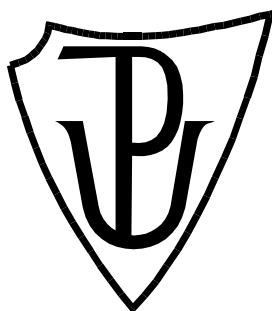


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Charakterizace vybraných aldehyddehydrogenas  
z čepenky odstálé (*Physcomitrella patens*) a ječmene  
setého (*Hordeum vulgare L.*)**

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Jakub Bělíček</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Radka Končítíková, PhD.</b>
Rok:	2021

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

V Olomouci dne .....

.....

Velmi rád bych poděkoval především své vedoucí práce Mgr. Radce Končítíkové, PhD., která mi svými nejen odbornými radami, trpělivým přístupem a ohromnou dávkou entuziasmu pomohla k vytvoření této diplomové práce. Můj velký vděk rovněž patří paní Mgr. Martině Kopečné, PhD. a panu Mgr. Davidovi Kopečnému, PhD. za umožnění vypracování experimentální části této práce, za jejich cenné odborné rady a vytvoření přátelského a motivujícího prostředí na pracovišti.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jakub Bělíček
Název práce	Charakterizace vybraných aldehyddehydrogenas z čepenky odstálé ( <i>Physcomitrella patens</i> ) a ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare L.</i> )
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra experimentální biologie
Vedoucí práce	Mgr. Radka Končítíková, PhD.
Rok obhajoby práce	2021

### Abstrakt

Významnou skupinou aldehyddehydrogenas jsou tzv. sukcinyl-semialdehyd dehydrogenasy, jež se zásadním způsobem podílejí na katabolismu  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny. V rámci této diplomové práce byly charakterizovány dvě isoformy sukcinyl-semialdehyddehydrogenas z mechu čepenky odstálé (*Physcomitrella patens*) a isoforma přítomná v ječmeni setém (*Hordeum vulgare L.*). Všechny studované enzymy vykazovaly úzkou specifitu vůči substrátu sukcinyl-semialdehydu a koenzymu  $\text{NAD}^+$ . Pro substrát sukcinyl-semialdehyd a koenzymy  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$  byly vyřešeny kinetické parametry  $V_{\text{lim}}$ ,  $K_M$  a  $k_{\text{cat}}$ . U všech tří isoform byla pozorována inhibice nadbytkem substrátu sukcinyl-semialdehydu při použití koenzymu  $\text{NAD}^+$ . Kromě kinetických parametrů byly enzymy studovány z hlediska vlivu pH, soli, glycerolu a koenzymů  $\text{NAD(P)}^+$  na stabilitu a sekundární strukturu proteinů. Přítomnost ligandu  $\text{NAD}^+$  u enzymů PpALDH5A a  $\Delta\text{HvALDH5}$  měla na proteiny stabilizační účinek. U isoformy PpALDH5B překvapivě došlo k destabilizaci po vazbě ligandu  $\text{NAD(P)}^+$ . Přídavek soli o koncentraci  $300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a výše měl u enzymů výrazně destabilizační vliv. Z hlediska kvartérní struktury vytvářejí všechny tři enzymy tetramery, jejichž aktivní místo i koenzym-vazebná doména jsou tvořeny vysoce konzervovanými residui napříč všech  $\text{NAD}^+$ -dependentních sukcinyl-semialdehyddehydrogenas.

Klíčová slova	ALDH5, metabolismus GABA, SSAL, ječmen, čepenka odstálá, SSADH
Počet stran	91
Počet příloh	4
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jakub Bělíček
Title	Characterization of selected aldehyde dehydrogenases from the moss ( <i>Physcomitrella patens</i> ) and barley ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Experimental Biology
Supervisor	Mgr. Radka Končítíková, Ph.D.
The year of presentation	2021

### Abstract

Succinic semialdehyde dehydrogenases (SSADH) create an important group of aldehyde dehydrogenase superfamily. These enzymes are involved in GABA-metabolism as a part of the GABA-shunt pathway. This diploma thesis is focused on characterization of two *Physcomitrella* and one barley SSADH isoforms. All three enzymes have shown a narrow substrate specificity to succinic semialdehyde (SSAL) and NAD<sup>+</sup>-coenzyme. Kinetic parameters ( $V_{lim}$ ,  $K_M$  and  $k_{cat}$ ) were determined for the substrate SSAL and coenzymes NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup>. Substrate inhibition for SSAL and coenzyme NAD<sup>+</sup>, characteristic of ALDH5, has been observed for all three isoforms. Beside to the kinetic assay, enzymes have been studied for the effect of pH, salt, glycerol and NAD(P)<sup>+</sup> on the stability and secondary structure. The addition of NAD<sup>+</sup> ligand have a stabilizing effect on the proteins PpALDH5A a  $\Delta H_v$ ALDH5. Surprisingly, the PpALDH5B isoform has been destabilized after NAD<sup>+</sup> ligand binding. Salt with a concentration od 300 mmol·l<sup>-1</sup> or higher has a significant destabilizing effect on the enzymes. Based on the gel filtration chromatography, all free enzymes form tetrameric quaternary structure. The active side and coenzyme-binding domain of ALDH5 enzymes are formed by highly conserved residues across all NAD<sup>+</sup>-dependent succinic-semialdehyde dehydrogenases.

Keywords	ALDH5, GABA-shunt, SSAL, succinic semialdehyde dehydrogenase, barley, <i>Physcomitrella patens</i>
Number of pages	91
Number of appendices	4
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky.....</b>	<b>10</b>
2.1	Metabolismus sukcinyl-semialdehydu.....	10
2.2	Metabolismus GABA .....	11
2.3	Nadrodina aldehyddehydrogenas.....	17
2.3.1	Reakční mechanismus .....	18
2.3.2	Substrátová specifita.....	19
2.3.3	Význam rostlinných aldehyddehydrogenas.....	20
2.4	Aldehyddehydrogenasy z rodiny 5 .....	21
<b>3</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>22</b>
3.1	Materiál a chemikálie.....	22
3.1.1	Biologický materiál .....	22
3.1.2	Použité chemikálie .....	22
3.1.3	Přístrojové vybavení.....	24
3.1.4	Použitý software .....	25
3.2	Metody .....	26
3.2.1	Příprava konstruktů s polyhistidinovou kotvou pro expresi rekombinantních proteinů.....	27
3.2.2	Optimalizace exprese rekombinantních proteinů .....	32
3.2.3	Expese rekombinantních proteinů v expresních buňkách <i>E. coli</i> .....	34
3.2.4	Extrakce a purifikace proteinů .....	35
3.2.5	Stanovení kinetických parametrů .....	41
3.2.6	Stanovení vlivu pH a iontové síly na stabilitu a sekundární strukturu proteinů.....	44
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>46</b>
4.1	Příprava konstruktů s polyhistidinovou kotvou pro expresi rekombinantních proteinů.....	46
4.1.1	PCR amplifikace genů PpALDH5A a PpALDH5B.....	46
4.1.2	Selekce buněčných kolonií Neb 10β pomocí PCR.....	47
4.1.3	Kontrolní štěpení izolovaných plasmidů pomocí restričních endonukleas .....	48
4.2	Optimalizace koncentrace IPTG pro expresi rekombinantních proteinů v expresních buňkách <i>E. coli</i> .....	49
4.3	Purifikace proteinů PpALDH5A, PpALDH5B a ΔHvALDH5 .....	50
4.4	Stanovení stupně oligomerizace proteinů .....	53
4.5	Stanovení pH optima .....	54
4.6	Substrátová specifita .....	55

4.7	Aktivita enzymů s alternativními koenzymy .....	56
4.8	Stanovení $V_{lim}$ , $K_M$ a $k_{cat}$ .....	57
4.8.1	PpALDH5A .....	58
4.8.2	PpALDH5B .....	59
4.8.3	$\Delta H_v$ ALDH5 .....	60
4.9	Cirkulární dichroismus .....	61
4.9.1	PpALDH5B .....	62
4.9.2	$\Delta H_v$ ALDH5 .....	63
4.10	Vliv pH, soli a přítomnosti ligandu na stabilitu proteinů .....	64
4.10.1	PpALDH5A .....	64
4.10.2	PpALDH5B .....	66
4.10.3	$\Delta H_v$ ALDH5 .....	68
4.11	Sekvenční logo .....	70
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>85</b>
9.1	Příloha 1 – sekvence cDNA studovaných ALDH5 .....	85
9.2	Příloha 2 – sekvence primerů .....	89
9.3	Příloha 3 – chromatografické záznamy afinitní FPLC chromatografie .....	90
9.4	Příloha 4 – chromatografický záznam gelové permeační chromatografie .....	91

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část:**

Zpracování literární rešerše na téma charakterizace metabolismu sukcinyl-semialdehydu v rámci rostlinné buňky, nadrodiny aldehyddehydrogenas a charakterizace rodiny ALDH5.

### **Praktická část:**

1. Příprava konstruktů s polyhistidinovou kotvou pro expresi rekombinantních proteinů PpALDH5A, PpALDH5B a  $\Delta^{1-32}$ -HvALDH5.
2. Optimalizace exprese a purifikace rekombinantních proteinů PpALDH5A, PpALDH5B a  $\Delta$ HvALDH5.
3. Enzymologická analýza purifikovaných proteinů.
4. Analýza sekundární struktury purifikovaných proteinů.



# 1 ÚVOD

Zástupci rostlinné říše jsou po celý svůj ontogenetický vývoj vystaveni různým druhům biotického či abiotického stresu. Stresové faktory významně omezují rostlinný růst i vývoj, což má mimo jiné velký dopad na výnosnost hospodářských plodin. Rostliny využívají dvou hlavních strategií reakce na stres, a to buď zamezení vlivu stresových faktorů přechodem do fyziologicky neaktivního stádia, nebo tzv. aklimatizaci. Aklimatizace je aktivní reversibilní přizpůsobení rostlin stresovým podmínkám. Při procesu aklimatizace dochází k různým změnám profilu genové exprese, což má ve výsledku dopad na složení rostlinného transkriptomu, proteomu i metabolomu. (Kosová *et al.*, 2011).

Během působení stresových činitelů dochází k akumulaci volných radikálů, částic schopných peroxidace lipidů. Lipidová peroxidace je v biologických systémech spojena s tvorbou široké škály aldehydů. (Bartels a Sunkar, 2005). Aldehydy jakožto silné elektrofilily ochotně reagují s proteiny či nukleovými kyselinami. Adicí aldehydů na tyto nukleofily může docházet ke genovým mutacím, ztrátě aktivity enzymů či funkce proteinů, což v důsledku vede k poruše buněčné homeostázy. Sloučeniny s aldehydovou skupinou však nevznikají pouze během lipidové peroxidace. Mnohé z nich slouží jako významné intermediáty v různých katabolických i biosyntetických dráhách (Brocker *et al.*, 2013).

Klíčovou roli při detoxifikaci aldehydů hrají enzymy z nadrodiny aldehyddehydrogenas. Tyto enzymy zajišťují oxidaci toxických aldehydů na méně reaktivní karboxylové kyseliny. Genová exprese řady ALDH enzymů je indukována v důsledku různých abiotických stresů, jako je například sucho, zvýšená salinita, ultrafialové záření, teplo, mráz či přítomnost těžkých kovů (Brocker *et al.*, 2013; Inostroza Blancheteau *et al.*, 2011; Sunkar *et al.*, 2003).

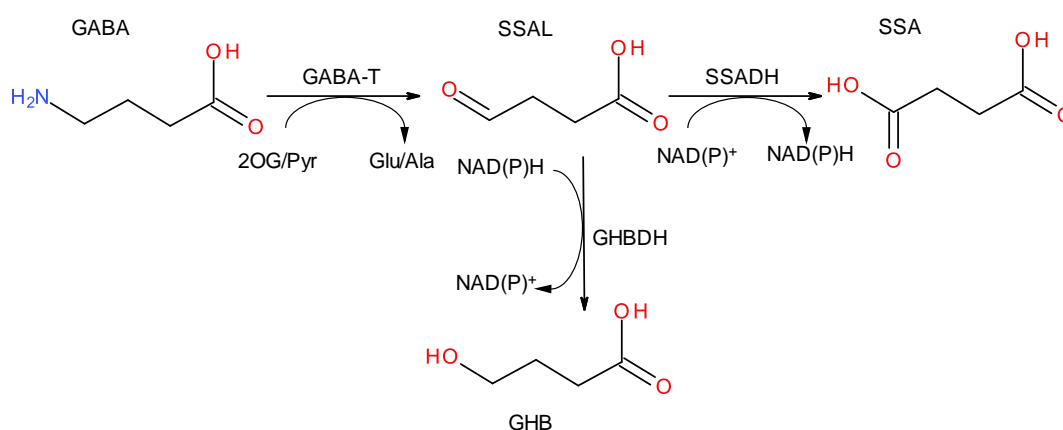
Aldehyddehydrogenasy se navíc významně podílejí na redukci NAD(P)H, jež slouží jako redukční ekvivalenty pro udržení redoxní buněčné rovnováhy (Brocker *et al.*, 2013).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Metabolismus sukcinyl-semialdehydu

Sukcinyl-semialdehyd (SSAL) je substituční derivát kyseliny butanové obsahující aldehydovou skupinu na  $\gamma$ -uhlíku. Tento metabolit vzniká v rostlinách transaminací  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (GABA) za současného vzniku glutamátu (obr. 1). V řadě rostlinných druhů (např. *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*) byly rovněž nalezeny i další různé isoformy  $\gamma$ -aminobutyráttransaminas. (Wu *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2009) Tyto isoformy využívají pyruvát či glyoxylát místo 2-oxoglutarátu jako substrát pro transaminační reakci (Ansari *et al.*, 2005).

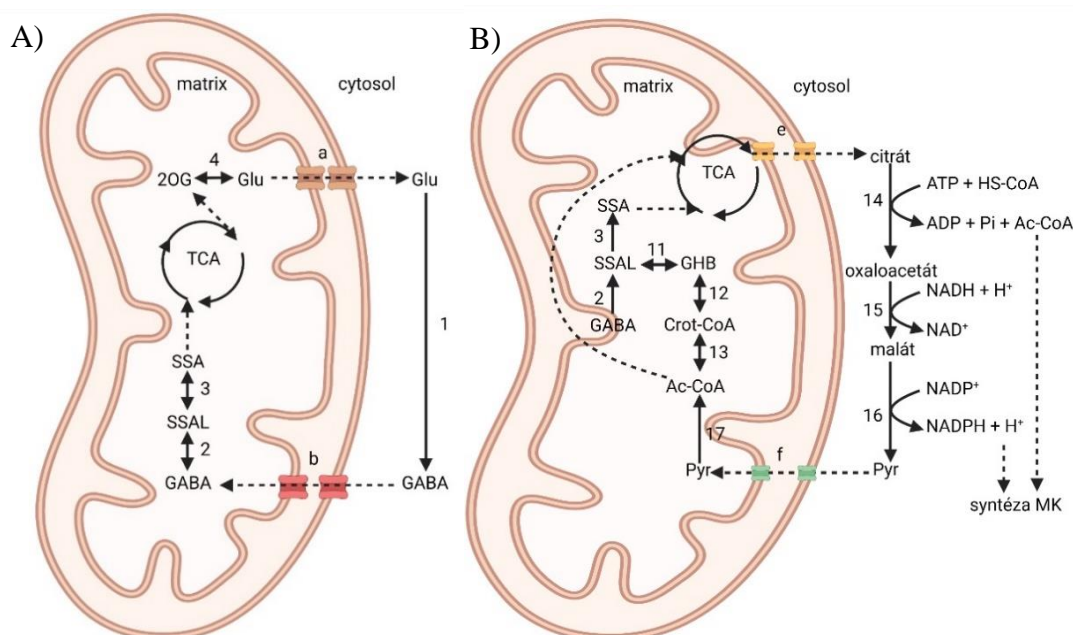
SSAL je následně oxidován za katalýzy enzymy z rodiny NAD(P)<sup>+</sup>-dependentních sukcinyl-semialdehyddehydrogenas (SSADH) na sukcinát. SSADH je u většiny organismů lokalizována v mitochondriích. U některých druhů mechorostů (*Physcomitrella patens*, *Synchitria ruralis*) se SSADH kromě mitochondrií nachází rovněž v cytosolu (Kopečná *et al.*, 2017). Vzniklý sukcinát je dále odbourán v Krebsově cyklu. Alternativní cestou odbourávání SSAL je jeho redukce glyoxylátreduktasou na kyselinu  $\gamma$ -hydroxymáselnou (obr. 2B) (Hoover *et al.*, 2007). U živočichů a hmyzu kyselina  $\gamma$ -hydroxymáselná účinkuje jako neuromodulátor. Kyselina  $\gamma$ -hydroxymáselná je u většiny organismů odbourávána na acetyl-CoA. V případě některých bakterií a rostlin může docházet i k její polymerizaci na zásobní poly- $\beta$ -hydroxybutyrát (Fait *et al.*, 2006; Parveez *et al.*, 2015).



Obr. 1 Reakční schéma vzniku a degradace sukcinyl-semialdehydu. GABA – kyselina  $\gamma$ -aminomáselná, SSAL – sukcinyl-semialdehyd, SSA – sukcinát, GHB –  $\gamma$ -hydroxybutyrát, 2OG – 2-ketoglutarát, GABA-T –  $\gamma$ -aminobutyrát transaminasa (EC 2.6.1.19, 2.6.1.96), GHBDH –  $\gamma$ -hydroxybutyrátdehydrogenasa (EC 1.1.1.61), SSADH – sukcinyl-semialdehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.16, 1.2.1.24). Vytvořeno pomocí softwaru BIOVIA Draw 2021.

## 2.2 Metabolismus GABA

SSAL je intermediát významné metabolické dráhy (anglicky GABA-shunt), která alteruje reakce 2-oxoglutarátdehydrogenasy a sukcinyl-CoA-syntetasy. Pro tuto dráhu bývá v případě biochemie živočichů používán český výraz GABA-zkrat, neboť bývá nejčastěji popisována v souvislosti s rychlými změnami koncentrace GABA v cytosolu neuronů. V rostlinných buňkách však místo výrazných fluktuací koncentrace GABA dochází k akumulaci vlivem různých podmínek, a tudíž výše uvedený překlad není plně vystihující (Clements, 1996; Koolman, Moeller a Rohm, 2012; Scholz *et al.*, 2017).

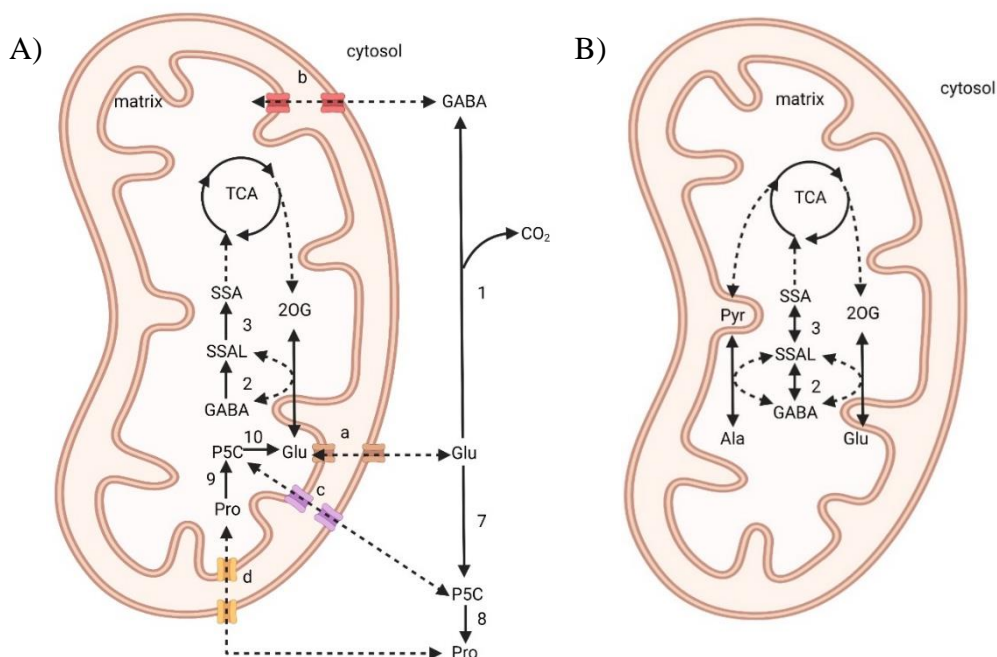


Obr. 2 Metabolická dráha odbočující přes GABA (GABA-shunt). A) Samostatná dráha. B) Alternativní dráha odbourávání sukcinyl-semiladehydu redukci na  $\gamma$ -hydroxybutyrát. 1 – glutamátdekarboxylasa (EC 4.1.1.15), 2 – GABA-transaminasa (EC 2.6.1.19, 2.6.1.96), 3 – mitochondriální sukcinyl-semialdehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.24) 4 – glutamátdehydrogenasa (EC 1.4.1.2), 11 –  $\gamma$ -hydroxybutyrátdehydrogenasa (EC 1.1.1.61), 12 – vinylacetyl-CoA- $\Delta$ -isomerasa (EC 5.3.3.3), 13 – enoyl-CoA-hydratasa (EC 4.2.1.17) s 3-hydroxybutyryl-CoA-oxidoreduktasou (EC 1.1.1.157) a acetyl-CoA-acetyltransferasou (EC 2.3.1.9), 14 – ATP-citrátlyasa (EC 2.3.3.8), 15 – malátdehydrogenasa (EC 1.1.1.37), 16 – malátdehydrogenasa (dekarboxylující) (EC 1.1.1.40), 17 – pyruvátkarboxylasa (EC 6.4.1.1), a – Glu/Asp translokátor, b – transportér pro GABA, e – trikarboxylátový transportní systém, f – trikarboxylátový transportní systém. Vytvořeno využitím softwaru Biorender podle Faita *et al.*, 2008.

Funkce této dráhy spočívá v syntéze i degradaci GABA u rostlin a živočichů. Samotná dráha sestává ze tří hlavních reakcí (obr. 2A). První reakcí je dekarboxylace glutamátu za vzniku GABA, katalyzovaná cytosolickou glutamátdekarboxylasou (GAD). Posléze je  $\gamma$ -aminoskupina GABA odbourávána za pomoci enzymu GABA-transaminasy (GABA-T). Současně vzniká SSAL. Poslední reakcí je oxidace SSAL na sukcinát. (Kinnersley a Turano, 2000; Fait *et al.*, 2008).

GABA u živočichů účinkuje jako jeden z hlavních neurotransmiterů, i proto je tato dráha dlouhodobě studována (Bloom a Iversen, 1971; Palacios *et al.*, 1981). Enzymy této metabolické dráhy jsou však exprimovány i v jiných tkáních než pouze v CNS. (Garry *et al.*, 1987; Ravasz *et al.*, 2017). Kromě syntézy a degradace GABA se dráha zapojuje jako alternativa 2-oxoglutarátdehydrogenasy v buňkách s deficiencí thiamindifosfátu (Page *et al.*, 1989).

GABA-transaminasy mohou jako akceptor aminoskupiny z GABA využívat 2-oxoglutarát či pyruvát. V případě prvního jmenovaného substrátu by reakce vedla ke



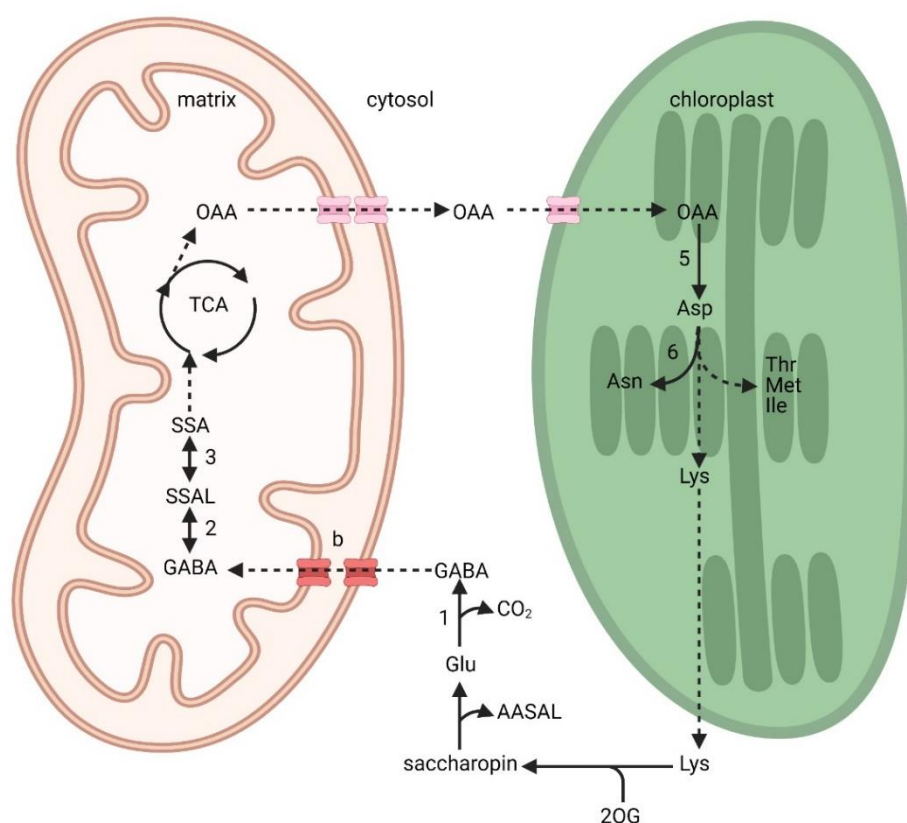
Obr. 3 A) Metabolismus GABA za stresových podmínek. B) Vznik jalového cyklu v případě přítomnosti pyruvát i 2-oxoglutarát-dependentní GABA-T. 1 – glutamátdekarboxylasa (EC 4.1.1.15), 2 – GABA-transaminasa (EC 2.6.1.19, 2.6.1.96), 3 – mitochondriální sukcinyl-semialdehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.24), 7 – pyrrolin-5-karboxylátsynthasa (EC 2.7.2.11) a glutamát-5-semialdehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.41), 8 – pyrrolin-5-kyrboxylátreduktasa (EC 1.5.1.2), 9-prolindehydrogenasa (EC 1.5.5.2), a – Glu/Asp translokátor, b – transportér pro GABA, c – pyrrolin-5-karboxylátový transportér, d – transportér pro prolin. Vytvořeno pomocí softwaru Biorender podle Faita *et al.*, 2008.

tvorbě glutamátu. Část nově formovaného glutamátu by pak pravděpodobně byla opětovně využita k syntéze GABA, čímž by vznikl zbytečný cyklus (obr. 3B), jež by pravděpodobně sloužil k udržení rovnováhy mezi koncentrací GABA a Glu (Bouché a Fromm, 2004). V některých rostlinách byla prokázána přítomnost pyruvát-dependentní i 2-oxoglutarát-dependentní GABA-T, přičemž pyruvát-dependentní GABA-T vykazuje u rostlin výrazně vyšší aktivitu než její 2-oxoglutarát-dependentní izoforma (Van Cauwenberghe a Shelp, 1999; Bartyzel *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2009).

Clark *et al.*, 2009). Fyziologická funkce pyruvát-dependentní GABA-T souvisí s kvetením, tvorbou pylové láčky i regulací senescence rostlin (Bouché a Fromm, 2004; Jalil *et al.*, 2019).

Regulace dekarboxylace Glu na GABA je pravděpodobně úzce spojena s dalšími stresem indukovanými metabolickými drahami spojenými s Glu (obr. 3A). Za normálních růstových podmínek je Glu využíván jako substrát pro tvorbu aminokyselin Met, Thr, Ile či Lys. Avšak například vlivem zvýšeného osmotického tlaku dochází ke zpětné konverzi Lys na Glu, který je poté přeměněn na Pro a GABA. Obě aminokyseliny jsou ve zvýšené míře syntetizovány vlivem působení stresových podmínek. Glu má rovněž funkci jako pozitivní regulátor několika metabolických reakcí souvisejících s růstem rostliny. Konverzí Glu na GABA tak dochází k regulaci rychlosti rostlinného růstu v závislosti na změně vnějších podmínek (Stepansky *et al.*, 2006; Fait *et al.*, 2008; Hare a Cress, 1997).

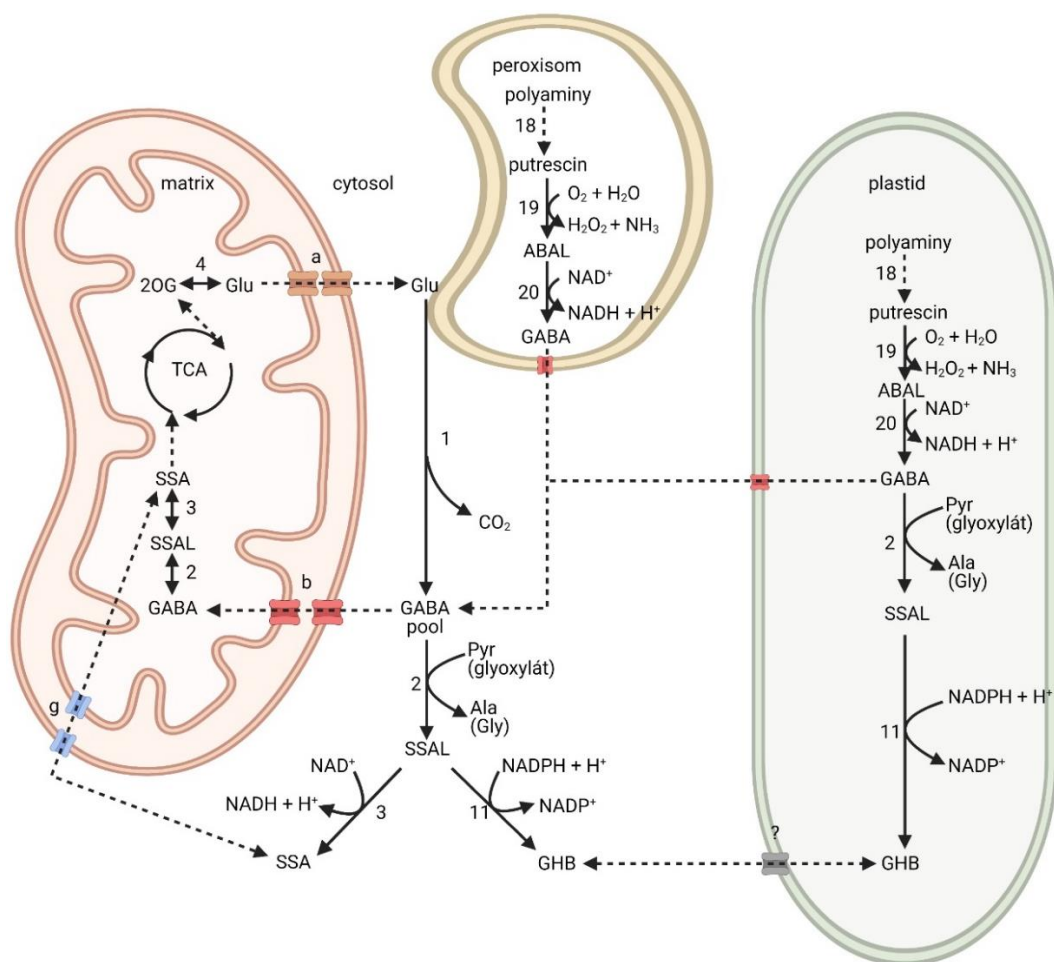
Metabolická dráha odbočující přes GABA se dále uplatňuje při klíčení semen, a to zprostředkováváním uhlíku ve formě sukcinátu, který je Krebsovým cyklem metabolizován na další intermediáty sloužící jako substrát pro kataplerotické reakce (obr. 4). Tok uhlíku do Krebsova cyklu tato dráha zprostředkovává rovněž i při vystavení rostlin stresovým faktorům (Fait *et al.*, 2006; Fait *et al.*, 2008). Katabolismus glutamátu na GABA či 2-oxoglutarát má výrazný vliv i na udržování rovnováhy mezi dusíkem a uhlíkem během maturace semen. Glu slouží jako donor amino-skupiny pro jiné transaminační reakce (Fait *et al.*, 2011).



