

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Příprava nových syntetických substrátů
aminoaldehyddehydrogenasy**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jan Frömmel
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Konzultant:	RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	27. duben 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 27. dubna 2010

Poděkování

Děkuji panu profesoru Marku Šebelovi, svému školiteli za odborné vedení a cenné rady při práci, panu doktoru Miroslavu Suralovi za pomoc při syntéze substrátů, panu doktoru Davidovi Kopečnému a slečně doktorce Martině Tylichové za pomoc při produkci enzymu a poskytnuté rady.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jan Frömmel
Název práce	Příprava nových syntetických substrátů aminoaldehyddehydrogenasy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>Oxidací polyaminů, která je katalyzována chinoproteinovými diaminoxidasami s Cu v aktivním místě (EC 1.4.3.21) a flavovoproteiny polyaminoxidasami (EC 1.5.3.11) vznikají ω-aminoaldehydy. Ty jsou dále oxidovány za vzniku příslušných aminokyselin. Tuto oxidaci katalyzuje velká skupina enzymů, která se vyznačuje širokou substrátovou specifičností. Hrachová aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH) je nejlépe prozkoumaným rostlinným enzymem zmíněné skupiny. Jedná se o dva izoenzymy s takřka stejnou molekulovou hmotností a vysoce homologní sekvencí. Jako rekombinantní proteiny jsou oba izoenzymy dimerní. Jejich nejlepším substrátem je 3-aminopropanal.</p> <p>Bylo studováno 21 aldehydů, které byly testovány jako substráty aminoaldehyddehydrogenas z hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>) a rajčete jedlého (<i>Lycopersicon esculentum</i>). Pro nejlepší z nich byly stanoveny hodnoty K_m a V. Nejširší substrátová specifičnost byla pozorována u LeAMADH1, velmi široká specifičnost byla pozorována i pro PsAMADH2. PsAMADH1 a LeAMADH2 vykazovaly užší substrátovou specifičnost. Nízká hodnota K_m byla u všech enzymů pozorována pro 3-(methylthio)propanal.</p>
Klíčová slova	aminoaldehyddehydrogenasa, aminoaldehydy, 3-aminopropanal, substrátová specifa, enzymologie
Počet stran	75
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Jan Frömmel
Title	Preparation of new synthetic aminoaldehyde dehydrogenase substrates
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Prof. Mgr. Marek Šebela
The year of presentation	2010
Abstract	<p>ω-Aminoaldehydes are produced by enzymatic oxidation of polyamines. This reaction is catalyzed by two enzymes, quinoprotein diamine oxidases (EC 1.4.3.21) and flavoprotein polyamine oxidases (EC 1.5.3.11). ω-Aminoaldehydes are further oxidized to the corresponding amino acids. This conversion is mediated by a large group of enzymes with a very broad substrate specificity. Pea aminoaldehyde dehydrogenase represents the best explored plant enzyme of this group. In pea, there are two isozymes of aminoaldehyde dehydrogenase (AMADH) with almost the same molecular weight and a high degree of sequence homology. As recombinant proteins, both of them are dimers. 3-Aminopropanal is their best substrate.</p> <p>Twenty one aldehydes were tested as substrates of aminoaldehyde dehydrogenases from pea (<i>Pisum sativum</i>) and tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>). For the best substrates from this group, K_m and V values were determined. The broadest substrate specificity was observed for LeAMADH1, PsAMADH2 showed a broad specificity too. The substrate specificity of PsAMADH1 and LeAMADH2 was narrower. 3-(Methylthio)butanal had very low K_m values for every enzymes.</p>
Keywords	aminoaldehyde dehydrogenase, aminoaldehydes, 3-aminopropanal, substrate specificity, enzymology
Number of pages	75
Number of appendices	2

Language

Czech

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování	2
Bibliografická identifikace	3
Bibliographical identification	4
Obsah	6
Cíle práce	7
TEORETICKÁ ČÁST	8
1 POLYAMINY	8
1.1 Vznik polyaminů	8
1.2 Výskyt a význam polyaminů u rostlin	9
2 DEGRADACE POLYAMINŮ – VZNIK AMINOALDEHYDŮ	11
2.1 Enzymy katalyzující oxidativní degradaci polyaminů	11
2.1.1 <i>Aminoxidasy obsahující měď</i>	11
2.1.2 <i>Polyaminoxidasy</i>	13
2.2 Jiné způsoby degradace polyaminů	15
3 AMINOALDEHYDY	15
3.1 Laboratorní příprava aminoaldehydů	15
3.2 Vlastnosti aminoaldehydů	17
3.2.1 <i>Některé reakce aminoaldehydů</i>	17
3.3 Biologicky významné aminoaldehydy: ω -aminoaldehydy	19
3.3.1 <i>Cyklizace</i>	19
3.3.2 <i>Toxicita</i>	20
4 DEGRADACE AMINOALDEHYDŮ	21
4.1 Enzymy katalyzující degradaci aminoaldehydů	21
4.2 Reakční mechanismus degradace ω -aminoaldehydů	23
4.3 Produkty degradace ω -aminoaldehydů	24
4.4 Další osud degradačních produktů ω -aminoaldehydů a jejich začlenění do obecných metabolických drah	25
5 AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY	26
5.1 Struktura	26
5.2 Lokalizace	29
5.3 Aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu	31

5.3.1	Vazebné místo pro kation a koenzym	33
5.3.2	Aktivní místo a vazba substrátu	36
5.3.3	Náhrada koenzymu, substrátová specifita a inhibice	37
5.3.4	Isoelektrický bod, pH a teplotní optimum a další vlastnosti.....	39
E X P E R I M E N T Á L N Í Č Á S T.....		40
6	MATERIÁL A METODY	40
6.1	Biologický materiál	40
6.2	Použité chemikálie	40
6.3	Použité přístroje	41
6.4	Produkce enzymu	41
6.5	Příprava substrátů.....	43
6.6	Měření aktivity a kinetických parametrů	45
7	VÝSLEDKY	Error! Bookmark not defined.
7.1	Připravené a zakoupené substráty.....	Error! Bookmark not defined.
7.2	Produkce enzymů	Error! Bookmark not defined.
7.3	Určení relativních aktivit při koncentraci substrátu 1,0 mmol.l ⁻¹ ..	Error! Bookmark not defined.
7.4	Stanovení kinetických parametrů	Error! Bookmark not defined.
8	DISKUSE	Error! Bookmark not defined.
9	ZÁVĚR	46
	Seznam použité literatury	47
	Seznam použitých zkratk	52
	PŘÍLOHY	54

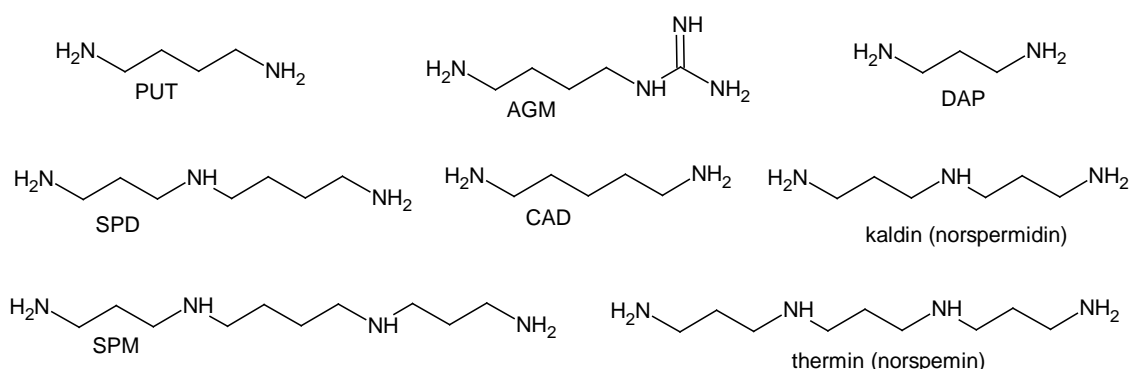
Cíle práce

- 1 Produkce rekombinantní aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu a rajčete s využitím geneticky modifikované bakterie *Escherichia coli*
- 2 Syntéza potenciálních substrátů aminoaldehyddehydrogenasy
- 3 Stanovení relativní aktivity a kinetických parametrů enzymů pro připravené substráty

TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYAMINY

Polyaminy jsou všudypřítomné sloučeniny hrající rozhodující roli v klíčových fyziologických procesech včetně buněčného růstu a dělení. Vzhledem k tomu, že za fyziologického pH nesou kladný náboj, váží se velmi silně, jak bylo *in vitro* demonstrováno, k záporně nabitým nukleovým kyselinám, kyselým fosfolipidům i mnoha typům proteinů včetně enzymů, jejichž aktivita je často výrazně ovlivněna vazbou polyaminu. Mezi nejvýznamnější polyaminy patří spermin (SPM), spermidin (SPD), putrescin (PUT), 1,3-diaminopropan (DAP) či agmatin (AGM) (Obr. 1) (Bouchereau et al., 1999, Tylichová et al, 2007, Walters, 2003).

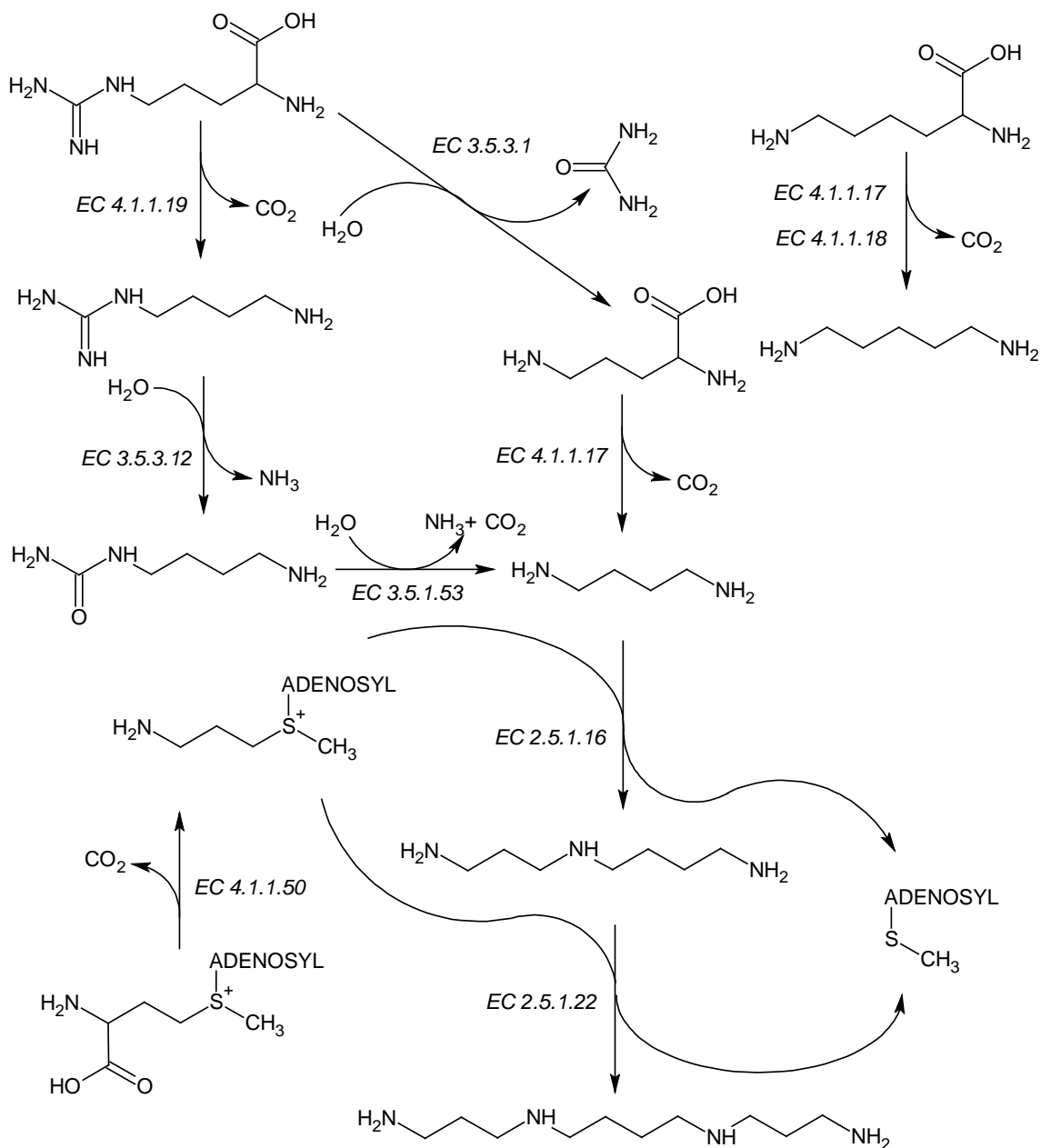


Obr. 1: Některé polyaminy vytvářející se v živých organismech (Walters, 2003)

1.1 Vznik polyaminů

Prvním krokem biosyntézy polyaminů je tvorba PUT, který může vzniknout buď přímo dekarboxylací ornithinu ornithindekarboxylasou (EC 4.1.1.17), nebo nepřímo z Arg, jehož dekarboxylací arginindekarboxylasou (EC 4.1.1.19) vzniká agmatin. Ten je dále přeměn agmatiniminohydrolasou (EC 3.5.3.12) na *N*-karbamoylputrescin, z něž za katalýzy *N*-karbamoylputrescinamidohydrolasou (EC 3.5.1.53) vzniká žádaný PUT. Z Arg může rovněž jednodokově vzniknout díky arginase (EC 3.5.3.1) ornithin. U rostlin a bakterií vzniká PUT z ornithinu i Arg, zatímco u živočichů a hub vede k PUT pouze dekarboxylace ornithinu. Připojením aminopropylové skupiny na jeden či oba dusíky Put vzniká SPD či SPM. Aminopropylová skupina se získá z dekarboxylovaného *S*-adenosylmethininu, odkud je přenesena spermidinsynthasou (EC 2.5.1.16) na dusíkový atom PUT za vzniku SPD, popř. sperminsynthasou (EC 2.5.1.22) na dusíkový atom primární aminoskupiny putrescinové části SPD za vzniku SPM. Dekarboxylaci *S*-adenosylmethininu zajišťuje *S*-adenosylmethinindekarboxylasa (EC 4.1.1.50). Pentan-1,5-diamin (kadaverin, CAD) vzniká dekarboxylací Lys, kterou katalyzuje nejen speciální enzym lysindekarboxylasa (EC 4.1.1.18), ale může být katalyzována i ornithindekarboxylasou (Obr. 2), jak je

uvedeno v citovaných přehledných člancích (Boucherau et al., 1999, Walters 2003, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme> - duben 2010).



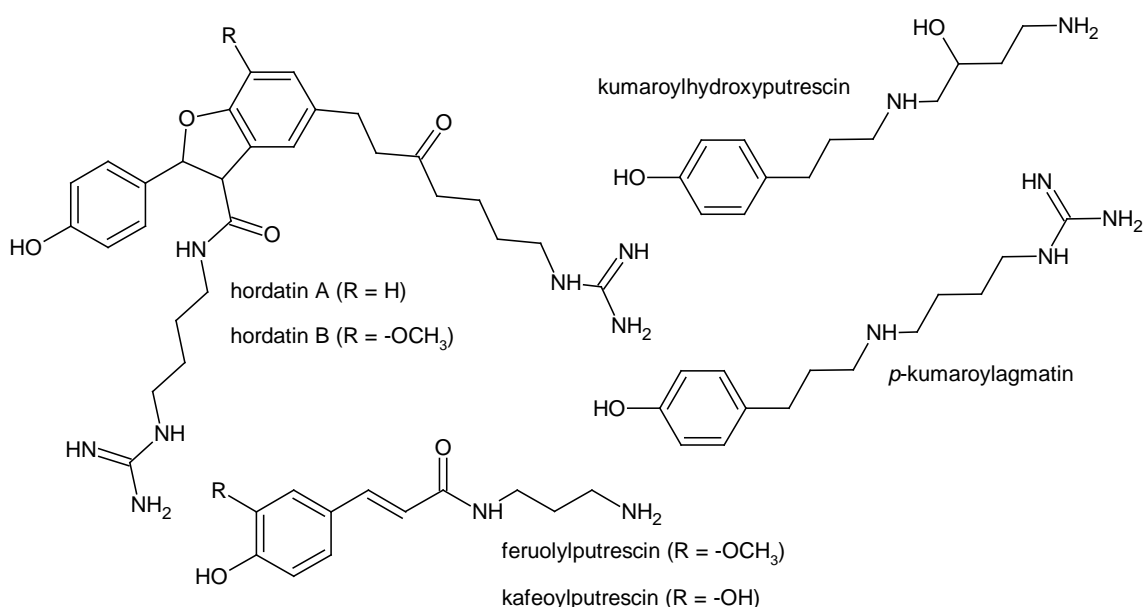
Obr. 2: Základní reakce biosyntézy nejvýznamnějších polyaminů (Boucherau et al., 1999, Walters 2003)

1.2 Výskyt a význam polyaminů u rostlin

Polyaminy se v rostlinných buňkách vyskytují buď ve formě volných bazí, nebo asociované s různými molekulami od malých fenolových kyselin až po velké molekuly proteinů. Časté jsou jejich deriváty se skořicovou, kávovou, *p*-kumarovou či ferulovou kyselinou. Rozmanitá skupina nízkomolekulárních konjugátů polyaminů se vyskytuje v široké skupině rostlinných čeledí. U dvaceti druhů rostlin reprezentujících rozdílné čeledi se dokonce jedná o hlavní fenolové sloučeniny reprodukčních orgánů. Asociáty

zmíněných kyselin s alifatickými diaminy a polyaminy jsou bazické a dobře rozpustné ve vodě, zatímco jejich neutrální asociáty s aromatickými aminy jsou ve vodě nerozpustné (Walters 2003). CAD není v rostlinách rozšířen tak široce jako PUT. Vyskytuje se především v čeledi motýlokvetých (*Papilionaceae*), jež je některými autory označována termínem bobovité (*Fabaceae*), nebo v květech kornoutic (*Zantedeschia* sp.) nazývaných též kala (Boucherau et al., 1999)

Polyaminy hrají důležitou roli v řadě vývojových procesů, mezi kterými jsou i růst kořenů, somatická embryogeneze, iniciace kvetení či vývoj květů a plodů. Velký význam mají polyaminy i v odpovědi na abiotický stres. Hladina polyaminů vzrůstá v odpovědi na sucho, salinitní stres, nedostatek draslíku či osmotický šok. U vyšších rostlin fungují polyaminy jako signální sloučeniny zejména při napadení patogeny (Boucherau et al., 1999, Walters, 2003).



Obr. 3: Některé asociáty polyaminů s fenolickými kyselinami (Walters, 2003)

Není bez zajímavosti, že akumulace sperminu spouští aktivaci kaspas v leukemických buňkách (Stefanelli et al., 1998). Feruloylputrescín se akumuluje v hlízách brambor napadených *Phoma exigua* (Malmberg, 1984). Protiplísňové účinky polyaminů byly pozorovány i u obilovin. *p*-Kumaroylhydroxyputrescín se akumuluje u pšenice napadené plísní, zatímco u ječmene dochází k akumulaci *p*-kumaroylagmatinu a hordatinu A a B (Smith & Best, 1978). Hordatín A je dimer *p*-kumaroylagmatinu, zatímco hordatín B je konjugát *p*-kumaroylagmatinu s feruloylagmatinem (Obr. 3) (Walters, 2003). Významným aspektem senzitivity kultivarů rýže vůči salinitě je nadměrná akumulace PUT spojená neschopností udržet vysokou hladinu SPM a SPD v kořenovém systému při expozici prostředí s vysokou koncentrací solí. V čiroku dochází při salinitním stresu k akumulaci SPD a SPM, což je považováno za adaptivní odpověď (Erdei et al., 1996). Neobvyklé polyaminy kaldin (norspermidin) a thermin

(norspermin) (Obr. 1) byly objeveny v termofilních bakteriích při jejich vystavení vysokým teplotám. Stejně polyaminy akumuluje při vystavení vysokým teplotám i pyl a buněčná kultura termofilní bavlny (Kuehn, 1990). Interakce SPD a SPM s membránami inhibuje přesun fosfolipidů přes membránu a stabilizuje např. thylakoidní membránu. U živočichů byly pozorovány souvislosti mezi přítomností SPD a SPM a cytoskeletární strukturou. Inhibice syntézy SPD a SPM navíc blokuje cytokinezi (Sunkara et al, 1979). Informace o výskytu polyaminu jsou podrobně shrnuty v recentních publikacích (Boucherau et al., 1999, Walters, 2003). Degradace polyaminů je spojená s mnoha fyziologickými procesy, mezi něž náleží i lignifikace, ztužení buněčné stěny či obrana buněk (Šebela et al., 2001b).

