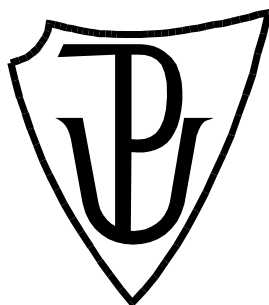


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Charakterizace mutantu W288A aminoaldehyddehydrogenasy 2 z hrachu (*Pisum sativum*)

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Adéla Hýlová**  
Studijní program: B1406 Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Martina Kopečná, Ph.D.**  
Termín odevzdání práce: květen 2013

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 13.5.2013

#### Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Martině Kopečné, Ph.D. za odborné vedení a užitečné rady. Mé díky dále patří Mgr. Davidovi Kopečnému, Ph.D. za vstřícnou pomoc a trpělivost při řešení teoretické i praktické části mé práce a Mgr. Radce Končítikové za cenné rady.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Adéla Hýlová
Název práce	Charakterizace mutantu W288A aminoaldehyddehydrogenasy 2 z hrachu ( <i>Pisum sativum</i> )
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Martina Kopečná, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	Práce se zabývá popisem aminoaldehyddehydrogenasy 2 z hrachu setého. Byl charakterizován divoký typ, tzv. wild type (WT-PsAMADH2) a jeho mutantní forma W288A. Tyto enzymy byly získány jako rekombinantní proteiny metodou exprese v buňkách <i>E.coli</i> a poté byly purifikovány afinitní chromatografií. Pomocí SDS-PAGE byla stanovena molekulová hmotnost monomeru, jenž činila 55 kDa pro oba enzymy. Dále bylo změřeno pH optimum a teplotní stabilita. Obě PsAMADH2 jsou stabilní do 35 °C a vykazují nejvyšší aktivitu při pH přibližně 9,8. Nakonec byla testována substrátová specifita s použitím tří různých aminoaldehydů a byly stanoveny kinetické parametry $K_m$ a $V_{lim}$ .
Klíčová slova	Aldehyddehydrogenasa, aminoaldehyddehydrogenasa, polyaminy, aldehydy, enzymologie, <i>Pisum sativum</i>
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Adéla Hýlová
Title	Characterization of W288A mutant of aminoaldehyde dehydrogenase 2 from pea ( <i>Pisum sativum</i> )
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, CRH
Supervisor	Mgr. Martina Kopečná, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>This thesis deals with characterization of aminoaldehyde dehydrogenase 2 from pea. Wild type (WT-PsAMADH2) and its mutant form W288A were characterized. These enzymes were obtained as recombinant proteins by expression in <i>E.coli</i> cells. Then they were purified by affinity chromatography. SDS-PAGE determined molecular mass, which was 55 kDa per monomer for both enzymes. pH optimum and thermal stability were measured. Both PsAMADH2 are stable to 35 °C and they are most active at pH approximately 9.8. Substrate specificity was tested using three different aminoaldehydes and kinetic parameters, <math>K_m</math> and <math>V_{lim}</math>, have been established in the end.</p>
Keywords	Aldehyde dehydrogenase, aminoaldehyde dehydrogenase, polyamines, aldehydes, enzymology, <i>Pisum sativum</i>
Number of pages	48
Nuber of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1. CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>- 8 -</b>
2.1. Úvod.....	- 9 -
2.2. Vlastnosti a vznik polyaminů.....	- 10 -
2.3. Degradace polyaminů – biosyntéza aldehydů.....	- 12 -
2.3.1. Aminoxidasy obsahující měď (CAO).....	- 12 -
2.3.2. Polyaminoxidasy obsahující flavinový kofaktor .....	- 14 -
2.4. Aldehyddehydrogenasy .....	- 16 -
2.4.1. Klasifikace aldehyddehydrogenas .....	- 16 -
2.4.1.1. ALDH2.....	- 17 -
2.4.1.2. ALDH3.....	- 17 -
2.4.1.3. ALDH5.....	- 17 -
2.4.1.4. ALDH6.....	- 17 -
2.4.1.5. ALDH7.....	- 17 -
2.4.1.6. ALDH10.....	- 17 -
2.4.1.7. ALDH11.....	- 18 -
2.4.1.8. ALDH12.....	- 18 -
2.4.1.9. ALDH18.....	- 18 -
2.4.1.10. ALDH21, 22, 23 a 24.....	- 18 -
2.4.2. Aminoaldehyddehydrogenasy .....	- 18 -
2.4.2.1. Substrátová specifita AMADH .....	- 19 -
2.4.2.2. Vlastnosti a struktura PsAMADH .....	- 20 -
2.4.2.3. Mechanismus reakce PsAMADH a substrátu .....	- 23 -
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>- 24 -</b>
3.1. Použité chemikálie.....	- 25 -
3.2. Použité přístroje.....	- 26 -
3.3. Metody .....	- 27 -
3.3.1. Produkce rekombinantní PsAMADH2 a její mutantní formy W288A- .....	- 27 -
3.3.2. Extrakce .....	- 27 -
3.3.3. Purifikace .....	- 28 -
3.3.4. SDS-PAGE.....	- 29 -
3.3.5. Spektrofotometrie v UV oblasti .....	- 30 -
3.3.5.1. Stanovení koncentrace proteinů .....	- 30 -

3.3.5.2.	Stanovení aktivity enzymů a porovnání substrátové specifity	- 30 -
3.3.5.3.	Stanovení pH optima a teplotní stability	- 32 -
3.3.5.4.	Stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů enzymů	- 32 -
3.4.	Výsledky	- 33 -
3.4.1.	SDS-PAGE	- 33 -
3.4.2.	Stanovení koncentrace proteinů	- 35 -
3.4.3.	Porovnání substrátové specifity	- 35 -
3.4.4.	pH optimum	- 36 -
3.4.5.	Teplotní stabilita	- 36 -
3.4.6.	Stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů enzymů	- 37 -
<b>4.</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>- 40 -</b>
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>- 42 -</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>- 43 -</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>- 48 -</b>

# 1. CÍLE PRÁCE

## Teoretická část

1. Objasnění metabolismu spojeného s biosyntézou a degradací aminoaldehydů v rostlinách
2. Klasifikace aldehyddehydrogenas
3. Popis substrátové specificity rostlinných aminoaldehyddehydrogenas
4. Popis reakčního mechanismu těchto enzymů

## Experimentální část

1. Produkce rekombinantních proteinů - aminoaldehyddehydrogenas (WT-PsAMADH2 a mutantní varianty W288A), extrakce a následná purifikace
2. Zjištění teplotní stability a pH optima
3. Stanovení substrátové specificity pro oba enzymy

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**



## 2.1. Úvod

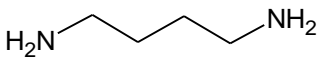
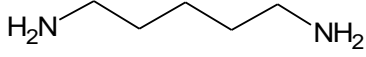
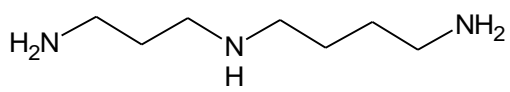
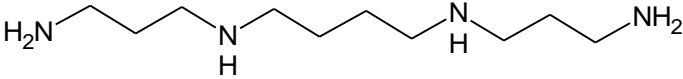
Aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) jsou enzymy katalyzující přeměnu  $\omega$ -aminoaldehydů, které jsou produkty degradace polyaminů, na odpovídající  $\omega$ -aminokyseliny. Tato reakce je NAD-dependentní. Některé bakteriální AMADH preferují jako kofaktor i NADP<sup>+</sup>. Aldehydy jsou ve vyšších koncentracích toxické, a proto musí být jejich hladina v buňkách regulována.

Rostlinné aldehyddehydrogenasy se na základě homologie aminokyselinové sekvence dělí do třinácti rodin. AMADH patří to rodiny ALDH10. Svou sekvencí jsou identické s betainaldehyddehydrogenasami (BADH), které katalyzují reakci, při níž vzniká osmolyt glycin betain z betainaldehydu. V posledních padesáti letech byly popsány mikrobiální, rostlinné i živočišné AMADH. V této práci je předmětem výzkumu AMADH2 z hrachu setého (*Pisum sativum*).

## 2.2. Vlastnosti a vznik polyaminů

Polyaminy jsou nízkomolekulární alifatické sloučeniny, které jsou přítomné ve všech živých organizmech. Třemi nejvíce zastoupenými polyaminy v rostlinách jsou putrescin, spermidin a spermin. Dále zde můžeme zařadit kadaverin (Tab. 1), nacházející se také v luštěninách. Tyto látky jsou důležité pro procesy morfogeneze, růstu, embryogeneze, dále pro stárnutí listů, stabilizaci buněčné membrány, vývoj rostlinných orgánů a odpovědi na abiotický a biotický stres. Putrescin a kadaverin jsou těkavé sloučeniny charakteristické svým mrtvolným zápachem (Kusano *et al.*, 2008). Polyaminy byly v rostlinných buňkách lokalizovány v cytoplazmě, ale i ve vakuolách, mitochondriích a chloroplastech (Kumar *et al.*, 1997). Polyaminy mají také velký význam v oboru agronomie. Ovlivňují obsah živin v plodinách, kvalitu plodů a oddalují odumírání výhonků popínavých rostlin, např. lilku rajčete (Mehta *et al.*, 2002).

Tab. 1. Strukturní vzorce a názvy nejčastěji se vyskytujících rostlinných polyaminů.

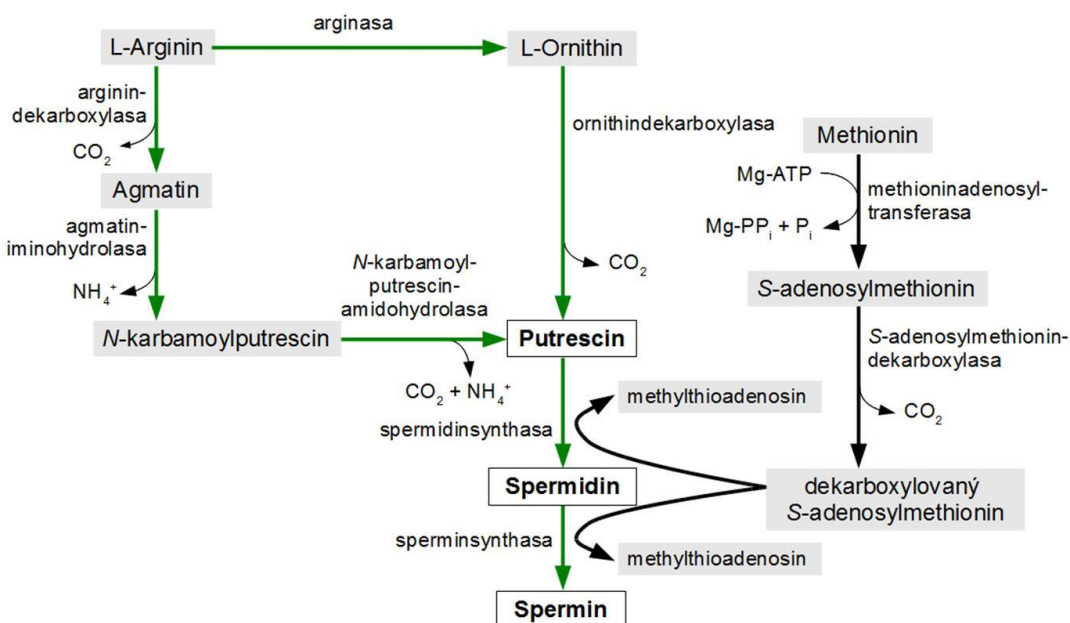
Strukturní vzorec	Název	Systematický název
	putrescin	butan-1,4-diamin
	kadaverin	pentan-1,5-diamin
	spermidin	<i>N</i> -(3-aminopropyl) butan-1,4-diamin
	spermin	<i>N,N'</i> -bis(3- aminopropyl)butan- 1,4-diamin

Řada polyaminů ovlivňuje iontové kanály, zejména inhibicí. Příkladem jsou polyaminy nacházející se v cytoplazmě, které blokují vtok  $K^+$  cytoplazmatickou membránou svěracích buněk (Liu *et al.*, 2000).

Pokud rostlina podléhá abiotickému či biotickému stresu, často dochází ke zvýšené produkci a akumulaci polyaminů (Kusano *et al.*, 2008). Schopnost rostlin lépe snášet stresové podmínky byla prokázána studiem transgenních rostlin, jejichž geny exprimovaly zvýšené množství polyaminů, např. overexprese *SPDS* genu (gen kódující spermidinsyntázu - *SPDS*) z tykve fíkolisté (*Cucurbita ficifolia*) uděluje odolnost *Arabidopsis thaliana* a batátům vůči rozmanitým stresovým podnětům

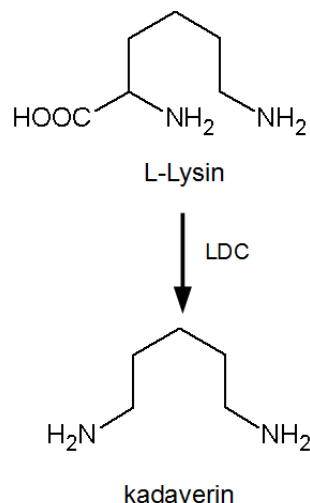
(Kasukabe *et al.*, 2004, 2006). *ADC* gen z durmanu obecného (*Datura stramonium*) kódující arginindekarboxylasu (ADC), exprimovaný v rýži zvyšuje její odolnost k suchu (Capell *et al.*, 2004).

Biosyntéza polyaminů v rostlinách probíhá dvěma alternativními drahami. Prekurzorem putrescinu je aminokyselina arginin. Arginasou (EC 3.5.3.1) je arginin přeměněn na ornithin, ze kterého vzniká putrescin účinkem ornithindekarboxylasy (ODC, EC 4.1.1.17). Druhá cesta syntézy putrescinu probíhá přes meziprodukt, kterým je agmatin. Tento proces zahrnuje tři reakce, katalyzované postupně arginindekarboxylasou (ADC, EC 4.1.1.19), agmatiniminohydrolasou (AIH, EC 3.5.3.12) a *N*-karbamoylputrescinamidohydrolasou (CPA, EC 3.5.1.53). Poté je putrescin převeden na spermidin účinkem spermidinsynthasy (SPDS, EC 2.5.1.16). Aminopropylová skupina je přenesena z dekarboxylovaného *S*-adenosylmethioninu. Ten vzniká z methioninu dvěma reakcemi, které katalyzují methioninadenosyltransferasa (EC 2.5.1.6) a *S*-adenosylmethionindekarboxylasa (SAMDC, EC 4.1.1.50) (Obr. 1) (Kusano *et al.*, 2008).