Obr. 4 Napojení metabolické dráhy odbočující přes GABA na biosyntézu esenciálních aminokyselin, jejichž prekurzorem je aspartát (anglicky aspartate family pathway). 1 – glutamátdekarboxylasa (EC 4.1.1.15), 2 – GABA-transaminasa (EC 2.6.1.19, 2.6.1.96), 3 – mitochondriální sukcinyl-semialdehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.24), 4 – glutamátdehydrogenasa (EC 1.4.1.2), 5 – aspartátaminotransferasa (EC 2.6.1.1), 6 – asparaginsynthetasa (EC 6.3.5.4). Vytvořeno pomocí softwaru Biorender podle Faita *et al.*, 2008.



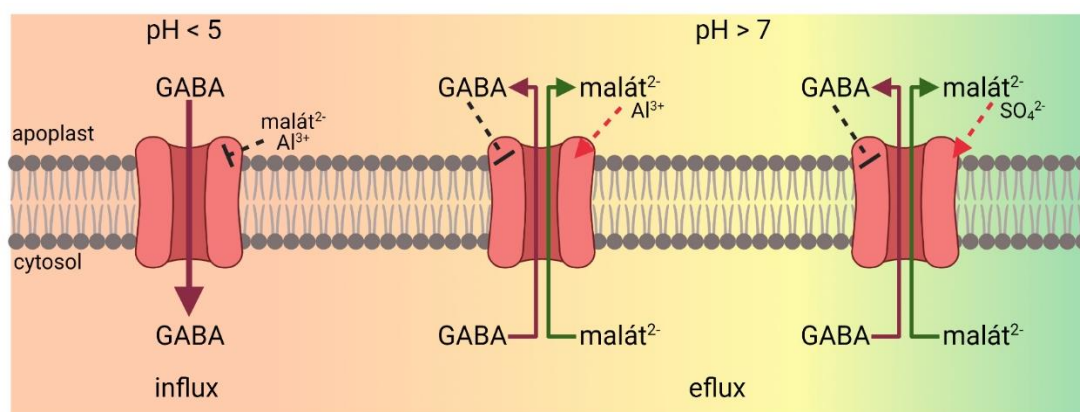
Kromě Glu jako substrátu pro syntézu GABA se v rostlinách nachází alternativní dráha spojená s katabolismem polyaminů (obr. 5). Polyaminy jsou nízkomolekulární alifatické deriváty uhlovodíků obsahující více než jednu aminoskupinu. Ve vyšších rostlinách jsou polyaminy nejvíce zastoupené ve třech formách – putrescinu, spermidinu a sperminu. Veškeré polyaminy jsou vysoce biologicky aktivní látky podílející se na většině procesů ontogenetického vývoje rostlin (Xu *et al.*, 2014; Mustafavi *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019). Polyaminy jsou v rostlinách katabolizovány pomocí  $\text{Cu}^{2+}$ -dependentní či FAD-dependentní aminoxidas. Vzniklý 4-aminobutyrát (ABAL) je následně oxidován na GABA enzymy z rodiny ALDH10 – aminoaldehyddehydrogenasami (Tylichová *et al.*, 2010; Kopečný *et al.*, 2011; Zarei *et al.*, 2016; Kopečná *et al.*, 2017).



Obr. 5 Alternativní dráha syntézy GABA využívající polyaminy jako substrát. 1 – glutamátdekarboxylasa (EC 4.1.1.15), 2 – GABA-transaminasa (EC 2.6.1.19, 2.6.1.96), 3 – sukcinyl-semialdehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.16, 1.2.1.24) 4 – glutamátdehydrogenasa (EC 1.4.1.2), 11 –  $\gamma$ -hydroxybutyrátdehydrogenasa (EC 1.1.1.61), 18 –  $\text{Cu}^{2+}$ - či FAD-dependentní polyaminoxidasa (EC 1.4.3.6, 1. 5.3.13-15), 19 –  $\text{Cu}^{2+}$ -dependentní aminoxidasa (EC 1.4.3.21), 20 – aminoaldehyddehydrogenasa (ALDH10, EC 1.2.1.19), a – Glu/Asp translokátor, b – transportér pro GABA. Vytvořeno pomocí softwaru Biorender podle Kopečné *et al.*, 2017.

GABA nemá u rostlin uplatnění pouze v rámci intracelulárního prostoru. Existence transportního proteinu ALMT1 pro eflux GABA do apoplastu (obr. 6) poukazuje na možnou extracelulární puřovací funkci GABA. Zvýšení koncentrace GABA v apoplastu navíc zajiřtřuje zpětnovazebnou regulaci kotransportu malátu (Ramesh *et al.*, 2018).

ALMT aniontové transportéry jsou v současné době jediným transportérem, u kterého byla potvrzena vazba GABA jakožto regulační molekuly. Na druhou stranu, experimentálně byl potvrzen vliv GABA na tok jiných iontů (např.  $\text{Ca}^{2+}$ ). Není však známo, zdali dochází k přímé vazbě GABA na transportéry  $\text{Ca}^{2+}$  iontů či jejich regulační proteiny. Nárůstem koncentrace GABA v apoplastu dochází ke změně membránového potenciálu, která může mít vliv na aktivitu iontových kanálů (Yu *et al.*, 2014; Gilliam a Tyerman, 2016; Fromm, 2020).



Obr. 6 Schéma funkce ALMT transportéru. Při nízkém pH apoplastu dochází k influxu GABA do cytosolu. Tento transport je inhibován malátem a hlinitými kationty. Hlinité kationty společně s vyšším pH, vyšší koncentrací malátu v apoplastu a přítomností síranových aniontů způsobují naopak přepnutí transportu do módu efluxu malátu a GABA do apoplastu. Zvýšená koncentrace GABA má inhibiční účinek na transport malátu a samotné GABA do apoplastu. Vytvořeno pomocí softwaru Biorender podle Rameshe *et al.* (2018).



### 2.3 Nadrodina aldehyddehydrogenas

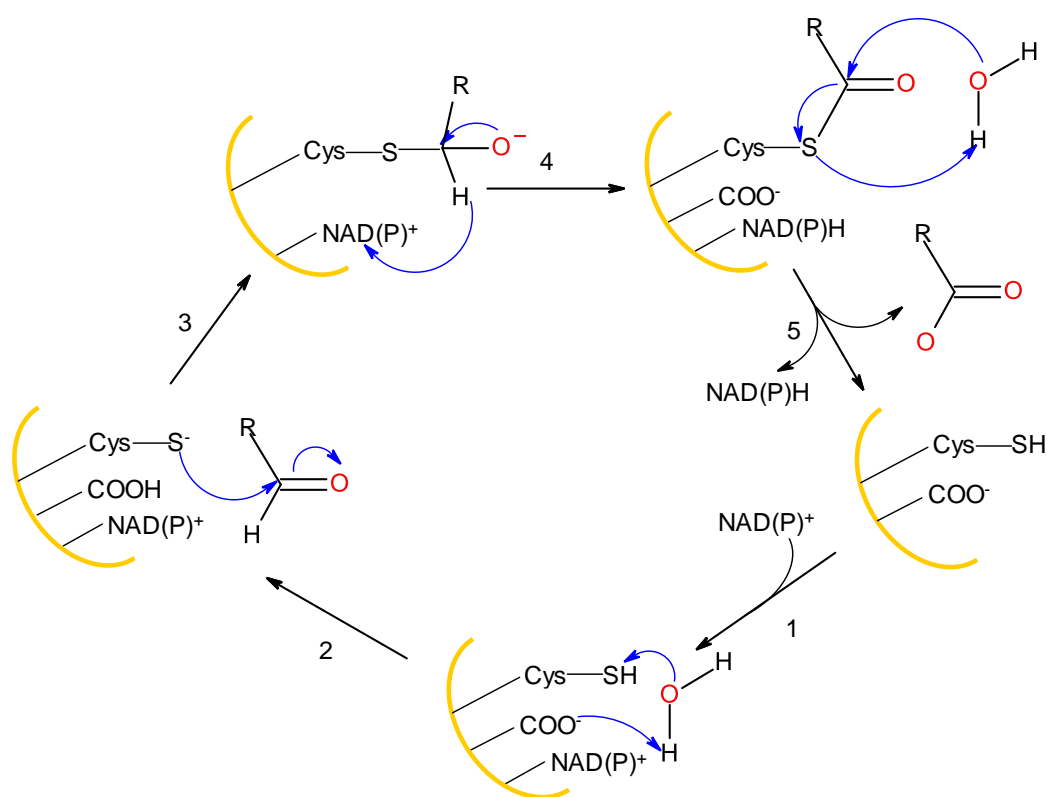
Aldehyddehydrogenasy jsou  $\text{NAD(P)}^+$ -dependentní oxidoreduktasy katalyzující oxidaci aldehydů na příslušné karboxylové kyseliny. ALDH enzymy patří k nejstarším proteinovým nadrodinám vyskytujícím se ve všech třech taxonomických doménách.

Jednotlivé enzymy jsou do příslušných rodin rozděleny na základě příbuznosti sekvencí aminokyselin v rámci polypeptidového řetězce. Pokud se sekvence shodují z alespoň 40 %, patří do stejné rodiny. V případě minimálně 60% shody sekvencí spadají dané polypeptidy do stejné podrodiny. Nadrodina ALDH enzymů u rostlin sestává celkem ze 14 rodin, jmenovitě ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24, z toho rodiny ALDH11, ALDH12, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24 jsou přítomny pouze u rostlin (Brocker *et al.*, 2013).

*ALDH* geny jsou v rámci rostlinné říše zastoupeny v různých počtech. Jako příklady lze uvést zástupce z rodů váleče (*Volvox cateri*) se 7 *ALDH* geny, čepenky (*Physcomitrella patens*) s 21 *ALDH* geny a sóji (*Glycine max*) s 53 *ALDH* geny. Při srovnání genomů zástupců nižších a vyšších rostlin lze pozorovat nárůst absolutního počtu *ALDH* genů. Na druhou stranu, hustota *ALDH* genů v rámci různých zástupců řas, mechů a kvetoucích rostlin nevykazuje žádný signifikantní trend z hlediska evolučního vývoje rostlin. Tento fakt podporuje myšlenku existence základního souboru *ALDH* genů kódujících enzymy z rodin ALDH5, ALDH10, ALDH11, ALDH12 a ALDH22, k nimž jsou přidávány či naopak ubírány ostatní *ALDH* geny v průběhu expanze genomu. Přesný proces evoluční expanze *ALDH* nadrodiny však doposud znám není (Tola *et al.*, 2021).

### 2.3.1 Reakční mechanismus

Mechanismus reakce ALDH enzymů (obr. 7) odpovídá uspořádanému sekvenčnímu modelu dvousubstrátových reakcí, kdy po vazbě oxidovaného  $\text{NAD(P)}^+$  dochází k navázání substrátu na katalytický cystein, poté dojde současně k oxidaci aldehydu a redukci  $\text{NAD(P)H}$ . Vzniklý  $\text{NAD(P)H}$  i příslušná karboxylová kyselina jsou z aktivního místa následně uvolněny. Některé aldehyddehydrogenasy katalyzují kromě oxidačně-redukčních reakcí rovněž i hydrolyzu esterů. Reakční model je v obou případech obdobný s tím, že v případě hydrolasové aktivity nedochází k přenosu elektronů na  $\text{NAD(P)}^+$ , nýbrž na kyslík hydrolyzovaného hydroxyly (Vasilou *et al.*, 1999).



Obr. 7 Reakční mechanismus oxidace aldehydů za katalýzy ALDH enzymy. V první fázi se do koenzym-vazebné domény prostřednictvím slabých vazebných interakcí asociuje oxidovaný  $\text{NAD(P)}^+$  za současného nukleofilního ataku molekuly vody na SH – skupinu cysteinu (1 a 2). Záporně nabitě thiolátové residuum cysteinu ochotně reaguje s elektrofilním uhlíkem karbonylové skupiny aldehydového substrátu za vzniku tetrahedrálního thiohemiacetalu (3). Vzniklý hydridový anion thiohemiacetalu redukuje nikotinamidový koenzym (4). Po odštěpení hydridového aniontu vzniká thioester, jenž je následně hydrolyzován. Vzniklý redukovaný  $\text{NAD(P)H}$  a příslušná karboxylová kyselina disociují z oblasti aktivního místa a uvolňují tak prostor pro vazbu nového oxidovaného koenzymu (5). Vytvořeno pomocí softwaru BIOVIA Draw 2021 podle Koppaky *et al.* (2012).

### 2.3.2 Substrátová specifita

Většina aldehyddehydrogenas vykazuje širokou substrátovou specifitu, což znamená, že jsou schopny oxidovat širokou škálu aldehydů či jejich derivátů. Oproti tomu jsou známy i takové isoformy, jež jsou vysoce specifické vůči svému substrátu (např. ALDH5, ALDH6, ALDH11, ALDH18, ALDH19 či ALDH21).

Stěžejní roli v rámci specifity enzymu vůči různým substrátům hraje struktura substrát-vazebné domény. Tato doména má v případě ALDH enzymů tvar kapsy. Zatímco u ALDH využívajících aldehydy s neutrální či záporně nabitou vedlejší skupinou se v této oblasti nachází aminokyseliny s neutrálně respektive kladně nabitými residui, u ALDH katalyzujících substráty s kladně nabitou vedlejší skupinou (např. AMDH) je substrát-vazebná doména tvořena residui aromatickými, polárními a negativně nabitými. Aktivní místo ALDH je dále tvořeno dvěma až čtyřmi konzervovanými aromatickými residui. Všestrannost aromatických skupin účastnících se na hydrofobních či kation- $\pi$  interakcích poukazuje na důležitou roli při vazbě různých aldehydů do aktivních míst odlišných ALDH enzymů (Riveros-Rosas *et al.*, 2013).

Aldehyddehydrogenasy využívají nikotiamidové koenzymy jako akceptory elektronů uvolněné při oxidaci aldehydů na karboxylové kyseliny. Většina aldehyddehydrogenas preferuje jako koenzym  $\text{NAD}^+$ .  $\text{NADP}^+$ -dependentní jsou pak enzymy z rodin ALDH11, ALDH18, ALDH19 a ALDH21 (Valverde *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000; Marchiti *et al.*, 2008; Stiti *et al.*, 2011, Stiti *et al.*, 2014).

Na základě rentgenostrukturní analýzy několika ALDH proteinů bylo zjištěno, že koenzym-vazebná doména aldehyddehydrogenas vytváří atypický Rossmannův záhyb tvořený pouze pěti  $\beta$ -řetězci místo šesti (Liu *et al.*, 1997). Uprostřed této domény se nachází Glu, jenž svým záporně nabitým residuem interaguje s 2'- a 3'-hydroxyly adenosinribosidu  $\text{NAD}^+$  a odpuzuje záporně nabitý 2'-fosfát  $\text{NADP}^+$ . Pokud se na pozici naproti Glu nachází aminokyselina s rozvětveným nepolárním řetězcem, dochází ke sterickému bránění, v jehož důsledku je afinita enzymu k  $\text{NADP}^+$  velmi nízká. Pomocí místně řízené mutagenese ALDH3H1<sub>I200G</sub> bylo experimentálně potvrzeno, že záměnou izoleucinu s dlouhým rozvětveným residuem za glycin došlo k významnému poklesu  $K_M$  pro  $\text{NADP}^+$  u jinak  $\text{NAD}^+$ -dependentního enzymu ALDH3H1. Afinita enzymu ku  $\text{NADP}^+$  nejvýrazněji vzrostla v případě kombinace mutací ALDH3H1<sub>E149T/I200G</sub>. Pro vazbu  $\text{NADP}^+$  je tudíž rozhodující velikost štěrbinu mezi residui Glu a Ile, respektive Thr a Gly (Perozich *et al.*, 2000; Stiti *et al.*, 2011; Stiti *et al.*, 2014).

### 2.3.3 Význam rostlinných aldehyddehydrogenas

Primární význam ALDH enzymů spočívá v detoxifikaci vysoce reaktivních aldehydů, jež jsou produkovány jak za fyziologických podmínek jako meziprodukty různých metabolických drah, tak za podmínek patologických, kdy vlivem zvýšené akumulace ROS dochází k peroxidaci lipidů za vzniku malondialdehydu. Spolu s oxidací aldehydů zároveň dochází k redukci NAD(P)H. Další význam aldehyddehydrogenas tudíž spočívá ve snížení poměru  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ . NAD(P)H je posléze dále uplatňován při oxidativní fosforylaci nebo jako redukční činidlo v řadě detoxifikačních metabolických drah, jakými jsou například Halliwell-Asadova dráha či xantofylový cyklus.

Aldehyddehydrogenasy se v rostlinách významně podílejí na adaptaci vůči nepříznivým podmínkám. Na základě studia profilu genové exprese *ALDH* genů za různých stresových podmínek bylo zjištěno, že řada *ALDH* je ve většině rostlin nadexprimována za podmínek zvýšené salinity, sucha, změny teploty či nedostatku dusíku (Hou a Bartels, 2015; Wang *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2017; Kopecná *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017; Korasick *et al.*, 2019).

Význam ALDH při vystavení rostlin biotickému stresu je doposud málo probádán. Několik studií však poukazuje na příspěvek aldehyddehydrogenas při obraně vůči některým škůdcům či patogenům. Vysoká koncentrace ALDH2 proteinu byla pozorována v rostlinách dubu (*Quercus robur* L.) napadených žlabatkou pruhovanou (*Cynips longiventris*). Přesný mechanismus působení ALDH2 není objasněn, je však možné, že je zapojen do biosyntézy bifenylových fytoalexinů, silných inhibitorů patogenů (Pawlowski *et al.*, 2017; Saini *et al.*, 2017). Rovněž bylo zjištěno, že vlivem napadení révy vinné (*Vitis vinifera*) plísní révou (*Plasmopara viticola*) dochází k výraznému zvýšení exprese genů *VvALDH11B1*, nefosforylující glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy. Geny *VvALDH2B4*, *VvALDH2B9*, *VvALDH3F1*, *VvALDH3H1*, *VvALDH6B7*, *VvALDH7B5* a *VvALDH10A9* byly naopak exprimovány v nižší míře než za normálních podmínek (Zhang *et al.*, 2012).

## 2.4 Aldehyddehydrogenasy z rodiny 5

Enzymy z rodiny ALDH5 se řadí do skupiny takzvaných sukcinyl-semialdehyddehydrogenas (SSADH). V rámci fylogenetického vývoje všech živých organismů se vyčlenily dvě hlavní skupiny SSADH, rodiny ALDH5 a ALDH21. ALDH5 rodina představuje především NAD<sup>+</sup>-dependentní enzymy, zatímco rodina enzymů ALDH21 je NADP<sup>+</sup>-dependentní. Tyto rodiny se také liší v ohledu výskytu v rámci různých taxonomických skupin organismů. Zatímco ALDH5 enzymy se v různém počtu vyskytují v téměř všech živých organismech, enzymy ALDH21 jsou specifické pouze pro mechorosty, zelené řasy, prvoky a některé bakterie (Kopečná *et al.*, 2017).

První zmínky o ALDH5 se objevují již na konci 50. let 20. století, kdy byla sukcinyl-semialdehyddehydrogenasová aktivita detekována v homogenátu opičího mozku (Albers a Salvador, 1958). Enzym byl poté úspěšně purifikován a kineticky charakterizován (Albers a Koval, 1961). Výzkum živočišných ALDH5 včetně lidské izoformy vedl k odhalení významné role SSADH v souvislosti s funkcí živočišné nervové soustavy při metabolismu neurotransmiteru GABA. Poruchy vedoucí k poklesu či ztrátě SSADH aktivity vedou k acidurii 4-hydroxybutyrátem, interakcí sukcinyl-semialdehydu s pyruvátdehydrogenasovým komplexem a dalším buněčným intoxikacím, jež inhibují buněčný látkový i energetický metabolismus. Autozomální recesivní deficiencie *SSADH* genu způsobuje závažné symptomy jako opoždění duševního vývoje spolu s poruchou motoriky, ataxii či hyporeflexi (Gibson *et al.*, 1983, Gibson *et al.*, 1984, Brown *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2009).

Rostlinná izoforma tohoto enzymu byla poprvé popsána roku 1972, kdy se podařilo extrahovat a purifikovat mitochondriální SSADH z ředkve seté (*Raphanus sativus*, L.) (Streeter a Thompson, 1972). Kromě isoformy z ředkve byly dále blíže popsány ALDH5 z huseníčku rolního (*AtALDH5F1*) a lilku bramboru (*ScALDH5F1*) (Busch a Fromm, 1999; Narayan *et al.*, 1989). Tato diplomová práce je zaměřena na charakterizaci ALDH5 izoformem z dalších dvou rostlinných zástupců, ječmene setého (*Hordeum vulgare*, L.) a čepenky odstálé (*Phycomitrella patens*).

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiál a chemikálie

##### 3.1.1 Biologický materiál

- Klonovací Neb-5 $\alpha$  buňky *Escherichia coli* (New England Biolabs, UK)
- Expresní buňky Rosetta 2 a T7 *E. coli* (New England Biolabs, UK)
- cDNA připravená RT-PCR z RNA čepenky odstálé (*P. patens*)

##### 3.1.2 Použité chemikálie

- 3-acetylpyridinadenin dinukleotid (Sigma-Aldrich, USA)
- 3-pyridinaldehydadenin dinukleotid (Sigma-Aldrich, USA)
- 4-aminobutanal (ABAL) (Honeywell Fluka, ČR)
- Akrylamid/Bis-akrylamid 30% roztok (Sigma-Aldrich, USA)
- Benzaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- B-PER (ThermoFisher Scientific, USA)
- Bradfordovo činidlo (ThermoFisher Scientific, USA)
- Bromid ethidia (ThermoFisher Scientific, USA)
- Butanal (Sigma-Aldrich, USA)
- Coomassie brilliant blue G-250 (VWR, USA)
- Dodecylsulfát sodný (Merck, NSR)
- DreamTaq Green PCR reakční směs (ThermoFisher Scientific, USA)
- Fenypropionylaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- Fluorid sodný (Supelco, USA)
- Glutamyl-5-semialdehyd (GSAL) (Sigma-Aldrich, USA)
- Glutaryl-5-semialdehyd (GRSAL) (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol (Lachine, KAN)
- Glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- HEPES (Sigma-Aldrich, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydrát NAD<sup>+</sup> (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydrát NADP<sup>+</sup> (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydroxid vápenatý (Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, USA)

- Chlorid vápenatý (Sigma-Aldrich, USA)
- Imidazol (Alfa Aesar, USA)
- Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosa (IPTG) (Sigma-Aldrich, USA)
- Kanamycinsulfát (Sigma-Aldrich, USA)
- Kit na extrakci DNA z agarosového gelu (Macherey-Nagel, NSR)
- Kit na izolaci plasmidové DNA (Promega, USA)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich, USA)
- LB(Luria/Miller) medium (Carl Roth, NSR)
- Methanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Mili-Q voda
- Močovina (Sigma-Aldrich, USA)
- NdeI restriční endonukleasa (New England Biolabs, GB)
- Nikotinamidhypoxanthindinukleotid (Sigma-Aldrich, USA)
- Pentanal (Sigma-Aldrich, USA)
- Persulfát amonný (APS) (Bio-Rad, USA)
- Platinum SuperFi PCR reakční směs (Thermofisher Scientific, USA)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA)
- Propanal (Sigma-Aldrich, USA)
- Protilátka proti histidinovému epitopu značená křenovou peroxidasou (Thermofisher Scientific, USA)
- Q5 HF DNA polymerasa (New England Biolabs, GB)
- Q5 HF DNA polymerasová reakční směs (New England Biolabs, GB)
- Roztok nukleotidtrifosfátů (dNTPs) (New England Biolabs, GB)
- Sall restriční endonukleasa (New England Biolabs, GB)
- SeaKem LE agarosa (Lonza, ČR)
- SOC růstové medium (New England Biolabs, GB)
- Streptomycinsulfát (Sigma-Aldrich, USA)
- Sukcynyl-semialdehyd (Santa-Cruz Biotechnology, USA)
- T4 DNA ligasa a reakční směs pro ligaci DNA genu s plasmidem (New England Biolabs, GB)
- Tetramethylethyléndiamin (TEMED) (GE Healthcare, USA)
- Thionikotinamidadenindinukleotid (Thio-NAD<sup>+</sup>) (Sigma-Aldrich, USA)

- Tris-acetát-EDTA pufr (TAE pufr) (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris-HCl (Sigma-Aldrich, USA)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA)
- Voda bez nukleas

### 3.1.3 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Sartorius, USA)
- Autokláv (Tuttnauer, Švýcarsko)
- Automatické pipety (Eppendorf, NSR)
- CD-spektroskop (JASCO, USA)
- Centrifuga stolní (Eppendorf, AUT)
- Centrifuga stolní chlazená Benchtop (Sigma-Aldrich, USA)
- GelPOC EZ imager skener (Bio-Rad, USA)
- Inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- Kolona chromatografická Superdex 200 HR 10/300 GL s náplní Superdex 200 prepgrade (Amersham Biosciences, Švédsko)
- Laminární box (Merci, CZ)
- Minicentrifuga (IKA, NSR)
- Minicentrifuga stolní (Labochema, IT)
- NGC chromatografický systém s frakčním sběračem (Bio-Rad, USA)
- PCR termocyklér (Eppendorf, NSR)
- Spektrofotometr NanoDrop UV/Vis (Hangzhou LifeReal, Čína)
- Spektrofotometr UV-Vis (Agilent Technologies, USA)
- Termoblok (Labnet, Finsko)
- Termostat lážňový (Huber, CZ)
- Termostat s magnetickou míchačkou (IKA, NSR)
- TransBlot Turbo transferový systém (Bio-Rad, USA)
- Transiluminátor (East-Port, CZ)
- Třepačka stolní (IKA, NSR)
- Tycho NT.6 (Nanotemper, NSR)
- Ultracentrifugační kyvety Amicon 30 000 Da (Sigma-Aldrich, USA)
- UV/Vis spektrofotometr (WPA, Biochrom, UK)
- Váhy předvážky (OHAUS, USA)
- Vortex (IKA, NSR)



- Zdroj stejnosměrného napětí (Bio-Rad, USA)

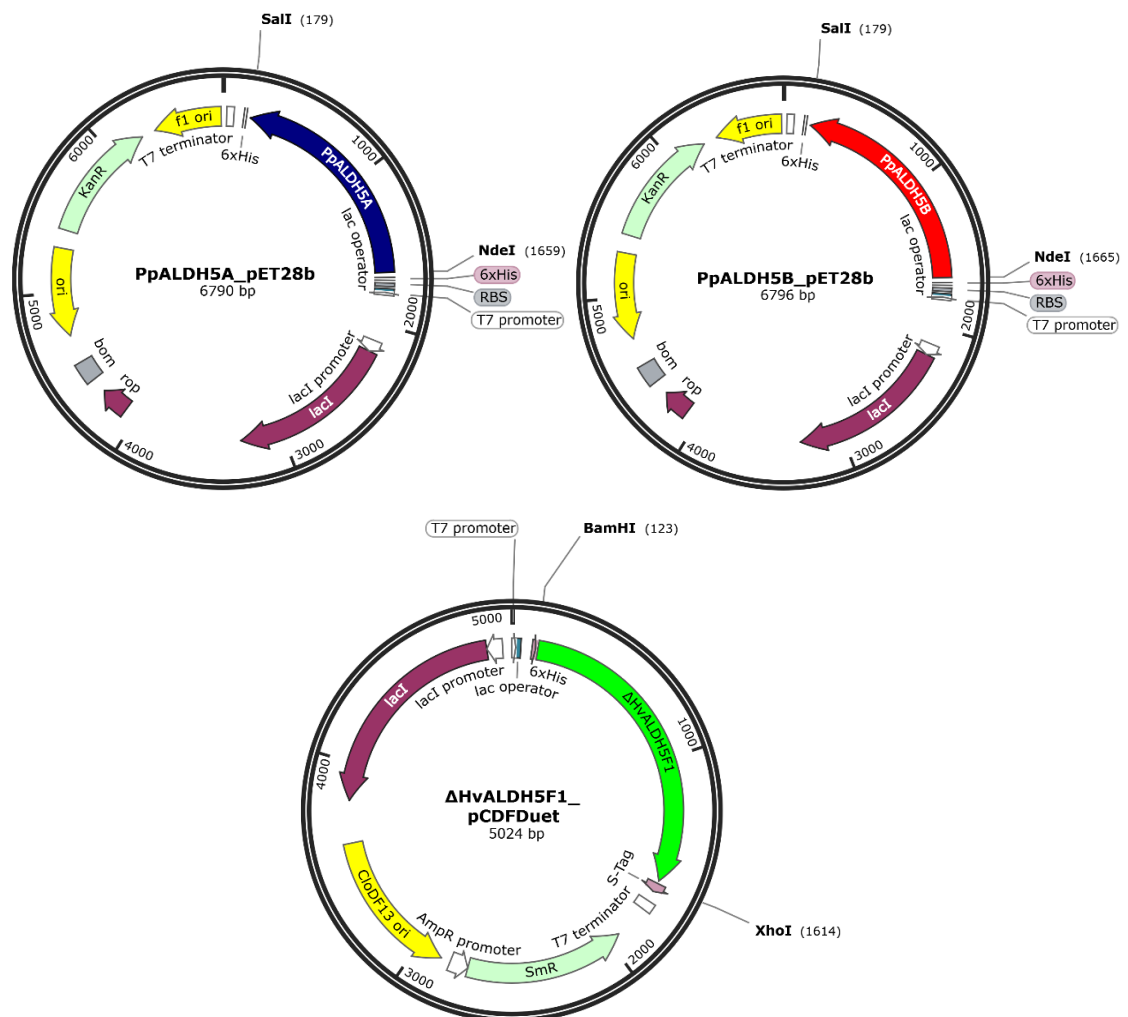
### **3.1.4 Použitý software**

- Biorender (Biorender, Kanada)
- Biovia Draw 2021 (Dassault Systèmes, Francie)
- ChromLab (Bio-Rad, USA)
- MEGAX (Kumar, Stecher a Tamura, 2018)
- Muscle (Edgar, 2004)
- SnapGene Viewer 5.1.5 (GSL Biotech LLC)
- Spectra Manager (JASCO, NSR)
- WebLogo 3.0 (Schneider a Stephens, 1990; Crooks *et al.*, 2004)

## 3.2 Metody

Pro přípravu rekombinantních proteinů byla použita strategie T4 klonování, kdy po PCR amplifikaci, izolaci amplifikované DNA vybraných genů *PpALDH5A* a *PpALDH5B* (Příloha 1) a její ošetření restričními enzymy *SalI* a *NdeI* byly sekvence ligovány do plasmidu pET28b. Plasmid pET32b nesoucí gen pro  $\Delta$ HvALDH5 protein (Příloha 1) byl připraven vedoucí cvičení. Na obrázku 8 jsou zachyceny mapy jednotlivých plasmidů včetně vyznačených restričních míst použitých pro ligaci genu do plasmidu.

