

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Produkce a charakterizace aldehyddehydrogenas
rodiny 22 z ječmene a kukuřice**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jarmila Kajánková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radka Končítíková, Ph.D.
Rok:	2020

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

V Olomouci dne 11.5.2020

podpis diplomanta

Chtěla bych poděkovat paní doktorce Radce Končítikové za zajímavé téma, odborné vedení práce, snahu předat mi co nejvíce praktických dovedností a teoretických znalostí a také za plnohodnotnou komunikaci při sepisování práce. Chtěla bych též poděkovat ostatním pracovníkům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky za vytvoření příjemného prostředí pro práci v laboratoři a případné rady. Poděkování patří i panu magistru Michalu Markovi za gramatickou a stylistickou kontrolu práce. Práce byla zpracována s využitím grantu IGA_PrF_2019_022.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jarmila Kajánková
Název práce	Produkce a charakterizace aldehyddehydrogenas rodiny 22 z ječmene a kukuřice
Typ práce	Magisterská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Radka Končítíková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt: Tato diplomová práce se zabývá klonováním, purifikací a charakterizací ječmenné a kukuřičné aldehyddehydrogenasy rodiny 22 (ALDH22), což je nově objevená rodina a nebyla zatím dostatečně prozkoumána. Byla provedena fylogenetická analýza ALDH22, tento protein byl popsán u řas i suchozemských rostlin, tudíž se vyvinul již před přechodem rostlin z vody na souš, navíc byl přítomen u většiny dostupných organismů. V experimentální části byl gen pro ALDH22 z vybraných pletiv vložen do expresních bakterií *Escherichia coli*, z jejichž lyzátu byl protein pomocí afinitivní a iontoměničové chromatografie purifikován. Bylo stanoveno pH optimum, substrátová specifita a kinetické parametry K_m a V_{lim} vybraných substrátů, u nichž byla porovnána katalytická účinnost enzymu. ALDH22 je NAD^+ -dependentní enzym s širokou substrátovou specifitou, který s vysokou katalytickou účinností přeměňuje acetaldehyd, citral, *trans*-2-nonenal a 3-metyl-2-butenal, navíc může být zapojen ve fenylypropanoidové nebo lipoxygenasové dráze, čemuž napovídá i jeho vysoká exprese v embryu a plodu.

Klíčová slova	Kukuřice, ječmen, aldehyddehydrogenasa, fenylypropanoidy, lipidy, acetaldehyd
Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname and Bc. Jarmila Kajánková

Title Production and characterization of aldehyde dehydrogenase family 22 from barley and maize

Type of thesis Diploma

Department Department of Biochemistry

Supervisor Mgr. Radka Končítíková, Ph.D.

The year of presentation 2020

Abstract: This thesis deals with cloning, purification, and characterization aldehyde dehydrogenase family 22 (ALDH22) from barley and maize. It is a new protein family and little is known about it. It was conducted a phylogenetic analysis of ALDH22, the protein was described in algae and terrestrial plants suggesting it was evolved before the transition of aquatic plants onto land. Furthermore, ALDH22 was confirmed in most accessible organisms. In the experiment part, *ALDH22* from selected tissue was cloned in *Escherichia coli* and ALDH22 was purified from their lysate by affinity and ion-exchange chromatography. Optimal pH, substrate specificity and kinetics parameters (K_m and V_{lim}) for selected substrates were determined. It was also compared catalytic efficiency for selected substrates. ALDH22 is a NAD^+ -dependent enzyme with broad substrate specificity, it metabolizes acetaldehyde, citral, *trans*-2-nonenal and 3-methyl-2-buthenal with high catalytic efficiency. In addition, ALDH22 probably participate in the phenylpropanoid pathway or lipoxygenase pathway as its high expression in embryo and fruit suggests.

Keywords Maize, barley, aldehyde dehydrogenase, phenylpropanoids, lipids, acetaldehyde

Number of pages 77

Number of appendices 0

Language Czech

Obsah

1 Úvod.....	10
2 Současný stav řešené problematiky.....	11
2.1 Aldehyddehydrogenasová nadrodina.....	11
2.2 Aldehyddehydrogenasy rodiny 22.....	11
2.3 Možné přirozené substráty aldehyddehydrogenasy 22.....	13
2.3.1 Produkty aldehyddehydrogenasy rodiny 22 jako součást fenylpropanoidové dráhy.....	14
2.3.1.1 Benzaldehyd.....	16
2.3.1.2 Fenylacetaldehyd.....	17
2.3.1.3 <i>m</i> -anisaldehyd a <i>p</i> -anisaldehyd.....	18
2.3.1.4 <i>trans</i> -cinnamaldehyd a hydrocinnamaldehyd.....	20
2.3.2 Lipoxygenasová dráha jako producent substrátů aldehyddehydrogenasy rodiny 22.....	21
2.3.2.1 pentanal, hexanal, heptanal, oktanal, nonanal.....	22
2.3.2.2 <i>trans</i> -2-hexenal a <i>trans, trans</i> -2,4-hexadienal.....	23
2.3.2.3 <i>trans</i> -2-nonenal.....	24
2.3.3 Citral.....	24
2.3.4 3-metyl-2-butenal.....	25
2.3.5 3-aminopropionaldehyd a 4-aminobutylaldehyd.....	26
3 Experimentální část.....	28
3.1 Materiál a chemikálie.....	28
3.1.1 Biologický materiál.....	28
3.1.2 Použité chemikálie a soupravy.....	29
3.1.2.1 Chemikálie.....	29
3.1.2.2 Použité soupravy.....	32
3.2 Přístrojové vybavení.....	33
3.3 Použité programy.....	34
3.4 Metody.....	34
3.4.1 Fylogenetická analýza.....	34

3.4.2	Klonování aldehyddehydrogenas rodiny 22.....	35
3.4.2.1	Kultivace ječmene a kukuřice.....	35
3.4.2.2	Izolace RNA.....	35
3.4.2.3	Reverzní transkripce.....	36
3.4.2.4	Real-Time PCR.....	36
3.4.2.5	PCR amplifikace.....	37
3.4.2.6	Agarová elektroforéza a purifikace DNA z gelu.....	37
3.4.2.7	Kultivace plazmidů a jejich purifikace.....	38
3.4.2.8	Restrikční štěpení a ligace.....	38
3.4.2.9	Transformace a její kontrola.....	39
3.4.3	Purifikace rekombinantních proteinů a kinetická měření.....	40
3.4.3.1	Expresse rekombinantních proteinů v <i>Escherichia coli</i>	40
3.4.3.2	Extrakce a purifikace rekombinantních proteinů.....	40
3.4.3.3	SDS-PAGE.....	41
3.4.3.4	Semi-dry western-blotting a imunodetekce se sekundární protilátkou.....	42
3.4.3.5	Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou.....	43
3.4.3.6	pH optimum.....	43
3.4.3.7	Substrátová specifita a kinetická měření.....	44
4	Výsledky.....	46
4.1	Fylogenetická analýza.....	46
4.2	Klonování ječmenné aldehyddehydrogenasy rodiny 22.....	52
4.3	Optimalizace exprese a purifikace ječmenné aldehyddehydrogenasy rodiny 22	52
4.4	Optimalizace exprese a purifikace kukuřičné aldehyddehydrogenasy rodiny 22	54
4.5	Real-Time PCR.....	55
4.6	pH optimum.....	55
4.7	Substrátová specifita.....	57
4.8	Kinetická měření.....	58
5	Diskuze.....	60
6	Závěr.....	65
7	Literatura.....	66

8 Seznam použitých zkratek.....	77
--	-----------

Cíle práce

1. Vypracování rešerše
2. Fylogenetická analýza aldehyddehydronasy rodiny 22
3. Určení expresního profilu genu kódujícího aldehyddehydrogenasu rodiny 22 pomocí kvantitativní PCR
4. Klonování aldehyddehydrogenasy rodiny 22 a exprese v *Escherichia coli*
5. Optimalizace exprese a purifikace
6. Charakterizace rekombinantních proteinů

1 ÚVOD

Aldehyddehydrogenasová (ALDH) nadrodina slučuje enzymy, které se podílejí na detoxikaci organismu přeměnou reaktivních aldehydů na příslušné karboxylové kyseliny (Yoshida et al. 1998; Brocker et al. 2013). Mezi nově objevené patří ALDH rodiny 22 (ALDH22), poprvé potvrzena Kirchem et al. (2004), jež je přítomna u vodních řas i suchozemských rostlin, vyvinula se tedy před přechodem rostlin z vody na souš (Zhang et al. 2012; Jimenez-Lopez et al. 2016b).

ALDH22 bývá v rostlinách nejčastěji přepisována podle jednoho genu (Brocker et al. 2013) a na základě signální sekvence bývá nejčastěji lokalizována do endoplazmatického retikula nebo sekreční dráhy (Gao a Han 2009; Jimenez-Lopez et al. 2010; Jimenez-Lopez et al. 2016b; Guo et al. 2017). Exprese *ALDH22* byla potvrzena ve většině rostlinných pletiv, nejvíce ve stonku a květu (Huang et al. 2008; Gao a Han 2009; Zhu et al. 2014; Gautam et al. 2019).

I když Kirch et al. (2004) zjistil konstantní expresi *ALDH22* během různých forem abiotického stresu, Zhang et al. (2012) a Tian et al. (2015) zaznamenali změnu exprese, navíc Huang et al. (2008) a Gautam et al. (2019) objevili v protomoru *ALDH22* elementy responsivní na přítomnost kyseliny abscisové (ABA) a polyetylglykolu (PEG).

Na základě experimentální části je odhadováno, že by se ALDH22 mohla účastnit fenylypropanoidové nebo lipoxygenasové dráhy, navíc relativně dobře oxidovala i isoprenoidní citral, acetaldehyd, produkt degradace cytokininů a některé aminoaldehydy. V teoretické části je zpracován metabolismus předpokládaných fyziologických substrátů ALDH22.

Fenylypropanoidová dráha je pro rostliny důležitý mechanismus, který vyúsťuje biosyntézou vonných látek, antibiotik, pesticidů, signálních molekul a hlavně také ligninu, který je nezbytný pro suchozemské rostliny (Heldt et al. 2011; Gleason a Chollet 2012).

Při lipoxygenasové reakci je do molekuly mastné kyseliny zabudována molekula kyslíku, což způsobí její štěpení. Lipoxygenasová dráha je aktivována při mechanickém poškození rostliny (Frankel 2005; Gleason a Chollet 2012).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Aldehyddehydrogenasová nadrodina

ALDH tvoří nadrodinu enzymů, které přeměňují často toxické aldehydy na příslušné karboxylové kyseliny za současné redukce koenzymů NAD^+ , případně NADP^+ (Yoshida et al. 1998; Brocker et al. 2013). ALDH byly popsány u prokaryot, bakterií, hub, rostlin i živočichů (Sophos et al. 2001). Některé jsou úzce specifické, jiné přeměňují široké spektrum substrátů (Lindhahl 1992). Expres *ALDH* genů se zvyšuje v odpovědi na různé formy stresu jako teplo, vysoká salinita či hypoxie (Tian et al. 2015; Gautam et al. 2019).

Jednotlivé ALDH rodiny slučují enzymy, které se shodují v primární struktuře alespoň ze 40 % a označují se arabskou číslicí; ALDH podrodiny pak slučují enzymy, které se v primární struktuře shodují alespoň ze 60 % a označují se písmenem; pořadí, v jakém byla ALDH v rámci podrodiny objevena, je umístěno za označením podrodiny a je značeno arabskou číslicí (Vasiliou et al. 1999).

ALDH nadrodina slučuje 24 ALDH rodin. U živočichů jsou přítomny rodiny ALDH1, ALDH2, ALDH3, ALDH4, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH8, ALDH9, ALDH10, ALDH16 a ALDH18. U rostlin jsou pak přítomny rodiny ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24 (Marchitti et al. 2008; Brocker et al. 2013).

Monomery ALDH se skládají z oligomerizační, NAD^+ vazebné a katalytické domény (Kotchoni et al. 2010). Katalytickým residuem v aktivním místě ALDH bývá cystein, který nukleofilně napadá elektronově chudý atom uhlíku karboxylové skupiny substrátu (Hempel et al. 1999; Wymore et al. 2004)

Spolu s dalšími organickými sloučeninami, jako jsou alkoholy, thioly, ketony nebo kyseliny, se aldehydy podílejí na charakteristické vůni přírodnin jako ovoce, maso, mléčné výrobky, pivo nebo dřevo (Schilling 2017).

2.2 Aldehyddehydrogenasy rodiny 22

ALDH22 jsou nově objevená enzymová skupina, která nebyla zatím dostatečně prozkoumána, a experimentální články o ní nepřinášejí jednotné informace; poprvé byla potvrzena Kirchem et al. 2004. ALDH22 je přítomna u řas i suchozemských rostlin, takže se vyvinula již před přechodem rostlin z vody na souš (Zhang et al. 2012; Jimenez-Lopez et al. 2016b).

ALDH22 bývá v rostlinách většinou biosyntetizována přepisem jednoho genu (Brockner et al. 2013; Tian et al. 2015; Jimenez-Lopez 2016a), u sóji byly zjištěny 4 členové rodiny ALDH22 (Wang et al. 2017) a u jablka 2 členové (Li et al. 2013). ALDH22 u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*; AtALDH22), kukuřice seté (*Zea mays*; ZmALDH22) a rýže seté (*Oryza sativa*; OsALDH22) vzájemně vykazují vysokou podobnost (Kirch et al. 2004).

ALDH22 má příbuznou sekvenci s dalšími nově objevenými rostlinnými rodinami, a to ALDH23 a ALDH24 (Wood a Duff 2009). V rámci fylogenetických stromů různých krytosemenných rostlin bývá ALDH22 často zařazena mezi ALDH3 a ALDH11, například u lupiny úzkolisté (Jimenez-Lopez et al. 2016b), huseníčku rolního, topolu chlupatoplodého (Tian et al. 2015), bérů italského, kukuřice seté nebo rýže seté (Zhu et al. 2014).

Huang et al. (2008) odhadují hmotnost monomeru ZmALDH22 na 65,62 kDa; Gautam et al. (2019) na 65,75 kDa. Monomer OsALDH22 se skládá nejvíce z α -helixů, jeho oligomerizační doména je oproti ostatním ALDH delší, takže její α -helix se skládá přes sebe a stejně jako některé další ALDH váže NAD^+ hlouběji, čímž je NAD^+ -kruh více chráněný (Kotchoni et al. 2010). ALDH22 z lupiny též vykazuje oproti ostatním ALDH odlišnou strukturu (Jimenez-Lopez 2016a).

Na základě signální sekvence je ZmALDH22 predikována do plastidů, nejpravděpodobněji do chloroplastů, což bylo ověřeno i experimentálně (Huang et al. 2008). Dong et al. (2017) lokalizují ALDH22 z bavlníku do cytoplazmy stejně jako Hou a Bartels (2015) AtALDH22 a Zhu et al. (2014) ALDH22 z bérů. Podle Gao a Hana (2009); Jimenez-Lopez et al. (2010); Jimenez-Lopez et al. (2016b) a Gua et al. (2017) je OsALDH22, ZmALDH22, bavlníková ALDH22, rajčatová ALDH22 součástí sekreční dráhy a endomembránového kompartmentu. Tian et al. (2015) zjistili konsistentní expresi ALDH22 u topolu napříč různými organelami.

OsALDH22 je exprimována podobně v mladém kořeni i mladém listu, více v květech a nejvíce ve stonku (Gao a Han 2009). V mladém listu byla zjištěná míra exprese *ZmALDH22* přibližně dvakrát vyšší oproti zralému listu a výrazně nejvyšší exprese byla zaznamenána ve stoncích a v zrnu sazenic – přibližně pětikrát vyšší než u kořenů. Exprese *ZmALDH22* probíhá podobně v kořeni, zralém listu, kukuřičných vlasech a mladém embryu (Huang et al. 2008). U brukve byla zjištěna nejvyšší exprese

ALDH22 v květu a plodu, kde byla dokonce druhou nejzastoupenější ALDH; relativně nízká exprese byla zaznamenána v listu a kořeni (Gautam et al. 2019). U bėru byla nejvyšší exprese *ALDH22* zjištěna v kořeni, méně pak ve stonku a téměř vůbec v listech (Zhu et al. 2014).

Expresa *ALDH* v organismech bývá ovlivněna stresovými podmínkami (Tian et al. 2015; Gautam et al. 2019). Kirch et al. (2004) zjistili, že *AtALDH22* se exprimuje v kořeni a těle rostliny konstitutivně, neboť míra její transkripce nebyla změněna v odpovědi na osmotický stres ve formě nedostatku vody, zvýšené koncentrace ABA nebo chloridu sodného. Díky tomu navrhují Wood a Duff (2009) zařadit *ALDH22* mezi základní ALDH, důležité pro rostliny.

Podle Huanga et al. (2008) byla naopak zvýšena úroveň mRNA genu *ZmALDH22* v kořenech sazenic po vystavení nedostatku vody, vysoké koncentraci ABA nebo chloridu sodného. Autoři článku připravili transgenní tabák nadexprimující vložený gen *ZmALDH22*, který vykazoval výrazně vyšší toleranci rostliny na přítomnost manitolu, NaCl a hlavně ABA, což se projevilo vyšší živou vahou rostlin i nižší koncentrací malondialdehydu, tudíž se Hung et al. (2008) domnívají, že by mohla být *ALDH22* zapojena v odpovědi na exogenní i endogenní přítomnost ABA; domněnka byla potvrzena analýzou promotoru *ZmALDH22*, který obsahuje sekvenci responzivní na přítomnost ABA.

V brukvi byla zjištěna též zvýšená exprese *ALDH22* v kořeni a ve výhoncích při odpovědi na salinitní stres, navíc i na zvýšenou přítomnost peroxidu vodíku a přítomnost PEG – v promotoru genu *ALDH22* byl zjištěn element zodpovědný za zvýšení exprese v přítomnosti PEG (Gautam et al. 2019).

Zvýšení exprese při přítomnosti PEG a peroxidu vodíku bylo potvrzeno i u bėru, při salinitním stresu pak úroveň *ALDH22* narostla výrazně. Při teplotním stresu docházelo ke snížení exprese jak při chladu, tak při teple (Tian et al. 2015). I exprese *ALDH22* ve vinné révě byla snížena chladovým stresem při 5 °C, navíc však i při salinitním stresu a dlouhotrvajícím vodním deficitu (Zhang et al. 2012). Expresa *OsALDH22* byla výrazně redukována v listech po vystavení rýže nedostatku vody (Gao a Han 2009).

2.3 Možné přirozené substráty aldehyddehydrogenasy 22

Na základě experimentální části je odhadováno, že *ALDH22* by se mohla účastnit

fenylpropanoidové nebo lipoxygenasové dráhy, navíc relativně dobře oxidovala i isoprenoidní substrát, produkt degradace cytokininů a některé aminoaldehydy.

2.3.1 Produkty aldehyddehydrogenasy rodiny 22 jako součást fenylpropanoidové dráhy

Fenylalanin je pro rostlinu významná aminokyselina, která je prekurzorem mnohých aromatických látek, na něž je přeměňována v fenylpropanoidové dráze (Obr. 1). Fenylpropanoidová dráha vede k biosyntéze antibiotik, přírodních pesticidů, signálních molekul, atraktantů, protektantů, vonných látek jako vanilin nebo myriscin, přírodních produktů specifických pro jednotlivé rostliny a hlavně také stavebních jednotek ligninu, druhého nejzastoupenějšího biopolymeru na planetě (Heldt et al. 2011; Gleason a Chollet 2012). Fenylpropanoidová dráha byla potvrzena u hub, bakterií, nižších i vyšších rostlin a patří obecně k sekundárnímu metabolismu, nicméně jelikož vrcholí právě biosyntézou ligninu, může být pro suchozemské rostliny řazena k primárnímu metabolismu (Gleason a Chollet 2012).

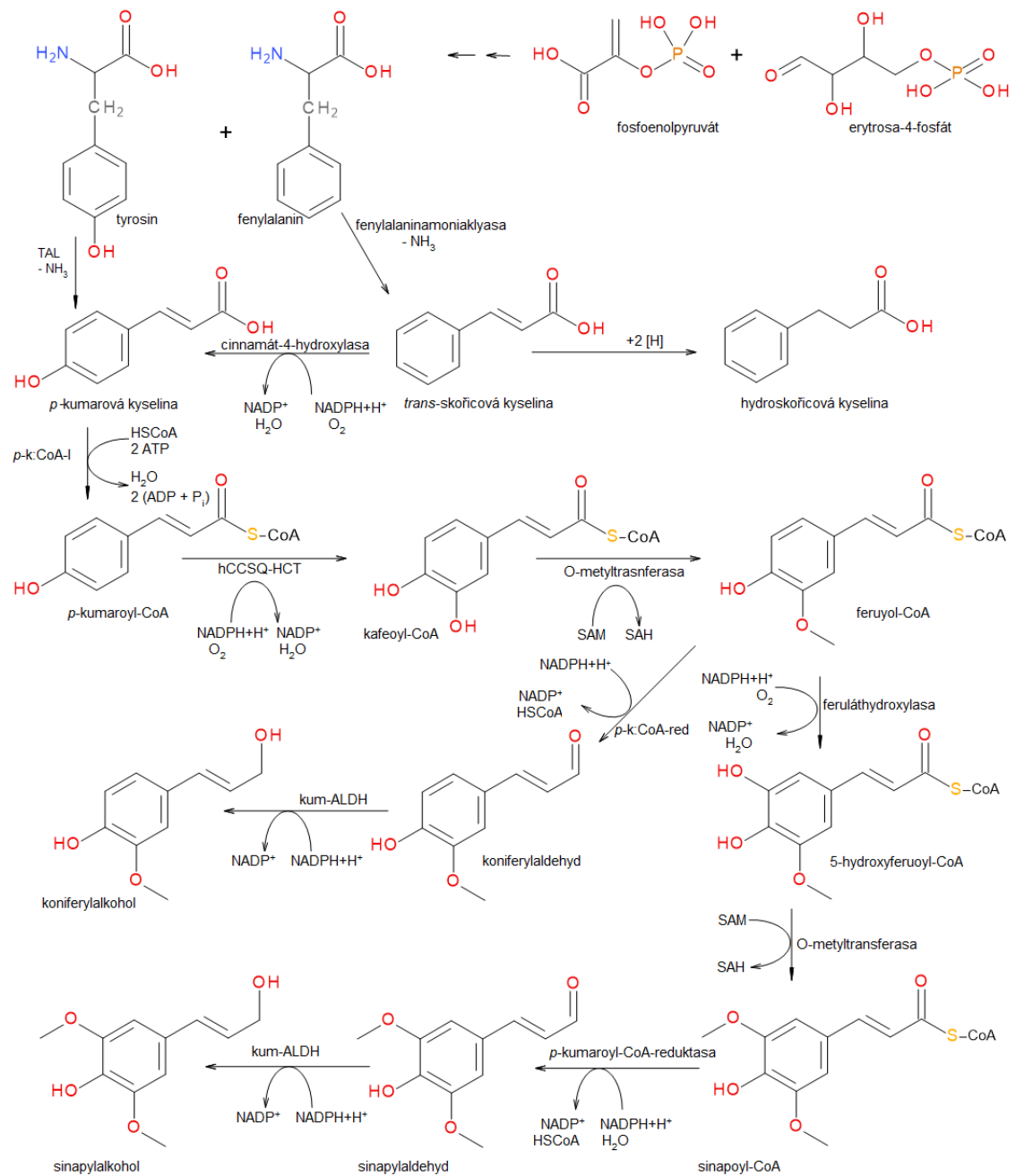
Enzymy fenylpropanoidové dráhy jsou asociované s různými buněčnými kompartmenty, například endoplazmatickým retikulem, cytosolem (Hrazdina a Wagner 1985; Achnine et al. 2004) nebo chloroplasty (Gestetner a Conn 1974).

V šikimátové dráze vzniká pro člověka esenciální aminokyselina fenylalanin při několikastupňové přeměně přes šikimát a chorismát z fosfoenolpyruvátu, získaného při glykolýze, a erytrozy-4-fosfátu, získané při pentosovém cyklu (Gleason a Chollet 2012; Kodíček et al. 2015).

Fenylalanin v přítomnosti fenylamoniaklyasy (EC 4.3.1.5) podléhá deaminaci za vzniku kyseliny *trans*-skořicové (Gleason a Chollet 2012). Skořicová kyselina může být redukována na hydroskořicovou kyselinu (Chamkha et al. 2001).

Kyselina *trans*-skořicová je hydroxylována enzymem cinnamát-4-hydroxylasou (EC 1.14.13.11) na *p*-kumarovou kyselinu za současné oxidace NADPH na NADP⁺. Analogově může vznikat *p*-kumarová kyselina přeměnou tyrosinu enzymem tyrosinamoniaklyasou (EC 4.3.1.23), což bylo potvrzeno u některých trav (Heldt et al. 2011); obecně však tyrosin není prekurzor většiny fenolických látek (Buchanan et al. 2015).

