové specificity

Aktivita enzymů byla měřena UV/VIS spektrofotometrem Cary 8454 UV-Vis (Agilent Technologies, USA) při 340 nm pomocí Warburgova optického testu v prostředí 150 mmol l^{-1} Tris-HCl pufru (pH 7,5), kofaktoru a substrátu o koncentraci 3 mmol l^{-1} a 1 mmol l^{-1} . Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 2 ml. Seznam testovaných substrátů a jejich strukturních vzorců je uveden v tabulce 5. Aktivita enzymů s aromatickými substráty byla měřena spektrofluorometricky za užití FluoroLog-3 spektrofluorometru (Horiba Scientific, USA) při excitaci 365 nm a emisi 460 nm v prostředí 150 mmol l^{-1} Tris-HCl pufru (pH 7,5), kofaktoru a substrátu o koncentraci 3 mmol l^{-1} a 1 mmol l^{-1} . Celkový objem reakční směsi byl 200 μl .

Tabulka 5. Aldehydy využívané pro test substrátové specifity.

Zkratka	Název	Strukturní vzorec
C6	Hexanal	
C9	Nonanal	
t-2-C6	<i>trans</i> -2-Hexenal	
t-2-C9	<i>trans</i> -2-Nonenal	
BenzAL	Benzaldehyd	
p-AnisAL	<i>p</i> -Anisaldehyd	
CinAL	Cinnamaldehyd	
SinAL	Sinapaldehyd	
ConAL	Coniferylaldehyd	

3.2.8 Stanovení kinetických parametrů

Při měření kinetických parametrů pro kofaktor byla použita konstantní koncentrace substrátu 1 mmol l^{-1} , naopak při měření kinetických parametrů pro substrát byla pro všechna měření použita konstantní koncentrace kofaktoru 3 mmol l^{-1} . Celkový objem reakční směsi byl 2 ml. V programu GraphPad Prism 5 byly stanoveny hodnoty K_m a V_{lim} pomocí rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

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

3.2.9 Teplotní stabilita

Teplotní stabilita byla stanovena pomocí nano diferenciální skenovací fluorimetrie, která využívá změny fluorescence tyrosinu a tryptofanu při tání a denaturaci proteinu. Poměrem intenzity fluorescence při 350 a 330 nm lze určit změny ve struktuře proteinů. Vzorky proteinů byly ve 20 mmol l⁻¹ Tris HCl pufru (pH 7,5), 1 mmol l⁻¹ NaCl a 1% glycerolu naředěny na koncentraci 0,1 mg ml⁻¹ a byly nasáty do kapilár vlivem kapilární elevace. Každý vzorek byl takto připraven ve třech opakováních. Kapiláry byly vloženy do přístroje Pometheus NT.48 (NanoTemper Technologies), který změřil fluorescenci pro 350 a 330 nm při ohřevu 1 °C/min do 95 °C. Výstupem je závislost poměru intenzit fluorescence při 350 a 330 nm na teplotě. Hodnoty T_m (teplota, při níž je protein z poloviny rozvolněný) byly stanoveny z grafu závislosti první derivace F_{350}/F_{330} na teplotě.

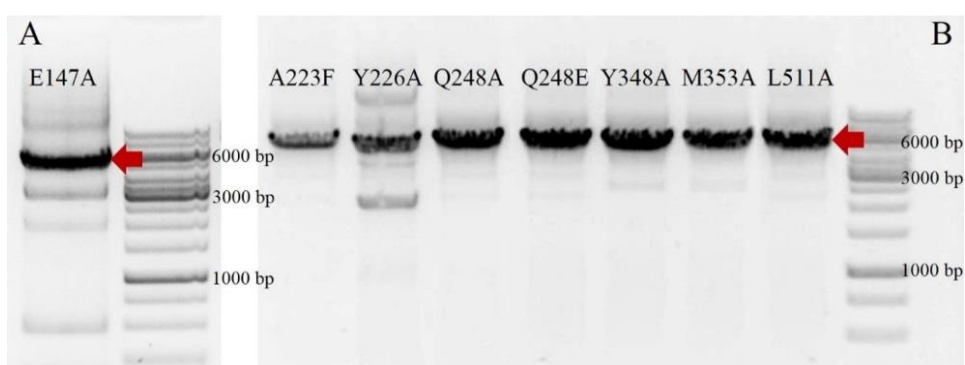
Teplotní stabilita byla také stanovena pomocí Warburgova optického testu. Vzorky proteinů byly inkubovány 30 min při teplotách v rozmezí 4 – 75 °C, poté byla měřena reziduální enzymová aktivita. Měření probíhalo v prostředí 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru o pH 7,5 s konstantní koncentrací kofaktoru (NAD⁺) 3 mmol l⁻¹ a substrátu nonanalů (C9) 1 mmol l⁻¹. Hodnoty T_{50} byly stanoveny v programu GraphPad Prism 5.

4 VÝSLEDKY

4.1 Místně specifická mutace genu $\Delta PpALDH2A$

4.1.1 Mutagenese pomocí PCR

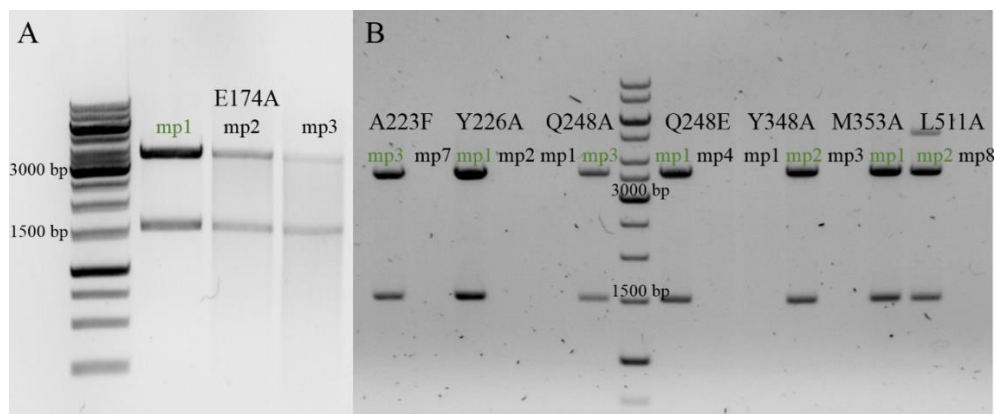
Amplifikace úseků DNA o předpokládané velikosti cca 5100 bp (plazmid cca 3500 bp a inzert cca 1600 bp) byla potvrzena agarosovou elektroforézou produktů PCR (Obrázek 15). Pásky odpovídající velikostí příslušným plazmidům byly vyříznuty, purifikovány pomocí kitu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), ošetřeny enzymem DpnI, religovány a transformovány do buněk *E. coli* NEB5 α .



Obrázek 15. Agarosová elektroforéza plazmidů po mutagenesi genu $\Delta PpALDH2A$ pomocí PCR. (A) Mutantní forma E147A, (B) mutantní formy A223F, Y226A, Q248A, Q248E, Y348A, M353A a L511A. Šipkou jsou označeny pásky odpovídající velikosti plazmidů, zbylé pásky odpovídají úsekům DNA namnožených po nespecifické vazbě primeru. Byl použit 1% agarosový gel.

4.1.2 Screening plazmidové DNA

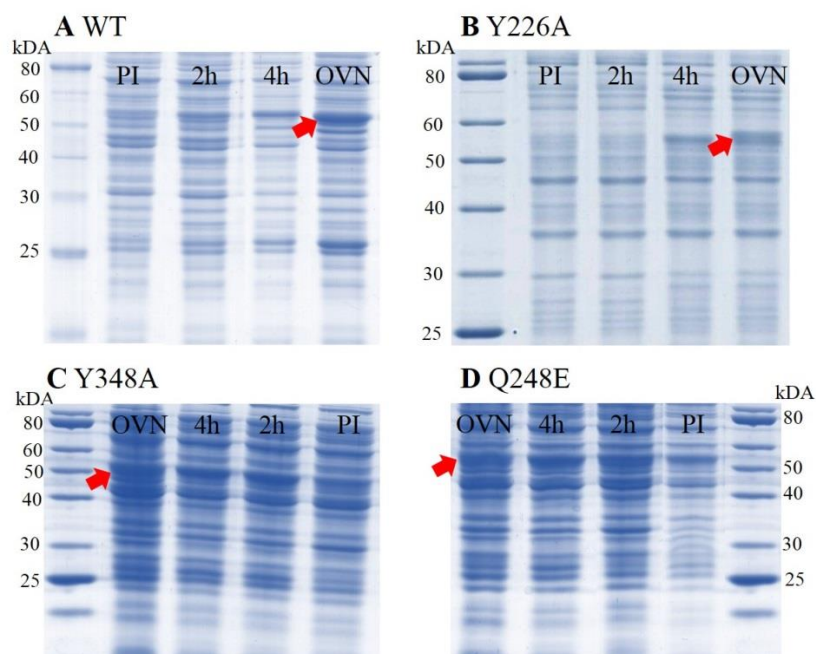
Plazmidy byly purifikovány z bakteriální kultury a štěpeny endokukleasami XhoI a BamHI-HF. Naštěpené plazmidy byly podrobeny elektroforetické separaci v agarosovém gelu (Obrázek 16). Jestliže byly u daného klonu pozorovány dva bandy, první o velikosti cca 3500 bp (plazmid bez insertu) a druhý o velikosti cca 1600 bp (inzert), tak byl výsledek screeningu pozitivní. Pozitivní klony byly poté poslány na sekvenaci. Aminokyselinové sekvence proteinu $\Delta PpALDH2A$ a jeho jednotlivých mutantních variant můžeme pozorovat na obrázku 14 (uvedeno dříve spolu s primery). Sekvence prokázala výskyt bodové mutace u jednotlivých variant, zbytek sekvence zůstalo zachováno.



Obrázek 16. Screening plazmidů pomocí endonukleas. (A) Varianta E174A, (B) varianty A223F, Y226A, Q248A, Q248E, Y348A, M353A a L511A. Plazmidy byly štěpeny restričními endonukleasami XhoI a BamHI-HF. Zeleně vyznačené klony byly poslány k sekvenaci. Byl použit 1% agarosový gel.