2 DEGRADACE POLYAMINŮ – VZNIK AMINOALDEHYDŮ

Nejobvykleji začíná katabolismus polyaminů jejich oxidativní deaminací, jež se může odehrávat jak na primární, tak na sekundární aminoskupině. V prvním případě vzniká příslušný aminoaldehyd, amoniak a peroxid vodíku. Z diaminů tímto způsobem vzniká jako primární produkt příslušný ω -aminoaldehyd. Oxidace polyaminů na sekundární aminoskupině může mít dvojí lokalizaci. Je totiž možná oxidace uhlíku na vnější či vnitřní straně sekundární aminoskupiny. V případě vnější oxidace, která je typická pro živočišné enzymy, ze SPM popř. SPD vznikne SPD popř. PUT a dále 3-aminopropanal (APAL) a peroxid vodíku. Oxidace uhlíku na vnitřní straně sekundární aminoskupiny poskytuje 4-[(3-aminopropyl)amino]butanal (APBAL) ze SPM a 4-aminobutanal (ABAL) ze SPD. Dalšími produkty jsou DAP, který již nemůže být přeměněn zpět na SPM či SPD, a peroxid vodíku (Tylichová et al, 2007).

2.1 Enzymy katalyzující oxidativní degradaci polyaminů

Oxidativní degradace polyaminů je katalyzována chinoproteinovými aminoxidasami (CAO, EC 1.4.3.6), které obsahují v aktivním místě měď, a flavoproteinovými polyaminoxidasami (PAO, EC 1.5.3.11). CAO byly později rozděleny na dvě skupiny, benzylaminoxidasu (EC 1.4.3.21; neoxidují polyaminy) a diaminoxidasu (EC 1.4.3.22) a původní označení EC bylo zrušeno (www.expasy.ch duben 2010). Jak je patrné z jejich klasifikace, katalyzuje CAO oxidaci primárních aminoskupin, zatímco PAO je odpovědná za oxidaci sekundárních aminoskupin. Reprezentativní enzymy obou skupin již byly krystalovány (Binda et al., 1999) .

2.1.1 Aminoxidasu obsahující měď

CAO bývá obvykle homodimerní. V každé své podjednotce obsahuje aktivní místo s topachinonovým kofaktorem a měďnatým iontem. Na základě substrátové specifity se CAO dělí do čtyř skupin. Prvou skupinu tvoří rostlinné aminoxidasu,

kteře vykazují vysokou afinitu k diaminům, zejména k PUT a CAD. Jsou proto často označovány jako diaminoxidasy. Enzymy z luštěninovitých rostlin oxidují výtečně i AGM, SPD a SPM. Další skupinou jsou CAO získané z krevní plazmy savců. Ty vykazují vysokou schopnost oxidace SPM, SPD, benzylaminu a jemu podobných monoaminů. Předposlední skupinu tvoří savčí intracelulární CAO. Příkladem mohou být enzymy z ledvin či placenty. Tato skupina se vyznačuje preferencí diaminů, oxiduje rovněž i histamin. V neposlední řadě náleží mezi CAO i mikrobiální enzymy, které s výjimkou methylaminoxidas katalyzují oxidaci arylalkyminů jako např. benzylamin, fenethylamin, tyramin či histamin. Propan-1,3-diamin (DAP) není CAO oxidován popř. je oxidován jen nepatrně za vznik APAL (Frébort & Adachi, 1995).

Tab. 1: Hodnoty K_i pro inhibici hrachové CAO vybranými inhibitory (Stránská et al., 2007, Šebela et al., 2007)

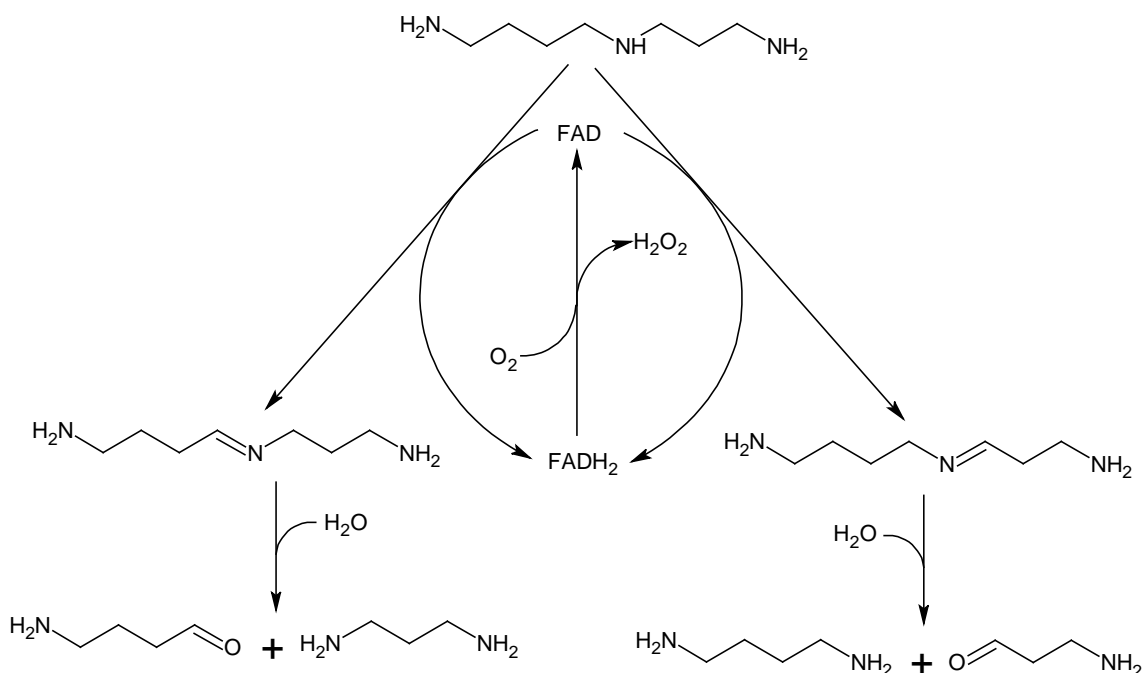
Inhibitor	K_i	Typ inhibice
<i>N,N</i> -bis(pyridin-2-ylmethyl)ethan-1,2-diamin	0,10 mmol.l ⁻¹	kompetitivní
<i>N,N</i> -bis(pyridin-2-ylmethyl)propan-1,3-diamin	0,20 mmol.l ⁻¹	kompetitivní
<i>N,N</i> -bis(pyridin-2-ylmethyl)butan-1,4-diamin	0,11 mmol.l ⁻¹	kompetitivní
<i>N,N</i> -bis(pyridin-2-ylmethyl)pentan-1,5-diamin	0,22 mmol.l ⁻¹	kompetitivní
<i>N,N</i> -bis(pyridin-2-ylmethyl)hexan-1,6-diamin	0,25 mmol.l ⁻¹	kompetitivní
<i>N,N</i> -bis(pyridin-2-ylmethyl)heptan-1,7-diamin	0,10 mmol.l ⁻¹	kompetitivní
<i>N,N</i> -bis(pyridin-2-ylmethyl)oktan-1,8-diamin	0,07 mmol.l ⁻¹	kompetitivní
1,4-diaminobutan-2-on	0,1 μmol.l ⁻¹	kompetitivní
1,5-diaminopentan-3-on	0,015 μmol.l ⁻¹	kompetitivní
<i>N</i> -(2-aminoethyl)ethan-1,2-diamin (diethylentriamin)	7 μmol.l ⁻¹	nekompetitivní
<i>N</i> ⁶ -(3-aminopropyl)adenin	0,1 - 0,10 mmol.l ⁻¹	kompetitivní
<i>N</i> ⁶ -(4-aminobut-2-enyl)adenin	0,1 - 0,10 mmol.l ⁻¹	kompetitivní

Většina rostlinných CAO oxiduje nejlépe PUT, SPD již hůře, přesto však lépe než SPM. V případě hrachové CAO dosahují relativní rychlosti vzhledem k PUT 35 % pro SPD a 0,3 % pro SPM. Enzym z čočky dosahuje u SPM, popř. SPD aktivity odpovídající 20, resp. 42 % aktivity pro PUT (Šebela et al., 2001b) Hrachová CAO oxiduje dobře i 1,4-bis(3-aminopropyl)-piperazin, dehydrospermin či (2-aminoethoxy)ethanal. Slabým substrátem, který je zároveň kompetitivním inhibitorem hrachové CAO je i dipropylentriamin, zatímco diethylentriamin je jejím nekompetitivním inhibitorem (Šebela et al, 2003). Poměrně dobrými substráty jsou i některé nenasycené diaminy. Zatímco například but-2-en-1,4-diamin dosahuje u CAO z hrachoru setého

(*Lathyrus sativus*) relativní aktivity vzhledem k PUT 18 % (trans izomer), resp. 11 % (cis izomer), je but-2-yn-1,4-diamin její reakčně závislý inhibitor (Šebela et al., 2000b). Jako kompetitivní inhibitory hrachové CAO funguje dobře řada *N,N*-bis(pyridin-2-ylmethyl)diaminů se dvěma až osmi uhlíky na nevětveném alifatickém řetězce mezi oběma aminoskupinami (Stránská et al., 2007). Kompetitivními inhibitory jsou i některé diaminoketony, *N*⁶-aminoalkyladeniny či deriváty agmatinu. Některé azadiaminy, jako například diethylentriamin či triethylentetramin, které mohou být považovány za deriváty kadaverinu a oktan-1,8-diaminu, jsou nekompetitivními inhibitory hrachové CAO (Tab. 1), jak je uvedeno v citované recentní publikaci (Šebela et al., 2007).

2.1.2 Polyaminoxidasy

Podle reakčního mechanismu je možné rozdělit PAO do dvou skupin. Živočišné PAO stejně jako sperminoxidasa (SMO) z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, která je známa pod označením Fms1 protein, a SMO z lidské či myší krevní plazmy, katalyzují oxidaci uhlíku na vnější straně sekundární aminoskupiny SPM či SPD. Jedním z produktů je u této skupiny APAL. Naproti tomu rostlinné PAO oxidují uhlíkový atom na vnitřní straně N⁴-dusíku, čímž vzniká jako jeden produktů propan-1,3-diamin (Šebela et al., 2001b, Tylichová et al, 2007).

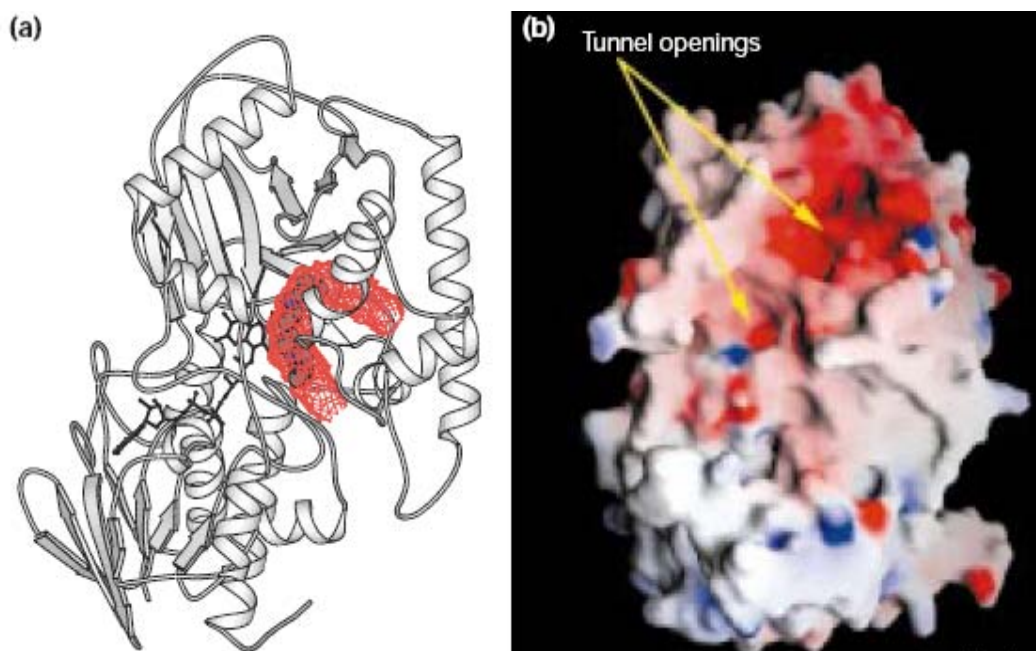


Obr. 4: Kroky reakce katalyzované rostlinnou (levé rameno) a živočišnou (pravé rameno) PAO demonstrováné na oxidaci SPD (Binda et al., 1999, Šebela et al, 2001b)

Narozdíl od CAO neprodukuje PAO NH_4^+ , shodně se uvolňuje H_2O_2 . Reakce PAO se skládá ze dvou fází, v první dochází k oxidaci sekundární aminoskupiny

dehydrogenací jedné z jejich vazeb se sousedním atomem uhlíku za současné redukce FAD na FADH₂. Následuje hydrolýza dvojně vazby iminoskupiny oxidovaného substrátu. FADH₂ je reoxidován vzdušným kyslíkem za vzniku H₂O₂. (Obr. 4). Molekula vody hydrolyzující meziprodukt je vodíkovým můstkem vázána na N⁵ atom flavinové části FAD (Binda et al., 1999).

PAO jsou monomerními proteiny s prostatickou skupinou FAD (Šebela et al., 2001B, Tylichová et al., 2007). Izoelektrický bod PAO leží obvykle v kyselé oblasti, některé rostlinné enzymy jsou glykoproteiny. Kukuřičná PAO, jejíž terciární struktura byla publikována jako první, je tvořena jedním polypeptidovým řetězcem o molekulové hmotnosti 53 kDa, který vytváří dvě dobře definované domény, FAD vazebnou doménu a doménu interagující se substrátem. Mezi doménami se vytváří tunel délky 30 Å ve tvaru písmene U, který je aktivním místem. Jádro katalytického místa je právě v zakřivené části tunelu, kde se nachází i flavinový kruh FAD (Obr. 5) (Binda et al., 1999).



Obr. 5: Prostorová struktura kukuřičné PAO s vyznačením celého katalytického tunelu (a) a vstupu do něj (b) (Binda et al., 1999)

Hodnota pH optima se obvykle pohybuje mezi 5,5 a 6,8. Molekulární vlastnosti a substrátová specifita PAO je shrnuta v citovaném článku (Šebela et al., 2001b).

Kompetitivní inhibitor kukuřičné PAO je například 1,4-Bis(3-aminopropyl)piperazin, jehož hodnota K_i je při použití SPM 1,0 mol.l⁻¹, což odpovídá polovině K_i pro SPD (Šebela et al., 2003). Rostlinné PAO jsou inhibovány širokým spektrem inhibitorů, mezi něž náleží například *N,N*-bis(pyridin-2-ylmethyl)-diaminy (Stránká et al., 2007). Informace o inhibicích PAO byly shrnuty v recentní publikaci (Šebela et al., 2007).

Stanovení PAO v krevním séru je možné využít při diagnóze mozkové mrtvice. Podrobný popis metody včetně referenčních mezí je uveden v citované publikaci (Tomitori et al., 2005).

2.2 Jiné způsoby degradace polyaminů

V některých bakteriích podléhají polyaminy transaminaci řízené nescifickými aminotransferasami (Tylichová et al., 2007). Již v první polovině šedesátých let byla publikována izolace putrescinaminotransferasy (EC 2.6.1.29) z bakterie *Escherichia coli* (Kim, 1964). Dalším příkladem může být polyaminaminotransferasa z bakterie *Arthrobacter* sp. TMP1, která katalyzuje přenos aminoskupiny z nor-spermidinu na pyruvát za vzniku 3-[(3-aminopropyl) amino]propanalu. Dalšími produkty jsou L-alanin, DAP, allylamin a akrolein v relativním množství 24, 3,3, 2,3 a 1,2 % vzhledem ke stupni transaminace páru DAP/pyruvát (Yorifuji et al., 1997b). Zmíněný enzym, který katalyzuje i transaminaci z DAP, PUT, SPD a SPM, se již podařilo vyčistit do homogenní čistoty. Jeho molekulová hmotnost dosahuje hodnoty 129 kDa. Enzym je složen ze dvou podjednotek o hmotnosti 64 kDa. Jako koenzym slouží pyridoxal-5'-fosfát, nejlepším akceptorem aminoskupiny je pyruvát, zatímco 2-oxoglutarát a oxaloacetát jsou vůči této transaminaci inertní (Yorifuji et al., 1997a).

Transaminace polyaminů byla pozorována i u rostlin. U lupiny mnoholisté (*Lupinus polyphyllus*) známé též jako vlčí bob probíhá v rámci tvorby chinolizidinových alkaloidů přesun aminoskupiny z CAD na pyruvát. Enzym katalyzující tuto reakci byl posléze vzhledem ke skutečnosti, že neuvolňuje 5-aminopentanal, ale až tetracyklický 17-oxospar-tein, označen jako 17-oxospatretinsynthasa a je lokalizován v chloroplastech (Wink & Hartmann, 1979, Wink & Hartmann, 1981).

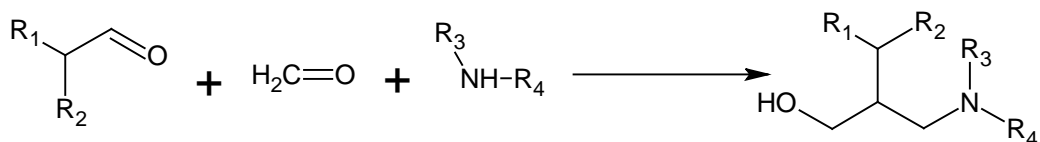
3 AMINOALDEHYDY

Jak napovídá název, jsou aminoaldehydy bifunkční sloučeniny, které obsahují aminoskupinu a aldehydovou skupinu. Nachází-li se alespoň jedna zmíněná skupina na aromatickém jádře, jedná se o aromatický aminoaldehyd, v opačném případě se jedná o alifatický aminoaldehyd. Byly připraveny aminoaldehydy s primární, sekundární, terciární i kvartérní aminoskupinou. Z hlediska přípravy aminoaldehydů i posuzování jejich vlastností hraje významnou roli vzájemná pozice obou charakteristických funkčních skupin (Lukeš, 1962).

3.1 Laboratorní příprava aminoaldehydů

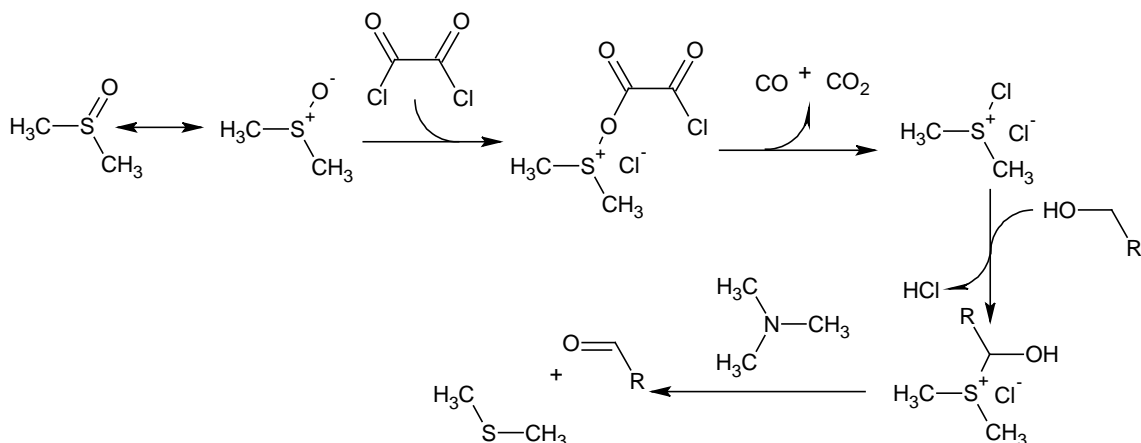
Pro přípravu aminoaldehydů bylo vytvořeno mnoho metod, které často vychází z redukce příslušných aminokyselin a jejich derivátů či oxidace příslušných aminoalkoholů. Některé z těchto metod jsou popsány v následující části této práce.