Kyselina *p*-kumarová je spolu s koenzymem A za hydrolýzy dvou molekul ATP přeměněna *p*-kumarát:CoA-ligasou (EC 6.2.1.12) na *p*-kumaroyl-CoA. Ten je přeměněn



Obr. 1 Fenylypropanoidová dráha. Hlavním prekurzorem fenylypropanoidové dráhy je fenylyalanin, tyrosin byl jako prekurzor potvrzen pouze u některých rostlin (Gleason et al. 2012). Vysvětlivky: h-CCSQ-HCT = hydroxycinnamoyl-CoA-šikimát:kvinát-hydroxycinnamoyl-transferasa; kum-ALDH = kumaroylaldehyddehydrogenasa; *p*-k:CoA-I = *p*-kumarát:CoA-ligasa; *p*-k-CoA-red = *p*-kumaroyl-CoA-reduktasa; SAM = S-adenosylmetionin; SAH = S-adenosylhomocystein; TAL = tyrosinamoniaklyasa. Obrázek byl vytvořen podle Gleasona a Cholleta (2012).

na kafeoyl-CoA a vodu za katalýzy enzymem hydroxycinnamoyl-CoA-šikimát:kvinát-hydroxycinnamoyl-transferasou (EC 2.3.1.133),

současně probíhá štěpení molekuly kyslíku a oxidace koenzymu NADPH. Kafeoyl-CoA je metylován enzymem kafeoyl-CoA/5-hydroxyferuoyl-3-O-metyltransferasou (EC 2.1.1.68) na feruoyl-CoA, donorem metylové skupiny je S-adenosylmethionin, z něhož vzniká S-adenosylhomocystein. Feruloyl-CoA může být též hydroxylován ferulát-5-hydroxylasou (EC 1.14.14.B13) v přítomnosti molekuly kyslíku na 5-hydroxy-feruloyl-CoA za současné oxidace NADPH. 5-hydroxy-feruoyl-CoA je kafeoyl-CoA/5-hydroxyferuoyl-O-metyltransferasou metylován na sinapoyl-CoA.

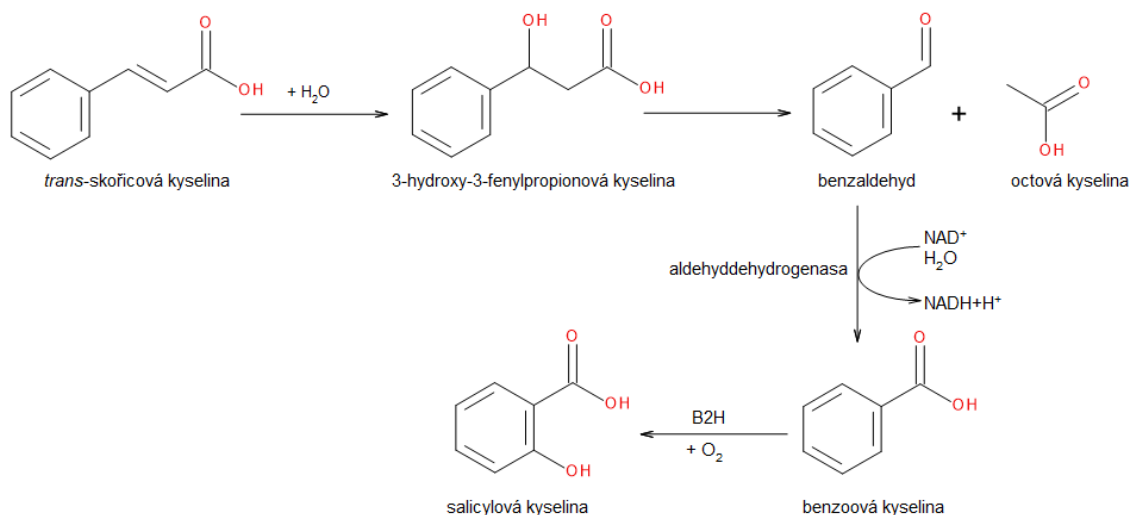
Feruloyl-CoA nebo sinapoyl-CoA jsou redukovány za oxidace NADPH na koniferylaldehyd nebo sinapylaldehyd *p*-kumaroyl-CoA-reduktasou (EC 1.2.1.44), současně molekulu opouští koenzym A. Koniferylaldehyd a sinapylaldehyd jsou pak redukovány kumaroylaldehyddehydrogenasou (EC 1.1.1.195) na koniferylalkohol nebo sinapylalkohol, prekurzory ligninu (Heldt et al. 2011; Gleason a Chollet 2012; Buchanan et al. 2015).

Koniferylalkohol, sinapylalkohol a *p*-kumarová kyselina jsou transportovány mimo buňky, kde jsou lakcasami (EC 1.10.3.2) a peroxidasami (EC 1.7.11.7) zpolymerizovány na lignin. Kyselina *p*-kumarová je významná výchozí sloučenina pro biosyntézu mnohých rostlinných metabolitů (Heldt et al. 2011).

2.3.1.1 Benzaldehyd

Benzaldehyd je molekula s výraznou vůní, která se podílí na aroma rostlin a přírodních produktů. Benzaldehyd je hlavní složka esenciálního oleje z jader hořkých mandlí, meruněk, švestek, třešní (Butzenlechner et al. 1989) nebo třeba z listů broskvoní (Verma et al. 2017). Přítomnost benzaldehydu byla také potvrzena v olivovém oleji (Vichi et al. 2007), dýňovém oleji (Matsui et al. 1998) nebo sezamovém oleji, kde byl dokonce výrazně zastoupen (Shimoda et al. 1997). Benzaldehyd se výrazně podílí na vůni třešní (Girard a Kopp, 1998) a broskví (Horvat et al. 1990), v menší míře je přítomen v borůvkách (Rohloff et al. 2009) nebo například jahodách (Jouquand et al. 2008), je také přítomen v kávě arabice (Bertrand et al. 2012). Benzaldehyd má antifungální účinky (Xie et al. 2017).

Benzaldehyd se podílí na vůni květin, například petúnií, pcháče, pětiprstky nebo jasmínu. Petúnie vylučují benzaldehyd hlavně v noci, pětiprstky vonné naopak ve dne. U pcháče rolního lákal benzaldehyd opylovače i florivory, které přitahoval ze všech zkoumaných volatilních látek nejvíce (Boatright et al. 2004; Huber et al. 2005; Theis



Obr. 2 Benzaldehyd vzniká z meziprojektu fenypropionoidové dráhy, kyseliny *trans*-skořicové, která je hydroxylována a její produkt 3-hydroxy-3-fenylpropionová kyselina podléhá retroaldovému štěpení. Vysvětlivky: B2H = benzoát-2-hydroxylasa. Převzato a upraveno podle Boatright et al. (2004).

2006; Edris et al. 2008).

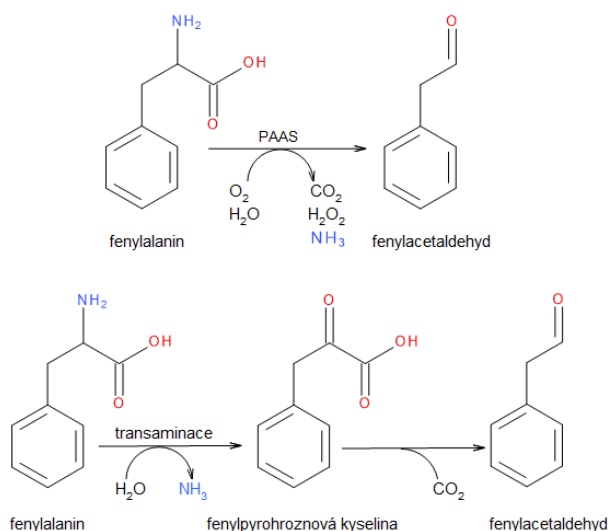
Hydratací *trans*-skořicové kyseliny vzniká 3-hydroxy-3-fenylpropionová kyselina, která může být při následném retro-aldolovém štěpení přeměněna na benzaldehyd a acetát. Benzaldehyd je následně oxidován na benzoovou kyselinu za současné redukce NAD⁺ (Obr. 2; Boatright et al. 2004; Long et al. 2009). Benzoová kyselina může z *trans*-skořicové kyseliny také vznikat β-oxidací postranního řetězce aromatického kruhu, u této cesty není však meziprojekt benzaldehyd (Jarvis et al. 2000). Kyselina benzoová je jedním z možných prekurzorů kyseliny salicylové – kyselina benzoová může být hydroxylována na kyselinu salicylovou enzymem benzoát-2-hydroxylasou (EC 1.14.12.10) za účasti molekuly kyslíku (León et al. 1995).

Benzaldehyd vzniká také v jádrech meruněk nebo třešní hydrolytickým enzymatickým štěpením amygdalinu β-glukosidasou (EC 3.2.1.21) přes prunasin a (R)-mandelonitril a hydroxynitriliasou (EC 4.1.2.37) za současného uvolnění kyanidovodíku (Poulton 1988).

Benzoová kyselina vzniká při degradaci ligninu bakteriemi (Gutierrez et al. 1994).

2.3.1.2 Fenyacetaldehyd

Fenyacetaldehyd se podílí na vůni květin, například petúnií, pcháče rolního nebo pětiprstky. Petúnie a pětiprstka vonná vylučují fenyacetaldehyd hlavně v noci, u pětiprstky byl nejvíce vylučovanou vonnou látkou. U pcháče rolního lákal



Obr. 3 Dva způsoby vzniku fenylacetaldehydu z fenylalaninu. Vysvětlivky: PAAS = fenylalanintransamísana. Převzato a upraveno podle Boatright et al. (2004) a Kaminaga et al. (2006).

fenylacetaldehyd spíše opylovače než florivory (Boatright et al. 2004; Huber et al. 2005; Theis 2006).

Fenylacetaldehyd je také přítomen v kávě arabice (Blank et al. 1992), víně (Sarrazin et al. 2007) a arašídovém nebo dýňovém oleji (Matsui et al. 1998).

Fenylacetaldehyd vzniká přímo z L-fenylalaninu enzymem fenylacetaldehydsyntasou (EC 2.6.1.58; EC 4.1.1.53), což je bifunkční enzym, který L-fenylalanin současně dekarboxyluje a deaminuje za uvolnění peroxidu vodíku (Kaminaga et al. 2006). Boatright et al. (2004) navrhuje i opačný sled reakcí, a to nejprve zbavení amonného iontu L-fenylalaninu fenylalanintransaminasou (EC 2.6.1.58) za vzniku fenylpyrohroznové kyseliny, ze které následnou dekarboxylací vzniká fenylacetaldehyd (Obr. 3). Fenylacetaldehyd tedy nevzniká z benzaldehydu.

Fenylactová kyselina vzniká z fenylacetaldehydu při degradaci ligninu nebo styrenu bakteriemi, využívajícími enzym fenylacetaldehyddehydrogenasu (EC 1.2.1.39; Gutierrez et al. 1994; Bestetti et al. 2004).

2.3.1.3 *m*-anisaldehyd a *p*-anisaldehyd

Aromatický *p*-anisaldehyd je přírodní látka s výrazným aroma připomínající vanilin (Schilling 2017) a je součástí anýzového esenciálního oleje získávaného z bedrníku anýzového, kde tvoří necelá 2 % (Rodrigues et al. 2003). Podílí se výrazně na vůni květin, například pcháče (Theis 2006) nebo orchidejí, u nichž byla potvrzena

i přítomnost *p*-anisové kyseliny (Dormont et al. 2014). I když tvoří u pcháče rolního jen 0,5 % vonných látek, je absolutně nejvíce atraktivní látkou pro opylovače, navíc se láká i florivory (Theis 2006).

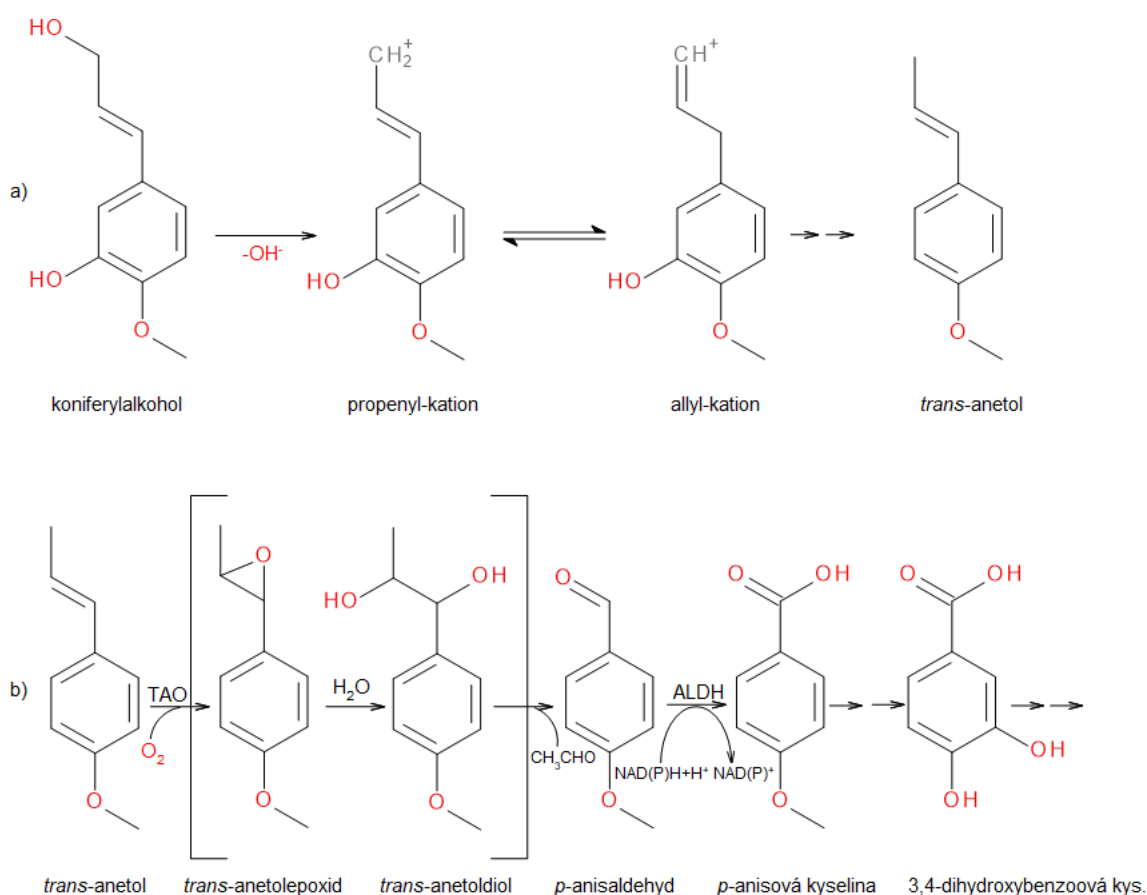
I když členovce třásněnku západní velmi přitahovala vůně *p*-anisaldehydu, jeho strukturně blízký izomer *m*-anisaldehyd neovlivňoval její chování ani při desetitisícnásobné koncentraci oproti *p*-anisaldehydu, který již při nízké koncentraci vábil hmyz (Koschier et al. 2000). Aplikace *p*-anisaldehydu na brouky rušníky diviznovité zvyšovala jejich atraktivitu pro druhé pohlaví, mírné zvýšení atraktivity způsobil i *m*-anisaldehyd (Imai et al. 2002). Naopak hmyz *Megoura viciae* přitahuje vůně *m*-anisaldehydu oproti *p*-anisaldehydu přibližně ze 80 % (Visser a Piron 1995).

Přítomnost *p*-anisaldehydu dává aroma i houbám (Rapior et al. 2002) a je také přítomen v kávě arabice (Blank et al. 1992).

Prekurzorem *p*-anisaldehydu je tyrosin (Okamoto et al. 2002) i fenylalanin (Mester et al. 1997). Odstraněním hydroxylové skupiny z tříuhlíkatého vedlejšího řetězce koniferylalkoholu vzniká karbokation, který je stabilizován rezonancí mezi svými dvěma konformacemi, a to propenylkationem a allylkationem. Redukce propenylového kationtu a následná dehydratace vedou k *trans*-anetolu (Obr. 4a; Gleason a Chollet 2012). U bakterií *Arthrobacter aurescens* a *Pseudomonas putida* *p*-anisaldehyd vzniká při degradaci *trans*-anetolu *trans*-anetoloxidasou (EC 1.13.99.6) na *p*-anisaldehyd za účasti molekulárního kyslíku a vody, kdy dochází ke zkrácení postranního řetězce aromatického kruhu. *p*-anisaldehyd je přeměňován na *p*-anisovou kyselinu, která může být dále degradována (Obr. 4b; Shimoni et al. 2002; Han et al. 2012a). U *Pseudomonas putida* byl objeven gen pro *p*-anisaldehyddehydrogenasu, který se nachází v klastru s *trans*-anetoloxidasou, a exprimovaný protein je pak schopný přeměňovat i veratraldehyd, vanilin a piperonal (Han et al. 2012b).

p-anisaldehyd vzniká také z *p*-anisalkoholu, jehož množství se citelně snížilo, jak v hlívě rostlo množství *p*-anisaldehydu. *p*-anisaldehyd je také spolu s dalšími aromatickými látkami produkt degradace ligninu (Gutierrez et al. 1994).

p-anisaldehyd má antimikrobiální účinky. U lidského patogenu *Pseudomonas aeruginosa* snižuje přidavek *p*-anisaldehydu transkripci některých enzymů glykolýzy nebo dýchacího řetězce, narušuje integritu povrchu a zvyšuje produkci chaperonů a heat-shock proteinů (Adewunmi et al. 2020). Antimikrobiální aktivita byla potvrzena



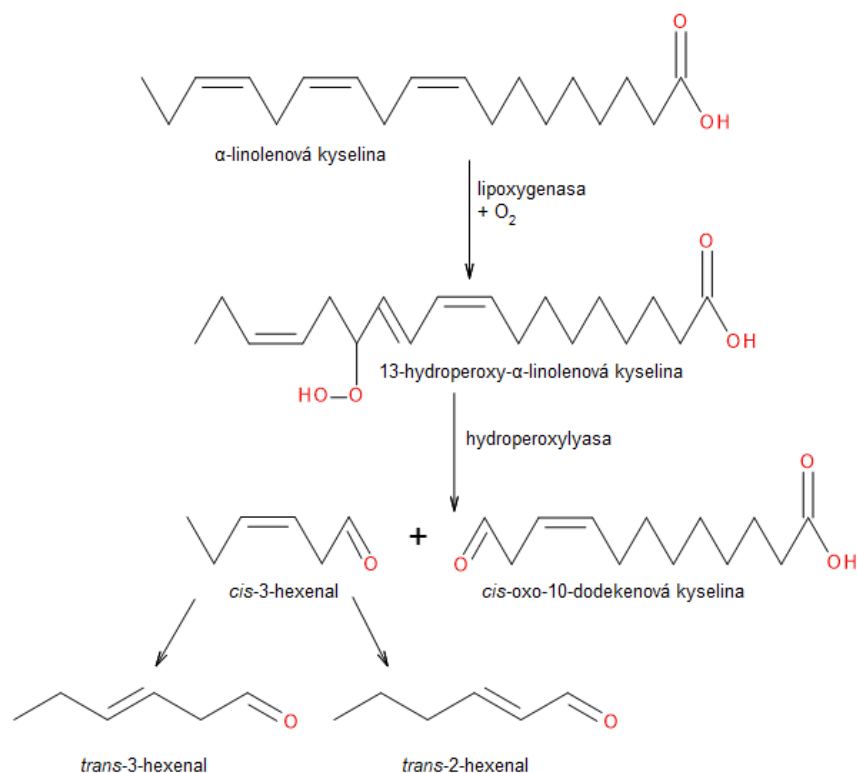
Obr. 4 Vznik *p*-anisaldehydu (b) z *trans*-anetolu, který vychází z koniferylalkoholu (a). Vysvětlivky: ALDH = aldehyddehydrogenasa; TAO = *trans*-anetol-oxygenasa. Převzato a upraveno z Gleasona a Cholleta (2012) a Hana et al. (2012a).

i vůči *Saccharomyces cerevisiae* (Yu et al. 2010). Byla potvrzena i antimikrobiální aktivita u *p*-anisové kyseliny (Prasad et al. 2014).

2.3.1.4 *trans*-cinnamaldehyd a hydrocinnamaldehyd

Trans-cinnamaldehyd tvoří hlavní složku esenciálního oleje ze skořicovníku (Tung et al. 2010). Esenciální olej z kůry skořicovníku se skládá jednoznačně nejvíce ze cinnamaldehydu, zastoupen je však i hydrocinnamaldehyd; v oleji z kořene, listů a plodu jsou cinnamaldehyd a hydrocinnamaldehyd zastoupeny v malé míře (Paranagama et al. 2001). Cinnamaldehyd se podílí lehce na vůni pětiprstky (Huber et al. 2005) a orchidejí (Dormont et al. 2014), *trans*-cinnamaldehyd je atraktivní pro opylovače (Andrews et al. 2007).

Cinnamaldehyd má výrazné antibakteriální (Moleyar a Narasimham 1992), antifungální (Xie et al. 2017) a protizánětlivé (Tung et al. 2010) účinky, navíc byl dokázán i jeho antihyperglykemický a antiobezitní účinek (Camacho et al. 2015).

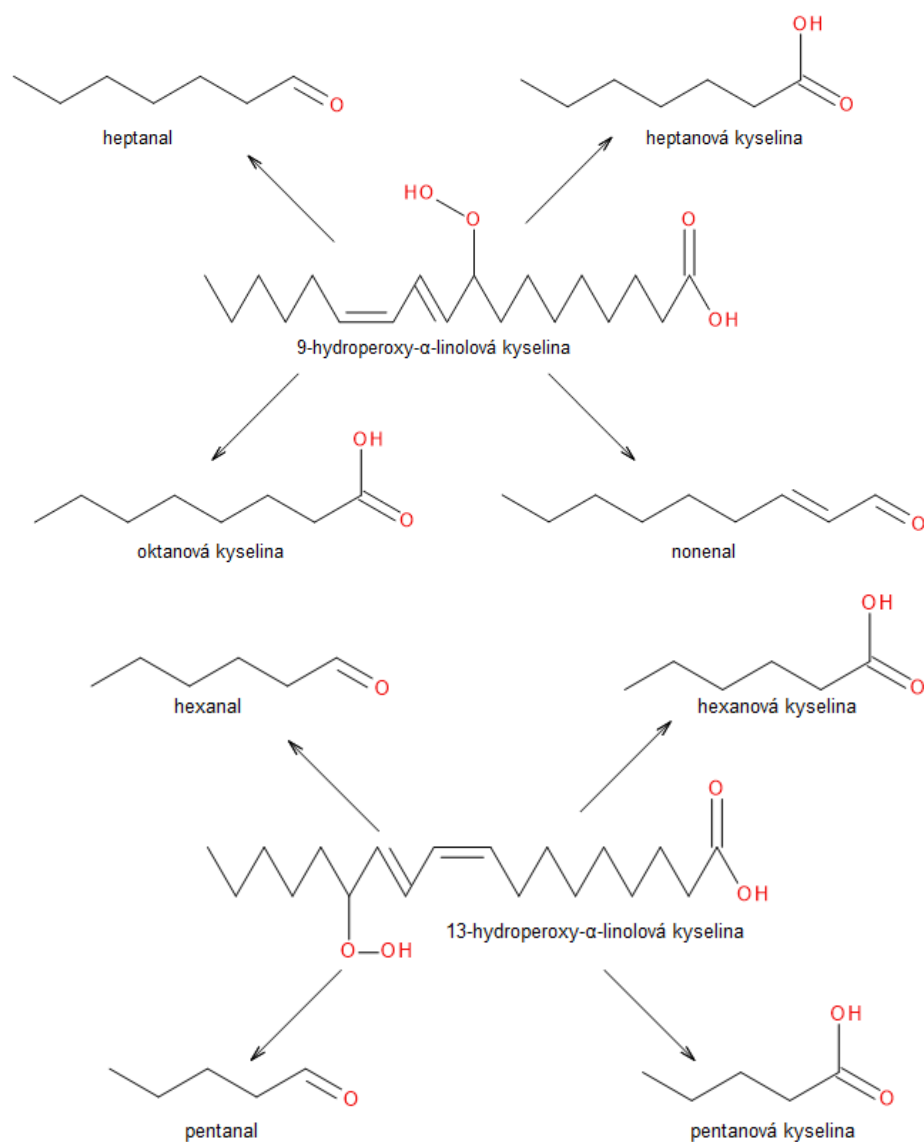


Obr. 5 Obecný mechanismus lipoxygenasové dráhy, možného producenta substrátů aldehyddehydrogenasy rodiny 22. Mastné kyseliny mohou být tímto mechanismem degradovány i bez účasti enzymů. Převzato a upraveno podle Heldta et al. (2011).

2.3.2 Lipoxygenasová dráha jako producent substrátů aldehyddehydrogenasy rodiny 22

Obecný mechanismus lipoxygenasy (EC 1.13.11.x) zahrnuje nejprve zabudování molekuly kyslíku do mastné kyseliny v poloze C9 nebo C13 za vzniku substitučního hydroperoxyderivátu mastné kyseliny, volného radikálového meziprojektu, jenž je následně štěpen hydroperoxylyasou (EC 4.2.99.x) na oxokyselinu. Oxokyselina je nestabilní a spontánně se rozkládá na menší molekuly (Obr. 5; Heldt et al. 2011). Mastné kyseliny mohou být takto degradovány i samovolně bez účasti enzymů (Frankel 2005).

