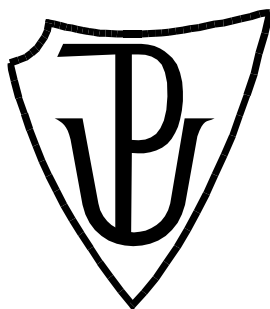


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Nové substráty rostlinných
aminoaldehyddehydrogenas**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Martina Dybalová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské 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

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Janu Frömmelovi, Ph.D. za pomoc, ochotu a trpělivost při vypracovávání mé bakalářské práce. Rovněž děkuji Mgr. Martině Kopečné, Ph.D. za poskytnutí rekombinantních kultur *Escherichia coli* a Mgr. Martinu Rausovi, Ph.D. za záchranu dat z mého poškozeného počítače.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martina Dybalová
Název práce	Nové substráty rostlinných aminoaldehyddehydrogenas
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná
Vedoucí práce	Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy jsou enzymy podílející se na několika metabolických drahách např. degradaci polyaminů, cholinu či lysinu. Díky tvorbě osmoprotektivních látek se rovněž podílí na ochraně rostlin před abiotickým stresem jako je chlad, vysoké teploty, salinita atd. Jejich substrátová specifita je velmi široká, mimo přirozené substráty ω -aminoaldehydy, betain aldehyd či γ -guanidinobutyraldehyd, oxidují i řadu syntetických substrátů, včetně aromatických a heterocyklických aldehydů. V rámci superrodiny aldehyddehydrogenas se řadí společně s houbovými isoenzymy do rodiny ALDH 10 separátně od živočišných aminoaldehyddehydrogenas, tvořících rodinu ALDH9.

V rámci této práce byly testovány 3 aldehydy odvozené od 3-fenylpropanalu či od 3-karbamoylpropanalu jakožto substrátů aminoaldehyddehydrogenas pocházejících z hrachu a rajčete. Ve všech případech byly tyto substráty oxidovány, přičemž nejlépe je oxidovala SIAMADH1. Lepšími substráty byly aldehydy odvozené od 3-fenylpropanalu v porovnání s karbamoylpropanalovým aldehydem, který byl oxidován na karboxylovou kyselinu pomalu.

Klíčová slova	aminoaldehyddehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa, metabolismus polyaminů, metabolismus cholinu, metabolismus lysinu, GABA, L-karnitin, betainy, substrátová specifita
Počet stran	47
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Martina Dybalová
Title	New substrates of plant aminoaldehyde dehydrogenase
Type of thesis	Bachelor
Department	Center of the Region Haná
Supervisor	Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Plant aminoaldehyde dehydrogenases participate in multiple metabolism pathways such as degradation of polyamines, choline or lysine. Thanks to the production of osmoprotectant substances, they take part in plant defense against abiotic stress like cold, high temperatures, salinity etc. Their substrate specificity is very broad. Out of physiological substrates such as ω -aminoaldehydes, betaine aldehyde or γ -guanidinobutyraldehyde, aminoaldehyde dehydrogenases are able to oxidase different synthetic substrates, including aromatic and heterocyclic aldehydes. As a part of aldehyde dehydrogenase superfamily, they are classified as ALDH10 family members together with isoenzymes from fungi separately from animal aminoaldehyde dehydrogenases which are members of the ALDH9 family.

In this work three aldehydes derived from 3-phenylpropionaldehyde and 3-carbamoylpropionaldehyde were tested as substrates of aminoaldehyde dehydrogenases from pea and tomato. All three aldehydes were oxidized whereas SLAMADH1 had best results. Derivatives of 3-phenylpropionaldehyde were oxidized more efficiently than carbamoylpropionaldehyde aldehyde derivative, which was converted to the carboxylic acid only slowly.

Keywords	aminoaldehyde dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, metabolism of polyamines, metabolism of choline, metabolism of lysine, GABA, L-carnitin, betaines, substrate specificity
Number of pages	47
Number of appendices	1
Language	Czech

Obsah

1.	Úvod	9
2.	Současný stav řešené problematiky	10
2.1	Metabolický význam aminoaldehyddehydrogenas	10
2.1.1	Metabolismus polyaminů	11
2.1.1.1	Biosyntéza polyaminů	11
2.1.1.2	Katabolismus polyaminů	12
2.1.1.3	Degradace ω -aminoaldehydů z katabolismu polyaminů	14
2.1.1.4	Cyklizace ω -aminoaldehydů	16
2.1.1.5	γ -Aminomáselná kyselina	16
2.1.2	Metabolismus cholinu - tvorba betainu	17
2.1.3	Metabolismus lysinu - tvorba L-karnitinu	18
2.2	Zařazení, struktura a funkce aminoaldehyddehydrogenas	19
2.2.1	Aminoaldehyddehydrogenasy	20
2.2.2	Struktura	21
2.2.3	Reakční mechanismus	22
2.2.4	Lokalizace	23
2.2.5	Specifičnost	24
3.	Experimentální část	27
3.1	Vybrané substráty pro testování	27
3.2	Biologický materiál	27
3.3	Přístrojová technika	27
3.4	Chemikálie	28
3.5	Programy	28
3.6	Metody	29
3.6.1	Expresce rekombinantního proteinu	29
3.6.2	Extrakce a purifikace rekombinantního proteinu	30
3.6.3	Měření koncentrace proteinu (Bicinchoninová metoda)	31
3.6.4	Měření aktivity enzymu	32
3.6.4.1	Měření substrátové specifičnosti	32
3.6.4.2	Měření kinetiky enzymových reakcí	33
4.	Výsledky a diskuze	34-40
5.	Závěr	34-40
6.	Citace	41
7.	Seznam zkratk	47

Cíle práce

- 1) Literární rešerše zabývající se problematikou rostlinných aminoaldehyddehydrogenas.
- 2) Produkce rekombinantního proteinu rostlinných aminoaldehyddehydrogenas.
- 3) Vyhledání a testování nových potenciálních substrátů rostlinných aminoaldehyddehydrogenas.