**Obr. 1. Biosyntéza polyaminů putrescinu, spermidinu a sperminu v rostlinách.** (Upraveno podle Kusano *et al.*, 2008).

Kadaverin vzniká z lysinu. Tato reakce je katalyzována lysindekarboxylasou (LDC, EC 4.1.1.18) (Obr. 2).



**Obr. 2. Vznik kadaverinu.** Reakci katalyzuje lysindekarboxylasa (LDC) (Upraveno podle Fecker *et al.*, 1993).

## 2.3. Degradace polyaminů – biosyntéza aldehydů

Produkty katabolizmu polyaminů jsou aldehydy. Reakce je katalyzována polyaminoxidasami, které obsahují flavin (PAO, EC 1.5.3.11), či aminoxidasami obsahujícími měď (CAO, EC 1.4.3.6) (Bouchereau *et al.*, 1999). CAO jsou také nazývány diaminoxidasy (DAO), protože nejběžnější substráty, které oxidují, jsou diaminy.

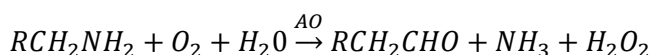
### 2.3.1. Aminoxidasy obsahující měď (CAO)

Rostlinné CAO jsou homodimery, jejichž molekulová hmotnost se nachází v rozmezí 150 – 200 kDa. V každé své podjednotce v aktivním místě obsahují měďnatý ion a kofaktor, jímž je 2,4,5-trihydroxyfenylalaninichinon nebo-li topachinon (TPQ). Díky příznivé vzdálenosti mezi  $\text{Cu}^{2+}$  a TPQ je umožněn přímý přenos elektronu mezi oběma prostetickými skupinami (Šebela *et al.*, 1998).

Úloha mědi spočívá v udržování aktivního místa v geometrické struktuře tak, aby mohla být uskutečněna vazba substrátu. Odstranění mědi z aktivního místa je poměrně jednoduché. Jedná se o reverzibilní děj realizovatelný reakcí s diethylthiokarbamátem za neredukujících podmínek (Hill *et al.*, 1964), případně redukcí dithioničitanem na  $\text{Cu}^+$  a následně pomocí kyanidu. Měďnaté ionty mohou být do aktivního místa navraceny, a to přidávkem volných  $\text{Cu}^{2+}$  k apoenzymu, čímž by byla katalytická aktivita enzymu obnovena (Suzuki *et al.*, 1984).

Topachinonový kofaktor vzniká za účasti  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{O}_2$  posttranslační autokatalytickou modifikací tyrosinového rezidua, které se nachází v aktivním místě enzymu (Klinman, 2003). Způsob vzniku TPQ byl studován na CAO z kvasinky *Hansenula polymorpha*, jejíž struktura byla objasněna ve studiích Li *et al.* (1998) a Chen *et al.* (2000).

CAO oxidují diaminy a polyaminy na primární aminoskupině. Vzniká příslušný aminoaldehyd, amoniak a peroxid vodíku.



Mezi inhibitory těchto enzymů patří karbonylové sloučeniny, např. hydrazin a semikarbazid (ireverzibilní inhibice). Reverzibilně jsou CAO inhibovány činidly tvořícími chelát s mědí (nekompetitivní inhibice) či sloučeninami strukturně podobnými substrátům (kompetitivní inhibice) (Šebela *et al.*, 1998). Například aminoxidasu z hrachu setého (PSAO) reverzibilně inhibují deriváty imidazolu, jako jsou karnosin, anserin a impromidin (Bieganski *et al.*, 1982).

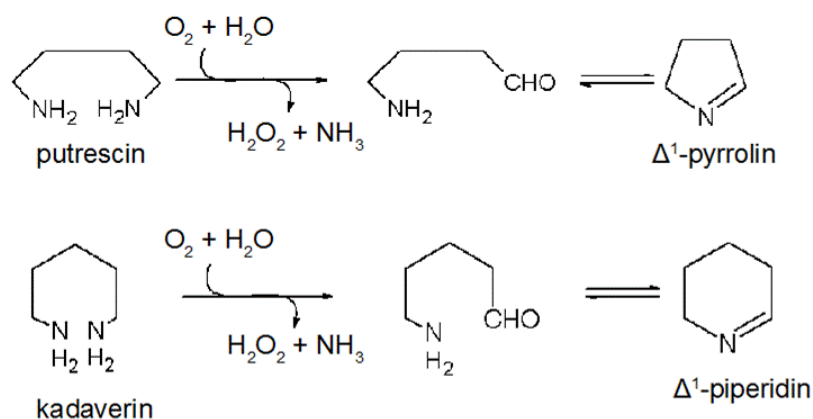
Substrátová specifita CAO je rozsáhlá a na jejím základě jsou tyto enzymy klasifikovány do čtyř skupin:

1. Savčí plazmové aminoxidas – oxidují přednostně polyaminy spermin a spermidin, ale také benzylamin, patřící mezi monoaminy.
2. Savčí diaminoxidas – nacházejí se v ledvinách a placentě. Preferovanými substráty jsou putrescin a kadaverin, popř. histamin.
3. Rostlinné diaminoxidas – stejně jako savčí DAO upřednostňují putrescin a kadaverin, dále oxidují také spermidin.
4. Mikrobiální aminoxidas – nejlepšími substráty jsou arylalkylaminy, např. fenethylamin, benzylamin nebo heterocyklický histamin a tyramin.

Nejvíce zástupců aminoxidas náleží do skupiny rostlinných aminoxidas. Nacházejí se zejména v bobovitých (*Fabaceae*), ale také např. v čeledích lipnicovité (*Poaceae*) a pryšcovité (*Euphorbiaceae*) (Šebela *et al.*, 1998). Nejlépe popsány a charakterizovány jsou CAO ze semenáčků hrachu setého (PSAO; Mann, 1961), čočky kuchyňské (LSAO; Floris *et al.*, 1983) a latexu pryšce *Euphorbia characias* (Rinaldi *et al.*, 1982).

Nejvýznamnějšími substráty preferovanými těmito enzymy jsou putrescin a kadaverin, běžně se vyskytující v rostlinných pletivech. Jsou toxické a mohou být považovány za karcinogenní, protože mají schopnost reagovat s dusitany za vzniku

nitrosaminů, jenž jsou potenciálními karcinogeny. CAO oxiduje putrescin na 4-aminobutyraldehyd (ABAL), který samovolně přechází na cyklickou formu  $\Delta^1$ -pyrrolin. Produktem oxidace kadaverinu je 5-aminovaleraldehyd (AVAL), který cyklizuje na  $\Delta^1$ -piperidin (Obr. 3). CAO také oxidují spermidin a spermin (Obr. 4) (Medda *et al.*, 1995).

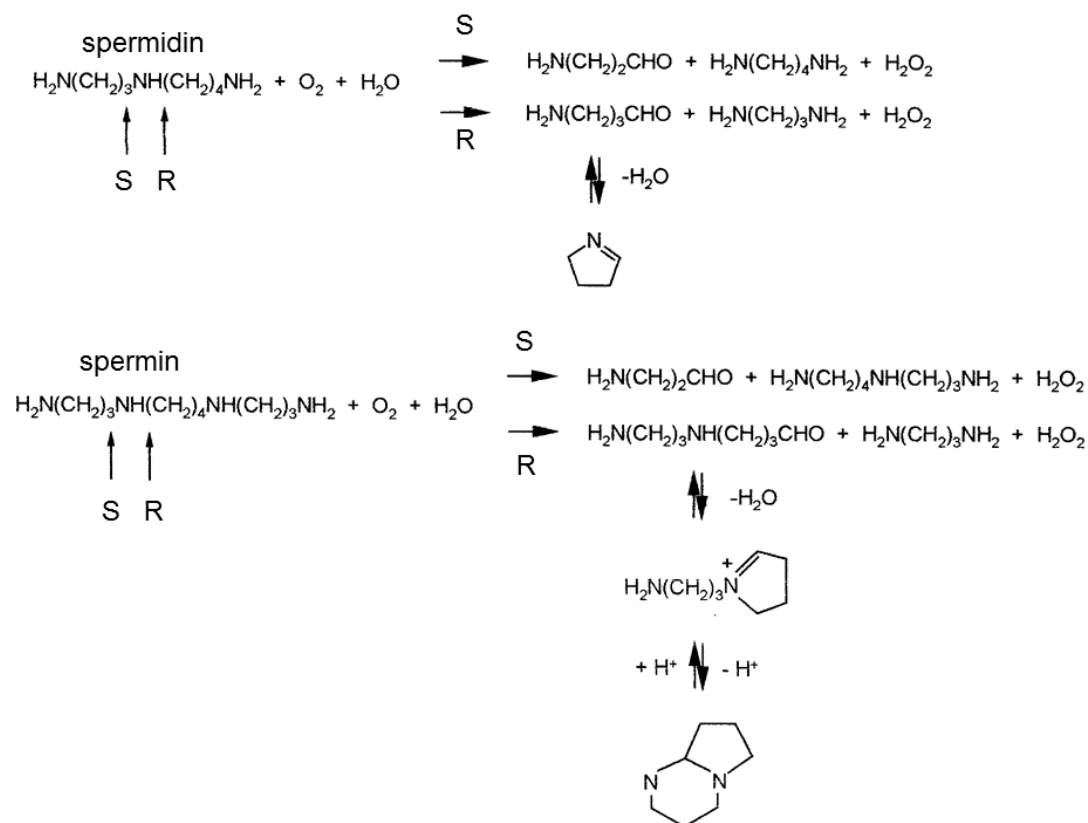


**Obr. 3. Oxidativní deaminace diaminů a polyaminů, kterou katalyzují CAO.** Produkty oxidace putrescinu a kadaverinu (ABAL, resp. AVAL) samovolně cyklizují (Upraveno podle Medda *et al.*, 1995).

### 2.3.2. Polyaminoxidasy obsahující flavinový kofaktor

Kofaktorem PAO je nekovalentně vázaný flavinadeninukleotid (FAD). Jako první byla popsána PAO z kukuřice (*Zea mays*) – ZmPAO, jenž byla izolována z apoplastu kukuřičných buněk. Je to monomerní glykosylovaný enzym obsahující jednu molekulu FAD (Tavladoraki *et al.*, 1998).

Rostlinné PAO způsobují oxidativní štěpení polyaminů, ale i diaminů jako je spermin či spermidin. Oxidací spermidinu vzniká 4-aminobutyraldehyd (ABAL) a oxidací sperminu *N*-(3-aminopropyl)-4-aminobutyraldehyd (APBAL), který má schopnost spontánně vytvářet cyklickou formu, 1,5-diazabicyklo[4.3.0]nonan (Kusano *et al.*, 2008). Dalším reakčním produktem je 1,3-diaminopropan (Dap) a peroxid vodíku (Obr. 4) (Šebela *et al.*, 2000). Dap je poté přeměněn na 3-aminopropionaldehyd (Duhazé *et al.*, 2002). Z tohoto faktu vyplývá, že PAO jsou enzymy katalyzující koncový krok katabolizmu polyaminů.



**Obr. 4. Katabolismus spermidinu a sperminu savčími (S) a rostlinnými (R) polyaminoxidasami.** Šipky označují místa v molekule substrátu, na které se váže příslušný enzym (Šebela *et al.*, 2001).

Zvláštním typem polyaminoxidasy je sperminoxidasa (SMO), která zprostředkovává zpětnou konverzi sperminu na spermidin. Dalšími produkty reakce jsou 3-aminopropionaldehyd a peroxid vodíku. SMO byla poprvé identifikována v živočišných buňkách (Vujcic *et al.*, 2002). Přítomnost enzymu se stejnou enzymatickou aktivitou, nazývaného se Fms1, byla prokázána také v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* (Landry a Sternglanz, 2003). Později byla zpětná konverze polyaminů prokázána v rostlinách. Enzym AtPAO1 z *Arabidopsis thaliana* katalyzuje stejnou reakci jako SMO/Fms1. AtPAO1, Fms1 a SMO oxidují spermin, ale ne spermidin. Zda-li existuje rostlinná polyaminoxidasa schopná přeměny spermidinu na putrescin a tím uzavírající cyklus zpětné konverze, zbývá posoudit v budoucnu. Význam této metabolické dráhy spočívá v produkci spermidinu, který je pravděpodobně využíván v jiných drahách (Tavladoraki *et al.*, 2006).

## 2.4. Aldehyddehydrogenasy

Aldehydy, jež jsou produkty katabolizmu polyaminů, jsou dále odbourávány aldehyddehydrogenasami (ALDH, EC 1.2.1.3) na příslušné karboxylové kyseliny. Kofaktorem rostlinných ALDH je NAD<sup>+</sup>, v některých bakteriálních ALDH je jím NADP<sup>+</sup>. Redukované formy NADH/NADPH jsou významným zdrojem redukčních ekvivalentů udržujících redoxní rovnováhu v buňkách (Brocker *et al.*, 2013). Rostlinné ALDH byly lokalizovány v cytoplazmě, mitochondriích, plastidech (chloroplastech, chromoplastech, leukoplastech), mikrozomech a peroxizomech (Missihoun *et al.*, 2011; Mitsuya *et al.*, 2009).

ALDH se uplatňují při působení podmínek zvyšujících oxidační stres. Za tohoto stavu jsou oxidační degradací lipidových membrán produkovány reaktivní aldehydy. Tento proces se nazývá peroxidace lipidů. Mezi tyto aldehydy patří 4-oxononal, 4-hydroxynonal či malondialdehyd. Mohou se chovat jako elektrofilů a vázat se na fyziologicky nepostradatelné sloučeniny nukleofilního charakteru, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Tyto adukty mohou být původci mutací, překážkami různých funkcí a mohou vést k poruchám homeostázy. Zvýšení hladiny ALDH v rostlinách je odpovědí na stresové podněty (Brocker *et al.*, 2013). Na základě tohoto faktu je exprese ALDH využívána ke zvýšení růstu a zlepšení kvality hospodářsky významných plodin rostoucích při zhoršených podmínkách, jako je sucho nebo špatná kvalita půdy (Bartels and Sunkar, 2005). ALDH také ovlivňují vývoj a dozrávání semen (Shin *et al.*, 2009).

### 2.4.1. Klasifikace aldehyddehydrogenas

ALDH se dělí do třinácti rodin – ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24. Rodiny ALDH10, ALDH12, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24 jsou typické pro rostliny. ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7 a ALDH18 mají své orthology v živočišné říši.

Vasiliou *et al.* (1999) stanovili systém dělení ALDH, a to podle vzoru Human Gene Nomenclature Guidelines (<http://www.genenames.org/guidelines.html>). Pokud jsou sekvence enzymů z více než 40 % stejné, je možné je zařadit do stejné rodiny. Jestliže sdílejí 60 % a více identity, řadí se do stejné podskupiny příslušné rodiny. Následující dělení enzymů do rodin, jenž byly doposud prostudovány a charakterizovány v rostlinách, bylo zpracováno podle Brocker *et al.* (2013).