Takto vzniká z 13-hydroxyperoxylinolenové kyseliny *trans*-2-hexenal, který je v rovnováze s *trans*-3-hexenalem (Obr. 5; Heldt et al. 2011); z 13-hydroperoxylinolenové kyseliny pentanal, pentanová kyselina, hexanal i hexanová kyselina (Obr. 6) a z 9-hydroperoxylinolenové kyseliny heptanal, heptanová kyselina, oktanová kyselina a nonenal (Obr. 6; Keszler et al. 2000). Oktanal vzniká stejným způsobem z oleové



Obr. 6 Linolová kyselina jako prekurzor možných substrátů aldehyddehydrogenasy rodiny 22. Převzato a upraveno podle Frankela (2005).

kyseliny (Frankel 2005). Hexanal a heptanal vznikají také oxidací konjugátů olejové kyseliny (García-Martínez et al. 2009). Obecně při lipoxygenasové reakci vznikají i *trans*-alkeny a *trans,trans*-alkdieny (Frankel 2005).

Některé produkty lipoxygenas propůjčují rostlině travnatou vůni, která se výrazně uvolňuje při mechanickém poškození listů, například při napadení rostlin býložravci, a láká tak hmyz, již se na býložravcích živí (Gleason a Chollet 2012).

2.3.2.1 pentanal, hexanal, heptanal, oktanal, nonanal

Jejich přítomnost byla potvrzena v různých přírodních produktech bohatých na tuky,

jako je například olivový olej (Vichi et al. 2007) nebo sezamový olej (Shimoda et al. 1997), u fermentovaných klobásek se podílejí nejvýrazněji na chuti (Olivares et al. 2009). Jsou také přítomny v hovězím mase (Rochat a Chaintreau 2005) a můžou se uvolňovat z dřevěných výrobků (Baumann et al. 2000). Pentanal, hexanal, heptanal, oktanal a nonanal můžou být použity jako biomarkery lipidové peroxidace (Ghorbani Gorji et al. 2019).

Tyto aldehydy se podílí na i vůni rostlin a jejich plodů. Přítomnost pentanalu byla potvrzena u třešně. Hexanal se výrazně podílí na vůni třešně (Girard a Kopp 1998) a broskví (Horvat et al. 1990); jeho přítomnost byla také potvrzena v jablkách (Plotto et al. 1998), pomerančích (Bai et al. 2009), jahodách (Schulbach et al. 2004) a borůvkách (Rohloff et al. 2009). Navíc jsou hexanal a hexanová kyselina přítomny v kávě arabice (Bertrand et al. 2012). Heptanal se podílí na vůni borůvek (Rohloff et al. 2009) a třešně (Girard a Kopp 1998); oktanal pomerančů (Bai et al. 2009) nebo borůvek (Rohloff et al. 2009) a nonanal mandarinek (Tietel et al. 2011), jahod (Jouquand et al. 2008), třešně (Girard a Kopp 1998) a borůvek (Rohloff et al. 2009). Nonanal je i uvolňován z květů orchidejí (Dormont et al. 2014).

Přítomnost pentanové, hexanové, heptanové, oktanové nebo nonanové kyseliny byla potvrzena například v sezamovém oleji (Shimoda et al. 1997), jahodách (Jouquand et al. 2008) nebo sušené šunce (López et al. 1992); samotná hexanová je pak výrazně zastoupena v lískooříškovém oleji (Matsui et al. 1998).

Hexanal by mohl být používán jako biomarker metabolismu *Streptococcus pneumoniae* v dechu pacientů (Filipiak et al. 2012). Přítomnost heptanalu byla zjištěna v dechu pacientů trpících rakovinou prsu (Phillips et al. 2006). Přítomnost oktalanu a nonalanu byla potvrzena i na lidské kůži (Ruzsanyi et al. 2012).

2.3.2.2 *trans*-2-hexenal a *trans, trans*-2,4-hexadienal

Trans-2-hexenal podílí výrazně na vůni a chuti některého ovoce nebo zeleniny, a to třešně (Girard a Kopp 1998), broskví (Horvat et al. 1990), jahod (Jouquand et al. 2008) a je druhou nejzastoupenější látkou v olivovém oleji (Vichi et al. 2007). Tvoří také v menší části vůni borůvek (Rohloff et al. 2009) a mandarinek (Tietel et al. 2011).

Přítomnost *trans,trans*-2,4-hexadieanalů byla potvrzena v olivovém oleji (Vichi et al. 2007) a hovězím mase (Rochat a Chaintreau 2005).

2.3.2.3 *trans*-2-nonenal

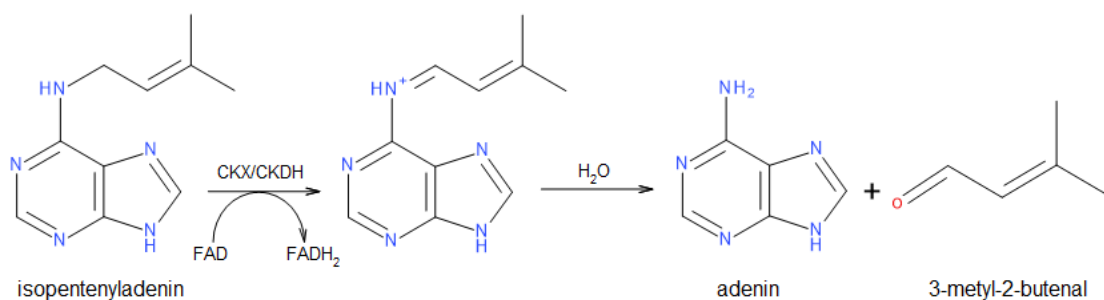
Trans-2-nonenal byl potvrzen v kávě arabice (Blank et al. 1992), lískooříškovém oleji a oleji z dýňových semínek, navíc i mírně v arašídovém oleji (Matsui et al. 1998) a olivovém oleji (Vichi et al. 2007).

Trans-2-nonenal vzniká také při oxidaci polynenasycených kyselin. Linolová kyselina je zkrácena enzymy β -oxidace, enoyl-CoA-isomerasou (EC 5.3.3.8), acyl-CoA-dehydrogenasou (EC 1.3.99.3) a 2,4-dienoyl-CoA-reduktasou (EC 1.3.1.34) přeměněn na *trans*-3-nonenal-CoA, který je enoyl-CoA-isomerasou přeměněn na *trans*-2-nonenal-CoA, jenž je během β -oxidace přeměněn na acetyly-CoA (Berg et al. 2002).

2.3.3 Citral

Citral je směs dvou stereoisomerů geranialu (*cis*-isomer) a neralu (*trans*-isomer) (Akhila 1985), jež mají výraznou vůni a podílejí se na aroma esenciálních olejů, zejména z citronovníku, limetky (Lota et al. 2002), citronové trávy (Chanthai et al. 2012) nebo meduňky (Pino et al. 1999); v menší míře se podílejí také na vůni perily (Ito et al. 1999) nebo zázvoru. Množství citralu se v zázvoru během skladování zvýšilo spolu s poklesem jejich prekurzoru (Sekiwa-Iijima et al. 2001). Citral také funguje jako poplašný feromon u roztočů (Shimizu et al. 2004) a má antibakteriální a antifungální účinky (Kakarla a Ganjewala 2009). Přítomnost citralu u semen pšenice inhibovala jejich vývoj (Dudai et al. 2000).

Citral je C₁₀ monoterpen, skládající se ze dvou isoprenoidních jednotek, jež mají původ v glukose; je to tedy produkt metylerytriol-4-fosfátové dráhy (Lüddecke et al. 2012; Gupta a Ganjewala 2015). Vzniká z geranyl-difosfátu postupnou přeměnou přes geraniol za účasti enzymů geraniolsyntasy (EC 4.2.3.8) a geranioldehydrogenasy (EC 1.1.1.183; Sato-Masumoto a Michiho 2014). Geranioldehydrogenasa u roztočů, bakterií, rostlin a hlavně také citronové trávy je NAD⁺-dependentní a vykazuje vysokou specifitu pro geraniol, který přeměňuje na geranial; neral vzniká pouze isomerací geranialu, neboť není substrátem geranioldehydrogenasy (Singh-Sangwan et al. 1993; Noge et al. 2005; Hassan et al. 2012; Lüddecke et al. 2012). Přítomnost geranioldehydrogenasy byla potvrzena také u zázvoru, u nějž jako koenzym využívala NADP⁺ (Sekiwa-Iijima et al. 2001) a přeměňovala s podobnou účinností geraniol a nerol na citral (Obr. 7; Iijima et al. 2014).



Obr. 8 Vznik 3-metyl-2-butenalu při oxidačním štěpení cytokininu isopentenyladeninu enzymem cytokininoxidasou/dehydrogenasou (CKX/CKDH). Převzato a upraveno podle Buchanana et al. (2015).

redukce FAD. Vzniká iminový meziprodukt, který je vzápětí hydrolyzován na adenin a 3-metyl-2-butenal (Obr. 8; Buchanan et al. 2015). 3-metyl-2-butenal vzniká také degradací xylenu bakteriemi *Bougainvillea buttiana* (Sangthong et al. 2016).

Zvýšené množství 3-metyl-2-butenalu bylo zjištěno u rajčat po napadení houbovým patogenem *Alternaria alternata*, takže může být biosyntetizován ve vyšší míře v odpovědi na přítomnost patogenů (Encinas-Basurto et al. 2017).

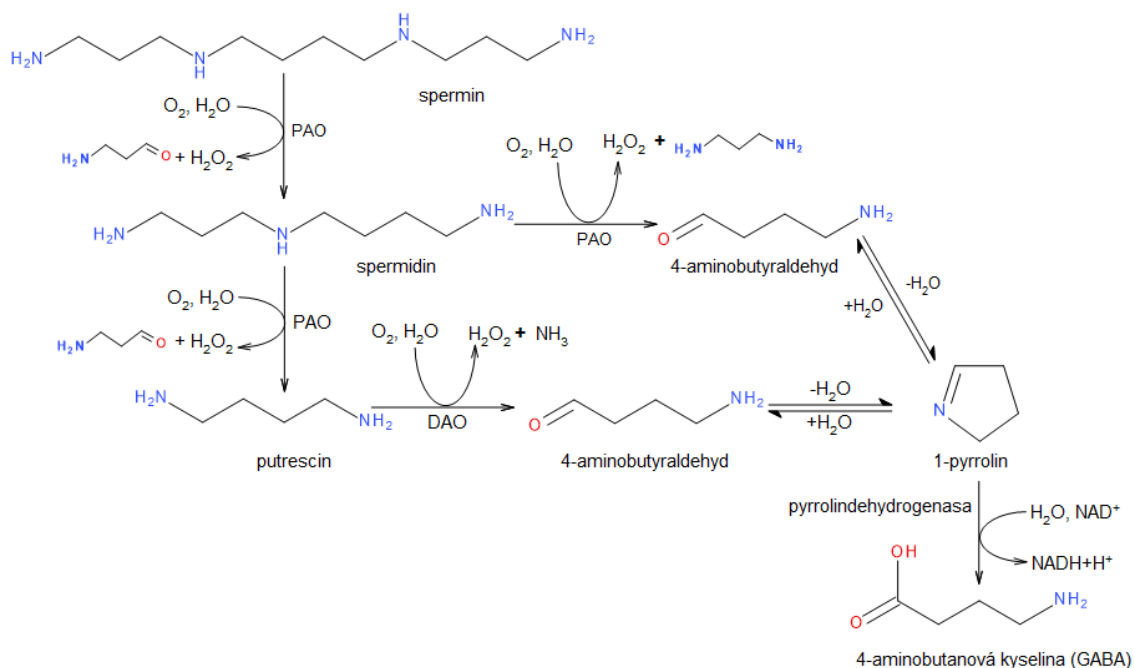
Je to těkavá sloučenina a její přítomnost byla detekována ve vařeném mase (Le Guen et al. 2000), chilli papričkách (Quijano a Pino 2010) nebo ostružinách (Georgilopoulos a Gallois 1987). 3-metyl-2-butenal byl potvrzen i na lidské kůži (Ruzsanyi et al. 2012).

2.3.5 3-aminopropionaldehyd a 4-aminobutyraldehyd

3-aminopropionaldehyd (APAL; Yu et al. 2004) a 4-aminobutyraldehyd (ABAL; Wood et al. 2007) jsou cytotoxické a vznikají při katabolismu polyaminů (Buchanan et al. 2015).

APAL vzniká při oxidaci sperminu na spermidin nebo při oxidaci spermidinu na putrescin různými isoenzymy polyaminoxidasy (EC 1.5.3.11) za přítomnosti molekuly kyslíku a vody a současného uvolnění peroxidu vodíku (Obr. 9; Buchanan et al. 2015). APAL může být 3-aminopropionaldehyddehydrogenasou (EC 1.2.1.87) přeměněn na 3-aminopropanovou kyselinu neboli β -alanin (Awal et al. 1995), který je významnou složkou kosterního svalu karnosinu (Hill et al. 2007) nebo vitamínu B₅ (Ottenhof et al. 2004).

Když je terminální (primární) aminoskupina putrescinu podrobena oxidativní deaminaci diaminoxidasou (EC 1.4.3.22), výsledkem je společný vznik ABALu,



Obr. 9 Aminoaldehydy 3-aminopropionaldehyd a 4-butyraldehyd vznikají při katabolismu polyaminů. Vysvětlivky: DAO = diaminoxidasa; PAO = polyaminoxidasa. Převzato a upraveno podle Buchanana et al. (2015).

peroxidu vodíku a amoniaku. Oxidací sekundární aminoskupiny spermidinu formují polyaminoxidasy peroxid vodíku, 1,3-diaminopropan a ABAL. Vznikající ABAL spontánně cyklizuje na 1-pyrrolin (Buchanan et al. 2015), který je pyrrolindehydrogenasou (EC 1.2.1.19) přeměňován na kyselinu 4-aminobutanovou (γ -aminomáselnou, GABA) za současné redukce NAD⁺ (Obr. 9; Flores a Filner 1985; Schieberle 1990).

Vzniklá GABA může vstoupit do mitochondrie, kde je transaminována na sukcinátsemialdehyd, který je sukcinátsemialdehyddehydrogenasou (EC 1.2.1.16) oxidován na sukcinát, jenž se účastní Krebsova cyklu (Berg et al. 2002).

Akumulace GABA v rostlinách byla potvrzena v odpovědi na stres, například na zvýšenou teplotu (Mayer et al. 1990) i nízkou teplotu (Cholewa et al. 1997), salinitní stres (Bolarín et al. 1995). U lidí je GABA nejdůležitější inhibiční neurotransmitter v centrální nervové soustavě, jejím prekurzorem je glutamát (Koolman a Röhm 2012).

APAL i ABAL jsou spolu s dalšími aminoaldehydy přeměňovány aminoaldehyddehydrogenasou (EC 1.2.1.19), která patří do rodiny ALDH10; ALDH10 z rajčete vykazovala s ABALem nejvyšší aktivitu (Kopečný et al. 2013).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Biologický materiál

Vedoucí práce byly dodány bakterie transformované plazmidem nesoucí konstrukt ZmALDH22 (Tab. 1; u ZmALDH22 nebyla vyjmuta signální sekvence, u dZmALDH22 byla vyjmuta část signální sekvence a u 2dZmALDH22 byla vyjmuta značná část signální sekvence). Geny byly do plazmidů v expresních buňkách klonovány tak, aby po spuštění exprese nesly proteiny ALDH22 na N-konci histidinovou kotvu (ze 6 histidinů). Klonování ZmALDH22 probíhalo stejným způsobem jako klonování HvALDH22, které bylo provedeno v rámci diplomové práce.

Primery pro *HvALDH22* byly navrženy Mgr. Radkou Končítíkovou, Ph.D. a Mgr. Davidem Kopečným, Ph.D.; forward primer byl navržen dvakrát a během experimentální části byla porovnána jejich specifita.

Další biologický materiál:

- *Escherichia coli*, NEB 5- α (New England Biolabs, Hitchin, UK)
- *Escherichia coli*, BL 21 (New England Biolabs, Hitchin, UK)
- semena ječmene setého, odrůda Golden Promise
- semena kukuřice seté, odrůda Celux225
- plazmid pET28a (New England Biolabs, Hitchin, UK)
- plazmid pET32b (New England Biolabs, Hitchin, UK)

Tab. 1 Přehled dodaných buněk transformovaných plazmidem nesoucí gen pro kukuřičnou aldehyddehydrogenasu rodiny 22 (ZmALDH22). V tabulce je uveden kmen expresních bakterií *Escherichia coli*, příslušný plazmid, který byl použit, a antibiotikum, na něž nese plazmid resistenci. U ZmALDH22 nebyla vyjmuta signální sekvence, u dZmALDH22 byla vyjmuta část signální sekvence a u 2dZmALDH22 byla vyjmuta značná část signální sekvence.

Typ ZmALDH22	Kmen <i>Escherichia coli</i>	Plazmid	Antibiotikum
ZmALDH22	BL21	pET32b	Ampicilin
dZmALDH22	Rosetta	pCDFDuet-1	Streptomycin
dZmALDH22	BL21	pCDFDuet-1	Streptomycin
dZmALDH22	BL21	pET32b	Ampicilin
2dZmALDH22	Rosetta	pET32b	Ampicilin
2dZmALDH22	BL21	pET32b	Ampicilin
2dZmALDH22	BL 21	pTYB12	Ampicilin

3.1.2 Použité chemikálie a soupravy

3.1.2.1 Chemikálie

- AccuPrime *Pfx* SuperMix (Invitrogen, USA)
- acetaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- agarosa (Sigma-Aldrich, USA)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- 4-aminobutyraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- 3-aminopropionaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- ampicilin (Sigma-Aldrich, USA)
- *m*-anisaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- *p*-anisaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- benzaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- bis(akryloamino)metan (Bio-Rad, USA)
- boritá kyselina (AMRESCO, USA)
- B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Fischer Scientific, USA)
- butyraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- citral (Sigma-Aldrich, USA)
- citronová kyselina (Sigma-Aldrich, USA)
- Comassie Brilliant Blue (Thermo Fischer Scientific, USA)
- cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Color Prestained Protein standard (10-250 kDa) (New England Biolabs, UK)
- CutSmart® Buffer (New England Biolabs, UK)
- D-arabinoza (Sigma-Aldrich, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, USA)
- D-glukosa (Sigma-Aldrich, USA)
- D-glyceraldehyd-3-fosfát (Sigma-Aldrich, USA)
- D,L-glyceraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)
- DNA-free voda (New England Biolabs, UK)
- DNasa (TopBio, ČR)

- dodecylsíran sodný (Bio-Rad, USA)
- DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, USA)
- D-ribosa (Sigma-Aldrich, USA)
- dusičnan amonný (Sigma-Aldrich, USA)
- dusičnan draselný (Sigma-Aldrich, USA)
- dusičnan vápenatý, pentahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- etanol (Sigma-Aldrich, USA)
- etidium bromid (Top-Bio, ČR)
- etylendiamintetraacetát sodný, dihydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- fenylacetaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- forward a reverse T7 primer
- GeneRuler 1 kbp DNA Ladder (New England Biolabs, UK)
- glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- glycerol (Lach-Ner, ČR)
- Goat anti-mouse IgG (H+L) – cross adsorbed, horseradish peroxidase conjugate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 4-guanidinobutyraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- heptanal (Sigma-Aldrich, USA)
- hexanal (Sigma-Aldrich, USA)
- HindIII (New England Biolabs, UK)
- 6x-His Tag Monoclonal antibody (Thermo Fisher Scientific, USA)
- hydrocinnamaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR)
- hydrogenfosforečnan sodný (Lach-Ner, ČR)
- hydroxid draselný (Lach-Ner, ČR)
- hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR)
- 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinethansulfoniová kyselina (HEPES; Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid manganatý, tetrahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid sodný (Sigma-Aldrich, USA)

- chlorovodíková kyselina (Lachema, SRN)
- imidazol (Sigma-Aldrich, USA)
- isobutyraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (Thermo Fischer Scientific, USA)
- kanamycin (Sigma-Aldrich, USA)
- Laemmliho vzorkovací pufr (Bio-Rad, USA)
- L-glyceraldehyd-3-fosfát (Sigma-Aldrich, USA)
- Luria-Bertani agar (Sigma-Aldrich, USA)
- Luria-Bertani médium (Roth, SRN)
- lysosym (Sigma-Aldrich, USA)
- malondialdehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- metanol (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-metylbutyraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- 3-metylbutyraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- 3-metyl-2-butenal (Sigma-Aldrich, USA)
- mléko sušené (Regilait, Francie)
- močovina (Lach-Ner, ČR)
- molybdan sodný, heptahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-(*N*-morpholino)-ethansulfoniová kyselina (MES; Sigma-Aldrich, USA)
- n-butanol (Sigma-Aldrich, USA)
- nikotinamidadeninukleotid (Sigma-Aldrich, USA)
- nikotinamidadeninukleotid fosfát (Sigma-Aldrich, USA)
- nonanal (Sigma-Aldrich, USA)
- *N, N, N', N'*-tetramethylethylendiamin (Bio-Rad, USA)
- octová kyselina (Lach-Ner, ČR)
- oktanal (Sigma-Aldrich, USA)
- pentanal (Sigma-Aldrich, USA)
- persíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)
- Phosphate Buffer Saline pH 7,2 (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Polyvinylpyrrolidon-40 (Sigma-Aldrich, USA)
- propionaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- Protein Ladder (10-250 kDa) (New England Biolabs, UK)

- 6x Purple Loading Dye (Sigma-Aldrich, USA)
- RNA-free voda (New England Biolabs, USA)
- RNase (TopBio, ČR)
- Sac1 (New England Biolabs, UK)
- semialdehyd aminosadipátu (Sigma-Aldrich, USA)
- síran hořečnatý, heptahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- síran měďnatý (Sigma-Aldrich, USA)
- síran zinečnatý, heptahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- síran železnatý, heptahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- sírová kyselina (Lach-Ner, ČR)
- SOC médium (New England Biolabs, UK)
- streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
- T4 DNA Ligase (Promega, USA)
- T4 DNA Ligase Buffer (Promega, USA)
- TAE pufr (tris-acetát-EDTA; Sigma-Aldrich, USA)
- *trans*-2-hexenal (Sigma-Aldrich, USA)
- *trans,trans*-2-hexandienal (Sigma-Aldrich, USA)
- *trans*-2-nonenal (Sigma-Aldrich, USA)
- *trans*-cinnamaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- 4-(trimethylamin)-butyraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, USA)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA)
- Xho1 (New England Biolabs, UK)

3.1.2.2 Použité soupravy

- GeneJET Gel Extraction Kit, katalogové č. K0692 (Thermo Fischer Scientific, USA)
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit, katalogové č. K0503 (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, katalogové č. 23236 (Thermo Fischer Scientific, USA)
- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, katalogové č. K1632 (Thermo Fischer Scientific, USA)

- RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit, katalogové č. AM1912 (Thermo Fischer Scientific, USA)
- SERVALight Polaris CL HRP WB Substrate Kit, katalogové č. 42584 (Serva, SRN)
- TaqMan™ Gene Expression Assay, katalogové č. 4331182 (Thermo Fischer Scientific, USA)

3.2 Přístrojové vybavení

- analytické váhy (Sartorius, SRN)
- centrifuga 5430R (Eppendorf, SRN)
- centrifuga Benchtop 4-16 k (Eppendorf, SRN)
- elektromagnetická míchačka (IKA, SRN)
- elektroforetická komůrka (Bio-Rad, USA)
- laminární box (Schoeller, ČR)
- kapalinový chromatograf pro střednětlakou chromatografii BioLogic Duo Flow (Bio-Rad, USA)
- mikrocetrifuga BLUE (Labnet, SRN)
- One Shot desintegrátor (Constant Systems, UK)
- PCR termocycler (Eppendorf, SRN)
- pH-metr (XS Instruments, Itálie)
- rotační třepačka (IKA, SRN)
- RT-PCR termocycler StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)
- skener Umax U9908- HAR0 (Amersham Bioscience Corp, USA)
- spektrofotometr UV-VIS s (Agilent, USA)
- spektrofotometr LightWave II UV-Vis II diode array UV/Visible (Biochrom WPA, UK)
- termoblok (Labnet, USA)
- termostat (Labnet, USA)
- Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA)
- třepačka RCT basic (IKA, SRN)
- UV transluminátor (East Port, Francie)
- vortex (Stuart, UK)

- váhy (Ohaus, USA)
- zobrazovací systém Amersham Imager 600 (Cytiva, USA)

3.3 Použité programy

- BioEdit 7.2
- BioLogic DuoFlow 2.0
- BioVia Draw 2008
- Dendroscope 3
- GraphPad 8.4.1
- Inscape 0.92.4
- ImageMaster
- kancelářský balík MS Office 2010
- Muscle online verze (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>)
- PhymI online verze (<http://www.atgc-montpellier.fr/phymI/>)
- QuantStudioMT Design & Analysis software
- Spectra Manager

3.4 Metody

3.4.1 Fylogenetická analýza

Pro vytvoření fylogenetického stromu byly staženy aminokyselinové sekvence pro všechny ALDH22 z dostupných organismů na <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> vyhledáváním pomocí známé proteinové sekvence AtALDH22 a OsALDH22 (Brocker et al. 2013); byly také staženy proteomy na <https://www.uniprot.org/> azoly karolínské a *Klebsormidia nitens*, odkud byly proteiny ALDH22 vyříznuty. Sekvence byly zpracovány v softwaru BioEdit a na základě vzájemných podobností byly rozděleny do podrodin. Fylogenetický strom byl vytvořen pomocí online softwarů <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> a <http://www.atgc-montpellier.fr/phymI/>, kde byla hodnota bootstrapu nastavena na 100, a následně graficky upraven v softwarech Dendroscope a Inscape.