Jako selekční antibiotikum byl v případě plasmidů pET28b použit kanamycin ve finální koncentraci 50  $\mu$ g/ml v tekutém i pevném LB-médiu. U kolonií nesoucí plasmid pCDFDuet byl použit streptomycin o finální koncentraci 100  $\mu$ g/ml.



Obr. 8 Mapy připravovaných konstruktů PpALDH5A/pET28b, PpALDH5B/pET28b a  $\Delta$ <sup>1-32</sup>-HvALDH5/pCDFDuet. U konstruktů s pET28b bylo k ligaci využito lepivých konců vzniklých restrikcí enzymy *SalI* a *NdeI*. Při přípravě konstruktů plasmidu pCDFDuet byly k ligaci využity lepivé konce vzniklé ošetřením plasmidu a ligované sekvence genu pomocí enzymů *BamHI* a *XhoI*. Restriční mapy byly vytvořeny pomocí softwaru SnapGene Viewer.

### 3.2.1 Příprava konstruktů s polyhistidinovou kotvou pro expresi rekombinantních proteinů PpALDH5A, PpALDH5B

PCR amplifikace genů *PpALDH5A* a *PpALDH5B* (Q5 HF DNA polymerasa – NEB):

Do jednotlivých 200 $\mu$ l mikrozkušavek byla dle tabulky 1 přidána reakční směs. Program PCR reakce byl nastaven následujícím způsobem:

- iniciační denaturace – 98 °C 30 s;
- 35 cyklů:
  - o denaturace 98 °C 10 s,
  - o hybridizace primerů 63,6 °C (*PpALDH5A*) a 63,4 °C (*PpALDH5B*) 30 s (primery Příloha 2)
  - o syntéza 72 °C 1 min
- závěrečná extenze – 72 °C 5 min
- chlazení výsledného produktu – 4 °C

Tab. 1 Jednotlivé složky reakční pro PCR reakci (Q5 HF polymerasa – New England Biolabs)

Reagencie	Objem [ $\mu$ l]
5X Q5 reakční směs	5
10mM dNTPs	0,5
10 $\mu$ M posměrný primer	1,25
10 $\mu$ M reverzní primer	1,25
templátová cDNA čepenky odstálé	1 $\mu$ g
Q5 DNA polymerasa	0,25
voda	16,75

### Agarosová elektroforéza:

Na přípravu 1% (w/v) agarosového gelu bylo do Erlenmeyerovy baňky naváženo 0,5 g agarosy, ke které se přidalo 50 ml 1x TAE pufru. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarosy. Po ochlazení agarosy bylo přidáno 35  $\mu$ l 10% (w/v) ethidium bromidu. Roztok byl přelit do vnitřní části horizontální elektroforetické komůrky na přípravu agarosového gelu. Pro vytvoření jamek byl do komůrky přidán hřebínek.

Během tuhnutí agarosového gelu byly připraveny jednotlivé vzorky, ke kterým byl přidán vzorkovací pufr v poměru 1:5.

Po ztuhnutí gelu byl hřebínek opatrně vyjmut a agarosový gel byl na podložce přenesen do vnější části elektroforetické komůrky. Do této komůrky byl následně po rysku nalit TAE elektrodový pufr.

Do první jamky byl napipetován standard DNA GeneRuler 1 kb marker (5  $\mu$ l). Do dalších jamek byly napipetovány jednotlivé vzorky. Elektroforetická komůrka byla bezpečnostním krytem uzavřena a připojena ke zdroji napětí 100 V po dobu 30 minut (v případě následné izolace DNA z gelu bylo kvůli snížení rizika poškození DNA nutné provést elektroforézu v co nejkratším čase za sníženého napětí 60 V). Průběh elektroforézy je možné sledovat dle pohybu pásů barev ve vzorkovacím pufru (spodní pás odpovídá DNA o velikosti 300 bp a horní o velikosti 3000 bp).

Po uplynutí požadované doby byl zdroj vypnut, elektrody odpojeny a gel na podložce vyjmut z elektroforetické komůrky na podložku pro záznam pomocí UV scanneru.

### Izolace DNA z agarosového gelu (Macherey – Nagel):

Agarosový gel na podložce byl přenesen na UV transiluminátor pro zviditelnění jednotlivých bandů. Band o požadované velikosti byl pomocí skalpelu vyříznut z gelu, přenesen do 2ml mikrozkušavky a zvážen. Na základě hmotnosti byl ke gelu přidán NTI pufr v poměru 100 mg gelu/ 200  $\mu$ l NTI a směs byla zahřívána při teplotě 50 °C do rozpuštění gelu.

Po rozpuštění gelu byl roztok přenesen na mikrokolonu a centrifugován (11 000 · g, 30 s). Roztok, jenž protekl, byl vylit a mikrokolona byla promyta dvakrát 700  $\mu$ l promývacího pufru (centrifugace 11 000 · g, 30 s). Pro úplné odstranění ethanolu obsaženého v promývacím pufru byla mikrokolona naprázdno centrifugována při (11 000 · g, 1 min). Mikrokolona byla přenesena do 1,5ml mikrozkušavky a bylo přidáno celkem 30  $\mu$ l elučního pufru vytemperovaného na 70 °C. Po uplynutí 5minutové inkubační doby

byla kolona centrifugována při (11 000 · g, 1 min). Eluce byla provedena ve dvou krocích. Pro určení koncentrace izolované DNA bylo použito spektrofotometrické stanovení DNA pomocí spektrofotometru Nanodrop.

Štěpení cílové DNA a plasmidu pET28b pomocí restričních endonukleas:

Ke vzorkům DNA a plasmidu pET28b o objemu 40 µl bylo přidáno po 5 µl CutSmart pufru, 2,5 µl SalI a 2,5 µl NdeI. Reakční směs byla inkubována při 37 °C přes noc. Pro přečištění naštípané DNA byla použita agarosová elektroforéza s následnou izolací DNA z gelu pomocí mikrokolon (Macherey – Nagel).

Ligace *PpALDH5A* a *PpALDH5B* do pET28b:

Na základě vzorce pro výpočet požadovaného templátové DNA do reakční směsi a tabulky 2 byly připraveny reakční směsi ligace *PpALDH5A* a *PpALDH5B* do pET28b. Reakce probíhala po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.

Vzorec pro výpočet požadované hmotnosti templátové DNA (uvedeno na příkladu ligace *PpALDH5A*:

$$m \text{ [ng]} = \frac{\text{ředění} \cdot \text{velikost insertu [bp]} \cdot \text{množství plasmidu [ng]}}{\text{velikost plasmidu [bp]}}$$

$$m \text{ [ng]} = \frac{3 \cdot 1473 \cdot 100}{5330} = 82,90 \text{ ng}$$

Tab. 2 Jednotlivé složky reakční pro ligaci cílové sekvence do plasmidu

Reagencie	Objem [µl]
<i>PpALDH5A/PpALDH5B</i>	3 / 5,5
pET28b	3
reakční pufr	1
T4 ligasa	0,5
voda	do 10 µl

### Transformace DNA konstruktů do buněk Neb 10β (*E. coli*):

Mikrozkumavka s 25 µl suspenze kompetentních buněk byla inkubována po 10 minut na ledu. Po uplynutí této doby bylo přidáno 5 µl roztoku DNA konstruktů. Suspenze byla promíchána kývavým pohybem mikrozkumavky a inkubována po dobu 20 minut na ledu. Následně byla inkubována 30 s při 42 °C a poté 5 minut opět ponechána na ledu. Do mikrozkumavky bylo přidáno 125 µl SOC – růstového média. Poté proběhla inkubace při 37 °C po dobu 1 hodiny pro nárůst buněk. Suspenze byla přenesena na Petriho misku s LB – růstovým agarem s přidavkem selektivního antibiotika. Pro nárůst transformovaných bakterií byla Petriho miska inkubována při 37 °C přes noc.

### Selekce buněčných kolonií s transformovaným DNA konstruktem pomocí PCR:

Pro selekci kolonií byl použit PCR screening. Vybrané kolonie byly inokulovány na druhou Petriho misku s LB – růstovým agarem. Půlka z každé kolonie byla přenesena do 1,5ml mikrozkumavek s 20 µl vody. Suspenze byla inkubována při 100 °C po dobu 5 minut a následně centrifugována (12 000 · g, 10 min).

Do 100µl mikrozkumavek byla napipetována reakční směs pro PCR (tabulka 3) a T7 primery.

Program PCR reakce byl nastaven následujícím způsobem:

- iniciační denaturace – 98 °C 30 s;
- 35 cyklů:
  - o denaturace 98 °C 10 s,
  - o hybridizace T7 primerů 50 °C 10 s
  - o syntéza 72 °C 1 min
- závěrečná extenze – 72 °C 5 min
- chlazení výsledného produktu – 4 °C

Výsledné PCR produkty byly podrobeny agarosové elektroforéze.

Tab. 3 Jednotlivé složky reakčních směsí pro PCR screening

DreamTaq Green	Objem [µl]	Platinum SupreFi	Objem [µl]
DreamTaq reakční směs	10	Platinum reakční směs	6,25
10µM T7 posměrný primer	1	10µM T7 posměrný primer	0,75
10µM T7 reverzní primer	1	10µM T7 reverzní primer	0,75
templát DNA	10	templát DNA	4,75

### Příprava kultur a izolace plasmidové DNA (Promega):

U pozitivně testovaných kolonií PCR screeningem bylo potřeba provést namnožení požadovaného konstruktů. Pozitivně testované kolonie byly z LB – růstového agarů na označené Petriho misce inokulovány do 10 ml LB – média s příslušným selekčním antibiotikem. Kultury byly inkubovány při 37 °C přes noc.

Po nárůstu kolonií byly zkumavky se suspenzemi centrifugovány (6 000 · g, 5 min, 20 °C). Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 250 µl resuspendačního roztoku. Suspenze byla důkladně promíchána a pomocí pipety přenesena do 2ml mikrozkuvek. K suspenzi bylo napipetováno 250 µl lyzačního roztoku a 10 µl alkalické proteasy. Tato směs byla otočením zkumavky promíchána, inkubována po dobu 5 minut. Reakce sloužící k lýze buněk byly ukončeny přidáním 350 µl neutralizačního roztoku. Pro oddělení kapalnó fáze od pevné byly mikrozkuvky centrifugovány (16 000 · g, 30 min).

Supernatant byl dekantován na mikrokolony a centrifugován (16 000 · g, 1 min). Mikrokolony byly dvakrát promyty 750 µl a 250 µl promývacího roztoku a zcentrifugovány (16 000 · g, 1 min). Pro úplné odstranění ethanolu obsaženého v promývacím roztoku bylo nutné mikrokolony centrifugovat naprázdno (16 000 g, 2 min). Eluce byla provedena 100 µl vody (centrifugace 16 000 · g, 1 min).

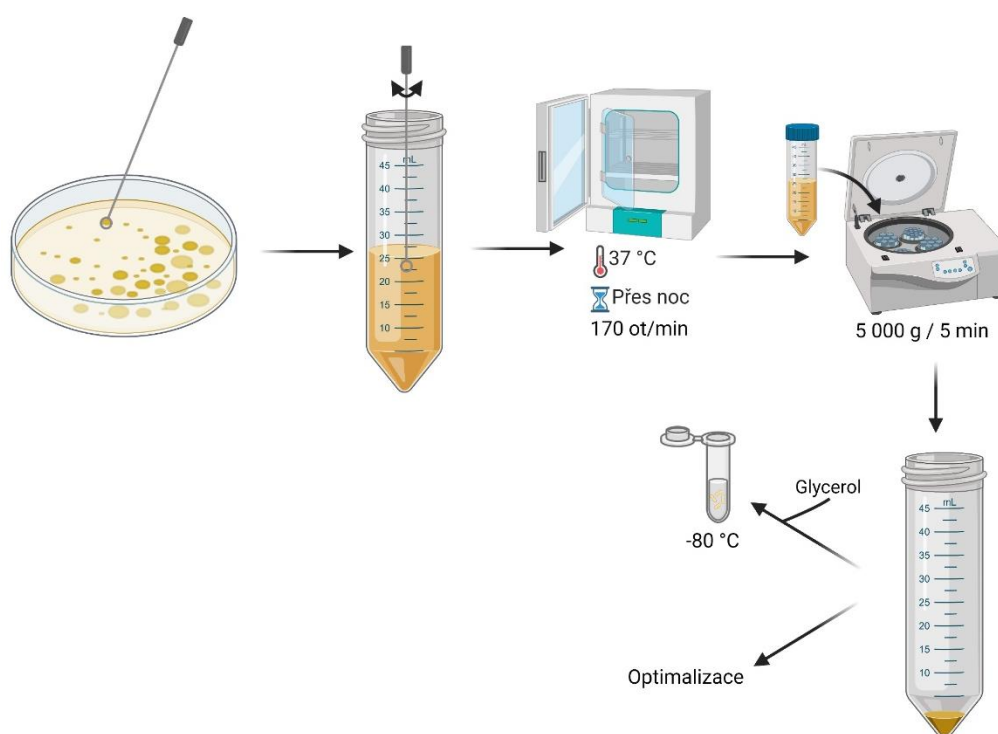
Získané roztoky plasmidů byly příslušným způsobem naředěny a pro kontrolu sekvence cílové DNA poslány na sekvenaci (Sangerovo sekvenování).

### 3.2.2 Optimalizace exprese rekombinantních proteinů v expresních buňkách *E. coli*

#### Porovnání exprese rekombinantních proteinů v různých expresních kmenech *E. coli*

Plasmidy nesoucí příslušné geny byly transformovány do expresních buněk T7 a Rosetta 2 *E. coli* (postup viz 3.2.1 Transformace DNA konstruktů do buněk *E. coli*). Kultura byla inokulována na LB-agar s antibiotikem a inkubována při 37 °C přes noc (obr. 9). Rostoucí kolonie nesoucí plasmidy byly přeočkovány do 20 ml LB-média s příslušným antibiotikem (inkubace 37 °C přes noc).

Na druhý den byly prekultury centrifugovány (5 min, 5000 · g, 21 °C) a naředěny do 2 ml LB-média. Pro skladování transformovaných expresních buněk bylo odebráno 500 µl suspenze do sterilní mikrozkušavky a po přidání glycerolu (koncentrace 5 % (V/V)) byly mikrozkušavky zmrazeny (-80 °C).



Obr. 9 Schéma postupu selekce transformovaných klonů a přípravy zásobní kultury. Na LB-agaru se selekčním antibiotikem narostly jen kolonie buněk s transformovaným konstruktem nesoucím gen pro rezistenci vůči danému antibiotiku. Pozitivní kolonie byly inokulovány do tekutého LB-média s antibiotikem a inkubovány při 37 °C přes noc. Na druhý den byla suspenze centrifugována (5 000 · g, 5 min), naředěna ve 2 ml LB-média a buď použita pro nárůst kultur, nebo uskladněna při -80 °C. Obrázek byl vytvořen pomocí softwaru Biorender.



Zbylé suspenze byly naředěny do 10 ml LB-média s příslušným antibiotikem a inkubovány při 30 °C do nárůstu  $OD_{600}$  na hodnotu 0,8 – 1,0. Do zkumavek byl pro indukci exprese rekombinantních proteinů přidán IPTG na koncentraci  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Kultury s IPTG byly inkubovány při 20 °C po dobu 16 h. Po uplynutí doby inkubace bylo z jednotlivých kultur odebráno po 1 ml kultury naředěné na  $OD_{600} = 0,8$ . Zkumavky s kulturami byly centrifugovány (5 min,  $5000 \cdot g$ , 21 °C), supernatant byl odstraněn a pelety byly rozředěny ve  $40 \mu\text{l}$   $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  močoviny. Takto připravené vzorky byly podrobeny SDS-PAGE.

#### Optimalizace koncentrace IPTG

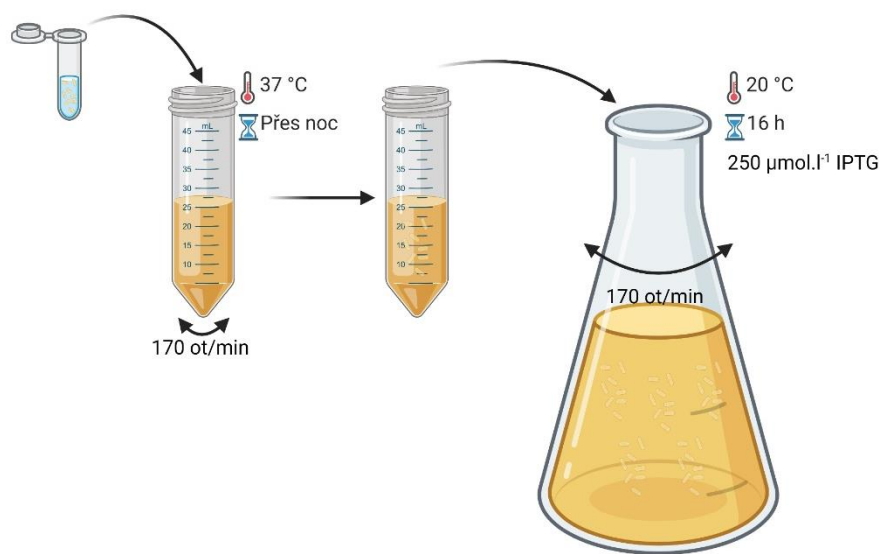
Po nárůstu prekultury a centrifugaci (5 min,  $5000 \cdot g$ , 21 °C) byla suspenze naředěna 70 ml LB-média s příslušným antibiotikem a rozdělena po 10 ml do šesti 50ml zkumavek. Kultury ve zkumavkách byly inkubovány při 30 °C do nárůstu  $OD_{600}$  na hodnotu 0,8 – 1,0. Do takto připravených kultur byl pro indukci exprese rekombinantních proteinů přidán IPTG na finální koncentrace 50, 75, 100, 150, 250 a  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Kultury s IPTG byly inkubovány při 20 °C po dobu 16 h. Po uplynutí doby inkubace bylo z jednotlivých kultur odebráno po 1 ml kultury naředěné na  $OD_{600} = 0,8$ . Zkumavky s kulturami byly centrifugovány (5 min,  $5000 \cdot g$ , 21 °C), supernatant byl odstraněn a pelety byly rozředěny ve  $40 \mu\text{l}$   $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  močoviny. Takto připravené vzorky byly podrobeny SDS-PAGE.

### 3.2.3 Exprese rekombinantních proteinů v expresních buňkách *E. coli*

Do 50ml zkumavky s 20 ml LB-média s příslušným antibiotikem bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  zásobní buněčné suspenze transformovaných expresních buněk (Rosetta 2 *E. coli*). Takto inokulované médium bylo inkubováno při 37 °C přes noc.

Na druhý den byla kultura po centrifugaci (5 min, 5000 · g, 21 °C) přenesena do 200 ml LB-média s příslušným antibiotikem. Inokulované médium bylo inkubováno při 30 °C do nárůstu OD<sub>600</sub> na hodnotu 0,8 – 1,0. Do takto připravených kultur byl pro indukci exprese rekombinantních proteinů přidán IPTG na finální koncentraci 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Kultura s IPTG byla inkubována při 20 °C po dobu 16 h.

Po uplynutí doby inkubace byla kultura přenesena do 250ml kyvet a suspenze centrifugována (20 min, 7000 · g, 8 °C). Supernatant byl odstraněn a sediment rozpuštěn ve 30 ml 0,9% (w/v) roztoku NaCl. Suspenze byla přenesena do 50ml zkumavek a centrifugována (10 min, 6000 · g, 8 °C). Supernatant byl opět odstraněn a sediment buněk byl uchován při -20 °C. Schéma celého postupu je zobrazeno na obrázku 10.



Obr. 10 Schéma přípravy expresní kultury pro tvorbu studovaných proteinů. Ze zásobní kultury uchované při -80 °C bylo do LB-média se selekčním antibiotikem přidáno 25  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze. Takto inokulované médium bylo inkubováno při 37 °C přes noc. Na druhý den byla suspenze centrifugována (5 000 · g, 5 min), naředěna do objemu 200 ml LB-média s antibiotikem a inkubována při 30 °C. Po nárůstu počtu kolonií byla pro indukci exprese proteinů do suspenze přidána IPTG o finální koncentraci 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 3.2.4 Extrakce a purifikace proteinů PpALDH5A, PpALDH5B a $\Delta$ HvALDH5

Sedimenty se po vytažení z mrazničky (-20 °C) nechaly rozpustit na ledu. Po rozmrazení byly do zkumavek přidány roztoky pufru a chloridu hořečnatého spolu s reagensy B-PER a inhibítorem proteas (tabulka 4). Suspenze byla důkladně vortexována a po rozpuštění sedimentu inkubována při pokojové teplotě po dobu 10 minut.

Po uplynutí inkubační doby bylo potřeba homogenizovat buněčné suspenze. Homogenizace byla provedena pomocí French press homogenizátoru (23 500 Psi). Získaný homogenát byl následně zbaven nukleových kyselin přidáním 5  $\mu$ l DNasy a 5  $\mu$ l RNasy (inkubace 30 min 37 °C). Poté byl k lyzátu přidán roztok NaCl na finální koncentraci 50 mmol·l<sup>-1</sup> a směs byla doplněna vodou na výsledný objem 5 ml. Lyzát byl poté centrifugován (30 min, 10 000 · g, 8 °C).

Pro purifikaci rekombinantních proteinů pomocí afinitní chromatografie bylo využito systému rychlé proteinové kapalinové chromatografie (FPLC – BioRad) s histidinovou pastí (HisTrap kolona s nikelnatými kationty). V průběhu inkubace s nukleasami a následné centrifugace bylo nutné promýt kolonu milli-Q vodou a provést její ekvilibraci pomocí ekvilibračního pufru (tabulka 5). Po provedení ekvilibrace se v softwaru ChromLab nastavily parametry metody (rychlost průtoku, objem dávkovací smyčky, objem sbíraných frakcí, gradient elučního pufru, celkový objem).

Tab. 4 Jednotlivé složky lyzačního pufru

	Složka	Koncentrace [mmol·l <sup>-1</sup> ]	Finální koncentrace [mmol·l <sup>-1</sup> ]	Objem [ $\mu$ l]
Lyzační pufr	HEPES pH 8,2	400	50	500
	MgCl <sub>2</sub>	500	10	80
	B-PER	-	-	500
	Inhibitor proteas	-	-	50
	NaCl	5 000	50	40
	Milli-Q H <sub>2</sub> O	-	-	do 4 ml

Tab. 5 Jednotlivé složky pufrů použitých při afinitní chromatografii

Pufr	Složka	Koncentrace [mmol·l <sup>-1</sup> ]	Finální koncentrace [mmol·l <sup>-1</sup> ]	Objem [ml]
Ekvilibrační pufr	HEPES pH 8,2	400	20	50
	NaCl	5 000	50	4
	Milli-Q H <sub>2</sub> O	-	-	do 400 ml
Eluční pufr	HEPES pH 8,2	400	20	7,5
	NaCl	5 000	50	1,5
	Imidazol	2 000	500	37,5
	Milli-Q H <sub>2</sub> O	-	-	do 150 ml
Promývací pufr	HEPES pH 8,2	400	50	12,5
	Milli-Q H <sub>2</sub> O	-	-	do 100 ml

Získaný supernatant byl po spuštění pomocí injekční stříkačky přenesen na kolonu a podroben separaci. Na základě hodnoty absorbance při vlnové délce  $\lambda = 280$  nm byly sesbírány frakce, které byly následně zakoncentrovány pomocí ultracentrifugačních kyvet s propustností do 30 kDa (Amicon). Čistota jednotlivých frakcí byla ověřena pomocí SDS-PAGE gelové elektroforéze v kombinaci s Western Blottingem. Frakce obsahující čistý protein byly následně promyty promývacím pufr pro odstranění imidazolu.

#### Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Příprava vzorků: Vzorky buněčných kultur suspendovaných v roztoku močoviny byly inkubovány při 100 °C po dobu 5 minut. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky krátce centrifugovány. Z mikrozkušavek bylo odebráno 30  $\mu$ l suspenze, k níž bylo přidáno 10  $\mu$ l Laemmliho vzorkovacího pufru. Směs byla znovu podrobena pětiminutové inkubaci při 100 °C a krátce centrifugována. V případě přípravy vzorků proteinů získaných během afinitní chromatografie byl k jednotlivým frakcím přidán Laemmliho vzorkovací pufr v poměru 3:1 a roztok byl následně inkubován při 100 °C a krátce centrifugován.

Příprava polyakrylamidového gelu: Obě skla byla důkladně očištěna a odmaštěna pomocí ethanolu. Po vysušení byla vložena do držáku a upevněna do nalévacího stojánu. Po kontrole správného sestavení aparatury byl připraven roztok separačního gelu (tabulka 6), který byl pomocí automatické pipety přenesen mezi skla pro tvorbu gelu. Pro získání rovného gelu byl roztok převrstven malým množstvím n-butanolu a polymerizován (30 – 40 minut). Po ztuhnutí separačního gelu byl n-butanol odsán pomocí filtračních papírů. Následně bylo potřeba připravit roztok gelu zaostřovacího

(tabulka 6), který byl navrstven na separační gel až po vrchní hranu skel. Do gelu byl opatrně vložen hřebínek pro tvorbu jednotlivých jamek a byl opět polymerizován (90 minut).

Provedení elektroforézy: Skla s polymerizovanými gely byla vyjmuta z držáku a vložena do elektroforetické cely tak, aby krycí sklo směřovalo směrem dovnitř cely. Pro zjednodušení byla na skla pomocí popisovače vyznačena dna jednotlivých jamek. Cely byla následně vložena do elektroforetické nádoby a naplněna elektrodoým pufrem. Po vyjmutí hřebínku byly do jednotlivých jamek napipetovány připravené vzorky a 5  $\mu$ l standardu molekulových hmotností. Nádoba byla naplněna elektrodoým pufrem, uzavřena víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Elektroforéza probíhala nejprve za napětí 100 V po dobu 20 minut, poté bylo napětí zvýšeno na 150 V. Elektroforéza byla ukončena, jakmile se migrující čelo gelu dostalo na spodní hranu skel. Skla byla vyjmuta z nádoby i cely a pomocí špachtle oddělena od sebe. Zaostrovací gel byl odříznut a dělicí gel byl opatrně přenesen do barvicího roztoku (Coomasie Brilliant Blue R-250). Obarvený gel byl na druhý den přenesen do odbarvovacího roztoku. Záznam odbarveného gelu byl proveden pomocí skeneru (Bio Rad).

Tab. 6 Jednotlivé složky roztoků separačního a zaostrovacího gelu (uvedeno na přípravu 2 gelů).

Separací gel (12%)	Objem	Zaostrovací gel (4%)	Objem
Milli-Q voda	3,2 ml	Milli-Q voda	2,95 ml
1,5mol·l <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	0,5mol·l <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
Akrylamid (30%)	4,0 ml	Akrylamid (30%)	0,65 ml
10% SDS	100 $\mu$ l	10% SDS	100 $\mu$ l
10% APS	50 $\mu$ l	10% APS	60 $\mu$ l
TEMED	15 $\mu$ l	TEMED	15 $\mu$ l

Western blot a detekce purifikovaných proteinů pomocí primární protilátky proti histidinové kotvě značené křenovou peroxidasou

Purifikované proteiny byly nejprve podrobeny SDS-PAGE elektroforéze (viz SDS-PAGE). Po vystřížení PVDF membrány o rozměrech shodných s rozměry polyakrylamidového gelu bylo pro snížení hydrofobicity nutné ponořit membránu do 100% (v/v) ethanolu (inkubace 4 minuty), do vody (2 minuty) a následně do Towbinova blotovacího pufru (tabulka 7). Do blotovacího pufru byly dále ponořeny 4 kusy Whatmanových blotovacích papírů a gel (2 minuty). Po uplynutí inkubační doby byly na dno blotovací kazety položeny 2 zvlhčené blotovací papíry, PVDF membrána, SDS-PAGE gel a další 2 vrstvy blotovacích papírů. Takto připravená kazeta byla pomocí víka s katodovou elektrodou uzavřena a uzamčena. Blotovací kazeta byla vložena do Trans-Blot Turbo transferového systému s přednastaveným programem pro blotování (proud 1,0 A, napětí 25 V, délka transferu 30 minut).

Membrána s transferovanými proteiny byla ošetřena následujícím postupem:

- Inkubace s blokovacím pufrem (10 ml, 1, hodina)
- Inkubace s primární protilátkou v blokovacím pufru (10 ml, 1 hodina)
- Promytí TBST pufrem (3 x 10 ml, 8 minut)
- Detekce proteinů využitím chemiluminiscenční reakce křenové peroxidasy s roztokem peroxidu vodíku a luminolu v poměru 1:1.

Tab. 7 Jednotlivé složky pufrů použitých pro Western blotting.

Pufr	Složka	Koncentrace	Pufr	Složka	Koncentrace
Towbinův pufr pH 8,3	Tris	25 mmol·l <sup>-1</sup>	TBS pH 7,6	Tris	50 mmol·l <sup>-1</sup>
	Glycin	20% (v/v)		NaCl	150 mmol·l <sup>-1</sup>
	Methanol	50% (v/v)			
TBST	Tween-20	0,05% (v/v)	Blokovací pufr	BSA	2,5% (m/v)
	TBS	-		TBST	-

### Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla použita pro analýzu kvartérní struktury zkoumaných proteinů. Byl využit systém FPLC (Bio-Rad) s připojenou kolonou Superdex 200 HR 10/300 GL (Amersham Biosciences, Švédsko) a 5ml dávkovací smyčkou. Pro stanovení molekulových hmotností proteinových frakcí byla sestrojena kalibrační závislosti molekulové hmotnosti na retenčním objemu (standard Bio-Rad Filtration Standard).

Po připojení kolony do FPLC systému bylo potřeba promýt kolonu destilovanou vodou a ekvilibrovat pomocí pufru (odpovídá ekvilibračnímu pufru tabulka 5). V softwaru ChromLab byly nastaveny parametry metody (celkový objem chromatografie, objem kolony, průtoková rychlost, objem sbíraných frakcí, tabulka 8) a po spuštění metody byl do smyčky pomocí injekční stříkačky aplikován vzorek proteinu získaného při afinitní chromatografii. Na základě chromatografu byly odečteny retenční objemy jednotlivých píků, pomocí kterých byla zjištěna molekulová hmotnost separovaného proteinu.

Tab. 8 Nastavení jednotlivých fází chromatografické metody

Fáze chromatografie	Průtoková rychlost [ml/min]	Objem [ml]
Ekvilibrace	0,7	2
Aplikace vzorku	0,7	5 + 2
Eluce	0,7	22

### Stanovení koncentrace proteinu Bradfordovou metodou

Pro stanovení koncentrace purifikovaného proteinu bylo nutné stanovit kalibrační závislost koncentrace proteinu na absorbanci při vlnové délce  $\lambda = 595$  nm.

Naředěním proteinového standardu dle přiloženého protokolu (BSA proteinový standard 2 mg/ml, Sigma Aldrich) byly získány roztoky o koncentraci proteinu 0 – 1,5 mg/ml. Do 5 mikrozkušavek bylo přidáno 1,5 ml Bradfordova činidla spolu s 50  $\mu$ l roztoku proteinu. Jako slepý vzorek bylo k 1,5 ml Bradfordova činidla přidáno 50  $\mu$ l vody. Směsi byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Po uplynutí inkubační doby byla spektrofotometricky stanovena absorbance jednotlivých vzorků standardů při vlnové délce 595 nm. Získané absorbance byly vyneseny do grafu proti koncentraci proteinu.