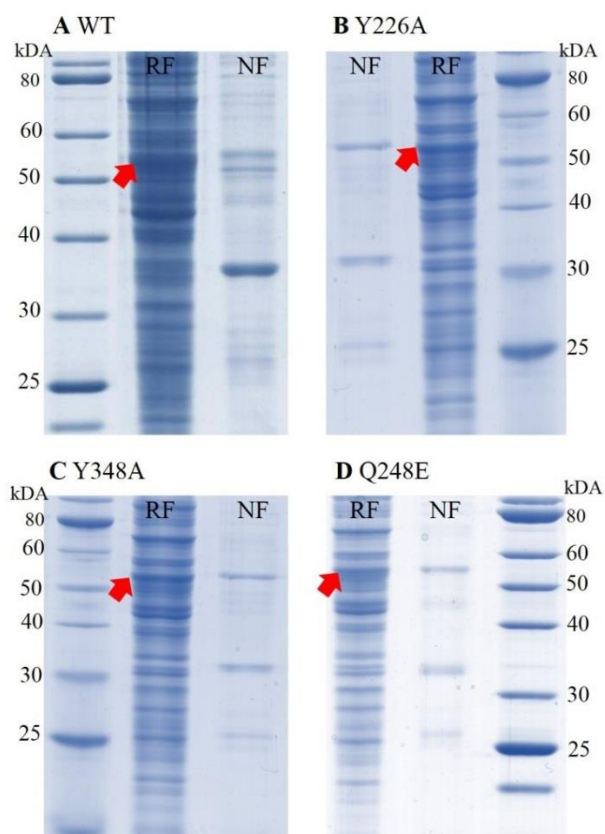
4.2 Optimalizace podmínek exprese

Byl proveden screening exprese proteinu Δ PpALDH2A (WT) a jeho vybraných mutantních variant v expresních buňkách *E. coli* T7. Pro testování optimálních podmínek byl vybrán enzym Δ PpALDH2A (WT) a jeho mutantní varianty Y226A, Y348A a Q248E, které při testování substrátové specifity vykazovaly nižší aktivitu, avšak míra jejich exprese se výrazně neliší. (Obrázek 17).



Obrázek 17. Optimalizace produkce rekombinantního proteinu Δ PpALDH2A a jeho variant. (A) Δ PpALDH2A - WT, (B) Y226A, (C) Y348A, (D) Q248E. Vzorky byly odebrány před indukcí (PI), 2 hod, 4 hod a přes noc (OVN) po indukci pomocí 0,3 mmol l⁻¹ IPTG, kdy byly kultury inkubovány při 20 °C. Šipkami jsou označeny pozice proteinů odpovídající velikosti asi 55 kDa.

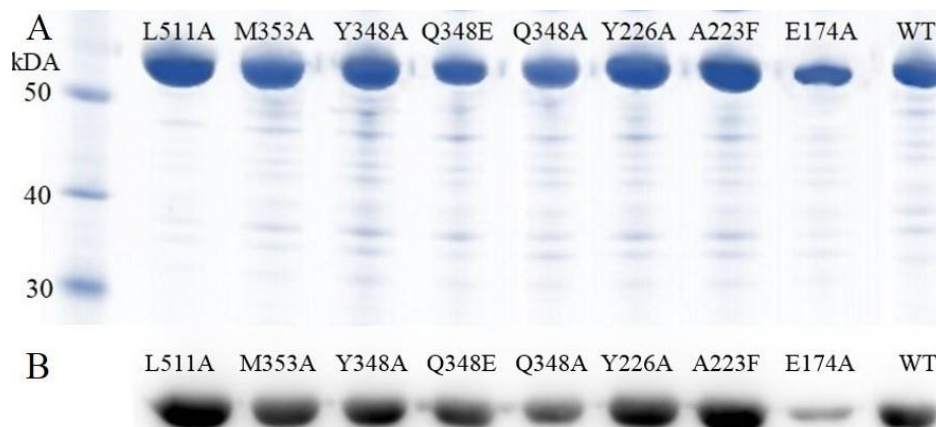
Produkce rekombinantních proteinů byla potvrzena pomocí SDS-PAGE a bylo ověřeno, že pro jejich optimální produkci je vhodná teplota 20 °C a optimální délka exprese je přes noc. Pomocí SDS-PAGE byla také potvrzena přítomnost rekombinantního proteinu v rozpustné fázi (Obrázek 18). Rozpustná fáze byla dále využita pro purifikaci proteinů afinitní chromatografií.



Obrázek 18. Porovnání produkce rekombinantního proteinu do rozpustné fáze (RF) a inkluzních tělísek (nerozpustné fáze, NF). (A) Δ PpALDH2A – WT, (B) Y226A, (C) Y348A, (D) Q248E. Pozice na gelu při 55 kDa, odpovídající velikosti studovaných proteinů, jsou označeny šipkou.

4.3 Purifikace rekombinantních proteinů a jejich detekce

Rekombinantní proteiny, obsahující histidinovou značku, byly purifikovány afinitní chromatografií na kolonkách s imobilizovanými kobaltnatými ionty. Poté byly pomocí filtračního centrikonu zakoncentrovány na objem asi 0,5 – 1,5 ml. Byla provedena SDS-PAGE, čímž byla ověřena čistota proteinů pro následující měření enzymových aktivit. Purifikované rekombinantní proteiny byly přebíleny na PVDF membránu a k jejich detekci byl využit konjugát HisProbe-HRP (Thermo Fisher Scientific, USA). Chemiluminiscence byla vyfocena přístrojem AmershamTM imager 600 (GE Life Sciences, USA) (Obrázek 19).



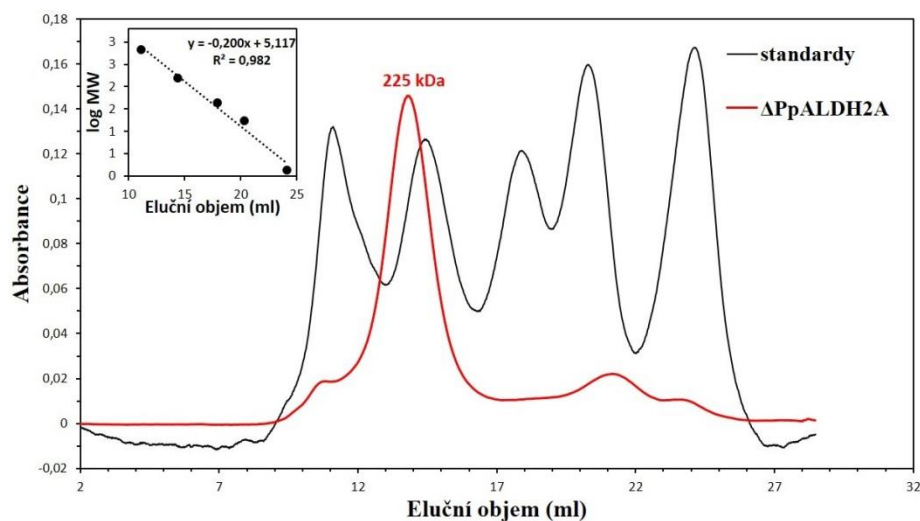
Obrázek 19. SDS-PAGE a chemiluminiscence. (A) SDS-PAGE rekombinantních proteinů a barvení pomocí Coomassie, (B) detekce proteinů na PVDF membráně. Membrána byla inkubována s HisProbe-HRP konjugátem a chemiluminiscenční detekce byla provedena pomocí luminolu a peroxidu vodíku.

4.4 Gelová permeační chromatografie

Pomocí gelové permeační chromatografie byla zjištěna molekulová hmotnost Δ PpALDH2A za nativních podmínek. Ze závislosti logaritmu molekulových hmotností standardů (Tabulka 6) na jejich elučním objemu byla stanovena kalibrační přímka (Obrázek 20). Rovnice kalibrační přímky byla použita k výpočtu molekulové hmotnosti Δ PpALDH2A, což odpovídalo 225 kDa. Pomocí SDS-PAGE byla velikost podjednotky určena přibližně na 55 kDa, což odpovídá teoretické velikosti včetně His-tagu. Kvartérní struktura enzymu je tudíž tetramerní.

Tabulka 6. Eluční objemy proteinů gelovou permeační chromatografií. Logaritmy molekulových hmotností standardů a zjištěný eluční objem. MW – molekulová hmotnost

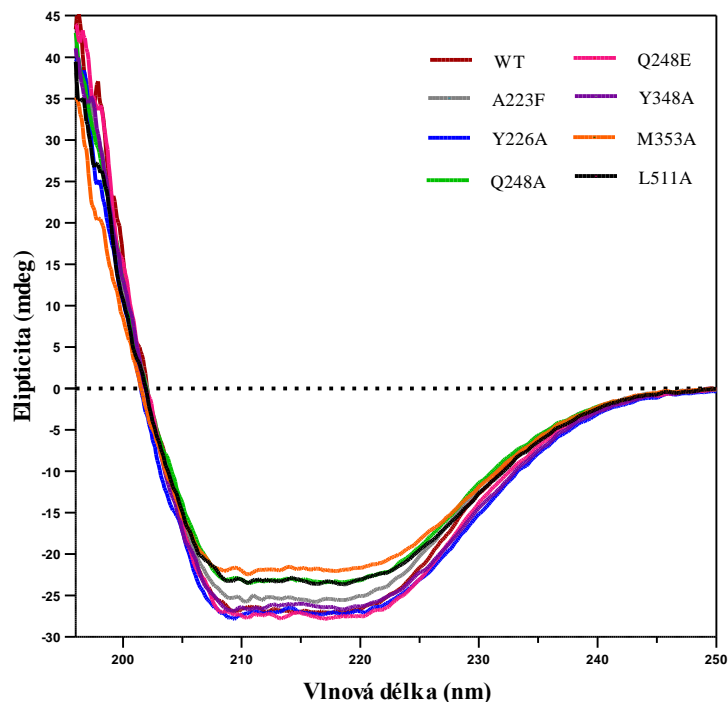
Protein	Eluční objem (ml)	MW (kDa)	log MW
thyroglobulin	11,11	670	2,83
gama-globulin	14,40	158	2,20
ovalbumin	17,90	44	1,64
myoglobin	20,30	17	1,23
B12	24,12	1,35	0,13
Δ PpALDH2A	13,83	225	2,35



Obrázek 20. Eluční profil Δ PpALDH2A na koloně Superdex 200 10/300 HR. Mobilní fázi tvořil 50 mmol l⁻¹ K-fosfátový pufr (pH 7,0) obsahující 150 mmol l⁻¹ NaCl. Proteinové standardy (thyroglobulin 670 kDa, gama-globulin 158 kDa, ovalbumin 44 kDa, myoglobin 17 kDa a B12 1,35 kDa) jsou vyznačeny černě. Eluční profil Δ PpALDH2A je označen červeně. Je vložen graf lineární kalibrace s rovnicí pro výpočet molekulové hmotnosti.

4.5. Stanovení sekundární struktury

Měřením spekter cirkulárního dichroismu bylo ověřeno zachování sekundární struktury u mutantních forem Δ PpALDH2A. CD spektra mutantních forem jsou téměř shodné s WT (Obrázek 21). Bylo potvrzeno, že sekundární struktura mutantních forem je zachována a data z kinetických měření jsou tudíž pouze výsledkem bodové mutace.