1. Úvod

Rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) jsou součástí velice široké skupiny aldehyddehydrogenas (ALDH), které oxidují aldehydy na příslušné karboxylové kyseliny za využití koenzymu NAD(P)^+ , jakožto akceptoru elektronů. V rámci této rodiny se rostlinné AMADH řadí do podrodiny ALDH10, společně s houbovými AMADH. Do podrodiny ALDH9 spadají živočišné AMADH.

Přírodními substráty AMADH jsou cytotoxické ω -aminoaldehydy, které vznikají různými metabolickými drahami, mimo jiné při degradaci polyaminů, či aminokyselin a tvorbě osmoprotektantů. Produkty v podobě ω -aminokyselin představují netoxické molekuly, které mají v různých organismech rozličné funkce od osmoprotektantů až po signální molekuly. Při absenci AMADH, či jejich nedostatečné expresi je možno u rostlin pozorovat zhoršenou odolnost vůči stresovým podmínkám. Na druhou stranu je pak možné při této absenci možno pozorovat tvorbu heterocyklických látek, které jsou odpovědné za charakteristickou vůni některých rostlin a plodin. Hlavní fyziologickou rolí aminoaldehyddehydrogenas je tedy detoxifikace a odpověď na stres.

Jedná se homodimerní enzymy, přičemž jejichž struktura je navzájem velmi podobná. V rámci substrátového kanálku se liší se pouze v několika aminokyselinových residuech, což má za následek různorodou substrátovou specifitost jednotlivých AMADH, která je v celku široká. Kromě jejich přírodních substrátů oxidují AMADH rovněž syntetické *N*-acyl- ω -aminoaldehydy, benzaldehyd a jeho deriváty či heterocyklické aldehydy. Tato skutečnost spolu s faktem, že se podílejí na tvorbě osmoprotektantů může být využita při praktických aplikacích v zemědělství, biotechnologii a potravinářském průmyslu.

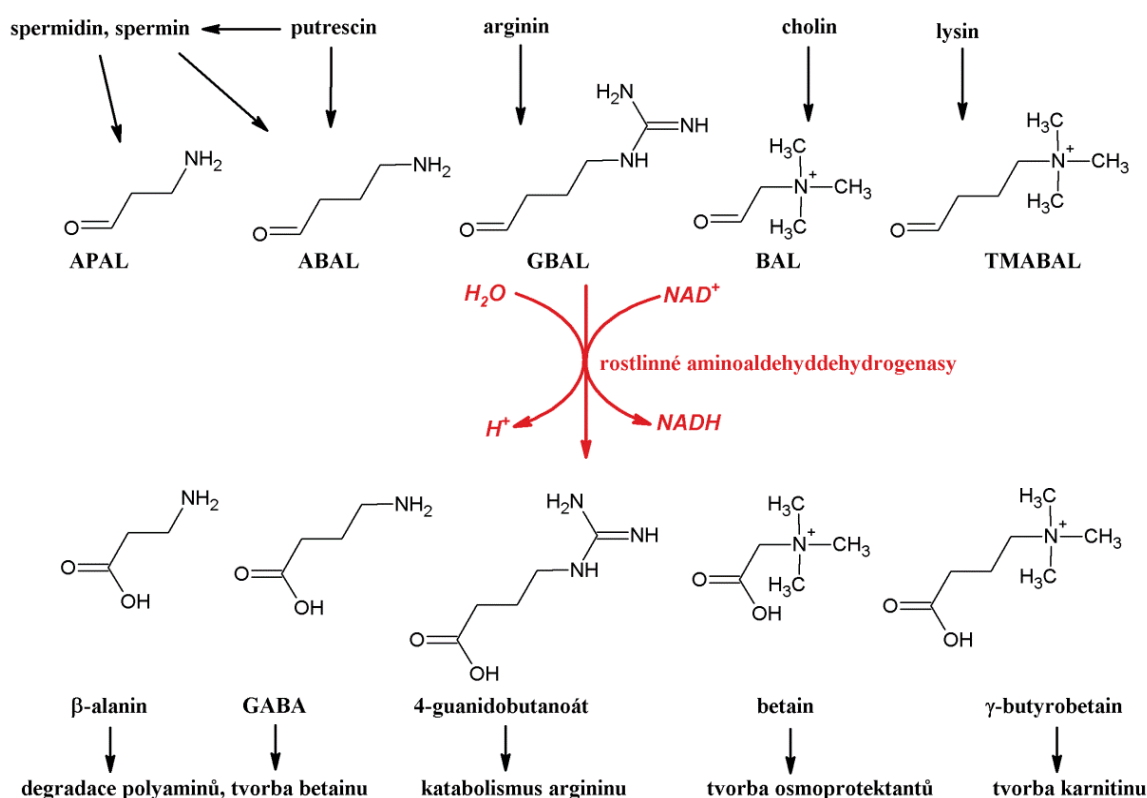
V rámci této bakalářské práce byla zkoumána substrátová specifita isoenzymů AMADH z rajčete a hrachu vůči syntetickým derivátům 3-fenylpropanalu a 3-karbomoylpropanalu.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Metabolický význam aminoaldehyddehydrogenas

Aminoaldehyddehydrogenasy jsou enzymy široké substrátové specifičnosti nacházející se u rostlin, živočichů, mikroorganismů i hub, které katalyzují přeměnu toxických ω -aminoaldehydů pocházejících z různých metabolických drah jako oxidace polyaminů, metabolismus argininu, cholinu či lysinu (Obr 1.) (Tylichová *et al.*, 2007; Tylichová *et al.*, 2010; Kopečný *et al.*, 2013).