#### 2.4.1.1. ALDH2

Tato rodina obsahuje mitochondriální a cytosolické enzymy s relativně širokou substrátovou specificitou (EC 1.2.1.3). Vyskytují se jako homotetramery. Katalyzují katabolickou reakci, při níž je acetaldehyd, produkt ethanolové fermentace, převeden na acetát. Z něj je syntetizován koenzym A (CoA) acetyl-CoA-synthasou (EC 6.2.1.1). Tento proces se nazývá pyruvátdehydrogenasová dráha.

#### 2.4.1.2. ALDH3

Savčí ALDH3 byly lokalizovány v cytoplazmě a mitochondriích (EC 1.2.1.5). Rostlinné ALDH patřící do této rodiny se nacházejí v cytoplazmě, chloroplastech a endoplazmatickém retikulu. Expres většiny genů této rodiny je pravděpodobně regulována kyselinou abscisovou jako reakcí na stresové podmínky.

#### 2.4.1.3. ALDH5

Do této rodiny se řadí sukcinátsemialdehyddehydrogenasa (SSADH; EC 1.2.1.24). Katalyzuje přeměnu sukcinátsemialdehydu (SSA) na sukcinát v průběhu posledního reakčního kroku katabolizmu kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné. Tato metabolická dráha se nazývá „GABA shunt“.

#### 2.4.1.4. ALDH6

ALDH6 zahrnuje methylmalonát-semialdehyddehydrogenasu (EC 1.2.1.27), která se účastní reakcí spojených s katabolizmem valinu a pyrimidinu. Zástupci ALDH6 jsou jediné aldehyddehydrogenasy, které využívají CoA jako kofaktor. Katalyzují CoA-dependentní reakci, při níž dochází k převodu methylmalonát semialdehydu na propionyl-CoA. Jsou také schopné metabolizovat malonát semialdehyd na acetyl-CoA.

#### 2.4.1.5. ALDH7

Řadí se sem  $\Delta^1$ -piperidin-6-karboxylátdehydrogenasa (P6CDH; EC 1.2.1.31). Je také známa pod názvy  $\alpha$ -aminoadipátsemialdehyddehydrogenasa či antikvitin. Rostlinné *ALDH7* jsou pravděpodobně exprimovány za podmínek stresové zátěže.

#### 2.4.1.6. ALDH10

Členové rodiny ALDH10 jsou známi pod názvem aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH; EC 1.2.1.19) či betainaldehyddehydrogenasy (BADH; EC 1.2.1.8). Tyto enzymy jsou spojeny s katabolizmem polyaminů, jelikož degradují reaktivní cytotoxické aminoaldehydy, jako je APAL či ABAL. Hrají významnou roli v reakci na stresovou zátěž rostlin a převádějí betainaldehyd (BAL) na osmoprotektant glycin betain. Řada homologů ALDH10 však není schopná oxidovat BAL a preferuje jako

substráty jiné aminoaldehydy. Příkladem jsou AMADH z lilku rajčete a kukuřice (Kopečný *et al.*, 2013). Aldehyddehydrogenasy, které vykazují vysokou aktivitu se substrátem BAL, se nazývají BADH. Řadí se mezi ně BADH ze špenátu (*Spinacia oleracea*) (Icharoensakdi *et al.*, 2000). Většina doposud studovaných rostlinných druhů obsahuje dva geny *ALDH10*. Některé rostlinné druhy však obsahují více těchto genů. Přítomnost třech *ALDH10* byla prokázána v genomu kukuřice.

#### **2.4.1.7. ALDH11**

Geny *ALDH11* kódují glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy (GAPN; EC 1.2.1.9), což jsou nefosforylující enzymy nacházející se v cytoplasmě. Kofaktorem je NADP<sup>+</sup>. GAPN oxidují glyceraldehyd-fosfát na 3-fosfoglycerát za současné produkce NADPH, který je dále využíván v procesu biosyntézy mannitolu v mnoha rostlinných druzích (Gao a Loescher, 2000).

#### **2.4.1.8. ALDH12**

Tato rodina zahrnuje 1-pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasy (P5CDH; EC 1.5.1.12). Tyto enzymy jsou klíčové při procesu degradace prolinu, ale také argininu, na glutamát.

#### **2.4.1.9. ALDH18**

ALDH18 zahrnuje 1-pyrrolin-5-karboxylát-synthetasy (P5CS; EC 1.2.1.41 a EC 2.7.2.11). Fylogeneticky je tato rodina od ostatních ALDH relativně vzdálená. Zvýšená exprese *ALDH18* nejspíše vede k nadprodukci prolinu, který je běžným rostlinným osmolytem.

#### **2.4.1.10. ALDH21, 22, 23 a 24**

Enzymy řazené do těchto rodin byly objeveny nedávno a jejich funkce a vliv na homeostázu rostlin zatím zůstává neobjasněn.

### **2.4.2. Aminoaldehyddehydrogenasy**

AMADH oxidují reaktivní cytotoxické  $\omega$ -aminoaldehydy na odpovídající  $\omega$ -aminokyseliny za současné redukce NAD<sup>+</sup> na NADH. AMADH jsou spojovány s mnoha metabolickými cestami, např. biosyntézou karnitinu či produkcí osmoprotektantu glycin betainu (Tylichová *et al.*, 2010). AMADH z rajčete (*Solanum lycopersicum*) – SIAMADH – a z kukuřice (*Zea mays*) – ZmAMADH – oxidují DMSPAL za vzniku DMSP, který plní funkci osmoprotektantu a také chrání rostlinu před chladem. Kukuřičné AMADH mohou hrát důležitou roli při kontrole hladiny  $\omega$ -aminoaldehydů během raného vývoje semen (Kopečný *et al.*, 2013). Důsledkem

náhodné mutace genu *AMADH* byla acetylace volného substrátu ABAL (popř. jeho cyklické formy  $\Delta^1$ -pyrrolinu) za vzniku těkavé sloučeniny 2-acetyl- $\Delta^1$ -pyrrolinu, která způsobuje charakteristickou vůni jasmínové a basmati rýže (Bradbury *et al.*, 2008).

#### 2.4.2.1. Substrátová specificita AMADH

Obecnou vlastností všech AMADH je široká substrátová specificita (Obr. 5). Na základě mnoha experimentů bylo prokázáno, že nejlepší substrát je APAL, který je metabolizován na  $\beta$ -alanin. Ten je prekurzorem osmoprotektantu  $\beta$ -alanin betainu.

Další hojně preferovaný substrát je ABAL, jehož oxidací vzniká GABA, která je v rostlinách akumulována za různých stresových podmínek (sucho, zvýšená salinita či mechanické poškození) (Tylichová *et al.*, 2007).

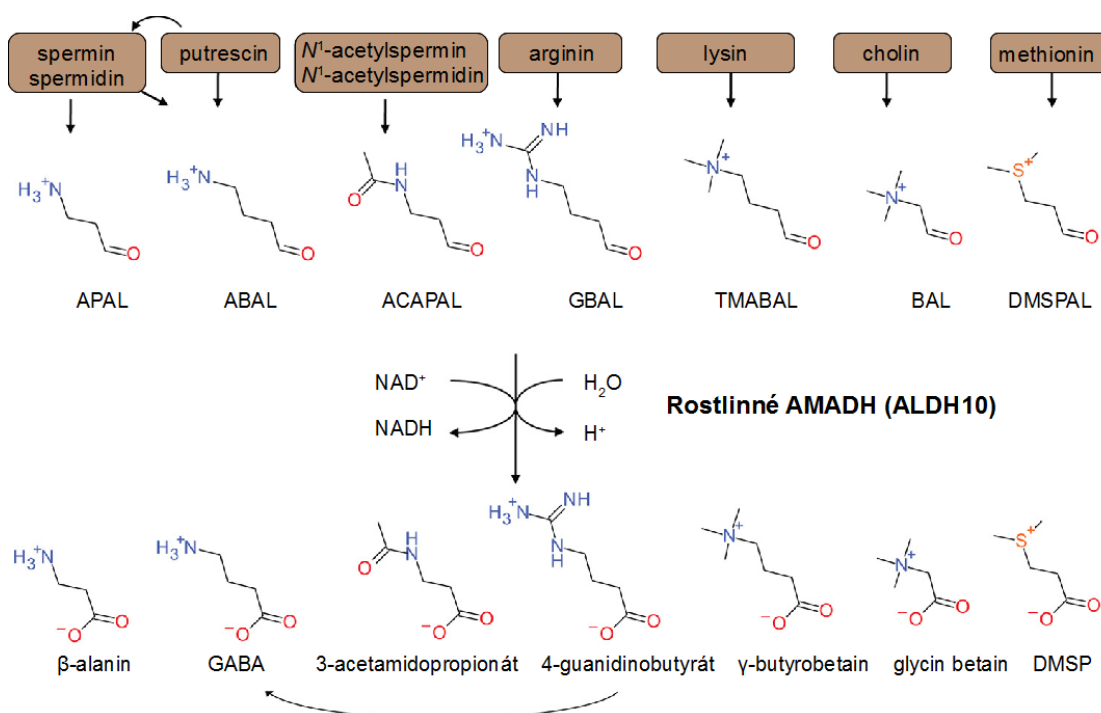
Nově charakterizovaný substrát je 3-acetamidopropionaldehyd (ACAPAL), jenž je degradován na 3-acetamidopropionát. Tento substrát může být běžným pro všechny rostlinné AMADH (Kopečný *et al.*, 2013).

GBAL, který vzniká z argininu, je převeden na 4-guanidinobutyrate, který je dále oxidován na  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu.

Methylací lysinu, navazující hydroxylací a aldolytickým štěpením vzniká TMABAL. Byl charakterizován jako substrát  $\gamma$ -trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.47) z krysích jater (Vaz *et al.*, 2000). Jeho degradací vzniká  $\gamma$ -butyrobetain, jenž je prekurzorem karnitinu, který hraje významnou roli v přenosu mastných kyselin přes vnitřní mitochondriální membránu do matrix, kde je lokalizována  $\beta$ -oxidace mastných kyselin.

BAL vzniká oxidací cholinu. Tato reakce je katalyzována cholinoxidasou nebo cholinmonooxygenasou. Není to univerzální substrát pro všechny AMADH. Je oxidován například ZmAMADH1a. Bylo dokázáno, že PsAMADH při reakci s BAL vykazuje minimální aktivitu (Tylichová *et al.*, 2010). BAL je metabolizován na glycin betain, který se účastní buněčné odpovědi na stres vyvolaný zvýšenou salinitou či suchem (Weigel *et al.*, 1986).

Produkt oxidace methioninu, DMSPAL, je dále degradován na DMSP, což je významný kryoprotektant a osmoprotektant (Kopečný *et al.*, 2013).



**Obr. 5. Přirozené substráty aminoaldehyddehydrogenas z rodiny ALDH10.**

3-aminopropionaldehyd (APAL), 4-aminobutyraldehyd (ABAL), 3-acetamidopropionaldehyd (ACAPAL), 4-guanidinobutyraldehyd (GBAL), *N,N,N*-trimethyl-4-aminobutyraldehyd (TMABAL), betainaldehyd (BAL), 3-dimethylsulfiopropionaldehyd (DMSPAL),  $\gamma$ -aminomáselná kyselina (GABA), 3-dimethylsulfiopropionát (DMSP) (Kopečný *et al.*, 2013).

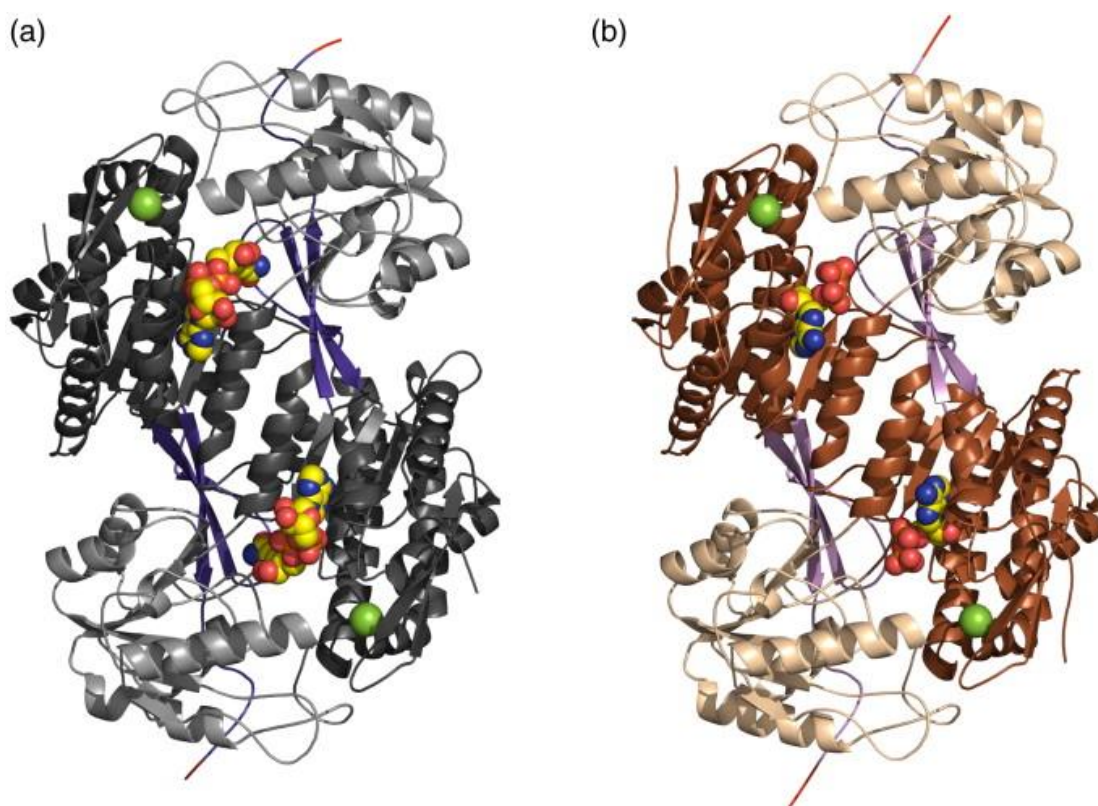
Mezi rostlinné AMADH, které již byly popsány, patří PsAMADH – aminoaldehyddehydrogenasa z etiolovaných semenáčků hrachu setého (*Pisum sativum*), jenž byla purifikována v homogenním stavu (Šebela *et al.*, 2000). V současnosti je to nejlépe charakterizovaný enzym ze skupiny AMADH. Brauner *et al.* (2003) stanovili primární strukturu tohoto enzymu. Později byla rentgenostrukturní analýzou stanovena struktura dvou izoenzymů, PsAMADH1 a PsAMADH2 (Tylichová *et al.*, 2010).