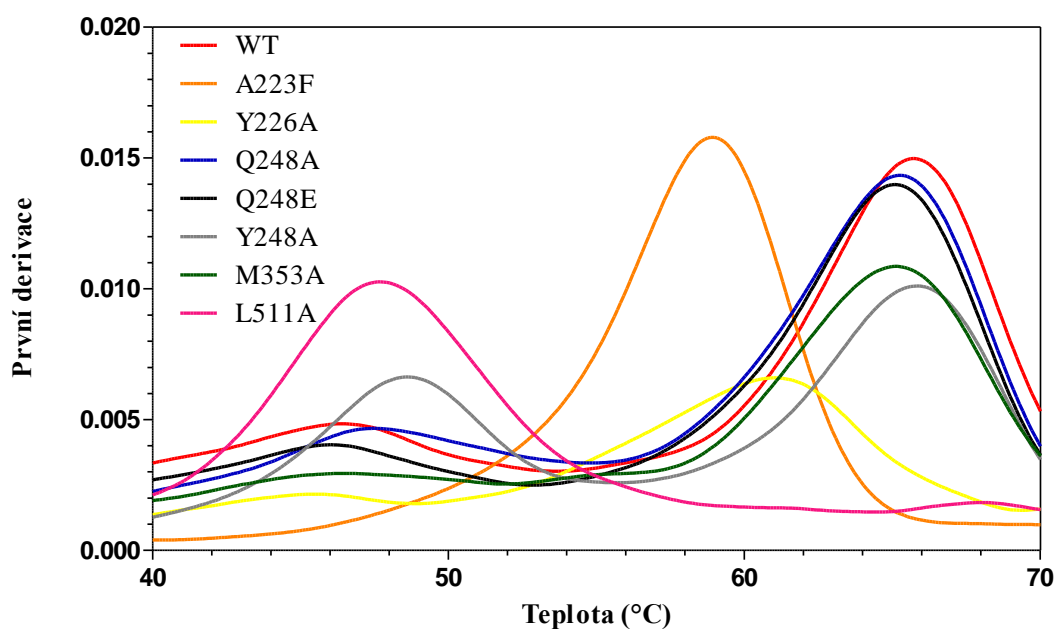


Obrázek 21. CD spektra Δ PpALDH2A a jeho studovaných variant.

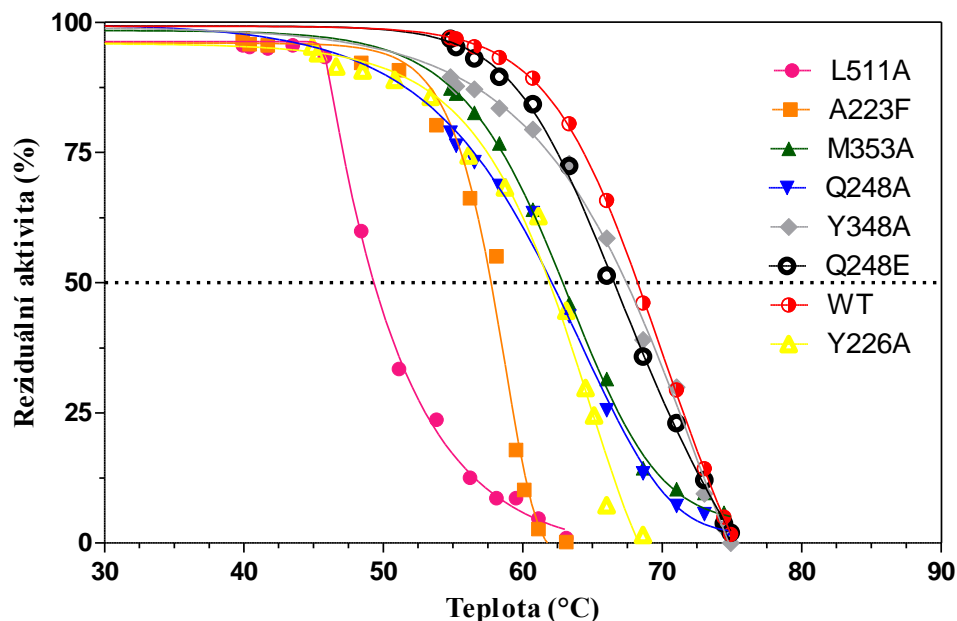
4.6 Teplotní stabilita

Teplotní stabilita byla pro Δ PpALDH2A a jeho sedm mutantních variant měřena pomocí nano diferenciální skenovací fluorimetrie (DSF) na přístroji Prometheus NT.48 v rozmezí teplot 20 - 95 °C (Obrázek 22) v 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5), 1 mmol l⁻¹ NaCl a 1% GOL. Každé měření bylo provedeno celkem třikrát. Hodnoty T_m byly stanoveny z grafu závislosti první derivace F_{350}/F_{330} na teplotě.

Druhou metodou stanovení teplotní stability bylo spektrofotometrické stanovení reziduální aktivity, kdy byly proteiny inkubovány po dobu 30 min při teplotách v rozmezí 4 - 75 °C (Obrázek 23) v 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5). Následně byla zbytková aktivita stanovena při použití 3 mmol l⁻¹ NAD⁺ a 1 mmol l⁻¹ nonanal. Hodnoty T_{50} byly určeny v programu GraphPad prism 5



Obrázek 22. Termostabilita Δ PpALDH2A a jeho sedmi variant. Měření pomocí nanoDSF v prostředí 20 mmol l⁻¹ Tris HCl pufru (pH 7,5), 1 mmol l⁻¹ NaCl a 1% GOL.



Obrázek 23. Termostabilita Δ PpALDH2A a jeho sedmi mutantních variant. Residuální aktivity byly měřeny spektrofotometricky při 340 nm. Měření probíhalo v 150 mmol l⁻¹ Tris HCl pufru (pH 7,5), 1 mmol l⁻¹ nonanal a 3 mmol l⁻¹ NAD⁺. Hodnoty T_{50} byly určeny v programu GraphPad prism 5. T_{50} - teplota, při níž enzym ztratí polovinu své aktivity.

Výsledky obou metod shrnuje tabulka 7. Hodnoty T_m a T_{50} se v rámci těchto metod mírně liší, což reflektuje rozdílné metody jejich stanovení. Trend teplotní stability však zůstává zachován. Nejméně stabilní je varianta L511A, následuje A223F a nejvíce stabilní naopak WT.

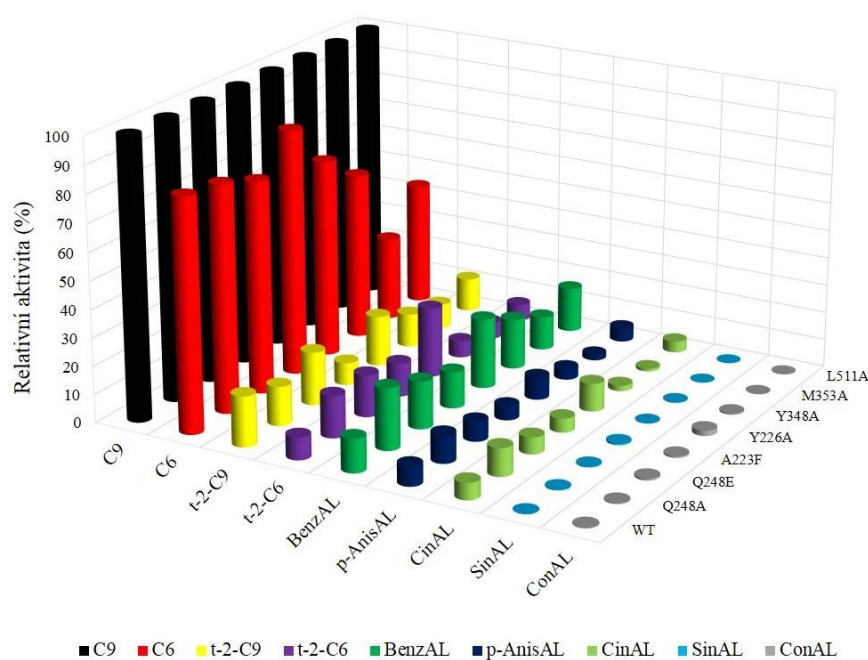
Tabulka 7. Hodnoty T_m a T_{50} Δ PpALDH2A a jeho sedmi mutantních variant. NanoDSF měření probíhalo v prostředí 20 mmol l⁻¹ Tris HCl pufru (pH 7,5), 1 mmol l⁻¹ NaCl a 1% GOL. Residuální aktivity byly měřeny v prostředí 150 mmol l⁻¹ Tris HCl pufru (pH 7,5), 1 mmol l⁻¹ nonanal a 3 mmol l⁻¹ NAD⁺.

Varianta enzymu	T_m (°C)	
	Nano DSF	Reziduální aktivita
WT	65,7 ± 0,1	68,1 ± 1,7
A223F	58,8 ± 0,1	57,9 ± 0,3
Y226A	60,8 ± 0,2	62,1 ± 0,9
Q248A	65,2 ± 0,1	62,3 ± 0,4
Q248E	65,0 ± 0	66,4 ± 3,0
Y348A	65,7 ± 0	67,2 ± 1,4
M353A	65,1 ± 0	62,6 ± 0,2
L511A	47,7 ± 0,1	49,6 ± 0,2

4.7 Substrátová specificita

Substrátová specificita Δ PpALDH2A a připravených variant byla stanovena za použití celkem devíti substrátů o finální koncentraci v reakční směsi 1 mmol l⁻¹. Všechna měření byla provedena v přítomnosti 150 mmol l⁻¹ Tris HCl pufru (pH 7,5) a koenzymu NAD⁺ s finální koncentrací 3 mmol l⁻¹. Byly použity čtyři alifatické (hexanal, nonanal, trans-2-hexenal, trans-2-nonenal) a pět aromatických aldehydů (benzaldehyd, *p*-anisaldehyd, cinnamaldehyd, sinapaldehyd, coniferylaldehyd).

Specifické aktivity enzymů můžeme pozorovat v tabulce 8. Všechna měření byla provedena ve čtyřech opakováních, z nichž jsou vyjádřeny směrodatné odchylky. Preferovaným substrátem byl pro všechny varianty nonanal (C9) a data vyjádřena relativně vzhledem k aktivitě s nonanalem (100 %) jsou uvedena v tabulce 9 a obrázku 24. Y226A varianta vykazuje 4-krát nižší specifickou aktivitu než WT a varianta M353A vykazuje významně vyšší poměr oxidace nonanalů vůči hexanalům. Specifické aktivity s nenasycenými aldehydy, *trans*-2-nonenalem a *trans*-2-hexenalem, byly ve srovnání se svými nasycenými variantami výrazně nižší v případě všech zkoumaných Δ PpALDH2A enzymů.