Pro analýzu ALDH nadrodiny v ječmeni, kukuřici a rýži byly vyhledány a staženy sekvence proteinů ALDH na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> a <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> na základě dříve rozčleněných ALDH z různých organismů podle Brokera et al. (2013) s výjimkou rozčleněných rodin pro kukuřici a rýži. Z databází byl zjištěn i počet aminokyselin, exonů a číslo chromozomů,

Tab. 2 Příprava Hoaglandova roztoku ze zásobních roztoků jednotlivých sloučenin, roztok byl doplněn na 1 l destilovanou vodou.

Zásobní roztok sloučeniny (koncentrace)	Množství zásobního roztoku sloučeniny na přípravu 1 l Hoaglandova roztoku
Roztok KNO_3 ($101 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ ($226 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) + NH_4NO_3 ($16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)	5,0 ml
Roztok Fe-EDTA	1,0 ml
$\text{MgSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($247 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)	2,0 ml
KH_2PO_4 ($136 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,5 ml
Roztok mikroprvků	0,5 ml

kde se gen nachází.

3.4.2 Klonování aldehydedehydrogenas rodiny 22

3.4.2.1 Kultivace ječmene a kukuřice

Nejprve byl namíchan Hoaglandův roztok podle Tab. 2 a roztok Fe-EDTA byl připraven rozpuštěním 56,1 g KOH ve 920 ml vody, pH roztoku bylo pomocí H_2SO_4 upraveno na hodnotu 5,5 a nakonec bylo přidáno 11,45 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ a 7,8 g $\text{FeSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ a roztok byl doplněn na objem 1 l. Roztok KH_2PO_4 byl upraven KOH na pH 6,0. Roztok mikroprvků byl připraven rozpuštěním 2,86 g H_3BO_3 ; 0,045 g $\text{MgCl}_2\cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0,051 g CuSO_4 a 0,12 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ v 1 l vody. Hoaglandův roztok byl před použitím sterilizován.

Třídenní klíčky ječmene a kukuřice byly kultivovány ve fytotronu v kontaktu s Hoaglandovým roztokem během 7 dnů za režimu 16 h světlo a 8 h tma a poté byly sklizeny.

3.4.2.2 Izolace RNA

RNA byla izolována pomocí kitu RNAqueous Pfenol-free RNA Isolation. Listy a kořeny byly rozdrceny v tekutém dusíku. Ke 100 mg vzorku byl přidán 1 ml Lysis Binding Solution a směs byla stočena (16000 g, 5 min., 10 °C). Byl odebrán supernatant, ke kterému byl přidán stejný objem 64% (v/v) etanolu, směs byla po 700 μl přidávána na kolonu s filtrem a stočena (10000 g, 30 s, 4 °C). Filtr byl dvakrát promyt 500 μl Wash Solution #2/3 a zcentrifugován (10000 g, 30 s, 4 °C). RNA byla eluována 60 μl a následně 40 μl Elution Solution, vytemperovaného na 80 °C, za současné centrifugace (10000 g, 30 s, 4 °C).

Směs byla poté ošetřena DNasou, k 90 μl vypurifikované RNA bylo přidáno 10 μl

DNA Turbo Buffer; 3 μl DNasy Turbo a směs byla zahřívána 45 min. na 37 °C, načež byly přidány 2 μl DNasy Turbo a směs byla zahřívána znova 45 min. na 37 °C. Následně byla DNasa inaktivována 10 min. při 70 °C.

Ke 100 μl směsi ošetřené RNA bylo přidáno 50 μl vychlazeného LiCl Precipitate Solution a směs byla stočena (16000 g, 20 min., 4 °C). Pelet byl promyt 200 μl vychlazeného 70% (v/v) etanolu a směs byla opět stočena (16000 g, 20 min., 4 °C). Pelet byl rozpuštěn ve 20 μl RNA-free vody a koncentrace RNA byla určena pomocí stanovení A_{260} a pomocí vztahu:

$$c(\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1})=40\cdot A_{260}\cdot\text{\textit{ředění}} \text{ rovnice 1.}$$

3.4.2.3 Reverzní transkripce

RNA byla přepsána na cDNA pomocí kitu RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. Ke 2 μg RNA byl přidán 1 μl Oligo dT primeru, směs byla doplněna do 12,5 μl DEPC-ošetřenou vodou a směs byla zahřívána 1 min. na 65 °C. K ochlazené směsi byly přidány 4 μl 5x Reaction Buffer; 0,5 μl Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitoru; 2 μl dNTP a 1 μl RevertAid H Minus Reverse Transcriptase.

Reakční směs byla na termocycleru zahřívána 1 h na 42 °C a inaktivována při 70 °C na 10 min. cDNA byla skladována při -20 °C.

3.4.2.4 Real-Time PCR

Byla nachystána kalibrační řada 2dZmALDH22 v pCDFDuetu-1 postupným ředěním 1:1 původní koncentrace 1 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. RT-PCR byla provedena pomocí kitu TaqMan™ Gene Expression Assay, sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. 3. Reakční směs na mikrotitrační destičce se skládala ze 2,5 μl cDNA nebo plazmidu (z kalibrační řady); 4x zředěného MyTaq Mixu; ROX ($c = 312,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$); 250 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ próby; 300 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ páru primerů a na objem 10 μl byla doplněna RNA-free vodou. Jako house-keeping gen byl zvolen elongační faktor EF1 α a β -aktin. Destička byla stočena (5000 g, 1 min., 20 °C) a byla spuštěna RT-PCR – směs byla 2 min. zahřívána na 50 °C, poté 10 min. na

Tab. 3 Nukleotidové sekvence primerů použitých při Real-Time PCR s aldehyddehydrogenasou rodiny 22.

Primer	Nukleotidová sekvence
Forward	5'-GTCATTCGCGACGGTGTCT
Reverse	5'-GCTGCCCTGCACAAAATTCT 5' [FAM]TTTCAGGTTCCAGCCCAGCGGA[TAMRA]

95 °C, načež probíhalo 40 cyklů 15 s 95 °C a reakce byla ukončena zahřátím 1 min. 60 °C.

Díky známé velikosti a koncentraci plazmidu byl vypočítán počet molekul plazmidu v jednotlivých jamkách a ze závislosti hodnoty prahu (C_T) na počtu molekul plazmidu byla určena rovnice závislosti. Z průměrných hodnot C_T vzorků byl pomocí rovnic 2 a 3 stanoven počet kopií genů v jednotlivých vzorcích pletiv ječmene a kukuřice.

$$N_{kontrola} = \frac{10^{\frac{C_T - p}{s}}}{C_{cDNA}} \quad \text{rovnice 2}$$

$$N_{vzorek} = \frac{N_{kontrola} \cdot 2^{C_T(kontrola) - C_T(elongační faktor)}}{2^{C_T(vzorek) - C_T(elongační faktor)}} \quad \text{rovnice 3}$$

3.4.2.5 PCR amplifikace

Reakční směs se skládala z 1,5 µl cDNA; 22,5 µl AccuPrime Pfx SuperMix a 200nmol·l⁻¹ páru primerů (nukleotidové sekvence jsou uvedeny v Tab. 4). Směs byla nejprve denaturována 2 min. při 95 °C, poté následovalo 35 cyklů 20 s při 95 °C – 30 s při 59,5 °C – 90 s při 68 °C. Amplifikace byla ukončena zahřátím na 68 °C během 5 min, pak směs byla ochlazená na 4 °C.

3.4.2.6 Agarová elektroforéza a purifikace DNA z gelu

1% (w/v) agarosa v TAE pufru byla nalita do elektroforetické komůrky a bylo přidáno 50 µl 0,07% (w/v) etidium bromidu. V případě následné purifikace DNA z gelu byla použita 0,8% (w/v) agarosa. Do ztuhlého gelu byly naneseny vzorky obarvené 6x Purple Loading Dye, standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder a elektroforéza běžela při 100 V. Pásky na gelu byly pozorovány pomocí UV transluminátoru.

Pro izolaci DNA z gelu byl použit GeneJET Gel Extraction Kit. Pásky se vzorky byly vyříznuty z gelu, zváženy, byl přidán Binding Buffer (k 1 g byl přidán 1 ml pufru) a směs byla zahřívána při 60 °C 10 min. nebo déle do úplného rozpuštění. Směs byla

Tab. 4 Nukleotidové sekvence primerů, použitých při PCR amplifikaci aldehyddehydrogenasy rodiny 22.

Primer	Nukleotidová sekvence
Forward 1	5'-AACGAGCTCGATGGAGGTCGACGCCT
Forward 2	5'-GAGGTCGACGCCTCCGACGTGATGG
Reverse	5'-AATCTCGAGTCACCGGCTTTTCCTCCTG

nanesena na GeneJET purifikační kolonku a stočena (12000 g, 10 min., 10 °C). Bylo přidáno 100 µl Binding Buffer na kolonku, která byla znovu stočena (12000 g, 10 min., 10 °C), poté bylo přidáno 700 µl Wash Buffer a kolonka byla stočena (12000 g, 10 min., 10 °C). Na kolonku bylo přidáno 50 µl Elution Buffer a eluát byl jímán do nové kolonky během stáčení (12000 g, 10 min., 10 °C).

3.4.2.7 Kultivace plazmidů a jejich purifikace

K 10 ml Luria-Bertani (LB) média s příslušným antibiotikem podle Tab. 5 bylo přidáno 5 µl zamraženého plazmidu (-20 °C). Kultura byla kultivována přes noc za stálého třepání (160 g, 37 °C).

Další den byly plazmidy z bakterií purifikovány pomocí setu GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Nejprve byla kultura stočena (12000 g, 10 min., 10 °C). Pelet byl resuspendován ve 250 µl Resuspension Solution, bylo přidáno 250 µl Lysis Solution a směs byla promíchána šestinásobným převrácením. Bylo přidáno 350 µl Neutralization Solution, směs byla opět několikrát převrácena a nakonec stočena (12000 g, 30 min., 10 °C). Supernatant byl nanesen na kolonku, která byla stočena (12000 g, 1 min., 10 °C). Bylo dvakrát přidáno 500 µl Wash Solution a kolonka byla stočena (12000 g, 1 min., 10 °C). Kolonka byla znovu stočena (12000 g, 1 min., 10 °C) a bylo přidáno 50 µl Elution Buffer vytemperovaného na 70 °C, eluát byl po dvouminutové inkubaci při pokojové teplotě jímán do nové mikrozkušavky při stáčení (12000 g, 2 min., 10 °C).

3.4.2.8 Restrikční štěpení a ligace

Koncentrace DNA insertu i plazmidu byla stanovena podle vztahu:

$$c(\text{ng} \cdot \mu\text{I}^{-1}) = 50 \cdot A_{260} \cdot \text{ředění} \quad \text{rovnice 4.}$$

Reakční směs pro restrikční štěpení HvALDH22 se skládala z 1 µg DNA, 5 µl CutSmart Buffer, 1 µl restrikčních enzymů SacI a XhoI a byla doplněna vodou na 50 µl. Směs byla 1 h inkubována při 37 °C a poté inaktivována 20 min. při 65 °C.

Reakční směs pro restrikční štěpení plazmidu se skládala z 45 µl plazmidu; 5,5 µl

Tab. 5 Tabulka plazmidů, použitých při klonování aldehyddehydrogenasy rodiny 22 z ječmene, a příslušných antibiotik, na něž nese plazmid resistenci.

Plazmid	Antibiotikum
pET28a	Kanamycin
pET32b	Ampicilin

CutSmart Buffer a 1,5 µl restričních enzymů HindIII, SacI a XhoI a byla doplněna vodou na 55 µl. Směs byla přes noc inkubována při 37 °C a poté inaktivována 20 min. při 80 °C.

Reakční směs na ligaci o objemu 20 µl se skládala ze 100 ng lineární vektorové DNA; 86 ng insertu DNA; 2 µl 10x T4 DNA Ligase Buffer; 0,5 µl T4 DNA Ligase a vody. Směs byla inkubována 1 h při pokojové teplotě a následně inaktivována 5 min. při 65 °C.

3.4.2.9 Transformace a její kontrola

K 5 µl ligačního produktu bylo přidáno 50 µl kompetentních buněk *Escherichia coli*, NEB 5-α a směs byla chlazená 30 min. na ledu, poté byla zahřívána 30 s na 42 °C a následně chlazená 5 min. na ledu. Bylo přidáno 200 µl SOC-média a směs byla inkubována 60 min. při 37 °C. 100 µl směsi bylo rozetřeno na plotnu s LB-agarem a příslušným antibiotikem podle Tab. 5 a plotny byly nechány přes noc při 37 °C ve tmě. Druhý den byla pomocí PCR se specifickými T7 primery ověřena úspěšnost transformace.

Pro PCR ověření byla dána polovina vybrané kolonie do 20 µl DNA-free vody, povařena 10 min. a stočena (12000 g, 10 min., 10 °C). Reakční směs pro PCR se skládala z 12,5 µl supernatantu; po 0,5 µl páru T7 primeru a 12,5 µl DreamTaq Green PCR Master Mixu. Reakční směs byla nejprve zahřívána 2 min. na 95 °C poté proběhlo 35 cyklů 15 s při 95 °C – 30 s při 50 °C – 2 min. při 72 °C a směs byla nakonec ochlazená na 4 °C. S PCR produkty byla provedena agarová elektroforéza a podle standardu byla ověřena úspěšnost klonování. Byl-li přítomen ve vzorku pás o očekávané velikosti, byl připravený plazmid podroben štěpení restričními endonukleasami a v případě pozitivního výsledku poslán na sekvenaci. Na restriční analýzu byly použity enzymy SacI a XhoI. Směs plazmidu a restričních enzymů byla 1 h inkubována při 37 °C a poté inaktivována 20 min. při 65 °C. Pro ověření štěpení plazmidu byla provedena agarosová elektroforéza.

Ukázalo-li sekvenování plazmidu, že do něj byl vložen správně gen *ALDH22*, byl plazmid transformován do T7 expresních bakterií *Escherichia coli* (kmen BL 21) stejným způsobem jako do kompetentních. Transformované expresní buňky byly uchovány při -80 °C.

3.4.3 Purifikace rekombinantních proteinů a kinetická měření

3.4.3.1 Expres rekombinantních proteinů v *Escherichia coli*

První den později odpoledne bylo 20 ml LB-médium s příslušným antibiotikem podle Tab. 1 nebo Tab. 5 naočkováno 5 μ l bakterie nesoucí *ADLH22* a prekultura byla inkubována přes noc za stálého třepání (200 g, 37 °C).

Druhý den byly prekultury stočeny (6000 g, 5 min., 10 °C), pelet byl resuspendován ve větším objemu LB-média (30 ml při optimalizacích exprese nebo 400 ml při produkci proteinu) s příslušným antibiotikem podle Tab. 1 nebo Tab. 5. Kultura byla inkubována za stálého třepání (200 g, 37 °C), dokud její optická densita OD_{600} nebyla v rozmezí 0,6-1; při optimalizacích byla inkubace při 37 °C ukončena při $OD_{600} \approx 0,8$. Byl odebrán 1 ml buněčné kultury pro SDS-PAGE elektroforézu jako vzorek „před indukcí“.

Expres *ALDH22* byla spuštěna přidáním isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG; finální koncentrace 0,5 mmol \cdot l $^{-1}$) a kultura byla inkubována buď 4 h při 30 °C, nebo přes noc při 20 °C. Po skončení exprese byly odebrány vzorky pro SDS-PAGE elektroforézu a zbytek kultury byl stočen v 50ml centrifugačních zkumavkách (6000 g, 5 min., 10 °C), pelet byl promyt ve 20 ml 0,9% (w/v) NaCl a zamražen na -20 °C, nebo bylo dále pokračováno v extrakci.

3.4.3.2 Extrakce a purifikace rekombinantních proteinů

Bakteriální pelet *Escherichia coli* byl resuspendován v resuspendačním pufru (50mmol \cdot l $^{-1}$ MES pH 6,5 nebo fosfátový pufr pH 7,0 nebo HEPES pH 7,5/pH 8,0/pH 8,5 nebo Tris-HCl pH 7,5/pH 8,0/pH 8,5 podle výsledků optimalizace; 10mmol \cdot l $^{-1}$ MgCl $_2$; 50 μ l cComplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) a bakterie byly rozbity na One Shot desintegrátoru za použití tlaku 27 kpsi nebo 33 kpsi. V závislosti na optimalizaci purifikace mohl být přidán lysosym (finální koncentrace 0,4 mg \cdot ml $^{-1}$).

Bakteriální lyzát byl inkubován 10 min. při pokojové teplotě s 1 ml B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent. Poté bylo přidáno 10 μ l DNasy (zásobní roztok 10 μ g \cdot ml $^{-1}$) a 10 μ l RNasy (zásobní roztok 10 U \cdot ml $^{-1}$). Směs byla promíchána pětinasobným převrácením a inkubována 30 min. při 37 °C. Byl přidán NaCl (finální koncentrace 300 mmol \cdot l $^{-1}$) a glycerol (finální koncentrace 5 % (w/w)). Směs byla stočena (12000 g, 30 min., 4 °C). Z peletu byly odebrán vzorek „inkluzní tělíska“, ze

supernatantu byl odebrán vzorek „rozpustná fáze“.

ALDH22 byla purifikována pomocí afinitní chromatografie na kolonkách s imobilizovanými Co^{2+} ionty (His selected cobalt gel; Sigma-Aldrich, USA). Kolonky byly nejprve ekvilibrovány třikrát 5 ml ekvilibračního pufru ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pufr, který byl použit i v resuspendačním pufru; $300\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 5% (w/w) glycerol; $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo $20\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ imidazol) minimálně 30 min. při pokojové teplotě. Poté byl na kolonky nanesen supernatant z purifikace a rotační třepačka (100 g) s kolonkami byla na 1 h umístěna do chladové místnosti ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Kolonky byly poté stočeny (300 g, 30 s, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$) a byl odebrán vzorek „flow-trough frakce“ (tj. proteiny, které se nezachytí na kolonce). Kolonky byly třikrát promyty 5 ml ekvilibračního roztoku.

Byly nanесeny 4 ml (při první eluci) a 3 ml (při druhé eluci) elučního roztoku ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pufr, který byl použit i v resuspendačním pufru; $300\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 5% (w/w) glycerol; $200\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ imidazol) a kolonky byly na rotační třepačce (100 g) umístěny na 40 min. do chladové místnosti ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Eluce z jedné kolonky byla sbírána do stejné centrifugační zkumavky.

Roztok eluovaného proteinu byl zakoncentrován na patroně Centricon (30 kDa, Centricon, Millipore, USA) za současného promývání promývacím roztokem ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pufr, který byl použit i v resuspendačním pufru; 5% (w/w) glycerol), dokud nebyla koncentrace imidazolu nižší než $1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po zakoncentrování byl odebrán vzorek „eluce“ a byl přidán dithiotreitol (DTT; finální koncentrace $20\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Vzorek ALDH22 pro stanovení specifické aktivity byl následně přečištěn pomocí iontoměničové chromatografie v střednětlakém uspořádání. Na kolonu Resource Q (GE Healthcare, USA) byl nejprve nanесen pufr A ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HEPES pH 8), poté vzorek rekombinantního proteinu, který byl následně eluován pufrem B ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HEPES pH 1; $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl). Analýza probíhala při tlaku 87 psi a průtokové rychlosti $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, objem smyčky byl 0,5 ml. Proteiny byly detekovány při vlnové délce 280 nm. Byly sbírány frakce vzorku v různých časových intervalech podle nárůstu absorbance, přítomnost rekombinantních proteinů byla ověřena také pomocí SDS-PAGE.

3.4.3.3 SDS-PAGE

Vzorky odebrané v průběhu extrakce a purifikace byly dále analyzovány pomocí SDS-PAGE. Vzorky byly stočeny (5000 g, 5 min., $10\text{ }^{\circ}\text{C}$), pelety byly resuspendovány

ve 60 μl $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ močoviny, bylo přidáno 20 μl Laemmliho vzorkovacího pufru a směs byla zahřívána 20 min. na 80 °C.

Gely do skel byly nality podle Tab. 6, persíran amonný byl vždy přidán těsně před naléváním gelů. Po nalití elektrodového pufru ($0,025\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 8,3; $0,025\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycin; 0,1% SDS) byly nanесeny vzorky a standard Protein Ladder (10-250 kDa); v případě následného blottingu na membránu byl použit standard Color Prestained Protein Standard (10-250 kDa). Elektroforéza běžela při 110 V, dokud nepřešly vzorky na rozhraní gelů, poté běžela při 130 V.

Po doběhnutí byl gel ponořen do barvicího roztoku (0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue; 40% (v/v) metanol; 7% (v/v) octová kyselina) za stálého třepání. Druhý den byl gel ponořen do odbarvovacího roztoku (5% (v/v) metanol; 7% (v/v) octová kyselina) a oskenován, na základě pásů standardu byla odečtena přibližná molekulová hmotnost pásů vzorků.

3.4.3.4 Semi-dry western-blotting a imunodetekce se sekundární protilátkou

Polyvinilidendifluoridová (PVDF) membrána o rozměrech 7x8,5 cm byla na 5 min. ekvilibrována v denaturovaném 96% (v/v) etanolu, poté 3 min. v destilované vodě a nakonec 10 min. v blotovacím pufru ($48\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris; $192\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycin; 20% (v/v) etanol; $1,3\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS; pH 9,2). Čtyři Whatmanovy papíry (tloušťka 0,8 mm) byly také namočený na 10 min. do blotovacího pufru.

Na dno blotovací komůrky byly naskládány dva Whatmanovy papíry – PVDF membrána – SDS-PAGE gel – dva Whatmanovy papíry. Válečkem byly odstraněny vzduchové bubliny a blotting probíhal při 1 A a 25 V během 30 min. Membrána byla na

Tab. 6 Složení zaostřovacího a dělicího gelu pro SDS-PAGE, objemy jsou uvedeny pro přípravu 2 gelů. Vysvětlivky: AA = akrylamid; APS = persíran amonný; BIS = bis(akryloamino)methan; SDS = dodecylsírán sodný; TEMED = *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin.

	AA (w = 0,3)/ BIS (w = 0,08)	Tris-HCl (c=1,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pH 8,8)	H ₂ O	SDS (w = 0,1)	APS (w = 0,1)	TEMED
Zaostřovací gel (12%)	0,65 ml	1,25 ml	2,95 ml	0,10 ml	0,06 ml	0,01 ml
Dělicí gel (4%)	4,00 ml	2,50 ml	3,20 ml	0,10 ml	0,05 ml	0,01 ml

noc umístěna do blokovacího pufru (2% (w/v) polyvinylpyrrolidon-40 (PVP-40); 10x Phosphate Buffer Saline pH 7,2; 0,1% Tween 20) za stálého třepání.

Druhý den byla 1 h inkubována s primární protilátkou s myším anti-His-tagem (6xHis Tag Monoclonal antibody), poté třikrát promyta 10 ml 2% (w/v) PVP-40 na 10 min. a inkubována 1 h se sekundární protilátkou v konjugátu s peroxidasou (Goat anti-mouse IgG (H+L) – cross adsorbed, horseradish peroxidase conjugate) v roztoku s mlékem (5% (w/v) mléko; 10x Phosphate Buffer Saline pH 7,2; 0,1% Tween 20). Membrána byla pětkrát promyta 10 ml 2% (w/v) PVP-40 na 10 min. Vizualizace byla provedena přidáním 1 ml luminolu.

3.4.3.5 Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou

Koncentrace celkových proteinů byla stanovena Bradfordovou metodou pomocí kitu Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit. Koncentrační řada standardů hovězího sérového albuminu (BSA) byla namíchána podle přiloženého návodu. K 1,5 ml Coomassie Plus Reagent bylo přidáno 50 µl standardu (nebo vzorku), směs byla inkubována 10 min. při pokojové teplotě a absorbance směsi byla změřena při 595 nm. Byla vytvořena závislost A_{595} na koncentraci standardů BSA, na základě níž byla odečítána koncentrace vzorků.

3.4.3.6 pH optimum

Hodnota pH optima ALDH22 byla stanovována v rozmezí pH pufrů 6,0 – 9,6. Pro pH 6,0 – 7,2 byly použity fosfocitrátové pufrы namíchané podle Tab. 7; pro pH 6,8 – 8,1 byl použitы pufrы Tris-HCl nebo HEPES a pro pH 8,6 – 9,6 byly použity glycin-NaOH pufrы namíchané podle Tab. 8. Kinetická měření probíhala v přítomnosti $75\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pufru; $1,5\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD^+ ; $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ *p*-anisaldehydu. pH optimum bylo vyhodnoceno v GraphPadu pomocí funkce Gaussian distribution.