Produkty jejich oxidace jsou neproteingenní ω -aminokyseliny, které mohou mít funkci jako důležité osmoprotektanty a signální molekuly, nebo mohou být meziprodukty, které se podílí na tvorbě těchto látek. (Tylichová *et al.*, 2007; Tylichová *et al.*, 2010).



Obr 1. Obecné schéma metabolických drah, na kterých se podílí aminoaldehyddehydrogenasy (upraveno podle Frömmel *et al.*, 2019).

2.1.1 Metabolismus polyaminů

Polyaminy jsou kationtové sloučeniny s alifatickou dusíkatou strukturou vyskytující se téměř ve všech organismech. Hrají zásadní roli ve fyziologických procesech jako je například buněčný růst, diferenciace popřípadě odpověď na environmentální stres. Mezi nejběžněji se vyskytujícími polyaminy u vyšších rostlin patří putrescin (1,4-butandiamin) a jeho deriváty spermidin [N-(3-aminopropyl)-1,4-butandiamin] a spermin [N,N'-bis-(3-aminopropyl)-1,4-butandiamin]. Dalším polyaminem, ale ne tak rozšířeným u vyšších rostlin jako putrescin, je kadaverin (1,5-pentandiamin), který se vyskytuje především u luštěnin a árónovitých lilií (Smith, 1975; Smith a Meeuse, 1976 Slocum, 1991).

Díky jejich kationtové formě při fyziologickém pH jsou schopné reagovat s proteiny, nukleovými kyselinami, membránovými fosfolipidy a složkami buněčné stěny, které buďto aktivují nebo stabilizují. Vyskytují se jak ve volné rozpustné formě, tak i ve formě nerozpustné vázané na makromolekuly (Bouchereau *et al.*, 1999; Lefèvre *et al.*, 2001).

Exogenní aplikace polyaminů a zvláště putrescinu, byla úspěšně použita ke zvýšení výnosu sklizně a zvýšení tolerance vůči salinitě, osmotickému stresu, suchu, těžkým kovům, zimě, vysoké teplotě, podmáčení půdy a ke zvýšení záplavové tolerance rostlin (Gill a Tuteja, 2010).

2.1.1.1 Biosyntéza polyaminů

Biosyntéza polyaminů se liší mezi savci, bakteriemi, houbami a rostlinami. Syntéza putrescinu u savců a hub je umožněna pouze jednou cestou a to skrze ornitin, který vzniká z argininu za katalýzy arginasou (Tabor a Tabor, 1984). U rostlin a bakterií je syntéza putrescinu (Obr 2.) umožněna dvěmi alternativními cestami a to dekarboxylací ornitinu nebo argininu (Davis *et al.*, 1992). Enzymy katalyzující tuto reakci jsou ornitindekarboxylasa (EC 4.1.1.17) a arginindekarboxylasa (EC 4.1.1.19), což jsou klíčové enzymy biosyntézy polyaminů (Slocum, 1991). Zároveň je možná syntéza ornitinu z argininu za současné katalýzy arginasou (EC 3.5.3.1), kde jako odpadní produkt vzniká močovina (Caldwell *et al.*, 2015). Několik druhů rostlin včetně *Arabidopsis thaliana* postrádají ornitindekarboxylasu (Hanfrey *et al.*, 2001).

Ornitindekarboxylasa vede přímo k tvorbě putrescinu, zatímco arginindekarboxylasa nepřímou skrze dva mezikroky resp. dva enzymy. Produktem dekarboxylace argininu je agmatin, který je dalším krokem hydrolyzován agmatiniminohydrolasu (EC 3.5.3.12) na N-karbamoyl putrescin, který je hydrolyzován na putrescin pomocí

N-karbamoylputrescinamidohydrolasy (EC 3.5.1.53) (Tiburcio *et al.*, 1990). U bakterií je agmatin převeden rovnou na putrescin za současné tvorby močoviny (Davis *et al.*, 1992).

SPD a SPM jsou syntetizovány následným připojením 3-aminopropylové skupiny na PUT a SPD. Tato reakce je uskutečněna za katalýzy spermidinsyntasou (EC 2.5.1.16) a sperminsyntasou (EC 2.5.1.22). Donorem aminopropylové skupiny je dekarboxylovaný S-adenosylmethionin (SAM), který vzniká za účasti S-adenosylmethionindekarboxylasy (EC 4.1.1.50) (Pegg a McCann, 1982).

2.1.1.2 Katabolismus polyaminů

Homeostaze volných polyaminů v buňce nezávisí pouze na biosyntéze, ale také na dalších procesech, zahrnující například degradaci (oxidativní deaminaci), konjugaci, transportu (Bouchereau *et al.*, 1999).

Oxidativní deaminace polyaminů je katalyzovaná aminooxidasami, které se u vyšších rostlin nacházejí v raných fázích vývoje etiolovaných klíčků a to konkrétně v jejich epikotylu, výhoncích a koříncích (Frébort a Adachi, 1995). Produkty oxidativní deaminace katalyzované aminooxidasami jsou peroxid vodíku, amoniak a příslušné ω -aminoaldehydy, které se poté podílí na biosyntéze sekundárních metabolitů a toleranci vůči abiotickému stresu. Tvorba peroxidu vodíku zprostředkovává, jako signální molekula, buněčnou smrt a souvisí se stárnutím a lignifikací buněčné stěny (Cona *et al.*, 2006).

Hlavními enzymy podílející se na degradaci polyaminů (Obr 2.) jsou měď obsahující aminooxidasy, které se dále dělí na dvě skupiny a flavin obsahující polyaminooxidasy.