Obrázek 24. Relativní aktivity Δ PpALDH2A a jeho variant s devíti substráty. Měřeno ve 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5), 3 mmol l⁻¹ NAD⁺ a 1 mmol l⁻¹ substrátu. Relativní aktivity pro každou variantu enzymu jsou vztaženy k její aktivitě s nonanalem (100 %), která byla 8,61 nkat mg⁻¹ pro WT; 7,24 nkat mg⁻¹ pro A223F; 2,18 nkat mg⁻¹ pro Y226A; 13,89 nkat mg⁻¹ pro Q248A; 6,38 nkat mg⁻¹ pro Q248E; 5,28 nkat mg⁻¹ pro Y348A; 7,49 nkat mg⁻¹ pro M353A a 7,14 nkat mg⁻¹ pro L511A. C9 - nonanal, C6 - hexanal, t-2-C9 - trans-2-nonenal, t-2-C6 - trans-2-hexenal, BenzAL - benzaldehyd, p-AnisAL - *p*-anisaldehyd, SinAL - sinapaldehyd, ConAL – coniferylaldehyd.

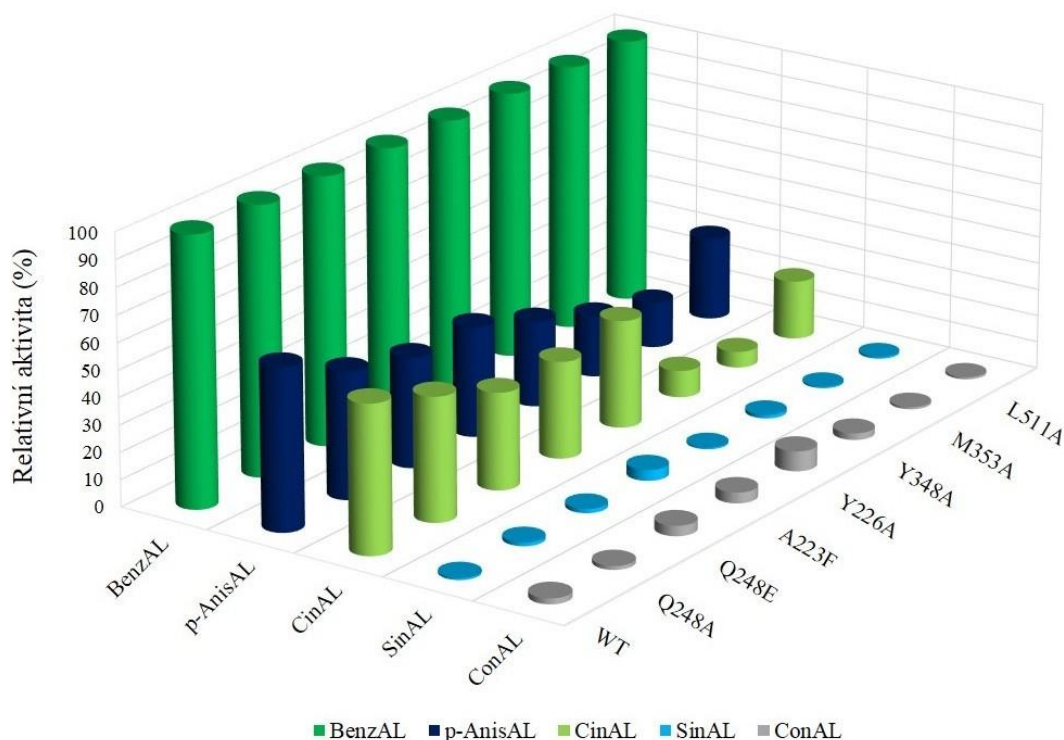
Tabulka 8. Specifické aktivity Δ PpALDH2A a jeho variant. Specifické aktivity (v nkat mg⁻¹) byly měřeny ve 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5), 2 mmol l⁻¹ NAD⁺ a 1 mmol l⁻¹ substrátu. Všechna měření probíhala v kvadruplikátech, směrodatné odchylky jsou uvedeny.

	Specifická aktivita (nkat mg ⁻¹)								
	Nonanal	Hexanal	<i>trans</i> -2-Nonenal	<i>trans</i> -2-Hexenal	Benzaldehyd	<i>p</i> -Anisaldehyd	Cinnamaldehyd	Sinapaldehyd	Coniferylaldehyd
WT	8,61 ± 0,2	7,15 ± 0,09	1,54 ± 0,03	0,67 ± 0,049	0,99 ± 0,13	0,59 ± 0,1	0,55 ± 0,05	0,007 ± 0,00045	0,021 ± 0,0028
Q248A	13,89 ± 0,51	11,28 ± 0,21	2,01 ± 0,1	2,13 ± 0,2	3,07 ± 0,155	1,46 ± 0,019	1,42 ± 0,06	0,039 ± 0,0015	0,042 ± 0,0007
Q248E	6,38 ± 0,28	4,84 ± 0,17	1,20 ± 0,021	0,95 ± 0,6	1,09 ± 0,04	0,45 ± 0,015	0,39 ± 0,03	0,017 ± 0,0007	0,041 ± 0,0026
A223F	7,24 ± 0,15	6,39 ± 0,23	0,60 ± 0,017	0,9 ± 0,08	0,94 ± 0,11	0,38 ± 0,05	0,34 ± 0,048	0,037 ± 0,006	0,038 ± 0,005
Y226A	2,18 ± 0,14	1,55 ± 0,1	0,40 ± 0,015	0,54 ± 0,021	0,55 ± 0,09	0,18 ± 0,016	0,22 ± 0,047	0,003 ± 0,0011	0,041 ± 0,008
Y348A	5,28 ± 0,18	3,15 ± 0,29	0,65 ± 0,022	0,33 ± 0,01	0,95 ± 0,05	0,22 ± 0,006	0,09 ± 0,01	0,012 ± 0,00117	0,024 ± 0,0011
M353A	7,49 ± 0,22	2,27 ± 0,07	0,69 ± 0,05	0,48 ± 0,048	0,90 ± 0,153	0,16 ± 0,003	0,05 ± 0,016	0,005 ± 0,0008	0,007 ± 0,0022
L511A	7,14 ± 0,32	3,14 ± 0,31	0,86 ± 0,04	0,41 ± 0,042	1,14 ± 0,14	0,35 ± 0,04	0,25 ± 0,032	0,008 ± 0,00064	0,009 ± 0,0013

Tabulka 9. Relativní aktivity Δ PpALDH2A a jeho variant. Relativní aktivity jsou pro každou variantu enzymu vztaženy k její aktivitě s nonanalem jako 100 %, která byla 8,61 nkat mg⁻¹ pro WT; 7,24 nkat mg⁻¹ pro A223F; 2,18 nkat mg⁻¹ pro Y226A; 13,89 nkat mg⁻¹ pro Q248A; 6,38 nkat mg⁻¹ pro Q248E; 5,28 nkat mg⁻¹ pro Y348A; 7,49 nkat mg⁻¹ pro M353A a 7,14 nkat mg⁻¹ pro L511A. Směrodatné odchylky jsou pro všechna měření < 5 %.

	Relativní aktivita (%)								
	Nonanal	Hexanal	<i>trans</i> -2-Nonenal	<i>trans</i> -2-Hexenal	Benzaldehyd	<i>p</i> -Anisaldehyd	Cinnamaldehyd	Sinapaldehyd	Coniferylaldehyd
WT	100	83	18	8	12	7	6	0,1	0,2
Q248A	100	81	14	15	22	10	10	0,3	0,3
Q248E	100	76	19	15	17	7	6	0,3	0,6
A223F	100	88	8	12	13	5	5	0,5	0,5
Y226A	100	71	18	25	25	8	10	0,2	1,9
Y348A	100	60	12	6	18	4	2	0,2	0,5
M353A	100	30	9	6	12	2	1	0,1	0,1
L511A	100	44	12	6	16	5	4	0,1	0,1

Relativní aktivity pro jednotlivé varianty enzymu s vybranými aromatickými aldehydy jsou porovnány na obrázku 25, kde jsou aktivity vztaženy k aktivitě s benzaldehydem (100 %). Varianty M353A a Y348A výrazněji ztrácí schopnost oxidovat *p*-anisaldehyd a cinnamaldehyd. Zajímavé jsou výsledky mutantní formy Q248A, jenž ve srovnání s WT vykazovala vyšší specifické aktivity při měření se všemi devíti substráty. K vzrůstu enzymové aktivity tedy vedla absence glutaminového rezidua.

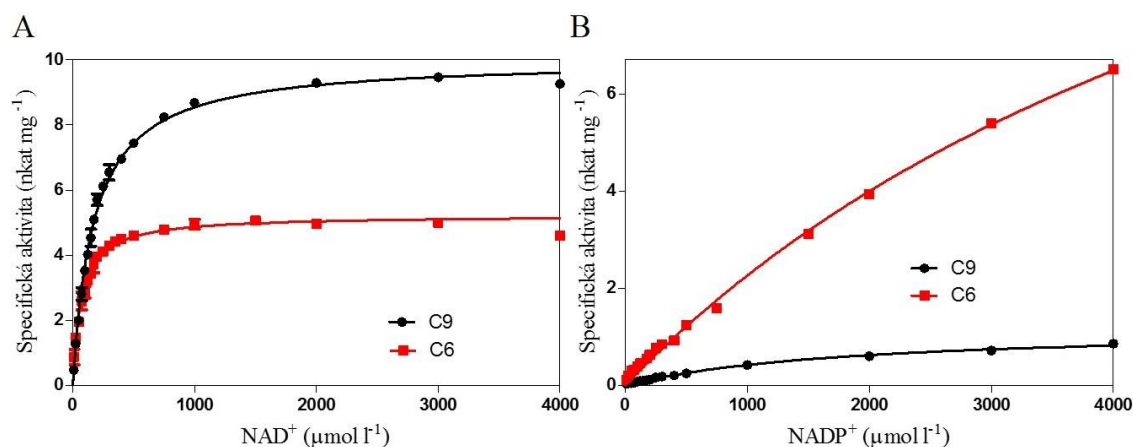


Obrázek 25. Relativní aktivita Δ PpALDH2A a jeho variant s aromatickými aldehydy. Měřeno ve 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5), 3 mmol l⁻¹ NAD⁺ a s 1 mmol l⁻¹ koncentrací substrátu. Relativní aktivity jsou vztaženy k benzaldehydu (100 %). Aktivita s WT byla 0,99 nkat mg⁻¹; 0,94 nkat mg⁻¹ pro A223F; 0,55 nkat mg⁻¹ pro Y226A; 3,07 nkat mg⁻¹ pro Q248A; 1,09 nkat mg⁻¹ pro Q248E; 0,95 nkat mg⁻¹ pro Y348A; 0,90 nkat mg⁻¹ pro M353A a 1,14 nkat mg⁻¹ pro L511A. BenzAL - benzaldehyd, p-AnisAL - *p*-anisaldehyd, SinAL - sinapaldehyd, ConAL – coniferylaldehyd.