Tab. 7 Tabulka pro přípravu fosfocitrátového pufru, použitého na stanovení optima.

pH	V ($0,2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4)	V ($0,2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrát)	V (H_2O)
6,0	9,63 ml	5,37 ml	15 ml
6,6	10,38 ml	4,62 ml	15 ml
6,8	12,27 ml	2,73 ml	15 ml
7,0	13,08 ml	1,95 ml	15 ml
7,2	13,5 ml	2,0 ml	15 ml

Tab. 8 Tabulka pro přípravu glycin-NaOH pufru, použitého pro stanovení pH optima.

pH	V (0,2mol·l ⁻¹ glycin)	V (0,2mol·l ⁻¹ NaOH)	V (H ₂ O)
8,6	7,5 ml	2,0 ml	15,5 ml
8,8	7,5 ml	3,0 ml	14,5 ml
9,0	7,5 ml	4,4 ml	13,1 ml
9,2	7,5 ml	6,0 ml	11,5 ml
9,4	7,5 ml	8,4 ml	8,6 ml
9,6	7,5 ml	9,4 ml	8,1 ml

3.4.3.7 Substrátová specifita a kinetická měření

Při stanovování substrátové specifity a kinetických měření byla byla do kyvety o tloušťce 1 cm napipetována reakční směs o objemu 2 ml. Jako slepý vzorek byla použita reakční směs bez enzymu. Po přidání enzymu byla v pravidelných časových intervalech sledována změna A_{340} , neboť lze při ní detekovat množství NAD(P)H, který vzniká jako produkt reakce ALDH a při 340 nm má absorpční maximum (Pingoud et al. 2002). Během reakce byla reakční směs zahřívána na 30 °C a interval měření změny A_{340} byl 10 s.

Pracovní roztoky aldehydů, které byly v zásobním roztoku ve formě diacetalu, byly připraveny ve 0,2mmol·l⁻¹ HCl a směsi byly 10 min. povařeny; v případě zbývajících alifatických a aromatických aldehydů byly pracovní roztoky připraveny v 96% (v/v) etanolu a cukry v pufru, v němž probíhalo měření.

Substrátová specifita byla měřena v reakční směsi 75mmol·l⁻¹ pufru HEPES (pH bylo zvoleno podle stanoveného pH optima); 1,5mmol·l⁻¹ NAD⁺ nebo NADP⁺; 500 μmol·l⁻¹ aldehydu.

Saturační křivka NAD⁺ byla měřena v reakční směsi 75mmol·l⁻¹ pufru (pH bylo zvoleno podle stanoveného pH optima); NAD⁺ v rozmezí 1 – 2000 μmol·l⁻¹ a 500 μmol·l⁻¹ *p*-anisaldehydu. Saturační křivky vybraných substrátů byly měřeny v reakční směsi 75mmol·l⁻¹ pufru HEPES pH 8,1 pro HvALDH22 nebo pH 8,3 pro ZmALDH22; 1,5mmol·l⁻¹ NAD⁺ a aldehydu v rozmezí 0,01 – 1500 μmol·l⁻¹, tak aby byly změřeny specifické aktivity pro alespoň 3 různé koncentrace aldehydu pod hodnotou K_m .

Z lineárních částí závislosti A_{340} na čase byla odečtena směrnice vzniku NAD(P)H. Specifické aktivity byly stanoveny pomocí rovnice 5, kde V je objem

reakční směsi (2 ml), m je hmotnost přidaného enzymu ALDH22, ε je molární absorpční koeficient NAD(P)H při 340 nm ($\varepsilon_{340}=6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Hodnoty K_m a V_{lim} byly vyhodnoceny pomocí softwaru GraphPad Prism za využití funkce Michaelise-Menten model (rovnice 6), když saturační křivka splňovala kinetiku Michaelise-Mentenové, nebo pomocí funkce Substrate inhibition (rovnice 7), když docházelo k inhibici substrátem.

$$\text{specifická aktivita}[\text{nkat}/\text{mg}] = \frac{\text{směrnice} \cdot V[\text{l}]}{m[\text{mg}] \cdot \varepsilon_{340}[\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]} \cdot 10^{12} \quad \text{rovnice 5}$$

$$v = \frac{V_{\text{lim}} + [S]}{K_m + [S]} \quad \text{rovnice 6}$$

$$v = \frac{V_{\text{lim}} + [S]}{K_m + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{1 + K_i}\right)} \quad \text{rovnice 7}$$

4 VÝSLEDKY

4.1 Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza ukázala, že rodina ALDH22 se nachází v podříši zelené rostliny u vývojových větví zelené řasy, mechy a vyšší rostliny, přesněji u oddělení zelené řasy, mechy, plavuně, kapradiny, jednoděložné a dvouděložné rostliny; byla potvrzena i u hospodářsky významných plodin jako je pšenice, sója nebo brambor (Obr. 10).

ALDH22 z vývojových větví mechorosty a vyšší rostliny byly zařazeny do podrodiny ADLH22A, u zelených řas byly ALDH22 rozděleny do dvou podrodin, a to ALDH22B a ALDH22C. Z fylogenetické mapy byla odstraněna ALDH22 pro mrkev, neboť tato proteinová sekvence byla výrazně delší než ostatní ALDH22 a v rámci fylogenetického stromu byla výrazně vzdálena od ostatních ALDH22.

V rámci fylogenetického stromu je pozorovatelné rozčlenění nejen podle vývojových větví a oddělení, ale většinou i v rámci jednotlivých čeledí – například u čeledi lipnicovité, kam patří bér, čirok, ječmen, kukuřice, *oropedium*, ozdobnice, pšenice, proso a rýže; nebo u čeledi růžovité, kam patří broskvoň, jabloň a jahodník. Výjimku tvoří například cizrna beraní, patřící do čeledi bobovité, která byla v rámci fylogenetického stromu zařazena mezi členy čeledi brukvovité.

Ječmen setý (Tab. 9), kukuřice setá (Tab. 10) i rýže setá (Tab. 11) obsahují stejné ALDH rodiny; kukuřice obsahuje 21 rodin, rýže 20 rodin a ječmen 16 rodin. Nejdelší ALDH byla ALDH18 (krom HvALDH18B1, která mohla být špatně osekvenována). U ječmene byly nalezeny 2 výrazně kratší ALDH (HvALDH3F1 a HvALDH3E1), tyto proteiny nejsou též pravděpodobně osekvenované celé.

ALDH stejných rodin a podrodin leží u ječmene, kukuřice a rýže většinou na různých chromozomech, nicméně v počtu aminokyselin se ALDH podrodiny relativně shodují (u ALDH11A3, ALDH10A5 a ALDH2C1 ve vysoké míře) stejně jako v počtu exonů, kde byla podobnost ještě vyšší. Obecně se více podobají údaje o kukuřice a rýži.



Obr. 10 Fylogenetická mapa aldehyddehydrogenasy rodiny 22 z organismů převážně dostupných na <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>; proteiny byly rozčleněny do podrodin A, B a C na základě vzájemné podobnosti. Mechy jsou fialově, zelené řasy zeleně, kaprad'orosty hnědě, jednoděložné rostliny červeně a dvouděložné rostliny modře. Proteiny, s nimiž bylo pracováno v rámci diplomové práce, jsou tučně. Hodnoty bootstrapu nikdy nebyly celých sto procent, čísla byla zaokrouhlena na celá čísla.

Tab. 9 Aldehyddehydrogenasová (ALDH) nadrodina v ječmeni (*Hordeum vulgare*). Proteinové sekvence ALDH byly staženy na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> a <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, odkud bylo i odečteno množství aminokyselin, číslo chromozomu a počet exonů. Sekvence byly porovnány v BioEditu a rozděleny do rodin podle Brockera et al. (2013); při rozčleňování nebyly použity ALDH pro kukuřici a rýži.

Rodina	Název genu	Phytozome ID	NCBI ID	Počet AMK	Číslo chromozomu	Počet exonů
ALDH2	ALDH2B7	HORVU6Hr1G072830	BAB62757.1	513	6	7
	ALDH2C1	HORVU7Hr1G085120	BAK05811.1	558	7	8
	ADLH2C2	HORVU1Hr1G068020	BAJ87654.1	499	1	9
	ALDH2C4	HORVU3Hr1G092680	BAJ87654.1	525	3	7
ALDH3	ALDH3E3	HORVU6Hr1G061220	BAJ96457.1	357	6	3
	ALDH3F1	HORVU2Hr1G092530	BAJ86301.1	361	2	7
	ALDH3H2	HORVU4Hr1G017450	BAK01937.1	489	4	10
ALDH5	ALDH5A1	HORVU6Hr1G031480.8	-	526	6	11
ALDH6	ALDH6B1	HORVU2Hr1G107550	BAJ94980.1	580	2	19
ALDH7	ALDH7B6	HORVU5Hr1G062090	BAJ87483.1	572	5	13
ALDH10	ALDH10A5	HORVU2Hr1G080970	BAB62847.1	506	2	15
ALDH11	ALDH11A3	HORVU2Hr1G036110	-	496	2	9
ALDH12	ALDH12A1	HORVU1Hr1G080320	AAL70106.1	551	1	15
ALDH18	ALDH18B1	HORVU1Hr1G072780	DAA80496.1	496	1	19
	ALDH18B2	HORVU3Hr1G085760	BAK07077.1	826	3	20
ALDH22	ALDH22A1	HORVU2Hr1G016040	BAK01829.1	564	2	14

Tab. 10 Aldehyddehydrogenasová (ALDH) nadrodina v kukuřici (*Zea mays*). Proteinové sekvence ALDH byly staženy na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> a <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, odkud bylo i odečteno množství aminokyselin, číslo chromozomu a počet exonů. Sekvence byly porovnány v BioEditu a rozděleny do rodin podle Brockera et al. (2013); při rozčleňování nebyly použity ALDH pro kukuřici a rýži.

Rodina	Název genu	Phytozome ID	NCBI ID	Počet AMK	Číslo chromozomu	Počet exonů
ALDH2	ALDH2B1	GRMZM2G058675_T02	NP_001105891.1	549	9	11
	ALDH2B5	GRMZM2G125268_T01	AAL99614.2	550	4	9
	ALDH2C1	GRMZM2G071021_T01	PWZ30284.1	502	3	7
	ALDH2C2	GRMZM2G122172_T01	XP_008649134.1	516	6	8
	ALDH2C2	GRMZM2G097706_T03	NP_001105047.1	511	3	8
ALDH3	ALDH3E1	GRMZM2G169458_T01	AAR21278.1	485	5	10
	ALDH3E2	GRMZM2G155502_T04	NP_001151141.1	452	10	8
	ALDH3H1	GRMZM2G103546_T02	NP_001152171.1	420	10	8
	ALDH3H2	GRMZM2G060800_T01	NP_001355011.1	487	4	10
	ALDH3H3	GRMZM2G118800_T01	NP_001168661.1	487	2	10
ALDH5	ALDH5F1	GRMZM2G128114_T03	XP_008643578.1	493	5	19
	ALDH5F2	GRMZM2G119482_T01	XP_020407172.1	527	4	11
ALDH6	ALDH6B1	GRMZM2G001898_T01	NP_001142146.1	400	7	13
ALDH7	ALDH7B6	GRMZM2G130440_T02	ACN34604.1	509	2	14
ALDH10	ALDH10A5	GRMZM2G135470_T01	ACF87737.1	506	10	15
	ALDH10A9	GRMZM2G016189_T01	NP_001105781.2	506	1	15
ALDH11	ALDH11A3	GRMZM2G035268_T03	NP_001105589.2	498	4	9

Tab. 10 Aldehyddehydrogenasová (ALDH) nadrodina v kukuřici (*Zea mays*). Proteinové sekvence ALDH byly staženy na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> a <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, odkud bylo i odečteno množství aminokyselin, číslo chromozomu a počet exonů. Sekvence byly porovnány v BioEditu a rozděleny do rodin podle Brockera et al. (2013); při rozčleňování nebyly použity ALDH pro kukuřici a rýži (*pokračování*).

Rodina	Název genu	Phytozome ID	NCBI ID	Počet aminokyselin	Číslo chromozomu	Počet exonů
ALDH12	ALDH12A1	GRMZM2G090087_T03	XP_008649934.1	457	6	12
ALDH18	ALDH18B1	GRMZM2G375504_T01	NP_001306625.1	717	8	20
	ALDH18B2	GRMZM2G028535_T01	AQK99427.1	731	8	21
ALDH22	ALDH22A1	GRMZM2G135341_T01	NP_001106059.2	593	7	15

Tab. 11 Aldehyddehydrogenasová (ALDH) nadrodina v rýži (*Oryza sativa*). Proteinové sekvence ALDH byly staženy na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> a <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, odkud bylo i odečteno množství aminokyselin, číslo chromozomu a počet exonů. Sekvence byly porovnány v BioEditu a rozděleny do rodin podle Brockera et al. (2013); při rozčleňování nebyly použity ALDH pro kukuřici a rýži.

Rodina	Název genu	Phytozome ID	NCBI ID	Počet aminokyselin	Číslo chromozomu	Počet exonů
ALDH2	ALDH2B1	LOC_Os06g15990	XP_015643334.1	549	6	11
	ALDH2B5	LOC_Os02g49720.1	XP_015625448.1	583	2	9
	ALDH2C1	LOC_Os01g40860	XP_015618943.1	502	1	8
	ALDH2C2	LOC_Os01g40870	XP_015621533.1	507	1	9
	ALDH2C3	LOC_Os06g39230	XP_015641595.1	423	6	8
ALDH3	ALDH3E1	LOC_Os02g43194	XP_015623875.1	487	6	10
	ALDH3E2	LOC_Os04g45720	XP_015635925.1	499	4	9
	ALDH3E3	LOC_Os02g43280	XP_015623591.1	491	2	10
	ALDH3H1	LOC_Os12g07810	XP_015618174.1	484	12	10
	ALDH3H2	LOC_Os11g08300	XP_015617047.1	482	11	10

Tab. 11 Aldehyddehydrogenasová (ALDH) nadrodina v rýži (*Oryza sativa*). Proteinové sekvence ALDH byly staženy na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> a <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, odkud bylo i odečteno množství aminokyselin, číslo chromozomu a počet exonů. Sekvence byly porovnány v BioEditu a rozděleny do rodin podle Brockera et al. (2013); při rozčleňování nebyly použity ALDH pro kukuřici a rýži (*pokračování*).

Rodina	Název genu	Phytozome ID	NCBI ID	Počet aminokyselin	Číslo chromozomu	Počet exonů
ALDH5	ALDH5F1	LOC_Os02g07760	XP_015627266.1	527	2	20
ALDH6	ALDH6B1	LOC_Os07g09060	XP_015647227.1	534	7	19
ALDH7	ALDH7B6	LOC_Os09g26880	XP_015611835.1	509	9	14
ALDH10	ALDH10A5	LOC_Os04g39020	XP_015637091.1	505	4	15
	ALDH10A9	LOC_Os08g32870	XP_015650889.1	503	8	15
ALDH11	ALDH11A3	LOC_Os08g34210	XP_015650252.1	499	8	9
ALDH12	ALDH12A1	-	XP_015639257.1	550	5	-
ALDH18	ALDH18B1	LOC_Os05g38150	XP_015640176.1	716	5	19
	ALDH18B2	LOC_Os01g62900	XP_015622203.1	735	1	20
ALDH22	ALDH22A1	LOC_Os07g48920	XP_015647804.1	597	7	14

4.2 Klonování ječmenné aldehyddehydrogenasy rodiny 22

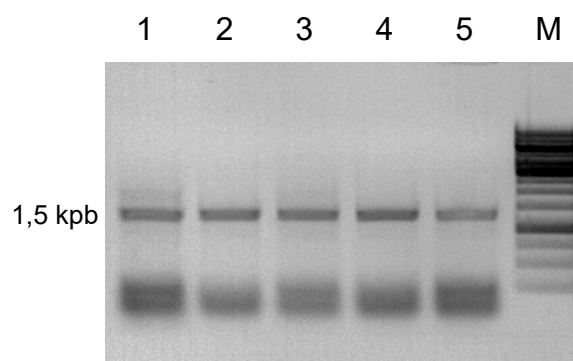
Teplota annealingu při amplifikaci *HvALDH22* byla stanovena na 59,5 °C pro forward primer 1 a 59,6 °C pro forward primer 2.

Úspěšnost transformace kompetentních buněk plazmidem pET28a s insertem *HvALDH22* byla provedena pomocí PCR reakce se specifickými T7 primery, s produkty PCR reakce byla provedena agarosová elektroforéza (Obr. 11). Neboť je přibližná velikost insertu *HvALDH22* 1,5 kbp, vzorky kolonií, jež obsahovaly pásy s touto velikostí, byly poslány na osekvenování (byly vybrány kolonie 1, 3, 5, 7 a 9). Forward primer 1 se ukázal jako lépe navržený, tedy více specifický a plazmidy s *HvALDH22* amplifikované pomocí něj častěji obsahovaly správně zaligovaný insert. Forward primer 2 méně často poskytoval pásy v oblasti 1,5 kbp, plazmid se často uzavíral na prázdno.

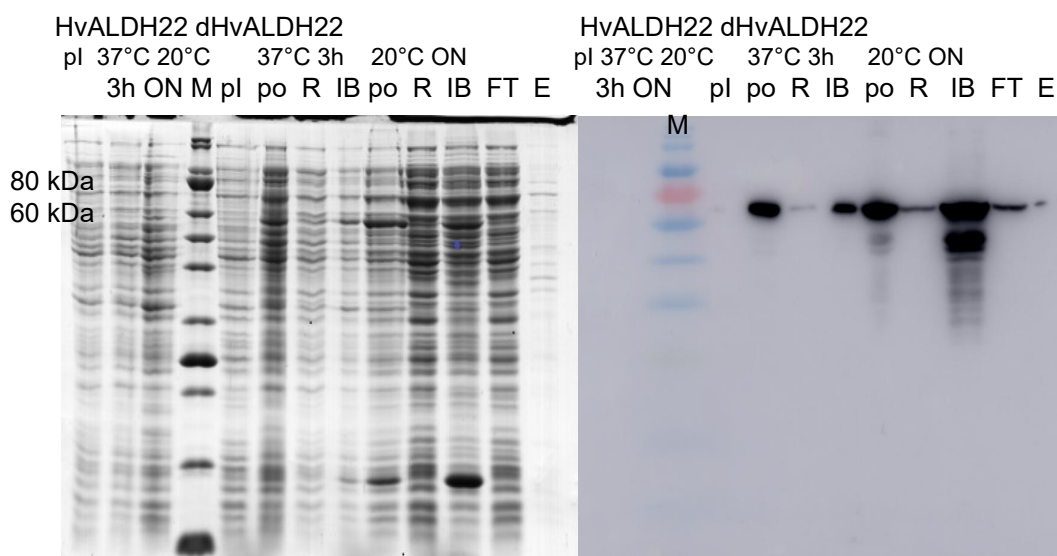
4.3 Optimalizace exprese a purifikace ječmenné aldehyddehydrogenasy rodiny 22

Expres *HvALDH22* (obsahující signální sekvenci) se výrazně nespustila ani při kultivaci 4 h na 30 °C, ani při 20 °C přes noc, tyto transformované buňky tedy nelze použít pro produkci proteinu.

Rekombinantní proteiny byly detekovány až po odstranění signální sekvence, tedy u vzorků d*HvALDH22*. Při použití pufru Tris-HCl pH 8 proběhla exprese d*HvALDH22* nejlépe při inkubaci při 20 °C přes noc (Obr. 12). Jelikož zůstávala stále značná část d*HvALDH22* v inkluzních tělíkách, byl při dalších purifikacích pro jejich rozbití



Obr. 11 Elektroferogram na ověření úspěšnosti vložení ječmenné aldehyddehydrogenasy rodiny 22 (*HvALDH22*) do kompetentních buněk *Escherichia coli* NEB 5-*a*. Úspěšnost transformace byla ověřena pomocí PCR se specifickými T7 primery (pro plazmid) s vybranými koloniemi. Při PCR amplifikaci *HvALDH22* v cDNA byl použit forward primer 1, který oproti forward primeru 2 častěji poskytoval správně zaligovaný insert. Očekávaná velikost insertu je asi 1,5 kbp. Vysvětlivky: M = marker.

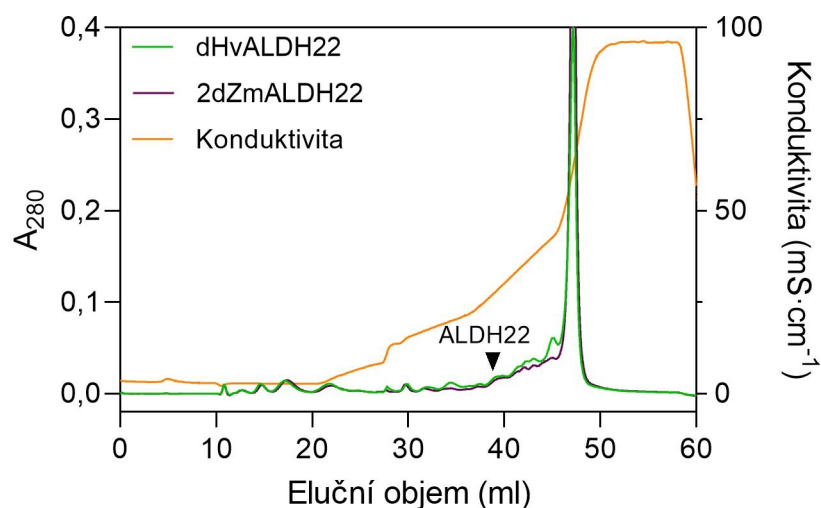


Obr. 12 Elektroferogram a membrána po následném Western-blottu optimalizace exprese aldehyddehydrogenasy rodiny 22 z ječmene (HvALDH22); předpokládaná molekulová hmotnost ALDH22 je asi 80 kDa. Vzorky před spuštěním exprese jsou označeny „pl“, vzorky po spuštění exprese „po“. Po spuštění exprese byly kultury inkubovány buď 4 h při 30 °C, nebo přes noc (ON) při 20 °C. Při purifikaci byly sbírány vzorky inkluzních tělísek (IB), rozpustné fáze (R, tedy to, co bylo nanášeno na kolonku), flow-trough frakce (FT, tedy to, co se nezachytilo na kolonce) a eluce (E, tedy roztok vypurifikovaného proteinu). Při purifikaci byl použit pufr Tris-HCl pH 8. Vysvětlivky: dHvALDH22 = aldehyddehydrogenasa rodiny 22 s vyššípnutou částí signální sekvence; HvALDH22 = aldehyddehydrogenasa se signální sekvencí.

navolen na One Shot desintegrátoru vyšší tlak (místo 27 kpsi navoleno 33 kpsi) a poté byl přidán lysosym.

Navíc byl Tris-HCl pH 8 nahrazen pufrém HEPES pH 8,5, neboť v jeho přítomnosti bylo uvolněno více dHvALDH22 do rozpustné fáze, odkud mohl být purifikován. Preference pufrů HEPES pH 8,5 a 8,0 byla ověřena i pomocí Western-blottu. I když byla specifická aktivita proteinu dostatečná, značnou část se nepodařilo zachytit na kolonce – kolonka buď nebyla dostatečně ekvilibrována, nebo se protein špatně skládal a ne všechny His-tag se tak dostal do kontaktu s mobilizovanými Co^{2+} ionty.

Při stanovování specifické aktivity byl protein přečištěn pomocí iontoměničové chromatografie, frakce byly sbírány v různých časových intervalech a byla ověřena jejich aktivita. Nejvyšší aktivitu vykazovala frakce opouštějící kolonu s elučním objemem 38 – 40 ml (Obr. 13).



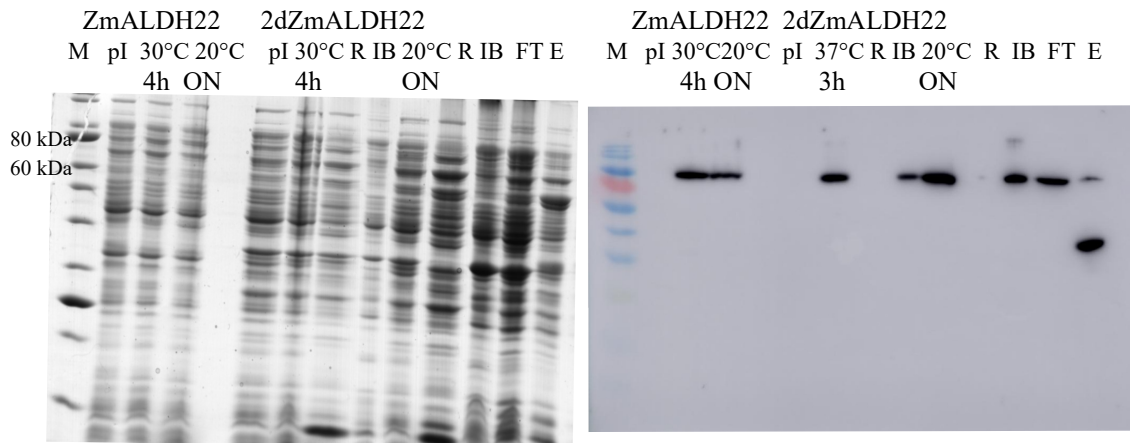
Obr. 13 Iontoměničová chromatografie pro přečištění zakoncentrovaného eluovaného roztoku aldehyddehydrogenasy rodiny 22 z ječmene (dHvALDH22) nebo kukuřice (2dZmALDH22). Přítomnost ALDH22 byla detekována měřením absorbance při 280 nm, SDS-PAGE a ověřením aktivity vzorků s různým elučním objemem. Gradient iontové síly byl vytvořen pomocí NaCl, v grafu je vynesena změna konduktivity, charakterizující uvolňování NaCl z kolony. Nejvyšší aktivitu v rámci sbíraných vzorků vykazovaly ty s elučním objemem 38 – 40 ml.