#### 2.4.2.2. Vlastnosti a struktura PsAMADH

Pomocí SDS-PAGE (denaturační podmínky) byla stanovena molekulová hmotnost monomeru, která činila 57 kDa. Metodou gelové permeační chromatografie byla zjištěna molekulová hmotnost enzymu v nativním stavu, která měla hodnotu 130 kDa. Enzym se tedy vyskytuje jako dimer. V hrachu se tento enzym vyskytuje ve

dvou izoformách – PsAMADH1 a PsAMADH2. Obě se skládají z 503 aminokyselin a jejich sekvence je identická z 80 % (Šebela *et al.*, 2000; Brauner *et al.*, 2003).

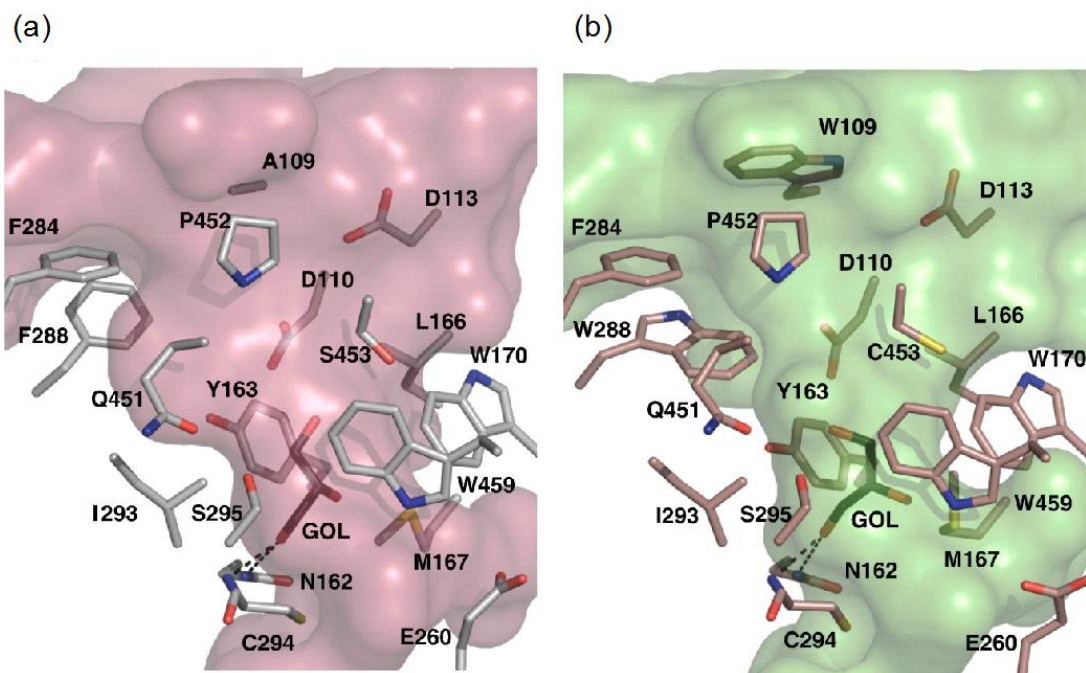
Obě izoformy PsAMADH1 a PsAMADH2 v komplexu s  $\text{NAD}^+$  byly krystalizovány metodou visící kapky. Každý z monomerů se skládá se tří domén – domény vázající koenzym (tvořena rezidui 1-131, 152-261 a 453-479), katalytické domény (262-452) a oligomerizační domény, která obsahuje dva dlouhé (rezidua 132-151) a jeden krátký  $\beta$ -skládaný list (480-503). Střední část prvních dvou zmíněných domén je tvořena pěti  $\beta$ -skládanými listy a čtyřmi  $\alpha$ -helixy. Na C-konec obou enzymů je navázána peroxizomálně cílená sekvence (Obr. 6), a proto je tento konec delší než C-konce ostatních ALDH, jejichž struktura je známá.



**Obr. 6. Struktura PsAMADH.** PsAMADH1 (a) – šedou barvou je zvýrazněna katalytická doména, černou doména vázající koenzym a modrou oligomerizační doména. PsAMADH2 (b) – katalytická doména (béžová), doména vázající koenzym (hnědá) a oligomerizační doména (fialová).  $\text{NAD}^+$  je znázorněn barvami odpovídajícími standardnímu značení atomů, ion kovu je vyznačen zeleně. Peroxizomální signální sekvence (S/A)KL a C-konec jsou zvýrazněny červeně (Tylichová *et al.*, 2010).

V blízkosti místa, do kterého se váže koenzym, se nachází vazebné místo pro kation. Výskyt kationtu je běžný u všech ALDH. PsAMADH je schopná vázat  $\text{Na}^+$ . Aktivní místo enzymů (Obr. 7) je tvořeno třemi hlavními rezidui, které jsou situovány

na konci substrátového kanálu, a to katalytickým C294 a dalšími dvěma rezidui, které se také účastní katalýzy – N162 a E260.



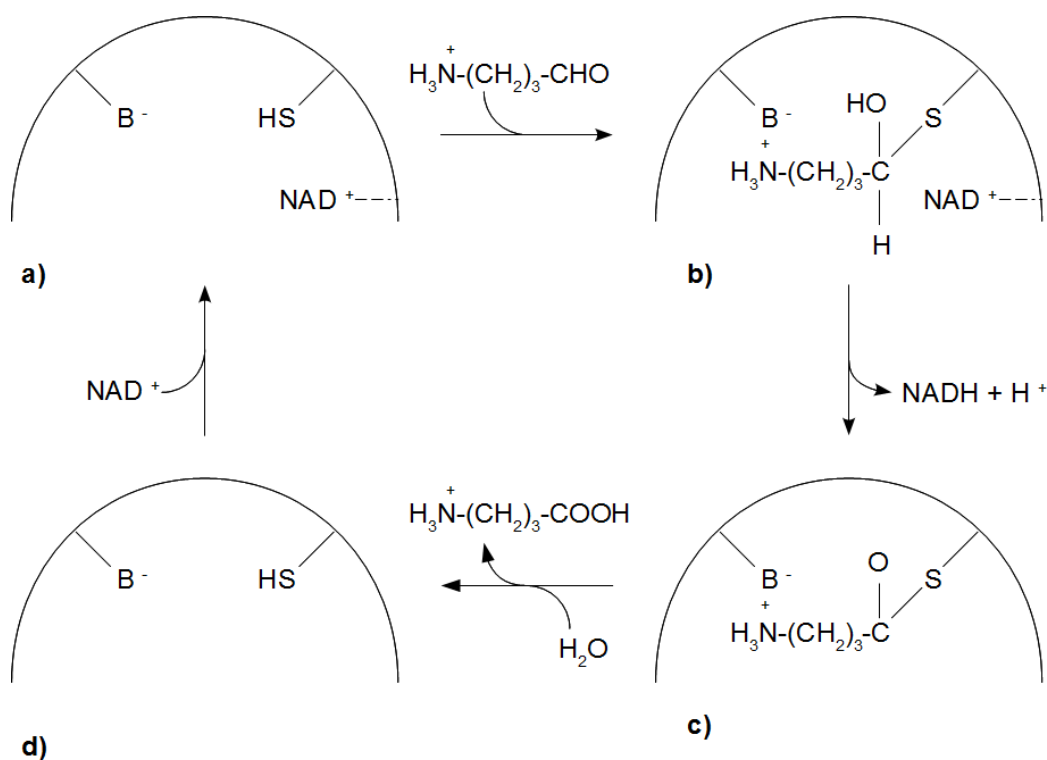
**Obr. 7. Detailní pohled do aktivního místa.** PsAMADH1 (a) a PsAMADH2 (b) vykazují vysokou homologii ve struktuře. Vodíkové vazby mezi molekulou glycerolu (GOL) (pocházející z kryoprotekčního roztoku) a C294 jsou vyznačeny přerušovanými čarami (Tylichová *et al.*, 2010).

Velikost a tvar substrátového kanálu v PsAMADH2 jsou velice podobné tomu v PsAMADH1. Liší se pouze ve třech reziduiích – A/W109, F/W288 a S/C453 (PsAMADH1/PsAMADH2) (Tylichová *et al.*, 2010). Dále se blízko substrátového kanálu nachází několik specifických reziduií, jejichž funkce byla objasněna zkoumáním důsledků cílené mutagenese *PsAMADH2*. U jeho vchodu jsou situovány D110 a D113, které jsou zodpovědné za pevné navázání  $\omega$ -aminoaldehydů a za aktivitu enzymu. Uvnitř substrátové dutiny jsou významná rezidua W170 a Y163 udržující optimální tvar substrátového kanálu. Do určité míry se na tomto úkolu podílí i L166 a M167. Konzervované reziduum W288 pravděpodobně udržuje průměr substrátového kanálu, aniž by ovlivňovalo rychlost reakce (Kopečný *et al.*, 2011).

Substrátová specifita AMADH je těsně spjata s jejich strukturou. V nejnovější studii SIAMADH a ZmAMADH bylo dokázáno, že rezidua na pozicích 163, 288, 289, 444 a 454 (číslování odpovídající sekvenci PsAMADH) substrátovou specifičtí ovlivňují (Kopečný *et al.*, 2013).

### 2.4.2.3. Mechanismus reakce PsAMADH a substrátu

Reakce je zahájena nukleofilní aktivací katalytického cysteinu pomocí glutamátu, který má charakter obecné báze. U PsAMADH2 se jedná o C294 a E260 (Tylichová *et al.*, 2010). Dalším krokem je nukleofilní atak C294 na molekulu substrátu, jímž je aldehyd. Vzniká thiohemiacetalový intermediát (Wymore *et al.*, 2004). Z něj je hydridový ion přenesen na kofaktor ( $\text{NAD}^+$ , popř.  $\text{NADP}^+$ ), vzniká redukovaná forma ( $\text{NADH}$ , resp.  $\text{NADPH}$ ) a thioester. V posledním kroku této reakce je glutamátem aktivována molekula vody, která hydrolyticky štěpí thioesterovou vazbu a je uvolněn konečný produkt – příslušná kyselina (Tylichová *et al.*, 2010) (Obr. 8).



**Obr. 8. Schéma reakčního mechanismu hrachové AMADH.** Navázání  $\text{NAD}^+$  do specifického místa a oxidace substrátu (zde ABAL) (a). Vznik thiohemiacetalového intermediátu (b). Po redukci na  $\text{NADH}$  vzniká thioester (c). Hydrolýzou se uvolňuje aminokyselina (zde GABA) a enzym je regenerován (d) (Šebela *et al.*, 2000).

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**



### 3.1. Použité chemikálie

- 3-aminopropionaldehyd (Sigma-Aldrich, Německo)
- 4-aminobutyraldehyd (Sigma-Aldrich, Německo)
- 4-guanidinobutyraldehyd (syntetizoval prof. Šebela, Katedra biochemie, PŘF UP)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- B-PER (Thermo Scientific, USA)
- *n*-butanol (Lach-Ner, Česká Republika)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)
- DNAsa (Top-Bio, Česká Republika)
- dodecylsulfát sodný (Bio-Rad, USA)
- ethanol (Lach-Ner, Česká Republika)
- glukosa (Chemapol, Česká Republika)
- glycerol (Lach-Ner, Česká Republika)
- guanidin-HCl (AppliChem, Německo)
- chlorid hořečnatý (Lachema, Česká Republika)
- chlorid sodný (Lach-Ner, Česká Republika)
- imidazol (značka Fluka, dodavatel Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- inhibitor proteas (Sigma, Česká Republika)
- isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (Fermentas, Litva)
- kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká Republika)
- Luria-Bretani (LB) medium (Roth, Německo)
- lysozym (značka Fluka, dodavatel Sigma-Aldrich, USA)
- močovina (Lach-Ner, Česká Republika)
- *N,N'*-metylenbisakrylamid (Bio-Rad, USA)
- *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (Bio-Rad, USA)
- *N,N,N*-trimethyl-4-aminobutyraldehyd (syntetizoval prof. Šebela, Katedra biochemie PŘF UP)
- nikotinamidadenindinukleotid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- persíran amonný (značka Fluka, dodavatel Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- Persteril (Euro-Šarm, Česká Republika)
- Protein ladder 10-250 kDa (New England Biolabs, USA)
- RNAsa (Fermentas, Litva)
- streptomycin (Sigma-Aldrich, Německo)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan nebo-li Tris (MP Biomedicals, Francie)

### 3.2. Použité přístroje

- analytické váhy (Sartorius, Německo)
- centrifuga 5430 (Eppendorf, Německo)
- termostat 2-blokový (Labnet, USA)
- magnetická míchačka (IKA RET basic C, Německo)
- chlazená centrifuga 5430R (Eppendorf, Německo)
- minitřepačka MS 3 Basic (IKA, Německo)
- spektrofotometr UV-VISs (Agilent, USA)
- termostat lázněový (Merci, Česká Republika)
- digitální předvážky (OHAUS, Švýcarsko)
- transiluminátor VL-TFP (Eastport, Česká Republika)
- elektroforetická komůrka (Bio-Rad, USA)
- zdroj napětí (Bio-Rad, USA)
- centrifuga BENCHTOP 4-16 K (Sigma-Aldrich, USA)
- laminární box Faster (Schoeller, Česká republika)
- spektrofotometr Lightwave II UV/Visible (Biochrom, USA)
- termocykler (Eppendorf, Německo)
- minicentrifuga BLUE (Labnet, USA)
- pH metr pH526 (WTW, Česká Republika)
- digestoř (Merci, Česká republika)
- autokláv (Tuttnauer, Německo)
- sada pipet (Eppendorf, Německo)

### 3.3. Metody

#### 3.3.1. Produkce rekombinantní PsAMADH2 a její mutantní formy W288A

V experimentální části práce byly k produkci rekombinantního proteinu použity expresní buňky T7 express (New England Biolabs). Do nich byl vpraven vektor nesoucí sekvence genů kódující požadovaný protein. Byl jím pCDFDuet (Novagen, USA) poskytující exprimovanému proteinu histidinovou kotvu na N-konci. Tento biologický materiál byl poskytnut školitelem.