4.8 Kinetické parametry

Saturační křivky Δ PpALDH2A byly změřeny pro koenzymy NAD⁺ a NADP⁺ (Obrázek 26) v prostředí 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5) se dvěma substráty - nonanalem (preferovaný) a hexanalem (druhý nejlepší), jejichž koncentrace byla 1 mmol l⁻¹. V tabulce 10 jsou uvedeny výsledné kinetické parametry, z nichž je zřejmé, že katalytická účinnost (poměr V_{lim}/K_m) je o dva řády vyšší s koenzymem NAD⁺ než s NADP⁺. V případě saturace enzymu nonanalem byla hodnota K_m pro NAD⁺ přibližně

173 ± 5 μmol l⁻¹, zatímco K_m pro NADP⁺ dosahovalo hodnoty 1,8 mmol l⁻¹. V případě saturace enzymu hexanalem byla hodnota K_m pro NAD⁺ 73 ± 4 μmol l⁻¹ a pro NADP⁺ dosahovala 6,6 ± 0,8 mmol l⁻¹. Každé měření bylo provedeno ve třech opakováních. Kinetické parametry byly ze saturačních křivek určeny pomocí programu GraphPad prism 5.



Obrázek 26. Saturační křivky enzymu ΔPpALDH2A s koenzymy NAD⁺ a NADP⁺. (A) Saturační křivky pro NAD⁺, (B) saturační křivky pro NADP⁺. Měřeno ve třech opakováních ve 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5) při saturaci enzymu 1 mmol l⁻¹ nonanalem nebo hexanalem. C9 - nonanal, C6 - hexanal.

Tabulka 10. Kinetické parametry pro koenzymy NAD⁺ a NADP⁺ v reakci ΔPpALDH2A. Měřeno ve třech opakováních ve 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5) při saturaci enzymu 1 mmol l⁻¹ nonanalem nebo hexanalem. Data byla vypočítána nelineární regresí rovnice Michaelis-Mentenové v programu GraphPad Prism 5.

WT - ΔPpALDH2A			
Kofaktor	K_m (μmol l ⁻¹)	V_{lim} (nmol s ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{lim}/K_m (%)
NAD ⁺ _(nonanal)	173 ± 5	10 ± 0,1	85
NADP ⁺ _(nonanal)	1842 ± 157	1,2 ± 0,1	1
NAD ⁺ _(hexanal)	73 ± 4	5 ± 0,1	100
NADP ⁺ _(hexanal)	6575 ± 851	17 ± 1,5	4

Na základě dosud nepublikované krystalové struktury a vazebného místa pro koenzym bylo vybráno aminokyselinové reziduum Q248, které interaguje s hydroxylovou skupinou ribosy NAD⁺. S mutantními variantami Q248A a Q248E byla změřena specifická aktivita s oběma koenzymy - NAD⁺ a NADP⁺ o koncentraci 2 mmol l⁻¹, v prostředí 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5) a saturaci 1 mmol l⁻¹ nonanalem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 11. Bylo předpokládáno, že záměna glutaminu Q248 za alanin uvolní místo pro fosfát NADP⁺, a ten se pak bude jevit jako lepší koenzym. Nicméně aktivita Q248A s NADP⁺ je ve srovnání s koenzymem NAD⁺ pouze 10%. Pro WT je to 6%.

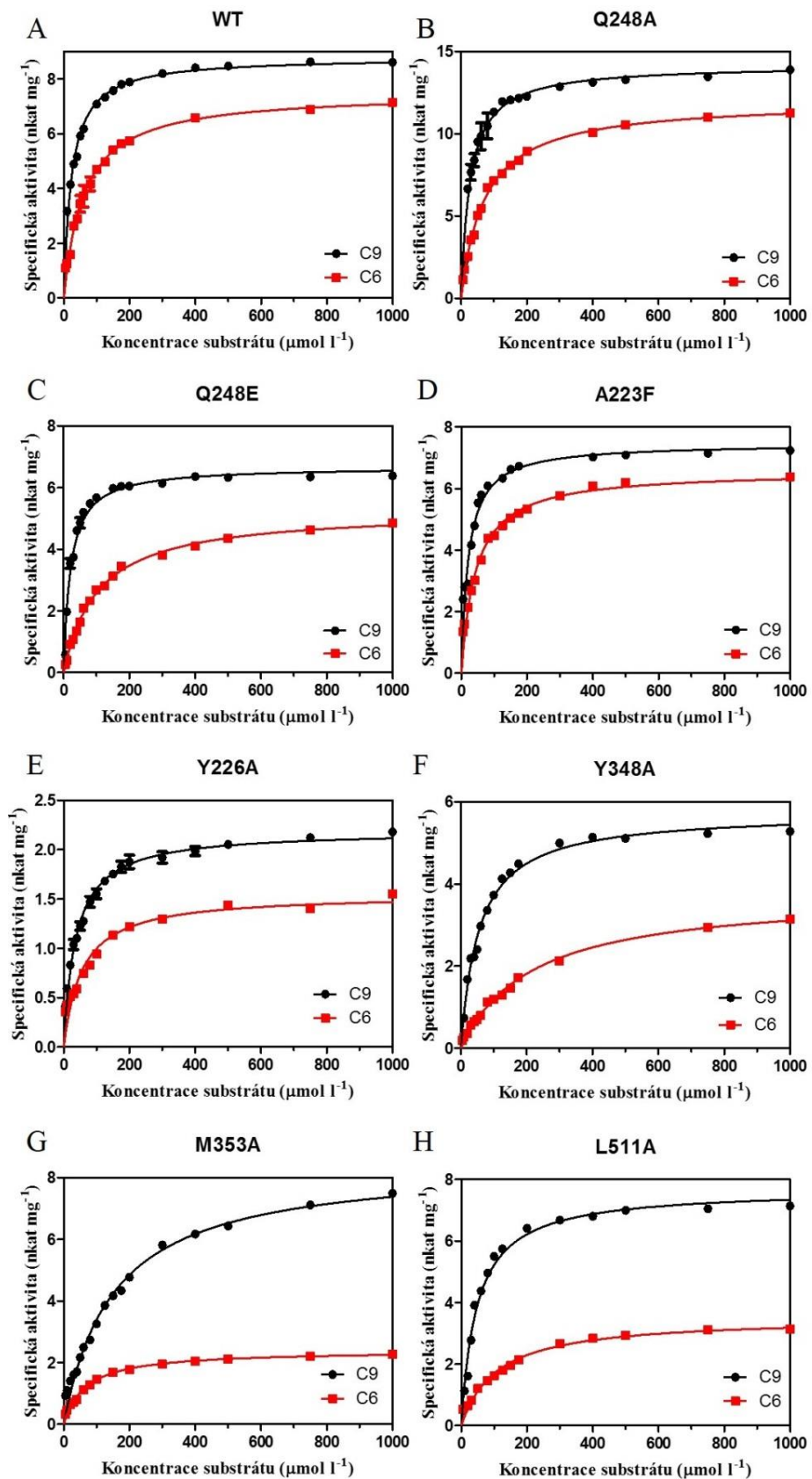
Tabulka 11. Specifické aktivity WT a mutantních variant Q248A a Q248E a jejich procentuální zastoupení. Měřeno ve třech opakováních ve 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5) při saturaci enzymu 1 mmol l⁻¹ nonanalem a 2 mmol l⁻¹ koenzymem.

Varianta enzymu	Specifická aktivita (nkat mg ⁻¹)		Relativní zastoupení (%)	
	NAD ⁺	NADP ⁺	NAD ⁺	NADP ⁺
WT	8,6	0,55	100	6
Q248A	13,9	1,3	100	10
Q248E	6,4	0,06	100	1

Na základě předchozího měření relativních aktivit a několika substrátů byly rovněž změřeny saturační křivky byly pro hexanal a nonanal a všechny varianty Δ PpALDH2A při saturaci s 3 mmol l⁻¹ koenzymem NAD⁺ v prostředí 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5). Výsledné grafy jsou zobrazeny na obrázku 27 a ukazují na to, že některé varianty oxidují podobně jak hexanal, tak i nonanal, zatímco jiné varianty preferují zejména nonanal. Trend katalytické účinnosti (poměr V_{lim}/K_m) se mezi substráty neliší (Tabulka 12). Katalytická účinnost výrazně klesá u mutantních forem Y226A, Y348A, M353A a L511A, jak pro nonanal, tak pro hexanal.

Tabulka 12. Výsledné kinetické parametry variant Δ PpALDH2A pro hexanal a nonanal. Měření probíhalo v prostředí 150 mmol l⁻¹ Tris HCl pufru (pH 7,5) při saturaci enzymu koenzymem NAD⁺, jehož finální koncentrace byla 3 mmol l⁻¹. Měření bylo provedeno v triplicátech. C9 - nonanal, C6 - hexanal. Hodnoty V_{lim}/K_m jsou vyjádřeny relativně.

Varianta enzymu	K_m (μ mol l ⁻¹)	V_{lim} (nmol s ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{lim}/K_m (%)
Nonanal			
WT	23 ± 1	8,8 ± 0,1	100
Q248A	27 ± 2	14,2 ± 0,3	137
Q248E	21 ± 1	6,7 ± 0,1	83
A223F	21 ± 2	7,4 ± 0,2	92
Y226A	37 ± 2	2,2 ± 0,1	16
Y348A	55 ± 3	5,7 ± 0,1	27
M353A	150 ± 12	8,5 ± 0,3	15
L511A	47 ± 4	7,7 ± 0,2	43
Hexanal			
WT	60 ± 4	7,5 ± 0,2	100
Q248A	71 ± 3	12 ± 0,2	135
Q248E	104 ± 4	5,3 ± 0,1	41
A223F	43 ± 4	6,5 ± 0,1	121
Y226A	56 ± 9	1,5 ± 0,1	21
Y348A	216 ± 13	3,8 ± 0,1	14
M353A	66 ± 4	2,4 ± 0,1	29
L511A	107 ± 11	3,5 ± 0,1	26



Obrázek 27. Saturační křivky pro hexanal a nonanal. Saturační křivky pro WT (A), Q248A (B), Q248E (C), A223F (D), Y226A (E), Y348A (F), M353A (G), L511A (H). Měřeno ve 150 mmol l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,5) při saturaci s 3 mmol l⁻¹ NAD⁺. Označení substrátů: C9 - nonanal, C6 – hexanal.