4.4 Optimalizace exprese a purifikace kukuřičné aldehyddehydrogenasy rodiny 22

Nejprve byla ověřena úspěšnost spuštění exprese přidavkem $0,5\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ IPTG ke kulturám dodaných transformovaných buněk (Tab. 1). K nejvýraznější expresi *ZmALDH22* došlo u 2dZmALDH22 v pET32b (kmen *E. coli* BL21), k dobré expresi pak také u *dZmALDH22* v pCDFDuetu-1 (kmen *E. coli* BL21) a 2dZmALDH22 v pET32b (v Rosetách).

Když byl součástí resuspendačního pufru při extrakci Tris-HCl pH 8, většina ALDH22 zůstala v inkluzních tělískách, proto byl ověřen vliv dalších pufrů na extrakci, a to MES pH 6,5; fosfátový pufr pH 7 a HEPES pH 8,5. Nicméně u těchto pH zůstávalo v inkluzních tělískách téměř vše, proto byl při extrakci a purifikaci použit pufr Tris-HCl pH 8.

Pro ověření produkce rekombinantního proteinu *ZmALDH22* byly vzorky detekovány pomocí Western-blott analýzy, byla použita primární protilátka s myším anti-His-tagem a sekundární protilátka s anti-myším IgG (Obr. 14). Exprese *ZmALDH22* v pET32b probíhala úspěšněji během inkubace při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 4 h. Exprese



Obr. 14 Elektroferogram a membrána po následném Western-blottu optimalizace exprese aldehyddehydrogenasy rodiny 22 z kukuřice (*ZmALDH22*); předpokládaná molekulová hmotnost ALDH22 je asi 80 kDa. Vzorky před spuštěním exprese jsou označeny „pI“, vzorky po spuštění exprese „po“. Po spuštění exprese byly kultury inkubovány buď 4 h při 30 °C, nebo přes noc (ON) při 20 °C. Při purifikaci byly sbírány vzorky inkluzních tělísek (IB), rozpustné fáze (R, tedy to, co bylo nanášeno na kolonku), flow-trough frakce (FT, tedy to, co se nezachytilo na kolonce) a eluce (E, tedy roztok vypurifikovaného proteinu). Při purifikaci byl použit pufr Tris-HCl pH 8 a byly použity transformavé buňky *E. coli* kmen BL21. Vysvětlivky: 2dZmALDH22 = aldehyddehydrogenasa rodiny 22 s vyšší podílem signální sekvence; HvALDH22 = aldehyddehydrogenasa se signální sekvencí.

2dALDH22 v pET32b probíhala úspěšněji při inkubaci při 20 °C přes noc, nicméně u obou způsobů zůstávala výrazná část v inkluzních tělíscích. Na koloně se podařilo zachytit pouze část proteinu, je možné že ne všechny protein se skládal správně, což mohlo negativně ovlivnit dostupnost histidinové kotvy. Navíc protein nebyl příliš stabilní, během eluce a zakoncentrování na patronách Centricon docházelo k jeho rozpadu, přesto byl při kinetických používán při měření aktivity, neboť vykazoval dostatečnou aktivitu.

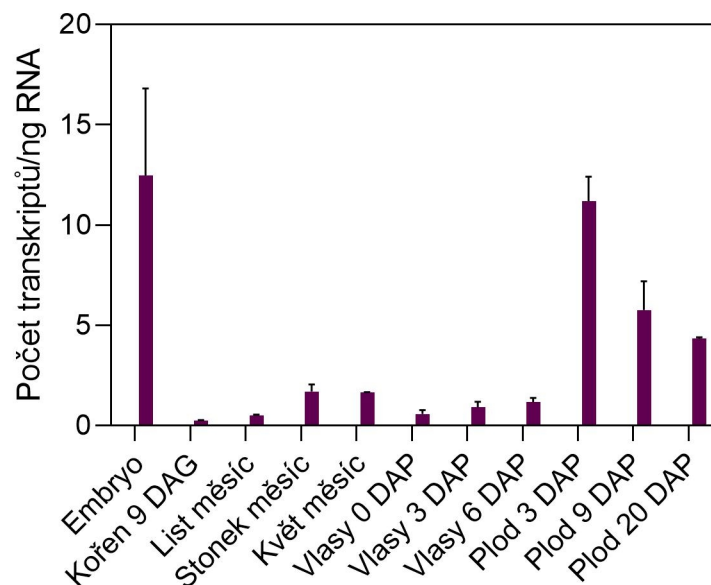
Při stanovování specifické aktivity *2dZmALDH22* byl vzorek přečištěn pomocí iontoměničové chromatografie. Stejně jako u *dHvALDH22* nejvyšší aktivitu vykazovala frakce opouštějící kolonu s elučním objemem 38 – 40 ml (Obr. 13).

4.5 Real-Time PCR

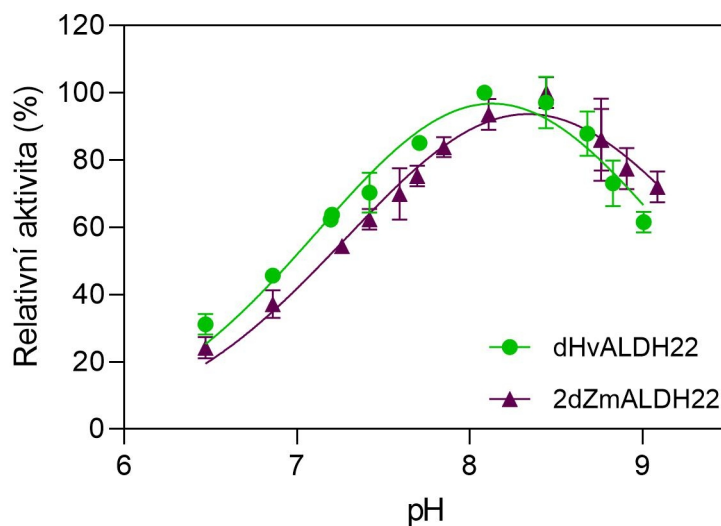
Nejvyšší míra exprese *ZmALDH22* byla zaznamenána v embryu a v plodu, kde klesala v čase. Přibližně pětina exprese byla zjištěna ve stonku a v květu (Obr. 15).

4.6 pH optimum

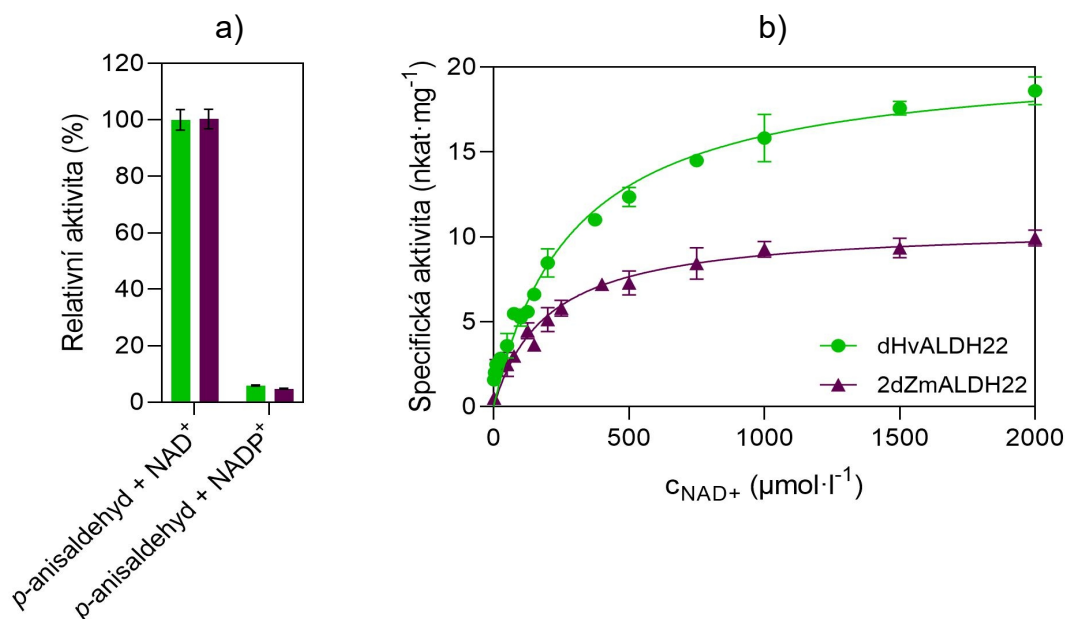
Hodnota pH optima byla pro *dHvALDH22* stanovena na $8,13 \pm 0,042$ a pro



Obr. 15 Expresní profil genu pro aldehyddehydrogenasu rodiny 22 z kukuřice (ZmALDH22), izolovaného z různých pletiv rostliny. Hodnoty prahu (C_T) byly stanoveny porovnáním s elongačním faktorem EF1 α a β -aktinem. Jako chybová úsečka je vynesena ± 1 směrodatná odchylka z měření v triplicátu. Vysvětlivky: DAG = dny po vyklíčení (day after germination); DAP = dny po opylení (day after pollination).



Obr. 16 Stanovení pH optima pro aldehyddehydrogenasu rodiny 22 z ječmene (dHvALDH22) a kukuřice (2dZmALDH22). Hodnota pH optima byla pro dHvALDH22 stanovena na $8,13 \pm 0,042$ a pro 2dZmALDH22 na $8,33 \pm 0,046$. Relativní hodnoty aktivit jsou vyneseny vzhledem k absolutní aktivitě v hodnotě pH optima; absolutní hodnoty v bodě pH optima jsou pro dHvALDH22 $17,7 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ a pro 2dZmALDH22 $9,35 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$. Pro pH 6,5 – 7,2 byly použity fosfocitrátové pufrы; pro pH 6,8 – 8,1 pufrы Tris-HCl a pro pH 8,6 – 9,1 pufrы glycin-NaOH. pH optimum bylo stanovováno v reakční směsi $75 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ pufru; $1,5 \text{ mM NAD}^+$ a $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ *p*-anisaldehydu. Jako chybová úsečka je vynesena ± 1 směrodatná odchylka z měření v triplicátu.



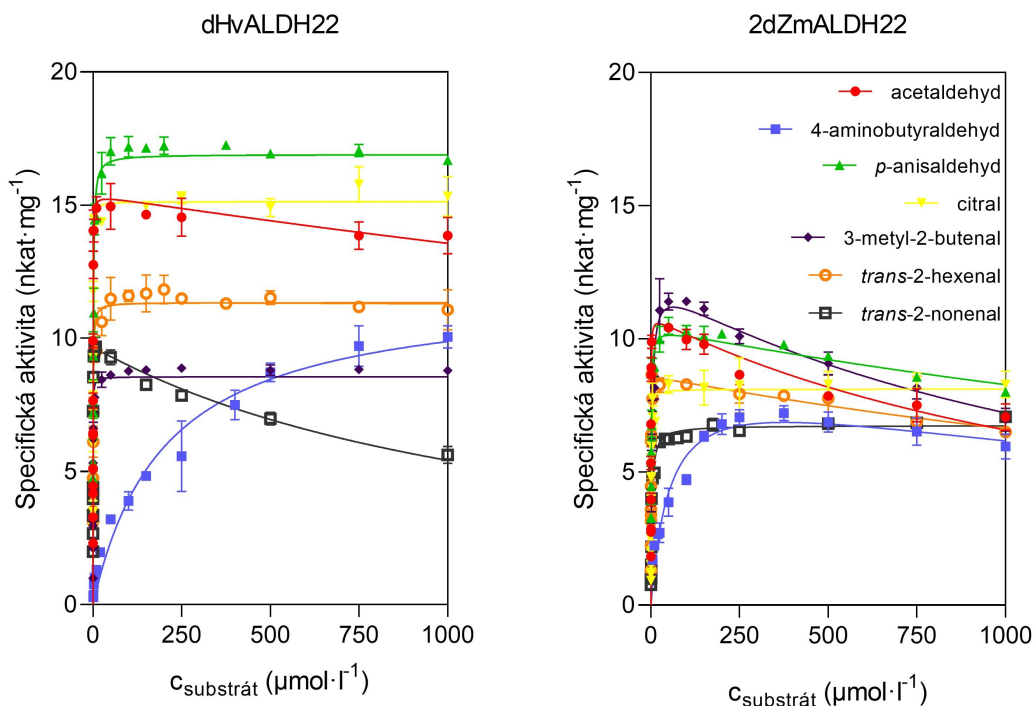
Obr. 17 Porovnání preference koenzymů aldehyddehydrogenasou rodiny 22 (ALDH22) (a) a saturační křivka NAD⁺ s ALDH22 z ječmene (dHvALDH22) a kukuřice (2dZmALDH22). Substrátová specifita pro koenzymy byla stanovována v reakční směsi 75mmol·l⁻¹ pufru (HEPES pH 8,1 pro dHvALDH22 nebo HEPES pH 8,3 pro 2dZmALDH22); 1,5mM NAD(P)⁺ a 500μmol·l⁻¹ *p*-anisaldehydu. Saturační křivka NAD⁺ byla měřena za stejných podmínek s výjimkou koncentrace NAD⁺, která byl zvolena v rozmezí 1 – 2000 μmol·l⁻¹. Jako chybová úsečka je vynesena ± 1 směrodatná odchylka z měření v duplikátu.

2dZmALDH22 na $8,33 \pm 0,046$ (Obr. 16). Při hodnotách pH menších než 6,5 a vyšších než 9,1 docházelo ke kalení reakční směsi, tyto hodnoty tedy nemohly být změřeny; pravděpodobně docházelo ke srážení enzymu nebo substrátu.

Porovnáním aktivity rekombinantního enzymu v pufru Tris-HCl a HEPES byl pozorován vzestup aktivity o 25 % při použití HEPES pH 8,1 nebo 8,3; proto byl při dalších kinetických měřeních používán HEPES. Na základě měření pH optima byl při stanovování specifické aktivity pro dHvALDH22 používán pufr HEPES pH 8,1 a pro 2dZmALDH22 HEPES pH 8,3.

4.7 Substrátová specifita

Substrátová specifita byla stanovována s aminoaldehydy, alifatickými aldehydy, aromatickými aldehydy a cukry (Obr. 18). Pro většinu substrátů byl pozorován podobný trend aktivit pro oba enzymy, aktivity v přítomnosti 500μmol·l⁻¹ substrátu se výrazně lišily například pro fenylacetaldehyd, 3-metyl-2-butenal nebo nonanal. 2dZmALDH22



Obr. 19 Saturační křivky aldehyddehydrogenasy rodiny 22 z ječmene (dHvALDH22) a kukuřice (2dZmALDH22) s vybranými substráty. Saturační křivky byly měřeny v reakční směsi $75\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pufru (HEPES pH 8,1 pro dHvALDH22 nebo HEPES pH 8,3 pro 2dZmALDH22); $1,5\text{mM}$ NAD^+ a substrátů v různé koncentraci tak, aby byly změřeny specifické aktivity při alespoň 3 různých koncentracích substrátu pod hodnotou K_m . Jako chybová úsečka je vynesena ± 1 směrodatná odchylka z měření v duplikátu nebo triplikátu.

Tab. 12 Tabulka vyhodnocených kinetických parametrů pro aldehyddehydrogenasu rodiny 22 z ječmene (dHvALDH22) a kukuřice (2dZmALDH22). Substráty byly vybrány na základě substrátové specifity s ohledem na 2dZmALDH22, neboť byla méně aktivní. Ke stanoveným hodnotám je přiřazena ± 1 směrodatná odchylka z měření z duplikátu nebo triplikátu.

substrát	dHvALDH22		2dZmALDH22	
	V_{lim} ($\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	V_{lim} ($\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
acetaldehyd	$15,4 \pm 0,25$	$0,217 \pm 0,013$	$10,9 \pm 0,23$	$0,274 \pm 0,021$
4-aminobutyraldehyd	$11,9 \pm 0,65$	202 ± 32	$8,80 \pm 0,51$	$53,3 \pm 8,3$
<i>p</i> -anisaldehyd	$16,9 \pm 0,32$	$0,811 \pm 0,22$	$10,4 \pm 0,30$	$0,811 \pm 0,11$
citral	$15,1 \pm 0,17$	$0,206 \pm 0,013$	$8,11 \pm 0,14$	$0,512 \pm 0,055$
3-metyl-2-butenal	$8,58 \pm 0,12$	$0,206 \pm 0,17$	$12,2 \pm 0,30$	$2,78 \pm 0,26$
<i>trans</i> -2-hexenal	$11,3 \pm 0,17$	$0,503 \pm 0,049$	$8,62 \pm 0,20$	$0,201 \pm 0,18$
<i>trans</i> -2-nonenal	$9,71 \pm 0,15$	$0,134 \pm 0,13$	$6,75 \pm 0,096$	$2,60 \pm 0,22$

5 DISKUZE

Při fylogenetické analýze (Obr. 10) byly zjištěny celkem tři podrodiny ALDH22, které respektují rozdělení podříše zelené rostliny. ALDH22 byla při potvrzena u organismů z teoretické části, které byly dostupné v databázi, navíc byly nalezeny všechny ALDH22 podle Brockera et al. (2013), oproti například Woodovi a Duffovi (2009) byla nalezena ALDH22 i u řasy *Chlamydomonas reinhardtii*, což ale může souviset se starším datem článku. Jelikož byla ALDH22 zjištěna u zelených řas i suchozemských rostlin, vyvinula se již před přechodem rostlin z vody na souš, tedy minimálně před 445 miliony let (Archibald 2017), což potvrzují i Wood a Duff (2009), Zhang et al. (2012), Jimenez-Lopez et al. (2016b) nebo Jiang et al. (2019).

Nadrodina ALDH zatím nebyla v ječmeni popsána, nicméně byly potvrzeny všechny významné rostlinné rodiny (Tab. 9; Jimenez-Lopez et al. 2010; Brocker et al. 2013; Hou a Bartels 2015). Tabulka ALDH nadrodiny pro kukuřici (Tab. 10) obsahuje jiný počet podrodin ZmALDH6 a ZmALDH10 oproti Brockerovi et al. (2013). Tabulka ALDH nadrodiny pro rýži (Tab. 11) se shoduje s Jimenezem-Lopezem et al. (2010) a Brockerem et al. (2013); oproti Kotchonimu et al. (2010) obsahuje méně podrodin OsALDH11 a OsALDH12. Jako nejdelší ALDH pro řasy, kaprad'orosty i krytosemenné rostliny nachází Jimenez-Lopez et al. (2010) i Brocker et al. (2013) ALDH18, což se shoduje s proběhnutou analýzou. Je možné, že ne všichni členové rodiny ALDH byly již popsáni, tudíž se v budoucnu může jejich počet změnit.

Nejvyšší exprese *ALDH22* byla zjištěna v embryu a v plodu; Huang et al. (2008) vysokou expresi *ALDH22* v embryu nepozoroval, u pylu ovšem ano a vysokou expresi *ALDH22* v plodu zaznamenal i Gautam et al. (2019). Třetí nejvyšší exprese byla zaznamenána v květu a stonku, kde ji ve vyšší míře zjistil i Huang et al. (2008), Gao a Han (2009), Zhu et al. (2014) nebo Gautam et al. (2019); oproti výsledkům Huanga et al. (2008) a Gaa a Hana (2009) je zjištěná exprese *ALDH22* ve stonku nízká. Na základě experimentálně získaných dat by se tedy mohla *ALDH22* podílet na metabolických procesech důležitých při embryogenezi a produkty její reakce by mohly být důležité pro plod a květ.

Hodnoty pH optima byly stanoveny na $8,13 \pm 0,042$ pro ječmen a $8,33 \pm 0,046$ pro kukuřici (Obr. 16), podobně vysoká hodnota pH byla určena pro matrix mitochondrie jako 8,1 či pro peroxisom jako 8,4 (Shen et al. 2013), kam ovšem

ALDH22 na základě signální sekvence nebyla zatím predikována, nebo také stroma chloroplastu jako 8,0 (Hauser et al. 1995). Do plastidů nebo chloroplastů predikují ALDH22 Huang et al. (2008) a Tian et al. (2015). Na základě analýzy signální sekvence je ALDH22 nejčastěji predikována do endoplazmatického retikula a sekreční dráhy (Gao a Han 2009; Jimenez-Lopez et al. 2010; Jimenez-Lopez et al. 2016b; Guo et al. 2017); pH samotného endoplazmatického retikula je $7,4 \pm 0,2$; Golgiho aparátu $6,2 \pm 0,4$ a zralých sekrečních granul $5,5 \pm 0,4$ (Wu et al. 2001). ALDH22 by tedy mohla být přítomna v endoplazmatickém retikulu, kde by dosahovala přibližně 70-80 % stanovené maximální aktivity. Dong et al. (2017), Hou a Bartels (2015) a Zhu et al. (2014) lokalizují ALDH22 do cytoplazmy, kde je pH přibližně 7,3 (Chan a Warwicker 2009).

ALDH22 je NAD^+ -dependentní enzym (Obr. 17b), jež má širokou substrátovou specifitu (Obr. 18) podobně jako ALDH1 (Wang et al. 2009) nebo ALDH2 (Končítíková et al. 2015). Preference *p*-anisaldehydu oproti ostatním substrátům byla u dHvALDH22 výraznější, protože u její saturační křivky s *p*-anisaldehydem oproti saturační křivce 2dZmALDH22 s *p*-anisaldehydem nebyla pozorována inhibice substrátem. I když byly s *p*-anisaldehydem stanoveny nejvyšší specifické aktivity mezi $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ substráty, z poměru V_{lim}/K_m vyplývá, že acetaldehyd, *trans*-2-nonenal, citral a 3-metyl-2-butenal jsou pro ALDH22 výrazně lepší substráty (Tab. 13). dHvALDH22 má nejvyšší afinitu k *trans*-2-nonenalu a *p*-anisaldehyd přeměňuje nejrychleji; 2dZmALDH22 má

Tab. 13 Poměr V_{lim}/K_m pro jednotlivé aldehydy, s nimiž byly stanovovány kinetické parametry s aldehyddehydrogenasou rodiny 22 z ječmene (dHvALDH22) a kukuřice (2dZmALDH22). Poměr V_{lim}/K_m odráží katalytickou účinnost, s níž je substrát ALDH22 přeměňován. Jako referenční substrát byl zvolen *p*-anisaldehyd, vůči němuž byla porovnávána i substrátová specifita a s nímž vykazovaly enzymy nejvyšší aktivitu mezi $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ substráty.

substrát	dHvALDH22	2dZmALDH22
acetaldehyd	3,40	3,88
4-aminobutyraldehyd	0,00283	0,00340
<i>p</i> -anisaldehyd	1,00	1,00
citral	3,54	3,07
3-metyl-2-butenal	2,00	4,58
<i>trans</i> -2-hexenal	1,08	1,33
<i>trans</i> -2-nonenal	3,48	3,91

nejvyšší afinitu k 3-metyl-2-butenalu a nejrychleji přeměňuje *trans*-2-hexenal. ALDH22 není výrazně zapojena v metabolismu aminoaldehydů nebo cukrů, i když je schopna je v menší míře přeměňovat.

U aminoaldehydů, 3-metyl-2-butenalu, nonanalů nebo *trans*-2-nonenalů byly rozdíly v aktivitě výrazné. Jelikož jsou zkoumané ADLH22 ze dvou organismů, nemusí být jejich substrátové specifity v překryvu, podobně jako tomu je u ALDH10 z rajčete a kukuřice (Kopečný et al. 2013) a například různé isoformy ALDH2 dokonce vykazovaly různou substrátovou specifitu mezi sebou (Končítíková et al. 2015). Pouze acetaldehyd byl inhibován HvALDH22 i ZmALDH22.

U saturačních křivek byla často pozorována inhibice substrátem (Obr. 19), což je nekompetitivní typ reversibilní inhibice, která je způsobena vazbou druhé molekuly substrátu ke komplexu enzym-substrát (Bisswanger 2008). I když ji Cook a Cleland (2007) přiřazují spíše reakcím, které nejsou fyziologické, substrátová inhibice je jednou z možných regulací aktivity enzymů (Bisswanger 2008; Cornish-Bowden 2012), potvrzených u řady fyziologických procesů (Nakashima et al. 1999; Svedružíc a Reich 2005; Colletier et al. 2006). 2dZmALDH22 byla substráty častěji inhibována než dHvALDH22, což může být způsobeno rozdílností organismů, z nichž byla ALDH22 klonována.

Poněvadž ALDH22 s vysokou specifitou přeměňovala aromatické substráty, mohla by být zapojena v fenylypropanoidové dráze. Nejdůležitějším produktem fenylypropanoidové dráhy je lignin, v jeho biosyntéze by mohla být v menší míře zapojena ALDH22, neboť je exprimována ve stonku. Aldehydicke produkty fenylypropanoidové dráhy mají většinou výrazné aroma a podílí se tak na vůni. Významná exprese *ADLH22* byla potvrzena v plodech a květech, ALDH22 by tak mohla být zapojena v regulaci vůně rostliny (Heldt et al. 2011; Gleason a Chollet 2012). Je pravděpodobné, že transkripce *ALDH22* (Obr. 15) klesá v čase v plodu, aby nebyly degradovány vonné látky, které vznikají během dozrávání.