Měď obsahující aminooxidasy jsou enzymy, které obsahují iont mědi a kofaktor 2,4,5-trihydroxyfenylalaninichinon. Ačkoliv původně se jednalo o samostatnou skupinu EC 1.4.3.6 (Frébort a Adachi, 1995), v poslední době převládlo rozdělení na dvě skupiny a to primární aminooxidasy EC 1.4.3.21, které nejefektivněji oxidují primární aminy a diaminoxidasy EC 1.4.3.22, které katalyzují oxidaci diaminů, jako je putrescin, kadaverin či agmatin na příslušné ω -aminoaldehydy za vzniku peroxidu vodíku a amoniaku. Z agmatinu vzniká 4-guanidinobutyraldehyd (GBAL), z kadaverinu 5-aminovaleraldehyd a z putrescinu 4-aminobutanal (ABAL) (Cona *et al.*, 2014; Ahmadifar *et al.*, 2017; www.brenda-enzymes.org, 9. 5. 2019).

polyaminoxidasy katalyzují oxidaci uhlíku na endo- straně N^4 -dusíku při degradaci polyaminů. Ze spermidinu a sperminu tak vzniká volný 1,3-diaminopropan (DAP), peroxid vodíku a ABAL, respektive 4-[(3-aminopropyl)amino)]-butyraldehyd (APBAL). Nalézají se především u jednoděložných rostlin (Smith, 1972; Federico a Angelini, 1991; Cohen, 1998; Šebela *et al.*, 2000; Seiler, 2004). U živočichů katalyzují polyaminoxidasy oxidaci uhlíku na exo- straně N^4 dusíku, což má za následek vznik 3-aminopropanalu (APAL) a putrescinu popř. sperminu (Vujcic *et al.*, 2003).

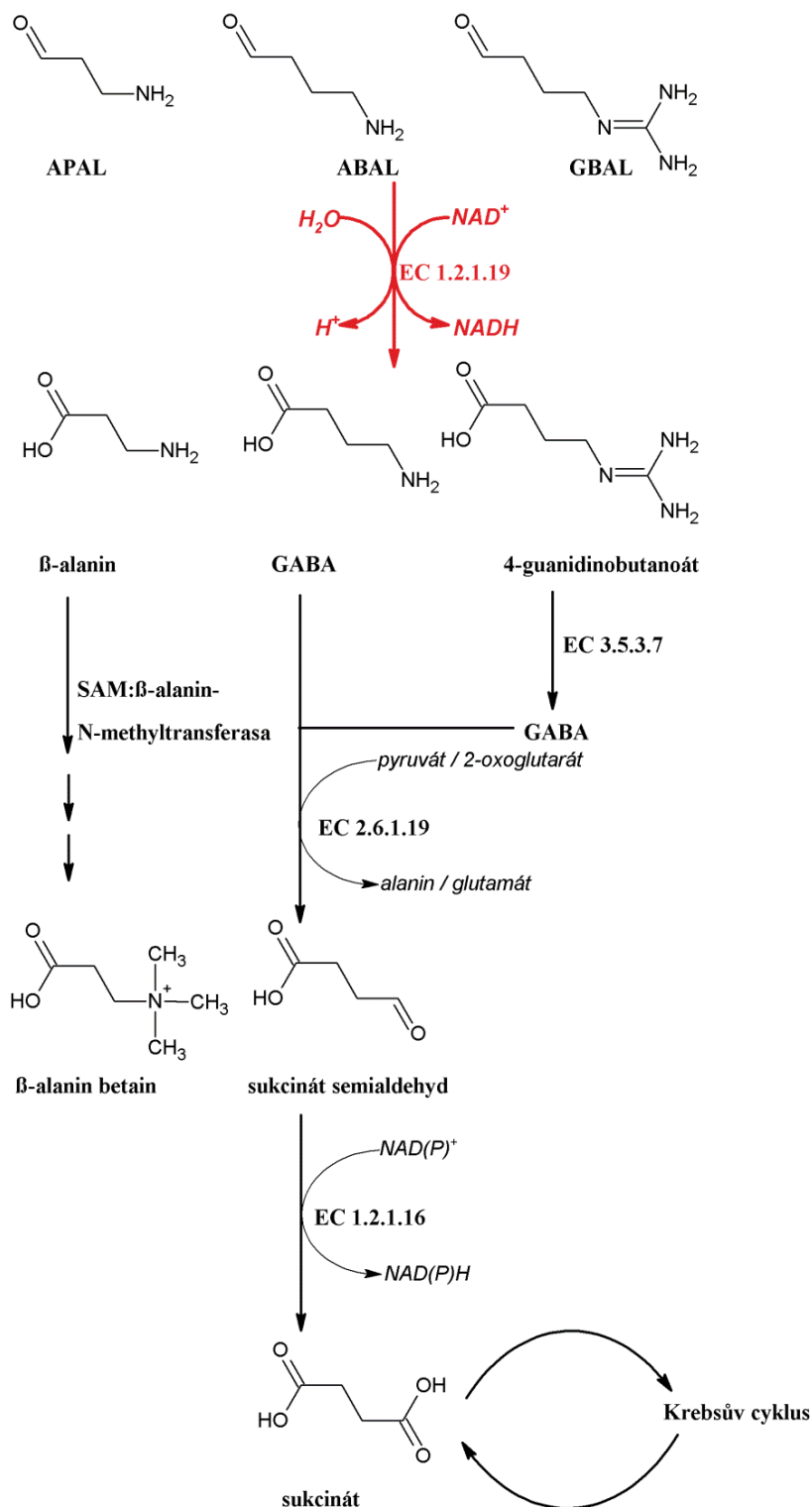
2.1.1.3 Degradace ω -aminoaldehydů z katabolismu polyaminů

Oxidační produkty degradace polyaminů představují ω -aminoaldehydy. Tyto látky jsou prokázány, jako příčina cytotoxicity a účastní se programované buněčné smrti i apoptózy a inhibice buněčného dělení (Agostinelli *et al.*, 2004).