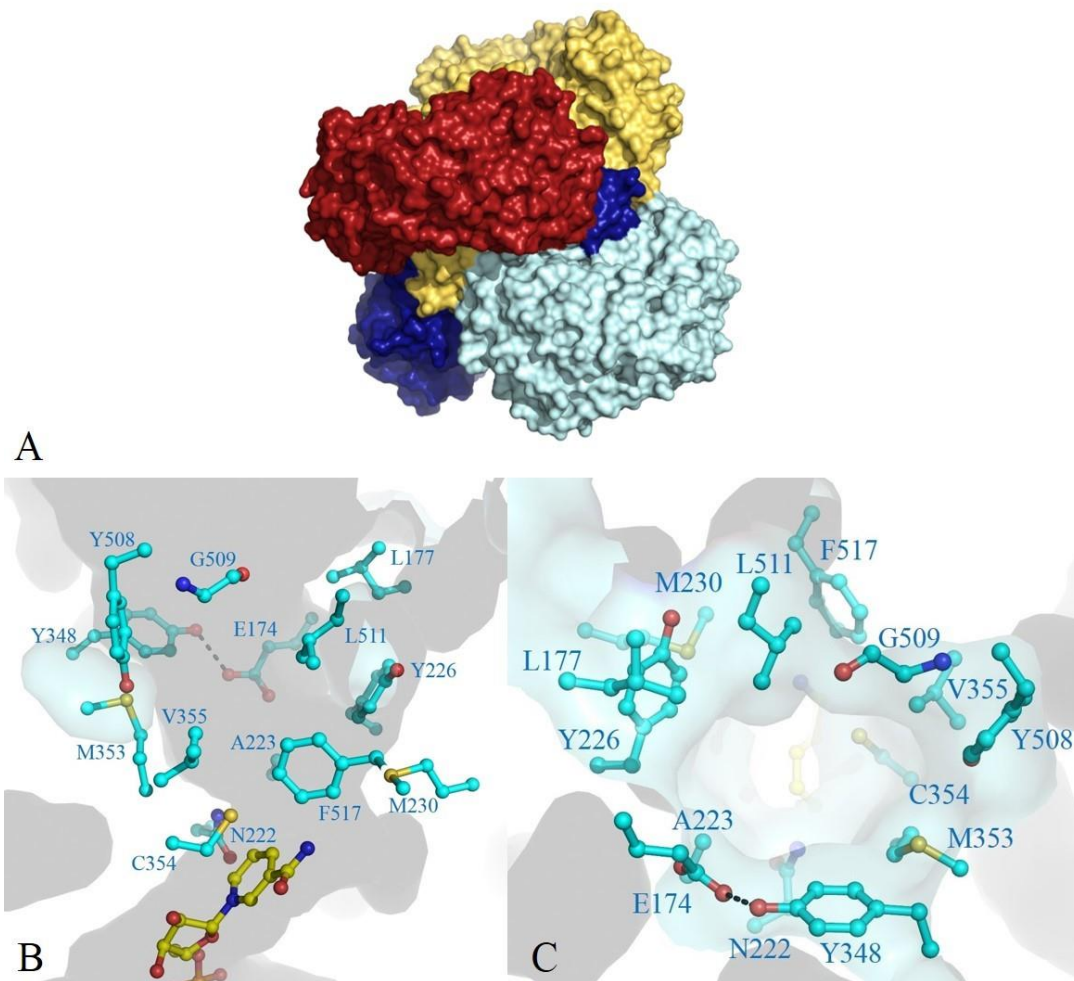
5 DISKUSE

První charakterizovanou rostlinnou mtALDH2 byla kukuřičná RF2A (Cui *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2001), následovaná RF2B (Liu a Schnable, 2002). Obě ALDH jsou lokalizovány v mitochondriích. Další mtALDH2 byly popsány v *O. sativa* (Nakazono *et al.*, 2000), *N. tabacum* (op den Camp a Kuhlemeier, 1997), *A. thaliana* (Skibbe *et al.*, 2002) a *A. majus* (Long *et al.*, 2009). mtALDH2 jsou podobné lidské ALDH2, která byla popsána v roce 1996 (Klyosov). Jejich hlavní funkcí je katalýza oxidace acetaldehydu na acetát.

Také cytosolické ALDH (cALDH2), jmenovitě RF2C, RF2D, RF2E a RF2F, byly detailně popsány v kukuřici (Končítiková *et al.*, 2015). Tyto enzymy jsou schopny oxidovat alifatické i aroamtické aldehydy jako benzaldehyd nebo fenylacetaldehyd a mohou být zapojeny do fenylpropanoidové dráhy. Δ PpALDH2A, která byla studována v této práci, sdílí podobnost s cALDH2. Δ PpALDH2A gen byl již dříve naklonován do plazmidu pCDFDuet a rekombinantní protein byl produkován v *E. coli*. Na 5-konci sekvence byla provedena delece 49 aminokyselin, kterou značí symbol Δ , je tak ovlivněna produkce kódovaného proteinu v rozpustné fázi v *E. coli*, která je vyšší (Hýlová, 2015).

V předchozích nepublikovaných experimentech školitele dr. Kopečného byla vyřešena krystalová struktura proteinu (Obrázek 28), na jejímž základě byla vybrána důležitá aminokyselinová rezidua v aktivním místě enzymu - E174, A223, Y226, Q248, Y348, M353 a L511. Rezidua E174, A223, Y226, Y348, M353 a L511 se nachází v kavitě, kde dochází k vazbě substrátu, kdežto reziduum Q248 je umístěno ve vazebném místě pro koenzym. Cílem této práce je určení vlivu těchto aminokyselin na vlastnosti enzymu, pokud dojde bodovou mutací k záměně vybraných aminokyselin za alanin. Místně řízenou mutagenezí bylo připraveno osm mutantů - E174A, A223F, Y226A, Q248A, Q248E, Y348A, M353A a L511A. Úspěšnost mutageneze byla potvrzena kontrolním štěpením plazmidů a následnou sekvenací.

Pomocí SDS-PAGE byla stanovena molekulová hmotnost jednotlivých variant enzymu na přibližně 55 kDa, což za denaturačních podmínek odpovídá monomeru. Gelovou permeační chromatografií byla experimentálně stanovena tetramerická struktura proteinu, o velikosti 225 kDa, která je již známá a je společnou vlastností pro všechny ALDH2 (Marchitti *et al.*, 2008).

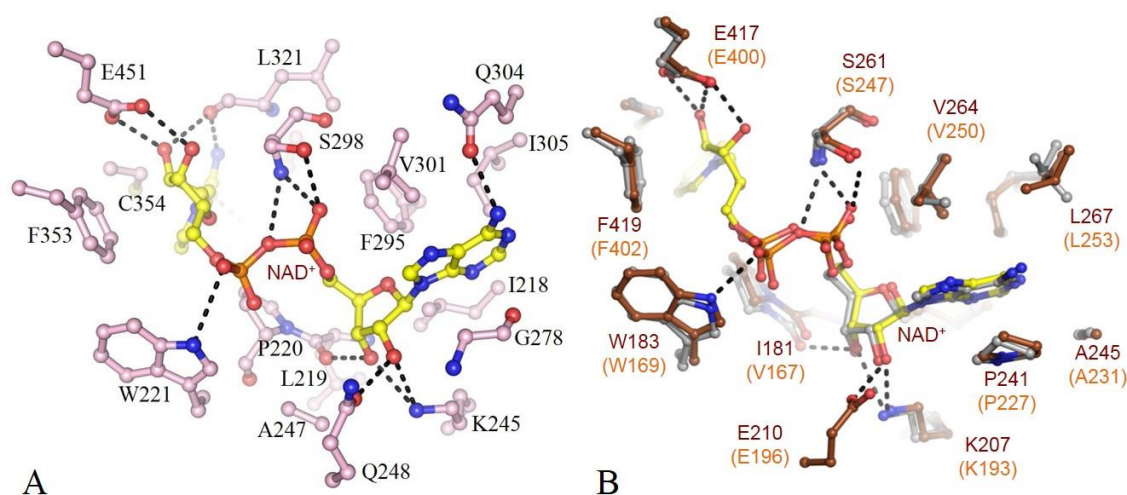


Obrázek 28. Struktura Δ PpALDH2A. (A) Krystalová struktura Δ PpALDH2A při rozlišení 2Å. Data byla posbírána na synchrotronu SOLEIL (Francie) a asymetrická jednotka obsahuje jeden tetramer, (B) boční pohled na substrátový kanál s aminokyselinovými rezidui E174, A223, Y226, Y348, M353 a L511, (C) pohled seshora na substrátový kanál. Na konci je koenzym NAD⁺ a reaktivní katalytický cystein C354.

Pomocí SDS-PAGE byla také ověřena dostatečná čistota proteinů. Mutantní varianta E174A byla připravena později a z časových důvodů s ní nebyly provedeny žádné další experimenty. Vzhledem k nižší aktivitě varianty Y226A byla pomocí CD spektroskopie ověřena sekundární struktura všech studovaných proteinů. Jejich tvary CD křivek odpovídaly CD spektru WT proteinu a z toho vyplývá, že sekundární struktura nebyla u žádného proteinu porušena a aktivity jednotlivých enzymů jsou pouze výsledkem příslušných bodových mutací. Tento fakt také potvrzují experimenty teplotní stability enzymů, které byly provedeny pomocí nanoDSF a stanovením reziduálních aktivit enzymů Warburgovým optickým testem. Trend výsledných teplotních stabilit byl podobný a nejméně stabilní byla varianta L511A (o více než deset stupňů) a následovala varianta A223F. Ostatní proteiny byly stabilní podobně jako WT.