50  $\mu$ l purifikovaných proteinů bylo přidáno k 1,5 ml Bradfordova činidla. Po desetiminutové inkubaci při pokojové teplotě byly naměřeny absorbance při vlnové délce 595 nm.

Koncentrace purifikovaných proteinů jsou důležitým parametrem potřebným pro následující výpočty kinetických parametrů a cirkulárního dichroismu. Z kalibrační závislosti koncentrace proteinů na absorbanci byla odvozena následující rovnice:

$$\rho_A = \frac{A_{595} - 0,0484}{0,0009}$$

$\rho_A$  ...hmotnostní koncentrace [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]

$A_{595}$  ...absorbance při vlnové délce 595 nm



### 3.2.5 Stanovení kinetických parametrů

Pro stanovení pH optima, substrátové specifity,  $K_M$ ,  $V_{lim}$  a  $k_{cat}$  pro substrát a koenzym všech studovaných enzymů bylo využito Warburgova optického testu pro spektrofotometrické stanovení redukovaného NAD(P)H ( $A_{340}$ ). Vlivem redukce NAD(P)<sup>+</sup> na NAD(P)H dochází k posunu absorpčního maxima z vlnové délky 260 nm na 340 nm (Warburg, 1923). Měření probíhalo v křemenných kyvetách po dobu 2 minut s 5sekundovými intervaly měření.

Veškeré reagenty byly před měřením temperovány na teplotu 30 °C. Reakční směs tvořil pufr (finální koncentrace 50 mmol·l<sup>-1</sup>), do nějž byl přidán enzym s koenzymem o požadované koncentraci a redukční činidlo dithiothreitol (DTT,  $c = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Tento roztok sloužil rovněž jako blank. Reakce byla odstartována přidáním substrátu.

#### pH optimum

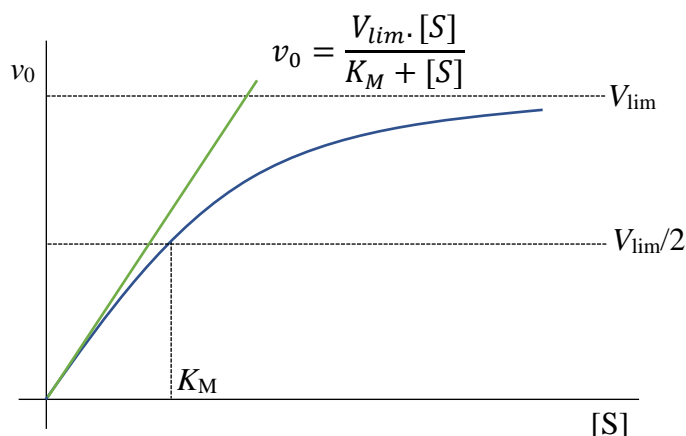
Na stanovení pH optima byly použity Britton-Robinsonovy pufrы v rozmezí pH 6,5 – 10.

#### Substrátová specifita

Pro stanovení substrátové specifity byly využity zástupci ze skupin alifatických (propanal, butanal, pentanal) a aromatických (benzaldehyd, fenylpropionaldehyd) aldehydů, semialdehydů (sukcinyl-4-semialdehyd – SSAL, glutamyl-5-semialdehyd – GSAL, glutaryl-5-semialdehyd – GRSAL) a aminosemialdehydů ( $\gamma$ -aminobutyraldehyd – ABAL) (obr. 11).

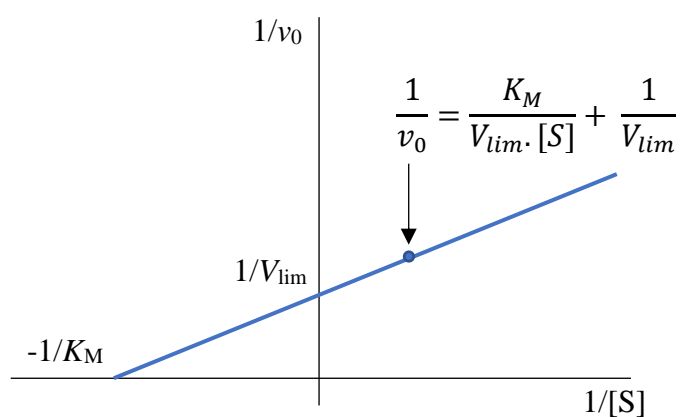
#### Stanovení $K_M$ , $V_{lim}$ a $k_{cat}$

Pro stanovení kinetických parametrů pro substrát bylo potřeba získat graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu odpovídající závislosti dle Michaelise a Mentenové (obr. 11). Pro tyto účely byla zjištěna rychlost enzymatické reakce při 12-16 různých koncentracích substrátu za konstantní koncentrace koenzymu rovné koncentraci saturační. Stanovení kinetických parametrů pro koenzymy bylo provedeno při 12-16 různých koncentracích koenzymů za konstantní koncentrace substrátu odpovídající limitní rychlosti enzymatické reakce (Michaelis a Mentenová, 1913).



Obr. 11 Graf závislosti okamžité rychlosti na koncentraci substrátu dle Michaelise a Mentenové.  $v_0$  – okamžitá rychlost [kat],  $V_{lim}$  – limitní rychlost [kat],  $[S]$  – molární koncentrace substrátu [ $\text{mol.l}^{-1}$ ],  $K_M$  – Michaelisova konstanta [ $\text{mol.l}^{-1}$ ].

Hyperbolický graf závislosti rychlosti chemické reakce na koncentraci substrátu neudává přesné hodnoty limitní rychlosti, proto je nutné provést dvojnásobně reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka (obr. 12), na základě kterého lze určit limitní rychlost i Michaelisovu konstantu přesněji. Záporná převrácená hodnota Michaelisovy konstanty odpovídá průsečíku grafu závislosti s osou x. Hodnotu převrácené limitní rychlosti lze získat stanovením průsečíku s osou y (Lineweaver a Burk, 1934).



Obr. 12 Graf závislosti převrácených hodnot okamžité rychlosti na koncentraci substrátu de Lineveavera a Burka.  $v_0$  – okamžitá rychlost [kat],  $V_{lim}$  – limitní rychlost [kat],  $[S]$  – molární koncentrace substrátu [ $\text{mol.l}^{-1}$ ],  $K_M$  – Michaelisova konstanta [ $\text{mol.l}^{-1}$ ].

Molární aktivita (číslo přeměny,  $k_{cat}$ ) lze vyjádřit jako podíl limitní rychlosti enzymu a molární koncentrace enzymu:

$$k_{cat} = \frac{V_{lim}}{[E]}$$

$k_{cat}$  ... číslo přeměny [ $s^{-1}$ ]

[E] ... molární koncentrace enzymu [ $nmol \cdot l^{-1}$ ]

$V_{lim}$  ... limitní rychlost [ $nmol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}$ ]

#### Preference alternativních koenzymů

Kromě substrátové specifity byla u enzymů studována preference vůči různým koenzymům, konkrétně  $NAD(P)^+$ , thio-nikotinamiadenindinukleotidu (thio- $NAD^+$ ,  $\lambda_{max} = 395$  nm), 3-acetylpyridinadenindinukleotidu ( $\lambda_{max} = 365$  nm), 3-pyridinaldehydadenindinukleotidu ( $\lambda_{max} = 358$  nm) a nikotinamid-hypoxanthinadenindinukleotidu ( $\lambda_{max} = 338$  nm). Oproti předchozím metodám byla aktivita enzymů měřená při vlnové délce odpovídající vlnové délce absorpčního maxima jednotlivých koenzymů.

### 3.2.6 Stanovení vlivu pH a iontové síly na stabilitu a sekundární strukturu proteinů

#### Cirkulární dichroismus

Pro stanovení vlivu pH a iontové síly na proteiny PpALDH5B a  $\Delta$ HvALDH5 bylo použito CD spektroskopie. Měření probíhalo v intervalu vlnových délek 250–197 nm. Výsledné křivky byly získány akumulací křivek z pěti měření.

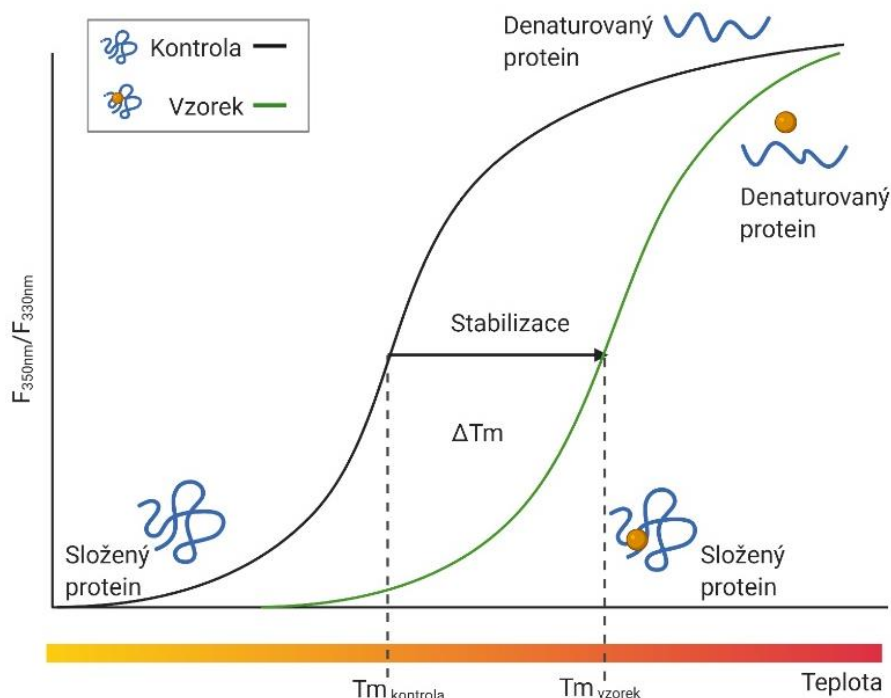
Před samotným měřením bylo nutné optimalizovat koncentraci proteinu ve vzorku. Oba enzymy byly použity ve finální koncentraci  $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pro určení vlivu pH byly použity Britton-Robinsonovy pufrы v rozmezí pH 7,57 – 9,53 o finální koncentraci  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V případě stanovení vlivu iontové síly byl použit  $20\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufr, pH 8,5 a fluorid sodný o finálních koncentracích v rozmezí 0 –  $600 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Do křemenných kyvet bylo napipetováno 400  $\mu\text{l}$  vzorku. Po upevnění kyvety do držáku spektroskopu byla metoda zahájena.

Získané křivky byly pomocí softwaru SpectraManager vyhlazeny. Získaná data byla zpracována pomocí softwaru (doplňit), kde na základě vybrané databáze spekter proteinů byl vyhodnocen poměr mezi  $\alpha$ -helikální a  $\beta$ -listovou strukturou.

#### Nano-Diferenční skenovací fluorimetrie (nanoDSF)

Vliv vazby ligandů, pH, typu pufru a iontové síly na stabilitu proteinů PpALDH5A, PpALDH5B a  $\Delta$ HvALDH5 byl stanovován pomocí nanoDSF. Tato metoda je založena na měření nárůstu fluorescence tryptofanových a tyrosinových residuí proteinu vlivem teplotní denaturace proteinu (obr. 14).



Obr. 13 Princip měření stability proteinu pomocí nanoDSF. Vlivem rostoucí teploty dochází ke ztrátě konformace proteinu. Při ztrátě konformace dochází k expozici residuů Tyr a Trp na povrchu proteinu. Jelikož se tato residua chovají jako fluorofory, dochází ke zvýšení intenzity fluorescence proteinu. V případě interakce specifických ligandů s proteinem může docházet ke změně teplotní stability proteinu, což se projeví jako změna výsledné teploty tání. Teplota tání je určena jako teplota odpovídající inflexnímu bodu naměřené závislosti fluorescence na teplotě.  $T_m$  – teplota tání [ $^{\circ}\text{C}$ ],  $F_{350\text{ nm}}/F_{330\text{ nm}}$  – poměr intenzity fluorescence při vlnové délce 350 a 330 nm. Vytvořeno v softwaru Biorender podle webu <https://2bind.com/nanodsf/> (14. března 2021).

Všechny vzorky byly používány při koncentraci  $0,1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pro určení vlivu pH byly použity Britton-Robinsonovy pufrы o pH 7,00, 8,08 a 9,02 (koncentrace  $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Po zjištění optimálního pH byla srovnána stabilita v pufrách Tris-HCl, Britton-Robinson a HEPES. V případě stanovení vlivu iontové síly byl použit  $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  HEPES pufr, pH 8,0 a chlorid sodný o finální koncentraci  $300\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

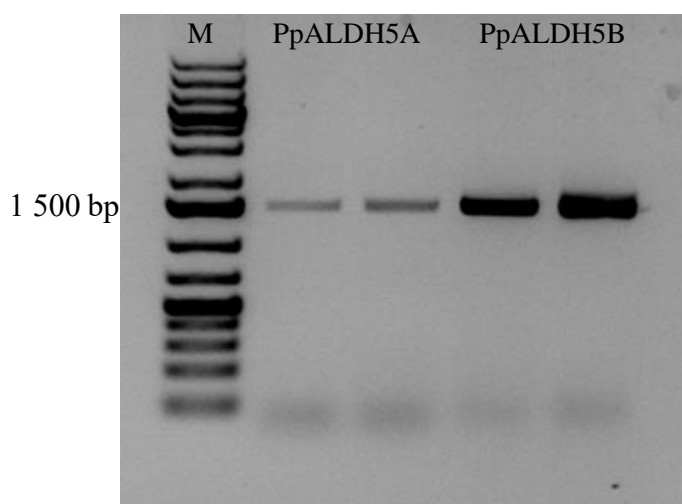
Po smíchání zkoumaného činidla s roztokem proteinu byl vzorek nasán do kapilár, které byly umístěny do držáku fluorimetru. Měření bylo spuštěno stisknutím ikony start. Přístroj automaticky vyhodnotil získané hodnoty ve formě grafu závislosti intenzity fluorescence na teplotě, poměru fluorescence  $F_{350}/F_{330}$  a první derivace získané křivky.

## 4 VÝSLEDKY

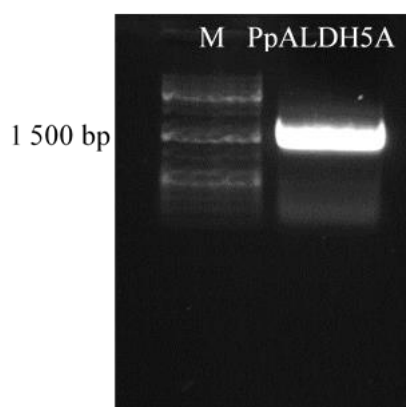
### 4.1 Příprava konstruktů s polyhistidinovou kotvou pro expresi rekombinantních proteinů PpALDH5A a PpALDH5B

#### 4.1.1 PCR amplifikace genů PpALDH5A a PpALDH5B (Q5 HF DNA polymerasa – NEB)

DNA genu *PpALDH5B* (obr. 14) byla úspěšně amplifikována v dostatečném množství pro izolaci. V případě DNA genu *PpALDH5A* (obr. 15) bylo potřeba použít větší množství templátové cDNA čepenky odstálé.



Obr. 14 Elektroforeogram PCR amplifikace *PpALDH5A* a *PpALDH5B* (Q5 HF DNA polymerasa – NEB). Byly použity specifické primery pro *PpALDH5A* ( $T_m = 63,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a *PpALDH5B* ( $T_m = 63,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) s extenzemi pro štěpení pomocí restričních endonukleas Sal I a Nde I. M – standard GeneRuler 1kb DNA Ladder.



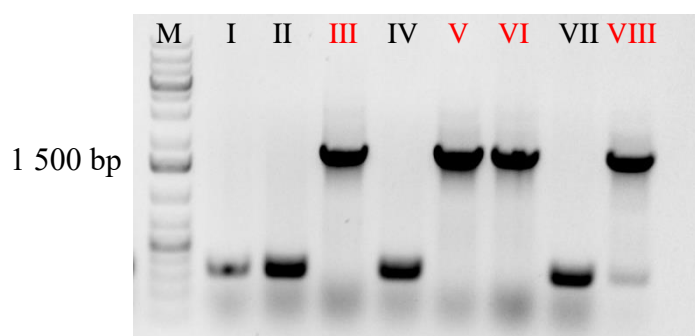
Obr. 15 Elektroforeogram PCR amplifikace *PpALDH5A* (Q5 HF DNA polymerasa - NEB). Použity specifické primery pro *PpALDH5A* ( $T_m = 63,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) s extenzemi pro štěpení pomocí restričních endonukleas Sal I a Nde I. M – standard GeneRuler 1kb DNA Ladder.

#### 4.1.2 Selekce buněčných kolonií *Neb 10β* obsahujících pET28b pomocí

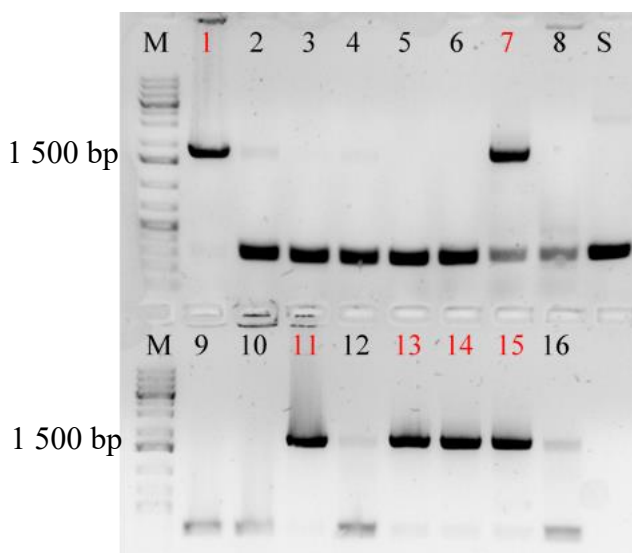
##### PCR:

Pomocí PCR screeningu kolonií *PpALDH5B/pET28b* (obr. 16) *Neb 10β* byly jako pozitivní kolonie testovány označené číslicemi III, V, VI a VIII. U kolonie VIII však kromě bandu o velikosti mezi 1500–2000 bp byl patrný band o nižší velikosti. Proto byly pro další experimenty použity vzorky III, V a VI.

U kolonií *PpALDH5A/pET 28b Neb 10β* (obr. 17) byly jako pozitivní kolonie označené číslicemi 1, 7, 11, 13, 14, 15, z nichž pro další experimenty byly použity kolonie 1, 11, 13 a 14.



Obr. 16 PCR screening kolonií *Neb 10β* (DreamTaq Green polymerasa – NEB). Pro PCR reakci byly použity T7 primery ( $T_m = 50\text{ }^\circ\text{C}$ ). Předpokládaná velikost ampliconu *PpALDH5B* je mezi bandy 1500 bp a 2000 bp. Jako pozitivní byly označeny kolonie III, V, VI a VIII. M – standard GeneRuler 1kb DNA Ladder.



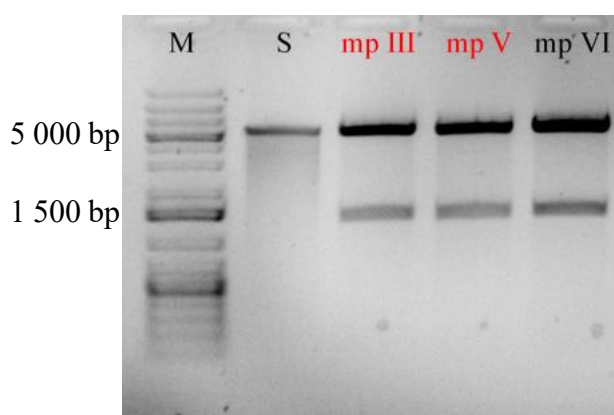
Obr. 17 PCR screening kolonií *Neb 10β* (Platinum SuperFi polymerasa – NEB). Pro PCR reakci byly použity T7 primery ( $T_m = 50\text{ }^\circ\text{C}$ ). Předpokládaná velikost ampliconu *PpALDH5A* je mezi bandy 1500 bp a 2000 bp. Jako pozitivní byly označeny kolonie 1, 7, 11, 13, 14 a 15. M – standard GeneRuler 1kb DNA Ladder, S – negativní kontrola (pET28b).

### 4.1.3 Kontrolní štěpení izolovaných plasmidů pomocí restričních endonukleas:

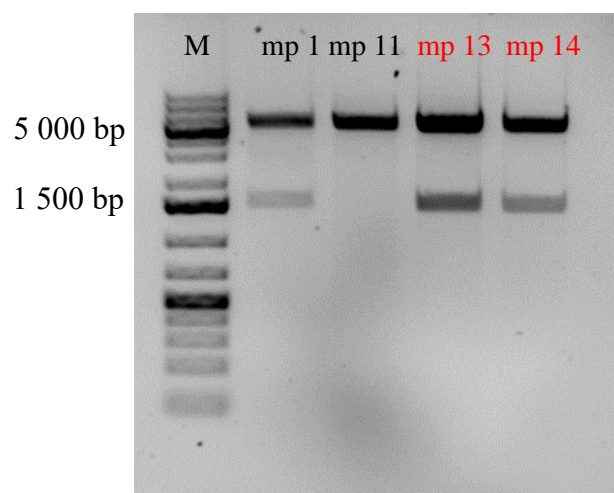
Pro sekundární kontrolu správnosti vložení sekvencí do vektoru pET28b byly opět použity restriční endonukleasy Sal I a Nde I.

V případě PpALDH5B/pET28b (obr. 18) u všech tří vzorků byly přítomny 2 bandy – jeden o velikosti odpovídající velikosti fragmentu *PpALDH5B* (1 500 – 2 000 bp) a druhý o velikosti odpovídající velikosti plasmidu pET28b (odpovídá bandu 5 000 bp). Na kontrolní sekvenaci byly poslány vzorky mp III a mp V.

U plasmidu PpALDH5A/pET28b (obr. 19) byly pozitivní mp 1, mp 13 a mp 14, z nichž na kontrolní sekvenaci byly poslány vzorky mp 13 a mp 14.



Obr. 18 Elektroforeogram kontrolního restričního štěpení plasmidu PpALDH5B/pET28b. Štěpení konstruktu bylo provedeno pomocí restričních endonukleas Sal I a Nde I. M – standard GeneRuler 1kb DNA Ladder.

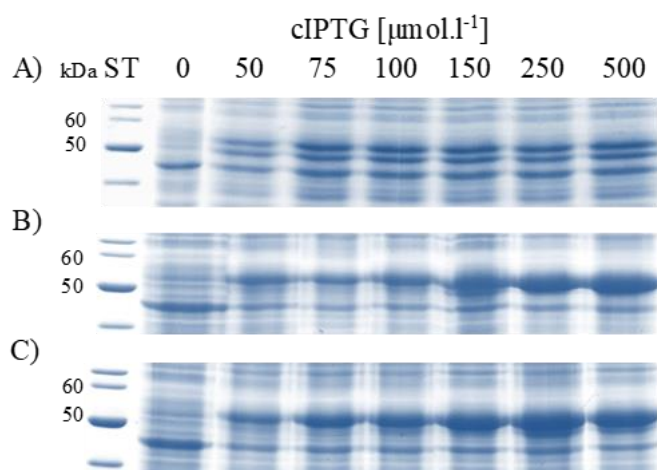


Obr. 19 Elektroforeogram kontrolního restričního štěpení plasmidu PpALDH5A/pET28b. Štěpení konstruktu bylo provedeno pomocí restričních endonukleas Sal I a Nde I. M – standard GeneRuler 1kb DNA Ladder.



## 4.2 Optimalizace koncentrace IPTG pro expresi rekombinantních proteinů v expresních buňkách *E. coli*

Na základě elektroforeogramu (obr. 20) je patrný vliv koncentrace IPTG na vzrůstající expresi rekombinantních proteinů. Pro dosažení optimálních podmínek exprese byla vybrána koncentrace  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Všechny 3 rekombinantní proteiny mají molekulovou hmotnost podjednotky odpovídající molekulové hmotnosti 53–55 kDa (obr. 20–24).



Obr. 20 Elektroforeogramy buněčných lyzátů buněčných kultur *E. coli* Rosetta s plasmidy PpALDH5A/pET28b (A), PpALDH5B/pET28b (B),  $\Delta\text{HvALDH5/pCDFDuet}$  (C). ST–standard (Unstained protein standard, broad range, 10 – 200 kDa, NEB), koncentrace IPTG 0, 50, 75, 100 150, 250 a  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

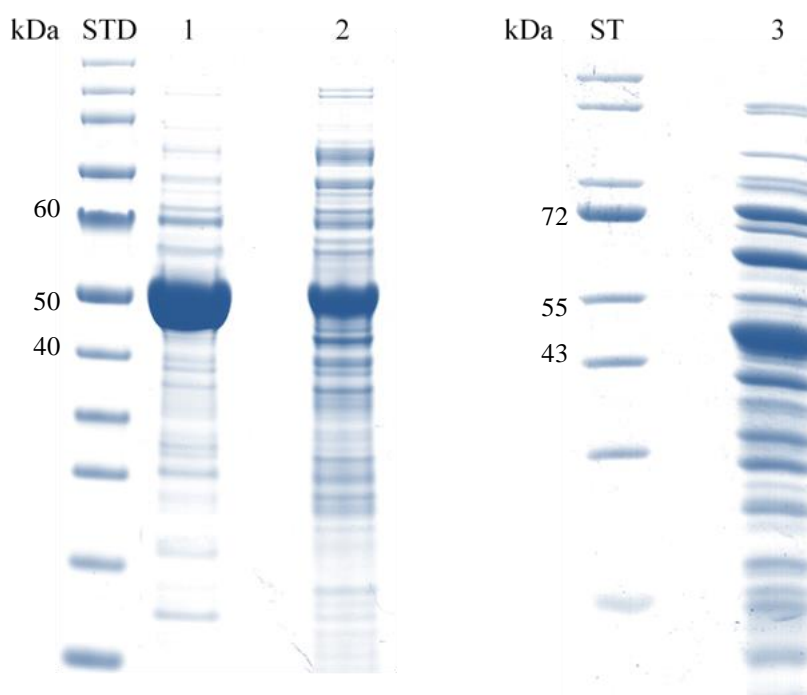
### 4.3 Purifikace proteinů PpALDH5A, PpALDH5B a $\Delta$ HvALDH5

V rámci purifikace jednotlivých proteinů pomocí afinitní chromatografie byly pro ověření čistoty sesbírávány jednotlivé frakce, které byly posléze podrobeny elektroforéze (obr. 21). Získané eluované frakce nebyly dostatečně čisté, a proto bylo k purifikaci proteinů 6·His-PpALDH5A (dále PpALDH5A) a 6·His-PpALDH5B (dále PpALDH5B) využito systému rychlé proteinové kapalinové chromatografie (FPLC) s histidinovou pastí (obr. 22). Pro 6·His- $\Delta$ HvALDH5 (dále jen  $\Delta$ HvALDH5) byla použita kombinace afinitní chromatografie s následnou gelovou permeační chromatografií (obr. 23)

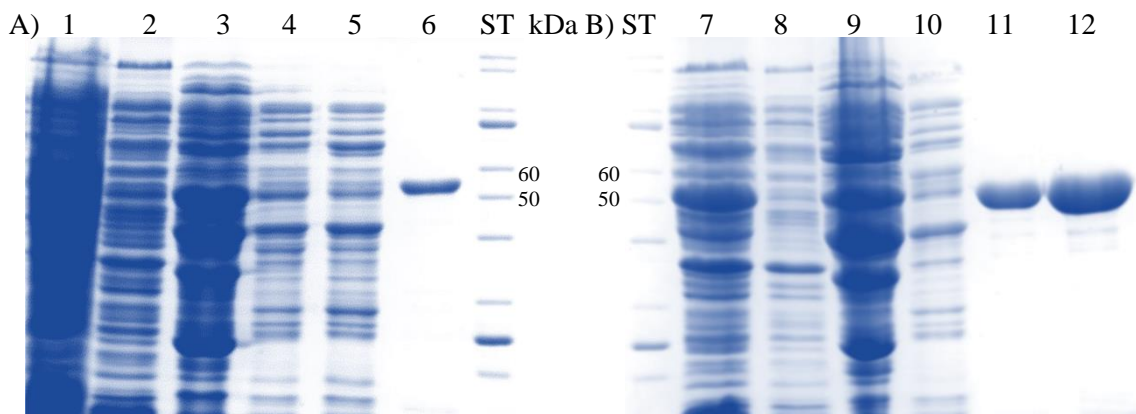
Molekulové hmotnosti purifikovaných enzymů jsou:

- $M_w$  (PpALDH5A) = 53,5 kDa
- $M_w$  (PpALDH5B) = 52,4 kDa
- $M_w$  ( $\Delta$ HvALDH5) = 54,1 kDa.

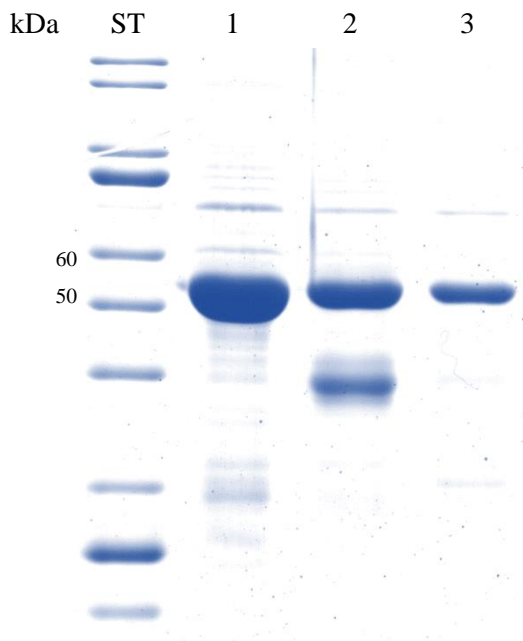
Purifikované proteiny byly ověřeny pomocí western blottingu s detekcí primární protilátkou proti histidinové kotvě (obr. 24).



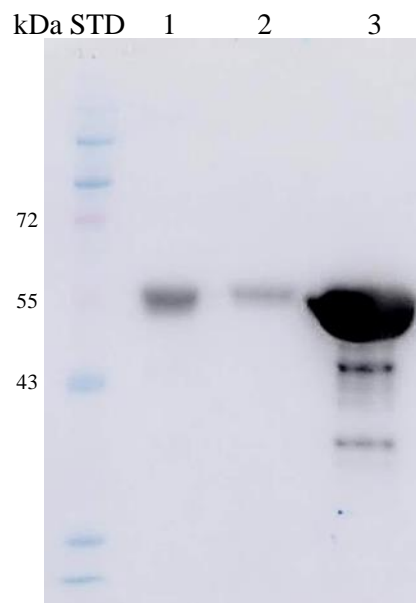
Obr. 21 Elektroforeogramy proteinů purifikovaných pomocí afinitní chromatografie s imobilizovanými  $\text{Ni}^{2+}$  ionty. ST– proteinový standard (Unstained protein standard, broad range, 10–200 kDa, NEB), STD – proteinový standard (Color prestained protein standard, broad range, 10 – 250 kDa, NEB). 1 – PpALDH5B, 2 –  $\Delta$ HvALDH5, 3 – PpALDH5A.