ALDH22 účinně přeměňovala různé produkty lipoxygenasové dráhy jako *trans*-2-hexenal, heptanal nebo nonanal (Obr. 18), navíc *trans*-2-nonenal s velmi vysokou katalytickou účinností (Obr. 19). Exprese lipoxygenas během klíčení (Melan et al. 1994) může vysvětlovat zvýšenou expresi *ALDH22* v embryu. Aldehydy vzniklé reakcí lipoxygenas s mastnými kyselinami jsou přítomny v mnohých plodech a podílejí

se na jejich vůni (Plotto et al. 1998; Jouquand et al. 2008; Rohloff et al. 2009), vysoká exprese *ALDH22* byla zjištěna i v plodech kukuřice a ječmene. Lipoxygenasy jsou mj. lokalizovány i v cytoplazmě (Tranbarger et al. 1991) nebo chloroplastech (Feussner et al. 1995), kam je *ALDH22* predikována podle signální sekvence (Huang et al. 2008; Dong et al. 2017).

ALDH obecně podílí na detoxifikaci organismu přeměnou aldehydů na příslušné karboxylové kyseliny (Yoshida et al. 1998; Brocker et al. 2013) a *ALDH22* by mohla být zapojena v oxidaci toxického acetaldehydu vznikajícího při etanolovém kvašení v cytosolu, vysoce aktivním u klíčících zrn (Mellema et al. 2002; Kodíček et al. 2015). Acetaldehyd se váže na důležité proteiny, a tím je inhibuje, embryo je na acetaldehyd obecně citlivější než dospělá rostlina (Perata a Alpi 1991). Exprese *ALDH22* byla zjištěna nejvyšší právě v embryu, navíc acetaldehyd byl přeměňován s vysokou katalytickou účinností u obou *ALDH22* (Tab. 13).

Zajímavé je, že *ALDH22* s vysokou katalytickou účinností (Tab. 13) přeměňovala i citral, který sice v rostlinném embryu nebývá přítomen, nicméně i on inhibuje vývoj semene (Dudai et al. 2000). Jelikož vysoká míra exprese *ALDH22* byla zaznamenána u plodů kukuřice (Obr. 15), *ALDH22* by mohla být zapojena v regulaci množství citralu zejména v citrusových plodech nebo citronové trávě (Lota et al. 2002, Chanthai et al. 2012), kde byla *ALDH22* potvrzena (Obr. 10). Podílení se na regulaci citralu je podpořeno fakty, že prekurzor citralu je biosyntetizován v chloroplastech (Dong et al. 2013), kam je odhadována přítomnost *ALDH22* podle pH optima, Schattat et al. (2011) navíc potvrzuje výměnu metabolitů mezi chloroplasty a endoplazmatickým retikulem, kam je naopak *ALDH22* nejčastěji predikována podle signální sekvence (Gao a Han 2009).

Pro 2dZm*ALDH22* byl nejlepším substrátem 3-metyl-2-butenal (Tab. 13), vznikající irreversibilní degradací cytokinů enzymem cytokininoxidasou/dehydrogenasou (Buchanan et al. 2015), která je ve většině organismů lokalizována v sekreční dráze (Schmülling et al. 2003), kam bývá *ALDH22* často predikována podle signální sekvence (Gao a Han 2009). Cytokininy iniciují buněčné dělení, kontrolují diferenci buněk, a ovlivňují kvetení a tvorbu plodů (Buchanan et al. 2015), což koresponduje se zvýšenou expresí *ALDH22* v embryu, plodu, květu a stonku.

Jelikož ALDH22 zatím nebyla potvrzena u bakterií (Riveros-Rosas et al. 2019), je pravděpodobné, že je specifická pro rostliny a nebude potvrzena u živočichů, neboť ALDH bakterií a lidí vykazují vysokou podobnost (Yoshida et al. 1998; Vasiliou a Nebert 2005). Toto tvrzení je potvrzeno faktem, že ALDH22 přeměňuje substráty charakteristické pro rostliny, jako jsou prekurzory fenylpropanoidové dráhy, citral nebo produkty lipoxygenasové dráhy.

6 ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše se zaměřením na ALDH22 a aldehydy, v jejichž metabolismu by mohla být ALDH22 zapojena. Byla provedena fylogenetická analýza ALDH22 napříč zelenými řasami, mechorosty a vyššími rostlinami. Byla provedena kvantitativní PCR pro ověření exprese *ALDH22* v různých pletivech ječmene a kukuřice.

HvALDH22 byla úspěšně naklonována a exprimována, ZmALDH22 byla úspěšně exprimována. Rekombinantní protein byl purifikován ve dvou krocích, a to pomocí afinitivní chromatografie a následně pomocí iontové výměnné chromatografie. Rekombinantní ALDH22 byla dále charakterizována; bylo určeno pH optimum, byla stanovena substrátová specifita a kinetické parametry K_m a V_{lim} pro vybrané substráty. Substrátová specifita i míra katalytické účinnosti pro vybrané substráty se mezi HvALDH22 a ZmALDH22 podobala.

Podle substrátové specifity, katalytické účinnosti pro vybrané substráty a kvantitativní PCR je předpokládáno, že ALDH22 podílí na detoxikaci acetaldehydu během embryonálního vývoje a ovlivňuje množství vonných látek v květu a hlavně v plodu.

7 LITERATURA

- ACHNINE, Lahoucine, BLANCAFLOR, Elison B., RASMUSSEN, Susanne a DIXON, Richard A. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*. 2004, **16**(11), 3098–3109. ISSN 10404651.
- ADEWUNMI, Yetunde, NAMJILSUREN, Sanchirmaa, WALKER, Dalia N., AMATO, William D., AMATO, Douglas V., MARVODI, Olga V., PATTON, Derek L. a MARVODI, Dmitri V. The antimicrobial activity and cellular pathway targeted by *p*-anisaldehyde and epigallocatechin gallate in opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020, **86**(4), 2482–2491.
- AKHILA, Anand. Biosynthetic relationship of citral-*trans* and citral-*cis* in *cymbopogon flexuosus* (lemongrass). *Phytochemistry*. 1985, **24**(11), 2585–2587. ISSN 00319422.
- ANDREWS, Elizabeth S., THEIS, Nina a ADLER, Lynn S.. Pollinator and herbivore attraction to *Cucurbita floral* volatiles. *Journal of Chemical Ecology*. 2007, **33**(9), 1682–1691. ISSN 00980331.
- ARCHIBALD, John. *1 + 1 = 1: rovnice života a symbiotická @evoluce*. Přeložil J. Lhotský. Praha: Vyšehrad, 2017. Spektrum, svazek 3. ISBN 978-80-7429-817-2.
- ATCG: *Phyml*. [Citováno 5.4.2020]. Dostupné z <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>.
- AWAL, Howlader M.A., YOSHIDA, Izumi, DOE, Matsumi a HIRASAWA, Eiji. 3-Aminopropionaldehyde Dehydrogenase of Millet Shoots. *Phytochemistry*. 1995, **40**(2), 393–395. ISSN 00319422.
- BAI, Jinhe, BALDWIN, Elizabeth, PLOTTO, Anne, MANTHEY, John A., MCCOLLUM, Gregory, IREY, Mike a LUZIO, Gary. Influence of Harvest Time on Quality of „Valencia“ Oranges and Juice. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 2009, **122**(5), 308–315.
- BAUMANN, Melissa G.D., LORENZ, Linda F., BATTERMAN, Stuart A. a ZHANG, Guo-Zheng. Aldehyde emission from particleboard and medium density fiberboard products. *Forest Products Journal*. 2000, **50**(9), 75–82.
- BERTRAND, Brad, BOULANGER, Rosalie, DUSSERT, Stuart, RIBEYRE, Frank, BERTHIOT, Leslie, DESCROIX, Frédéric a JOËT, Thomas. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green *Arabica coffee* bean as well as coffee beverage quality. *Food Chemistry*. 2012, **135**(4), 2575–2583. ISSN 03088146.
- BERG, Jeremy M., TYMOCZKO, John L., STRYER, Lubert a CLARKE, Neil D. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2002. XXXVIII. 974 s. ISBN 0716746840.
- BESTETTI, Giuseppina, Patrizia D.I., COLMEGNA, Andrea, RONCO, Ilaria, GALLI, Enrica a SELLO, Guido. Characterization of styrene catabolic pathway in *Pseudomonas uorescens* ST. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2004, **54**(6), 183–187.
- BISSWANGER, Hans. *Enzyme kinetics: principles and methods*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. XVIII. ISBN 9783527319572.
- BLANK, Imre, SEN, Alina a GROSCH, Werner. Potent odorants of the roasted powder and brew of Arabica coffee. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 1992, **195**(3), 239–245. ISSN 14382385.
- BOATRIGT, Jennifer, NEGRE, Florence, CHEN, Xinlu, KISH, Christine M., WOOD, Barbara, PEEL, Greg, ORLOVA, Irina, GANG, David, RHODES, David a DUDAREVA, Natalia. Understanding in vivo benzenoid metabolism in *petunia petal* tissue. *Plant Physiology*. 2004, **135**(4), 1993–2011. ISSN 00320889.
- BOLARÍN, María C., SANTA-CRUZ, Ana, CAYUELA, Encarna a PÉREZ-ALFOCEA, Fernando. Short-term Solute Changes in Leaves and Roots of Cultivated and Wild Tomato Seedlings Under Salinity. *Journal of Plant Physiology*. 1995, **147**(3), 463–468. ISSN 01761617.
- BROCKER, Chad, VASILIOU, Melpomene, CARPENTER, Sarah, CARPENTER, Christopher,

- ZHANG, Yucheng, WANG, Xiping, KOTCHONI, Simeon O., WOOD, Andrew J., KIRCH, Hans Hubert, KOPEČNÝ, David, NEBERT, Daniel W. a VASILIOU, Vasilis. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: Gene nomenclature and comparative genomics. *Planta*. 2013, **237**(1), 189–210. ISSN 00320935.
- BUCHANAN, Bob B., GRUISSEM Wilhelm a JONES Russell L. 2nd ed. *Biochemistry & molecular biology of plants*. 2nd ed. Chichester: Wiley Blackwell. 2015. XV. ISBN 978-0-470-71421-8.
- BUTZENLECHNER, Maria, ROSSMANN, Andrew a SCHMIDT, Helene. Assignment of Bitter Almond Oil to Natural and Synthetic Sources by Stable Isotope Ratio Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1989, **37**(2), 410–412. ISSN 15205118.
- CAMACHO, Susana, MICHLIG, Stephanie, DE SENARCLENS-BEZENÇON, Carole, MEYLAN, Jenny, MEYSTRE, Julie, PEZZOLI, Maurizio, MARKRAM, Henry a LE COUTRE, Johannes. Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of cinnamaldehyde via altered ghrelin secretion and functional impact on food intake and gastric emptying. *Scientific Reports*. 2015, **5**(7919). ISSN 20452322.
- CHAMKHA, Mohamed, LABAT, Marc, PATEL, Bharat K.C. a GARCIA, Jean-Louis. Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001, **51**(6), 2049–2054. ISSN 14665026.
- CHAN, Pedro a WARWICKER, Jim. Evidence for the adaptation of protein pH-dependence to subcellular pH. *BMC Biology*. 2009, **7**(69). ISSN 17417007.
- CHANTHAI, Saksit, PRACHAKOLL, Sujitra, RUANGVIRIYACHAI, Chalerm a LUTHRIA, Devanand L. Influence of extraction methodologies on the analysis of five major volatile aromatic compounds of citronella grass (*Cymbopogon nardus*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) grown in Thailand. *Journal of AOAC International*. 2012, **95**(3), 763–772. ISSN 10603271.
- CHOLEWA, Ewa, CHOLEWINSKI, Andrzej J., SHELPI, Barry J., SNEDDEN, Wayne A. a BOWN, Alan W., 1997. Cold-shock-stimulated γ -aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic Ca^{2+} , not by an increase in cytosolic H^{+} . *Canadian Journal of Botany*. 1997, **75**(3), 375–382. ISSN 00084026.
- COOK, Paul F. a CLELAND William W. *Enzyme kinetics and mechanism*. London: Garland Science, 2007. XXII. ISBN 9780815341406.
- CORNISH-BOWDEN, Athel. *Fundamentals of enzyme kinetics*. 4th ed. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2012. XVIII. 498 s. ISBN 978-3-527-33074-4.
- COLLETIER, Jacques P., FOURNIER, Didier, GREENBLATT, Harry M., STOJAN, Jure, SUSSMAN, Joel L., ZACCAI, Giuseppe, SILMAN, Israel a WEIK, Martin. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *The EMBO Journal*. 2006, **25**(12), 2746–2756. ISSN 02614189.
- DONG, Lemeng, MIETTINEN, Karel, GOEDBLOED, Miriam, VERSTAPPEN, Francel W.A., VOSTER, Alessandra, JONGSMA, Maarten A., MEMELINK, Johan, van der KROL, Sander a BOUWMEESTER, Harro J., 2013. Characterization of two geraniol synthases from *Valeriana officinalis* and *Lippia dulcis*: Similar activity but difference in subcellular localization. *Metabolic Engineering*. 2013, **20**(1), 198–211. ISSN 10967184.
- DONG, Yating, LIU, Hui, ZHANG, Yi, HU, Jiahui, FENG, Jiyu, LI, Cong, LI, Cheng, CHEN, Jinhong a ZHU, Shuijin. Comparative genomic study of ALDH gene superfamily in *Gossypium*: a focus on *Gossypium hirsutum* under salt stress. *PLoS ONE*. 2017, **12**(5). ISSN 19326203.
- DORMONT, Loïse, DELLE-VEDOVE, Renée, BESSIÈRE, Julienne a SCHATZ, Baise. Floral scent emitted by white and coloured morphs in orchids. *Phytochemistry*. 2014, **100**(4), 51–59. ISSN 00319422.
- DUDAI, Nativ, LARKOV, Olga, PUTIEVSKY, Eli, LERNER, Henri R., RAVID, Uzi, LEWINSOHN, Efraim a MAYER, Alfred M. Biotransformation of constituents of essential oils by germinating wheat seed. *Phytochemistry*. 2000, **55**(5), 375–382.

ISSN 00319422.

- EDRIS, Amr E., CHIZZOLA, Remigus a FRANZ, Chlodwig. Isolation and characterization of the volatile aroma compounds from the concrete headspace and the absolute of *Jasminum sambac* (L.) Ait. (Oleaceae) flowers grown in Egypt. *European Food Research and Technology*. 2008, **226**(3), 621–626. ISSN 14382377.
- ENCINAS-BASURTO, David, VALENZUELA-QUINTANAR, María I., SÁNCHEZ-ESTRADA, Alberto, TIZNADO-HERNÁNDEZ, Martín E., RODRÍGUEZ-FÉLIX, Armida a TRONCOSO-ROJAS, Rosalba. Alterations in volatile metabolites profile of fresh tomatoes in response to *Alternaria alternata* (Fr.) keissl. 1912 infection. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2017, **77**(3), 194–201. ISSN 07185839.
- FEUSSNER, Ivo, HAUSE, Bettina, VÖRÖS, Kirsten, PARTHIER, Benno a WASTERNAK, Claus. Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplast of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *The Plant Journal*. 1995, **7**(6), 949–957.
- FILIPIAK, Wojciech, SPONRING, Andreas, BAUR, Maria M., AGER, Clemens, FILIPIAK, Anna, WIESENHOFER, Helmut, NAGL, Markus, TROPPEMAYER, Jakob a AMANN, Anton. Characterization of volatile metabolites taken up by or released from *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by using GC-MS. *Microbiology (United Kingdom)*. 2012, **158**(12), 3044–3053. ISSN 13500872.
- FLORES, Hector E. a FILNER, Philip. Polyamine catabolism in higher plants: Characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regulation*. 1985, **3**(3), 277–291. ISSN 01676903.
- FRANKEL, Erwin N. *Lipid oxidation*. 2nd ed. Calgary: Oily Press, 2005. ISBN 9780953194988.
- GAO, Chenxi a HAN, Bin. Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in rice (*Oryza sativa*). *Gene*. 2009, **431**(1), 86–94. ISSN 03781119.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, Mari C., MÁRQUEZ-RUIZ, Gloria, FONTECHA, Javier a GORDON, Michael H. Volatile oxidation compounds in a conjugated linoleic acid-rich oil. *Food Chemistry*. 2009, **113**(4), 926–931. ISSN 03088146.
- GAUTAM, Ranjana, AHMED, Israr, SHUKLA, Pawan, MEENA, Rajesh K. a KIRTI, Peter. Genome-wide characterization of ALDH Superfamily in *Brassica rapa* and enhancement of stress tolerance in heterologous hosts by BrALDH7B2 expression. *Scientific Reports*. 2019, **9**(7012), 1–13. ISSN 20452322.
- GEORGILOPOULOS, Dimitris N. a GALLOIS, Annie N., 1987. Volatile flavour compounds in heated blackberry juices. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. **185**(4), 299–306. ISSN 00443026.
- GESTETNER, Benjamin a CONN, Eric E. The 2-hydroxylation of *trans*-cinnamic acid by chloroplasts from *Melilotus alba* desr. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1974, **163**(2), 617–624. ISSN 10960384.
- GHORBANI GORJI, Sara, CALINGACION, Mariafe, SMYTH, Heather E. a FITZGERALD, Melissa. Comprehensive profiling of lipid oxidation volatile compounds during storage of mayonnaise. *Journal of Food Science and Technology*. 2019, **56**(9), 4076–4090. ISSN 09758402.
- GIRARD, Benjamin a KOPP, Theodore G. Physicochemical Characteristics of Selected Sweet Cherry Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, **46**(2), 471–476. ISSN 00218561.
- GLEASON, Florence K. a CHOLLET, Raymond. *Plant biochemistry*. 1st ed. Sudbury: Jones & Bartlett Learning, 2012. 240 s. XIII. ISBN 978-1-4496-2866-6.
- GUPTA, Ashish K. a GANJEWALA, Deepak. A study on biosynthesis of “citral” in lemongrass (*C. flexuosus*) cv. Suvarna. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015, **37**(11). ISSN 01375881.
- GUTIERREZ, Andrea, CAMELO, Léon, PRIETO, Antoine, MARTINEZ, Martin J. a MARTINEZ, Alexander. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Applied and*

- Environmental Microbiology*. 1994, **60**(6), 1783–1788. ISSN 00992240.
- HALL, Mélanie, HAUER, Bernhard, STUERMER, Rainer, KROUTIL, Wolfgang a FABER, Kurt. Asymmetric whole-cell bioreduction of an α,β -unsaturated aldehyde (citral): competing prim-alcohol dehydrogenase and C-C lyase activities. *Tetrahedron Asymmetry*. 2006, **17**(21), 3058–3062. ISSN 09574166.
- HAN, Dongfei, KURUSARTTRA, Somwang, RYU, Ji Y., KANALY, Robert A. a HUR, Hor Gil. Production of natural fragrance aromatic acids by coexpression of *trans*-anethole oxygenase and *p*-anisaldehyde dehydrogenase genes of *Pseudomonas putida* JYR-1 in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012a, **60**(48), 11972–11979. ISSN 00218561.
- HAN, Dongfei, RYU, Ji Y., KANALY, Robert A. a HUR, Hor G.. Isolation of a gene responsible for the oxidation of *trans*-anethole to *para*-anisaldehyde by *Pseudomonas putida* JYR-1 and its expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012b, **78**(15), 5238–5246. ISSN 00992240.
- HASSAN, Maizom, MAAROF, Nur D., ALI, Zainon M., NOOR, Normah M., OTHMAN, Roohaida a MORI, Nobuhiro. Monoterpene alcohol metabolism: Identification, purification, and characterization of two geraniol dehydrogenase isoenzymes from *Polygonum minus* leaves. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2012, **76**(8), 1463–1470. ISSN 09168451.
- HAUSER, Matthias, EICHELMANN, Hillar, OJA, Vello, HEBER, Ulrich a LAISK, Agu. Stimulation by light of rapid pH regulation in the chloroplast stroma in vivo as indicated by CO₂ solubilization in leaves. *Plant Physiology*. 1995, **108**(3), 1059–1066. ISSN 00320889.
- HELDT, Hans-Walter, PIECHULLA, Birgit a HELDT, Fiona . *Plant biochemistry*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2011. XXIV. ISBN 978-0-12-384986-1.
- HEMPEL, John, PEROZICH, John, CHAPMAN, Toby, ROSE, John, BOESCH, Josette, LIU, Zhi-jie, LINDAHL, Ronald a WANG, Bi-cheng. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. 7. vyd. Boston: Springer, 1999. ISBN 978-1-4613-7146-5.
- HILL, Chester A., HARRIS, Richard C., KIM, Henry J., HARRIS, Brian D., SALE, Craig, BOOBIS, Leslie H., KIM, Cong K. a WISE, Jane A. Influence of β -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids*. 2007, **32**(2), 225–233. ISSN 09394451.
- HORVAT, Robert J., CHAPMAN, Glen W., ROBERTSON, James A., MEREDITH, Francis, SCORZA, Rick, CALLAHAN, Andrea a MORGENS, Peter. Comparison of the Volatile Compounds from Several Commercial Peach Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1990, **38**(1), 234–237. ISSN 15205118.
- HOU, Quancan a BARTELS, Dorothea. Comparative study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in the glycophyte *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema halophytes*. *Annals of Botany*. 2015, **115**(3). ISSN 10958290.
- HRAZDINA, Geza a WAGNER, George J. Metabolic pathways as enzyme complexes: Evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985, **237**(1), 88–100. ISSN 10960384.
- HUANG, Weizao, MA, Xinrong, WANG, Qilin, GAO, Yongfeng, XUE, Ying, NIU, Xiangli, YU, Guirong a LIU, Yongsheng. Significant improvement of stress tolerance in tobacco plants by overexpressing a stress-responsive aldehyde dehydrogenase gene from maize (*Zea mays*). *Plant Molecular Biology*. 2008, **68**(4), 451–463. ISSN 01674412.
- HUBER, Franz K., KAISER, Roman, SAUTER, William a SCHIESTL, Florian P. Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). *Oecologia*. 2005, **142**(4), 564–575. ISSN 00298549.
- IJIMA, Yoko, KOEDUKA, Takao, SUZUKI, Hideyuki a KUBOTA, Kikue Biosynthesis of geraniol, a potent aroma compound in ginger rhizome (*Zingiber officinale*): Molecular cloning and characterization of geraniol dehydrogenase. *Plant Biotechnology*. 2014,

- 31(5)**, 525–534. ISSN 13476114.
- IMAI, Toshihiro, MAEKAWA, Michihide a TSUCHIYA, Satoshi, 2002. Attractiveness of *p*-anisaldehyde to the varied carpet beetle, *Anthrenus verbasci* (L.) (*Coleoptera: Dermestidae*). *Applied Entomology and Zoology*. 2002, **37(4)**, 505–508. ISSN 00036862.
- ISHIDA, Taoko, TOYOTA, Miyomi a ASAKAWA, Yu. Terpenoid biotransformation in mammals. V. Metabolism of (+)-citronellal, (+/-)-7-hydroxycitronellal, citral, (-)-perillaldehyde, (-)-myrtenal, cuminaldehyde, thujone and (+/-)-carvone. *Xenobiotica*. 1989, **19(8)**, 843–855.
- ITO, Michiho, TOYODA, Mariko, NAKANO, Yayoi, KIUCHI, Fumiyuki a HONDA, Gisho. Chemical composition of essential oils from *perilla setoyensis*, a new species of wild perilla in Japan. *Journal of Essential Oil Research*. 1999, **11(6)**, 669–672. ISSN 10412905.
- JARVIS, Andrew P., SCHAAF, Otmar a OLDHAM, Neil J. 3-Hydroxy-3-Phenylpropanoic Acid Is an Intermediate in the Biosynthesis of Benzoic Acid and Salicylic Acid But Benzaldehyde Is Not. *Planta*. 2000, **212(1)**, 119–126. ISSN 00320935.
- JIANG, Xin, REN, Ji, YE, Xueling, LIU, Mingfeng, LI, Qingqing, WANG, Li a LIU, Zhiyong. Genome-wide identification and analysis of aldehyde dehydrogenase gene Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Canadian Journal of Plant Science*. 2019, **99(4)**, 259–275.
- JIMENEZ-LOPEZ, Jose C. Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) functional identification and characterization of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily. *Plant Gene*. 2016a, **6(2)**, 67–76. ISSN 23524073.
- JIMENEZ-LOPEZ, Jose C., GACHOMO, Emma W., SEUFFERHELD, Manfredo J. a KOTCHONI, Simeon O. The maize ALDH protein superfamily: Linking structural features to functional specificities. *BMC Structural Biology*. 2010, **10(43)**. ISSN 14726807.
- JIMENEZ-LOPEZ, Jose C., LOPEZ-VALVERDE, Francisco J., ROBLES-BOLIVAR, Paula, LIMA-CABELLO, Elena, GACHOMO, Emma W. a KOTCHONI, Simeon O. Genome-wide identification and functional classification of tomato (*Solanum lycopersicum*) aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily. *PLoS ONE*. 2016b, **11(10)**. ISSN 19326203.
- JOUQUAND, Céline, CHANDLER, Craig, PLOTTO, Anne a GOODNER, Kevin. A sensory and chemical analysis of fresh strawberries over harvest dates and seasons reveals factors that affect eating quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2008, **133(6)**, 859–867. ISSN 00031062.
- KAKARLA, Shalini a GANJEWALA, Deepak. Antimicrobial Activity of Essential Oils of Four Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud) Varieties. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 2009, **3(1)**, 107–109.
- KAMINAGA, Yasuhisa, SCHNEPP, Jennifer, PEEL, Greg, KISH, Christine M., BEN-NISSAN, Gili, WEISS, David, ORLOVA, Irina, LAVIE, Orly, RHODES, David, WOOD, Karl, PORTERFIELD, D. Marshall, COOPER, Arthur J.L., SCHLOSS, John V., PICHERSKY, Eran, VAINSTEIN, Alexander a DUDAREVA, Natalia. Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, **281(33)**, 23357–23366. ISSN 00219258
- KESZLER, Ágnes, KRISKA, Tamás a NÉMETH, András. Mechanism of volatile compound production during storage of sunflower oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, **48(12)**, 5981–5985. ISSN 00218561.
- KIRCH, Hans-Hubert, BARTELS, Dorothea, WEI, Yanling, SCHNABLE, Patrick S. a WOOD, Andrew J. The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*. 2004, **9(8)**, 371–377. ISSN 13601385.
- KODÍČEK, Milan, VALENTOVÁ, Olga a HYNEK, Radovan. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 1 st ed. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. XII.