Obecná metoda pro přípravu aminoaldehydu jakékoliv skupiny spočívá v ozonolýze vhodného aminoalkenu. Možné je i využití adice NH_3 nebo aminu na vhodný alken. Při této adici na alk-2-enal vzniká vzhledem ke konjugaci β -aminoaldehyd. Ten je možné získat i Mannichovou reakcí – kondenzací aldehydu s methanalem a NH_3 , aminem či jeho solí (Obr. 6) (Čičibabin 1957, Lukeš 1962).



Obr. 6: Mannichova reakce

Již v období před první světovou válkou byly nezávisle na sobě publikovány dvě práce popisující přípravu glycinalu resp. alaninalu oxidací příslušného methylesteru sodným amalgámem. Po druhé světové válce byla citovaným autorem tato metoda použita i pro přípravu histidinalu. (Adams, 1955).



Obr. 7: Swernova oxidace

V sedmdesátých letech dvacátého století byla vyvinuta Swernova oxidace. Tato metoda přípravy karbonylových sloučenin oxidací příslušných alkoholů umožňuje přípravu aldehydů či ketonů i v přítomnosti jiných funkčních skupin. Metoda využívá pro oxidaci alkoholů dimethylsulfoxid (DMSO), který je nejprve aktivován oxalylochlorem, čímž vzniká chlorid (2-chlor-2-oxoacetoxy)dimethylsulfonia, ze kterého vzniká odstěpením oxidu uhličitého a oxidu uhelnatého chlorid chlordindimethylsulfonia. K takto vzniklému meziprojektu je přidán příslušný alkohol, jenž se naváže na atom síry namísto chloru za vzniku chloridu (1-hydroxyalkyl)dimethylsulfonia. Příslušný alkohol je ze zmíněného meziprojektu vytěsněn pomocí vhodným terciárním aminem, nejčastěji je využíván trimethylamin (Obr. 7). Vzhledem k nestabilitě meziprojektů je nutno během průběhu reakce udržet teplotu pod $-50\text{ }^\circ\text{C}$, v opačném případě dochází k nesespecifické oxidaci i jiných funkčních skupin. Reakce probíhá v bezvodém prostředí a veškerá použitá činidla jsou rozpuštěna v dichlormethanu (Mancuso et al., 1978, Mancuso et al., 1979, Omura & Swern, 1978).

Jen o pár let později byla publikována metoda enzymové přípravy α -aminoaldehydů oxidací odpovídajících aminoalkoholů pomocí alkoholdehydrogenasy (EC 1.1.1.1) z koňských jater. Jako akceptoru elektronů využívá enzym koenzymu NAD^+ , který je regenerován oxidací pomocí FMN. Celá reakce probíhá při pH 8,7, jako pufr je použit difosforečnan sodný. Tato metoda se ukázala jako nevhodná pro přípravu α -aminoaldehydů s kladně nabitým postranním řetězcem, odpovídající aminoalkoholy nebyly totiž alkoholdehydrogenasou oxidovány. Naproti tomu aminoalkoholy s alifatickým postranním řetězcem byly oxidovány rychlosti odpovídající až 6 % rychlosti oxidace fyziologického substrátu - ethanolu (Andersson & Wolfenden 1982).

3.2 Vlastnosti aminoaldehydů

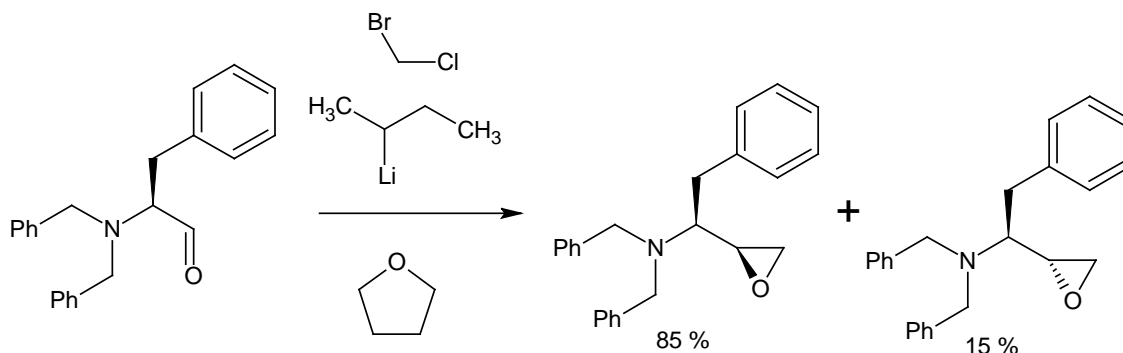
Stejně jako peptidové aldehydy jsou i α -aminoaldehydy odvozené od proteinogenních aminokyselin účinnými reverzibilními inhibitory serinových a cysteinových proteas. Je to pravděpodobně způsobeno strukturální podobností s meziprodukty přeměny substrátů (Andersson & Wolfenden 1982).

V kyselém prostředí bývají α -aminoaldehydy poměrně stabilní, zatímco při vyšším pH jejich stabilita klesá. Například histidinal rozpuštěný v roztoku 0,001 až 0,5 M HCl či jeho dihydrochlorid rozpuštěný ve vodě je při laboratorní teplotě stabilní několik dní, zatímco zmražen na teplotu $-15\text{ }^\circ\text{C}$ je stabilní po dobu několika měsíců. Je-li však za laboratorní teploty po dobu nikoli delší než 10 minut inkubován v roztoku při pH 7 či vyšším, stává se inaktivní pro enzymy redukující jej na histidinol (Adams, 1955).

3.2.1 Některé reakce aminoaldehydů

V první polovině devadesátých let byl *N,N*-bis(fenylmethyl)fenylalaninal použit při syntéze meziprojektu syntézy potencionálního inhibitoru HIV proteasy. Klíčová je zde reakce s chloromethylithiem, popř. bromomethylithiem za vzniku odpovídajícího epoxidu (Obr. 8). Získaná směs epoxidů, v níž v poměru 17: 3 převažoval *erythro* izomer, byla dále po dobu 1,5 hodiny inkubována s isobutylaminem a isopropanolem při teplotě $80\text{ }^\circ\text{C}$, čímž byla získána hrubá směs aminů. Hydrogenací terciální aminoskupiny 20 % hydroxidem paladnatým v uhlíku společně s methanolem byl získán 3-amino-4-fenyl-1-isobuthylamino-butan-2-ol, který byl úspěšně použit pro syntézu potencionálních inhibitorů HIV proteasy. Ačkoliv již před citovanou studií byly zkoumány reakce aldehydů s halomethylithiem, adice chirálních α -aminoaldehydů poskytující příslušné α -aminoepoxydy nebyly dříve vyšetřovány.

Dříve studované reakce při použití sulfoxium ylidu jako činidla nevykazovala dostatečnou stereospecifičnost (Ng et al, 1995).

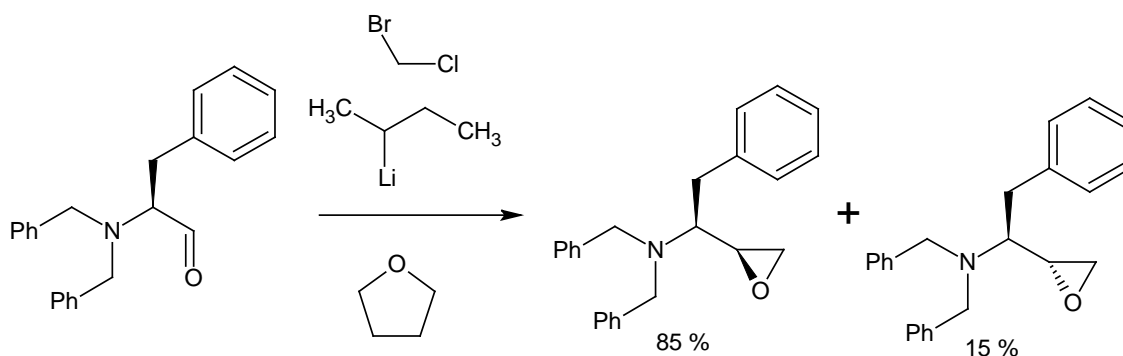


Obr. 8: Tvorba epoxidu z *N,N*-bis(fenylmethyl)fenylalaninalu

Stejně jako jiné karbonylové sloučeniny podléhají i aminoaldehydy Michaelově adiční reakci s nitroalkeny, přičemž je v závislosti na použitém katalyzátoru dosahováno vysokého stupně stereoselektivity. Takto získaná enantiomerická čistota produktu je však často degradována při izolaci produktu (Albertshofer et al., 2007).

Hydrogenací alkylovinylnketonů v přítomnosti *N*-Boc- α -aminoaldehydů vede ke stereoselektivní tvorbě příslušných *syn*- β -hydroxyketonů. Reakce probíhá za laboratorní teploty a při normálním tlaku. Katalyzátorem reakce je rhodium a jako ligandu se využívá trifur-2-ylfosfin. Za stereoselektivitu reakce je odpovědná intramolekulární vodíková vazba mezi kyslíkem karbonylové skupiny a vodíkem aminoskupiny chráněnou *tert*-butoxykarbonylovou skupinou (Jung & Krische, 2006).

Pictet-Spenglerova reakce mezi α -aminoaldehydy či jejich deriváty odvozenými od Glu a 2(1*H*-indol-3-yl)ethanaminem vede s jednoznačnou stereospecifičností k jedinému produktu. Jedná se o *cis* (+)-(1*S*, 12*bR*)-1-aminoindolchinolizidin, který je prekurzorem farmakologicky zajímavé pentacyklické sloučeniny azaburnanu (Melnik et al., 1993). Naproti tomu Pictet-Spenglerova cyklizační kondenzace mezi *N*-Boc-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-karbaldehydem a hydrochloridem methyl-2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenol)-propanoátem poskytuje tři izomerní sloučeniny s 1,3'-bistetrahydroisochinolinovým skeletem. Dvě sloučeniny jsou diastereomery lišící se orientací vodíku na pozici 3', zatímco u třetího produktu došlo k opačnému směru cyklizace, což se projevuje rozdílnou polohou hydroxylových skupin na nově vzniklém isochinolinovém jádře (Obr. 9). Vzniklý skelet je meziproductem pro tvorbu pentacyklických sloučenin se strukturální analogií k některým alkaloidům (Aubry et al., 2006).



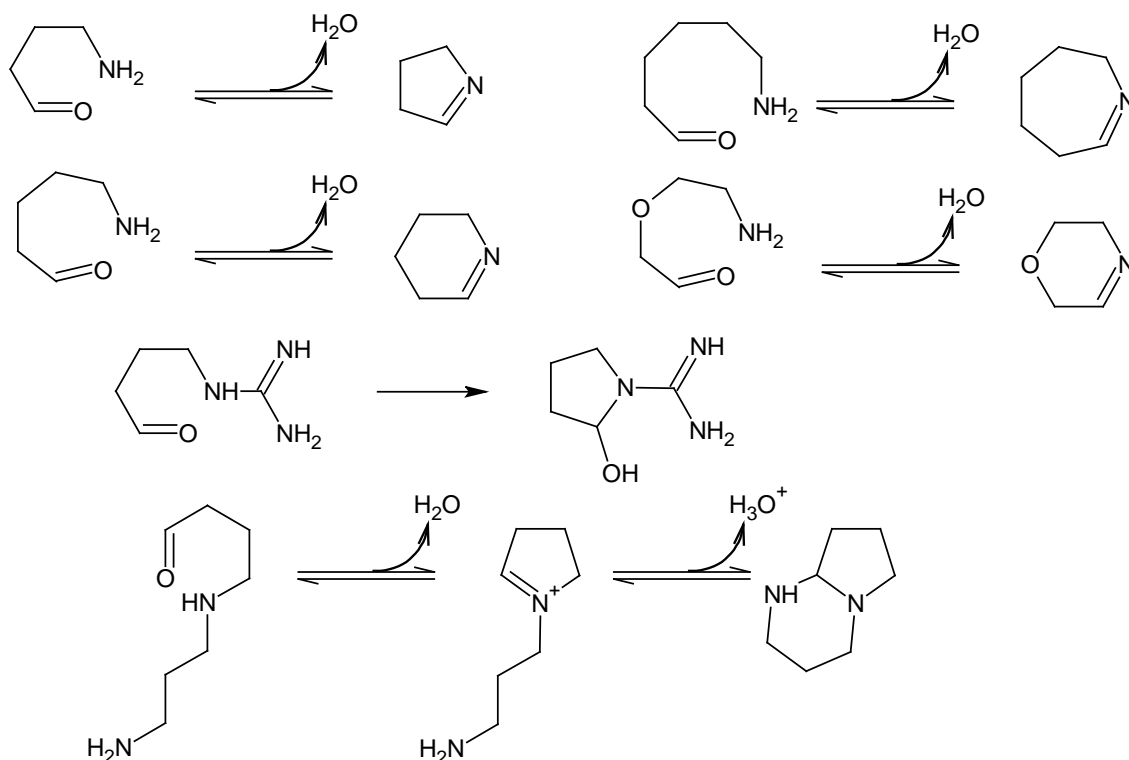
Obr. 9: Pictet-Spenglerova reakce

3.3 Biologicky významné aminoaldehydy: ω -aminoaldehydy

Z hlediska metabolismu jsou nejvýznamnější ω -aminoaldehydy, které nesou aminoskupinu na konci alifatického řetězce. Jejich příkladem je APAL, ABAL, betainaldehyd (BAL), 4-guanidinobutanal (GBAL) a mnoho dalších.

3.3.1 Cyklizace

Některé ω -aminoaldehydy jsou poměrně nestabilní a podléhají samovolné cyklizaci. Z ABAL tak vzniká Δ^1 -pyrrolin, z 5-aminopentanal (5-aminovaleraldehyd, AVAL) Δ^1 -piperidin, z GBAL *N*-amidino-2-hydroxypyrrolidin a z APBAL vzniká 1-(3-aminopropyl)pyrrolinium, které dále cyklizuje na 1,5-diazabicyklonan. Uzavření kruhu je závislé na délce řetězce. 6-Aminohehexanal (6-aminokapronaldehyd, ACAL) vzniklý z hexan-1,6-diaminu použitého jako syntetický substrát CAO rovněž spontánně cyklizuje na Δ^1 -azacyklohepten. Naproti tomu 10-aminodekanal necyklizuje vůbec, podobně jako APAL (Šebela et al., 2001b, Tylichová et al., 2007). Vzniklé cyklické sloučeniny jsou významnými prekurzory rostlinných alkaloidů. Například v lupině mnoholisté vznikají z Δ^1 -piperideinu chinolizidinové alkaloidy spartein či lupanin (Wink & Hartman, 1979). (2-Aminoethoxy)ethanal připravený oxidací 1,5-diamino-3-oxapentanu imobilizovanou CAO z hrachu setého (*Pisum sativum*) poskytuje spontánní cyklizaci 3,6-dihydro-2*H*-1,4-oxazin (Obr. 10) (Šebela et al., 2003).

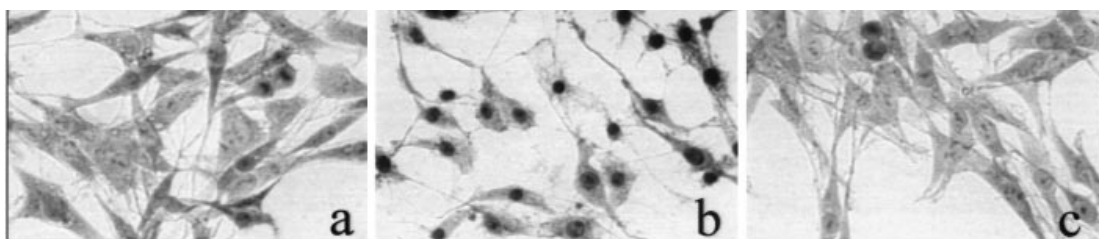


Obr. 10: Cyklizace některých aminoaldehydů

3.3.2 Toxicita

APAL je vysoce reaktivní aldehyd, který se kovalentně váže na aminoskupinu či sulfhydrylovou skupinu proteinů. Takto modifikované proteiny se ve větší míře vyskytují v cerebrospinální tekutině pacientů trpících cerebrální ischemií. Pro imunologickou detekci zmíněných proteinů je možné vyprodukovat vhodné protilátky (Ivanova et al., 2002).

Pro savčí buňky obecně je APAL cytotoxický, je například jedním z faktorů, které se vyskytují při ischemii. Při testech na krysách se špatným prokrvením levé zadní končetiny, způsobeným podvázáním stehenní tepny, byla 24 hodin po podvázání tepny v krvi odebrané z levé stehenní žíly koncentrace APAL 60 mg/ml. Naproti tomu v případě kontrolních krys nebyl APAL detekován vůbec a v krvi odebrané ze srdce byla koncentrace APAL desetkrát menší než v případě krve ze žíly. Tato data ukazují, že APAL vzniká v ischemické tkáni (Syrek et al., 2000). Takto vzniklý APAL je cytotoxický, jak ukázaly experimenty s buněčnou linií D384 získanou z nádoru lidských astrocytů, kde přítomnost APAL vede k protržení lysozomů, což zjevně předchází aktivaci kaspas a apoptické smrti buňky (Li et al., 2003). Takto aktivované apoptose či nekrose podléhají velmi často jak neurony, tak gliové buňky. Jeho rozšíření v mozkové tkáni mimo ischemické ohnisko způsobuje významné poškození mozku (Tylichová et al., 2007).



Obr. 11: Smrt buněk linie D384 vlivem APAL a ochrana buněk pomocí *N*-(2-merkaptopropanoyl)glycinu. A kontrolní kultura, B buňky kultivované s APAL, C buňky kultivované s APAL a *N*-(2-merkaptopropionyl)-glycinem (Li et al., 2003)

Imunohistochemický výzkum odhalil, že APAL se koncentruje uvnitř lysozomů a jako prevence proti této akumulaci funguje amoniak. Tato ochrana před cytotoxicitou APAL je založena na nárůstu pH v přítomnosti amoniaku. Cytotoxické vlastnosti APAL významně inhibuje i *N*-(2-merkaptopropionyl)-glycin (Obr. 11), který reaguje s APAL za vzniku netoxického thioacetalového aduktu. *N*-(2-merkaptopropionyl)-glycin je netoxický a je využíván jako léčivo pro prevenci ledvinových kamenů u pacientů trpících cysteinurií. Jako ochrana buněk před poškozením fungují i enzymy z široké skupiny aldehyddehydrogenas, které oxidují APAL (Ivanova et al., 2002, Li et al., 2003).

4 DEGRADACE AMINOALDEHYDŮ

ω -Aminoaldehydy jsou v organismech oxidovány na příslušné aminokyseliny. Tuto reakci zprostředkovávají různě specifické enzymy z široké rodiny NAD⁺ či NADP⁺ dependentních aldehyddehydrogenas (ALDH, EC 1.2.1.x). Z nejčastěji se vyskytujících aminoladehydů, APAL a ABAL, vzniká 3-aminopropanová kyselina (β -alanin) a 4-aminobutanová kyselina (GABA). Oxidací betinaldehydů vzniknou příslušné betainy (Tylichová et al., 2007).