Obr. 22 Elektroforeogramy frakcí proteinů sesbíraných po FPLC s histidinovou pastí. A) PpALDH5A, 1 – buněčný lyzát, 2 – frakce A1, 3 – frakce 6-8, 4 – frakce 15 a 16, 5 – frakce 17-19, 6 – frakce 38-41. B) PpALDH5B, 7 – buněčný lyzát, 8 – frakce A1, 9 – frakce 6 a 7, 10 – frakce 15-17, 11 – frakce 35-37, 12 – frakce 33,34, 38 a 39. ST–proteinový standard (Unstained protein standard, broad range, 10–200 kDa, NEB).



Obr. 23 Elektroforeogram frakcí proteinů sesbíraných po gelové permeační chromatografii proteinu  $\Delta$ HvALDH5. ST–proteinový standard (Unstained protein standard, broad range, 10–200 kDa, NEB), 1 – vzorek purifikovaný afinitní chromatografií, 2 – frakce 13-20, 3 – frakce 9-17.



Obr. 24 PVDF membrána po Western blottingu proteinů  $\Delta$ HvALDH5, PpALDH5A a PpALDH5B. STD – proteinový standard (Color prestained protein standard, broad range, 10–250 kDa, NEB). 1 -  $\Delta$ HvALDH5 frakce 9-17, 2 – PpALDH5A frakce 38-41, 3 – PpALDH5B frakce 33, 34, 38, 39. Proteiny byly detekovány pomocí primární protilátky proti histidinové kotvě s navázanou křenovou peroxidasou.

#### 4.4 Stanovení stupně oligomerizace proteinů

Pro stanovení stupně oligomerizace analyzovaných enzymů byla využita gelová permeační chromatografie. Z chromatogramu (Příloha 4) byly odečteny eluční objemy jednotlivých frakcí, s jejichž pomocí byly na základě kalibrační závislosti zjištěny hodnoty  $M_w$  jednotlivých píků.

PpALDH5A       $M_{w,1} = 218$  kDa       $M_{w,2} = 58,6$  kDa

PpALDH5B       $M_{w,1} = 209$  kDa       $M_{w,2} = 55,4$  kDa

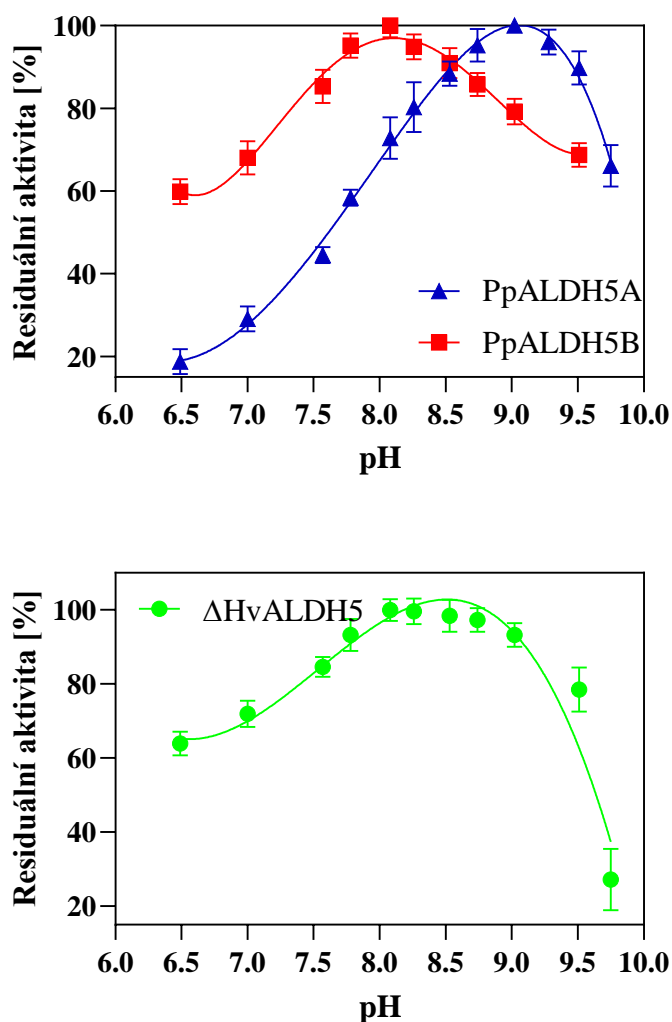
$\Delta H_v$ ALDH5       $M_{w,1} = 228$  kDa

Porovnáním naměřených hodnot s hodnotami molekulových hmotností analyzovaných proteinů (kapitola 4.3) je patrné, že všechny tři isoformy vytvářejí kvartérní strukturu.

## 4.5 Stanovení pH optima

pH optimum bylo pro jednotlivé enzymy určeno na základě spektrofotometrického měření aktivity enzymů pro SSAL jako substrát ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) při použití koenzymu  $\text{NAD}^+$  ( $1\,500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Dle grafu (obr. 6) vykazují isoformy PpALDH5A a PpALDH5B různé pH optimum. PpALDH5B vykazuje nejvyšší aktivitu při hodnotě pH 8,0, což je hodnota blízká fyziologické hodnotě pH mitochondriální matrix, kde je tento enzym rovněž lokalizován. PpALDH5A má pH optimum až při pH 9,0.  $\Delta\text{ALDH5}$  je nejvíce aktivní v rozmezí pH 7,5–9,0.

Na základě těchto výsledků byl pro následující měření použit HEPES pufr, pH 8,0 (finální koncentrace  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) pro PpALDH5B a  $\Delta\text{HvALDH5}$ . Pro PpALDH5A byl použit HEPES pufr, pH 9,0 (finální koncentrace  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).



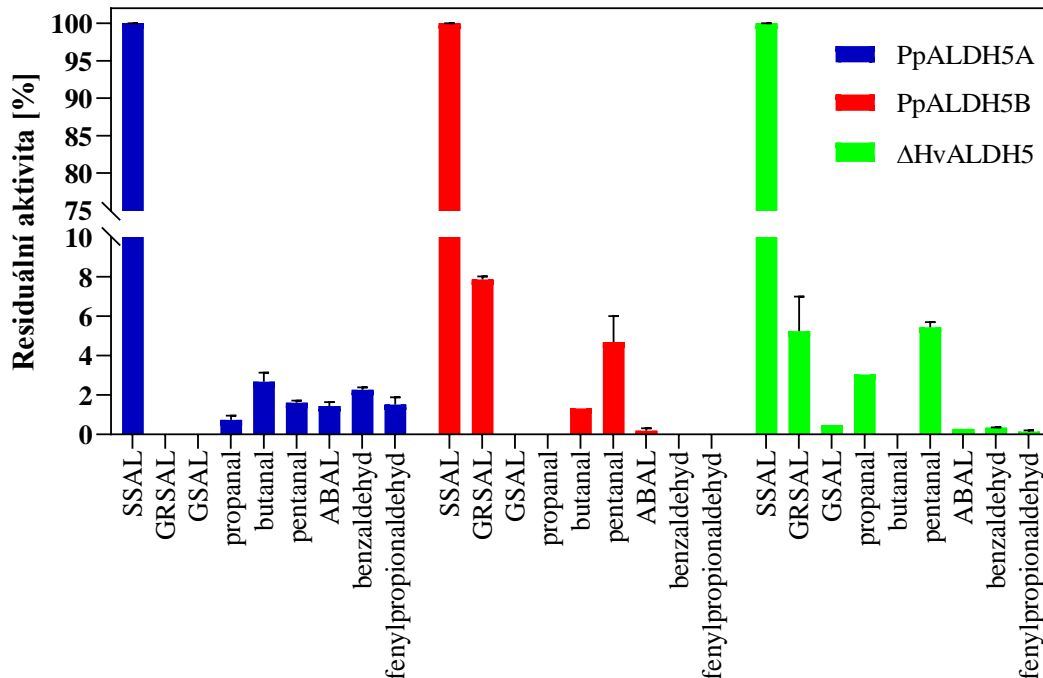
Obr. 25 Grafy závislosti residuální aktivity na pH. U všech tří enzymů bylo pH optimum stanovováno s použitím Britton-Robinsonových pufrů o rozmezí pH 6,5 – 10. pH optimum bylo stanovováno spektrofotometricky s použitím SSAL jako substrátu ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a  $\text{NAD}^+$  jako koenzymu ( $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

## 4.6 Substrátová specifita

Substrátová specifita byla studována pro substráty ze skupiny alifatických aldehydů a semialdehydů s podobnou délkou řetězce, jakou má hlavní substrát SSAL, a dále pro zástupce aromatických aldehydů (obr. 27). Na základě porovnání aktivit je patrné, že všechny studované enzymy vykazovaly úzkou substrátovou specifitu vůči sukcinyl-semialdehydu (SSAL).

V případě PpALDH5A z důvodu nedostatku substrátů nebylo možné určit aktivitu glutaryl-5-semialdehydem (GRSAL) a glutamyl-5-semialdehydem (GSAL). Kromě SSAL isoforma vykazovala nízkou residuální aktivitu i s alifatickými aldehydy (butanal, pentanal a propanal). Překvapivě proti ostatním studovaným isoformám vykazoval enzym rovněž aktivitu s aromatickými aldehydy (benzaldehyd, fenypropionaldehyd) a aminoaldehydem 4-aminobutyraldehydem (ABAL).

Izoformy PpALDH5B a  $\Delta$ HvALDH5 v porovnání s ostatními substráty kromě SSAL vykazovaly relativně vysokou aktivitu při použití substrátu GRSAL. Rovněž byly oba enzymy schopné katalyzovat oxidaci pentanalu. Ječmenná isoforma navíc vykazovala aktivitu při použití propanalu.



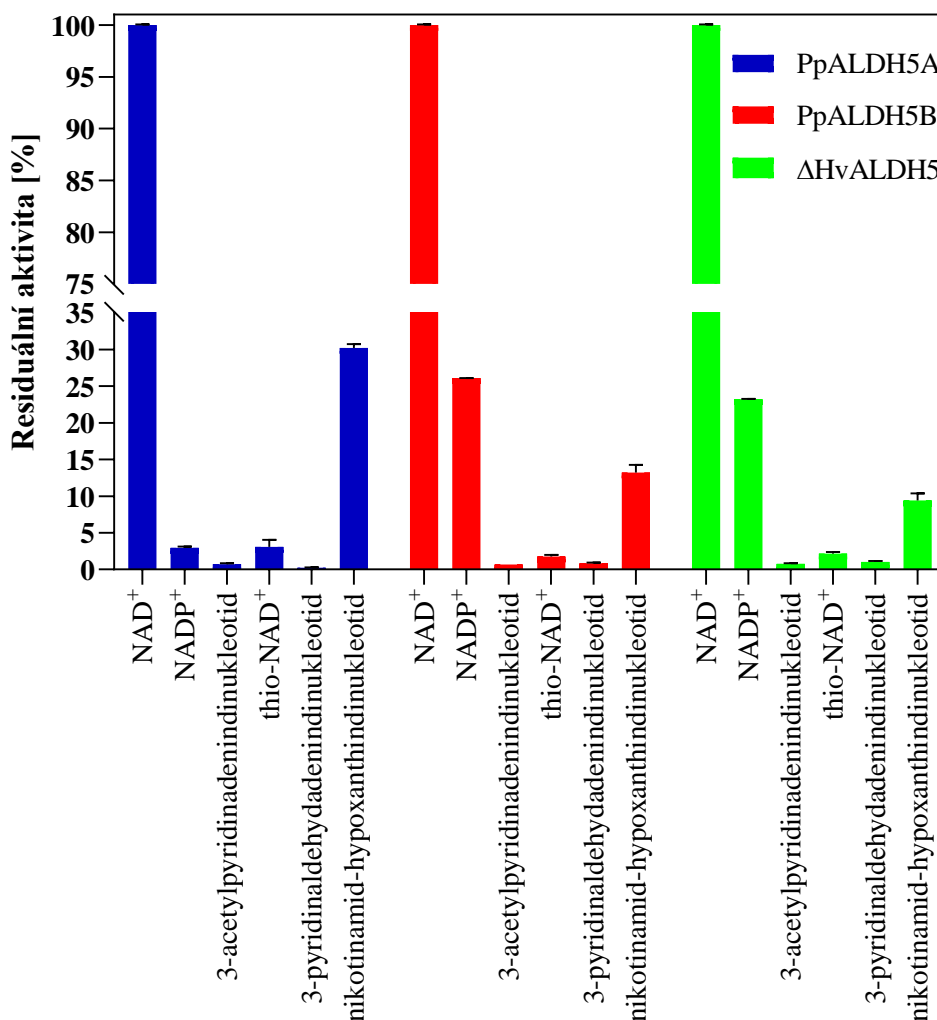
Obr. 26 Graf substrátové specifity enzymů PpALDH5A, PpALDH5B a  $\Delta$ HvALDH5. Nejvyšší aktivitu vykazovaly všechny tři isoformy při použití SSAL jako substrátu. Aktivita byla měřena spektrofotometricky s použitím  $\text{NAD}^+$  jako koenzymu ( $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). koncentrace substrátů byly pro jednotlivé enzymy určeny na základě stanovení kinetických parametrů. SSAL – sukcinyl-semialdehyd, GRSAL – glutaryl-5-semialdehyd, GSAL – glutamyl-5-semialdehyd, ABAL – 4-aminobutanal.

## 4.7 Aktivita enzymů s alternativními koenzymy

Studované sukcinyl-semialdehyddehydrogenasy byly kromě charakterizace substrátové specifity rovněž podrobeny prověření aktivity s alternativními koenzymy (obr. 27). Všechny tři izoformy vykazovaly nejvyšší aktivitu při použití koenzymu  $\text{NAD}^+$ .

Druhým nejlepším koenzymem pro PpALDH5B a  $\Delta\text{HvALDH5}$  byl  $\text{NADP}^+$  (ve srovnání s  $\text{NAD}^+$  byla aktivita v obou případech zhruba třetinová). Oproti tomu však aktivita PpALDH5A s  $\text{NADP}^+$  byla výrazně nižší než v případě použití nikotinamid-hypoxanthindinukleotidu. Tento koenzym s ostatními enzymy vykazoval přibližně desetinovou aktivitu než při použití  $\text{NAD}^+$ .

Zbylé koenzymy v případě všech 3 enzymů vykazovaly jen velmi nízkou residuální aktivitu.



Obr. 27 28 Graf aktivity enzymů PpALDH5A, PpALDH5B a  $\Delta\text{HvALDH5}$  při použití různých koenzymů. Nejvyšší aktivitu vykazovaly všechny tři isoformy při použití  $\text{NAD}^+$  jako koenzymu. Aktivita byla měřena spektrofotometricky s použitím SSAL jako substrátu ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Thio- $\text{NAD}^+$  – thionikotinamidadenindinukleotid.



#### 4.8 Stanovení $V_{lim}$ , $K_M$ a $k_{cat}$

Specifické aktivity ječmenné sukcinyl-semialdehyddehydrogenasy byly vyneseny do grafu závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu. Ze saturačních křivek (obrázky 28, 29 a 30) je patrné, že enzymy ALDH5 podléhají inhibici nadbytkem substrátu. Pro saturační křivky koenzymů lze pozorovat charakteristickou závislost dle Michaelise a Mentenové.

Kinetické parametry  $\Delta$ ALDH5 pro substrát byly vyřešeny pomocí softwaru GraphPad Prism dle upraveného vzorce pro inhibici nadbytkem substrátu:

$$v_0 = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_M + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)}$$

$v_0$  ... počáteční rychlost reakce [nkat]

$V_{lim}$  ... teoretická neinhibovaná limitní rychlost reakce [nkat]

$K_M$  ... Michaelisova konstanta [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]

$[S]$  ... koncentrace substrátu [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]

$K_i$  ... inhibiční konstanta [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]

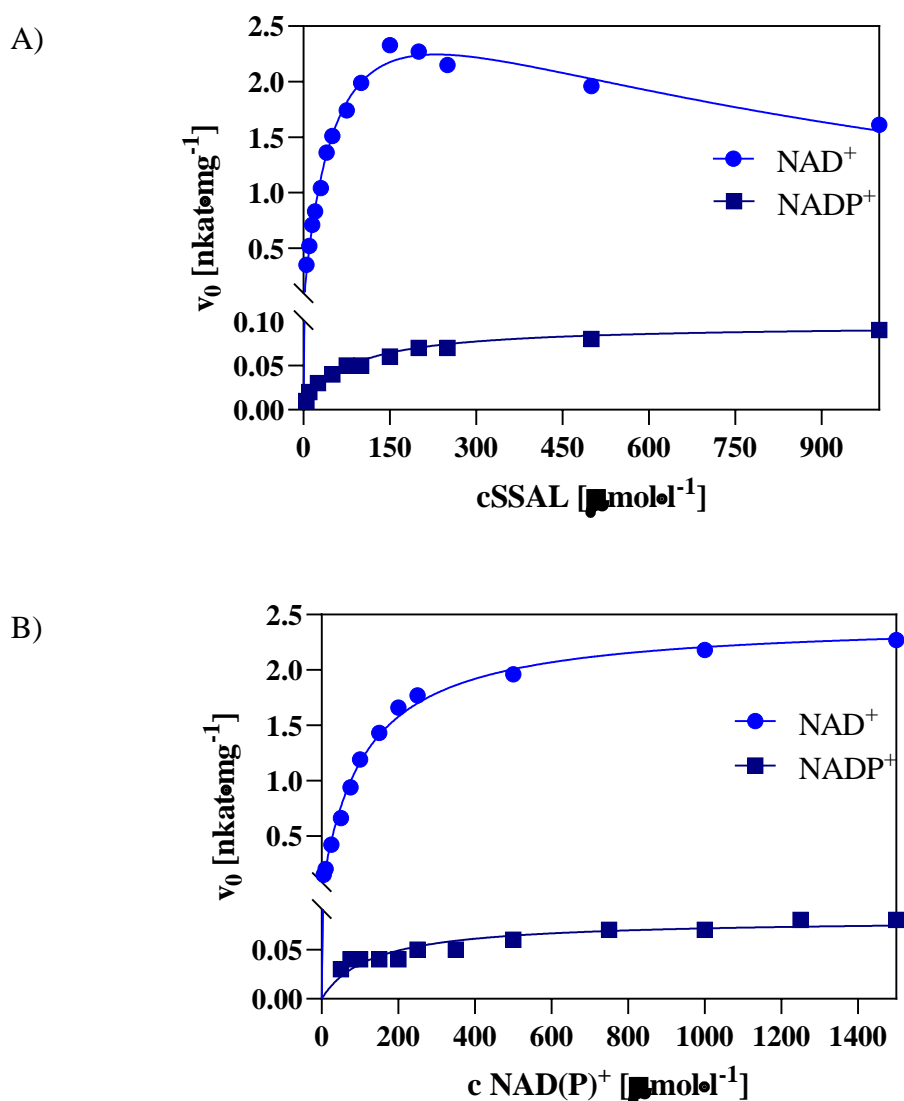
Tab. 9 Získané hodnoty kinetických parametrů pro enzymy pro substrát a koenzymy.

Enzym	Proměnná/ konstanta	$V_{lim}$ [nkat·mg <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat} / K_M$ [1/s·mol·l <sup>-1</sup> ]	$K_i$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
PpALDH5A	SSAL/NAD <sup>+</sup>	3,42	60,3	0,184	$3,05 \cdot 10^3$	881
	SSAL/NADP <sup>+</sup>	0,08	74,7	0,026	$3,50 \cdot 10^2$	-
	NAD <sup>+</sup> /SSAL	2,45	111	0,132	$1,19 \cdot 10^3$	-
	NADP <sup>+</sup> /SSAL	0,08	130	0,004	$3,34 \cdot 10^1$	-
PpALDH5B	SSAL/NAD <sup>+</sup>	24,8	20,3	1,340	$6,62 \cdot 10^4$	66,2
	SSAL/NADP <sup>+</sup>	7,01	25,3	0,411	$1,45 \cdot 10^4$	77,5
	NAD <sup>+</sup> /SSAL	11,6	56,9	0,625	$1,10 \cdot 10^4$	-
	NADP <sup>+</sup> /SSAL	6,11	1297	0,331	$2,55 \cdot 10^2$	-
$\Delta$ HvALDH5	SSAL/NAD <sup>+</sup>	223	28,6	12,15	$4,26 \cdot 10^5$	37,0
	SSAL/NADP <sup>+</sup>	141	141	0,400	$2,82 \cdot 10^3$	10,9
	NAD <sup>+</sup> /SSAL	67,1	36,9	3,625	$9,83 \cdot 10^4$	-
	NADP <sup>+</sup> /SSAL	24,6	725	1,313	$1,81 \cdot 10^3$	-

### 4.8.1 PpALDH5A

Ze saturačních křivek pro substrát SSAL (obr. 29) je patrný trend charakteristický pro inhibici nadbytkem substrátu v případě použití koenzymu  $\text{NAD}^+$ . Pro  $\text{NADP}^+$  však tento trend patrný není a enzym vykazuje klasickou kinetiku dle Michaelise a Mentenové.

Hodnota katalytické účinnosti (poměr  $k_{\text{cat}}/K_M$ , tabulka 9) pro  $\text{NAD}^+$  je asi 36x vyšší než hodnota této konstanty pro  $\text{NADP}^+$ . Oproti tomu se ale hodnoty Michaelisovy konstanty charakterizující míru afinity enzymu vůči substrátu pro  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$  výrazně neliší. Klíčovým rozdílem mezi oběma koenzymy je hodnota limitní rychlosti, jež je zhruba 30x vyšší při použití  $\text{NAD}^+$  než při  $\text{NADP}^+$ . Z těchto kinetických parametrů lze usoudit, že PpALDH5A je  $\text{NAD}^+$ -dependentní sukcinyl-semialdehyddehydrogenasa.

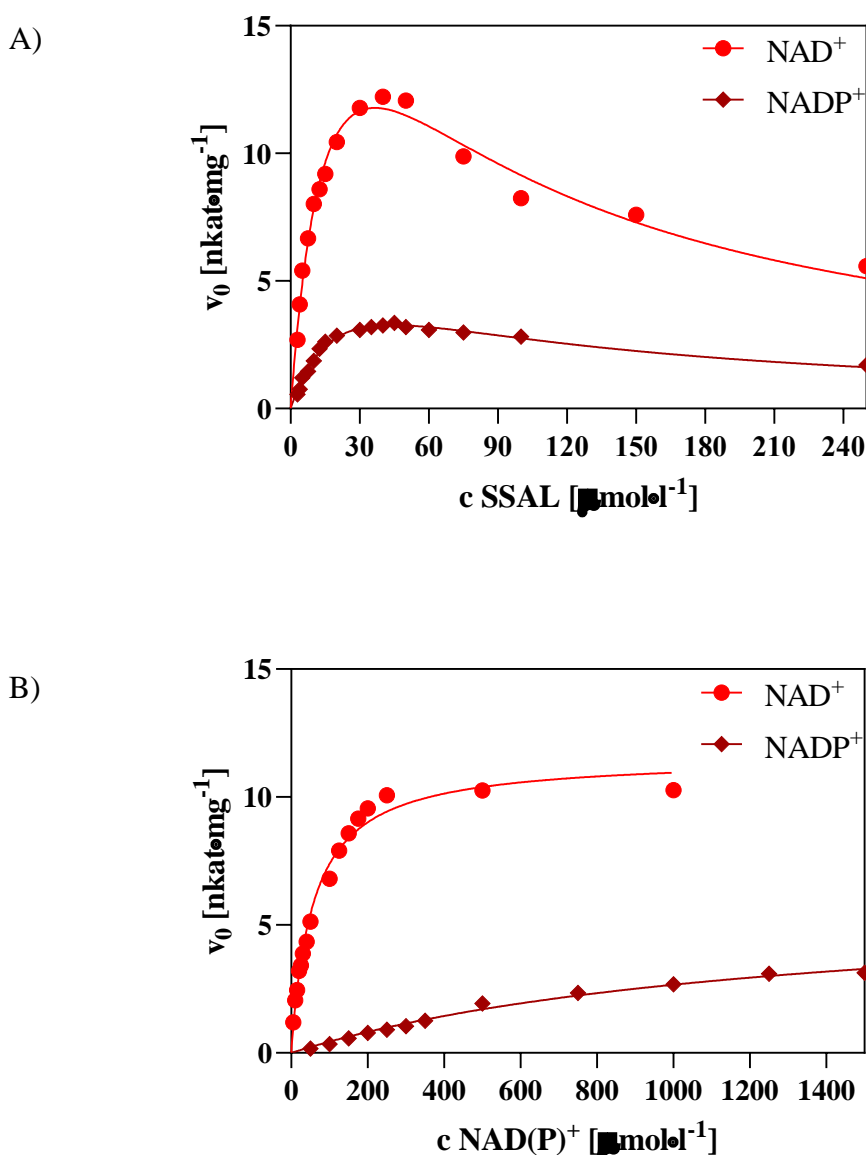


Obr. 29 Saturační křivky PpALDH5A. (A) Saturační křivky pro sukcinyl-semialdehyd (SSAL) při použití  $\text{NAD(P)}^+$  ( $1\ 500\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). (B) Saturační křivky pro  $\text{NAD(P)}^+$  při použití SSAL ( $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Aktivita enzymů byla měřena v  $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  HEPES pufru, pH 9,0.

## 4.8.2 PpALDH5B

Ze saturačních křivek pro substrát SSAL (obr. 30) je patrný trend charakteristický pro inhibici nadbytkem substrátu ( $K_i$  – tabulka 9).

Hodnota katalytické účinnosti (poměr  $k_{cat}/K_M$ , tabulka 9) pro  $\text{NAD}^+$  je asi 43x vyšší než hodnota této konstanty pro  $\text{NADP}^+$ . Spolu s faktem, že PpALDH5B vykazuje 23x nižší hodnotu  $K_M$  pro  $\text{NAD}^+$  než pro  $\text{NADP}^+$ , lze vyvodit jasnou preferenci této isoformy vůči koenzymu  $\text{NAD}^+$ .

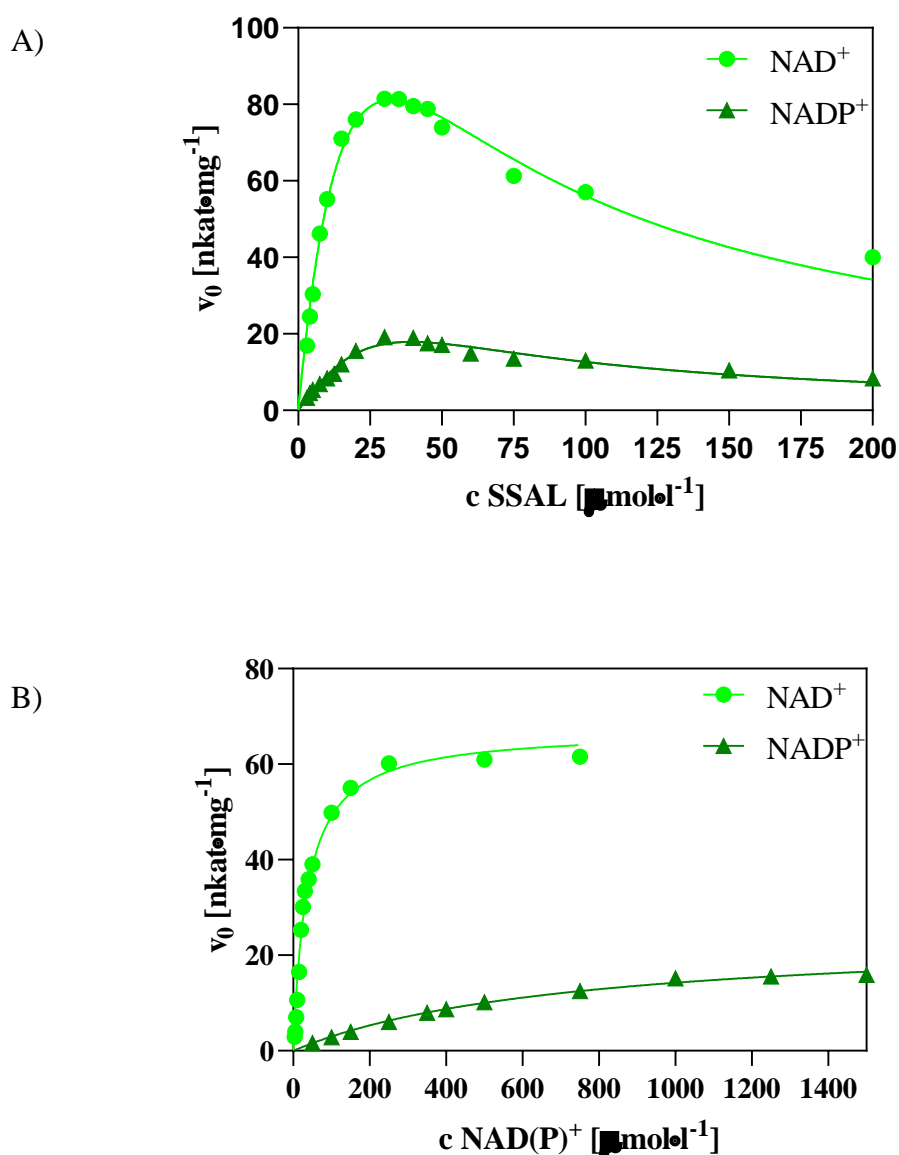


Obr. 30 Saturační křivky PpALDH5B. (A) Saturační křivky pro sukcinyl-semialdehyd (SSAL) při použití  $\text{NAD(P)}^+$  ( $1\,500\,\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). (B) Saturační křivky pro  $\text{NAD(P)}^+$  při použití SSAL ( $40\,\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Aktivita enzymů byla měřena v  $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  HEPES pufru, pH 8,0.

### 4.8.3 $\Delta H_v$ ALDH5

Ze saturačních křivek pro substrát SSAL (obr. 31) je patrný trend charakteristický pro inhibici nadbytkem substrátu ( $K_i$  – tabulka 9).

Hodnota katalytické účinnosti (poměr  $k_{cat}/K_M$ , tabulka 9) pro  $\text{NAD}^+$  je asi 151x vyšší než hodnota této konstanty pro  $\text{NADP}^+$ . Spolu s faktem, že  $\Delta H_v$ ALDH5 vykazuje 19x nižší hodnotu  $K_M$  pro  $\text{NAD}^+$  než pro  $\text{NADP}^+$ , lze vyvodit jasnou preferenci této isoformy vůči koenzymu  $\text{NAD}^+$ .



Obr. 31 Saturační křivky  $\Delta H_v$ ALDH5. (A) Saturační křivky pro sukcinyl-semialdehyd (SSAL) při použití  $\text{NAD(P)}^+$  ( $1\,500\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). (B) Saturační křivky pro  $\text{NAD(P)}^+$  při použití SSAL ( $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Aktivita enzymů byla měřena v  $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  HEPES pufru, pH 8,0.

## 4.9 Cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus, jakožto ukazatel vlivu různých činitelů na sekundární strukturu proteinu, byl zkoumán u enzymů PpALDH5B a  $\Delta$ HvALDH5. Pro nedostatečné množství purifikovaného enzymu jej však nebylo možno určit pro PpALDH5A. Kromě samotných křivek závislosti cirkulárního dichroismu na vlnové délce bylo možno na základě softwaru SpectraManager určit rovněž podíl specifických a nespecifických sekundárních struktur zkoumaných proteinů (tabulka 10).