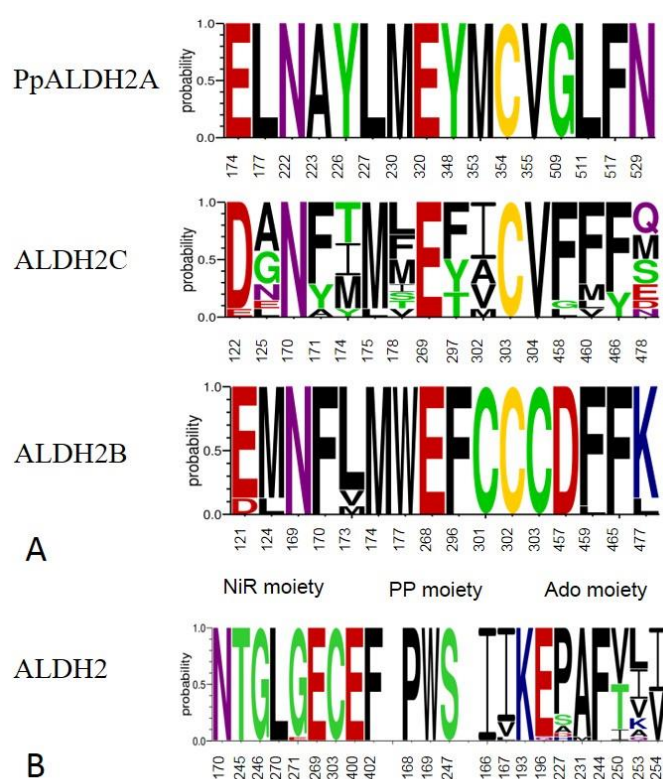
Dále byla provedena kinetická měření a bylo zjištěno, že preferovaným koenzymem je NAD^+ . Mutantní varianty glutaminu 248, jmenovitě Q248A a Q248E, byly navrženy z důvodu interakce tohoto rezidua s hydroxylovou skupinou ribózy, na kterou se váže 2'-fosfátová skupina v případě NADP^+ . Bylo však zjištěno, že záměnou Q248A se preference mezi NAD^+ a NADP^+ mění velmi málo. Zatímco relativní rychlost oxidace nonanalů s NADP^+ byla 6% vůči rychlosti s NAD^+ (100%), v případě varianty Q248A s NADP^+ to bylo 10 % vůči rychlosti s NAD^+ . Záměna Q248E naopak ještě více zvýšila preferenci NAD^+ jako koenzymu a rychlost reakce s NADP^+ dosahovala pouze 1 % vůči NAD^+ .

Koenzym NAD^+ preferují i kukuřičné enzymy RF2C, RF2D, RF2E, RF2F a také lidská ALDH2, jako i jiné ALDH, například ALDH10 (Farres *et al.*, 1994; Kopečný *et al.*, 2013). Obsahují konzervované reziduum kyseliny glutamové (E196 u RF2C, E210 u RF2F), která brání ve vazbě 2'-fosfátové skupiny NADP^+ , který tak není vhodným koenzymem u rostlinných ALDH2 (Končítíková *et al.*, 2015). Jde jak o sterickou zábranu, tak i repulzi na základě stejného náboje. Srovnání koenzymových vazebných míst enzymu PpALDH2A a kukuřičné RF2F a RF2C je znázorněno na obrázku 29.



Obrázek 29. Schéma vazebných míst pro koenzym. (A) Složení vazebného místa $\Delta\text{PpALDH2A}$ pro koenzym obsahující aminokyselinové reziduum Q248, (B) vazebné místo pro NAD^+ kukuřičné RF2F (ZmALDH2-6, znázorněno tmavě hnědou barvou) a RF2C (ZmALDH2-3, šedá barva), Rezidua jsou označena oranžovou barvou a číslována podle RF2F a v závorkách zobrazeny rezidua RF2C (převzato z Končítíková *et al.*, 2015).

Srovnání aminokyselinových reziduí v aktivním místě enzymu bylo vytvořeno za užití WebLogo 3 (<http://weblogo.threplusone.com>). Aminokyselinová rezidua substrátového kanálu PpALDH2A byla porovnána se složením známých ALDH2C izoformem (Obrázek 30A). Složení aktivního místa ALDH2C je obecně vysoce variabilní a kolem katalytického cysteinu (C303) obsahuje motiv XCV, kde X je proměnlivé reziduum. PpALDH2A obsahuje motiv MCV. Naopak mitochondriální izoformy (ALDH2B) sdílí velmi konzervované aktivní místo napříč různými organismy a kolem katalytického cysteinu mají motiv CCC. Na obrázku 30B jsou znázorněna aminokyselinová rezidua ALDH2, která jsou významná pro vazbu koenzymu.



Obrázek 30. Přehled aminokyselinových reziduí substrátového kanálu a vazebného místa pro koenzym. (A) Aminokyselinová rezidua tvořící substrátový kanál u PpALDH2A, ALDH2C a ALDH2B. Rezidua u ALDH2C jsou číslována dle kukuřičné RF2C, ALDH2B jsou číslována dle hALDH2, (B) přehled aminokyselinových zbytků důležitých pro vazbu koenzymu rodiny ALDH2, aminokyselinové zbytky jsou číslovány na základě kukuřičné RF2C. Část byla převzata z Končítíková *et al.* (2015).

Testováním substrátové specifity PpALDH2A (Tabulka 8) bylo zjištěno, že preferovaným substrátem je alifatický nonanal, na rozdíl od kukuřičných ALDH2, kde je nejlepším substrátem hexanal (Končítíková *et al.*, 2015). S nonanalem byla pro WT naměřena specifická aktivita 8,6 nkat mg⁻¹. Ostatní varianty enzymu měly podobné výsledky, avšak jejich aktivity byly oproti WT nepatrně nižší, a v případě varianty Y226A to bylo jen 2,2 nkat mg⁻¹. Varianty M353A a L511A vykazovaly nižší aktivitu s hexanalem oproti WT. Nenasycené aldehydy, *trans*-2-nonenal a *trans*-2-hexenal, patřily mezi slabší substráty všech zkoumaných Δ PpALDH2A enzymů, oproti svým nasyceným variantám. Tyto šesti- a devíti uhlíkaté aldehydy vznikají lipoxygenasovou dráhou z polynenasycených mastných kyselin, jako je kyselina linolová a linolenová (Dudareva *et al.*, 2013). *trans*-2-Nonenal a *trans*-2-hexenal vystupují jako markery lipidové peroxidace, které jsou metabolizovány na méně reaktivní formy a tyto reakce tak může Δ PpALDH2A *in vivo* katalyzovat. C9 a C6 nasycené i nenasycené aldehydy patří mezi těžké volatilní látky listů a plodů, k jejichž syntéze obvykle dochází v zelených částech rostlin v reakci na zranění, a také se podílí na typickém aromatu ovoce a zeleniny (Feussner *et al.*, 1997; Dudareva *et al.*, 2013). Specifické aktivity, naměřené s aromatickými substráty, byly ve všech případech nízké (Obrázek 24). Varianty M353A a Y348A výrazněji ztrácely schopnost oxidovat *p*-anisaldehyd a cinnamaldehyd. Cinnamaldehyd, coniferylaldehyd a sinapaldehyd jsou součástí procesu lignifikace cévnatých rostlin (Peng *et al.*, 2008; Dudareva *et al.*, 2013). Pro ALDH2A z mechu, u kterého k lignifikaci nedochází, coniferylaldehyd a sinapaldehyd nejsou dobrými substráty. Naopak kukuřičné izoformy cALDH2 oxidovaly jak coniferylaldehyd, tak sinapaldehyd a ve vyšších rostlinách tak mohou být zapojeny do biosyntézy ligninu (Končítíková *et al.*, 2015).

Se dvěma nejlepšími substráty, nonanalem a hexanalem, byly změřeny saturační křivky pro všechny varianty enzymu (Obrázek 27). WT, A223F a Y226A oxidovaly podobně jak hexanal, tak i nonanal, kdežto varianty Y348A, M353A a L511A dávaly přednost nonanalu. V žádném z případů nedošlo k obrácení substrátové preference. Z toho důvodu bude v budoucnu potřeba otestovat další aminokyselinová rezidua nacházející se v aktivním místě enzymu. Následovat budou také *in vivo* studie, ve kterých se bude zkoumat PpALDH2A knockout linie z mechu a linie nadprodukcující PpALDH2A v *Arabidopsis thaliana* s cílem určit *in vivo* hlavní substrát tohoto enzymu v nižších rostlinách.

6 ZÁVĚR

V teoretické části práce byla vypracována literární rešerše současných poznatků o mechu *P. patens*, nadrodině rostlinných aldehyddehydrogenas, rodině rostlinných aldehyddehydrogenas 2 a aldehydech.

V experimentální části byla provedena místně-řízená mutageneze $\Delta PpALDH2A$, kterou bylo vytvořeno osm mutantů. Mutantní varianty byly produkovány v *E. coli*, extrahovány a purifikovány.

Byla potvrzena čistota proteinů pro měření enzymových aktivit a bylo ověřeno zachování sekundární struktury. Byly studovány vlastnosti jednotlivých mutantních variant, jako je teplotní stabilita, substrátová specifita a kinetické parametry.

7 LITERATURA

- Awal H. M. A., Kinoshita T., Yoshida I., Doe M., Hirasawa E. (1997): Aminoaldehyde dehydrogenase of pea epicotyls. *Phytochemistry* **44**, 997-1000.
- Boatright J., Negre F., Chen X. L., Kish C. M., Wood B., Peel G., Orlova I., Gang D., Rhodes D., Duderava N. (2004): Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiology* **135**, 1993-2011.
- Bowman J. L., Kohchi T., Yamato K. T. et al. (2017): Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell* **171**, 287-304.
- 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.V., Vasiliou V. (2013): Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* **237**, 189-210.
- Castresana J. (2000): Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 540-552.
- Cui X. Q., Wise R. P., Schnable P. S. (1996): The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science* **272**, 1334-1336.
- Dudareva N., Klempien A., Muhlemann J. K., Kaplan I. (2013): Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist* **198**, 16-32.
- Edgar R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792-1797.
- Farres J., Wang X. P., Takahashi K., Cunningham S. J., Wang T. T., Weiner H. (1994): Effects of changing glutamate-487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase - a model to study human (oriental type) class-2 aldehyde dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 13854-13860.
- Feussner I., Balkenhohl T. J., Porzel A., Kuhn H., Wasternack C. (1997): Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons - implication of lipid body lipoxigenase in lipid mobilization during germination. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 21635-21641.
- Force A., Lynch M., Pickett F. B., Amores A., Yan Y. L., Postlethwait J. (1999): Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**, 1531-1545.
- Garret R. H. a Grisham Ch. M. (1999): *Biochemistry*. 2. vyd., Brooks-Cole publishing, Kalifornie, USA, 1127 stran.
- Grabber J. H., Ralph J., Hatfield R. D. (2000): Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 6106-6113.
- Guindon S. a Gascuel O. (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696-704.
- Harrison C. J. (2017): Development and genetics in the evolution of land plant body plans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-biological Sciences* **372**:20150490. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/royptb/372/1713/20150490.full.pdf>.
- Hemm M. R., Ruegger M. O., Chapple C. (2003): The *Arabidopsis* ref2 mutant is defective in the gene encoding CYP83A1 and shows both phenylpropanoid and glucosinolate phenotypes. *Plant Cell* **15**, 179-194.
- Herrmann K. M. (1995): The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology* **107**, 7-12.
- Hou Q. a Bartels D. (2015): Comparative study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in the glycophyte *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema* halophytes. *Annals of Botany* **115**, 465-479.
- Hýlová A. (2015): *Cloning and expression of ALDH selected from families 2 and 3 from moss*. Diplomová práce, UPOL Olomouc, Česká republika.
- Chapple C. C. S., Vogt T., Ellis B. E., Somerville C. R. (1992): An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **4**, 1413-1424.