4.1 Enzymy katalyzující degradaci aminoaldehydů

Oxidaci aminoaldehydů zprostředkovává množství enzymů, které lze seskupit do velmi široké skupiny ALDH. Některé tyto enzymy jsou obvykle NAD⁺ dependentní, avšak jako akceptor elektronů jsou schopny přijmout i NADP⁺, což se však obvykle projevuje snížením aktivity enzymu. Mezi zástupce těchto enzymů patří aminobutyraldehyddehydrogenasy (ABALDH, EC 1.2.1.19), guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (GBALDH, EC 1.2.1.54), betinaldehyddehydrogenasy (BAL, EC 1.2.1.8) či nespecifické aldehyddehydrogenasy (ALDH), které jako akceptor elektronů buď striktně vyžadují NAD⁺ (EC 1.2.1.3), nebo jsou schopny přenést elektrony i na NADP⁺ (EC 1.2.1.5). ABALDH i GBALDH zejména u rostlin vykazují velmi širokou substrátovou specifčnost, což je příčinou jejich

označení za aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) (Šebela et al., 2000a, Tylichová et al., 2007). Další skupinou jsou trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.47), která je zapojena do biosyntézy karnitinu z lysinu. Aldolytickým štěpením z hydroxytrimethyllysinu totiž vzniká jako meziproduct 4-(trimethylamino) butanal a Gly (Hassan et al., 2008).

Doposud se tyto enzymy podařilo izolovat z mikroorganismů, rostlin i živočichů. Již roku 1959 byla získána NAD⁺-dependentní ABALDH z bakterie *Pseudomonas fluorescens* rostoucí na pyrrolidinu a PUT jako jediném zdroji energie, dusíku a uhlíku. Jiné druhy této bakterie adaptované na SPD jako jediný zdroj uhlíku a dusíku naproti tomu produkují nespecifické AMADH s rozdílnými kinetickými parametry vůči APAL a ABAL (Jakoby & Frederics, 1959). Podobné experimenty s nutričním nedostatkem byly provedeny i s mnoha dalšími druhy bakterií, ze kterých byly získány různé enzymy degradující aldehydy. Za zmínku stojí produkce ABALDH i GBALDH bakterií *Pseudomonas putida*, kde první jmenovaný enzym katalyzuje oxidaci nejen ABAL, ale i GBAL, zatímco druhý jmenovaný je striktně specifický pro GBAL (Callewae et al., 1974), jak je shrnuto v recentní publikaci (Tylichová et al., 2007).

První zpráva o NAD⁺ dependentních dehydrogenasách vyšších rostlin, které se podílí na oxidaci ABAL či GBAL, pochází z roku 1984, kdy byla purifikována GBALDH z bobu (*Vicia faba*). Krátce nato byla aktivita ABALDH detekována i v hrachu, ovsu, ječměni, kukuřici a dalších rostlinách. Z výhonků prosa byla částečně purifikována aminopropionaldehyddehydrogenasa (APALDH), která však neoxiduje jen APAL či ABAL, ale i indol-3-acetaldehyd a rozličné C2 až C4 aldehydy. Výše zmíněná hrachová ABALDH byla posléze purifikována a vzhledem ke své široké substrátové specifičnosti přejmenována na AMADH. Jedná se o nejlépe popsáný enzym této skupiny, který byl získán z vyšších rostlin (Awal et al., 1997).

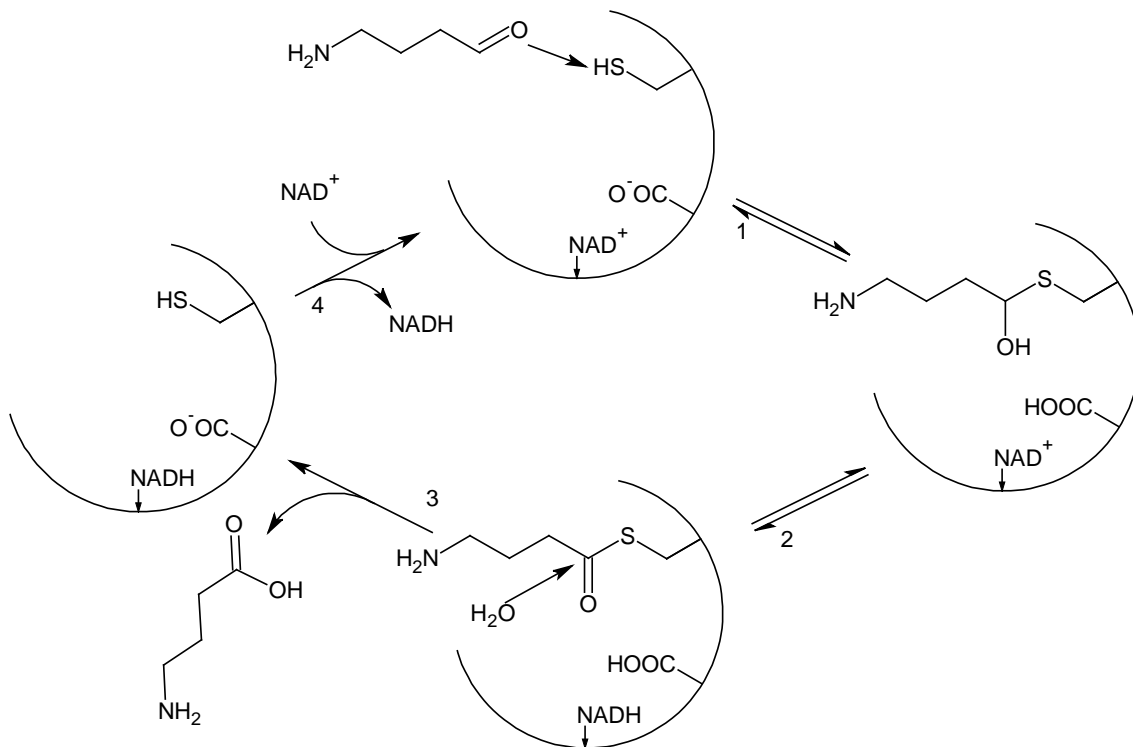
V průběhu sedmdesátých a osmdesátých let dvacátého století se podařilo purifikovat do homogenity ALDH z mnoha rozličných savčích organismů. V lidských játrech se nachází dva izoenzymy ALDH, cytoplasmatická (E1) a mitochondriální (E2), které oxidují široké spektrum alifatických či aromatických aldehydů včetně 2-hydroxyaldehydů či 2-halogenaldehydů. Oba izoenzymy rovněž oxidují ABAL, ale až při jeho vysokých koncentracích. Roku 1989 byl purifikován další lidský jaterní izoenzym ALDH (E3), který vykazoval velmi dobrou afinitu k ABAL s pH optimem 7,5. I přes svou širokou substrátovou specifičnost jej proto lze považovat za prvou ABALDH izolovanou ze savčího organismu (Kurys et al., 1989). Podobný enzym byl získán i z hovězího mozku. Z lidského mozku byl získán další izoenzym, který se od jaterního izoenzymu E3 liší v sekvenci jen v jedné aminokyselině (Kikonoyogo & Pietruszko, 1996). Z pohledu katalytických vlastností jsou tyto dva izoenzymy nerozlišitelné. Zmíněné

lidské a krysí jaterní ABALDH prokázaly krátce po své první purifikaci a charakterizaci schopnost katalyzovat i oxidaci BAL, protože jsou nyní často označovány jako BALDH či ALDH9 (Tylichová et al., 2007).

Při porovnání rostlinných BADH a AMADH a jejich genů vychází najevo, že zatímco geny z jednoděložných rostlin jsou si velmi podobné, mezi geny z dvouděložných rostlin dochází k větší variabilitě genů, ačkoliv produkty jejich exprese se již tolik neliší. Například hrachová AMADH 1 (PsAMADH1) vykazuje malinko větší podobnost vůči některým rostlinným BADH než vůči PsAMADH2 (Brauner et al., 2003).

4.2 Reakční mechanismus degradace ω -aminoaldehydů

Nejen AMADH, ale i BALDH a další ALDH obsahují ve svém aktivním místě katalytické residuum Cys, díky čemuž je možné je inaktivovat použitím činidel reagujících s thiolovou skupinou (Brauner et al., 2003).



Obr. 12: Reakční mechanismus enzymové oxidace aminoaldehydů na příslušné aminokyseliny (Tylichová et al., 2007).

Reakční mechanismus představuje typický příklad uspořádaného sekvenčního modelu dvousubstrátové reakce. Nejprve dochází k vazbě koenzymu NAD⁺, který může být nahrazen NADP⁺. Jedná se však o neplnohodnotnou náhradu, což je pravděpodobně způsobeno elektrostatickým odporem 2'-fosforečnanové skupiny, jenž byl pozorován u některých ALDH. Adeninová část koenzymu je v aktivním místě navázána pevně, zatímco nikotinamid se svou ribosou jsou flexibilní. Poté dojde

k nukleofilnímu ataku katalytického Cys vůči oxidovanému aminoaldehydu za tvorby kovalentě navázaného thiohemiacetalu (Tylichová et al., 2007).

Následně je karbonylový hydrid přesunut z tetrahedrálního meziprojektu na C4 pozici nikotinamidového kruhu NAD⁺, čímž vznikne thioester a redukovaná forma koenzymu NADH. Pro dipolární charakter karbonylové skupiny je přesun hydridového iontu ze substrátu na koenzym energeticky náročný krok. V posledním kroku, který limituje reakční rychlost, aktivuje reziduum Glu, které je rovněž u všech izoenzymů zachováno, molekulu vody. Ta díky tomu nukleofilně štěpí thioesterovou vazbu za vzniku příslušné aminokyseliny a regenerace katalytického Cys. Na závěr dojde uvolnění NADH z kapsy, jež váže koenzym (Obr. 12) (Wymore et al., 2004).

Ve dvou zmíněných krocích je nutná přítomnost báze. Jedná se o aktivaci katalytického nukleofilního Cys, který atakuje aldehydovou skupinu substrátu, a aktivaci molekuly vody hydrolyzující thioester. Aktivace Cys je patrně zprostředkovaná molekulou vody, která odevzdá přítomné bázi proton, načež získá proton zpět tím, že jej odebere residuu Cys. Roli báze obvykle plní Glu, jehož pozice se pohybuje kolem 260 (Tylichová et al., 2007).

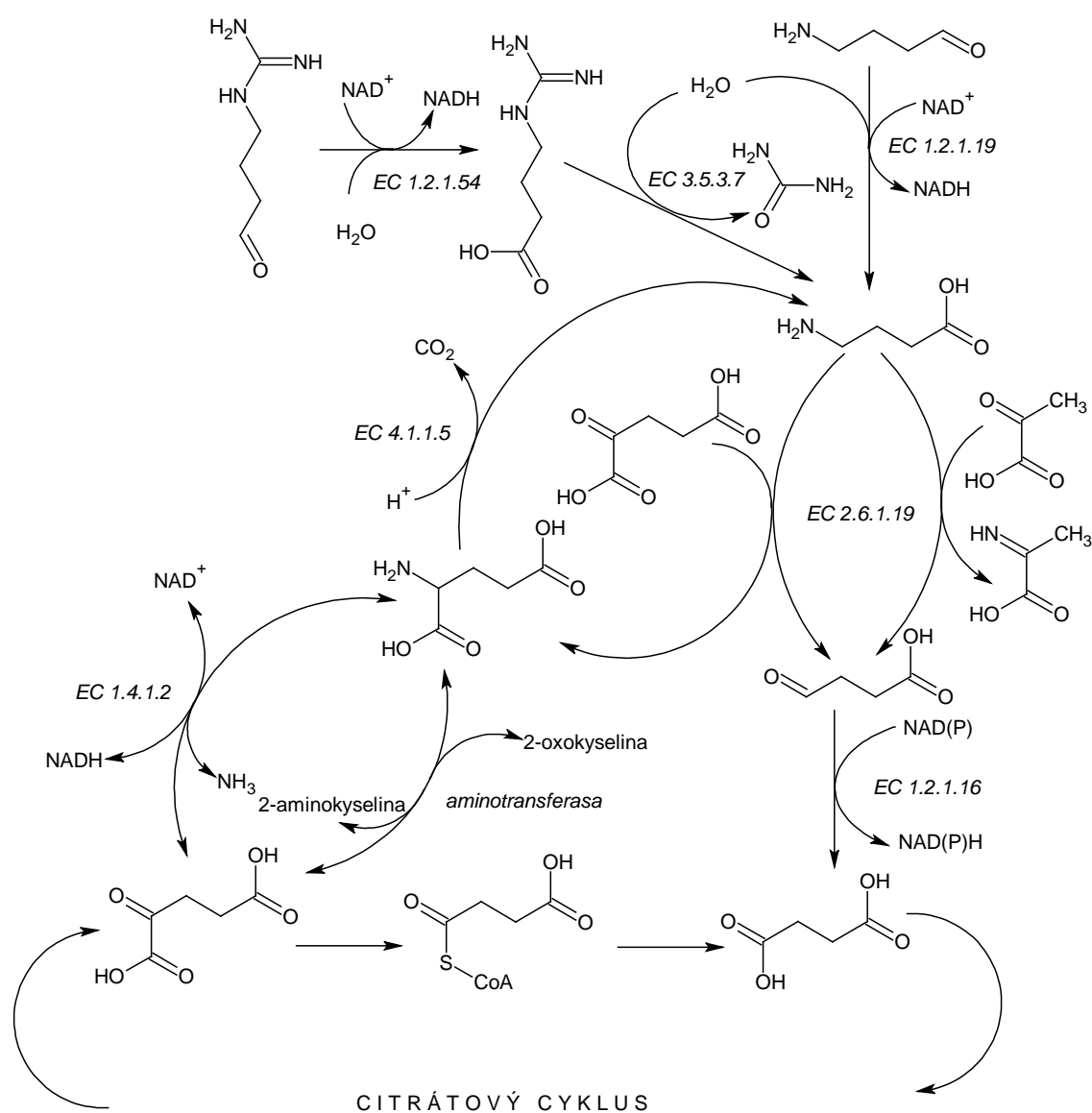
4.3 Produkty degradace ω-aminoaldehydů

V centrálním nervovém systému savců je GABA velmi dobře známý neurotransmitter, který inhibuje přenos signálu z jedné nervové buňky do druhé. U rostlin dochází k významné akumulaci GABA za stresových podmínek, zejména za chladu, sucha, zvýšené salinity, anoxie či mechanického poškození. Částečně se může jednat o následek snížení pH v cytoplazmě, což stimuluje glutamátdekarboxylasu (EC 4.1.1.15), jejíž pH optimum se pohybuje kolem hodnoty 5,8. Dekarboxylace Glu katalyzovaná glutamátdekarboxylasou je totiž další reakcí, kterou v rostlinách vzniká GABA. Tato reakce odebírá z prostředí protony, a může tudíž být považována za adaptační reakci přispívající k regulaci cytoplazmatického pH (Tylichová et al., 2007).

Zwitteriontové sloučeniny označované jako betainy jsou nejefektivnějšími osmo-protéktanty rostlin. Jedná se o karboxylové kyseliny obsahující kvartérní amin. Jejich velkou výhodou je skutečnost, že ani při vysokých koncentracích nejsou toxické a při fyziologickém rozmezí pH nenesou žádný náboj. Díky tomu je jejich akumulace, která nenarušuje výkon buněčných funkcí, představitelem obrany rostlin před suchem, salinitou, mrazem, horkem a dalšími druhy stresu. Betainy dále stabilizují enzymy a membrány (Tylichová et al., 2007).

4.4 Další osud degradačních produktů -aminoaldehydů a jejich začlenění do obecných metabolických drah

Enzymová hydrolýza 4-guanidinobutanové kyseliny, která vzniká oxidací GBAL, reprezentuje další z cest vedoucích ke vzniku GABA. Tato reakce je katalyzována enzymem guanidinobutyrasou (EC 3.5.3.7). GABA může být transaminací přeměněna na kyselinu 4-oxobutanovou (sukcinylsemialdehyd) za katalýzy GABA transaminasou (EC 2.6.1.19). Akceptorem aminoskupiny bývá 2-oxoglutarát nebo pyruvát, který je tak přeměněn na Glu či Ala. Sukcinylsemialdehyd je za přispění sukcinylsemialdehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.16) oxidován na butandiovou kyselinu (kyselina jantarová, sukcinát), která je jedním z komponentů citrátového cyklu (Obr. 13) (Šebela et al., 2000a).



Obr. 13: Oxidace ABAL a GBAL a začlenění vzniklých kyselin a Glu do citrátového cyklu (Šebela et al., 2000a, Tylichová et al., 2007)

Glu může být do citrátového cyklu zabudován i jedinou anaplerotickou reakcí – oxidační deaminací (glutamátdehydrogenasa, EC 1.4.1.2) nebo transaminací (různé aminotransferasy) za vzniku 2-oxoglutarátu. Začlenění Glu do citrátového cyklu třemi reakci přes GABA je často v anglicky psané literatuře označováno jak tzv. GABA shunt, což lze do češtiny volně přeložit výrazem odbočka přes GABA (Tylichová et al., 2007).

5 AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY

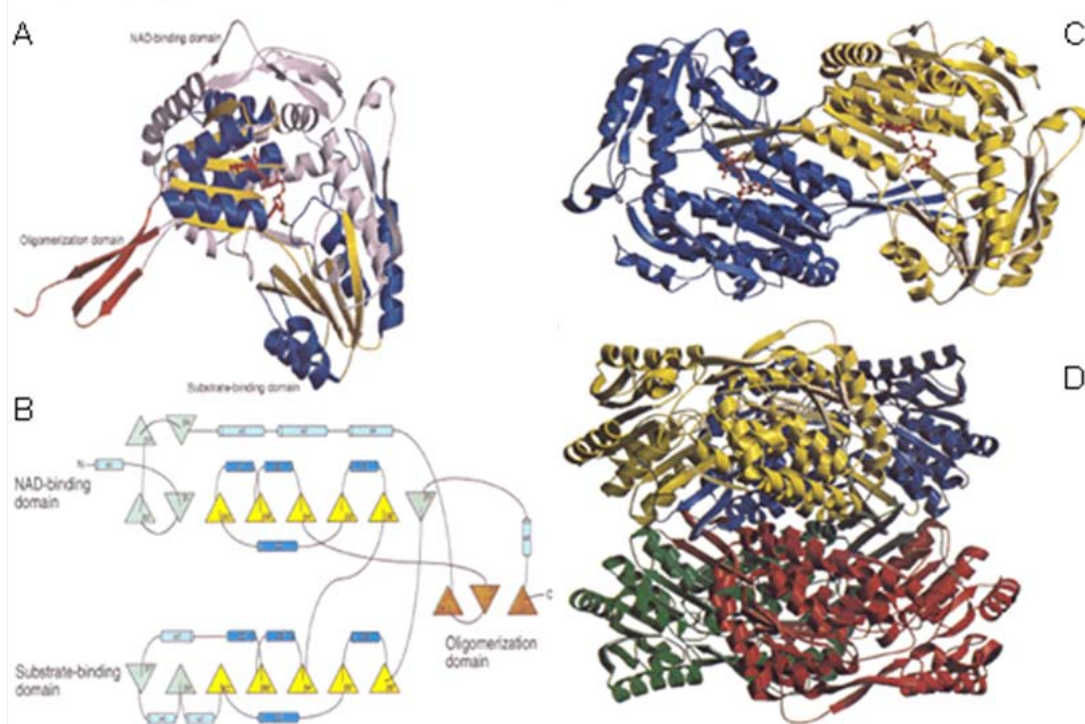
Postup purifikace AMADH se nijak významně neodlišuje od purifikačních protokolů jiných proteinů. Jeho součástí bývají rozličné chromatografické kroky zahrnující mimo jiné i iontoměničovou či gelovou permeační chromatografii. Velmi účinný nástroj k získání čistého proteinu představuje afinitní chromatografie využívající např. NAD-agarosu či AMP-Sepharosu (Tylichová et al., 2007). Roku 2008 byla publikována příprava rekombinantní P.s. AMADH 1 s polyhistidinovou značkou pomocí bakterie *Escherichia coli*. Při klonování bylo použito vektoru pET28b. Buněčná kultura byla pěstována na LB médiu (Luria-Bertani médium) s kanamycinem ($30 \mu\text{.ml}^{-1}$). Po zlyzování buněk byl enzym jedнокrokově přečištěn afinitní chromatografií, jejíž stacionární fáze obsahovala kobaltnaté ionty (Tylichová et al., 2008). Později byly podobnou metodou získány i další rekombinantní AMADH. Zde však bylo použito vektoru pCDFDuet a antibiotika streptomycinu. Jeho vnesení do buňky bakterie *Escherichia coli* je sice složitější, ale poskytuje lepší výsledky při expresi příslušného genu (Tylichová, 2010).