Přírozenými představiteli jsou APAL, ABAL, GBAL. Zatím ještě nebylo prokázáno, jakou cestou se tvoří v rostlinách APAL. Předpokládá se ovšem, že APAL vzniká jako meziprodukt degradace polyaminů a to konkrétně při degradaci sperminu a spermidinu z DAP (Obr 2.), nicméně pro rostlinné aminooxidasy je to slabý substrát, tudíž se předpokládá existence jiného rostlinného enzymu, který katalyzuje přeměnu DAP na APAL. U bakterií byla identifikována aminotransferasa, která tuto přeměnu řídí, zatímco u savců je APAL produkován polyaminoxidasami (Medda *et al.*, 1995; Bouchereau *et al.*, 1999; Duhazé *et al.*, 2002; Tylichová *et al.*, 2007).

Oxidací APALu pomocí aminoaldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.19, AMADH) vzniká β -alanin (Obr 3.), který poté může být přeměněn za pomoci S-adenosylmethionin:beta-alanin-N-methyltransferasy (EC 2.1.1.49) trojnásobnou methylací na β -alanin betain, který plní funkci osmoprotektantu ve většině buněčných membrán (Rathinasabapathi *et al.*, 2001; Duhazé *et al.*, 2002).

AMADH rovněž oxidují ABAL (Obr 3.) na 4-aminomáslenou kyselinu (GABA), která se v rostlině kumuluje při stresových podmínkách jako sucho, zvýšená salinita atd. GABA poté může být přeměněna reakcí katalyzovanou GABA transaminasou (EC 2.6.1.19) na sukcinát semialdehyd. Akceptorem aminoskupiny je buď pyruvát nebo 2-oxoglutarát. Sukcinát semialdehyd je dále oxidován za katalýzy sukcinát semialdehyddehydrogenasou (EC 1.2.1.16) na sukcinát, který je jedním z meziproduktů Krebsova cyklu. (Shelp *et al.*, 1999; Kinnersley a Turano, 2000).



Obr 3. Schéma oxidace ω -aminoaldehydů na příslušné ω -aminokyseliny a jejich další metabolické pochody vedoucí ke vzniku osmoprotektandů.

GBAL vznikající z agmatinu, který je meziproduktem syntézy polyaminů a zároveň produktem degradace argininu, může být také přeměněn na GABA (Obr 3.). Produktem jeho oxidace katalyzované AMADH je 4-guanidinobutanoát, který je dále hydrolyzován

guanidinobutyrasou (EC. 3.5.3.7) na GABA za současného vzniku močoviny. Tento enzym byl charakterizován zejména u bakterií a je pravděpodobně analogem jiných ureohydrolas např. agmatiniminohydrolasy (Matsuda a Suzuki, 1984; Sekowska *et al.*, 2000; Arakawa *et al.*, 2003).

2.1.1.4 Cyklizace ω -aminoaldehydů

Konkrétními produkty oxidace polyaminů jsou ω -aminoaldehydy (Obr 2.). Putrescin je přeměněn na ABAL, kadaverin na 5-aminovaleraldehyd, spermin je přeměněn na APBAL a agmatin na GBAL. Tyto produkty nadále cyklizují na netoxické produkty vlivem pH optima enzymů, kdy z ABALu, 5-aminovaleraldehydu, GBALu a APBALu vzniká v pořadí Δ^1 -pyrolin, Δ^1 -piperidin, N-amidino-2-hydroxypyrolidin a 1-(3-aminopropyl)pyrolin, který dále cyklizuje na 1,5-diazabicyklononan, naproti tomu APAL necyklizuje pro vysoké vazebné pnutí čtyřčlenného cyklu (Tabor, 1951; Hasse a Maisack, 1957; Medda *et al.*, 1995; Ascenzi *et al.*, 2002; Tylichová *et al.*, 2007).

Cyklické formy ABALu a 5-aminovaleraldehydu jsou důležitými meziproducty při tvorbě rostlinných alkaloidů (Hasse a Schühler, 1962; Tylichová *et al.*, 2007).

Při nedostatečné oxidaci ABALu dochází k tvorbě 2-acetyl-1-pyrolinu, který je zodpovědný za typické aroma jasmínové rýže. Inaktivací genů pro AMADH v rýži byla zjištěna přítomnost zvýšené hladiny této látky, což potvrdilo důležitost významu AMADH při odpovědi na tvorbu cytotoxických látek (Bradbury *et al.*, 2008).

2.1.1.5 γ -Aminomáselná kyselina

γ -Aminomáselná kyselina (GABA) je neproteinogenní aminokyselina, která se nachází ve všech organismech. U živočichů hraje zásadní roli jako signální molekula, konkrétně neurotransmitter. Možnými rolemi GABA v rostlinách jsou ochrana proti oxidativnímu stresu, regulace cytosolického pH, obrana proti hmyzu, podíl se na rovnováze uhlík-dusík, osmoregulace a potenciální role signální molekuly (Steward *et al.*, 1949; Shelp *et al.*, 1999; Bouché a Fromm, 2004).

Glutamát dehydrogenasa (EC 1.4.1.3) a glutamát dekarboxylasa (EC 4.1.1.15) umožňují syntézu GABA z 2-oxoglutarátu přes glutamát. GABA je poté degradována za účasti dvou enzymů - sukcinát semialdehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.16) a GABA transaminasa (EC 2.6.1.19). Dohromady tyto čtyři enzymy tvoří tzv. GABA odbočku citrátového cyklu, která se uplatňuje u živočichů a rostlin (Kinnersley a Turano, 2000).