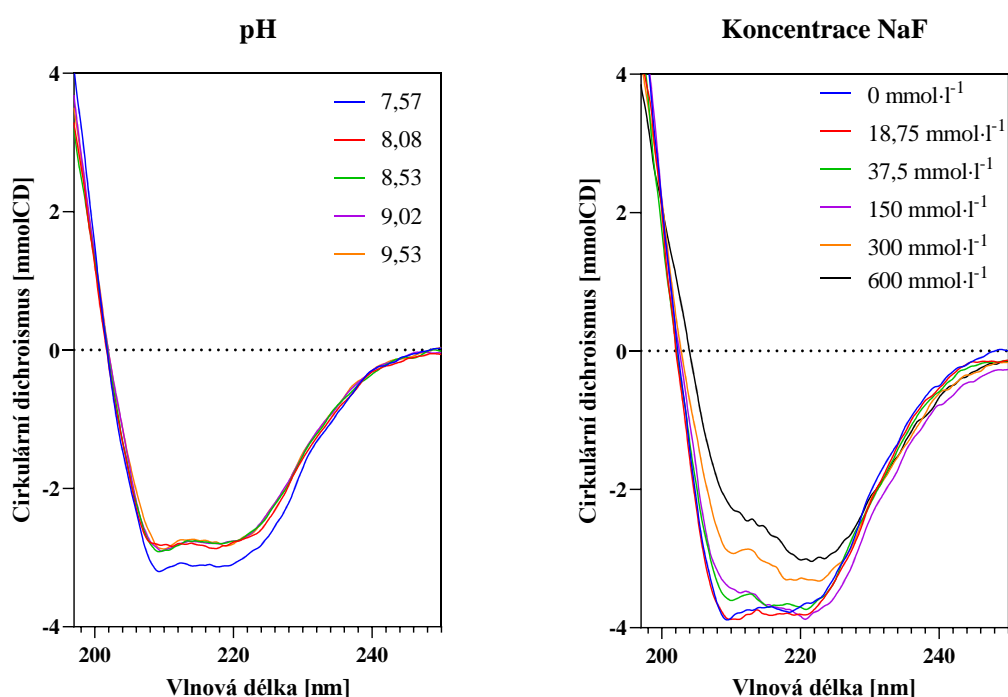
Tab. 10 Získané hodnoty procentuálního zastoupení různých sekundárních struktur.

Enzym	pH	c NaF [mmol·l <sup>-1</sup> ]	$\alpha$ -helix [%]	$\beta$ -list [%]	Otočky [%]	Jiné [%]	
PpALDH5B	7,57	-	34,8	24,3	10,0	30,9	
	8,08	-	33,9	22,4	12,7	31,0	
	8,53	-	32,5	23,3	12,0	32,2	
	9,02	-	31,9	26,0	9,5	32,6	
	9,53	-	31,3	26,1	10,3	32,3	
	8,00	0,00	42,6	20,1	8,9	28,4	
	8,00	18,75	43,4	17,4	12,7	26,5	
	8,00	37,5	42,3	21,1	8,2	28,4	
	8,00	150	49,5	13,0	13,0	24,5	
	8,00	300	41,3	17,2	12,8	28,7	
	8,00	600	34,9	22,1	10,4	32,6	
	$\Delta$ HvALDH5	7,57	-	38,6	22,3	13,1	26,0
		8,08	-	39,0	20,6	14,9	25,5
		8,53	-	39,9	15,9	19,3	24,9
9,02		-	36,9	20,6	14,6	27,9	
9,53		-	40,5	19,2	14,6	25,7	
8,00		0,00	35,2	25,4	10,0	29,4	
8,00		18,75	44,6	17,0	14,6	23,8	
8,00		37,5	36,4	25,5	11,1	27,0	
8,00		75	39,3	22,0	12,6	26,1	
8,00		150	38,2	23,2	10,8	27,8	
8,00		300	40,2	21,2	12,8	25,8	
8,00		600	39,4	22,5	12,7	25,4	

## PpALDH5B

Z grafů závislosti naměřených hodnot cirkulárního dichroismu na vlnové délce (obr. 32) je patrné, že pH nemá výrazný vliv na sekundární strukturu PpALDH5B. Při rostoucím pH pak docházelo jen k mírnému poklesu poměru  $\alpha$ -helikálních struktur (tabulka 10).

Koncentrace soli a s ní související vliv iontové síly na sekundární strukturu je na druhou stranu u PpALDH5B signifikantní. Zatímco nižší koncentrace NaF zapříčiňovaly zvýšení podílu helikálních struktur, při použití NaF o koncentracích nad 300  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  lze pozorovat výrazný pokles zastoupení těchto struktur za současného nárůstu nespecifických struktur (tabulka 10).

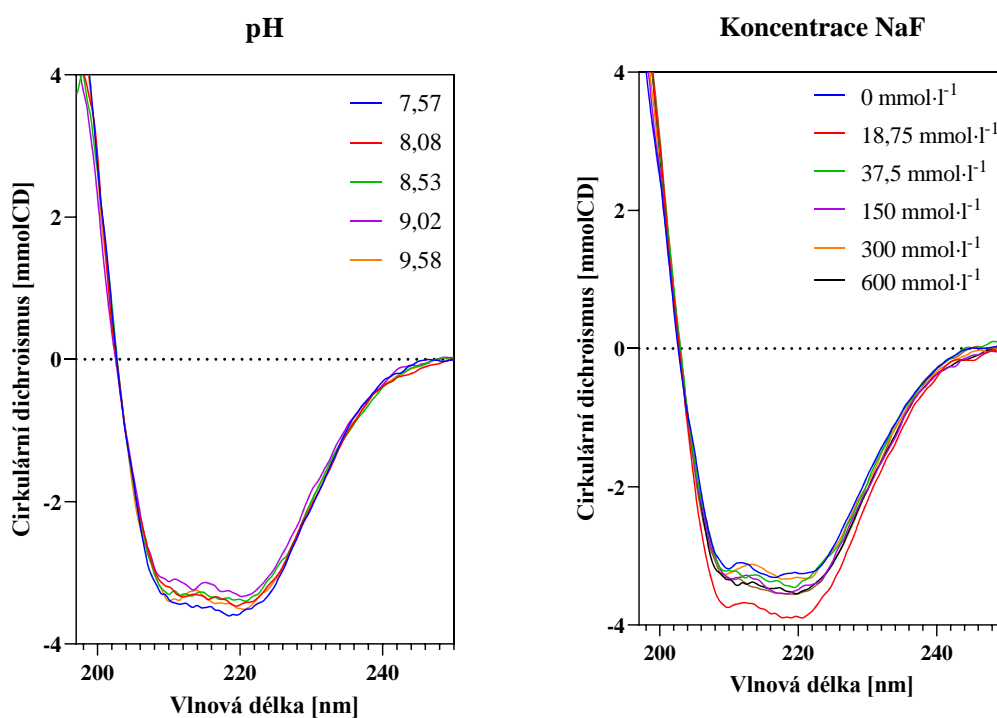


Obr. 32 Graf závislosti cirkulárního dichroismu proteinu PpALDH5B na vlnové délce. (A) Křivky cirkulárního dichroismu při různém pH. Závislost cirkulárního dichroismu na pH byla stanovena použitím Britton-Robinsonových pufrů o finální koncentraci 40  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . (B) Křivky cirkulárního dichroismu při různé koncentraci chloridu draselného. Závislost cirkulárního dichroismu na koncentraci soli byla stanovena použitím roztoku chloridu draselného (koncentrace v legendě) v Tris-HCl pufru (pH 8,0, finální koncentrace 40  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

### 4.9.1 $\Delta H_v$ ALDH5

Z grafů závislosti naměřených hodnot cirkulárního dichroismu na vlnové délce (obr. 33) je patrné, že pH nemá výrazný vliv na sekundární strukturu  $\Delta H_v$ ALDH5. Při rostoucím pH pak docházelo jen k mírnému nárůstu poměru  $\alpha$ -helikálních struktur (tabulka 10).

Koncentrace soli a s ní související vliv iontové síly na sekundární strukturu je na druhou stranu u  $\Delta H_v$ ALDH5 rovněž signifikantní. Oproti PpALDH5B však docházelo ke zvýšení podílu helikálních struktur vlivem přítomnosti NaF. K nejvyššímu nárůstu podílu došlo v případě použití fluoridu draselného o finální koncentraci  $18,75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . (tabulka 10).



Obr. 33 Graf závislosti cirkulárního dichroismu proteinu  $\Delta H_v$ ALDH5 na vlnové délce. (A) Křivky cirkulárního dichroismu při různém pH. Závislost cirkulárního dichroismu na pH byla stanovena použitím Britton-Robinsonových pufrů o finální koncentraci  $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . (B) Křivky cirkulárního dichroismu při různé koncentraci chloridu draselného. Závislost cirkulárního dichroismu na koncentraci soli byla stanovena použitím roztoku chloridu draselného (koncentrace v legendě) v Tris-HCl pufru (pH 8,0, finální koncentrace  $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

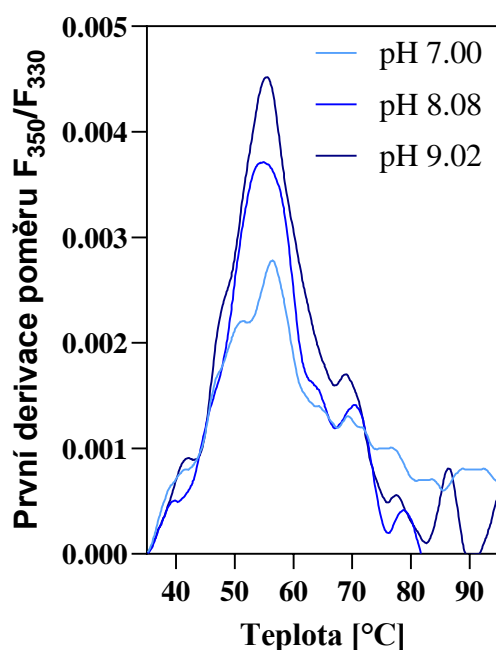
## 4.10 Vliv pH, soli a přítomnosti ligandu na stabilitu proteinů

### 4.10.1 PpALDH5A

Na základě grafu závislosti první derivace poměru fluorescence při vlnových délkách 350 nm a 330 nm (obr. 34, 35) lze vyvodit, že pH ani přidavek glycerolu nemají žádný vliv na změnu teploty tání PpALDH5A ( $T_m 55,2 \pm 0,2$  °C).

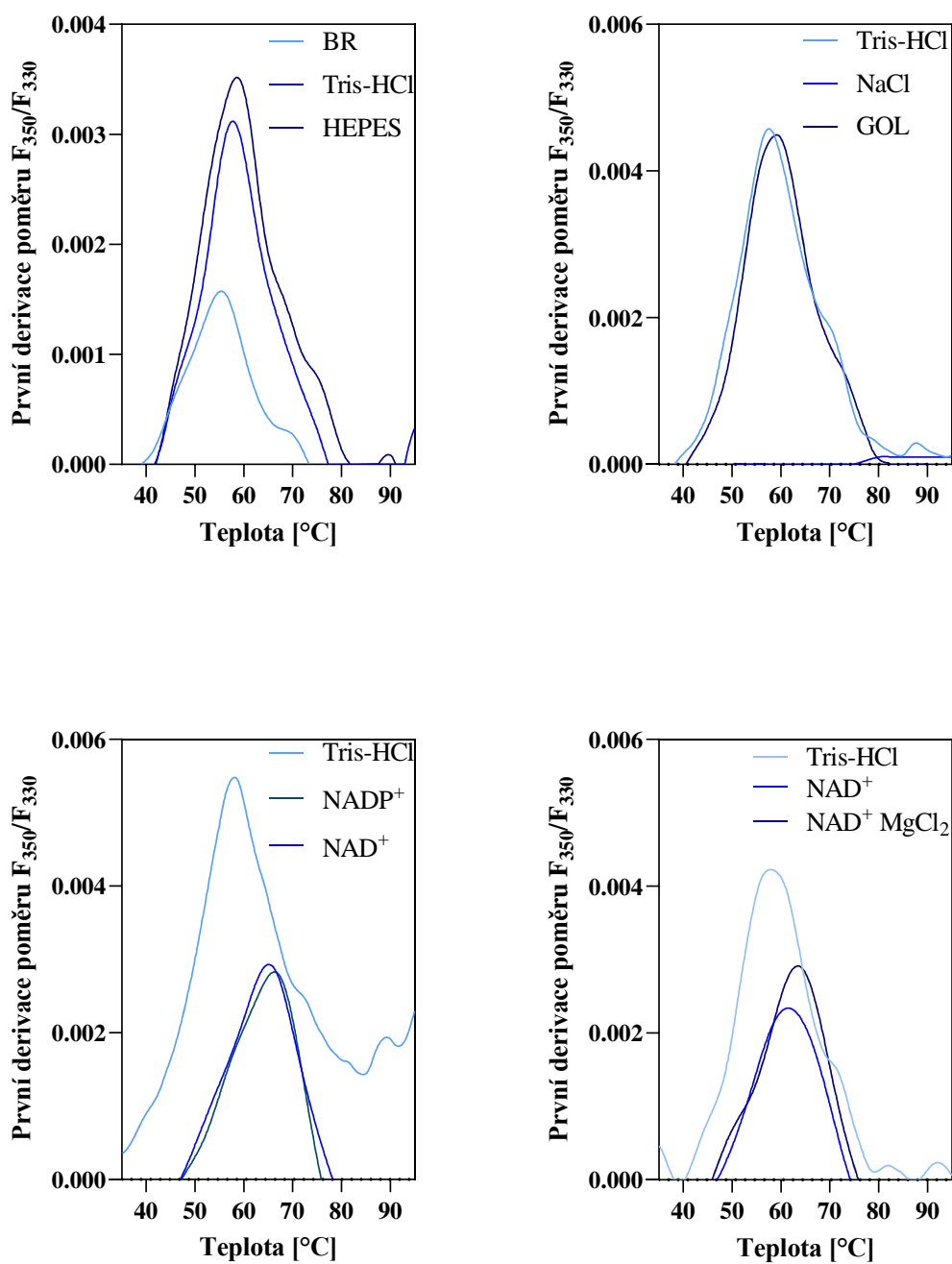
Mírnou změnu stability lze pozorovat při použití různých typů pufrů. Jako nejlepší se pak jeví pufr HEPES pH 8,0 ( $T_m 59,5 \pm 0,2$  °C).

Výrazné zvýšení stability pak zapříčiňuje přidavek koenzymů  $NAD^+$  i  $NADP^+$  ( $T_m 65,2 \pm 0,2$  °C, respektive  $T_m 63,9 \pm 0,2$  °C) jakožto ligandů vázajících se do koenzym-vazebné domény enzymu. Přidavek chloridu sodného má naopak silně destabilizující účinek na tento protein ( $T_m < 35$  °C).



Obr. 34 Závislost první derivace poměru  $F_{350}/F_{330}$  na teplotě pro PpALDH5A. Vliv pH byl zkoumán za použití Britton-Robinsonových pufrů o finální koncentraci  $40\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .





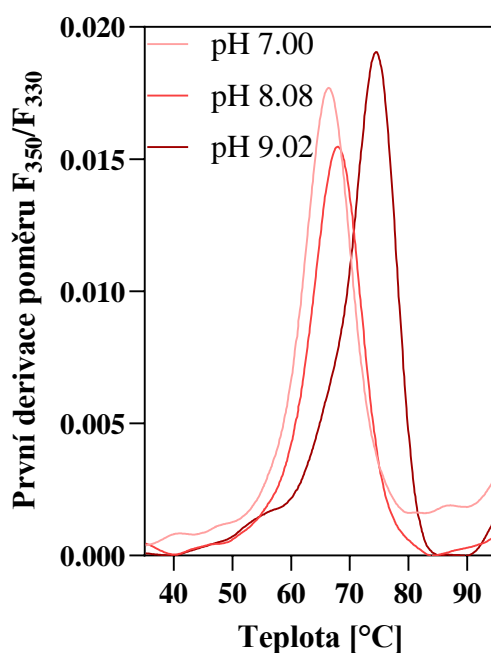
Obr. 35 Závislost první derivace poměru  $F_{350}/F_{330}$  na teplotě pro PpALDH5A. Vliv NaCl a glycerolu byl měřen za použití HEPES pufru (pH 8,0,  $c = 50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Vliv pufru byl zkoumán za použití Britton-Robinsonova (BR), HEPES a Tris-HCl pufrů (pH 8,0) o finální koncentraci  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vliv  $\text{NAD}^+$  s a bez přidavku  $\text{MgCl}_2$  a  $\text{NADP}^+$  byl měřen za použití HEPES pufru (pH 8,0,  $c = 50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). GOL – glycerol.

#### 4.10.2 PpALDH5B

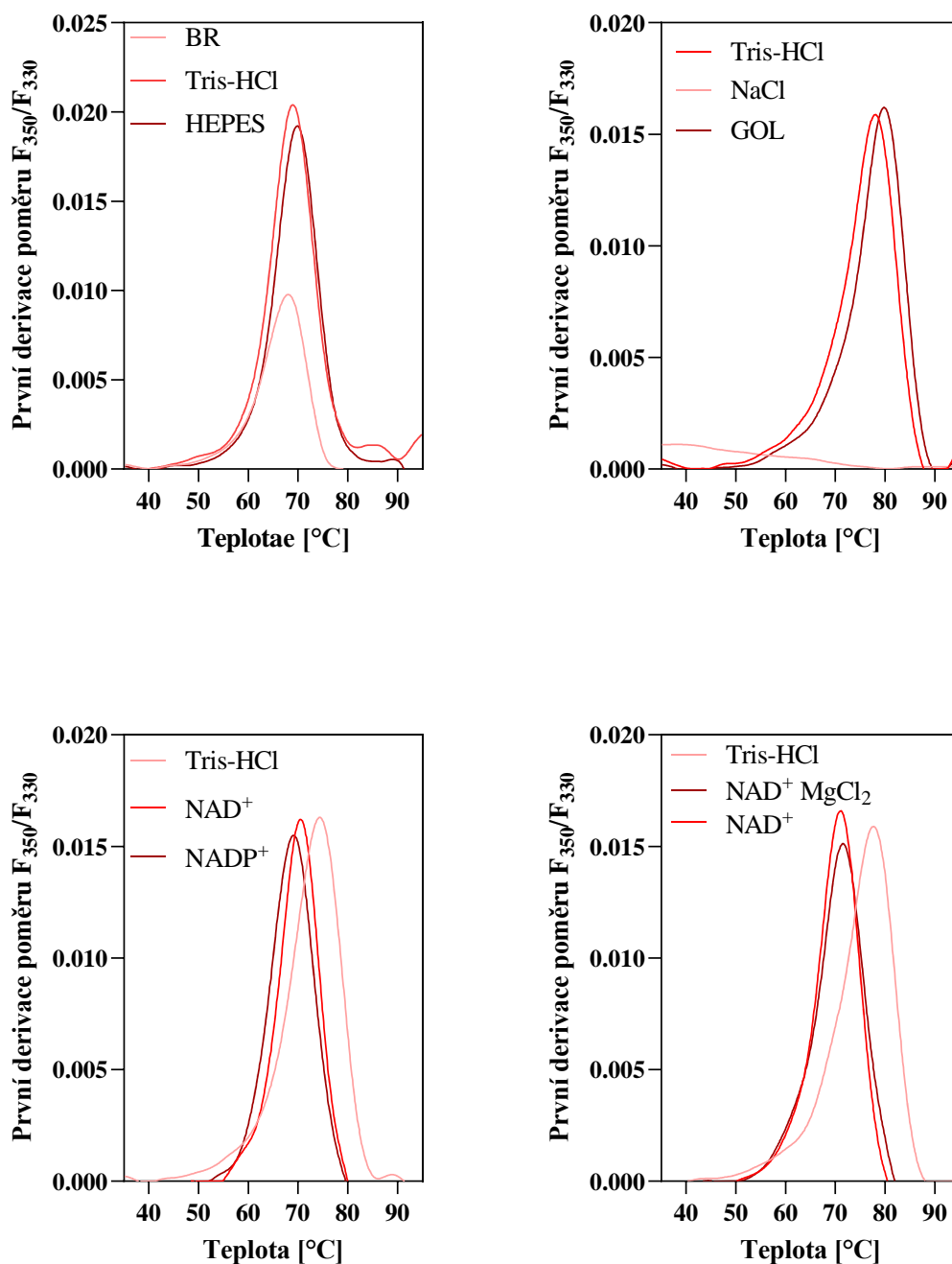
Na základě grafů závislosti první derivace poměru fluorescence při vlnových délkách 350 nm a 330 nm (obr. 36, 37) lze vyvodit, že pH má výrazný vliv na stabilitu PpALDH5B. Nejvyšší teplota tání byla zaznamenána pro pH 9,02 ( $T_m 74,8 \pm 0,2$  °C).

Mírnou změnu stability lze pozorovat při použití různých typů pufrů. Jako nejlepší se pak jeví použití pufru HEPES pH 8,0 ( $70,2 \pm 0,2$  °C). Zvýšení teploty tání bylo rovněž dosaženo přidavkem glycerolu ( $79,9 \pm 0,2$  °C).

Naopak výrazné snížení stability pak zapříčiňuje přidavek koenzymů  $NAD^+$  i  $NADP^+$  ( $T_m 70,9 \pm 0,2$  °C, respektive  $T_m 69,0 \pm 0,2$  °C) jakožto ligandů vázajících se do koenzym-vazebné domény enzymu. Přidavek chloridu sodného má rovněž silně destabilizující účinek na tento protein ( $T_m < 35$  °C).



Obr. 36 Závislost první derivace poměru  $F_{350}/F_{330}$  na teplotě pro PpALDH5B. Vliv pH byl zkoumán za použití Britton-Robinsonových pufrů o finální koncentraci  $40\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .



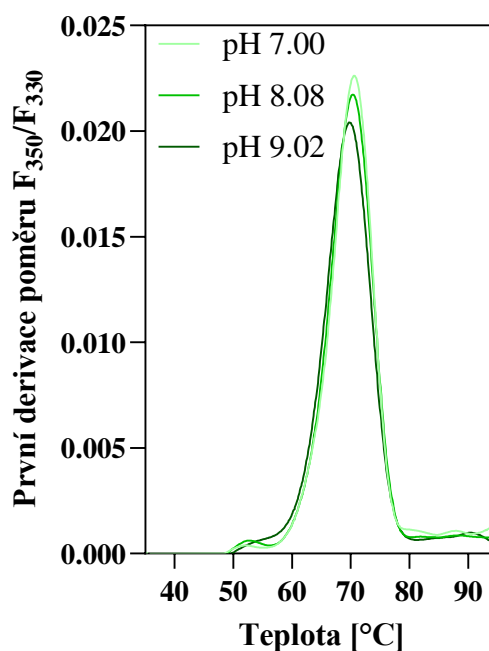
Obr. 37 Závislost první derivace poměru  $F_{350}/F_{330}$  na teplotě pro PpALDH5A. Vliv pufru byl zkoumán za použití Britton-Robinsonova (BR), HEPES a Tris-HCl pufrů (pH 8,0) o finální koncentraci  $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vliv NaCl a glycerolu byl měřen za použití HEPES pufru (pH 8,0,  $c = 50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Vliv  $NAD^+$  s a bez přidavku  $MgCl_2$  a  $NADP^+$  byl měřen za použití HEPES pufru (pH 8,0,  $c = 50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). GOL – glycerol.

### 4.10.3 $\Delta H_v$ ALDH5

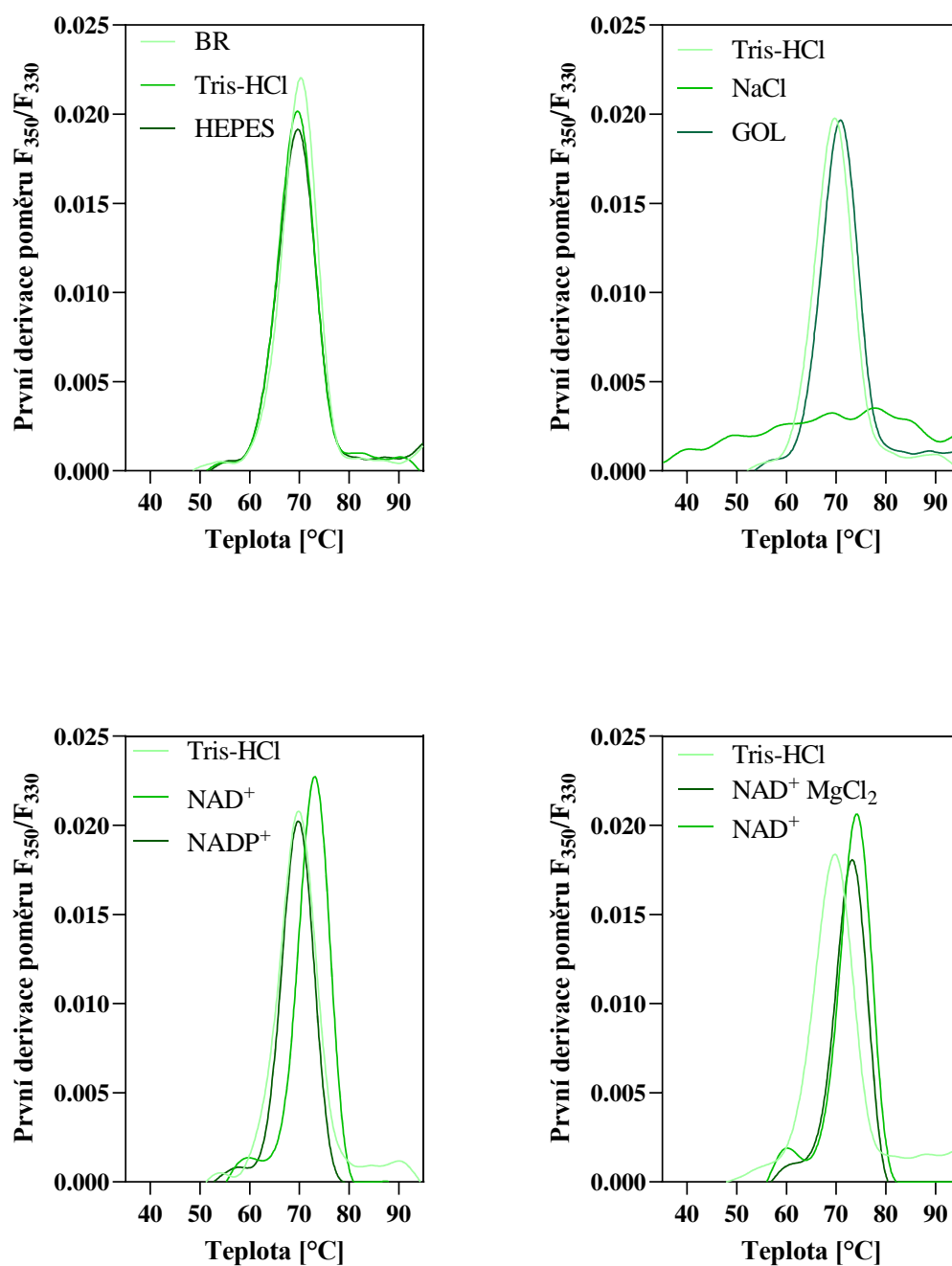
Na základě grafů závislosti první derivace poměru fluorescence při vlnových délkách 350 nm a 330 nm (obr. 38, 39) lze vyvodit, že pH nemá výrazný vliv na stabilitu  $\Delta H_v$ ALDH5 ( $T_m$   $70,7 \pm 0,2$  °C). Stabilitu rovněž neovlivňoval ani přidavek glycerolu či použití různých pufrů.

Vliv na stabilitu má pak z hlediska vazebných ligandů  $NAD^+$  vázající se do koenzym-vazebné domény enzymu. Dochází ke zvýšení stability ( $T_m$   $73,2 \pm 0,2$  °C).

Přidavek chloridu sodného má naopak opět silně destabilizující účinek na tento protein ( $T_m < 35$  °C).



Obr. 38 Závislost první derivace poměru  $F_{350}/F_{330}$  na teplotě pro  $\Delta H_v$ ALDH5. Vliv pH byl zkoumán za použití Britton-Robinsonových pufrů o finální koncentraci  $40\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .



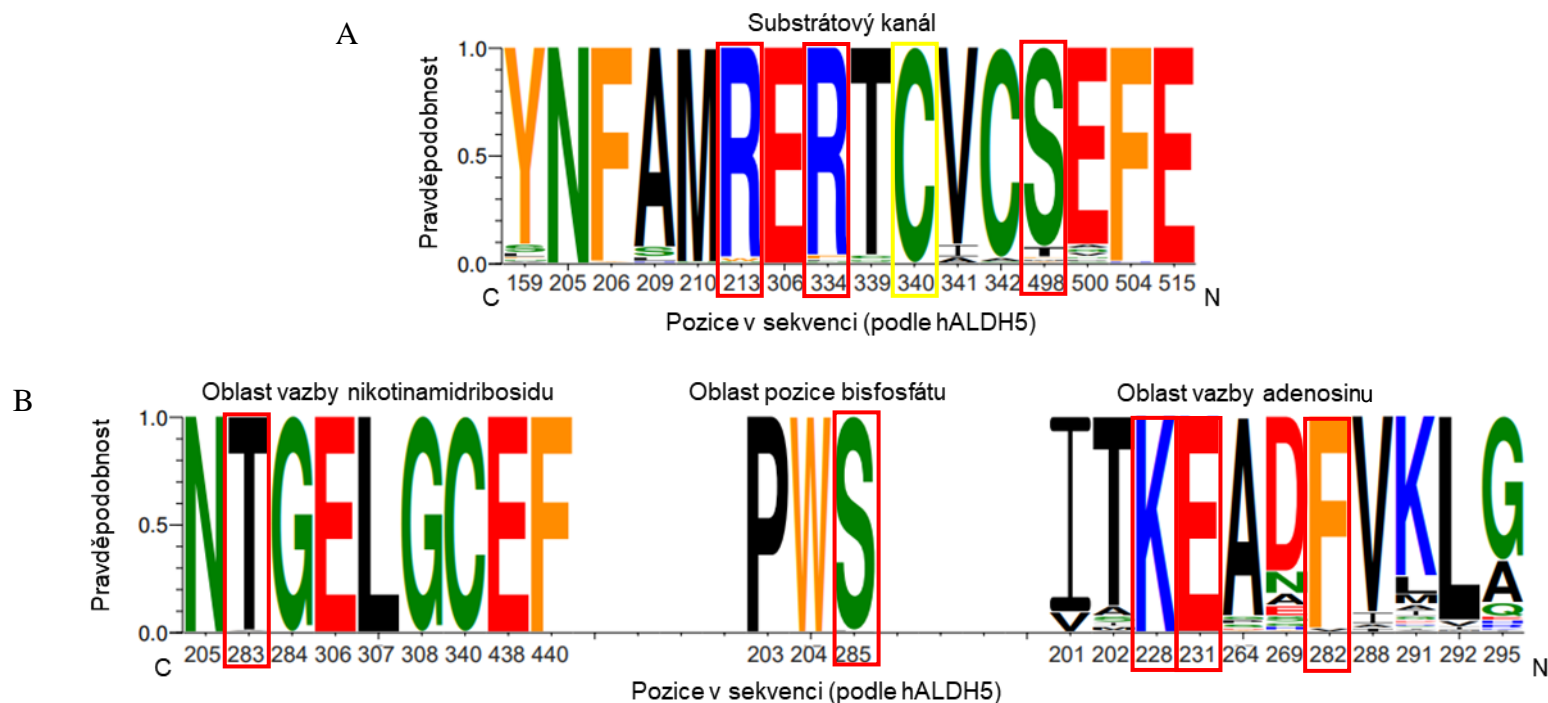
Obr. 39 Závislost první derivace poměru  $F_{350}/F_{330}$  na teplotě pro  $\Delta HvALDH5$ . Vliv pufru byl zkoumán za použití Britton-Robinsonova (BR), HEPES a Tris-HCl pufrů (pH 8,0) o finální koncentraci  $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vliv NaCl a glycerolu byl měřen za použití HEPES pufru (pH 8,0,  $c = 50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Vliv  $NAD^+$  s a bez přidavku  $MgCl_2$  a  $NADP^+$  byl měřen za použití HEPES pufru (pH 8,0,  $c = 50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). GOL – glycerol.