5.1 Struktura

Tab. 2: N-terminální sekvence některých AMADH a BADH, AMADH z hrachu v prvním řádku tabulky představuje homogenní P.s. AMADH získanou izolací ze semenáčku, jedná se o směs obou izoenzymů (Šebela et al., 2000, Brauner et al., 2003).

enzym	zdroj	N-terminální sekvence
AMADH	hrách (<i>Pisum sativum</i>)	AIT-VSSRQLFIDGEWRVPIK
AMADH 1	hrách (<i>Pisum sativum</i>)	MAIT-VSSRQLFIDGEWRVPIILNKRIPIINP
AMADH 2	hrách (<i>Pisum sativum</i>)	MDIP-IPTRQLFINGDWKAPVLNKRIPVINP
BADH	špenát (<i>Spinacia oleracia</i>)	MAFP-IPARQLFIDGEWREPIKKNRIPVINP
BADH	cukrová řepa (<i>Beta vulgaris</i>)	MSMP-IPSRQLFIDGEWREPIKKNRIPPIINP
BADH	ječmen (<i>Hordeum vulgare</i>)	MVAPAKIPQRQLFIDGEWRAPALAGRRLPVINP
BADH	laskavec (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)	MAIR-VPSRQLFIDGEWREPIKKNRIPPIINP

Klíčové aminokyseliny aktivního místa enzymu jsou zachovány u všech ALDH (Tylichová et al., 2007). Homogenní PsAMADH, jak byla před objevem existence izoenzymů nazývána jejich směs získaná purifikací z hrachových semenáčků (toto označení je využíváno i níže v této práci), vykazuje ve své N-terminální sekvenci získané Edmanovou degradací vysoký stupeň homologie s rostlinnými BADH. Například s BADH z listů laskavce se shoduje v 85 % N-terminálních aminokyselin, zatímco s BADH ze špenátu či cukrové řepy v 70 %. BADH z tresčích jater jako zástupce enzymu obratlovců vykazuje shodu jen ve 20 % N-terminálních aminokyselin (Šebela et al., 2000). O tři roky později byly publikovány sekvence obou izoenzymů (PsAMADH1 a 2) získané na základě příslušných cDNA, které se podařilo amplifikovat vhodným určením primerů pro polymerasovou řetězovou reakci. Při porovnání těchto sekvencí je patrná shoda částečné sekvence určené Edmanovou degradací se sekvencí PsAMADH1 i vysoká míra homologie obou isoenzymů (Tab. 2) (Brauner et al., 2003).



Obr. 14: Struktura ALDH (BADH z tresky). A) podjednotka, B) schematické rozkreslení sekundárních struktur tří domén podjednotky, C) uspořádání dimerního proteinu, D) uspořádání tetrametru (Johansson et al., 1998)

AMADH jsou obvykle tetramerní proteiny, ovšem vyskytují se i dimerní či monomerní enzymy. Hmotnost podjednotky se obvykle pohybuje mezi 50 a 75 kDa (Tab. 3). Každá podjednotka obsahuje tři důležité domény, katalytickou doménu, oligomerizační doménu a doménu vytvářející kapsu, do níž je vázán koenzym (Obr. 14). Z hlediska izoelektrického bodu, jehož hodnota se obvykle nachází mezi 5 a 6,

jsou AMADH kyselými proteiny (Johansson et al., 1998, Tylichová et al., 2007). Příkladem monomerní AMADH je enzym z ova, jehož molekulová hmotnost je 55 kDa (Livingstone et al., 2002).

Tab. 3: Molekulové vlastnosti vybraných enzymů (Brauner et al., 2003, Kyruys et al., 1989, Livingstone et al., 2002).

¹ Zatímco obě nativní PsAMADH jsou tetramerní, rekombinantní enzymy jsou dimerní.

² V případě laskavce se za sucha vytváří heterodimerní enzym s jednou podjednotkou se zvýšenou molekulovou hmotností (Tylichová et al., 2007).

enzym	zdroj	Molekulová hmotnost (kDa)	
		nativní enzym	podjednotka
AMADH 1	hrách (<i>Pisum sativum</i>)	230 ¹	56
AMADH 2	hrách (<i>Pisum sativum</i>)	230 ¹	56
AMADH	oves (<i>Avena sativa</i>)	55	55
ABALDH	lidská játra	219	54
ABALDH	potkan (<i>Rattus norvegicus</i>)	112	52
ABALDH	<i>Escherichia coli</i>	195	95
ABALDH	<i>Pseudomonas</i>	228	75
ABALDH	<i>Arthrobacter</i>	201	51
APALDH	<i>Pseudomonas</i>	226	74
APALDH	<i>Arthrobacter</i>	205	52
BADH	laskavec (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)	125	63 (70) ²
BADH	oves (<i>Avena sativa</i>)	120	61
BADH	špenát (<i>Spinacia oleracia</i>)	120	60
BADH	lidská játra	230	54
BADH	<i>Bacillus subtilis</i>	125	54
BADH	<i>Escherichia coli</i>	232	55

Podjednotky jsou spojeny do dimerů díky vodíkové vazbě tvořené mezi posledními prvky oligomerizační domény jedné podjednotky a katalytické domény druhé podjednotky. Tetramer se vytváří spojením dimerů zády k sobě naproti pozicím, v nichž dochází k vazbě koenzymu (Obr. 14) (Johansson et al., 1998, Tylichová et al., 2007).

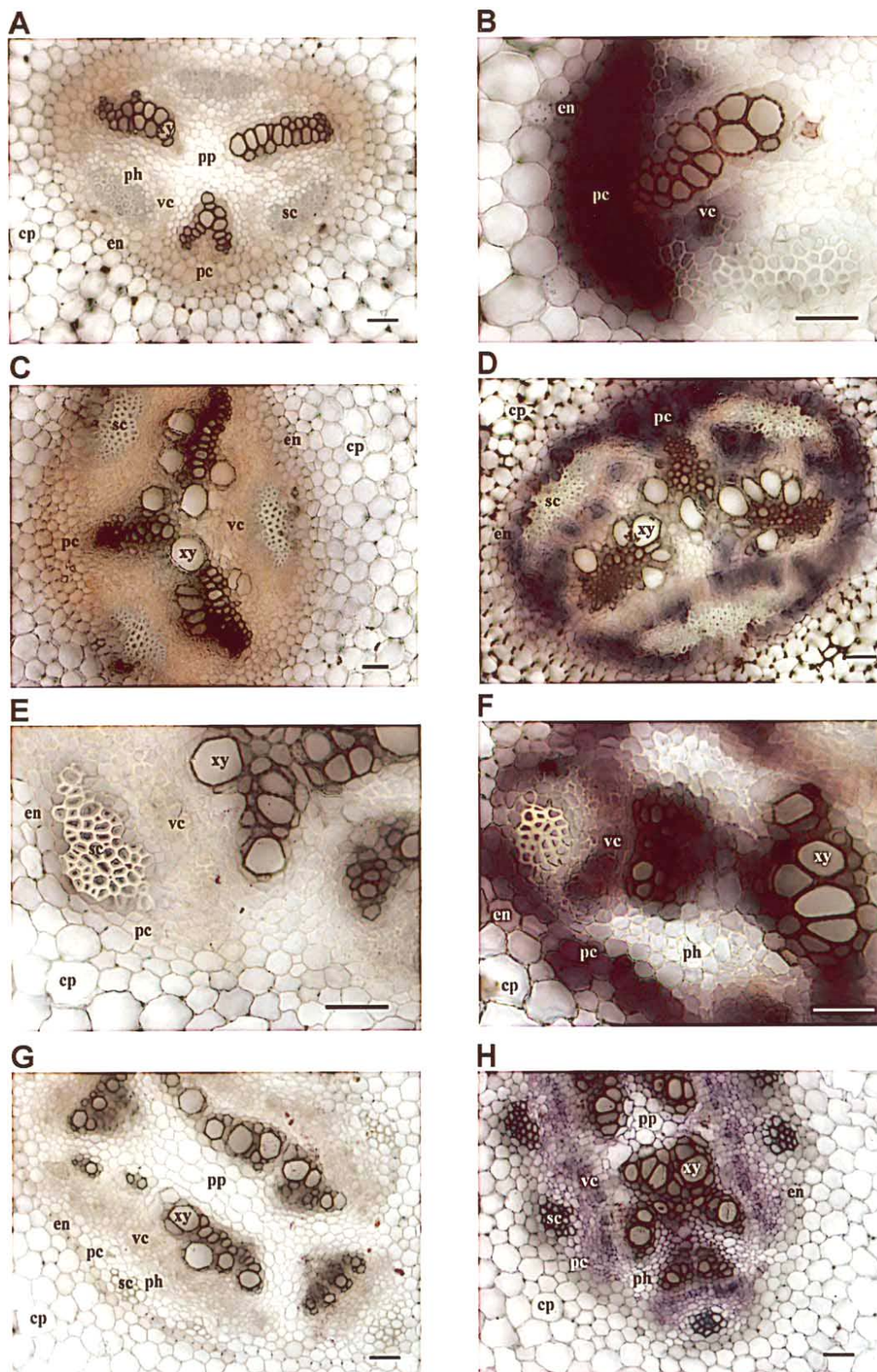
Mezi podjednotkami vede k aktivnímu místu cca 15 Å dlouhá pasáž nálevkovitého tvaru, která je částečně hydrofobní. Přesto však obsahuje řadu hydrofilních residuí včetně ve vysoké míře zachovaného Asn, který interaguje s kyslíkem substrátu, či Ser/Thr v těsné blízkosti katalytického Cys. Ve vzdálenosti 27 aminokyselin před katalytickým Cys se nachází vysoce konzervovaný dekapeptid VS/TLELGGKSP, který je však v některých případech, mezi něž náleží např. BADH *Pseudomonas aeruginosa*, pozměněn nejen záměnou Thr za Ser, ale i záměnou dalších aminokyselin (Tab. 4). Díky pevné vazbě, která se mezi podjednotkami vytváří, nedochází ke konformačním změnám při vazbě či uvolňování koenzymu, což bylo shrnuto v citovaném přehledném článku (Tylichová et al., 2007).

Tab. 4: Sekvence části katalytického místa vybraných AMADH a BADH s vysoce konzervovaným dekapeptidem VS/TLELGGKSP (zeleně) a katalytickým Cys (červeně). U BADH z bakterie *P. aeruginosa* je červeně vyznačena odchylka v sekvenci vysoce konzervovaného dekapeptidu (Tylichová et al., 2007, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html> - duben 2010).

enzym	zdroj	katalytické místo (region Glu-Cys)
AMADH 1	hrách (<i>Pisum sativum</i>)	VKP VSLELGGKSP I V V F E D V D - L D K V A E W T G F G C F F T N G Q I C S A T S R L
AMADH 2	hrách (<i>Pisum sativum</i>)	VKP VSLELGGKSP L V V F E D V D - L D K A A E W A I F G C F W T N G Q I C S A T S R L
AMADH 1	rajče (<i>Solanum lycopersicum</i>)	VKP VSLELGGKSP I V V F D D I D N L D I A A E W T L F G I F A N T G Q V C S A T S R L
AMADH 2	rajče (<i>Solanum lycopersicum</i>)	VKP VSLELGGKSP I V V F D D I H N L D T A V E W T L F G C F W T N G Q I C S A T S R L
BADH	špenát (<i>Spinacia oleracia</i>)	VKP VTLELGGKSP I V V F E D V D - L D K V V E W A I F G C F W T N G Q I C S A T S R L
BADH 1	rýže (<i>Oryza sativa</i>)	VKP VSLELGGKSP L I V F D D V D - I D K A V E W A M F G C F A N A G Q V C S A T S R L
BADH 2	rýže (<i>Oryza sativa</i>)	VKP VSLELGGKSP I V V F D D V D - V E K A V E W T L F G C F W T N G Q I C S A T S R L
BADH	treska (<i>Gadus callarias</i>)	VKH VTLELGGKSP L L I F K D C E - L E N A V R G A L M A N F L T Q G Q V C T N G T R V
BADH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LKE VTMELGGKSP L I I F P D A D - L D R A A D I A V M A N F F S S G Q V C T N G T R V

5.2 Lokalizace

V prvních zprávách o existenci AMADH bylo demonstrováno pravděpodobné spojení s protoplastem (Flores & Filner, 1985). Pozdějším výzkumem pomocí anti-AMADH protilátek, které byly značeny koloidním zlatem, bylo prokázáno, že se jedná o intracelulární proteiny s nejpravděpodobnějším výskytem v cytoplazmě, což bylo publikováno až v přehledném článku jako výsledek práce v laboratoři autorů (Tylichová et al, 2007).



Obr. 15: Lokalizace aktivity AMADH v hrachových semenáčcích redukcí nitroblue tetrazolia koenzymem NADH. Levý sloupec kontrola bez substrátu, pravý sloupec vzorek se substrátem; A),B) kořen, C),D) hypokotyl, E),F) epikotyl, G),H) vrcholek výhonku (Šebela et al., 2001a)

Histochemickou lokalizací pomocí redukce nitrobluetetrazolia vznikajícím NADH byla v sedmidenních hrachových semenáčcích prokázána aktivita v meristemické oblasti celého semenáčku. V centrálním válci kořenové části byla největší aktivita pozorována u xylémových a protoxylémových buněk. Nejrychleji probíhala redukce NADH v hypokotylu, kde bylo nejvýraznější zbarvení pozorováno u pericyklu, kambia a endodermis, zatímco nezbarveny zůstaly buňky parenchymatické, sklerenchymatické a epidermální. Nejintenzivnější zbarvení v epikotylu bylo pozorováno ve vaskulárním kambiu. Ve vzrostném vrcholku byla aktivita výrazně nižší, zbarvení bylo pozorováno v buňkách pericyklu a endodermis (Obr. 15) (Šebela et al., 2001a).

5.3 Aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu

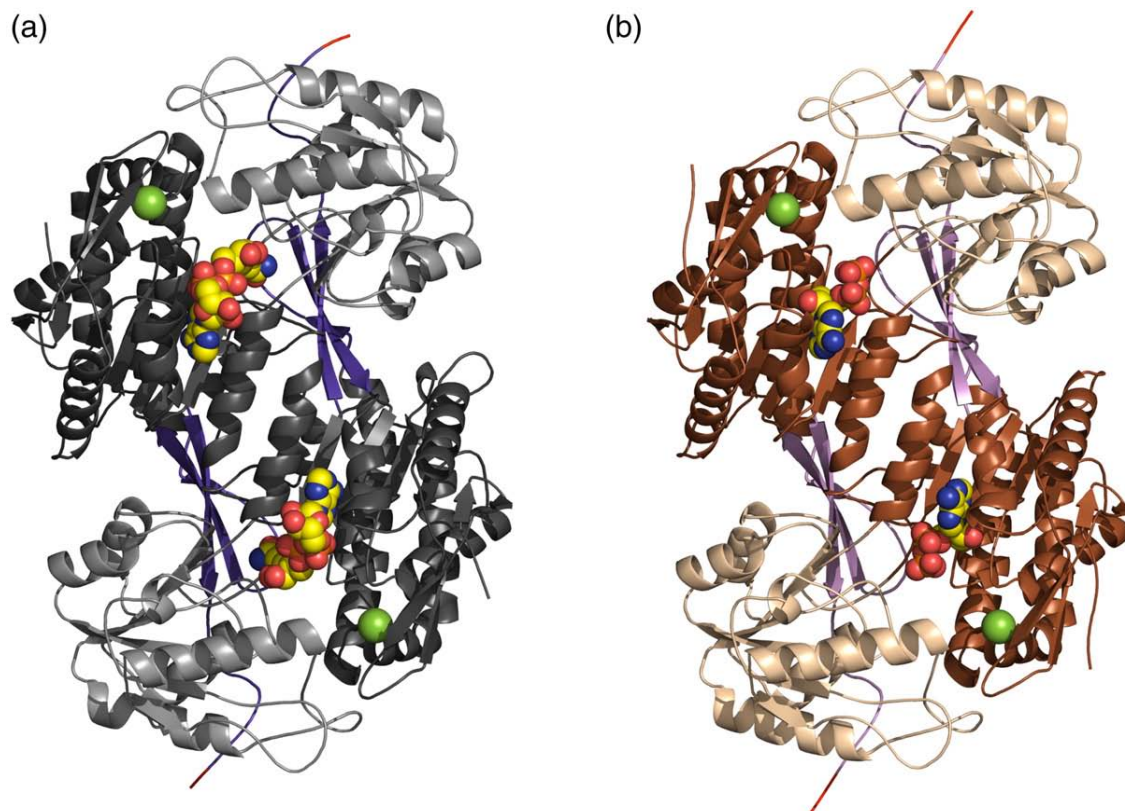
Nejlépe prozkoumanými AMADH jsou enzymy purifikované z hrachu setého (*Pisum sativum*), označované jako PsAMADH1 a 2. Oba izoenzymy obsahují 503 aminokyselin, z nichž 81 % se u obou izoenzymů shoduje a 92 % aminokyselin vykazuje podobnost (Brauner et al., 2003). První zmínka o možné existenci více izoenzymů byla publikována roku 2001, kdy při izoelektrické fokusaci za nedenaturujících podmínek byly krom hlavní izoformy ($pI = 5,44$) získány další dvě izoformy ($pI = 5,39$ a $5,26$). O dva roky později byla potvrzena existence isoenzymů s uvedením jejich primární struktury (Brauner et al., 2003, Šebela et al., 2001a).

Na konci 20. století, tedy v době, kdy ještě nebyla známa existence dvou hrachových izoenzymů, byla publikována studie vlastností homogenní PsAMADH (šlo vlastně o PsAMADH1). Pomocí SDS-PAGE byla stanovena její molekulová hmotnost na 57 kDa, zatímco při gelové permeační chromatografii za nedenaturujících podmínek byla určena hodnota 230 kDa, což naznačovalo tetramerní uspořádání v nativním stavu (Šebela et al., 2000a). Po určení primární struktury byla spočítána molekulová hmotnost PsAMADH 1 na 54,635 kDa a PsAMADH 2 na 54,525 kDa (Brauner et al., 2003).

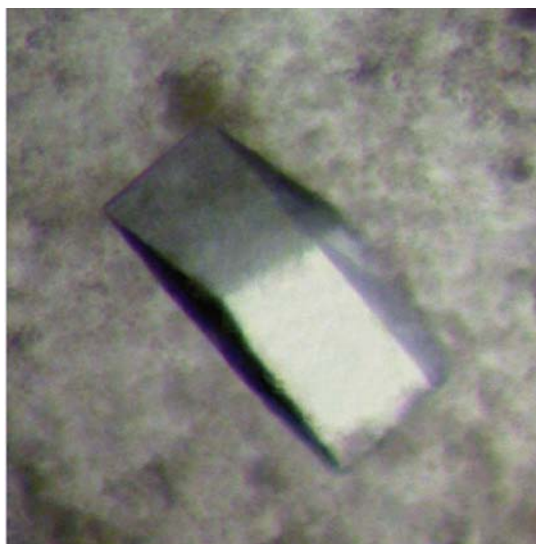
Podjednotky obou isoenzymů obsahují všechny tři domény charakteristické pro ALDH. Centrální část katalytické domény i NAD^+ vazebné domény se sestává ze čtyř α -helixů a pěti β -skládaných listů. Katalytická doména je tvořena residui 262 až 453, NAD^+ vazebnou doménu tvoří více částí řetězce, konkrétně residua 1 až 131, 152 až 261 a 453 až 479. Oligomerizační doména, která je tvořena residui 132 až 151 a 480 až 530, zahrnuje dva dlouhé β -skládané listy a jeden krátký β -řetězec. Způsob spojení dvou podjednotek do jednoho dimeru je obdobný tvorbě dimerů ostatních ALDH (Obr. 16) (Tylichová et al., 2010).