Kultivace bakteriální prekultury proběhla v Erlenmeyerově baňce o objemu 100 ml přes noc při 37°C za mírného třepání na třepačce. Bylo použito 20 ml Luria-Bretani (LB) media, do kterého byl přidán 1 ml 20% glukosy, 50 µl antibiotika streptomycinu (výsledná koncentrace tak byla 50 µg ml<sup>-1</sup>) a 10 µl zásobní kultury skladované při -80 °C. Další den byla prekultura přelita do sterilní falkony o objemu 50 ml a byla centrifugována (4000 x g, 5 min, 20 °C). Supernatant byl odlit (do nádoby s Persterilem sloužícím k dezinfekci) a sediment *E.coli* byla resuspendována v Erlenmeyerově baňce (objem 500 ml) s čistým sterilním LB médiem obsahujícím streptomycin (celkový objem media – 200 ml + 0,5 ml antibiotika). Poté proběhla inkubace na třepačce při 30 °C přibližně hodinu a čtvrt. Po uplynutí této doby byla na spektrofotometru změřena optická hustota při 600 nm (optical density OD<sub>600</sub>), jejíž ideální hodnota se má pohybovat mezi 0,5 a 0,6. To znamená, že se buňky dostatečně rozmnožily. Pak byl 1 ml této kultury (před indukcí) odebrán do čisté mikrozkušavky, centrifugován (4000 x g, 5 min, 20 °C), supernatant se odstranil a usazenina zamrazila. Do baňky se zbylou kulturou bylo přidáno 200 µl 0,5 M isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) (finální koncentrace 0,5 mM), který indukuje expresi genu kódujícího studovaný protein. Optimální teplota pro indukci je 20 °C, kultura byla inkubována na třepačce přes noc.

#### 3.3.2. Extrakce

Další den byla změřena optická hustota (OD<sub>600</sub>) – z indukované kultury byl odebrán 1 ml, který byl naředěn čistým LB médiem na stejnou koncentraci jako vzorek před indukcí.

Z tohoto vzorku byl odebrán 1 ml do čisté mikrozkušavky, proběhla centrifugace (4000 x g, 5 min, 20 °C), supernatant byl vylit a sediment zamražen. Zbylá kultura byla přelita do 0,5 l kyvet a centrifugována při 4000 x g a 4 °C po 20 min. Poté následovala extrakce. Supernatant byl vylit a k sedimentu byl přidán

0,9% NaCl, ve kterém byla resuspendována a následně centrifugována v 50 ml zkumavkách (4000 x g, 10 min, 4 °C). K takto získanému precipitátu bylo přidáno 1,25 ml 50 mM Tris-HCl pufru pH 8,0; 0,25 ml 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µl inhibitoru proteas a 1,45 ml vody (celkový objem směsi tak činil 3 ml). Po zvortexování se přidaly 3 ml lyzačního pufru B-PER (Thermo Scientific, USA). Směs byla znovu zvortexována, přidalo se 50 µl lysozymu o koncentraci 10 mg ml<sup>-1</sup>. Po promíchání a třicetiminutové inkubaci při laboratorní teplotě musí být směs gelovitá (pokud není, je nutné přidat lysozym). Obsah zkumavky byl poté doplněn 4 ml vody na konečný objem 10 ml, byl zvortexován a bylo přidáno 8 µl RNAsy a 8 µl DNAsy (oba zásobní roztoky měly koncentraci 10 µg ml<sup>-1</sup>). Směs byla promíchána a následně inkubována 30 min při 37 °C, čímž se konzistence změnila na tekutou. Poté byl přidán 1 ml 1 M NaCl (konečná koncentrace 100 mM) a 1 ml 50% glycerolu (konečná koncentrace 5%). Z takto vzniklého lyzátu byl odebrán 1 ml, který byl centrifugován (10000 x g, 10 min). Supernatant tvořila rozpustná frakce, jenž byla přenesena do čisté mikrozkušavky a usazenina (nerozpustná frakce nebo-li inkluzní tělíska) byla resuspendována v 1 ml 8 M močoviny. Zbylá směs byla centrifugována ve speciálních (Nalgene) kyvetách (12000 x g, 30 min, 4 °C).

### 3.3.3. Purifikace

Získaný supernatant, obsahující požadovaný protein, byl purifikován pomocí afinitní chromatografie. Na centrifugační kolonce naplněné sepharosou s navázanými Co<sup>2+</sup> ionty (HisPur Cobalt Spin Columns, Thermo Scientific, USA) se protein zachytil histidinovou kotvou, což je šest histidinů následujících za sebou v aminokyselinové sekvenci proteinu. Po několikanásobném promytí kolonky ekvilibračním pufrem (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl, 5% glycerol, 10 mM imidazol) byl nanesen supernatant z extrakce. Kolonka byla umístěna na rotátor a inkubována 1 hodinu při 4 °C. Poté byl obsah centrifugován (300 x g, 1 min) a frakce, která protekla, tzv. flow-through frakce (FT), byla odebrána a uschována. Pak se promytí ekvilibračním pufrem opakovalo třikrát a následně byl použit eluční pufr s vyšším obsahem imidazolu (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl, 5% glycerol, 250 mM imidazol). Kolonky byly inkubovány 30 min při 4 °C. Imidazol má k iontům kovu vysokou afinitu, a tak je při použití vysoké koncentrace imidazolu protein z vazby vytěsněn a uvolněn do eluátu. Eluce pomocí centrifugace byla provedena dvakrát. Tímto způsobem byly získány oba enzymy WT-PsAMADH2 a mutantní varianta W288A. Oba enzymy byly zakoncentrovány centrifugací na cca 1,5 ml pomocí centrifugačních filtrů Centricon Plus-70 10 kDa (Millipore, USA).

### 3.3.4. SDS-PAGE

K detekci a ověření úspěšné produkce obou proteinů byla použita elektroforeza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Tato metoda je založena na rozdílné elektroforetické pohyblivosti látek v elektrickém poli a na velikosti molekul (velké molekuly putují gelem pomaleji než malé).

Polyakrylamidový gel vzniká polymerační reakcí akrylamidu a *N,N'*-metylenbisakrylamidu (BIS). Tuto reakci zahajují volné radikály vznikající při rozkladu persíranu amonného (APS). Pro stabilizaci volných radikálů je do směsi nutné přidat *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiamin (TEMED).

Použitím SDS jsou proteiny rozpuštěny, denaturovány a mají jednotný záporný náboj. Dělení probíhalo v diskontinuálním systému, který je realizován dvěma gely (dělicím a zaostřovacím) o různém složení a pufrů o různém pH a iontové síle.

**Tab. 2. Složení dělicího a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE.**

Jednotlivé složky	Dělicí gel (12%) (ml)	Zaostřovací gel (4%) (ml)
AA/BIS (30%/0,8%)	4,00	0,65
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,50	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	1,25
H <sub>2</sub> O (deionizovaná)	3,20	2,95
SDS	0,10	0,10
TEMED	0,01	0,01
APS	0,06	0,06

Podle Tab. 2 byl připraven dělicí gel, který byl nanesen mezi skla. Pro odstranění přebytečné vody byl gel převrstven *n*-butanolem. Po proběhnutí polymerace (30 min) byl *n*-butanol vylit a ztuhlý gel opláchnut deionizovanou vodou. Poté byl připraven zaostřovací gel, který byl nanesen na dělicí gel a vsazením hřebínku byly vytvořeny jamky. Po třicetiminutové polymeraci byla skla vložena do elektroforetické komůrky. Do prostoru mezi skly a vně byl nalit elektroodový pufr (0,025 M Tris pH 8,3; 0,192 M glycin, 0,1% (w/v) SDS). Po vytažení hřebínku z gelu byly do jamek aplikovány vzorky – po 10  $\mu$ l připravených vzorků z extrakce a purifikace a 4  $\mu$ l kontrolního markeru. Elektroforetická komůrka byla uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Přibližně po 1 hodině byla elektroforeza ukončena. Vizualizace vzorků byla provedena pomocí barvicího roztoku Coomassie Brilliant

Blue, ve kterém byl gel ponechán přes noc. Další den byl odbarven směsí 35% methanolu a 10% kyseliny octové.

### 3.3.5. Spektrofotometrie v UV oblasti

#### 3.3.5.1. Stanovení koncentrace proteinů

Proteiny absorbují světlo v UV oblasti, tedy světlo o vlnových délkách 275 – 280 nm. Je to způsobeno přítomností vedlejších řetězců tyrosinu a tryptofanu.

Ze známé sekvence proteinu (Brauner *et al.*, 2003) byl pomocí programu ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) stanoven molární absorpční koeficient  $\epsilon$  a odpovídající absorbance proteinu při koncentraci 1 mg ml<sup>-1</sup>. Program vypočítá molární absorpční koeficient proteinu pomocí Edelhochovy metody (Edelhoch, 1967), ale s použitím molárních absorpčních koeficientů pro tryptofan a tyrosin určenými ve studii Pace *et al.* (1995). Pomocí absorbance stanovené tímto programem byla přímou úměrou vypočítána koncentrace získaných rekombinantních enzymů PsAMADH2 (v mg ml<sup>-1</sup>).

#### 3.3.5.2. Stanovení aktivity enzymů a porovnání substrátové specifity

Aktivita enzymů je udávána jako rychlost katalyzované reakce. Její jednotkou je 1 katal (kat), což je množství substrátu, které 1 mol enzymu přemění na produkt za 1 s. V praxi se používají jednotky  $\mu$ kat nebo nkat, jelikož je obvykle aktivita enzymů velmi malá.

Výchozí vzorec pro výpočet aktivity je definován Lambert-Beerovým zákonem – absorbance je přímo úměrná tloušťce vrstvy  $d$  a koncentraci vzorku  $c$  ( $\epsilon$  – molární absorpční koeficient).

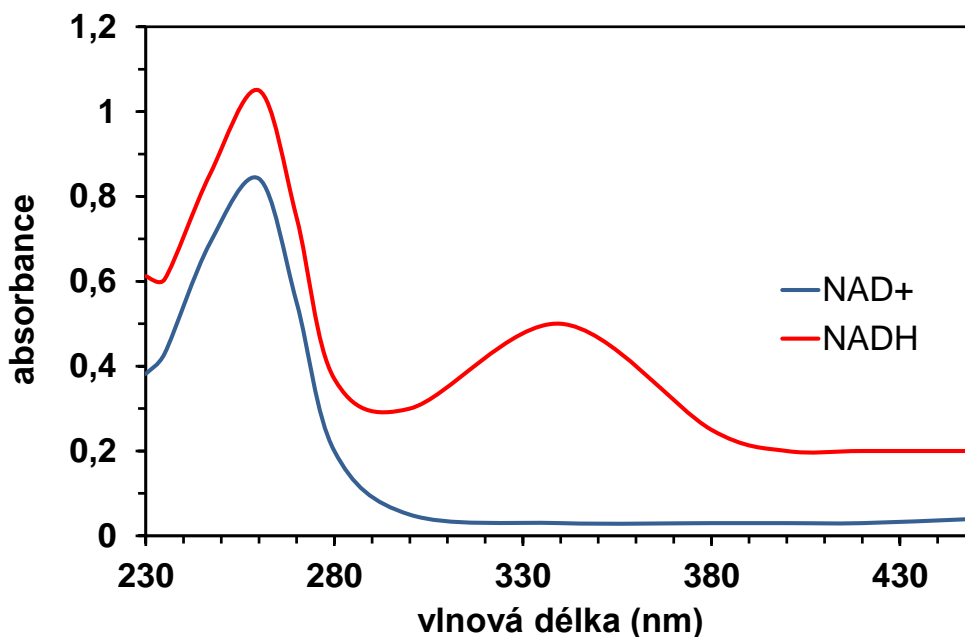
$$A = \epsilon \times c \times d$$

Úpravou tohoto vzorce vznikne vztah pro výpočet aktivity v kat:

$$a = \frac{\Delta A \times V}{\Delta t \times \epsilon \times l}$$

$\Delta A$  – změna absorbance,  $V$  – objem reakční směsi v kyvetě (l),  $\Delta t$  – reakční doba (s),  $\epsilon$  – molární absorpční koeficient (pro NADH = 6220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>),  $l$  – šířka kyvety (cm).

Principem měření je přeměna  $\text{NAD}^+$  na  $\text{NADH}$ , což se projeví změnou absorbance při 340 nm. Toto stanovení se nazývá Warburgův optický test (Awal *et al.*, 1997) (Obr. 9).



**Obr. 9. Princip Warburgova optického testu.** Vznikající  $\text{NADH}$  má absorpční maximum při 340 nm.

Reakční směs obsahovala 1,55 ml 0,15 M Tris-HCl pufru pH 9,0; 50  $\mu\text{l}$  20 mM  $\text{NAD}^+$ , deionizovanou vodu a enzym (takto připravená směs slouží jako slepý vzorek). Reakce byla startována přidáním substrátu (100 mM APAL, ABAL, TMABAL či GBAL) (Tab. 3). Celkový objem směsi v kyvetě byl 2 ml. Měření probíhalo při vlnové délce 340 nm. Pomocí změřené koncentrace proteinů byla aktivita přepočítána na specifickou (jednotka  $\text{nkat mg}^{-1}$ ).

**Tab. 3. Příprava substrátů.** Celkové množství bylo 1 ml a koncentrace 100 mM. APAL a ABAL diethylacetal jsou kapaliny, TMABAL diethylacetal jodid a GBAL diethylacetal uhličitán jsou pevné látky. Příprava byla dokončena přidavkem 0,2 M HCl a povařením na termobloku (100 °C, 10 min).

Substrát	Množství	0,2 M HCl ( $\mu\text{l}$ )
3-aminopropionaldehyd (APAL)	16,2 $\mu\text{l}$	983,8
4-aminobutyraldehyd (ABAL)	17,9 $\mu\text{l}$	982,1
<i>N,N,N</i> -trimethyl-4-aminobutyraldehyd (TMABAL)	33,1 mg	1000
4-guanidinobutyraldehyd (GBAL)	26,5 mg	1000

### 3.3.5.3. Stanovení pH optima a teplotní stability

Reakční směs pro stanovení pH optima obsahovala 1,55 ml 150 mM glycin/NaOH pufru, 50 µl 20 mM NAD<sup>+</sup>, 20 µl enzymu a 20 µl 100 mM substrátu APAL. Takto připravená směs byla doplněna deionizovanou vodou na objem 2 ml.

Pro zjištění teplotní stability byly oba enzymy inkubovány na termocykleru při různých teplotách (v rozmezí od 30,1 °C do 63,7 °C) po dobu 30 min. Teplota 4 °C byla dosažena inkubací na ledu. Poté byla spektrofotometricky (340 nm) změřena aktivita se substrátem APAL. Reakční směs obsahovala 1,55 ml 0,15 M Tris-HCl pH 9,0; 50 µl 20 mM NAD<sup>+</sup>, 20 µl enzymu a 360 µl deionizované vody. Reakce byla startována přidáním 20 µl 100 mM APAL (finální koncentrace v kvěťce byla 1 mM).