## 4.11 Sekvenční logo

Sekvenční logo konzervovaných residuí utvářející substrát a koenzym-vazebnou doménu byla vytvořena na základě analýzy 105 sekvencí NAD<sup>+</sup>-dependentních sukcinyl-semialdehyddehydrogenas z říší *Bacteria*, *Plantae* a *Animalia*. Pro číslování pozic jednotlivých residuí bylo využito sekvence enzymu hALDH5A1 s ověřenou strukturou (Trettel *et al.*, 1997).

Vazebná doména pro substrát (obr. 40 A) je u NAD<sup>+</sup>-dependentních SSADH tvořena napříč bakteriální, rostlinnou i živočišnou říší vysoce konzervovanými residuí. Nepochopitelné residuum M210, polární residua N205, C340, aromatická residua F206 a F504 a kyselá residua E306 a E515 byla přítomna ve všech 105 analyzovaných sekvencích. Mimo tato residua jsou v substrátovém kanálu rovněž vysoce konzervovaná nepolární residua A209, T334 a V341, aromatické residuum Y159, polární residua C342, S498, kyselá residuum E500 a bazická residua R213 a R334.

Residua vytvářející oblast pro vazbu nikotinamidribosidu a pyrofosfátu (obr. 40 B) se napříč různých NAD<sup>+</sup>-dependentních sukcinyl-semialdehyddehydrogenas naprosto shodují. Oblast vazby nikotinamidribosidu je tvořena nepolárními residuí T283 a L307, aromatickým residuem F440, polárními residuí N205, G284, G308, C340 a kyselými residuí E306 a E438. Oblast pro bisfosfátovou skupinu NAD<sup>+</sup> je tvořena residuí P203, W204 a S285. Adenosinribosidová oblast byla ve všech sekvencích zastoupena residuí K228 a E231. Vysoce konzervovaná byla dále nepolární residua I201 T202 A264 V288 a L292 a polární residuum F282. Výrazně méně konzervovaná residua se nacházejí v pozicích 269, 291 a 295.



Obr. 40 Přehled konzervovanosti aminokyselinových residuů vytvářejících substrátový kanál (A) a koenzym-vazebnou doménu (B). Číslování aminokyselin odpovídá pořadí aminokyselin v enzymu hALDH5A1. Residua interagující se sukcinyl-semialdehydem a  $\text{NAD}^+$  jsou označena červenými rámečky. Katalytický Cys-320 je zvýrazněn žlutým rámečkem. Pro vytvoření sekvenčního loga bylo využito 105 sekvencí bakteriálních, rostlinných a živočišných izoform  $\text{NAD}^+$ -dependentních sukcinyl-semialdehyddehydrogenas. Zarovnání sekvencí bylo provedeno pomocí metody MUSCLE v programu MEGAX. Logo bylo vygenerováno pomocí online softwaru WebLogo3 (<http://weblogo.threeplusone.com>). Aminokyseliny jsou barevně rozlišeny na nepolární (černá), polární (zelená), aromatické (oranžová), kyselé (červená) a bazické (modrá).

## 5 DISKUZE

Metabolická dráha biosyntézy a degradace GABA je konzervována napříč většiny bakterií, rostlin i živočichů. Zatímco u živočichů je tato dráha důkladně prozkoumána z hlediska molekulárních i fyziologických mechanismů, v rostlinné říši nabízí řadu doposud nezodpovězených otázek. Role samotné GABA jako primárního metabolitu v kontextu stresových odpovědí je velmi dobře zdokumentována, na druhou stranu, první poznatky o mechanismu působení tohoto metabolitu v kontextu intra- i intercelulárních signálních drah byly publikovány teprve v nedávné době (Ramesh *et al.*, 2018; Fromm *et al.*, 2020). Kromě tohoto faktu, rostlinné isoformy ALDH5 enzymů, které se do dráhy biosyntézy a degradace GABA významně zapojují, byly charakterizovány pouze u několika rostlinných zástupců.

V rámci praktické části této diplomové práce byly popsány tři rostlinné ALDH5, a sice dvě isoformy z čepenky odstálé (PpALDH5A a PpALDH5B) a jedna ječmenná isoforma s deletovanou signální sekvencí pro transport do mitochondrií ( $\Delta^{1-32}$ HvALDH5).

Všechny tři ALDH5 isoformy vykazují relativně širokou škálu pH optima v rozmezích pH 7,5 – 9,0 (kapitola 4.4). PpALDH5B a  $\Delta$ HvALDH5, podobně jako GabD (SSADH z *E. coli*) či YneI (SSADH z gramnegativní bakterie *Salmonella typhimurium*) vykazovaly nejvyšší residuální aktivitu při pH  $\approx$  8 (pH optimum pro GabD protein odpovídá pH 8,2) (Donnelly a Cooper, 1981; Zheng *et al.*, 2013). Donnelly a Cooper (1981) dále pozorovali rapidní pokles residuální aktivity při pH  $>$  9,2, který je u  $\Delta$ HvALDH5 rovněž pozorovatelný. Oproti deletované variantě ječmenné ALDH5 bylo pH optimum HvALDH5 purifikované z ječmenných zrn posunuto na 9,0. Při tomto pH se však výrazně snížila stabilita tohoto enzymu (Yamaura *et al.*, 1988).

PpALDH5A oproti ostatním studovaným isoformám vykazovala vyšší pH optimu, a sice pH  $\approx$  9,0. Nejvyšší aktivitu při pH  $\geq$  9 rovněž vykazovaly AtALDH5 z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), StALDH5 z lilku bramboru (*Solanum tuberosum*) či lidská hALDH5 (Busch a Fromm, 1999; Narayan a Nair, 1989; Ryzlak a Pietruszko, 1998).

Kromě NAD<sup>+</sup>-dependentních ALDH5 patří mezi SSADH taktéž NADP<sup>+</sup>-dependentní enzymy z rodiny ALDH21 (EC 1.2.1.79), charakteristické pro některé prvoky, bakterie, nižší rostliny a mechorošty. pH optimum PpALDH21 z čepenky odstálé odpovídá hodnotě pH 8,2 (Kopečná *et al.*, 2017).



Velmi úzkou substrátovou specifitu vůči sukcinyl-semialdehydu vykazovaly kromě studovaných enzymů rovněž  $\text{NAD}^+$ -dependentní StALDH5, lidská isoforma hALDH5 i  $\text{NADP}^+$ -dependentní PpALDH21. Stejně jako u PpALDH5B a  $\Delta\text{HvALDH5}$ , hALDH5 a PpALDH21 byly schopné katalyzovat kromě SSAL i semialdehyd kyseliny glutarové, avšak s výrazně nižší aktivitou oproti SSAL (Narayan a Nair, 1989; Ryzlak a Pietruzsko, 1988; Kopečná *et al.*, 2017). Nízkou aktivitu s  $\text{C}_3$ - $\text{C}_5$  aldehydy vykazoval stejně jako všechny tři studované isoformy rovněž i hALDH5 (Ryzlak a Pietruzsko, 1988). S těmito aldehydy a navíc i 4-karboxybenzaldehydem vykazoval residuální aktivitu rovněž GabD protein z *E. coli* (Donnelly a Cooper, 1981). Naopak u PpALDH21 tento trend pozorován nebyl. Tato skutečnost je pravděpodobně dána různou strukturou substrát-vazebné domény u eukaryotických  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$ -dependentních sukcinyl-semialdehyddehydrogenas. Kopečná *et al.* (2017) se zaměřili a porovnání substrát-vazebné domény. Stejně jako u hALDH5 byly substrát i produkt stabilizovány dvěma guanidinovými skupinami argininu a jednou hydroxylovou skupinou tyrosinu (v případě ALDH5 je tyrosinové residuum nahrazeno serinem). Pozice těchto residuů však u výše uvedených dvou rodin vzájemně nekorrespondují. U YneI ze *S. typhimurium* Zheng *et al.* (2012) pozorovali residuální aktivitu při použití esteru semialdehydu kyseliny adipové, což však nebylo pozorováno v případě žádných jiných charakterizovaných SSADH.

Pro vazbu ligandu do koenzym-vazebné domény je rozhodující struktura oblasti vazby adenosinu (Kim *et al.*, 2009; Kopečná *et al.*, 2017). Na základě preference koenzymů jsou SSADH rozděleny do tří následujících skupin:  $\text{NAD}^+$ -dependentní SSADH (ALDH5, EC 1.2.1.24) vyskytující se u většiny živých organismů,  $\text{NADP}^+$ -dependentní SSADH (ALDH21, EC 1.2.1.79) charakteristické pro některé bakterie, prvoky, zelené řasy či mechorosty a  $\text{NAD(P)}^+$ -dependentní SSADH (YneI, EC 1.2.1.18) objevené u gramnegativních bakterií rodů *Salmonella* a *Escherichia* (Donnelly a Cooper, 1981; Fuhrer *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2013; Bocker *et al.*, 2013). Všechny tři studované isoformy, obdobně jako jiné ALDH5, vykazovaly významnou preferenci koenzymu  $\text{NAD}^+$  (Yamaura *et al.*, 1988; Busch a Fromm, 1999; Narayan, 1989; Cash *et al.*, 1978; Ryzlak a Pietruzsko, 1988).

Kromě  $\text{NAD(P)}^+$  byla v rámci praktické části ověřena další analoga koenzymů. Nejvyšší residuální aktivitu vykazoval u všech studovaných isoformách nikotinamid-hypoxanthindinukleotid, který s PpALDH5A vykazoval až 30% residuální aktivitu v porovnání s  $\text{NAD}^+$ . Tato residuální aktivita byla oproti ostatním ALDH5 výrazně vyšší než při použití  $\text{NADP}^+$ .

Míru afinity substrátu lze v rámci enzymy katalyzovaných reakcí charakterizovat na základě hodnot Michaelisovy konstanty  $K_M$ . U isoform  $\Delta H_vALDH5$  a PpALDH5B byly zjištěny hodnoty srovnatelné s  $H_vALDH5$  izolovanou z ječmenných zrn, dále rostlinnými AtALDH5, StALDH5, lidskou hALDH5 i bakteriálními GabD či YneI (15,9; 15; 4,6; 16; 43 a  $13,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (Yamaura *et al.*, 1988; Busch a Fromm, 1999; Narayan, 1989; Cash *et al.*, 1978; Donnelly a Cooper, 1981; Zheng *et al.*, 2013). U PpALDH21 Kopečná *et al.* (2017) pozorovali vyšší hodnotu Michaelisovy konstanty ( $181 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Tento enzym však nepodléhal inhibici nadbytkem, která, mimo nedeletovanou  $H_vALDH5$  a PpALDH5A v při použití  $\text{NADP}^+$ , byla pozorována u všech ostatních SSADH (Yamaura *et al.*, 1988).

Kromě inhibice nadbytkem substrátu byla u AtALDH5 pozorována rovněž kompetitivní inhibice NADH ( $K_i = 122 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a AMP, nekompetitivní inhibice ATP a smíšená inhibice ADP ( $K_i 2,5 - 8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Přítomnost intermediátů Krebsova cyklu enzymovou reakci nijak neovlivňovala (Busch a Fromm, 1999). U nedeletované  $H_vALDH5$  a StALDH5 byla rovněž stanovena inhibice těžkými kovy (Yamaura *et al.*, 1988; Narayan *et al.*, 1989).

Schopnost daného enzymu katalyzovat reakci specifického substrátu nejlépe charakterizuje katalytická účinnost (poměr  $k_{cat}/K_M$ ). Všechny tři studované isoformy mají hodnotu katalytické účinnosti pro  $\text{NAD}^+$  za saturační koncentrace SSAL vyšší než pro  $\text{NADP}^+$ . U PpALDH5B a  $\Delta H_vALDH5$  jsou hodnoty  $K_M$  pro  $\text{NAD}^+$  významně nižší v porovnání s hodnotami pro  $\text{NADP}^+$ . Srovnatelné hodnoty Michaelisovy konstanty pro  $\text{NAD}^+$  byly zjištěny též u StALDH5, hALDH5 či YneI (Narayan *et al.*, 1989; Cash *et al.*, 1978; Zheng *et al.*, 2013). PpALDH5A má podobné hodnoty  $K_M$  pro oba koenzymy, rozhodující je zde hodnota katalytické účinnosti ( $k_{cat}/K_M(\text{NAD}^+) = 1,19 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{cat}/K_M(\text{NADP}^+) = 3,34 \cdot 10^1 \text{ s}^{-1}$ ).  $\text{NADP}^+$ -dependentní PpALDH21 a GabD mají na druhou stranu významně vyšší hodnoty Michaelisovy konstanty pro  $\text{NAD}^+$  než pro  $\text{NADP}^+$  (200krát a 80krát vyšší) (Kopečná *et al.*, 2017; Donnelly a Cooper; 1981).

Nejvyšší hodnotu katalytické účinnosti pro SSAL za saturační koncentrace  $\text{NAD}^+$  vykazuje ječmenná isoforma  $\Delta H_vALDH5$  ( $4,26 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Hodnota katalytické účinnosti pro enzym PpALDH5B ( $6,62 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) řádově odpovídá hodnotě pro cytosolární  $\text{NADP}^+$ -dependentní PpALDH21 ( $8,7 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), která je v tomto mechu rovněž přítomna. Dá se předpokládat, že oba enzymy se pravděpodobně spolupodílejí na katalýze degradační reakce GABA (Kopečná *et al.*, 2017). Ze studovaných enzymů pak nejnižší hodnotu katalytické účinnosti vykazuje PpALDH5A ( $3,05 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Porovnáním výsledků teploty tání jakožto indikátoru stability jednotlivých enzymů byla nejvyšší hodnota  $T_m$  pozorována u PpALDH5B isoformy. U této isoformy byla překvapivě pozorována destabilizace enzymu po vazbě koenzymu, kdy došlo ke snížení teploty tání vlivem vazby  $\text{NAD(P)}^+$ . U PpALDH5A i  $\Delta\text{HvALDH5}$  byl tento efekt dle původních předpokladů opačný, kdy vlivem vazby ligandu  $\text{NAD}^+$  došlo ke zvýšení  $T_m$ . Zvýšení stability bylo rovněž pozorováno u PpALDH21 po vazbě koenzymu  $\text{NADP}^+$  ( $T_m$  se z původní hodnoty 43,2 °C zvýšila na 58,9 °C) (Kopečná *et al.*, 2017). Překvapivé je rovněž zjištění, že zatímco u jiných studovaných SSADH stabilitu ovlivnil pouze přírůstek jednoho z koenzymů, u PpALDH5A byl pozorován efekt zvýšení stability po přidavku koenzymů obou. Tento fakt pravděpodobně souvisí s podobnou mírou afinity k oběma koenzymům. V přítomnosti chloridu sodného o koncentraci 300  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  byla pozorována výrazná destabilizace všech studovaných isoform. Tento efekt zároveň koreluje se získanými CD spektry PpALDH5B a  $\Delta\text{HvALDH5}$ , na jejichž základě byl dle databáze spekter cirkulárního dichroismu u enzymů vystavených koncentracím  $\text{NaCl}$  vyšším než 300  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  patrný úbytek specifických sekundárních struktur na úkor nesespecifických.

Pomocí gelové permeační chromatografie byla dále stanovena kvartérní struktura výše uvedených proteinů. Všechny tři ALDH5 tvoří tetramery, podobně jako jiné rostlinné ALDH5, lidská ALDH5 či bakteriální  $\text{NAD}^+$ -dependentní sukcinyl-semialdehyddehydrogenasa YneI (Ryzlak a Pietruzsko, 1988; Narayan *et al.*, 1989; Busch a Fromm, 1999; Zheng *et al.*, 2013). Tetramerní uspořádání bylo též pozorováno u cytosolické PpALDH21, která na základě vyřešené krystalové struktury tohoto proteinu vytváří homotetramery (Kopečná *et al.*, 2017). Oproti ostatním,  $\text{NADP}^+$ -dependentní GabD sukcinyl-semialdehyddehydrogenasa z *E. coli* vytváří homodimery (Donnelly a Cooper, 1981).

Pro porovnání rozdílů mezi  $\text{NAD}^+$ -dependentními PpALDH5A, PpALDH5B a  $\text{NADP}^+$ -dependentní PpALDH21 bylo na základě struktury hALDH5 vygenerováno sekvenční logo ALDH5 enzymů. Na vazbě sukcinyl-semialdehydu do vazebné domény pro substrát se u obou rodin podílejí dvě guanidinové skupiny argininů vytvářející solné můstky s karboxylovou skupinou SSAL a jedna hydroxylová skupina serinu, respektive tyrosinu. Koenzym-vazebná doména je u obou rodin v oblasti vazby nikotinamidribotidu i bisfosfátu tvořena vysoce konzervovanými aminokyselinovými residui. Významný rozdíl je v uspořádání oblasti pro vazbu adenosinu, kde je glutamátové residuum nahrazeno serinem interagujícím spolu s guanidinovým residuem s 2'-fosfátovou

skupinou NADP<sup>+</sup>. Namísto tohoto argininu se v sekvenci ALDH5 nachází residuum nepolárního alaninu (Kopečná *et al.*, 2017). Pro přesné určení rozdílů mezi strukturami isoform PpALDH5A, PpALDH5B a PpALDH21 by však bylo potřeba znát i krystalovou strukturu mitochondriálních enzymů, která však doposud není vyřešena.

Sukcynyl-semialdehyd dehydrogenasy se řadí mezi základní ALDH vyskytující se v téměř všech živých organismech. Přítomnost různých isoform SSADH má v některých organismech i nepřímý vliv na základní funkce včetně rozmnožování. Hnědá řasa *Scytosiphon lomentaria* obsahuje ve svých samičích gametách specifickou mitochondriální SSADH, jejíž genová exprese se vlivem přechodu do fertilizační fáze výrazně zvýší po dobu následujících 48 hodin. Po ošetření samčích i samičích gamet GABA došlo ke změně genové exprese jak u samičích, tak u samčích gamet, přičemž oba druhy gamet vykazovaly patologický vývoj a ztrátu pohyblivosti (Han *et al.*, 2014). Ve vyšších rostlinách se ALDH5 podílí na správné polaritě růstu listů (Toriba *et al.*, 2010). Mutanti *Arabidopsis* s vyřazeným *ALDH5* genem vykazovaly trpasličí vzrůst s malými listy (Toyokura *et al.*, 2011). U těchto mutantů byl navíc pozorován výrazný nárůst koncentrace markerů oxidačního stresu, jakými jsou například ROS. S těmito závěry koreluje studie Nayyar *et al.* (2014) zaměřující se na vliv GABA na ochranu sazenic rýže seté (*Oryza sativa* L.) proti teplotnímu stresu, kdy tyto sazenice po ošetření exogenní GABA vykazovaly vyšší odolnost proti teplotě v kombinaci s lepším růstem. Po přidání GABA se v rostlinách zvýšila hladina osmoprotektantů, což vedlo ke zvýšení buněčného turgoru. Mimo ALDH5 byly z hlediska osmoprotektivní funkce studovány i enzymy z rodiny ALDH21. Transformanti tabáku a bavlny se začleněným genem *ScALDH21* z mechu *Syntrichia caninervis* vykazovali oproti kontrolním rostlinám vyšší podíl germinace semen s delšími kořeny a vyšší hmotností. Tyto rostliny obsahovaly také vyšší koncentrace osmoprotektivního prolinu, nižší koncentrace malondialdehydu a zvýšenou aktivitu enzymů antioxidačního systému. U transformovaných rostlin tabáku byly tyto závěry potvrzeny i v případě jejich pěstování na poli, kde se zároveň potvrdila jejich zvýšená tolerance vůči suchu (Yang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016). SSADH enzymy stejně jako ostatní enzymy podílející se na metabolismu GABA mají v rostlinách velký význam, jejich další výzkum má tudíž do budoucna jak vědecký, tak i biotechnologický či agronomický potenciál.

## 6 ZÁVĚR

Teoretická část této diplomové práce byla zaměřena na vypracování literární rešerše na téma metabolismu sukcinyl-semialdehydu ve spojení s metabolismem  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny se zaměřením na její význam v rostlinách. Druhá část literární rešerše byla věnována charakterizaci nadrodiny aldehyddehydrogenas z hlediska pravidel nomenklatury jednotlivých rodin a podrodin, reakčního mechanismu ALDH enzymů, substrátové specifity jednotlivých rodin a významu jejich rostlinných zástupců. Pro návaznost s následující částí je zde rovněž rozebrán úvod a historie výzkumu rodiny ALDH5.

Praktická část byla věnována popisu metod použitých pro získání požadovaných konstruktů, expresi rekombinantních proteinů PpALDH5A, PpALDH5B a  $\Delta$ HvALDH5 v expresních buňkách *E. coli*, jejich purifikaci pomocí afinitní chromatografie a charakterizaci z hlediska kinetických parametrů, stability a sekundárních struktur.

Konstrukty PpALDH5A/pET28b a PpALDH5B/pET28b byly úspěšně připraveny. Po transformaci do expresních buněk a expresi rekombinantních proteinů PpALDH5A, PpALDH5B a  $\Delta$ HvALDH5 byly proteiny purifikovány. Všechny proteiny se dále podařilo charakterizovat z hlediska kvartérní struktury a následně stanovit jejich pH optima, substrátové specifity a preference koenzymu, kinetické parametry  $K_M$ ,  $V_{lim}$   $k_{cat}$ , inhibiční konstanty pro substrát a vliv různých činitelů na stabilitu. Proteiny PpALDH5B a  $\Delta$ HvALDH5 byly navíc podrobeny CD-spektroskopii pro analýzu procentuálních zastoupení sekundárních struktur.

## 7 LITERATURA

Albers, R. W., Koval, G. J. (1961): Succinic semialdehyde dehydrogenase: purification and properties of the enzyme from monkey brain. *Biochimica et biophysica acta*, **52**(1), 29-35.

Albers, R. W., Salvador, R. A. (1958): Succinic semialdehyde oxidation by a soluble dehydrogenase from brain. *Science*, **128**(3320), 359-360.

Ansari, M. I., Lee, R. H., Chen, S. C. G. (2005): A novel senescence-associated gene encoding  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA): pyruvate transaminase is upregulated during rice leaf senescence. *Physiologia Plantarum*, **123**(1), 1-8.

Bartels, D., Sunkar, R. (2005): Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, **24**(1), 23-58.

Bartyzel, I., Pelczar, K., Paszkowski, A. (2003): Functioning of the  $\gamma$ -aminobutyrate pathway in wheat seedlings affected by osmotic stress. *Biologia Plantarum*, **47**(2), 221-225.

Bloom, F. E., Iversen, L. L. (1971): Localizing 3 H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature*, **229**(5287), 628-630.

Bouché, N., Fromm, H. (2004): GABA in plants: just a metabolite?. *Trends in plant science*, **9**(3), 110-115.

Brocker C., Vasiliou M., Carpenter S., Carpenter C., Zhang Y., Wang X., Kotchoni S. O., Wood A.J., Kirch H.H., Kopečný D., Nebert D.W., Vasiliou V. (2013): Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* **237**, 189-210.

Brown, G. K., Cromby, C. H., Manning, N. J., Pollitt, R. J. (1987): Urinary organic acids in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: evidence of  $\alpha$ -oxidation of 4-hydroxybutyric acid, interaction of succinic semialdehyde with pyruvate dehydrogenase and possible secondary inhibition of mitochondrial  $\beta$ -oxidation. *Journal of inherited metabolic disease*, **10**(4), 367-375.

Busch, K. B., Fromm, H. (1999). Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant physiology*, **121**(2), 589-598.

Cash, C. D., Maitre, M., Ossola, L., Mandel, P. (1978): Purification and properties of two succinate semialdehyde dehydrogenases from human brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, **524**(1), 26-36.

Clark, S. M., Di Leo, R., Dhanoa, P. K., Van Cauwenberghe, O. R., Mullen, R. T., Shelp, B. J. (2009): Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an *Arabidopsis*  $\gamma$ -aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate. *Journal of experimental botany*, **60**(6), 1743-1757.

Clark, S. M., Di Leo, R., Van Cauwenberghe, O. R., Mullen, R. T., Shelp, B. J. (2009): Subcellular localization and expression of multiple tomato  $\gamma$ -aminobutyrate transaminases that utilize both pyruvate and glyoxylate. *Journal of experimental botany*, **60**(11), 3255-3267.

Clements, J. D. (1996): Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends in neurosciences*, **19**(5), 163-171.

Donnelly, M. I., Cooper, R. A. (1981): Two succinic semialdehyde dehydrogenases are induced when *Escherichia coli* K-12 Is grown on gamma-aminobutyrate. *Journal of bacteriology*, **145**(3), 1425-1427.

Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A. R., Galili, G. (2006): *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant physiology*, **142**(3), 839-854.

Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., Fernie, A. R. (2008): Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in plant science*, **13**(1), 14-19.

Fait, A., Nesi, A. N., Angelovici, R., Lehmann, M., Pham, P. A., Song, L., Fernie, A. R. (2011): Targeted enhancement of glutamate-to- $\gamma$ -aminobutyrate conversion in *Arabidopsis* seeds affects carbon-nitrogen balance and storage reserves in a development-dependent manner. *Plant physiology*, **157**(3), 1026-1042.

Fait, A., Yellin, A., Fromm, H. (2006): GABA and GHB neurotransmitters in plants and animals. In: *Communication in plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, 171-185.

- Fromm, H. (2020): GABA signaling in plants: Targeting the missing pieces of the puzzle. *Journal of Experimental Botany*, **71**(20), 6238-6245.
- Fuhrer, T., Chen, L., Sauer, U., Vitkup, D. (2007): Computational prediction and experimental verification of the gene encoding the NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **189**(22), 8073-8078.
- Gao, Z., Loescher, W. H. (2000): NADPH supply and mannitol biosynthesis. Characterization, cloning, and regulation of the non-reversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in celery leaves. *Plant Physiology*, **124**(1), 321-330.
- Garry, D. J., Coulter, H. D., McIntee, T. J., Wu, J. Y., Sorenson, R. L. (1987): Immunoreactive GABA transaminase within the pancreatic islet is localized in mitochondria of the B-cell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **35**(8), 831-836.
- Gibson, K. M., Sweetman, L., Nyhan, W. L., Jakobs, C. (1983): Rating D, Siemes H, Hanefeld F. Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: an inborn error of gamma-aminobutyric acid metabolism. *Clin. Chim. Acta*, **133**, 33-42.
- Gibson, K. M., Sweetman, L., Nyhan, W. L., Rating, D. (1984): Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Journal of neurogenetics*, **1**(3), 213-218.
- Gilliham, M., Tyerman, S. D. (2016): Linking metabolism to membrane signaling: the GABA-malate connection. *Trends in plant science*, **21**(4), 295-301.
- Guo, R., Shi, L., Yan, C., Zhong, X., Gu, F., Liu, Q., Li, H. (2017): Ionomic and metabolic responses to neutral salt or alkaline salt stresses in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *BMC Plant Biology*, **17**(1), 1-13.
- Han, J. W., Klochkova, T. A., Shim, J., Nagasato, C., Motomura, T., Kim, G. H. (2014): Identification of three proteins involved in fertilization and parthenogenetic development of a brown alga, *Scytosiphon lomentaria*. *Planta*, **240**(6), 1253-1267.
- Hare, P. D., Cress, W. A. (1997): Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant growth regulation*, **21**(2), 79-102.
- Hoover, G. J., Prentice, G. A., Merrill, A. R., Shelp, B. J. (2007): Kinetic mechanism of a recombinant *Arabidopsis* glyoxylate reductase: studies of initial velocity, dead-end inhibition and product inhibition. *Botany*, **85**(9), 896-902.
- Hou, Q., Bartels, D. (2015): Comparative study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in the glycophyte *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema halophytes*. *Annals of botany*, **115**(3), 465-479.
- Chen, D., Shao, Q., Yin, L., Younis, A., Zheng, B. (2019): Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*, **9**, 1945.
- Inostroza-Blancheteau, C., Reyes-Díaz, M., Aquea, F., Nunes-Nesi, A., Alberdi, M., Arce-Johnson, P. (2011): Biochemical and molecular changes in response to aluminium-stress in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**(9), 1005-1012.
- Jalil, S. U., Khan, M. I. R., Ansari, M. I. (2019): Role of GABA transaminase in the regulation of development and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Current Plant Biology*, **19**, 100119.
- Kim, Y. G., Lee, S., Kwon, O. S., Park, S. Y., Lee, S. J., Park, B. J., Kim, K. J. (2009): Redox-switch modulation of human SSADH by dynamic catalytic loop. *The EMBO Journal*, **28**(7), 959-968.
- Kim, Y. G., Lee, S., Kwon, O. S., Park, S. Y., Lee, S. J., Park, B. J., Kim, K. J. (2009): Redox-switch modulation of human SSADH by dynamic catalytic loop. *The EMBO Journal*, **28**(7), 959-968.
- Kinnersley, A. M., Turano, F. J. (2000): Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **19**(6), 479-509.
- Koolman, J., Moeller, H., Röhm, K. H. (2012): Kaffee, Käse, Karies...: Biochemie im Alltag. *John Wiley & Sons*.
- Kopečná, M., Vigouroux, A., Vilím, J., Končítiková, R., Briozzo, P., Hájková, E., Jašková, L., von Schwartzenberg, K., Šebela, M., Moréra, S., Kopečný, D. (2017): The ALDH 21 gene found in lower plants and some vascular plants codes for a NADP<sup>+</sup>-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase. *The Plant Journal*, **92**(2), 229-243.