V mutantní *Arabidopsis thaliana*, která měla narušený gen pro sukcinát semialdehyddehydrogenasu, byla pozorována vyšší citlivost vůči oxidativnímu stresu, protože nebyla schopná odstraňovat peroxid vodíku. Zároveň je poslední krok GABA odbočky doprovázen vznikem NADH a sukcinátu, které jsou důležité pro Krebsův cyklus i dýchací řetězec. Předpokládá se, že degradace GABA by mohla vést k zabránění kumulace reaktivních kyslíkových meziproductů, vznikajících za oxidativního stresu, které inhibují enzymy Krebsova cyklu (Coleman *et al.*, 2001; Bouché a Fromm, 2003).

Kyselé pH stimuluje aktivitu glutamátdehydrogenasy, která odstraňuje proton za katalýzy dekarboxylace glutamátu (Iyer *et al.*, 2002).

Hladiny GABA jsou v rostlinách vyšší při poškození či mechanické stimulaci (hmyz lezoucí po listu popř. požívající rostlinu). Je možné, že GABA narušuje normální vývoj hmyzu v raných fázích vývoje (Ramputh and Bown, 1996; Shelp *et al.*, 1999; Bown *et al.*, 2002).

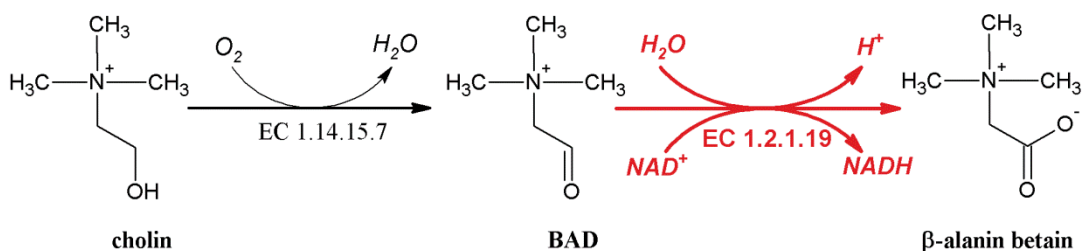
V závislosti na stresových podmínkách roste hladina GABA v rostlinách. *Arabidopsis thaliana* efektivně rostla na médiu obsahující GABA, jako jediného zdroje dusíku, tudíž je možno předpokládat její účast v metabolismu dusíku (Breitkreuz *et al.*, 1999; Shelp *et al.*, 1999).

2.1.2 Metabolismus cholinu - tvorba betainu

Výsledným produktem degradace cholinu je glycin betain (Obr 4.), který vzniká ve dvou oxidačních krocích. Prvním krokem je oxidace cholinu na betain aldehyd (BAL), druhým krokem pak oxidace BAL na glycin betain. (Weretilnyk *et al.*, 1990).

První krok této dráhy je katalyzován rozličnými enzymy v různých systémech. U vyšších rostlin se vyskytuje ferredoxin-dependentní cholin monooxygenasa (EC 1.14.15.7), která je lokalizována v chloroplastech. Během oxidace se spotřebovává kyslík. Druhý krok, oxidace BAL na glycin betain, probíhá v přítomnosti AMADH (EC 1.2.1.19) (Rathinasabapathi *et al.*, 1997; Nuccio *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 1998).

Glycin betain, stejně jako β -alanin betain, je široce rozšířená osmoprotektivní látka, která chrání rostlinné enzymy a membrány před chladem, horkem atd. Má funkci chaperonu, kdy pomáhá stabilizovat a chránit proteinovou strukturu a funkci v buňce. Rozdíl mezi glycin betainem a β -alanin betainem je i v jejich tvorbě. Předpokládá se, že tvorba β -alanin betainu je přednostní při stresu v prostředích s nedostatkem kyslíku a



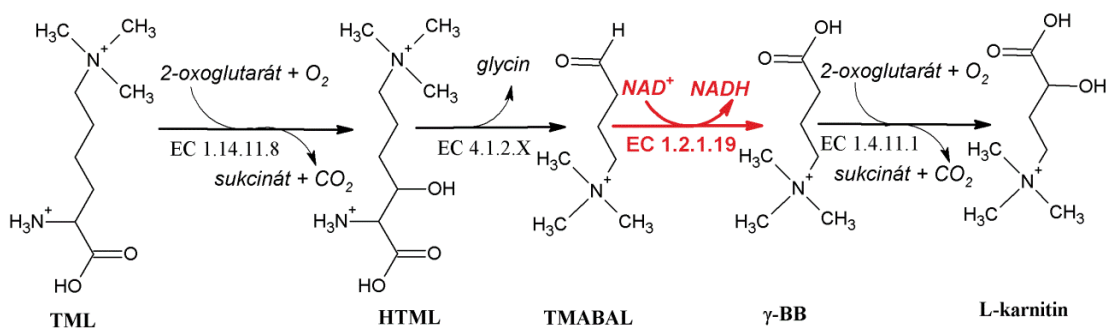
Obr 4. Schéma metabolismu cholinu u rostlin.

salinitou, jelikož jeho tvorba nevyžaduje přítomnost kyslíku (Hanson *et al.*, 1994; Allakhverdiev *et al.*, 2008). Na základě schopnosti kumulovat glycin betain, rozdělujeme vyšší rostliny na glycin betain neakumulující a glycin betain akumulující (Fitzgerald *et al.*, 2009).

2.1.3 Metabolismus lysinu - tvorba L-karnitinu

U živočichů i hub je velice dobře popsána degradace lysinu, která vede ke karnitinu, jako produktu. Je známo, že karnitin se vyskytuje u živočichů, kde hraji roli přenašeče aktivovaných mastných kyselin, u hub ve kterých je zodpovědný za přenos acetyl-CoA z glyoxysomů, bakterií, kde má roli osmolytu, i rostlin. Detailně je však popsána jeho syntéza a funkce pouze u živočichů, hub a bakterií, u rostlin prozatím nebyla jeho funkce ani biosyntéza dobře determinována. Předpokládá se velká podobnost mezi biosyntézou karnitinu u rostlin s biosyntézou probíhající ostatních eukaryotních organismů (van Roermund *et al.*, 1999; Kerner a Hoppel, 2000; Stephens *et al.*, 2007; Angelidis a Smith, 2003; Rippa *et al.*, 2012).