Izozym PsAMADH1 byl prvním, který byl krystalován. Vytváří jednodlonné krystaly prostorové grupy $P2_1$ s parametry elementární buňky $a = 86,4 \text{ \AA}$, $b = 216,6 \text{ \AA}$, c

= 205, 4 Å a $\beta = 98,1^\circ$ (Obr. 17) (Tylichová et al., 2008). Později byl krystalován i isoenzym PsAMADH2. Asymetrická jednotka krystalu PsAMADH1 obsahuje 6 velmi podobných dimerů, zatímco asymetrická jednotka PsAMADH2 jen jeden dimer. To vede k názoru, že aktivní forma enzymu v roztoku je dimerní ve shodě s odhady molekulové hmotnosti z gelové chromatografie obou enzymů. Oba homodimery jsou si navzájem velmi podobné, průměrná hodnota střední kvadratické odchylky v případě atomů C α dosahuje hodnoty 0,68 Å pro PsAMADH1 a PsAMADH 2 (Tylichová et al., 2010).



Obr. 16 Struktura PsAMADH. A) model PsAMADH 1, katalytická doména šedě, doména pro vazbu NAD $^+$ černě, oligomerizační doména modře. B) model PsAMADH 2, katalytická doména béžově, doména pro vazbu NAD $^+$ hnědě, oligomerizační doména fialově (Tylichová et al., 2010)

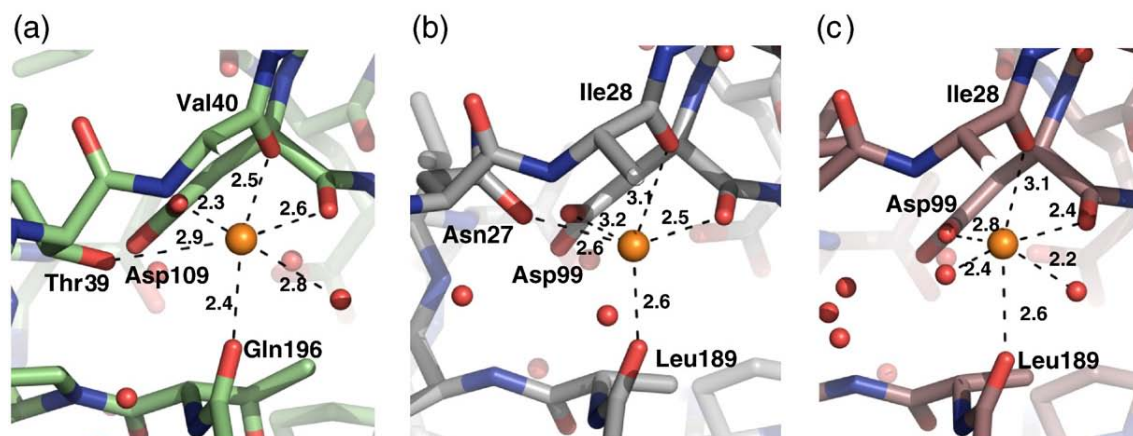


Obr. 17: Krystal PsAMADH1 (Tylichová et al., 2008)

Aktivita PsAMADH po poranění hrachového semenáčku vzrůstá, přičemž nejvyšší hodnoty dosahuje druhý den po poranění. Při stejném experimentu byla porovnávána i aktivita CAO, která však nejvyšších hodnot dosáhla až třetí den po poranění (Petřivalský et al, 2007).

5.3.1 Vazebné místo pro kation a koenzym

Role jednomocných iontů není u ALDH zcela objasněna, lze předpokládat, že přispívají ke stabilitě smyčky, která se podílí na vazbě koenzymu. U obou PsAMADH je v dutině uvnitř podjednotky nedaleko domény odpovědné za vazbu koenzymu jen jeden ion, v obou případech se jedná o Na^+ . V případě některých enzymů byla pozorována částečná ztráta aktivity po dialýze při purifikačních procesech, což může být způsobeno ztrátou Na^+ doprovázenou ztrátou strukturní integrity.



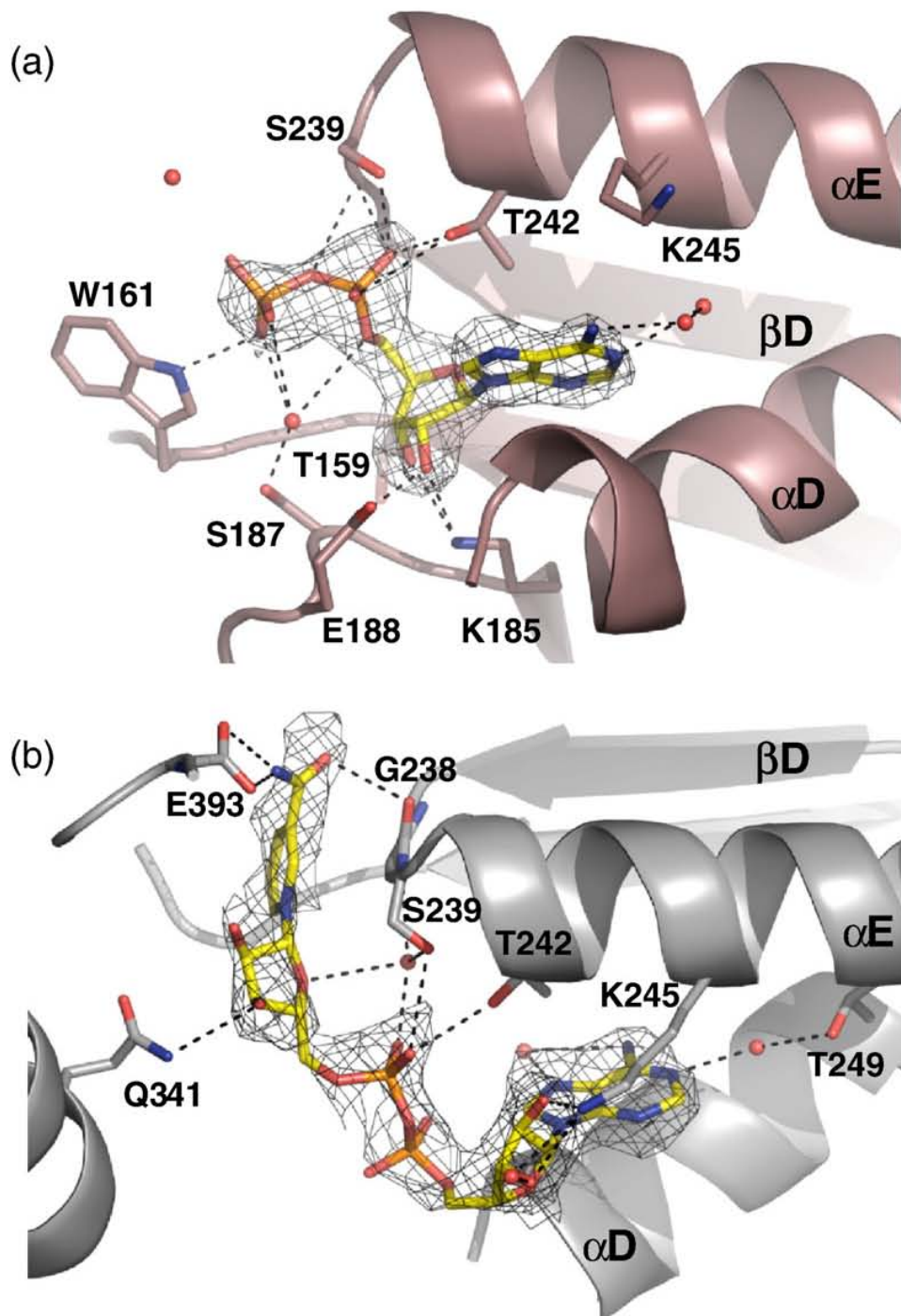
Obr. 18: Vazebné místo pro Na^+ (oranžově). A) lidská ALDH 2. B) PsAMADH1. C) PsAMADH2 (Tylichová et al., 2010).

Atomová absorpční spektrometrie použitá pro analýzu obou pro krystalizaci purifikovaných PsAMADH prokázala přítomnost 2,5 mol Na^+ na mol dimerního

proteinu, což přibližně odpovídá jednomu iontu na monomerní jednotku. Dutina, do níž se váže kation, je tvořena třemi karbonylovými skupinami náležícími k Ile28, Asp99 a Ile182. Ačkoliv u PsAMADH1, interaguje s kationem i vedlejší řetězec Asn27, nedochází u PsAMADH2 k interakci s vedlejším řetězcem aminokyselin. To je dáno skutečností, že zmíněný Asn27 je zde nahrazen Val, který pro svůj nepolární charakter interakci s iontem ztrácí (Obr. 18) (Tylichová et al., 2010).

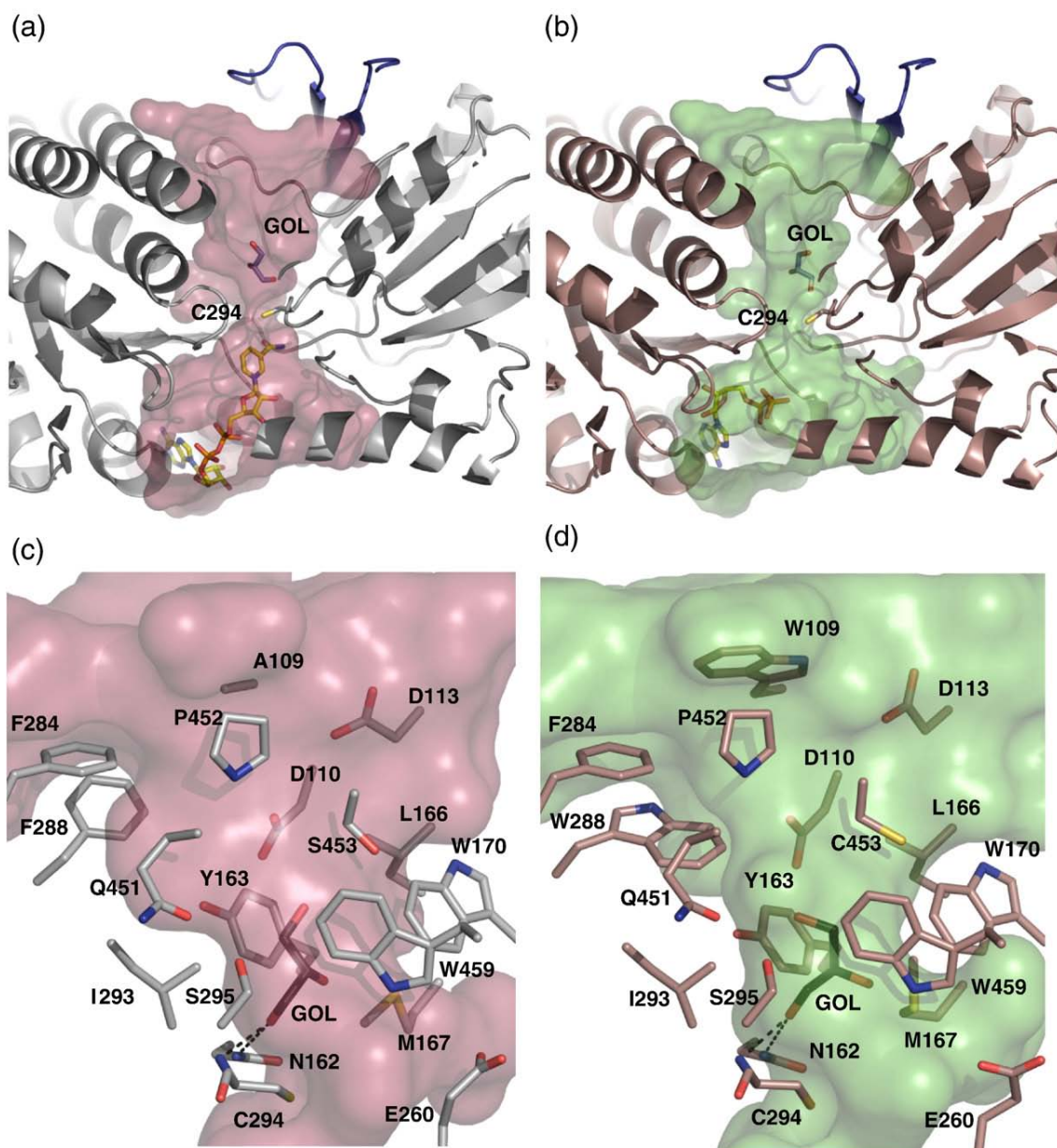
Způsob vazby koenzymu NAD⁺ je u PsAMADH2 obdobný způsobu, který byl popsán pro enzymy ALDH. Adeninová báze je vložena do kapsy mezi α -helixem D a α -heliem E obložená Gly218 a vedlejším řetězcem Thr242. U PsAMADH2 se nevyskytuje polární kontakt NAD⁺ s enzymem, který byl pozorován u enzymu izolovaného z tresčích jater či BADH izolované z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Kyslíkové atomy ribosy vytváří vazbu s vedlejším řetězcem Glu188 (atom O2B) páteřním kyslíkem Thr159 (atom O3B), přitom oba kyslíkové atomy interagují s vedlejším řetězcem Lys185. α -Fosforečnanové atomy kyslíku O1A a O2A vytváří vodíkovou vazbu s postranním kyslíkem Thr242, přičemž druhý zmíněný atom vytváří interakce i se sekundární aminoskupinou hlavního řetězce či postranním kyslíkem Ser239. Jeden kyslíkový atom β -fosforečnanu je vázán na atom NE1 postranního řetězce Trp161 (Obr. 19) (Tylichová et al, 2010).

Ačkoliv u PsAMADH1 jsou všechna residua vytvářející vazbu koenzymu s proteinem vzhledem k PsAMADH2 striktně zachována, přijímá ADP úsek koenzymu pozoruhodnou konformaci, která dosud nebyla pozorována u žádné jiné ALDH. Při srovnání s obvyklou konformací ADP je adeninová báze přetočena o 180°, díky čemuž je strana N3 až N9 vystavena rozpouštědлу. Adeninová báze se nachází mezi hlavními řetězci Gly218 a Ala223 na jedné a Thr242 a Ile246 na druhé straně. Kyslíkové atomy ribosy O2B a O3B interagují s vedlejším řetězcem Lys345. Atom O2B může navíc vytvářet vodíkový můstek s dusíkem Gln341. I když kyslíky α -fosforečnanu nevykazují polární kontakt s proteinem, vytváří se mezi kyslíky β -fosforečnanu a vedlejšími řetězci Thr242 a Ser239 vodíková vazba (Obr. 19) (Tylichová et al, 2010).



Obr. 19: Vazba koenzymu NAD⁺. A) PsAMADH1. B) PsAMADH2 (Tylichová et al., 2010)

5.3.2 Aktivní místo a vazba substrátu



Obr. 20: Dutina pro vstup substrátu do aktivního místa s vazbou glycerolu a koenzymu. A) PsAMADH1, enzym šedě, dutina růžově. B) PsAMADH2, enzym hnědě, dutina zeleně. C) Detailní pohled na aktivní místo PsAMADH1. D) Detailní pohled na aktivní místo PsAMADH2 (Tylichová et al., 2010).

Katalytický Cys294 leží mezi NAD⁺ vazebným místem a substrát vázajícím místem. Další dvě residua zapojená do katalýzy, konkrétně Asp162 a Glu260, se nachází na dně substrátového kanálu, kde vytváří aktivní místo. Aminoskupina Cys294 společně s amidem Asn12 vytváří oxyaniontovou mezeru, která vodíkovým můstkem stabilizuje thiohemiacetalový a thioesterový meziprodukt. Karboxyl vedlejšího řetězce Glu260, který je od thiolové skupiny katalytického Cys vzdálen 7 až 8 Å,

interaguje s karbonylovým kyslíkem hlavního řetězce Trp459 a dusíkem hlavního řetězce Glu470. Reakční mechanismus zahrnuje přenos protonu z molekuly vody, na čemž se podílí dvě zachovaná residua Glu260 a Glu470 a blízké residuum Lys171.

Molekula glycerolu (pocházejícího z krystalizace – kryoprotekčního roztoku) se váže na dno substrátového kanálku. Ten je u PsAMADH1 tvořen ve vstupní části aminokyselinami Ala109, Asp113, Pro452 a Ser453 a ve vnitřní části aminokyselinami Asp110, Gln162, Tyr163, Leu166, Met167, Trp170, Phe248, Phe288, Ile293, Cys294, Ser295, Gln451 a Trp459 a je přibližně 5 až 8 Å široký a hlu boký 14 Å. Substrátový kanálek PsAMADH2 se tvarem a velikostí podobá kanálku popsanému u PsAMADH1. Oba kanálky se liší jen ve třech aminokyselinách, kde je u PsAMADH2 Trp109, Trp288 a Cys243 (Obr. 20) (Tylichová et al, 2010).

5.3.3 Náhrada koenzymu, substrátová specifita a inhibice

I přes rozdíly ve způsobu vazby je afinita obou PsAMADH ke koenzymu NAD⁺ velmi podobná, hodnota K_m dosahuje 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, popř. 45,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pro PsAMADH1 resp. 2. Poměrně nedávno byla testována i odolnost enzymů vůči použití různých analogů NAD⁺ jako náhradních koenzymů. Ve srovnání s NAD⁺ dochází při použití NADP⁺ u obou izoenzymů k poklesu aktivity přibližně o 85 %. 2-Fosforečnan se střetává v případě PsAMADH1 s vedlejším řetězcem Lys245, který se však může přeskupit a vytvořit interakci s oním fosforečnanem, což vede k domněnce o malém či žádném vazebném rozdílu mezi NAD⁺ a NADP⁺. Naproti tomu u PsAMADH2 naráží 2'-fosforečnanová skupina na vedlejší řetězec Glu188, jehož přeskupení umožňující vazbu 2'-fosforečnanu není pro blízké objemné vedlejší řetězce Ile25, Ile39 a Leu217 možné. Dalšími testovanými akceptory elektronů byly 3-acetylpyridin-NAD⁺, 3-pyridinaldehyd-NAD⁺ a hypoxanthinový derivát NAD. Jako nejlepší z nich byl vyhodnocen prvně jmenovaný, při jehož použití bylo dosaženo 40 % aktivity ve srovnání s NAD⁺ (Tylichová et al., 2010).

Bylo testováno poměrně velké množství syntetických i přirozených aldehydů v koncentraci 1,0 mmol.l^{-1} a porovnány s aktivitou enzymu pro APAL. Za zmíněné koncentrace substrátu jsou daleko lépe přeměňovány lineární C3 a C4 aminoaldehydy (APAL a ABAL) než jejich methyl- či guanidinoderiváty. Rovněž přeměna hydroxyderivátů probíhá mnohem pomaleji než přeměna APAL či ABAL, ovšem stále výrazně rychleji než oxidace lineárních aldehydů s délkou řetězce mezi ethanalem a oktánalem včetně, které jsou známy jako substráty nespecifických ALDH. Z této skupiny jsou nejlepší substráty PsAMADH butanal, pentanal a hexanal, které jsou přeměňovány rychlostí odpovídající až 3 % reakční rychlosti oxidace APAL (Tab. 5). Rozvětvené n-alkyl-aldehydy jako např. 2-methylbutanal či 3-methylbut-2-enal nejsou substráty.

Tab. 5: Relativní aktivita hrachových AMADH s různými substráty (Šebela et al., 2000a, Tylichová et al, 2010)

Substrát	Nativní PsAMADH1	Rekombinantní PsAMADH1	Rekombinantní PsAMADH2
APAL	100 %	100 %	100 %
2-oxobutannitril	N.D.	108 %	99 %
3-(trimethylamino)propanal	N.D.	54 %	35 %
3-guanidinopropanal	87 %	12 %	17 %
ABAL	60 %	82 %	36 %
4-amino-2-hydroxybutanal	26 %	20 %	13 %
4-(dimethylamino)butanal	N.D.	57 %	80 %
4-(trimethylamino)butanal	N.D.	45 %	48 %
4-guanidinobutanal	48 %	24 %	30 %
4-guanidino-2-hydroxybutanal	21 %	25 %	22 %
BAL	N.D.	1,3 %	6,8 %
Ethanal	N.D.	0,3 %	0,1 %
Propanal	N.D.	1,4 %	1,8 %
Butanal	N.D.	2,6 %	2,1 %
Pentanal	N.D.	2,7 %	3,5 %
Hexanal	N.D.	2,7 %	3,8 %
Heptanal	N.D.	1,6 %	0,9 %

Je překvapivé, že BAL jakožto zástupce dvouhlíkatých aldehydů byl rovněž slabě oxidován. Naproti tomu benzaldehyd nebyl oxidován vůbec, zatímco pyridinkarbalddehydy byly slabě oxidovány (Tylichová et al., 2010). Nativní PsAMADH1 oxiduje C3 až C6 aminoaldehydy včetně jejich derivátů a některých guanidinových analog. Naproti tomu není oxidována kyselina 2-oxobutanová (sukcinylsemialdehyd) jakožto meziproduct při zapojení ABAL do citrátového cyklu. Podobně není přijat ani propanal či glutaraldehyd (Šebela et al., 2000a).