### 3.3.5.4. Stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů enzymů

Substrátová specifita byla testována u obou enzymů pro substráty ABAL, TMABAL a GBAL. Reakční směs obsahovala 1,55 ml 0,15 M Tris-HCl pH 9,0; 50 µl 20 mM NAD<sup>+</sup>, deionizovanou vodu a enzym. Stejně jako u měření aktivity byla reakce zahájena přidáním substrátu (zásobní roztoky všech substrátů měly koncentraci 2 mM). Substráty byly připraveny podle Tab. 3.

Kinetické parametry, které byly stanoveny, jsou  $K_m$  a  $V_{lim}$ .  $K_m$  je Michaelisova konstanta, jež je definována jako koncentrace substrátu, při níž je rychlost enzymové reakce poloviční oproti limitní rychlosti.  $V_{lim}$  je limitní nebo též mezní rychlost reakce. Tyto konstanty jsou zahrnuty v rovnici Michaelise a Mentenové:

$$v_0 = \frac{V \times [S]}{K_m + [S]}$$

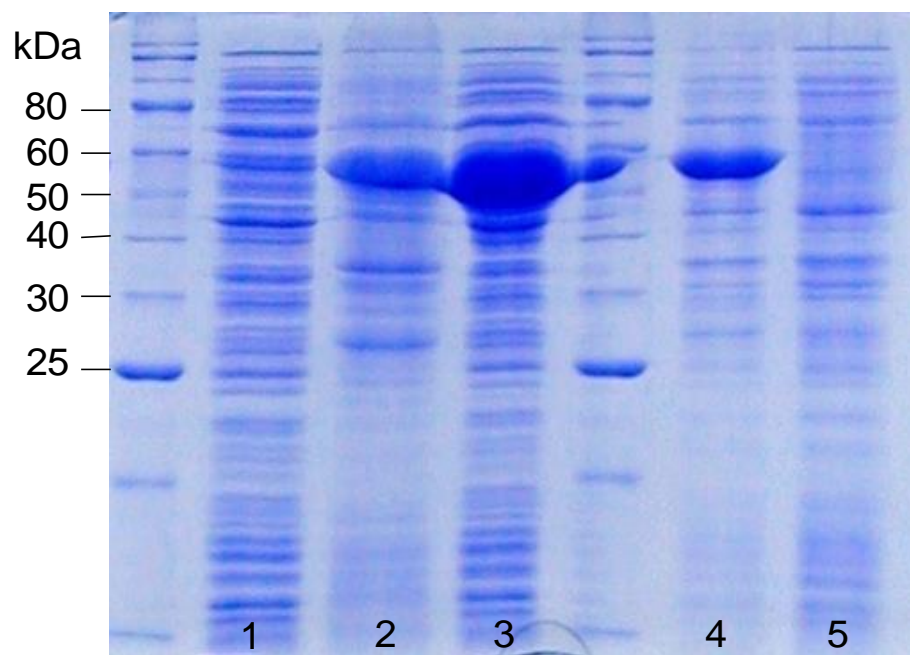
$K_m$  a  $V_{lim}$  byly stanoveny pro oba enzymy se třemi substráty – ABAL, TMABAL a GBAL. Jejich výpočet byl proveden pomocí nelineární regrese v softwaru GraphPad Prism 5. Dále bylo určeno, zda je enzym při vyšších koncentracích substrátu v saturaci nebo inhibici.



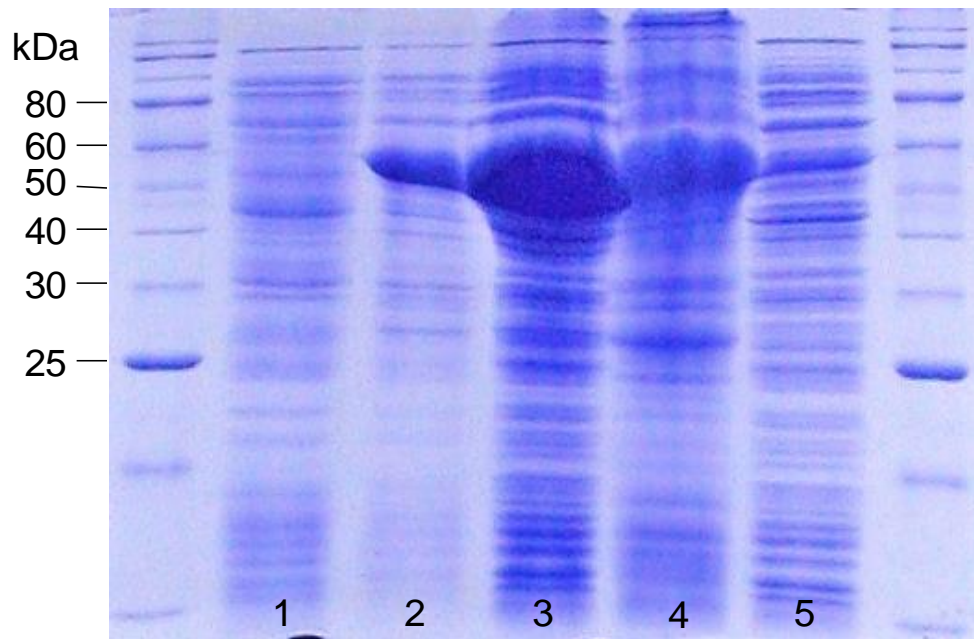
### 3.4. Výsledky

#### 3.4.1. SDS-PAGE

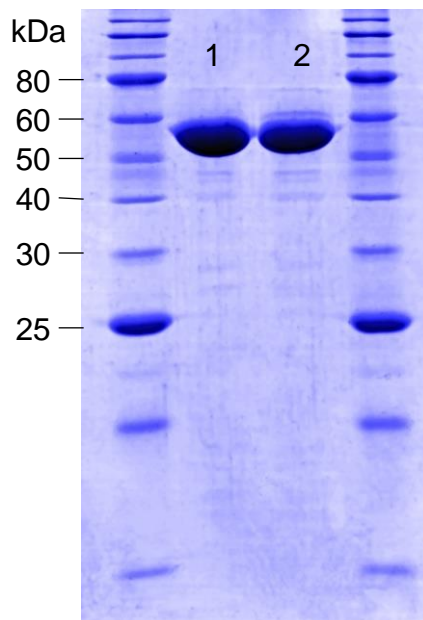
Metodou SDS-PAGE byly analyzovány vzorky získané při extrakci a purifikaci enzymů WT-PsAMADH2 (Obr. 10) a W288A (Obr. 11). Vzorky bakterií před indukcí a po indukci IPTG byly rozpuštěny v 50  $\mu$ l 8 M močoviny a poté bylo přidáno 50  $\mu$ l vzorkovacího pufru (složení – 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,01% (w/v) bromfenolová modř, 2% (w/v) SDS, 25% (w/v) glycerol). Z každého dalšího vzorku – rozpustná frakce, inkluzní tělíska, flow-through frakce (FT) a eluát – bylo odebráno 50  $\mu$ l. Poté bylo přidáno 50  $\mu$ l vzorkovacího pufru. Takto připravené směsi byly inkubovány na termobloku 10 min při 100  $^{\circ}$ C, čímž byla dokončena denaturace proteinů, a po vychladnutí byly centrifugovány na mikrocentrifuze. Zvlášť byly analyzovány proteiny v eluátu (Obr. 12). Vzorky byly do jamek aplikovány po 10  $\mu$ l, marker po 4  $\mu$ l. Gely byly barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue. Použitým proteinovým markerem byl Protein ladder 10-250 kDa (New England Biolabs).



**Obr. 10. SDS-PAGE jednotlivých vzorků získaných při extrakci a purifikaci WT-PsAMADH2.** Do levé jamky byl nanesen marker. Dále byla separována frakce, která se při první purifikaci nezachytala na kolonce, tzv. flow-through (FT) (1); nerozpustná frakce nebo-li inkluzní tělíska (2); rozpustná frakce (3), bakteriální kultura po indukci IPTG (4), bakteriální kultura před indukcí (5). Přítomnost mnoha bendů v dráze 1 je způsobena balastními proteiny obsaženými ve frakci FT. Rozšíření bendu z dráhy 3 do vedlejších drah bylo zapříčiněno nepřesným pipetováním. Bylo ověřeno, že po přidání IPTG byla indukována exprese genu, o čemž svědčí přítomnost bendu v dráze 4.



**Obr. 11. SDS-PAGE jednotlivých vzorků získaných při extrakci a purifikaci W288A.** Bakteriální kultura před indukcí IPTG (1), bakteriální kultura po indukci (2), rozpustná frakce (3), nerozpustná frakce – inkluzní tělíska (4), flow-through frakce (FT) (5). Stejně jako u předchozího obrázku je zde patrný bend signalizující indukci exprese (dráha 2). Deformace bendů v drahách 2 a 4 je způsobena velkým množstvím proteinů v rozpustné fázi (3). Frakce FT obsahovala mnoho nespecifických proteinů, proto je v této dráze velký počet bendů.



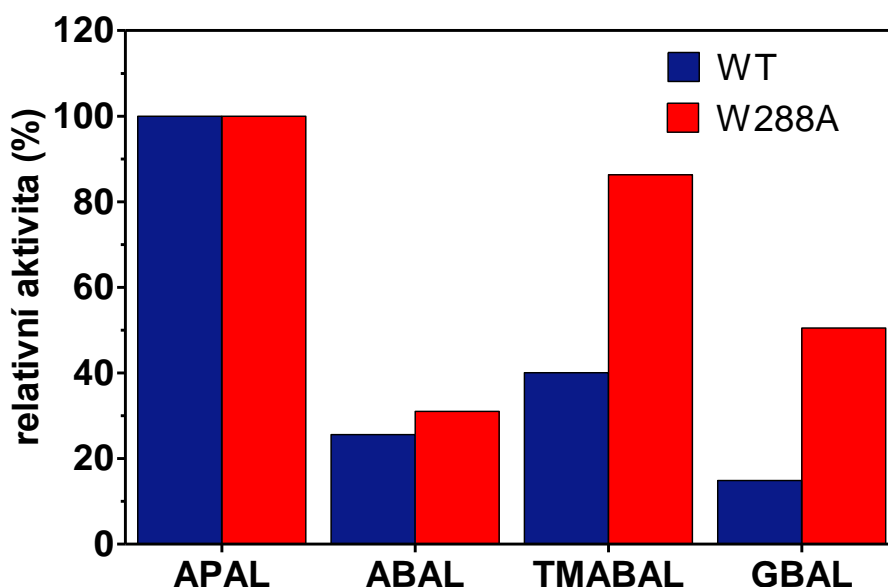
**Obr. 12. Detekce získaných proteinů v eluátu po purifikaci afinitní chromatografií pomocí SDS-PAGE.** V první dráze se nachází WT-PsAMADH2 a ve druhé W288A. Molekulová hmotnost odečtená z gelu je přibližně 55 kDa. Gel vykazuje přítomnost minimálních nečistot.

### 3.4.2. Stanovení koncentrace proteinů

V křemenné kyvetě bylo proměřeno spektrum od 190 nm do 1100 nm a byla odečtena absorbance při 280 nm. Pomocí absorbance (odpovídající koncentraci 1 mg ml<sup>-1</sup>) vypočítané programem ProtParam byla přímou úměrou vypočítána koncentrace rekombinantních PsAMADH2, která činila 5,43 mg ml<sup>-1</sup> pro WT-PsAMADH2 a 5,78 mg ml<sup>-1</sup> pro W288A.

### 3.4.3. Porovnání substrátové specifity

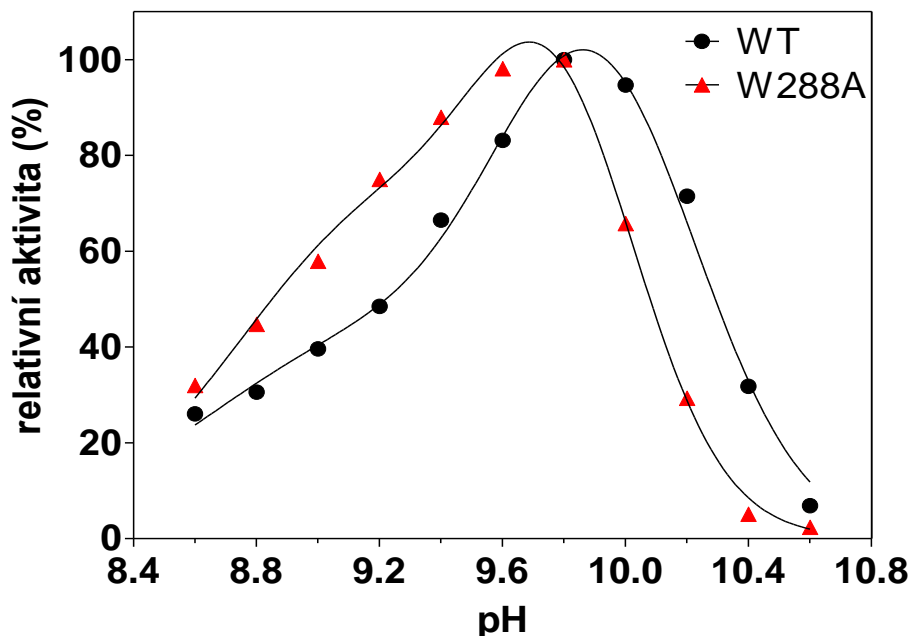
Aktivita byla stanovena relativně vzhledem k substrátu APAL, jelikož při reakci s ním oba enzymy vykazovaly největší aktivitu. WT-PsAMADH2 i W288A byly při reakci se substrátem ABAL přibližně stejně aktivní. TMABAL a GBAL se jeví jako lepší substráty pro W288A. Aktivita této mutantní varianty enzymu byla v porovnání s WT-PsAMADH2 v případě substrátu TMABAL dvojnásobná a u GBAL trojnásobná (Obr. 13).



**Obr. 13. Porovnání aktivit WT-PsAMADH2 a W288A se čtyřmi substráty.** Měření bylo provedeno v přítomnosti 0,5 mM NAD<sup>+</sup>. Konečná koncentrace substrátů v kyvetě byla 1 mM. Změřené specifické aktivity enzymů se substrátem APAL: 47,8 nkat mg<sup>-1</sup> pro WT-PsAMADH2 a 54,5 nkat mg<sup>-1</sup> pro W288A.