Metabolismus, který vede až ke tvorbě karnitinu u živočichů (Obr 5.) začíná prekurzorem 6-N-trimethyllysinem (TML), který pochází z degradace proteinů. Od TML vedou celkem 4 kroky k finálnímu produktu. Prvním krokem je hydroxylace TML pomocí TML dioxygenasy (EC 1.14.11.8), která vede k tvorbě 3-hydroxy-6N-trimethyllysinu (HTML). Za katalýzy HTML aldolasy (EC 4.1.2. X) dojde k vytvoření 4-N-trimethylaminobutanalu (TMABAL) a glycinu. Třetím krokem je přeměna TMABAL na 4-N-trimethylaminobutyrate (γ-butyrobetain, γBB) účinkem AMADH (EC 1.2.1.19). Nakonec dojde k hydroxylaci za katalýzy γ-BB dioxygenasou (EC 1.14.11.1) za tvorby finálního produktu L-karnitinu. Houby a bakterie mají podobné biosyntetické cesty jako savci (Kaufman a Broquist, 1977; Strijbis *et al.*, 2009).



Obr 5. Schéma metabolismu lysinu u savců (upraveno z Rippa *et al.*, 2012)

Prozatímni výzkum ukazuje, že syntéza karnitinu v rostlinách pravděpodobně probíhá podobně, jak je tomu u savců, s homologními enzymy, katalyzujícími dané reakce. V *Arabidopsis thaliana* byla identifikována přítomnost TML a γ-BB v mnohem větším množství než karnitin, tudíž je možné předpokládat, že průběh syntézy má jiný spád než u savců, kde se v největší koncentraci vyskytuje karnitin. TML a γ-BB mají strukturu kvartérní amoniové soli stejně jako glycine betain a karnitin a mohly by mít i osmoprotektivní funkci (van Vlies *et al.*, 2005; Charrier *et al.*, 2012; Rippa *et al.*, 2012).

2.2 Zařazení, struktura a funkce aminoaldehyddehydrogenas

Aminoaldehyddehydrogenasy jsou součástí široké skupiny enzymů patřící do superrodiny aldehyddehydrogenas, sestávající z 27 rodin, přičemž 13 rodin je rostlinných. ALDH se vyskytují jak u prokaryotických, tak i u eukaryotických organismů (Brocker *et al.*, 2013; Vasiliou *et al.*, 2013; Riveros-Rosas *et al.*, 2013).

Buněčná lokalizace ALDH je široká. Vyskytují se v cytoplasmě, mitochondriích, plastidech, peroxisomech, mikrosomech i jako součást membrán. Jejich hlavní funkce spočívá v odstraňování reaktivních aldehydů, které vznikají během oxidativní degradace lipidových membrán tzv. lipoperoxidace, nebo také jako meziprodukty mnoha metabolických drah. Tato široká skupina enzymů se podílí na endogenním i exogenním metabolismu aldehydů (Bartel a Sunkar *et al.*, 2005; Mitsuya *et al.*, 2009; Missihoun *et al.*, 2011).

Přírozeným koenzymem ALDH je NAD⁺ (akceptují i koenzymem NADP⁺ a další analoga), přičemž katalyzují oxidaci aldehydové funkční skupiny na karboxylovou funkční skupinu. Při této reakci zároveň vznikají redukované koenzymy NADH a NADPH, které jsou důležité pro zachování buněčné redoxní rovnováhy (Brocker *et al.*, 2013).

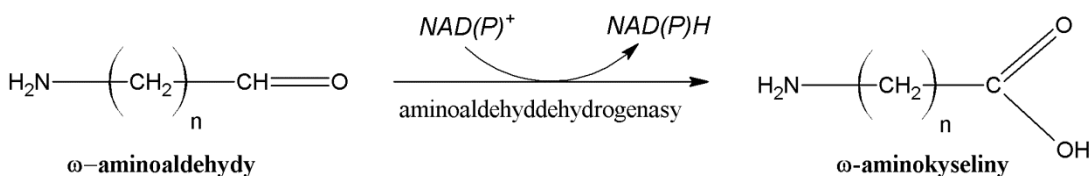
Rostlinné geny ALDH jsou exprimovány, jako odpověď na stres, konkrétně pak stres způsobený suchem, podmačením, těžkými kovy, vysokou salinitou, horkem, suchem atd. Tento stres-responsivní charakter ukazuje jejich důležitou roli v adaptaci na měnící se environmentální podmínky (Sunkar *et al.*, 2003; Chugh *et al.*, 2011; Inostroza-Blancheteau *et al.*, 2011; Brocker *et al.*, 2013).

Příslušnost k jednotlivým ALDH rodinám a podrodinám je založena na procentuálním zastoupení stejných aminokyselinových sekvencí. Pokud jsou dva enzymy identické v nejméně 40 % aminokyselinových sekvencí, řadíme je do stejné rodiny. Enzymy sdílející alespoň 60 % identitu jsou zařazeny do stejné podrodiny (Sophos *et al.*, 2001).

2.2.1 Aminoaldehyddehydrogenasy

Aminoaldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.19, AMADH) jsou enzymy široké substrátové specifičnosti příslušné k rodinám ALDH9 (živočišné), ALDH10 (rostlinné a houbové) a ALDH25 až ALDH27 (některé bakteriální). Podílejí se na degradaci a zároveň detoxifikaci aldehydů, které vznikají např. při katabolismu polyaminů, cholinu, lysinu atd. Katalyzují přeměnu ω -aminoaldehydů, na korespondující ω -aminokyseliny (Obr 6.) (Šebela *et al.*, 2001; Riveros-Rosas *et al.*, 2013).