- Kirch H. H., Bartels D., Wei Y. L., Schnable P. S., Wood A. J. (2004): The ALDH gene superfamily of Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **9**, 371-377.
- Kloosterman H., Hessels G. I., Vrijbloed J. W., Euverink G. J., Dijkhuizen L. (2003): (De)regulation of key enzyme steps in the shikimate pathway and phenylalanine-specific pathway of the actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *Microbiology-SGM* **149**, 3321-3330.
- Klyosov A. A. (1996): Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. *Biochemistry* **35**, 4457-4467.
- Končítiková 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**, 109-123.
- Kopečný D., Končítiková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Soral M., Šebela M., Moréra S. (2013): Plant ALDH10 family. Identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 9491-9507.
- Kotchoni S. O., Jimenez-Lopez J. C., Gao D. Y., 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**:e11516. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0011516>.
- Lang D., Ullrich K. K., Murat F. et al., (2018): The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *The Plant Journal* **93**, 515-533.
- Liu F., Cui X. Q., Horner H. T., Weiner H., Schnable P. S. (2001): Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male sterility in maize. *Plant Cell* **13**, 1063-1078.
- Liu F. a Schnable P. S. (2002): Functional specialization of maize mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Plant Physiology* **130**, 1657-1674.
- Long M. C., Nagegowda D. A., Kaminaga Y., Ho K. K., Kish C. M., Schnepf J., Sherman D., Weiner H., Rhodes D., Duderava N. (2009): Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis. *Plant Journal* **59**, 256-265.
- Marchitti S. A., Bocker C., Stagos D., Vasiliou V. (2008): Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **4**, 697-720.
- Marnett L. J. (1999): Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**, 83-95.
- McDaniel S. F., von Stackelberg M., Richardt S., Quatrano R. S., Reski R., Rensing S. A. (2010): The speciation history of the *Physcomitrium-Physcomitrella* species complex. *Evolution* **64**, 217-231.
- Meyer K., Cusumano J. C., Somerville C., Chapple C. C. S. (1996): Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 6869-6874.
- Mittasch J., Bottcher C., Frolov A., Strack D., Milkowski C. (2013): Reprogramming the phenylpropanoid metabolism in seeds of oilseed rape by suppressing the orthologs of reduced epidermal fluorescence1. *Plant Physiology* **161**, 1656-1669.
- Müller S.J., Gütle D.D., Jacquot J., Reski R. (2016): Can mosses serve as model organisms for forest research? *Annals of Forest Science* **73**, 135-146.
- Mustafa N. R. a Verpoorte R. (2005): Chlorismate derived C6C1 compounds in plants. *Planta* **222**, 1-5.
- Nair R. B., Bastress K. L., Ruegger M. O., Denault J. W., Chapple C. (2004): The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell* **16**, 544-554.
- Nakazono M., Tsuji H., Li Y. H., Saisho D., Arimura S., Tsutsumi N., Hirai A. (2000): Expression of a gene encoding mitochondrial aldehyde dehydrogenase in rice increases under submerged conditions. *Plant Physiology* **124**, 587-598.
- op den Camp R. G. L. a Kuhlemeier C. (1997): Aldehyde dehydrogenase in tobacco pollen. *Plant Molecular Biology* **35**, 355-365.

- Peng M. S., Hudson D., Schofield A., Tsao R., Yang R., Gu H. L., Bi Y. M., Rothstein S. J. (2008): Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the *NLA* gene. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2933-2944.
- Perozich J., Kuo I., Lindahl R., Hempel J. (2001): Coenzyme specificity in aldehyde dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions* **130**, 115-124.
- Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005): Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy* **99**, 455-466.
- Prigge M. J. a Bezanilla M. (2010): Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* **137**, 3535-3543.
- Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D. et al., (2008): The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**, 64-69
- Singh S., Brocker C., Koppaka V., Chen Y., Jackson B. C., Matsumoto A., Thompson D. C., Vasiliou V. (2013): Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radical Biology and Medicine* **56**, 89-101.
- Skibbe D. S., Liu F., Wen T. J., Yandeu M. D., Cui X., Cao J., Simmons C. R., Schnable P. S. (2002): Characterization of the aldehyde dehydrogenase gene families of *Zea mays* and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **48**, 751-764.
- Steinmetz C. G., Xie P. G., Weiner H., Hurley T. D. (1997): Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic komponent of ethanol aversion. *Structure* **5**, 701-711.
- Strotbek C., Krinninger S., Frank W. (2013): The moss *Physcomitrella patens*: methods and tools from cultivation to targeted analysis of gene function. *International Journal of Developmental Biology* **57**, 553-564.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochemistry and Biophysics Acta* **1480**, 329-341.
- Šebela M., Radová A., Angelini R., Tavliadoraki P., Frébort I., Peč P. (2001): FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**, 197-207.
- Tzin V. a Galili G. (2010): The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book* **8**:e0132. <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0132>.
- 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. a Nebert D. W. (2005): Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human Genomics* **2**, 138-143.
- Wei Y. L., Lin M., Oliver D. J., Schnable P. S. (2009): The roles of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the PDH bypass of *Arabidopsis*. *BMC Biochemistry* **10**:7. <https://bmcbiochem.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2091-10-7>
- Wellman C. H., Osterloff P. L., Mohiuddin U. (2003): Fragments of the earliest land plants. *Nature* **425**, 282-285.
- Wood A. J. a Duff R. J. (2009): The aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily of the moss *Physcomitrella patens* and the algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Ostreococcus tauri*. *Bryologist* **112**, 1-11.
- Yoshimoto K., Takamura H., Kadota I., Motose H., Takahashi T. (2016): Chemical control of xylem differentiation by thermospermine, xylemin and auxin. *Scientific Reports* **6**:21487. <https://www.nature.com/articles/srep21487.pdf>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Δ	odstranění signální sekvence proteinu
3H3PP	kyselina 3-hydroxy-3-fenylpropionová
3H3PP-CoA	3-hydroxy-3-fenylpropionyl-CoA
3O3PP-CoA	3-oxo-3-fenylpropionyl-CoA
4CL	4-kumaroyl-CoA-ligasa / <i>p</i> -kumaroyl-CoA-syntasa
AA/BIS	akrylamid/bisakrylamid
AADC	aromatická- <i>L</i> -aminokyselinadekarboxylasa
AAT	alkoholacyltransferasa
ABAL	4-aminobutanal
ADH	alkoholdehydrogenasa
AGT	anthocyaninglykosyltransferasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ANS	anthocyanidinsynthasa
AOX	aldehydoxidasa
APAL	3-aminopropanal
APS	persíran amonný
AVAL	5-aminovaleraldehyd
BA	kyselina benzoová
BA-CoA	benzoyl-CoA
BAlc	benzylalkohol
BALDH	benzaldehyddehydrogenasa
BB	benzylbenzoát
BenzAL (BAld)	benzaldehyd
BPBT	benzoyl-CoA-benzylalkoholbenzoyltransferasa/ 2fenylethanolbenzoyltransferasa
BSA	hovězí sérový albumin
BSMT	benzoylkarboxymethyltransferasa/ salicylkarboxymethyltransferasa
C3H	<i>p</i> -kumarát-3-hydroxylasa
C4H	cinnamát-4-hydroxylasa
C6	hexanal
C9	nonanal

CA	kyselina skořicová
CA-CoA	cinnamoyl-CoA
CAD	cinnamylalkoholdehydrogenasa
cALDH	cytosolická aldehyddehydrogenasa
CAO (DAO)	aminoxidasy obsahující měď (diaminoxidasy)
CCoAOMT	cafeoyl-CoA-3- <i>O</i> -methyltransferasa
CCR	cinnamoyl-CoA-reduktasa
CD	cirkulární dichroismus
CFA	kyselina kávová
CFA-CoA	kafeoyl-CoA
CFAT	koniferylalkoholacetyltransferasa
CinAL	cinnamaldehyd
CNL	cinnamoyl-CoA-ligasa
COMT	cafeoyl- <i>O</i> -methyltransferasa
ConA	koniferylalkohol
ConAc	koniferylacetát
ConAL	coniferylaldehyd
DAHP	<i>D</i> -arabinoheptulosonát-7-fosfátsyntasa
DAP	1-(3-aminopropyl)4-aminobutanal a 1,3-diaminopropan
DRF	dihydroflavanon-4-reduktasa
EGS	eugenolsyntasa
Eug	eugenol
F3H	flavanon-3-hydroxylasa
F5H	ferulát-5-hydroxylasa
FA	ferulová kyselina
FA-CoA	feruloyl-CoA
FAD	flavinadenindinukleotid
FP	forward primer
GOL	glycerol
hALDH2	lidská aldehyddehydrogenasa 2
HCT	hydroxycinnamoyl-CoA:šikimáthydroxycinnamoyltransferasa
HPL	hydroxyperoxylyasa
CHI	chalkon-flavanonisomerasa
CHS	chalkonsyntasa

IEMT	isoeugenol- <i>O</i> -methyltransferasa
IEug	isoeugenol
IGS	isoeugenolsyntasa
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
ISO	isomerasa
KAT	3-ketoacyl-CoA-thiolasa
LB médium	Luria-Broth médium
LOX	lipoxygenasa
MB	methylbenzoát
MeCA	methylcinnamát
Mp	miniprep
mtALDH	mitochondriální aldehyddehydrogenasa
NAD(P)	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)
OD	optická hustota
OMT	<i>O</i> -methyltransferasa
PAAS	fenylacetaldehydsyntasa
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
p-AnisAL	p-anisaldehyd
PAO	polyaminoxidasy obsahující flavinový kofaktor
pCA	kyselina <i>p</i> -kumarová
pCA-CoA	<i>p</i> -kumaroyl-CoA
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEB	fenylethylbenzoát
PhA	fenylacetaldehyd
Phe	fenylalanin
PhEth	2-fenylethanol
PhEthA	fenylethylamin
Pp	<i>Physcomitrella patens</i>
PVDF	polyvinilidendifluorid
<i>Refl</i>	gen snížené epidermální fluorescence 1
<i>Rf</i>	gen obnovující plodnost
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP	reverse primer
SinAL	sinapaldehyd

t-2-C6	trans-2-hexenal
t-2-C9	trans-2-nonenal
T ₅₀	teplota, při níž má enzym 50% aktivitu
T _a	teplota nasedání primeru (annealing)
T _m	teplota rozvolnění enzymu (melting)
TAE pufr	pufr obsahující Tris, kyselinu octovou a kyselinu ethylendiamintetraoctovou
TEMED	tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
WT	fenotyp nacházející se v přírodě (wild type)