S některými přirozenými i syntetickými substráty bylo provedeno i kinetické měření, čímž došlo ke stanovení hodnot K_m a V . Není bez zajímavosti, že v případě

rekombinantní PsAMADH1 je hodnota K_m pro APAL výrazně vyšší než pro 4-(trimethylamino)butanal i pro 4-guanidinobutanal, jejichž limitní rychlosti jsou rovněž vyšší než pro APAL. Naproti tomu afinita PsAMADH2 k APAL je vyšší než k prvému uvedenému substrátu, zároveň však mírně nižší než ke 4-guanidinobutanalu. Oba substráty zde rovněž dosahují nižších hodnot V (Tylichová et al., 2010).

Nativní PsAMADH1 je velmi silně inhibována sloučeninami reagujícími s thiolovou skupinou, mezi něž patří kyselina 4-chlormerkurybenzoová či *N*-ethylmaleimid (1-ethyl-1*H*-pyrrol-2,5-dion). Slabší inhibiční efekt vykazují sloučeniny vázající kov jako 1,10-fenantrolin, 2,2'-bipyridyl, diethyldithiokarbamat sodný či 8-hydroxychinolin. Slabá inhibice byla pozorována u některých aldehydů či aminů (Šebela et al., 2000a). Velmi silně inhibují činidla reagující s Cys, popř. s karboxylovými skupinami Glu či Asp, při inkubaci enzymu s jodacetamidem dosáhne aktivita po 30 minutách 39 % a po hodině 15 % původní aktivity, zatímco v případě *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimidu poklesne aktivita na 17 %, resp. 2 % původní aktivity. Slabší inhibiční efekt vykazují specifická modifikační činidla reagující s vedlejšími řetězci Arg., Lys, Tyr. či Trp (Brauner et al., 2003).

5.3.4 Isoelektrický bod, pH a teplotní optimum a další vlastnosti

U nativní PsAMADH1 byla hodnota isoelektrického bodu stanovena na 5,4. Její pH optimum bylo stanoveno na 8,5 a teplotní optimum na 45 °C. Na rozdíl od BADH z laskavce nebyl při pH optimu u nativní PsAMADH1 pozorován pokles aktivity při použití Tris-HCl jako pufru namísto K-glycinátu či K-bicinátu, vše v koncentraci 0,15 mol.l⁻¹ (Šebela et al., 2000a). Isoelektrický bod byl pro PsAMADH1 byl na základě sekvence vypočítán na hodnotu 5,23, zatímco v případě Ps AMADH2 byla stanovena hodnota 5,29 (Brauner et al., 2003).

Pravděpodobná příčina původní domněnky o přítomnosti pouze jednoho enzymu spočívá ve velmi podobných molekulových vlastnostech, což znemožnilo jejich separaci (Brauner et al., 2003).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Biologický materiál

Bakteriální kultura *Escherichia coli* transformovaná vektorem pET28b s vloženou sekvencí (ORF) PsAMADH1 (1724 bp, GenBank přístupové číslo AJ315852) nebo vektorem pCDFDuet-1 s vloženou sekvencí PsAMADH2 (1683 bp, GenBank přístupové číslo AJ 315853), LeAMADH1 (1515 bp, GenBank přístupové číslo AY796114) či LeAMADH2 (1518 bp GenBank přístupové číslo FJ228482) byly získány od Mgr. Martiny Tylichové, Ph.D.

6.2 Použité chemikálie

- Bacterial Protein Extraction Reagent tj. B- Per (Thermo, USA)
- 3,3-diethoxypropan-1-amin (Sigma-Aldrich, USA)
- 4,4-diethoxybutan-1-amin (Sigma-Aldrich, USA)
- dichlormethan (Sigma-Aldrich, USA)
- 2,2-dimethoxyethan-1-amin (Sigma-Aldrich, USA)
- dimethylsulfoxid tj. DMSO (Sigma-Aldrich, USA)
- DNAsa (Top-Bio, ČR)
- fenylmethylsulfonyl florid tj PMSF (Sigma-Aldrich, USA)
- hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid hořečnatý (Lachema, ČR)
- chlorid sodný (Lach-Ner, ČR)
- 4-chloro-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (Sigma-Aldrich, USA)
- 6-chlor-9*H*-purin (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-chlorpyrimidin (Sigma-Aldrich, USA)
- chromatografický sorbent IDA-Sepharose (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- imidazol (značka Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- isopropyl -D-1-thiogalaktopyranosid tj IPTG (Fermentas, Litva)
- kanamycin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- kyselina chlorovodíková, koncentrovaná (Lach-Ner, ČR)
- Luria-Bertani medium tj LB-medium (Roth, Německo)
- lysozym (značka Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- 2-merkapt ethanol (značka Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- β-nikotinamidadeninukletotid tj NAD⁺ (Sigma-Aldrich, USA)
- β-nikotinamidadeninukletotidfosfát tj NADP⁺ (Sigma-Aldrich, USA)
- oxalylchlorid (Sigma-Aldrich, USA)

- 3-pyridin-2-ylpropanol (Sigma-Aldrich, USA)
- 3-pyridin-3-ylpropanol (Sigma-Aldrich, USA)
- 3-pyridin-4-ylpropanol (Sigma-Aldrich, USA)
- RNAsa (Fermentas, Litva)
- souprava pro stanovení obsahu proteinů metodou kyseliny bicinchinonové (Sigma-Aldrich, USA)
- streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- triethylamin (Sigma-Aldrich, USA)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan tj. Tris (MP Biomedicals, USA)

6.3 Použité přístroje

- analytické váhy (Sartorius, SRN)
- autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, SRN)
- centrifuga 6K15 (Sigma, SRN)
- centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie)
- digitální pH metr (Multical WTW, SRN)
- digitální předvážky (KERN, SRN)
- elektromagnetická míchačka (IKA, SRN)
- chromatograf nízkotlaký s pumpou P-1, řídicí jednotkou UV-1, dvoukanálovým zapisovačem REC-112 a sběračem frakcí Frac-920 (Amersham Biosciences, Švédsko)
- laminární box (Schoeller, ČR)
- míchačka magnetická (IKA, SRN)
- NMR spektroskop Varian Unity*Plus* (299.89 MHz)
- pipety 5000, 1000, 200, 100, 20, 10 μ l (Eppendorf, SRN)
- ponorný spirálový chladič FT 902 (JULABO GmbH, SRN)
- spektrofotometr Beckman DU 7500 (Beckman Coulter, USA)
- termostat BBD (Grant, UK)
- UHPLC-MS systém sestávající se z UHPLC chromatografu Acela s UV/VIS detektorem diodového pole a trojitě kvadrupólového hmotnostního spektrometru Quantum Access (vše Thermo Scientific, USA)
- ultrafiltrační zařízení Amicon (Millipore, USA)
- vodní lázeň SUB6 (Grant, UK)
- vortex (Stuart, UK)

6.4 Produkce enzymu

Do sterilní Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml bylo nalito 20 ml autoklávovaného Luria/Bertani média (LB médium) o koncentraci 25 g.l⁻¹. K médiu byl

přidán 1 ml sterilního roztoku 20 % glukosy a antibiotikum. Pro PsAMADH1 bylo použito kanamycinu o výsledné koncentraci $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro PsAMADH2 a obě AMADH z rajčete (LeAMADH1 a 2; zkratka odvozena z *Lycopersicon esculentum*) byl využit streptomycin o výsledné koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ze zásobní mikrozkušavky obsahující geneticky modifikované bakterie *Escherichia coli* bylo do kultury napipetováno 5 μl suspenze. Hrdlo Erlenmayerovy baňky bylo zakryto alobalem. Kultura byla přes noc inkubována při 37 °C za mírného třepání na inkubační třepačce. Až do zakrytí Erlenmayerovy baňky se pracovalo v laminárním boxu. V případě PsAMADH1 byl při transformaci do bakterie vnesen expresní vektor pET28, zatímco v případě ostatních enzymů bylo použito vektoru pCDF Duet.

Druhý den byla kultura přelita do sterilní plastové centrifugační zkumavky o objemu 50 ml (dále jen „falkonka“) a 5 minut centrifugována při 4 °C a 4000 g. Supernatant byl vylit a k sedimentu bakterií bylo přidáno 10 ml LB média o koncentraci 25 g.l⁻¹ s příslušným antibiotikem (viz předchozí odstavec). Protřepáním na vibrační třepačce byl sediment bakterií převeden do suspenze, která poté byla přelita do Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml se 190 ml LB média stejné koncentrace s příslušným antibiotikem. Hrdlo baňky bylo zakryto alobalem a kultura byla inkubována 1 až 2 hodiny při 30 °C za mírného třepání. Průběh inkubace byl kontrolován měřením absorbance při vlnové délce 600 nm. Jakmile se absorbance ocitla mezi hodnotami 0,5 a 0,6, byla indukována exprese přidáním 200 μl isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG). Baňky byly překryty alobalem a kultura inkubována přes noc při 20 °C za mírného třepání. Veškerá manipulace s kulturou probíhala v laminárním boxu.

Další den byla kultura přelita do plastových kyvet o objemu 0,35 l a v nich 20 min centrifugována při 4 °C a 4000 g. Supernatant byl odstraněn, k sedimentu bylo přidáno 40 ml 0,9 % NaCl a po krátkém protřepání na vibrační třepačce byla směs přelita do „falkonek“, ve kterých byla 10 min centrifugována při 4 °C a 4000 g. Supernatant byl odstraněn a sediment bakterií byl zamražen a uchován pro pozdější extrakci proteinu, nebo ihned dále zpracován při extrakci enzymu, jak je popsáno v následujícím odstavci.

Do „falkonky“ s rozmraženým sedimentem buněčné kultury transformovaných bakterií *E.coli* bylo přidáno 1,25 ml pufru (0,4 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 8), 250 μl 0,4 mol.l⁻¹ MgCl₂, 150 μl inhibitoru proteas (50 mmol.l⁻¹ fenylmethylsulfonylfluorid rozpuštěný v ethanolu) a 850 μl deionizované vody. Po krátkém protřepání na vibrační třepačce bylo přidáno 2,5 ml extrakčního činidla B-PER (Bacterial Protein Extraction Reagent) a po dalším protřepání směs volně ponechána při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 0,3 ml lysozymu o koncentraci 50 mg/ml. Směs byla inkubována při laboratorní

teplotě až do zgelovatění (cca 45 až 60 min) a poté bylo přidáno 5 ml vody. Po protřepání bylo přidáno 20 μ l RNasy o koncentraci 10 μ g/ml a 10 μ l DNasy o specifické aktivitě 10 IU/ μ l, směs byla promíchána pětinasobným převrácením uzavřené falkonky a 30 min inkubována při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 1,25 ml 1 mol.l⁻¹ NaCl a 1,37 50 % glycerolu a směs byla přenesena do Nalgene kyvet a 30 min centrifugována při 10 °C a 12000 g. Ze supernatantu byl afinitní chromatografií získán enzym.

Pro přečištění afinitní chromatografií byla použita kolona naplněná Co(II)-IDA-Sepharosou (2,5 x 10 cm) ekvilibrována 20 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pufrém o pH 8,0 obsahujícím 0,1 mol.l⁻¹ NaCl, 10 mmol.l⁻¹ imidazol a 5 % (v/v) glycerol. Po nanesení supernatantu a vymytí nezachycených proteinů byl enzym eluován stejným pufrém se zvýšenou koncentrací imidazolu (0,25 mol.l⁻¹). Průtok při ekvilibraci, nanášení a promývání o hodnotě 1 až 1,5 ml.min⁻¹ byl pro eluci zvýšen na 1,5 až 2 ml.min⁻¹.

Eluát byl zahuštěn ultrafiltrací v komůrce Amicon 8200 v ledové lázni pod tlakem dusíku 1 bar. Po snížení objemu na 3 až 5 ml bylo ke směsi přidáno 50 ml pufru (20 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0 s 3 % glycerolem). Tento krok byl opakován, čímž bylo dosaženo odsolení vzorku. Získaný enzym byl rozpipetován na alikvoty do sterilních mikrozkušavek a zmrazen (Tylichová et al., 2008).

Koncentrace proteinu v roztoku byla stanovena spektrofotometrickou metodou s kyselinou bicinchinovou, která je založena na alkalické redukci Cu²⁺ na Cu¹⁺ proteinem a následné chelataci Cu¹⁺ kyselinou bicinchinovou za vzniku fialového zbarvení. Byla použita souprava od firmy Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, sestávající se z činidla A (vodný roztok 4,4'-dikarboxy-2,2'-bichinolinanu disodného, c = 26 mmol.l⁻¹; Na₂CO₃.H₂O, c = 160 mmol.l⁻¹; vinanu sodno-draselného, c = 700 mmol.l⁻¹; NaOH, c = 100 mmol.l⁻¹; NaHCO₃, c = 110 mmol.l⁻¹) a činidla B (vodný roztok CuSO₄, c = 16 mmol.l⁻¹). Pro přípravu pracovního roztoku bylo činidlo A bylo smíseno s činidlem B v poměru 50:1. Získaný roztok byl po 2 ml rozpipetován do zkumavek. K němu bylo přidáno 0,5 až 10 μ l vzorku nebo roztoku hovězího sérového albuminu pro kalibrační křivku v rozsahu 1 až 50 mg.l⁻¹. Zkumavky se vzorkem či standardem byly promíchány krátkým protřepáním. Po 30 min inkubace při 37 °C byla u jednotlivých vzorků měřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Jako slepý vzorek pro vynulování přístroje byl použit pracovní roztok (Smith et al., 1985).

6.5 Příprava substrátů

Potenciální syntetické substráty byly získány Swernovou oxidací nebo nukleofilní substitucí za vzniku příslušného acetalu, popř. byly zakoupeny. Diacetyly byly těsně před měřením hydrolyzovány.

První kroky Swernovy oxidace probíhaly při teplotě -55 až -65 °C, která byla zajištěna ponořením trojhrdlé baňky s reakční směsí do tepelně izolované kádinky s ethanolem a magnetickým míchadlem, do níž byla vložena spirála ponorného chladiče FT 902 nastaveného na teplotu -70 °C. Do zmíněné trojhrdlé baňky obsahující magnetické míchadlo, 11 mmol (1 ml) oxalylchloridu a 25 ml dichlormethanu byl prostředním hrdlem vložen teploměr. Na její boční hrdla byly nasazeny dělicí nálevky zakončené sušícími trubičkami s hygroskopickým CaCl₂, z nichž první obsahovala 22 mmol (1,7 ml) DMSO a 5 ml dichlormethanu a druhá 10 mmol příslušného alkoholu a 10 ml dichlormethanu. Směs z první dělicí nálevky byla za stálého míchání po kapkách vpouštěna do baňky takovou rychlostí, aby teplota reakční směsi v baňce nevystoupila nad -55 °C. Po 10 minutách od přidání celého obsahu první dělicí nálevky byl do reakční směsi stejným způsobem přidán obsah druhé dělicí nálevky a reakční směs ponechána čtvrt hodiny v lázni chladiče. Mezitím bylo do již uvolněné dělicí nálevky napipetováno 50 mmol (7 ml) triethylaminu, který byl poté obdobně přidán do reakční směsi. Po pěti minutách byla reakční směs vytažena z chladicí lázně a zahřána na laboratorní teplotu a poté k ní bylo přidáno 30 ml vody a směs byla extrahována. Vodná fáze byla ještě jednou extrahována 20 ml dichlormethanu. Obě organické fáze byly spojeny dohromady a vysušeny síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Dichlormethan byl následně odstraněn odpařením na vakuové rotační odparce (Omura & Swern, 1978).

Při nukleofilní substituci bylo v závislosti na syntetizované látce 1,49 mmol 6-chlor-9*H*-purinu, 1 mmol 2-chlorpyrimidinu nebo 0,75 mmol 4-chloro-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]-pyrimidinu rozpuštěno v 5 ml ethanolu nebo 3 ml *n*-butanolu. Ke směsi bylo přidáno dvojnásobné látkové množství 2,2-dimethoxyethanaminu, 3,3-diethoxypropanaminu či 4,4-diethoxybutanaminu podle požadované délky alifatického řetězce. Směs byla refluxována, což v případě rozpuštění reaktantů v *n*-butanolu trvalo 1 až 4 hodiny a u reaktantů rozpuštěných v ethanolu 9 hodin až 6 dní. Směs byla následně odpařena do sucha. V případě, že výchozí sloučeninou byl 6-chlor-9*H*-purin, bylo přidáno 10 ml ledově vychlazené vody, vzniklý precipitát oddělen odsátím, promyt ledově vychlazenou vodou a vysušen. V případě zbývajících dvou výchozích sloučenin byla směs přečištěna sloupcovou chromatografií (DAVISIL LC60A 40-60µm), mobilní fáze se skládala z toluenu, acetonitrilu a methanol v poměru 5:2:1.

Získané aldehydy byly analyzovány pomocí LC/MS a dále pomocí ¹H- a ¹³C-NMR spektroskopie. LC/MS analýza byla provedena na systému sestávajícím se z UHPLC chromatografu Accela s detektorem diodového pole a hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem jako analyzátozem TSQ Quantum Access (oboje Thermo Scientific, CA. USA). Byla použita kolona Nucleodur Gravity C18 (1,8

μm , 2,1 mm, 50 mm, Macherey-Nagel, SRN). Mobilní fáze byla získána mísením roztoku A (10 mmol.l^{-1} octan amonný ve vodě) a B (acetonitril). Separace probíhala při $30 \text{ }^\circ\text{C}$, obsah složky B se po dobu 2,5 min lineárně zvyšoval z 10 % na 80 %, na které byl 1,5 min ponechán. Kolona byla následně ekvilibrována 1 min 10 % obsahem složky B. Pro získání NMR spekter bylo použito přístroje Varian UnityPlus (299,89 MHz). Spektra byla získána ze směsi s deuterovaným DMSO nebo chloroformem při $21 \text{ }^\circ\text{C}$.

APAL, ABAL i látky, které byly připraveny nukleofilní substitucí ve formě diacetalů, byly v den měření převedeny na příslušné aldehydy kyselou hydrolyzou. Roztok diacetalu o koncentraci $0,10 \text{ mol.l}^{-1}$ v HCl o koncentraci $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ byl v mikrozkuhavce o objemu 1,5 či 2 ml vložen do blokového termostatu BBD nastaveném na teplotu $100 \text{ }^\circ\text{C}$, kde byl na 10 minut ponechán. Následně byl získaný aldehyd o koncentraci $0,10 \text{ mol.l}^{-1}$ vyjmut, ochlazen na laboratorní teplotu a v průběhu měření uchováván v ledové lázni.