ISBN 978-80-7080-927-3.

- KONČITÍKOVÁ, Radka, VIGOUROUX, Armelle, KOPEČNÁ, Martina, ANDREE, Tomáš, BARTOŠ, Jan, ŠEBELA, Marek, MORÉRA, Solange a KOPEČNÝ, David. Role and structural characterization of plant aldehyde dehydrogenases from family 2 and family 7. *Biochemical Journal*. 2015, **468**(1), 109–123. ISSN 14708728.
- KOOLMAN, Jan a RÖHM, Klaus-Heinrich. *Barevný atlas biochemie*. Přeložil V. BENDA, M. VEJRAŽKA. Praha: Grada Publishing, 2012. XIV. 498 s. ISBN 978-80-247-2977-0.
- KOPEČNÝ, David, KONČITÍKOVÁ, Radka, TYLICOVÁ, Martina, VIGOUROUX, Armelle, MOSKALÍKOVÁ, Hana, SOURAL, Miroslav, ŠEBELA, Marek a MORÉRA, Solange. Plant ALDH10 family identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, **288**(13), 9491–9507. ISSN 00219258.
- KOSCHIER, Elisabeth H., DE KOGEL, Willem J. a VISSER, Hans J. Assessing the attractiveness of volatile plant compounds to western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Chemical Ecology*. 2000, **26**(12), 2643–2655. ISSN 00980331.
- KOTCHONI, Simeon O., JIMENEZ-LOPEZ, Jose C., GAO, Dongying, EDWARDS, Vincent, GACHOMO, Emma W., MARGAM, Venu M. a SEUFFERHELD, Manfredo J. Modeling-dependent protein characterization of the rice aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily reveals distinct functional and structural features. *PLoS ONE*. 2010, **5**(7). ISSN 19326203.
- LE GUEN, Sing, PROST, Carol a DEMAIMAY, Mélanie. Characterization of odorant compounds of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 2000, **896**(2), 361–371. ISSN 00219673.
- LEÓN, José, SHULAEV, Vladimir, YALPANI, Nasser, LAWTON, Michael A. a RASKIN, Ilya. Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995, **92**(22), 10413–10417. ISSN 00278424.
- LI, Xiaoqin, GUO, Rongrong, LI, Jun, SINGER, Stacy D., ZHANG, Yucheng, YIN, Xiangjing, ZHENG, Yi, FAN, Chonghui a WANG, Xiping. Genome-wide identification and analysis of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013, **71**(8), 268–282. ISSN 09819428.
- LINDAHL, Ronald. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1992, **27**(4–5), 283–335. ISSN 10409238.
- LONG, Michael C., NAGEGOWDA, Dinesh A., KAMINAGA, Yasuhisa, Ki HO, Kwok, KISH, Christine M., SCHNEPP, Jennifer, SHERMAN, Debra, WEINER, Henry, RHODES, David a DUDAREVA, Natalia. Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis. *Plant Journal*. 2009, **59**(2), 256–265. ISSN 09607412.
- LÓPEZ, María O., DE LA HOZ, Lorenzo, CAMBERO, María I., GALLARDO, Emiliano, REGLERO, Guillermo a ORDÓÑEZ, Juan A. Volatile compounds of dry hams from Iberian pigs. *Meat Science*. 1992, **31**(3), 267–277. ISSN 03091740.
- LOTA, Marie-Laure, DE ROCCA SERRA, Dominique, TOMI, Félix, JACQUEMOND, Camille a CASANOVA, Joseph. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(4), 796–805. ISSN 00218561.
- LÜDDEKE, Frauke, WÜLFING, Annika, TIMKE, Markus, GERMER, Frauke, WEBER, Johanna, DIKFIDAN, Aytac, RAHNFIELD, Tobias, LINDER, Dietmar, MEYERDIERKS, Anke a HARDER, Jens. Geraniol and geraniol dehydrogenases induced in anaerobic monoterpene degradation by *Castellaniella defragrans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, **78**(7), 2128–2136. ISSN 00992240.
- MARCHITTI, Satori A., BROCKER, Chad, STAGOS, Dimitrios a VASILIOU, Vasilis. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: The aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert*

- Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2008, **4**(6), 697–720. ISSN 17425255.
- MATSUI, Toshiro, GUTH, Helmut a GROSCH, Werner. A comparative study of potent odorants in peanut, hazelnut, and pumpkin seed oils on the basis of aroma extract dilution analysis (AEDA) and gas chromatography-olfactometry of headspace samples (GCOH). *Lipid - Fett*. 1998, **100**(2), 51–56. ISSN 09315985.
- MAYER, Randall R., CHERRY, Joe H. a RHODES, David. Effects of heat shock on amino acid metabolism of cowpea cells. *Plant Physiology*. 1990, **94**(2), 796–810. ISSN 00320889.
- MELAN, Melissa. A., ENRIQUEZ, Anette L.D. a PETERMAN, Kaye T. The LOX1 gene of *Arabidopsis* is temporally and spatially regulated in germinating seedlings. *Plant Physiology*. 1994, **105**(1), 385–393. ISSN 00320889.
- MELLEMA, Stefan, EICHENBERGER, Waldemar, RAWYLER, André, SUTER, Marianne, TADEGE, Million a KUHLEMEIER, Cris. The ethanolic fermentation pathway supports respiration and lipid biosynthesis in tobacco pollen. *The Plant Journal*. 2002, **30**(3), 329–336. ISSN 09607412.
- MESTER, Tünde, SWARTS, Henk J., ROMERO, André, SOLÉ, Sílvia I., DE BONT, Jan A.M. a FIELD, Jim A. Stimulation of aryl metabolite production in the basidiomycete *Bjerkandera* sp. strain BOS55 with biosynthetic precursors and lignin degradation products. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, **63**(5), 1987–1994. ISSN 00992240.
- MOLEYAR, Venkataramana a NARASIMHAM, Pattisapu. Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*. 1992, **16**(4), 337–342. ISSN 01681605.
- MUSCLE: *Multiple Sequence Alignment*. [Citováno 5.4.2020]. Dostupné z <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>.
- NAKASHIMA, Akira, MORI, Keiji, SUZUKI, Takahiro, KURITA, Hideki, OTANI, Motohiko, NAGATSU, Toshiaru a OTA, Akira. Dopamine inhibition of human tyrosine hydroxylase type 1 is controlled by the specific portion in the N-terminus of the enzyme. *Journal of Neurochemistry*. 1999, **72**(5), 2145–2153. ISSN 00223042.
- NOGE, Koji, KATO, Makiko, IGUCHI, Tsuyoshi, MORI, Naoki, NISHIDA, Ritsuo a KUWAHARA, Yasumasa. Biosynthesis of Neral in *Carpoglyphus lactis* (Acari: Carpocephidae) and Detection of Its Key Enzyme, Geraniol Dehydrogenase, by Electrophoresis. *Journal of the Acarological Society of Japan*. 2005, **14**(2), 75–81. ISSN 0918-1067.
- OKAMOTO, Kenji, NARAYAMA, Shinji, KATSUO, Akihisa, SHIGEMATSU, Ichirou a YANASE, Hideshi. Biosynthesis of *p*-anisaldehyde by the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, **93**(2), 207–210. ISSN 13891723.
- OLIVARES, Alicia, NAVARRO, José L. a FLORES, Mónica. Establishment of the contribution of volatile compounds to the aroma of fermented sausages at different stages of processing and storage. *Food Chemistry*. 2009, **115**(4), 1464–1472. ISSN 03088146.
- OTTENHOF, Harald H., ASHURST, Jennifer L., WHITNEY, Heather M. S., SALDANHA, Adrian, SCHMITZBERGER, Florian, GWEON, Hyun S., BLUNDELL, Tom L., ABELL, Chris a SMITH, Alison G. Organisation of the pantothenate (vitamin B5) biosynthesis pathway in higher plants. *Plant Journal*. 2004, **37**(1), 61–72. ISSN 09607412.
- PARANAGAMA, Paliki A., WIMALASENA, Siene, JAYATILAKE, Goidre S., JAYAWARDENA, Auliware L., SENANAYAKE, Uyakami M. a MUBARAK, Aamidi M. A comparison of essential oil constituents of bark, leaf, root and fruit of cinnamon (*cinnamomum zeylanicum blum*) grown in Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*. 2001, **29**(3–4), 147–153. ISSN 13914588.
- PERATA, Pierdomenico a ALPI, Amedeo. Ethanol-induced injuries to carrot cells: The role of acetaldehyde. *Plant Physiology*. 1991, **95**(3), 748–752. ISSN 00320889.
- PHILLIPS, Michael, CATANEO, Renee N., DITKOFF, Beth A., FISHER, Peter,

- GREENBERG, Joel, GUNAWARDENA, Ratnasiri, KWON, Stephan C., TIETJE, Olaf a WONG, Cynthia. Prediction of breast cancer using volatile biomarkers in the breath. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2006, **99**(1), 19–21. ISSN 01676806.
- PINGOUD, Alfred, URBANKE, Claus, HOGGETT, Joseph G. a JELTSCH, Albert. *Biochemical methods: a concise guide for students and researchers*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. XIII. ISBN 3-527-30299-9.
- PINO, Jorge A., ROSADO, Aristides a FUENTES, Victor. Composition of the essential oil of *melissa officinalis* L. From Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. 1999, **11**(3), 363–364. ISSN 10412905.
- PLOTTO, Anne, MATTHEIS, James P., LUNDAHL, David S. a MCDANIEL, Mina R. Validation of Gas Chromatography Olfactometry Results for „Gala" Apples by Evaluation of Aroma Active Compound Mixtures. *Flavor Analysis*. 1998, **750**(1), 290–302. ISSN 00976156.
- POULTON, Jonathan E. Localization and catabolism of cyanogenic glycosides. *Novartis Foundation Symposium*. 1988, **140**(3), 67–91.
- PRASAD, Vinnakota G. N. V., KRISHNA Bobba V., SWAMY Parasa L., RAO Thumati S. a RAO Srinivasa G. Antibacterial synergy between quercetin and polyphenolic acids against bacterial pathogens of fish. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014, **4**(1), 326–329. ISSN 22221808.
- Protein BLAST: search protein databases using a protein query*. [Citováno 5.4.2020]. Dostupné z <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>.
- QUIJANO, Cendrique a PINO, José A. Volatile compounds of capsicum frutescens L. Cultivars from Colombia. *Journal of Essential Oil Research*. 2010, **22**(6), 503–506. ISSN 10412905.
- RAPIOR, Sylvie, BREHERET, Sophie, TALOU, Thierry, PÉLISSIER, Yves a BESSIÈRE, Jean M. The anise-like odor of *Clitocybe odora*, *Lentinellus cochleatus* and *Agaricus essettei*. *Mycologia*. 2002, **94**(3), 373–376. ISSN 00275514.
- RIVEROS-ROSAS, Héctor, JULIÁN-SÁNCHEZ, Adriana, MORENO-HAGELSIEB, Gabriel a MUÑOZ-CLARES, Rosario A. Aldehyde dehydrogenase diversity in bacteria of the *Pseudomonas* genus. *Chemico-Biological Interactions*. 2019, **304**(3), 83–87. ISSN 18727786.
- ROCHAT, Sabine a CHAINTREAU, Alain. Carbonyl odorants contributing to the in-oven roast beef top note. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, **53**(24), 9578–9585. ISSN 00218561.
- RODRIGUES, Vera M., ROSA, Paulo T.V., MARQUES, Marcia O.M., PETENATE, Ademir J. a MEIRELES, Angela A. Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum* L) using CO₂: Solubility, kinetics, and composition data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(6), 1518–1523. ISSN 00218561.
- ROHLOFF, Jens, NESTBY, Rolf, NES, Arnfinn a MARTINUSSEN, Inger, 2009. Volatile profiles of european blueberry : few major players, but complex aroma patterns. *Latvian Journal of Agronomy*. 2009, (12), 98–103.
- RUZSANYI, Veronika, MOCHALSKI, Pawel, SCHMID, Alex, WIESENHOFER, Helmut, KLIEBER, Martin, HINTERHUBER, Hartmann a AMANN, Anton, 2012. Ion mobility spectrometry for detection of skin volatiles. *Journal of Chromatography B*. 2012, **911**(5), 84–92. ISSN 15700232.
- SANGTHONG, Sindomi, SUKSABYE, Pang a THIRAVETYAN, Pytiye. Air-borne xylene degradation by *Bougainvillea buttiana* and the role of epiphytic bacteria in the degradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2016, **126**(5), 273–280. ISSN 10902414.
- SARRAZIN, Elise, DUBOURDIEU, Denis a DARRIET, Philippe. Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chemistry*. 2007, **103**(2), 536–545. ISSN 03088146.
- SATO-MASUMOTO, Naoko a MICHIHO, Ito. Two types of alcohol dehydrogenase from

- Perilla can form citral and perillaldehyde. *Phytochemistry*. 2014, **104**(8), 12–20.
- SCHATTAT, Martin, BARTON, Kiah, BAUDISCH, Bianca, KLÖSGEN, Ralf B. a MATHUR, Jaideep. Plastid stromule branching coincides with contiguous endoplasmic reticulum dynamics. *Plant Physiology*. 2011, **155**(4), 1667–1677. ISSN 00320889.
- SCHIEBERLE, Peter. The role of free amino acids present in yeast as precursors of the odorants 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine in wheat bread crust. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1990, **191**(3), 206–209. ISSN 00443026.
- SCHILLING, Boris. *Handbook of Odor*. 1. vyd. Dordrecht: Springer, 2017. ISBN 9783319269306.
- SCHMÜLLING, Thomas, WERNER, Tomáš, RIEFLER, Michael, KRUPKOVÁ, Eva a Y MANNS, Elena B. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research*. 2003, **116**(3), 241–252. ISSN 09189440.
- SCHULBACH, Kurt F., ROUSEFF, Ray L. a SIMS, Cynthia. Relating Descriptive Sensory Analysis to Gas Chromatography/Olfactometry Ratings of Fresh Strawberries Using Partial Least Squares Regression. *Journal of Food Science*. 2004, **69**(7), 273–277.
- SEKIWA-IIJIMA, Yoko, AIZAWA, Yoko a KUBOTA, Kikue. Geraniol Dehydrogenase Activity Related to Aroma Formation in Ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, **49**(4), 5902–5906.
- SHEN, Jinbo, ZENG, Yonglun, ZHUANG, Xiaohong, SUN, Lei, YAO, Xiaoqiang, PIMPL, Peter a JIANG, Liwen. Organelle pH in the arabidopsis endomembrane system. *Molecular Plant*. 2013, **6**(5), 1419–1437. ISSN 17529867.
- SHIMIZU, Nobuhiro, NOGE, Koji, MORI, Naoki, NISHIDA, Ritsuo a KUWAHARA, Yasumasa. Chemical Ecology of Astigmatid Mites LXXIII. Neral as an Alarm Pheromone of the Acarid Mite, *Oulenzia* sp. (*Astigmata: Winterschmidtidae*). *Journal of the Acarological Society of Japan*. 2004, **13**(1), 57–64. ISSN 0918-1067.
- SHIMODA, Mitsuya, NAKADA, Yuji, NAKASHIMA, Masatosi a OSAJIMA, Yutaka. Quantitative Comparison of Volatile Flavor Compounds in Deep-Roasted and Light-Roasted Sesame Seed Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, **45**(8), 3193–3196. ISSN 00218561.
- SHIMONI, Eyal, BAASOV, Timor, RAVID, Uzi a SHOHAM, Yuval. The *trans*-anethole degradation pathway in an *Arthrobacter* sp. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**(14), 11866–11872. ISSN 00219258.
- SINGH-SANGWAN, Niwan, SINGH SANGWAN, Rethyr, LUTHRA Raji, a SINGH THAKUR, Riyth. Geraniol dehydrogenase: a determinant of essential oil quality in lemongrass. *Planta Medica*. 1993, **59**(2), 168–170. ISSN 00320943.
- SOPHOS, Nickolas A., PAPPA, Aglaia, ZIEGLER, Thomas L. a VASILIOU, Vasilis. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: The 2000 update. *Chemico-Biological Interactions*. 2001, **130–132**(1–3), 323–337. ISSN 00092797.
- SVEDRUŽIĆ, Željko M. a REICH, Norbert O. DNA cytosine C5 methyltransferase Dnmt1: Catalysis-dependent release of allosteric inhibition. *Biochemistry*. 2005, **44**(27), 9472–9485. ISSN 00062960.
- THEIS, Nina. Fragrance of Canada thistle (*Cirsium arvense*) attracts both floral herbivores and pollinators. *Journal of Chemical Ecology*. 2006, **32**(5), 917–927. ISSN 00980331.
- TIAN, Feng X., ZANG, Jian L., WANG, Tan, XIE, Yu L., ZHANG, Jin a HU Jian J. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily in *Populus*: Organization and expression divergence between paralogous gene pairs. *PLoS ONE*. 2015, **10**(4). ISSN 19326203.
- TIETEL, Zipora, PLOTTO, Anne, FALLIK, Elazar, LEWINSOHN, Efraim a PORAT, Ron. Taste and aroma of fresh and stored mandarins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011, **91**(1), 14–23. ISSN 00225142.
- TRANBARGER, Timothy J., FRANCESCHI, Vincent R., HILDEBRAND, David F. a GRIMES, Howard D. The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxigenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *The Plant Cell*.

- 1991, **3**(9), 973–987. ISSN 10404651.
- TUNG, Yu T., YEN, Pei L., LIN, Chun Y. a CHANG, Shang T. Anti-inflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves. *Pharmaceutical Biology*. 2010, **48**(10), 1130–1136. ISSN 13880209.
- UniProt. [Citováno 5.4.2020]. Dostupné z <https://www.uniprot.org/>.
- VASILIOU, Vasilis, BAIROCH, Amos, TIPTON, Karl F., NEBERT, Daniel W. (1999): Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping, *Pharmacogenetics*. 1999, **9**(10), 421–434.
- VASILIOU, Vasilis a NEBERT, Daniel W. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) gene family. *Human Genomics*. 2005, **2**(2), 138–143. ISSN 14797364.
- VERMA, Ram S., PADALIA, Rajendra C., SINGH, Ved R., GOSWAMI, Prakash, CHAUHAN, Amit a BHUKYA, Balakishan. Natural benzaldehyde from *Prunus persica* (L.) Batsch. *International Journal of Food Properties*. 2017, **20**(2), 1259–1263. ISSN 15322386.
- VICHI, Stefania, GUADAYOL, Josep M., CAIXACH, Josep, LÓPEZ-TAMAMES, Elvira a BUXADERAS, Susana. Comparative study of different extraction techniques for the analysis of virgin olive oil aroma. *Food Chemistry*. 2007, **105**(3), 1171–1178. ISSN 03088146.
- VISSER, Janic H. a PIRON, Peter G.M. Olfactory antennal responses to plant volatiles in apterous virginoparae of the vetch aphid *Megoura viciae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1995, **77**(1), 37–46. ISSN 15707458.
- WANG, Ming F., HAN, Chih L. a YIN, Shih-Jiun. Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*. 2009, **178**(1–3), 36–39. ISSN 00092797.
- WANG, Wei, JIANG, Wei, LIU, Juge, LI, Yang, GAI, Junyi a LI, Yan. Genome-wide characterization of the aldehyde dehydrogenase gene superfamily in soybean and its potential role in drought stress response. *BMC Genomics*. 2017, **18**(1). ISSN 14712164.
- WOOD, Andrew J. a DUFF, Joel R. The aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) gene superfamily of the moss *Physcomitrella patens* and the algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Ostreococcus tauri*. *The Bryologist*. 2009, **112**(1), 1–11. ISSN 0007-2745.
- WOOD, Paul L., KHAN, Amin M. a MOSKAL, Joseph R. The concept of „aldehyde load" in neurodegenerative mechanisms: Cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line. *Brain Research*. 2007, **1145**(1), 150–156. ISSN 00068993.
- WU, Minnie M., GRABE, Michael, ADAMS, Stephen, TSIEN, Roger Y., MOORE, Hsiao P. H. a MACHEN, Terry E. Mechanisms of pH Regulation in the Regulated Secretory Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001, **276**(35), 33027–33035. ISSN 00219258.
- WYMORE, Troy, HEMPEL, John, CHO, Samuel S., MACKERELL, Alexander D., NICHOLAS, Hugh B. a DEERFIELD, David W. Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenase and mechanism of nucleophile activation. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 2004, **57**(4), 758–771. ISSN 08873585.
- XIE, Yongjian, HUANG, Qianqian, WANG, Zhunjing, CAO, Haiyan a ZHANG, Dayu. Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenol derivatives against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. 2017, **97**(9), 388–394. ISSN 09266690.
- YOSHIDA, Akira, RZHETSKY, Andrey, HSU, Lily C. a CHANG, Cheng. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *European Journal of Biochemistry*. 1998, **251**(3), 549–557. ISSN 00142956.
- YU, Lu, GUO, Na, YANG, Yi, WU, Xiuping, MENG, Rizeng, FAN, Junwen, GE, Fa, WANG, Xuelin, LIU, Jingbo a DENG, Xuming. Microarray analysis of p-anisaldehyde-induced transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and*

- Biotechnology*. 2010, **37**(3), 313–322. ISSN 13675435.
- YU, Zhengquan, LI, Wei, HILLMAN, Jan a BRUNK, Ulf T. Human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells are highly sensitive to the lysosomotropic aldehyde 3-aminopropanal. *Brain Research*. 2004, **1016**(2), 163–169. ISSN 00068993.
- ZHANG, Yucheng, MAO, Linyong, WANG, Hua, BROCKER, Chad, YIN, Xiangjing, VASILIOU, Vasilis, FEI, Zhangjun a WANG, Xiping. Genome-wide identification and analysis of grape aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily. *PLoS ONE*. 2012, **7**(2). ISSN 19326203.
- ZHU, Chen, MING, Chen, ZHAO-SHI, Xu, LIAN-CHENG, Li, XUE-PING, Chen a YOU-ZHI, Ma. Characteristics and expression patterns of the Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) gene superfamily of foxtail millet (*Setaria italica* L.). *PLoS ONE*. 2014, **9**(7). ISSN 19326203.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- 2dZmALDH22 – aldehyddehydrogenasa rodiny 22 z kukuřice seté (*Zea mays*),
neobsahuje značnou část signální sekvence
- ABA – kyselin abscisová
- ABAL – 4-aminobutyraldehyd
- APAL – 3-aminopropionaldehyd
- ALDH – aldehyddehydrogenasa
- ALDH22 – aldehyddehydrogenasa rodiny 22
- AtALDH22 – aldehyddehydrogenasa rodiny 22 z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*)
- BSA – hovězí sérový albumin
- C_T – hodnota prahu
- dHvALDH22 – aldehyddehydrogenasa rodiny 22 z ječmene setého (*Hordeum vulgare*),
neobsahuje část signální sekvence
- dZmALDH22 – aldehyddehydrogenasa rodiny 22 z kukuřice seté (*Zea mays*),
neobsahuje část signální sekvence
- DTT – dithiotreitol
- GABA – γ -aminomáselná kyselina
- IPTG – isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
- HvALDH22 – aldehyddehydrogenasa rodiny 22 z ječmene setého (*Hordeum vulgare*),
obsahuje celou signální sekvenci
- LB - Luria-Bertani
- OsALDH22 – aldehyddehydrogenasa rodiny 22 z rýže seté (*Oryza sativa*)
- psi – jednotka tlaku („*pound per square inch*“); 1 psi = 6894,76 Pa
- PVDF – polyvinilidendifluorid
- PVP-40 - polyvinylpyrrolidon-40
- ZmALDH22 – aldehyddehydrogenasa rodiny 22 z kukuřice seté (*Zea mays*)