### 3.4.4. pH optimum

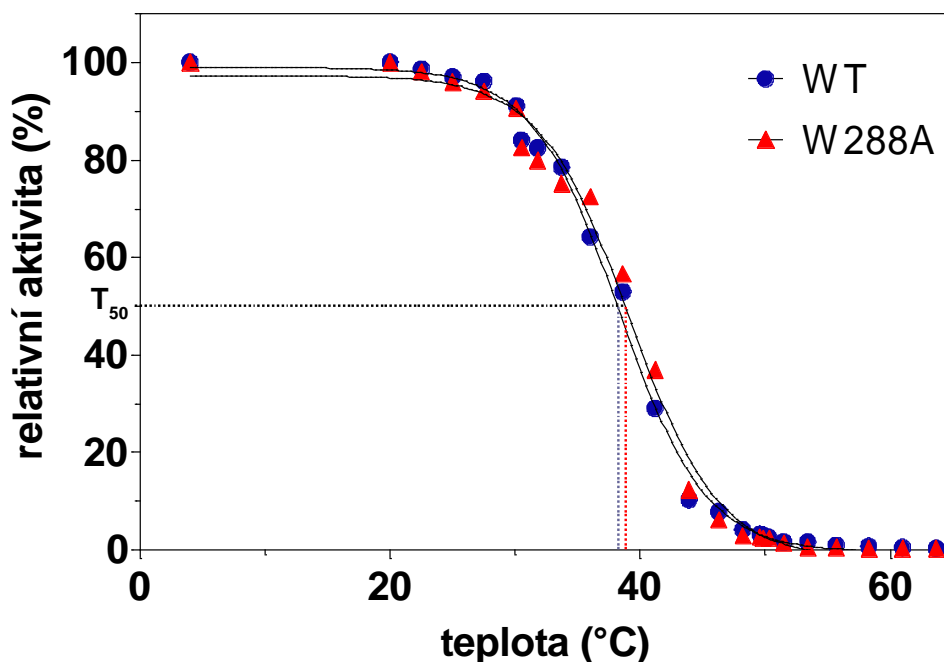
Měření bylo provedeno v rozmezí hodnot pH 8,6 – 10,6. Stanovené pH optimum má pro WT hodnotu přibližně 9,85 a pro W288A 9,70 (Obr. 14).



Obr. 14. pH optimum studovaných enzymů. pH optimum bylo měřeno ve 150 mM glycin/NaOH pufrch o rozmezí pH 8,6 – 10,6 v přítomnosti 0,5 mM  $\text{NAD}^+$  s 1 mM substrátem APAL.

### 3.4.5. Teplotní stabilita

Pro zjištění teplotní stability byly oba enzymy inkubovány v termocykleru při různých teplotách (v rozmezí od 30,1 °C do 63,7 °C) po dobu 30 min. Teplota 4 °C byla dosažena inkubací na ledu. Poté byla spektrofotometricky změřena aktivita se substrátem APAL. Oba enzymy byly stabilní jen při nižších teplotách. Při inkubaci při teplotě nad 50 °C nevykazovaly zbytkovou aktivitu. Pomocí softwaru Origin 8 byla určena teplota  $T_{50}$ , což je teplota, při které zůstává enzym po 30 min inkubaci z 50 % aktivní. Pro WT-PsAMADH2 má hodnotu 38,2 °C a pro W288A 39,1 °C (Obr. 15).



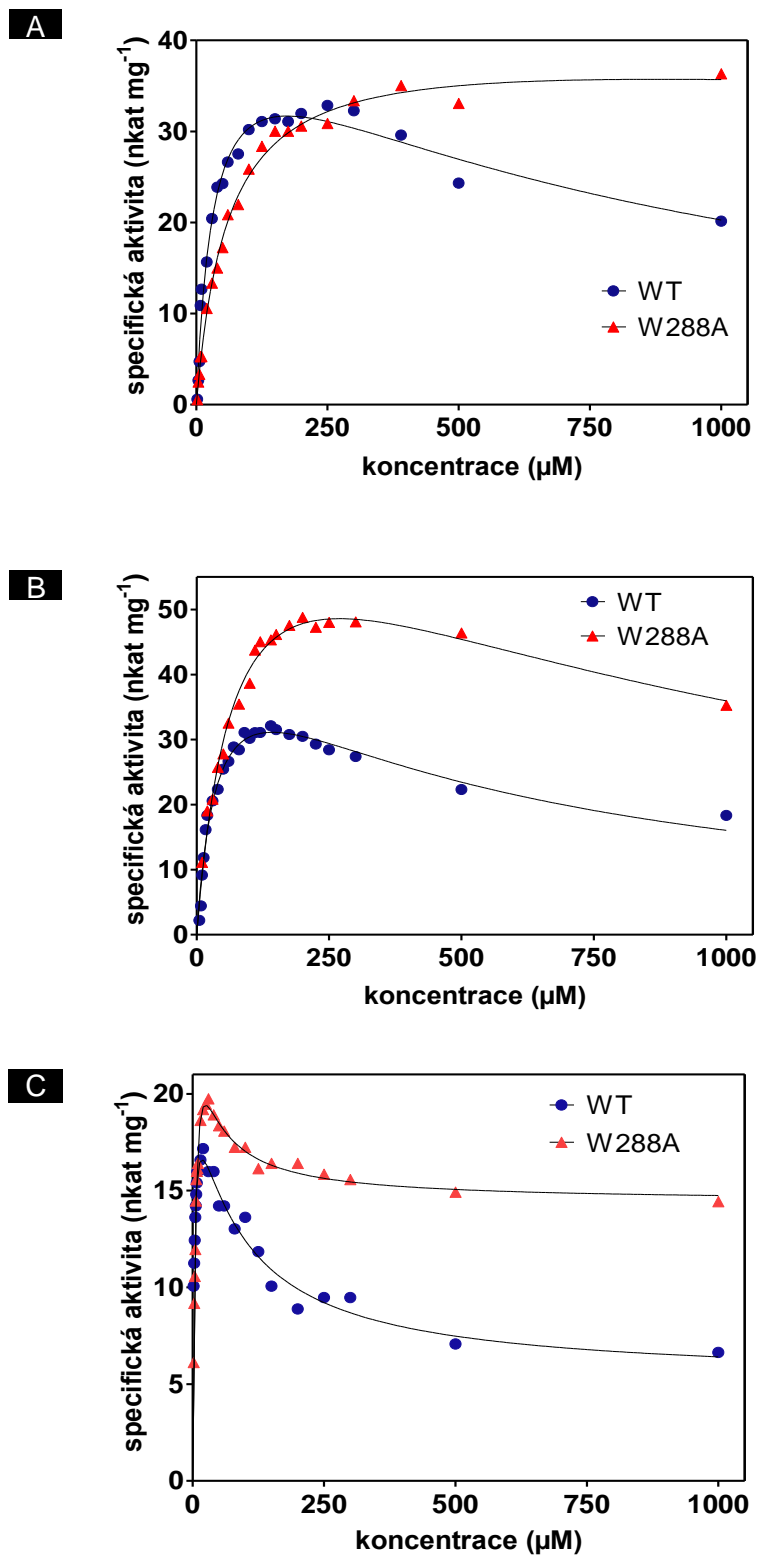
**Obr. 15. Teplotní stabilita WT-PsAMADH2 a mutantní formy W288A.** Aktivita enzymů byla měřena se substrátem APAL (koncová koncentrace v kyvetě byla 1 mM) v přítomnosti 0,5 mM NAD<sup>+</sup>.

### 3.4.6. Stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů enzymů

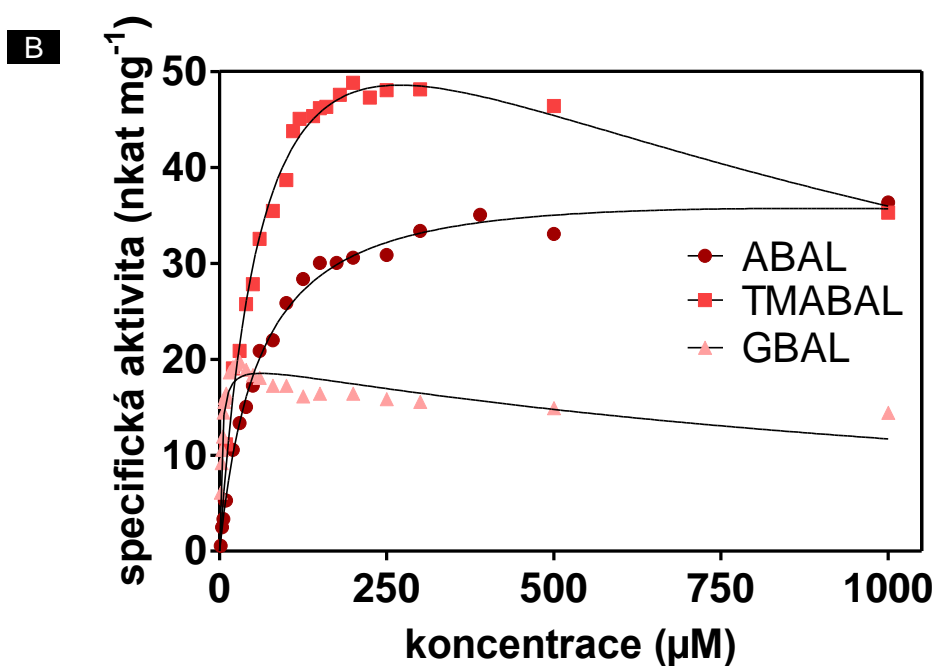
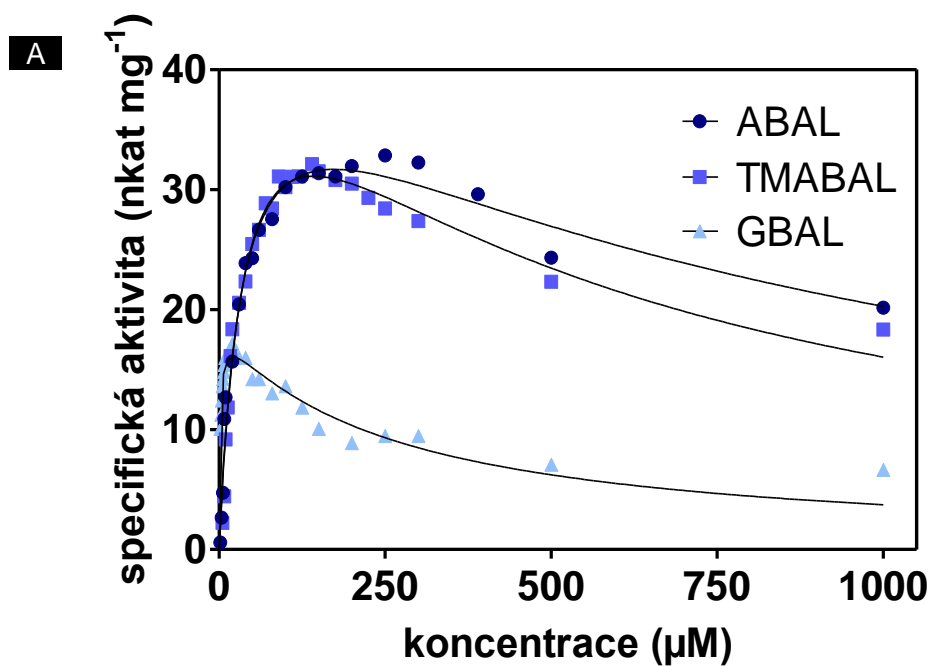
Měření probíhalo při 340 nm v křemenné kyvetě v 0,15 M Tris-HCl pufru pH 9,0 s 0,5 mM kofaktorem NAD<sup>+</sup>. Reakce byla zahájena přidavkem substrátu (příprava podle Tab. 3). Výpočet Michaelisovy konstanty  $K_m$  a limitní rychlosti  $V_{lim}$  byl proveden nelineární regresí v softwaru GraphPad Prism 5 (Tab. 4). Saturační křivky jsou vynesemím závislosti specifické aktivity na koncentraci substrátu (Obr. 16, Obr. 17)

**Tab. 4. Hodnoty kinetických parametrů  $K_m$  a  $V_{lim}$  pro oba enzymy s uvedenými substráty.** Jednotkou  $K_m$  je  $\mu\text{M}$  a  $V_{lim}$   $\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

	WT-PsAMADH2			W288A		
	$K_m$	$V_{lim}$	$V_{lim}/K_m$ (relativní)	$K_m$	$V_{lim}$	$V_{lim}/K_m$ (relativní)
ABAL	$34 \pm 5$	$44 \pm 2,5$	0,15	$61 \pm 4,8$	$41 \pm 1,3$	0,17
TMABAL	$41 \pm 5$	$49 \pm 2,8$	0,14	$74 \pm 8$	$75 \pm 4$	0,26
GBAL	$2,6 \pm 0,3$	$22 \pm 0,9$	1	$8,8 \pm 1,1$	$34 \pm 2,3$	1



**Obr. 16. Saturační křivky obou enzymů s jednotlivými substráty.** Substrátová specifická byla měřena při 340 nm v přítomnosti 0,5 mM NAD<sup>+</sup> se substráty ABAL (A), TMABAL (B) a GBAL (C). Ve všech případech je pozorovatelná inhibice substrátem, kromě reakce ABAL s W288A (inhibice pravděpodobně nastává při vyšších koncentracích substrátu).



Obr. 17. Saturační křivky obou enzymů – porovnání reakce všech substrátů s enzymem. Reakce substrátů ABAL, TMABAL a GBAL o různé koncentraci s WT-PsAMADH2 (A) a W288A (B). Měření probíhalo při 340 nm v přítomnosti 0,5 mM NAD<sup>+</sup>. Ve všech případech nastává inhibice substrátem. Výjimkou je situace, kdy reaguje ABAL s W288A – inhibice se pravděpodobně projeví při koncentracích vyšších než 1000 μM.

## 4. DISKUZE

WT-PsAMADH2 a mutantní varianta W288A byly exprimovány a následně purifikovány afinitní chromatografií. Poté byly podrobeny analýze metodou SDS-PAGE, čímž byla ověřena účinnost purifikace, neboť gel nevykazoval skoro žádnou přítomnost balastních proteinů v drahách, ve kterých migrovaly získané proteiny. Teoretická molekulová hmotnost monomeru stanovená ze sekvence je 54,5 kDa. Molekulová hmotnost odečtená z gelu je přibližně stejná (kolem 55 kDa). AMADH, které byly podrobeny analýze v jiných studiích, např. AMADH z lilku rajčete (*Solanum lycopersicum*, SIAMADH), kukuřičné AMADH (*Zea mays*, ZmAMADH; Kopečný *et al.*, 2013), vyskytující se ve třech izoformách (ZmAMADH1a, ZmAMADH1b a ZmAMADH2) a AMADH z ovsa setého (*Avena sativa*; Livingstone *et al.*, 2002), mají stejnou molekulovou hmotnost jako PsAMADH2.