6.6 Měření aktivity a kinetických parametrů

K měření aktivity i kinetickým měřením byl použit Warbugův optický test, založený na detekci vzniku redukovaného koenzymu NADH při vlnové délce 340 nm ($\epsilon = 6200 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Awal et al., 1997). Měření probíhalo na UV/Vis spektrofotometru Beckman DU7500 (Beckmann Coulter Inc., Brea, USA) při laboratorní teplotě ($23 \text{ }^\circ\text{C}$). Do kyvety bylo pipetováno 1550 μl pufru (Tris-HCl o koncentraci $0,15 \text{ mol.l}^{-1}$ a pH 9,0), 50 μl $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$ NAD^+ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, kat. č. N7004), roztok enzymu, jehož objem byl určen na základě aktivity enzymu, a voda. Po vynulování přístroje na slepý vzorek byla reakce nastartována přidávkem roztoku substrátu. Celkový objem reakční směsi po přidávku substrátu činil 2 ml, objem substrátu se řídil požadovanou koncentrací v reakční směsi na počátku reakce, objem vody byl dopočítán tak, že součet pipetovaných objemů roztoku enzymu, substrátu a vody byl 400 μl . Počáteční koncentrace NAD^+ byla $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, počáteční koncentrace substrátu byla při určování relativní aktivity $1,0 \text{ mmol.l}^{-1}$, při stanovení kinetických parametrů byla použita koncentrační řada, která se obvykle pohybovala v rozmezí od $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ do $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, koncentrace zásobního roztoku substrátu byla při měření relativní aktivity 100 mmol.l^{-1} a při stanovení kinetických parametrů obvykle 10 mmol.l^{-1} . Pipetovaný objem enzymu se obvykle nacházel mezi 5 a 20 μl . Měření nárůstu absorbance probíhalo po dobu 4 minut. Kyvetový prostor byl vyhříván na $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Kinetické parametry byly určeny pomocí linearizace závislosti počáteční rychlosti na koncentraci substrátu podle Lineweavera a Burka a dle Eadieho a Scatcharda. Z hodnot získaných oběma zobrazeními byl vypočítán aritmetický průměr, který byl považován za výslednou hodnotu. Inhibice substrátem byla vyhodnocena pomocí Dixonovy linearizace.

9 ZÁVĚR

V teoretické části byla vypracována rešerše odborné literatury zaměřená na degradační metabolismus polyaminů, zejména aminoxidasy, aminoaldehydy a aminoaldehyddehydrogenasy.

Bylo připraveno 12 substrátů a zakoupeno dalších 9. Ty pak byly testovány jako substráty vyprodukovaných AMADH. Všechny enzymy preferovaly jako substrát APAL. PsAMADH2 a LeAMADH1 vykazovaly širší substrátovou specifičnost než PsAMADH1 a LeAMADH2. Pro některé substráty byly stanoveny hodnoty K_m a V .

Seznam použité literatury

- Adams E. (1955) Synthesis and properties of an α -aminoaldehyde, histidinal. *J. Biol. Chem.* **217**, 317-324
- Albertshofer K., Thayumanavan R., Utsumi N., Tanaka F., Barbas C. F. Amine-catalyzed Michael reactions of an aminoaldehyde derivative to nitroolefins. *Tetrahedron Lett.* **48**, 693-696
- Anderson L., Wolfenden R. (1982) A general method of α -aminoaldehyde synthesis using alcohol dehydrogenase. *Anal. Biochem.* **124**, 150-157
- Aubry S., Pellet-Rostaing S., Fenet B., Lemaire M. (2006) Synthetic investigation of (1,3')-bistetrahydroisoquinolines: towards pentacyclic analogues of piperazine core alkaloids. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1319-1323
- Awal H. M. A., Kinshita T., Yoshida I., Doea M., Hirasawa E. (1997) Aminoaldehyde dehydrogenase of pea epicotyl. *Phytochemistry* **44**, 997-1000
- Binda C., Coda A., Angelini R., Federico R., Ascenzi P., Mattevi A. (1999) A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure* **7**, 265-276
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and envirometal challenges: recent development, *Plant Sci.* **140**, 103-125
- Brauner F., Šebela M., Snégaroff J., Peč P., Meunier J.-C. (2003), Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and aktive side residues, *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 1-10
- Callewae D. M., Rosemba M. S., Tchen T. T. (1974) Purification and properties of 4-aminobutanal dehydrogenase from a *Pseudomonas* species, *J. Biol. Chem.* **249**, 1737-1741
- Čičibabin A. E. (1957) Základy organickej chemie, 1. Diel, pp. 540, Slovenské vydavateľstvo technickej literatury, Bratislava, SR
- Erdei L., Szegletes Z., Barabas K., Pestenacz A. (1996) Response in polyamine titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings, *J. Plant Physiol.* **147**, 599-603.
- Flores H. E., Filner P. (1985) Polyamine catabolism in higher plants – characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Reg.* **3**, 277-291
- Frébort I., Adachi O. (1995) Copper/quinone-containing amine oxidases, an exciting class of ubiquitous enzymes. *J. Ferment Bioeng.* **80**, 625-632

- Hassan M., Okada M., Ichiyanagi T., Mori N. (2008) 4-N-Trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase: Purification and characterisation of an enzyme from *Pseudomonas* sp 13CM. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 155-162
- Ivanova S., Batliwalla F., Mocco J., Kiss S., Huang J., Mack W., Coon A., Eaton A., Al-Abed Y., Gregersen P. K., Shohami E., Connolly E. S., Tracey K. J. (2002) Neuroprotection in cerebral ischemia by neutralization of 3-aminopropanal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5579-5584
- Jakoby W. B., Frederics J. (1959) Pyrrolidine and putrescine metabolism – gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **234**, 2145-2150
- Johansson K., El-Ahmad M., Ramaswamy S., Hjelmqvist L., Jornvall H., Eklund H. (1998) Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* **7**, 2106-2117
- Jung C.-K., Krische M. J. (2006) Asymmetric Induction in Hydrogen-Mediated Reductive Aldol Additions to α -Aminoaldehydes Catalyzed by Rhodium Selective Formation of syn-Stereotriads Directed by Intramolecular Hydrogen-Bonding. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 17051-17056
- Kikonoyogo A., Pietruszko R. (1996) Aldehyde dehydrogenase from adult human brain that dehydrogenates gamma-aminobutyraldehyde: Purification, characterization, cloning and distribution. *Biochem. J.* **316**, 317-324
- Kim K.-H. (1964) Purification and properties of diamine α -ketoglutarate transaminase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **239**, 783-786
- Kuehn G.D., Rodriguez-Garay B., Bagga S., Phillips G.C. (1990) Novel occurrence of uncommon polyamines in higher plants, *Plant Physiol.* **94**, 855–857
- Kurys G., Ambroziak W., Pietruszko R. (1989) Human aldehyde dehydrogenase: purification and characterization of third isoenzyme with low K_m for γ -aminobutyraldehyde. *J. Biol. Chem.* **264**, 4715-4721
- Li W., Yuan X.-M., Ivanova S., Tracey K., Eaton J. W., Brunk U. T. (2003) 3-Aminopropanal, formed during cerebral ischemia, is a potent lysosomotropic neurotoxin. *Biochem. J.* **371**, 429-436
- Liekens S., Bronckaers A., Balzarini J. (2009) Improvement of purine and pyrimidine antimetabolite-based anticancer treatment by selective suppression of mycoplasma-encoded catabolic enzymes. *Lancet Onc.* **10**, 628-635

- Livingstone J. R., Yoshida I., Yutaka T., Hirooka K., Yamamoto Y., Tsutni N., Hirasava E. (2002) Purification and properties of aminoaldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *J.Plant Res.* **115**, 393-400
- Lukeš R. (1962) Organická chemie II, pp. 266-267, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, ČR
- Malmberg, A. (1984). N-feruloylputrescine in infected potato tubers. *Acta Chem. Scand.* **B38**, 153-155
- Mancuso A. J., Huang S.-L., Swern D. (1978) Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide "activated" by oxalyl chloride. *J. Org. Chem.* **43**, 2480-2482
- Mancuso A. J., Brownfain D. S., Swern D. (1979) Structure of the dimethyl sulfide-oxalyl chloride reaction product. Oxidation of heteroaromatic and diverse alcohols to carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* **44**, 4148-4150
- Melnyk P., Ducrot P., Thal C. (1993) Stereospecific Pictet-Spengler Rynthesis of cis (+)-(1S, 12bR)-1-Aminoindolquinolizidine from a Pure α -(S)-Aminoaldehyde Derivative. *Tetrahedron* **38**, 8589-8596
- Moskalíková H. (2009) Charakterizace aminoaldehyddehydrogenasy z rajčete jedlého (*Lycopersicon esculentum*), diplomová práce, pp. 55-57, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc, ČR
- Ng. J. S., Przybyla C. A., Liu C., Yen J. C., Muellner F. W., Weyker C. L. (1995) A Practical Synthesis of an HIV Protease Inhibitor Intermediate - Diastereoselective Epoxide Formation from Chiral α -Aminoaldehydes. *Tetrahedron* **51**, 6397-6410
- Omura K., Swern D. (1978) Oxidation of alcohols by „activated“ dimethylsulfoxide. A preparative, steric and mechanistic study. *Tetrahedron* **34**, 1651-1660
- Petřivalský M., Brauner F., Luhová L., Ganeul D., Šebela M. (2007) Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *J. Plant Physiol.* **164**, 1410-418
- Smith, T.A., Best, G.R. (1978) Distribution of the hordatines in barley. *Phytochem.* **17**, 1093-1098.
- Stefanelli, C., Bonavita, F., Stanic, I., Mignani, M., Facchini, A., Pignatti, C., Flamigni, F., Calderera, C.M., (1998) Spermine causes caspase activation in leukaemia cells. *FEBS Letters* **437**, 233-236.

- Stránská J., Šebela M., Tarkowski P., Řehulka P., Chmelík ., Popa I., Peč P. (2007) Inhibition of plant amine oxidases by a novel series of diamine derivatives. *Biochimie* **89**, 135-144
- Sunkara P.S., Rao P.N., Nishioka K., Brinkley B.R. (1979) Role of polyamines in cytokinesis of mammalian cells. *Exp. Cell Res.* **119**, 63-68
- Syrek J. R., Ivanova S., Friedman S., Scher L., Tracey K. J. (2000) 3-Amino-propanal in the pathogenesis of ischemia. *Surgical Forum Abstracts* **191**, 3-4
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., F. H. Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goetze N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000) Characterization of homogenous plant aminoaldehyde dehydrogenase *Biochim. Biophys. Acta* **1480**, 329-341
- Šebela M., Frébort I., Lemr K., Brauner F., Peč P. (2000) A study on the reactions of plant copper amine oxidase with C3 and C4 aliphatic diamines. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**, 88-99
- Šebela M., Lamplot Z., Petřivalský M., Kopečný D., Lemr K., Frébort I., Peč P. (2003) Recent news related to substrates and inhibitors of plant amine oxidases *Biochim. Biophys. Acta* **1647**, 355-360
- Šebela M., Luhová L., Brauner F., Galuszka P., Radová A., Peč P. (2001) Light microscopic localisation of aminoaldehyde dehydrogenase activity in plant tissues during nitoblue tetrazolium-based staining method *Plant Physiol. Biochem.* **39**, 831-839
- Šebela M., Radová A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001) FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researches in biochemistry and fysiology of plants *Plant Sci.* **160**, 197-207
- Šebela M., Tylichová M., Peč P. (2007) Inhibition of diamine oxidases and polyamine oxidases by dimine-based compounds. *J. Neural. Transm.* **114**, 793-798
- Tomitori H., Usui T., Saeki N., Ueda S., Kase H., Nishimura K., Kashiwagi K., Igarashi K. (2005) Polyamine Oxidase and Acrolein as Novel Biochemical Markers for Diagnosis of Cerebral Stroke. *Stroke* **36**, 2609-2613
- Tylichová M., Briozzo P., Kopečný D., Ferrero J., Moréra S., Joly N., Snéariff J., Šebela M. (2008) Purification, cystalization and preliminary crystallographic

study of a recombinant plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum*. *Acta cryst.* **F64**, 88-90

Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010) Structural and Functional Characterization of Plant Aminoaldehyde Dehydrogenase from *Pisum sativum* with a Broad Specificity for Natural and Synthetic Aminoaldehydes. *J. Mol. Biol.* **396**, 870-882

Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M. (2007) Aminoaldehyde dehydrogenases: has the time now come for new interesting discoveries? *Curr. Topics Plant Biol.* **8**, 45-70

Walters D. R. (2003) Polyamines and plant diamine. *Phytochemistry* **64**, 97-107

Wink M., Hartman T. (1979) Cadaverine-pyruvate transamination – principal step of enzymatic quinolizidine alkaloid biosynthesis in lupinus-polyphyllus cell suspension cultures. *FEBS Lett.* **101**, 343-346

Wink. M, Hartman T. (1981) Localization of the enzymes of quinolizidine alkaloids biosynthesis in *Lupinus polyphyllus* chloroplasts. *Plant Physiol.* **70**, 74-77

Wymore T., Hempel J., Cho S. S., MacKerell A. D., Nicholas H. B., Deerfield D. W. (2004) Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenase and mechanism of nucleophile activation. *Proteins* **57**, 758-771

Yorifuji T., Ishihara T., Naka T., Kondo S., Shimizu E. (1997) Purification and characterization of polyamine aminotransferase of *Arthrobacter* sp. TMP-1. *J Biochem.* **122**, 537-543

Yorifuji T., Kondo S., Naka T., Ishihara T., Shimizu E. (1997) Action of polyamine aminotransferase on norspermidine. *J. Biochem.* **122**, 544-549

Seznam použitých zkratek

2-PCAL	pyridin-2-karbaldehyd
2-PPAL	3-pyridin-2-ylpropanal
3-PCAL	pyridin-3-karbaldehyd
2-PM-AAAL	[(pyridin-2-ylmethyl)amino]ethanal (2-pyridinylmethylaminoacetaldehyd)
3-PPAL	3-pyridin-3-ylpropanal
4-PCAL	pyridin-4-karbaldehyd
4-PPAL	3-pyridin-4-ylpropanal
4-PM-AAAL	[(pyridin-4-ylmethyl)amino]ethanal (4-pyridinylmethylaminoacetaldehyd)
AGM	1-(4-aminobutyl)guanidin (agmatin)
ABAL	4-aminobutanal (4-aminobutyraldehyd)
ABALDH	aminobutyraldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.19)
ACAL	6-aminopentanal (5-aminokapronaldehyd)
APAL	3-aminopropanal (3-aminopropionaldehyd)
APALDH	aminopropionaldehyddehydrogenasa
APBAL	4-[(3-aminopropyl)amino]butanal
AVAL	5-aminopentanal (5-aminovaleraldehyd)
BALDH	betinaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.8)
CAD	pentan-1,5-diamin (kadaverin)
CAO	aminoxidasa (EC 1.4.3.21 a 1.4.3.22)
DAP	propan-1,3-diamin (1,3-diaminopropan)
DMSO	dimethylsulfoxid
FMN	flavinmononukleotid
GABA	4-aminobutanová kyselina (kyselina γ -aminomáselná)
GBAL	4-guanidinobutanal (4-guanidinobutyraldehyd)
GBALDH	guanidinobutyraldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.54)
LB médium	Luria-Bertani médium
Met-fur-BAL	3-(5-metylylfur-2-yl)butanal
Met-S-BAL	3-methylthiobutanal
Met-S-PAL	3-methylthiopropanal
O-4-PCAL	<i>N</i> -oxid pyridin-4-karbaldehydu
PAO	polyaminoxidasa (EC 1.5.3.11)
Pm-AAAL	(pyrimidin-2-ylamino)ethanal (pyrimidin-2-ylaminoacetaldehyd)
Pm-ABAL	4-(pyrimidin-2-ylamino)butanal (pyrimidin-2-ylaminobutyraldehyd)
Pm-APAL	3-(pyrimidin-2-ylamino)propanal (pyrimidin-2-ylaminoapropionaldehyd)
PsAMADH	aminoaldehyddehydrogenasa z hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>)
Pu-AAAL	(9 <i>H</i> -purin-6-ylamino)ethanal (purin-6-ylaminoacetaldehyd)

Pu-ABAL	4-(9 <i>H</i> -purin-6-ylamino)butanal (purin-6-ylaminobutyraldehyd)
Pu-APAL	3-(9 <i>H</i> -purin-6-ylamino)propanal (purin-6-ylaminopropionaldehyd)
PUT	butan-1,4-diamin (putrescin)
PyrPm-AAAL	(7 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-ylamino)ethanal (pyrrolopyrimidin-4-ylacetaldehyd)
PyrPm-ABAL	4-(7 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-ylamino)butanal (pyrrolopyrimidin-4-ylbutyraldehyd)
PyrPm-APAL	3-(7 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-ylamino)propanal (pyrrolopyrimidin-4-ylpropionaldehyd)
LeAMADH	aminoaldehyddehydrogenasa z rajčete (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
SPD	<i>N</i> -(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin (spermidin)
SPM	<i>N,N'</i> -bis-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin (spermin)

U proteinogenních aminokyselin jsou při zmínce v textu použity třípísmenné značky.

PŘÍLOHY

- 1) **Poster z konference** 8th Discussions in Structural Biology, Academic and University Center, Nové Hrady, March 18-20, 2010

(Frömmel J, Moskalíková H, Sural M, Tylichová M, Kopečný D, Šebela M (2010) Exploring the active sites of plant aminoaldehyde dehydrogenases using natural and synthetic substrates. 8th Discussions in Structural Biology, Academic and University Center, Nové Hrady, March 18-20, 2010. Poster P38 by M. Šebela. Abstract in: Materials Structure in Chemistry, Biology, Physics and Technology, Bulletin of the Czech and Slovak Crystallographic Association 2010, 17 (1a): 53.)

- 2) **Abstrakt z konference** XIVth Workshop of Biochemists and Molecular Biologists (XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů), April 20-21, 2010, Masaryk University, Brno, Czech Republic

(Frömmel J, Moskalíková H, Sural M, Tylichová M, Kopečný D, Šebela M (2010) Exploring the active sites of plant aminoaldehyde dehydrogenases using natural and synthetic substrates. XIVth Workshop of Biochemists and Molecular Biologists (XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů), April 20-21, 2010, Masaryk University, Brno, Czech Republic; lecture by M. Šebela. Abstract in: Sborník příspěvků (Book of Abstracts), Masaryk University, Brno, p. 12, ISBN 978-80-210-5164-5.)

Příloha 2 Abstrakt z konference XIVth Workshop of Biochemists and Molecular Biologists (XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů), April 20-21, 2010, Masaryk University, Brno, Czech Republic

EXPLORING THE ACTIVE SITES OF PLANT AMINOALDEHYDE DEHYDROGENASES USING NATURAL AND SYNTHETIC SUBSTRATES

Jan Frömmel¹, Hana Moskalíková¹, Miroslav Soural², Martina Tylichová¹, David Kopečný¹ and Marek Šebela¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic.

²Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, tř. 17. listopadu 1192/12, CZ-771 46 Olomouc, Czech Republic.

Aminoaldehyde dehydrogenases (AMADH, EC 1.2.1.19) catalyze the terminal step in polyamine catabolism by oxidizing compounds like 4-aminobutyraldehyde (ABAL) and 3-aminopropionaldehyde (APAL). This NAD⁺-dependent oxidative reaction produces omega-amino acids related to the processes of cellular defense against stress events caused for example by increased drought and salinity (either as direct mediators or precursors). Based on indirect evidences, the enzyme also seems to participate in the production of carnitine in plants. AMADHs belong to the large enzyme superfamily of aldehyde dehydrogenases. In this work, isoenzymes 1 and 2 of plant AMADHs from pea, tomato and maize were obtained as pure recombinant proteins by expression of the respective genes in *Escherichia coli* followed by affinity purification. There were also eight mutants of the pea AMADH2 available, which had been prepared by site-directed mutagenesis of active-site residues. To characterize the difference in their substrate specificity, the enzymes were subjected to a large kinetic study with natural and synthetic aminoaldehyde and aldehyde substrates. The studied compounds comprised C2-C4 omega-aminoaldehydes and their *N*-methylated, hydroxy and guanidino analogs, plus *n*-alkyl aldehydes (C2-C7). For the activity measurements, there were also position isomers available of pyridine-carbaldehyde, 3-pyridinylpropanal and (pyridinylmethyl)lamino aldehydes together with a series of (9*H*-purin-6-ylamino) aldehydes, (7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylamino) aldehydes and (pyrimidin-2-ylamino) aldehydes. A majority of the studied AMADHs accepted APAL or ABAL as the best substrates and well oxidized their substitution derivatives. One of the mutants of pea AMADH2 behaved as a non-specific aldehyde dehydrogenase oxidizing preferentially capronaldehyde and other *n*-alkyl or aromatic aldehydes known as less effective substrates for the wild-type enzyme. Another enzyme showed a significant preference for aromatic aldehydes even though ABAL was the best substrate. The crystal structures of pea AMADH1 and AMADH2 together with structural models of the other enzymes were used to discuss the observed differences in substrate properties.

This work was supported by grant 522/08/0555 from the Czech Science Foundation.