- Kopečný, D., Tylichová, M., Snegaroff, J., Popelková, H., Šebela, M. (2011): Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of  $\omega$ -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *The FEBS journal*, **278**(17), 3130-3139.
- Koppaka V., Thompson D.C., Chen Y., Ellermann M., Nicolaou K.C., Juvonen R.O., Petersen D., Deitrich R.A., Hurley T.D., Vasiliou V. (2012): Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacological Reviews* **64**, 520-539.
- Korasick D. A., Končítiková R., Kopečná M., Hájková E., Vigouroux A., Moréra S., Becker D.F., Šebela M., Tanner J.J., Kopečný, D. (2019): Structural and Biochemical Characterization of Aldehyde Dehydrogenase 12, the Last Enzyme of Proline Catabolism in Plants. *Journal of molecular biology*, **431**, 576-592.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T., Renaut, J. (2011): Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics*, **74**(8), 1301-1322.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934): The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, **56**(3), 658-666.
- Liu Z.J., Hempel J., Sun J., Rose J., Hsiao D., Chang W.R., Chung Y.J., Kuo I., Lindahl R., Wang B.C. (1997): Crystal structure of a class 3 aldehyde dehydrogenase at 2.6 Å resolution. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **414**, 1–7.
- Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D., Vasiliou, V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, **4**(6), 697-720.
- Michaelis, L., Menten, M. L. (1913): Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. z.*, **49**(333-369), 352.
- Mustafavi, S. H., Badi, H. N., Şekara, A., Mehrafarin, A., Janda, T., Ghorbanpour, M., Rafiee, H. (2018): Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. *Acta Physiologiae Plantarum*, **40**(6), 1-19.
- Narayan, V. S., Nair, P. M. (1989): Potato tuber succinate semialdehyde dehydrogenase: purification and characterization. *Archives of biochemistry and biophysics*, **275**(2), 469-477.
- Nayyar, H., Kaur, R., Kaur, S., Singh, R. (2014):  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) imparts partial protection from heat stress injury to rice seedlings by improving leaf turgor and upregulating osmoprotectants and antioxidants. *Journal of Plant Growth Regulation*, **33**(2), 408-419.
- Page, M. G., Ankoma-Sey, V., Coulson, W. F., Benders, D. A. (1989): Brain glutamate and  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) metabolism in thiamin-deficient rats. *British journal of nutrition*, **62**(2), 245-253.
- Palacios, J. M., Wamsley, J. K., Kuhar, M. J. (1981). High affinity GABA receptors—autoradiographic localization. *Brain research*, **222**(2), 285-307.
- Parveez, G. K. A., Bahariah, B., Ayub, N. H., Masani, M. Y. A., Rasid, O. A., Tarmizi, A. H., Ishak, Z. (2015): Production of polyhydroxybutyrate in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) mediated by microprojectile bombardment of PHB biosynthesis genes into embryogenic calli. *Frontiers in plant science*, **6**, 598.
- Pawłowski, T. A., Staszak, A. M., Karolewski, P., Giertych, M. J. (2017): Plant development reprogramming by cynipid gall wasp: proteomic analysis. *Acta Physiologiae Plantarum*, **39**(5), 114.
- Perozich, J., Kuo, I., Wang, B. C., Boesch, J. S., Lindahl, R., Hempel, J. (2000): Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *European journal of biochemistry*, **267**(20), 6197-6203.
- Ramesh, S. A., Kamran, M., Sullivan, W., Chirkova, L., Okamoto, M., Degryse, F., Tyerman, S. D. (2018): Aluminum-activated malate transporters can facilitate GABA transport. *The Plant Cell*, **30**(5), 1147-1164.
- Ravas, D., Kacso, G., Fodor, V., Horvath, K., Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C. (2017): Catabolism of GABA, succinic semialdehyde or gamma-hydroxybutyrate through the GABA shunt impair mitochondrial substrate-level phosphorylation. *Neurochemistry international*, **109**, 41-53.



Riveros-Rosas, H., González-Segura, L., Julián-Sánchez, A., Díaz-Sánchez, Á. G., Muñoz-Clares, R. A. (2013): Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chemico-biological interactions*, **202**(1-3), 51-61.

Ryzlak, M. T., Pietruszko, R. (1988): Human brain “high  $K_M$ ” aldehyde dehydrogenase: purification, characterization, and identification as NAD<sup>+</sup>-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase. *Archives of biochemistry and biophysics*, **266**(2), 386-396.

Saini, K., Markakis, M. N., Zdanio, M., Balcerowicz, D. M., Beeckman, T., De Veylder, L., Vissenberg, K. (2017): Alteration in auxin homeostasis and signaling by overexpression of PINOID kinase causes leaf growth defects in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, **8**, 1009.

Scholz, S. S., Malabarba, J., Reichelt, M., Heyer, M., Ludewig, F., Mithöfer, A. (2017): Evidence for GABA-induced systemic GABA accumulation in *Arabidopsis* upon wounding. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 388.

Stepansky, A., Less, H., Angelovici, R., Aharon, R., Zhu, X., Galili, G. (2006): Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. *Amino acids*, **30**(2), 121-125.

Stiti, N., Adewale, I. O., Petersen, J., Bartels, D., Kirch, H. H. (2011): Engineering the nucleotide coenzyme specificity and sulfhydryl redox sensitivity of two stress-responsive aldehyde dehydrogenase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, **434**(3), 459-471.

Stiti, N., Podgórska, K., Bartels, D. (2014): Aldehyde dehydrogenase enzyme ALDH3H1 from *Arabidopsis thaliana*: Identification of amino acid residues critical for cofactor specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1844**(3), 681-693.

Streeter, J. G., Thompson, J. F. (1972): In vivo and in vitro studies on  $\gamma$ -aminobutyric acid metabolism with the radish plant (*Raphanus sativus*, L.). *Plant physiology*, **49**(4), 579-584.

Sunkar, R., Bartels, D., Kirch, H. H. (2003): Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal*, **35**(4), 452-464.

Tola, A. J., Jaballi, A., Germain, H., Missihoun, T. D. (2021): Recent Development on Plant Aldehyde Dehydrogenase Enzymes and Their Functions in Plant Development and Stress Signaling. *Genes*, **12**(1), 51.

Toriba, T., Suzaki, T., Yamaguchi, T., Ohmori, Y., Tsukaya, H., Hirano, H. Y. (2010): Distinct regulation of adaxial-abaxial polarity in anther patterning in rice. *The Plant Cell*, **22**(5), 1452-1462.

Toyokura, K., Watanabe, K., Oiwaka, A., Kusano, M., Tameshige, T., Tatematsu, K., Okada, K. (2011): Succinic semialdehyde dehydrogenase is involved in the robust patterning of *Arabidopsis* leaves along the adaxial–abaxial axis. *Plant and Cell Physiology*, **52**(8), 1340-1353.

Trettel, F., Malaspina, P., Jodice, C., Novelletto, A., Slaughter, C. A., Caudle, D. L., Gibson, K. M. (1996): Human Succinic Semialdehyde Dehydrogenase. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* **6** (pp. 253-260). Springer, Boston, MA.

Tylichová, M., Kopečný, D., Moréra, S., Briozzo, P., Lenobel, R., Snégaroff, J., Šebela, M. (2010): Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *Journal of molecular biology*, **396**(4), 870-882.

Valverde, F., Losada, M., Serrano, A. (1999): Engineering a central metabolic pathway: glycolysis with no net phosphorylation in an *Escherichia coli* gap mutant complemented with a plant *GapN* gene. *FEBS letters*, **449**(2-3), 153-158.

Van Cauwenberghe, O. R., Shelp, B. J. (1999): Biochemical characterization of partially purified gaba: pyruvate transaminase from *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, **52**(4), 575-581.

Bartyzel, I., Pelczar, K., Paszkowski, A. (2003): Functioning of the  $\gamma$ -aminobutyrate pathway in wheat seedlings affected by osmotic stress. *Biologia Plantarum*, **47**(2), 221-225.

Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K. F., Nebert, D. W. (1999): Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics*, **9**(4), 421-434.

- Wang, W., Jiang, W., Liu, J., Li, Y., Gai, J., Li, Y. (2017): Genome-wide characterization of the aldehyde dehydrogenase gene superfamily in soybean and its potential role in drought stress response. *BMC genomics*, **18**(1), 1-17.
- Warburg, O. (1923): Versuche und uberledbeudem karcinomgewebe (methoden). *Biochem. Z.*, **142**, 317-333.
- Wu, C., Zhou, S., Zhang, Q., Zhao, W., Peng, Y. (2006): Molecular cloning and differential expression of an  $\gamma$ -aminobutyrate transaminase gene, OsGABA-T, in rice (*Oryza sativa*) leaves infected with blast fungus. *Journal of Plant Research*, **119**(6), 663-669.
- Xu, D., Guo, J., Xu, L., Sun, X., Sun, X. Z. (2014): The relationship between polyamine oxidase activity and lignin deposition and chrysanthemum flower bud differentiation. *Acta Agric. Boreali Sinica*, **29**, 164-169.
- Yamaura, I., Matsumoto, T., Funatsu, M., Shinohara, T. (1988): Purification and some properties of succinic semialdehyde dehydrogenase from barley seeds. *Agricultural and biological chemistry*, **52**(11), 2929-2930.
- Yang, H., Zhang, D., Li, H., Dong, L., Lan, H. (2015): Ectopic overexpression of the aldehyde dehydrogenase *ALDH21* from *Syntrichia caninervis* in tobacco confers salt and drought stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, **95**, 83-91.
- Yang, H., Zhang, D., Li, X., Li, H., Zhang, D., Lan, H., Wang, J. (2016): Overexpression of *ScALDH21* gene in cotton improves drought tolerance and growth in greenhouse and field conditions. *Molecular Breeding*, **36**(3), 34.
- Yang, H., Zhang, D., Wang, J., Wood, A. J., Zhang, Y. (2012): Molecular cloning of a stress-responsive aldehyde dehydrogenase gene *ScALDH21* from the desiccation-tolerant moss *Syntrichia caninervis* and its responses to different stresses. *Molecular biology reports*, **39**(3), 2645-2652.
- Yu, G. H., Zou, J., Feng, J., Peng, X. B., Wu, J. Y., Wu, Y. L., Sun, M. X. (2014): Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) affects pollen tube growth via modulating putative Ca<sup>2+</sup>-permeable membrane channels and is coupled to negative regulation on glutamate decarboxylase. *Journal of experimental botany*, **65**(12), 3235-3248.
- Zarei, A., Trobacher, C. P., Shelp, B. J. (2016): *Arabidopsis* aldehyde dehydrogenase 10 family members confer salt tolerance through putrescine-derived 4-aminobutyrate (GABA) production. *Scientific reports*, **6**(1), 1-11.
- Zhang, Y., Mao, L., Wang, H., Brocker, C., Yin, X., Vasiliou, V., Wang, X. (2012): Genome-wide identification and analysis of grape aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily. *PloS one*, **7**(2), e32153.
- Zhao, J., Missihoun, T. D., Bartels, D. (2017): The role of *Arabidopsis* aldehyde dehydrogenase genes in response to high temperature and stress combinations. *Journal of experimental botany*, **68**(15), 4295-4308.
- Zheng, H., Beliaevsky, A., Tchigvintsev, A., Brunzelle, J. S., Brown, G., Flick, R., Yakunin, A. F. (2013): Structure and activity of the NAD (P)<sup>+</sup>-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase YneI from *Salmonella typhimurium*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **81**(6), 1031-1041.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(k)bp	(kilo) pár bází
2OG	2-oxoglutarová kyselina
AASAL	$\alpha$ -aminoadipát-semialdehyd
ABAL	4-aminobutanal
Ac-CoA	acetyl-koenzym A
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALDH“ „	aldehyddehydrogenasa z rodiny “ „
ALDH21	NADP <sup>+</sup> -dependentní sukcinyl-semialdehyddehydrogenasa
ALDH5	NAD <sup>+</sup> -dependentní sukcinyl-semialdehyddehydrogenasa
APS	persulfát amonný
B-PER	Bacterial protein extraction reagent
BSA	hovězí sérový albumin
CD	cirkulární dichroismus
cDNA	komplementární DNA
CNS	centrální nervová soustava
Crot-CoA	krotonyl-koenzym A
dNTPs	směs deoxynukleotid trifosfátů
FPLC	rychlá proteinová kapalinová chromatografie
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáslená
GABA-T	$\gamma$ -aminobutyrátransaminasa
GAD	glutamátdekarboxylasa
GHB	kyselina $\gamma$ -hydroxymáslená
GHBDH	$\gamma$ -hydroxybutyrátdehydrogenasa
GRSAL	semialdehyd kyseliny glutarové
GSAL	semialdehyd kyseliny glutamové
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
Kan	kanamycin
LB	lysogenylový bujón (Luria-Bertani)
Milli-Q H <sub>2</sub> O	ultračistá voda
OAA	kyselina oxaloctová
OD	optická hustota
P5C	pyrrolin-5-karboxylová kyselina
PCR	polymerázová řetězcová reakce
PpALDH5A	ALDH5A isoforma z <i>Physcomitrella patens</i>
PpALDH5B	ALDH5B isoforma z <i>Physcomitrella patens</i>
Pyr	kyselina pyrohroznová
RT-PCR	PCR spojená s reverzní transkripcí
SDS	dodecylsulfát sodný
Sm	streptomycin
SOC	Super optimal broth
SSA	kyselina jantarová
SSADH	sukcinylsemialdehyddehydrogenasa
SSAL	sukcinyl-semialdehyd
TAE	Tris-acetát-EDTA
TBS	Towbinův pufr
TBST	Towbinův pufr s přísávkem detergentu TWEEN20
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin

TEMED	tetramethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWEEN20	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
$\Delta^{1-32}\text{HvALDH5}$	ALDH5F1 isoforma z <i>Hordeum vulgare</i> L.

## 9 PŘÍLOHY

### 9.1 Příloha 1 – sekvence cDNA studovaných ALDH5

Následující sekvence byly vyhledány pomocí algoritmu BLASTN v online databázi Phytozome 13. *PpALDH5A* (Pp3c26\_10950V3.1.p), *PpALDH5B* (Pp3c26\_10958V3.1.p)  $\Delta^{1-32}$ *HvALDH5F1* (HORVU6Hr1G031480.3).

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	10                  20                  30                  40                  50
<b>PpALDH5A</b>	ATGGTGCAGC TGAACGAAGC GGGATTGTTC AAATCGCAGG GGCTTATTGG
<b>PpALDH5B</b>	ATGGGCACAA TGGTGCAGCT GAACGAAGCG GGATTGTTCA AATCGCAGGG
<b><math>\Delta</math>HvALDH5F1</b>	ATGGGCAGCG TGGACGCGGG CGCGGCGATG GAGAAGATCC GGGCGGCGGG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	60                  70                  80                  90                  100
<b>PpALDH5A</b>	TGACAAGTGG GTCGATGCTG AAAACGGCCA CACTCTCCCA GTTAACAATC
<b>PpALDH5B</b>	GCTTATTGGT GACAAGTGGG TCGATGCTGA AAACGGCCAC ACTCTCCCAG
<b><math>\Delta</math>HvALDH5F1</b>	GCTGCTCAGG ACGCGCGGCC TCATCGGCGG CAAGTGGGTC GACGCTACG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	110                  120                  130                  140                  150
<b>PpALDH5A</b>	CTGCCACGGG AGAGATCCTC ACGTCTGTGC CATTATGGG TAAGCGAGAA
<b>PpALDH5B</b>	TTAACAATCC TGCCACGGGA GAGATCCTCA CGTCTGTGCC ATTTATGGGT
<b><math>\Delta</math>HvALDH5F1</b>	ACGGGAAGAC CATCGAGGTG CAAAATCCAG CAACTGGCGA GGTCCCTGCA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	160                  170                  180                  190                  200
<b>PpALDH5A</b>	GCAGAGAAGG CGATCGCTGC AGCATCTCAG GCTTTTACAT CTTGGAGTAA
<b>PpALDH5B</b>	AAGCGAGAAG CAGAGAAGGC GATCGCTGCA GCATCTCAGG CTTTACATC
<b><math>\Delta</math>HvALDH5F1</b>	AATGTAGCCT GCATGGGCAA CAGAGAAACA GCTGATGCAA TAGCTTCTGC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	210                  220                  230                  240                  250
<b>PpALDH5A</b>	GCGAACGGCT AATGACAGGA GCAAAATCTC ACGACAGTGG TTTAACTTAC
<b>PpALDH5B</b>	TTGGAGTAAG CGAACGGCTA ATGACAGGAG CAAAATCTA CGACAGTGGT
<b><math>\Delta</math>HvALDH5F1</b>	TCACACTACA TTTTATACTT GGAGCAAAC TACTGCAAGT GAAAGGAGCA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	260                  270                  280                  290                  300
<b>PpALDH5A</b>	TCATAAAGAA TAAAGATGAC CTTGGGAAGC TCATTGTCTT GGAACAAGGA
<b>PpALDH5B</b>	TTAACTTACT CATAAAGAAT AAAGATGACC TTGGGAAGCT CATTGTCTTG
<b><math>\Delta</math>HvALDH5F1</b>	AGGCACTAAG AAAATGGCAT GACCTACTTA TGTACACAA GGAAGAACTT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	310                  320                  330                  340                  350
<b>PpALDH5A</b>	AAGCCACTCG CTGAAGCAGT CGGAGAGGTA ATCGTATATG GTGCAGCCTT
<b>PpALDH5B</b>	GAACAAGGAA AGCCACTCGC TGAAGCAGTC GGAGAGATCG TATATGGTGC
<b><math>\Delta</math>HvALDH5F1</b>	GCGCTTCTTA TGACACTGGA ACAGGGGAAG CCTATGAAAG AAGCCCTTGG

	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	360          370          380          390          400
<b>PpALDH5A</b>	TGTAGAGTAT TATGCGGAAG AGGCAAAACG AGTTTACGGT GACATAATTC
<b>PpALDH5B</b>	AGCCTTTGTA GAGTATTATG CGGAAGAGGC AAAACGAGTT TACGGTGACA
<b>ΔHvALDH5F1</b>	GGAGGTGAAC TATGGTGCAA GTTTCATAGA ATTTTTTGCT GAGGAAGCAA
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	410          420          430          440          450
<b>PpALDH5A</b>	CCTCTCCTTT CCCAGAGAAA CGAATGCTCG TGATGAAACA ACCAGTTGGA
<b>PpALDH5B</b>	TAATTCCCTC TCCTTTCCCA GAGAAACGAA TGCTCGTGAT GAAACAACCA
<b>ΔHvALDH5F1</b>	AGCGTGTGTA TGGTGATATT ATTCCCCCAA CTCTAGCTGA TCGCAGACTA
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	460          470          480          490          500
<b>PpALDH5A</b>	GTAGTAGCTG CCATAGCACC TTGGAATTTT CCTCTGGCCA TGATTACTCG
<b>PpALDH5B</b>	GTTGGAGTAG TAGCTGCCAT AGCACCTTGG AATTTTCCTC TGGCCATGAT
<b>ΔHvALDH5F1</b>	TTGGTTCTGA AGCAGCCTAT TGGGGTAGTT GGAGCTATTA CACCATGGAA
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	510          520          530          540          550
<b>PpALDH5A</b>	CAAGGTCCCT CCAGCGTTAG CAGCAGGGTG CACTGTCGTT ATAAAGCCTT
<b>PpALDH5B</b>	TACTCGCAAG GTAGCTCCAG CGTTAGCAGC AGGGTGCACG GTCGTTATAA
<b>ΔHvALDH5F1</b>	TTTTCCTTTA GCAATGATAA CCAGAAAGGT TGGACCAGCA TTGGCTTGTG
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	560          570          580          590          600
<b>PpALDH5A</b>	CAGAGCTTAC TCCTTTGACG GCGTTAGCTG CTGCAGAACT TGCCCTGCAA
<b>PpALDH5B</b>	AGCCTTCAGA GCTTACTCCT TTGACGGCGT TAGCTGCTGC AGAACTTGCC
<b>ΔHvALDH5F1</b>	GATGCACAGT TGTTGTCAAG CCATCAGAGT TCACACCTCT GACAGCATTA
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	610          620          630          640          650
<b>PpALDH5A</b>	GCAGGCATTC CTCCTGGTGT TGTGAACGTT GTGATGGGAG ATGCAAAGGG
<b>PpALDH5B</b>	CTGCAAGCAG GCATTCCCTC TGGTGTGTG AACGTTGTGA TGGGAGATGC
<b>ΔHvALDH5F1</b>	GCTGCAGCAG ACCTTGCTCT TCAAGCTGGA ATACCAGCTG GTGTACTAAA
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	660          670          680          690          700
<b>PpALDH5A</b>	AATTGGGGAT GCGATGCTAG ACAGCACAGA GGTTCGTAAA ATTACTTTCA
<b>PpALDH5B</b>	AAAGGGAATT GGGGATGCGA TGCTAGACAG CACAGAGGTT CGTAAAATTA
<b>ΔHvALDH5F1</b>	TGTTGTGATG GGTAATGCTC CTGAGATAGG TGATGAACTA ATGCAGAGCA
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	710          720          730          740          750
<b>PpALDH5A</b>	CTGGCTCAAC AGGAGTTGGT AAAATGCTCT TGGCTGGGGC GGGAAAGACT
<b>PpALDH5B</b>	CTTTCACTGG CTCAACAGGA GTTGGTAAAA TGCTCTTGGC TGGGGCGGGA
<b>ΔHvALDH5F1</b>	CACAGGTCAG AAAGATTACG TTCACGGGTT CAACAGCTGT TGGCAAAAAA

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          760          770          780          790          800
PpALDH5A      GTTAAAAAGG TTTCCCTAGA GCTTGGTGGT AACGCACCGT GCATCGTTTT
PpALDH5B      AAGACTGTTA AAAAGGTTTC CTTAGAGCTT GGTGGTAACG CACCGTGCAT
ΔHvALDH5F1   CTGATGGCTG GATCAGCAAA CACCGTGAAA AAGGTTTCTT TGGAGCTTGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          810          820          830          840          850
PpALDH5A      TGATGATGCT AATTTGGACG TTGCTGTTAA AGGAGTGTTG GCCGGCAAGT
PpALDH5B      CGTTTTTGAT GATGCTAATT TGGACGTTGC TGTTAAAGGA GTGTTGGCCG
ΔHvALDH5F1   TGGGAATGCA CCTTGCATTG TTTTCGATGA TGCAGATATT GATGTTGCCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          860          870          880          890          900
PpALDH5A      ACAGGAACTC TGGCCAAACT TGTGTTTGCA TCAACAAAAT TTTTGTGCAA
PpALDH5B      GCAAGTACAG GAACTCTGGC CAAACTTGTG TTTGCATCAA CAAAATTTTT
ΔHvALDH5F1   TTAAAGGCAG TCTTGCTGCC AAGTTTCGGA ACAGTGGACA GACATGTGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          910          920          930          940          950
PpALDH5A      GATGGCATCT ACGACAAGTT TCGGAGGCT TTTGCAAAAAG CAGTGTCAAG
PpALDH5B      GTGCAAGATG GCATCTACGA CAAGTTTGC GAGGCTTTTG CAAAAGCAGT
ΔHvALDH5F1   TGTGCAAACA GGATATTGGT GCAAGAAGGT ATCTACGAAA AATTCGCAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          960          970          980          990          1000
PpALDH5A      ATTACGCGCA GGAATGGCC TAGAACCAGG CATAACTCAG GGACCATTGA
PpALDH5B      GTCAGGATTA CGCGCAGGGA ATGGCCTAGA ACCAGGCATA ACTCAGGGAC
ΔHvALDH5F1   TGCATTTGTC AAGGCTGTTC AGAGCTTGCA AGTCGGTAAT GGGCTAGAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1010         1020         1030         1040         1050
PpALDH5A      TTAATGAGAC AGCACTCGAA AAGGTTGAGA GGCACGTACA AGACGCAGTG
PpALDH5B      CATTGATTAA TGAGACAGCA CTCGAAAAGG TTGAGAGGCA CGTACAAGAC
ΔHvALDH5F1   AGAGTACATC ACAGGGTCTT CTAATCAATG AAGCTGCCGT TCAAAAGGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1060         1070         1080         1090         1100
PpALDH5A      TCCAAGGGAG CGAAAGTGCT TGTAGGTGGC AAACGGCATA GTTTAGGTGC
PpALDH5B      GCAGTGTTCA AGGGAGCGAA AGTGCTTGTA GGTGGCAAAC GGCATAGTTT
ΔHvALDH5F1   GAGAAGTTTG TAGGTGATGC TACTTCAAAG GGAGCCAACG TCATGCTCGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1110         1120         1130         1140         1150
PpALDH5A      CACATTCTAT GAACCAACTA TTCTCGGCAA CGCTAGTGAC GAAATGCTTA
PpALDH5B      AGGTCGCACA TTCTATGAAC CAACTATTCT CGGCAACGCT AGTGACGAAA
ΔHvALDH5F1   TGGTAAAAGA CACAGCCTCG GGATGACCTT TTATGAGCCA ACTGTGGTAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1160         1170         1180         1190         1200
PpALDH5A      TCTTCAGGGA GGAAGTATTT GGGCCAGTTG CACCCCTTGT GCGATTTAAC
PpALDH5B      TGCTTATCTT CAGGGAGGAA GTATTTGGGC CAGTTGCACC CCTTGTCGGA
ΔHvALDH5F1   GGAACGTAAG CAATGATATG CTCTTTTCA GGAAGAAGT TTTTGGTTCA

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1210      1220      1230      1240      1250
PpALDH5A ACAGATGAGG AAGCAATCAA GTTGGCCAAT AATTCAGAAT TTGGCCTGGC
PpALDH5B TTTAACACAG ATGAGGAAGC AATCAAGTTG GCCAATAATT CAGAATTTGG
ΔHvALDH5F1 GTTGCACCAC TTATACCATT CAAAACCTGAG GAGGAAGCAA TCCATCTAGC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1260      1270      1280      1290      1300
PpALDH5A TGCATACGCT TTTACTGAGA ATATTACTCG AGGTTGGCGT GTAGCCGAGT
PpALDH5B CCTGGCTGCA TACGCTTTTA CTGAGAATAT TACTCGAGGT TGGCGTGTAG
ΔHvALDH5F1 AAACGACACC AATGCAGGCT TAGCTGCATA CATGTTTACA AAGAGCATAG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1310      1320      1330      1340      1350
PpALDH5A CACTTGAGTT TGGCATGGTT GGCCTAAATG AAGGCCTCAT TTCAACTGAG
PpALDH5B CCGAGTCACT TGAGTTTGGC ATGGTTGGCC TAAATGAAGG CCTCATTTCA
ΔHvALDH5F1 CCCGGTCATG GCGTGTTTCC GAAGCTCTTG AGTACGGGCT TGTCGGTGTG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1360      1370      1380      1390      1400
PpALDH5A GTGGCACCTT TCGGAGGTAT GAAGCAATCT GGACTGGGTC GTGAAGGCTC
PpALDH5B ACTGAGGTGG CACCTTTCGG AGGTATGAAG CAATCTGGAC TGGGTCGTGA
ΔHvALDH5F1 AATGAGGGAT TGATTTCCAC AGAGGTGGCG CCATTCGGTG GGGTTAAGCA

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1410      1420      1430      1440      1450
PpALDH5A CAAGTATGGT CTTGACGAAT ACCTTGAGAT GAAGTACGTG TGTCTTGGCA
PpALDH5B AGGCTCCAAG TATGGTCTTG ACGAATACCT TGAGATGAAG TACGTGTGTC
ΔHvALDH5F1 GTCTGGCCTT GGGCGGGAAG GATCAAAAATA TGGCATGGAT GACTTCCTGG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|
      1460      1470      1480
PpALDH5A ACATGGCACA ACCCGTCGGT TGA.....
PpALDH5B TTGGCAACAT GGCACAACCC GTCGGTTGA. ....
ΔHvALDH5F1 AGATTAAGTA TGTATGCATG GGCAACCTGG GTTGA

```

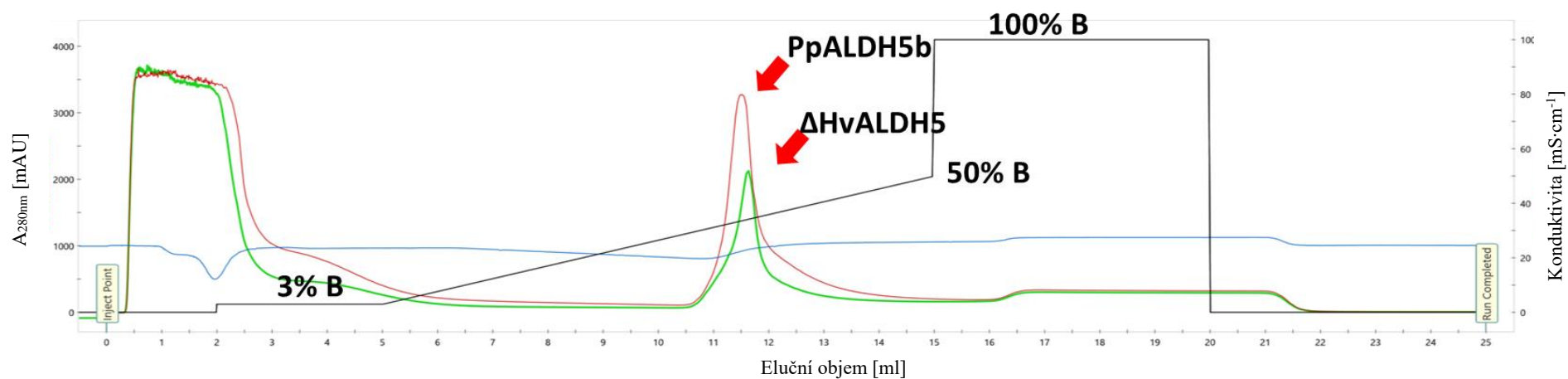


## 9.2 Příloha 2 – sekvence primerů

Tab. 11 Sekvence primerů použité pro klonování genů *PpALDH5A* a *PpALDH5* pomocí PCR. PP – posměrný primer, RP-reverzní primer, T<sub>A</sub> – teplota annealingu [°C].

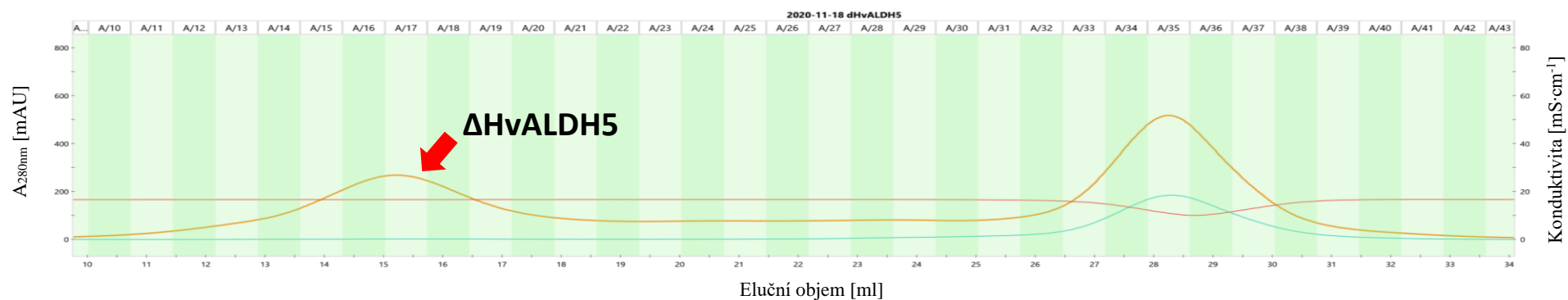
Primer	T <sub>A</sub> [°C]	Sekvence (5' → 3')
PpALDH5A_NdeI PP	63,6	CACTCATATGGGGTTTGCGCAAGTTGGT
PpALDH5A_SalI RP	66,5	CACGTCGACTCAGCACATGAAGGGTTGCT
PpALDH5B_NdeI PP	63,4	CACTCATATGGGCACAATGGTGCAGC
PpALDH5B_SalI RP	65,0	CATGTCGACTCAACCGACGGGTTGTG

### 9.3 Příloha 3 – chromatografické záznamy afinitní FPLC chromatografie



Obr. 41 Chromatogram proteinů PpALDH5B (červená) a  $\Delta$ HvALDH5 (zelená). Pro afinitní chromatografii bylo využito gradientu elučního pufru. Černá barva znázorňuje procento elučního pufru obsahujícího imidazol o koncentraci  $500\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (B). Proteiny byly detekovány na základě spektrofotometrického měření absorbance při vlnové délce 280 nm.

## 9.4 Příloha 4 – chromatografický záznam gelové permeační chromatografie



Obr. 42 Příklad chromatografického záznamu gelové permeační chromatografie. Eluovaný protein  $\Delta$ HvALDH5 je zobrazen oranžovou barvou. Pomocí kalibrační závislosti byla z odečteného elučního objemu vypočítána molekulová hmotnost jednotlivých frakcí analyzovaných proteinů. Proteiny byly detekovány na základě spektrofotometrického měření absorbance při vlnové délce 280 nm.