Dále byla stanovena koncentrace proteinů po zahuštění, jenž činila 5,43 mg ml<sup>-1</sup> pro WT-PsAMADH2 a 5,8 mg ml<sup>-1</sup> pro W288A. Na základě těchto hodnot byla počítána specifická aktivita enzymů, která činila 47,8 nkat mg<sup>-1</sup> pro WT-PsAMADH2 a 54,5 nkat mg<sup>-1</sup> pro W288A (měřeno se substrátem APAL o koncentraci 1 mM). pH optimum obou enzymů bylo téměř identické, mělo hodnoty 9,85 pro WT-PsAMADH2 a 9,7 pro W288A. pH optima ZmAMADH1a, ZmAMADH2 a SIAMADH2 jsou podobná pH optima PsAMADH2, pohybují se v rozmezí 9,4 – 9,8. SIAMADH1 a ZmAMADH1b mají toto optimum posunuto k zásaditějším hodnotám, pH ~ 10,2 (Kopečný *et al.*, 2013). Naproti tomu je pH optimum AMADH z *Avena sativa* o něco nižší (pH 8,6) (Livingstone *et al.*, 2002).

Teplotní stabilitou se enzymy od sebe nelišily. Stabilní byly přibližně do 35°C. Aktivita enzymů inkubovaných při vyšších teplotách strmě klesala. Hodnota T<sub>50</sub> (tj. teplota, při které zůstává enzym po třicetiminutové inkubaci z poloviny aktivní) byla 38,2 °C a 39,1 °C pro WT-PsAMADH2, resp. W288A. AMADH z *Avena sativa* se ve stabilitě od PsAMADH2 neliší. ZmAMADH1 je také stabilní přibližně stejně jako PsAMADH2, zatímco ZmAMADH2 je z tohoto hlediska nestandardní, protože je stabilní až do 55 °C (Lakomá, 2010).

Dále bylo provedeno srovnání substrátové specifity měřením aktivity obou enzymů s 1 mM substráty APAL, ABAL, TMABAL a GBAL. Nejlépe byl oxidován APAL, a tak byla aktivita vztažena relativně vzhledem k tomuto substrátu. Pokles aktivity WT při reakci s ostatními substráty byl značný. Rychlost oxidace substrátu TMABAL byla 40%. ABAL byl přeměňován čtvrtinovou rychlostí a nejméně preferovaný GBAL pouze 15% rychlostí vůči APAL. ABAL byl mutantem W288A



oxidován přibližně stejně rychle jako u WT (31 %). Výrazná změna je pozorovatelná u dalších dvou substrátů. Aktivita W288A s TMABAL je více než dvojnásobná (86 %) a s GBAL je dokonce přibližně trojnásobná (50 %) než aktivita WT. Ve srovnání se SIAMADH se hrachová AMADH v mnoha případech liší. SIAMADH1, která má na pozici 288 alanin (číslování podle sekvence PsAMADH2), vykazuje nejvyšší aktivitu se substrátem ABAL. APAL je také velmi dobře oxidován, ale aktivita s TMABAL a GBAL je nižší (30 %, resp. 50 % oproti ABAL). Na pozici 288 se u SIAMADH2 nachází tryptofan (stejně jako u WT-PsAMADH2) a preferenčním substrátem je APAL. Aktivita při reakci se substráty ABAL, TMABAL i GBAL je méně než poloviční. ZmAMADH upřednostňují stejně jako PsAMADH2 APAL. První dvě výše zmíněné izoformy ZmAMADH, obsahující také W288, vykazují nižší aktivitu se substráty ABAL a TMABAL, než je aktivita W288A. ZmAMADH2 (A288) projevuje aktivitu stejnou. GBAL je všemi ZmAMADH přeměňován velmi pomalu (Kopečný *et al.*, 2013), kdežto u W288A je rychlost cca trojnásobná.

Nakonec byly ze saturačních křivek stanoveny kinetické parametry  $K_m$  a  $V_{lim}$ . Ve srovnání saturačních křivek všech substrátů s jednotlivými enzymy (Obr. 18) je patrný rozdíl v aktivitě WT-PsAMADH2 a W288A s TMABAL. V případě mutantu je  $K_m$  (Tab. 4) podstatně vyšší. Stejně tak je  $K_m$  vyšší i pro ABAL a GBAL. Afinita k použitým substrátům je menší než u WT-PsAMADH2. Na základě poměru  $V_{lim}/K_m$  lze vyvodit, že nejlépe přijímaným substrátem oběma enzymy je GBAL. Hodnota tohoto poměru pro ABAL je u obou enzymů prakticky stejná a mutace nemá na preferenci tohoto substrátu prakticky žádný vliv. TMABAL je upřednostňován mutantem, jelikož je poměr  $V_{lim}/K_m$  dvojnásobný oproti WT-PsAMADH2. Vliv mutace se zde projevil.

Tryptofan na pozici 288 v AMADH studovaných v Kopečný *et al.* (2013) může být zaměněn za alanin či fenylalanin. Tato pozice je variabilní. ZmAMADH2 a SIAMADH1 obsahující na tomto místě alanin preferují TMABAL stejně jako PsAMADH1, která obsahuje fenylalanin (Tylichová *et al.*, 2010). Hodnoty  $K_m$  pro APAL a ABAL byly vyšší než pro TMABAL, APAL a ABAL byly tedy oxidovány pomaleji. Lze říci, že důvodem preference substrátu TMABAL enzymy bez tryptofanu (na místě 288) je zvětšený průměr substrátového kanálu, a tak dochází k oslabení  $\pi$ -elektronových interakcí mezi reziduem nacházejícím se v této pozici a elektrofilní aminoskupinou substrátu.

## 5. ZÁVĚR

V rámci této práce byla sepsána literární rešerše na téma aminoaldehydy a jejich metabolismus v rostlinách. Dále byly popsány aldehyddehydrogenasy z hlediska klasifikace. Podrobněji byly charakterizovány aminoaldehyddehydrogenasy, které patří do rodiny ALDH10. Dále je popsána substrátová specifita, mechanismus reakce AMADH se substrátem a struktura AMADH z hrachu setého – PsAMADH – což je prozatím nejprostudovanější aminoaldehyddehydrogenasa.

V experimentální části byly předmětem studia dva rekombinantní enzymy z hrachu setého (*Pisum sativum*) – WT-PsAMADH2 a její mutantní varianta W288A. Po produkci, extrakci a purifikaci byly podrobeny studiu pH optima, teplotní stability a substrátové specifity, a to metodou spektrofotometrie. Pomocí SDS-PAGE byla stanovena molekulová hmotnost. Dále byly stanoveny kinetické vlastnosti těchto PsAMADH2 – Michaelisova konstanta  $K_m$  a limitní rychlost  $V_{lim}$ . Na základě hodnot kinetických parametrů a poměru  $V_{lim}/K_m$  bylo určeno, že oba enzymy vykazují největší afinitu k substrátu GBAL.

## 6. LITERATURA

- Awal H. M. A., Kinoshita T., Yoshida I., Doe M., Hirasawa E. (1997) Aminoaldehyde dehydrogenase of pea epicotyls. *Phytochemistry* **44**, 997-1000.
- Bartels D., Sunkar R. (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **24**, 23-58.
- Bieganski T., Osinska Z., Maslinski C. (1982) Inhibition of plant and mammalian diamine oxidases by hydrazine and guanidine compounds. *Int. J. Biochem.* **14**, 949-953.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* **140**, 103-125.
- Bradbury L. M. T., Gillies S. A., Brushett D. J., Waters D. L. E., Henry R. J. (2008) Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant Mol. Biol.* **68**, 439-449.
- Brauner F., Šebela M., Snégaroff J., Peč P., Meunier J. C. (2003) Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 1-10.
- Brocker C., Vasiliou M., Carpenter S., Carpenter C., Zhang Y., Wang X., Kotchoni S. O., Wood A. J., Kirch H. H., Kopečný D., Nebert D. W., Vasiliou V. (2013) Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* **237**, 189-210.
- Capell T., Bassie L., Christou P. (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9909-9914.
- Duhazé C., Gouzerh G., Gagneul D., Larher F., Bouchereau A. (2002) The conversion of spermidine to putrescine and 1,3-diaminopropane in the roots of *Limonium tataricum*. *Plant Sci.* **163**, 639-646.
- Edelhoch H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948-1954.
- Fecker L. F., Rügenhagen C., Berlin J. (1993) Increased production of cadaverine and anabasine in hairy root cultures of *Nicotiana tabacum* expressing a bacterial lysine decarboxylase gene. *Plant Mol. Biol.* **23**, 11-21.

- Floris G., Giartosio A., Rinaldi A. (1983) Diamine oxidase from *Lens esculenta* seedlings – purification and properties. *Phytochemistry* **22**, 1871-1874.
- Gao Z. G., Loescher W. H. (2000) NADPH supply and mannitol biosynthesis. Characterization, cloning, and regulation of the non-reversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in celery leaves. *Plant Physiol.* **124**, 321-330.
- Hill J. M., Mann P. J. G. (1964) Further properties of diamine oxidase of pea seedlings. *Biochem. J.* **91**, 171-182.
- Chen Z. W., Schwartz B., Williams N. K., Klinman J. P., Mathews F. S. (2000) Crystal structure at 2.5 Å resolution of zinc-substituted copper amine oxidase of *Hansenula polymorpha* expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **39**, 9709-9717.
- Icharoensakdi A., Matsuda N., Hibino T., Meng Y. L., Ishikawa H., Hara A., Funaguma T., Takabe T. (2000) Overproduction of spinach betaine aldehyde dehydrogenase in *Escherichia coli* – structural and functional properties of wild.type, mutants and *E.coli* enzymes. *Eur. J. Biochem.* **267**, 7015-7023.
- Kasukabe Y., He L. X., Nada K., Misawa S., Ihara I., Tachibana S. (2004) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 712-722.
- Kasukabe Y., He L., Watakabe Y., Otani M., Shimada T., Tachibana S. (2006) Improvement of environmental stress tolerance of sweet potato by introduction of genes for spermidine synthase. *Plant Biotechnol.* **23**, 75-83.
- Klinman J. (2003) The multi-functional topa-quinone copper amine oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1647**, 131-137.
- Kopečný D., Končítíková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Soral M., Šebela M., Moréra S. (2013) Plant ALDH10 family: identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *J. Biol. Chem.* **288**, 9491-9507.
- Kopečný D., Tylichová M., Snégaroff J., Popelková H., Šebela M. (2011) Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high affinity binding of  $\omega$ -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *FEBS J.* **278**, 3130-3139.
- Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**, 367-381.

Lakomá P. (2010) Charakterizace aminoaldehyddehydrogenasy z kukuřice seté. Diplomová práce, PřF Univerzita Palackého.

Landry J., Sternglanz R. (2003) Yeast Fms1 is a FAD-utilizing polyamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 771-776.

Li R., Klinman J. P., Mathews F. S. (1998) Copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha*: the crystal structure determined at 2.4 Å resolution reveals the active conformation. *Structure* **6**, 293-307.

Liu K., Fu H. H., Bei Q. X., Luan S. (2000) Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol.* **124**, 1315-1325.

Livingstone J. R., Yoshida I., Tarui Y., Hirooka K., Yamamoto Y., Tsutui N., Hirasawa E. (2002) Purification and properties of aminoaldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *J. Plant Res.* **115**, 393-400.

Mann P. J. G. (1960) Further purification and properties of the amine oxidase of pea seedlings. *Biochem. J.* **79**, 623-631.

Medda R., Padiglia A., Floris G. (1995) Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* **39**, 1-9.

Mehta R. A., Cassol T., Li N., Ali N., Handa A. K., Matto A. K. (2002) Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nat. Biotechnol.* **20**, 613-618.

Missihoun T. D., Schmitz J., Klug R., Kirch H.H., Bartels D. (2011) Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta* **233**, 369-382.

Mitsuya S., Yokota Y., Fujiwara T., Mori N., Takabe T. (2009) OsBADH1 is possibly involved in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes. *FEBS Lett.* **583**, 3625-3629.

Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. (1995) How to measure and predict the molar absorption-coefficient of a protein. *Protein Sci.* **11**, 2411-2423.

Rinaldi A., Floris G., Finazziagro A. (1982) Purification and properties of diamine oxidase from *Euphorbia latex*. *Eur. J. Biochem.* **127**, 417-422.

Shin J. H., Kim S. R., An G. (2009) Rice aldehyde dehydrogenase 7 is needed for seed maturation and viability. *Plant Physiol.* **149**, 905-915.

- Suzuki S., Sakurai T., Nakahara A., Manabe T., Okuyama T. (1984) Roles of the 2 copper ions in bovine serum amine oxidase. *Biochemistry* **25**, 338-341.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000) Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1480**, 329-341.
- Šebela M., Frébort I., Peč P. (1998) Nové poznatky o kofaktorech Cu-aminoxidas jako příspěvek k biochemii proteinů. *Chem. Listy* **92**, 698-710.
- Šebela M., Radová A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001) FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Sci.* **160**, 197-207.
- Tavladoraki P., Rossi M. N., Saccuti G., Perez-Amador M. A., Polticelli F., Angelini R., Federico R. (2006) Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiol.* **141**, 1519-1532.
- Tavladoraki P., Schinina M. E., Cecconi F., Di Agostino S., Manera F., Rea G., Mariottini P., Federico R., Angelini R. (1998) Maize polyamine oxidase: primary structure from protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett.* **426**, 62-66.
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010) Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *J. Mol. Biol.* **396**, 870-882.
- Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M. (2007) Aminoaldehyde dehydrogenases: has the time now come for new interesting discoveries? *Curr. Topics Plant Biol.* **8**, 45-70.
- Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K. F., Nebert D. W. (1999) Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* **9**, 421-434.
- Vaz F. M., Fouchier S. W., Ofman R., Sommer M., Wanders R. J. A. (2000) Molecular and biochemical characterization of rat  $\gamma$ -trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 7390-7394.

Vujcic S., Diegelman P., Bacchi C. J., Kramer D.L., Porter C.W. (2002) Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem. J.* **367**, 665-675.

Weigel P., Weretilnyk E. A., Hanson A. D. (1986) Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **82**, 753-759.

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

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	akrylamid/bisakrylamid
ABAL	4-aminobutyraldehyd
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
APAL	3-aminopropionaldehyd
APBAL	<i>N</i> -(3-aminopropyl)-4-aminobutyraldehyd
APS	persíran amonný
AVAL	5-aminovaleraldehyd
BAL	betinaldehyd
B-PER	bacterial protein extraction reagent
CAO	aminoxidasa obsahující měď
CoA	koenzym A
DAO	diaminoxidasa
Dap	1,3-diaminopropan
DMSP	3-dimethylsulfoniopropionát
DMSPAL	3-dimethylsulfoniopropionaldehyd
FAD	flavinadenindinukleotid
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
GBAL	4-guanidinobutyraldehyd
HPAO	aminoxidasa z <i>Hansenula polymorpha</i>
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
NAD(H)	nikotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PAO	polyaminoxidasa
SDS	dodecylsulfát sodný
SMO	sperminoxidasa
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TMABAL	<i>N,N,N</i> -trimethyl-4-aminobutyraldehyd
TPQ	topachinon