Pro svou schopnost oxidovat ω -aminoaldehydy (APAL, ABAL) a rovněž GBAL, BAL a TMABAL jsou AMADH označovány rovněž jako ABAL dehydrogenasa (EC 1.2.1.19, ABALDH), GBAL dehydrogenasa (EC 1.2.1.54, GBALDH), BAL dehydrogenasa (EC 1.2.1.8, BADH) a TMABAL dehydrogenasa (EC 1.2.1.47, TMABADH) dle jejich nejpreferovanějšího substrátu. (Šebela *et al.*, 2000; Strijbis *et al.*, 2009). V některých případech ABALDH, GBALDH i BADH oxiduje efektivněji APAL. Naopak některé BADH zase nejsou schopné oxidovat jiné ω -aminoaldehydy vůbec. V závislosti na tomto faktu je poté těžké určit jejich přesnou klasifikaci. V dnešní době již převládá označení AMADH. (Chern a Pietruszko, 1995; Trossat *et al.*, 1997; Šebela *et al.*, 2000; Hibino *et al.*, 2001).



Obr 6. Obecné schéma reakce katalyzující aminoaldehyddehydrogenasy.

2.2.2 Struktura

Jedná se převážně o homodimerní enzymy (Obr 7.) popř. homotetramery, přičemž každá podjednotka s hmotností přibližně 50 až 60 kDa, sestává ze tří domén:

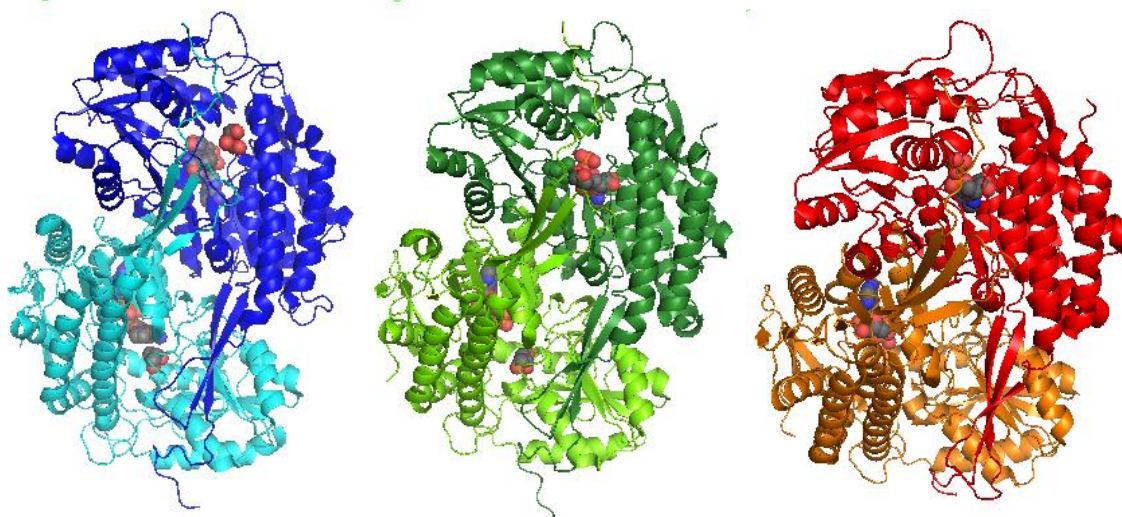
oligomerizační domény, koenzym vázající domény a katalytické domény (Obr 8.). Pevné spojení těchto domén je důvodem, proč nedochází ke konformačním změnám za přítomnosti i nepřítomnosti NAD(P)^+ (Gruez *et al.*, 2004; Johansson *et al.*, 1998).

AMADH využívá jako NAD^+ jako redoxní koenzym, přičemž tento koenzym může být nahrazen NADP^+ , ale v tomto případě dochází ke snížení rychlosti přeměny APAL popř. ABAL (Šebela *et al.*, 2000).

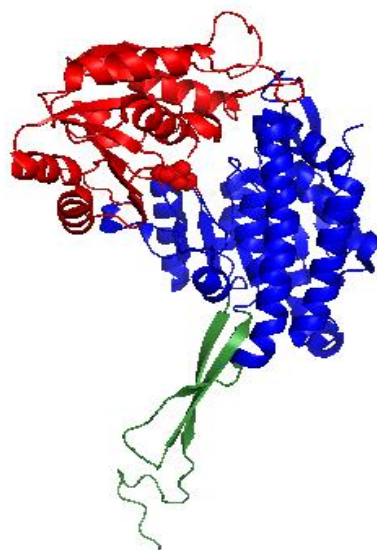
Oligomerizační jednotka je zodpovědná za propojení dvou podjednotek pomocí vodíkových vazeb, které se váží ke katalytické doméně druhé podjednotky. Tetramer je zformován interakcí dvou dimerů z opačné strany, než se dvě podjednotky vážou k sobě (Johansson *et al.*, 1998).

V případě hrachových isoenzymů AMADH tvoří oligomerizační doména dva dlouhé a jeden krátký β skládaný list. V porovnání s ostatními ALDH je C-konec o něco delší a to kvůli přítomnosti C-terminální peroxizomální zaměřovací sekvenci typu 1. (Tylichová *et al.*, 2010).

V místě spojení oligomerizační a katalytické domény je zformován substrátový kanálek o délce 14 Å, který vede ke katalytickému cysteinovému residuu. Tento kanálek je částečně hydrofobní a částečně hydrofilní s asparaginovým a glutamovým residuem.



Obr 7. Struktura dimerní hrachových (*Pisum sativum*) a rajčatové (*Solanum Lycopersicum*) AMADH s navázaným NAD^+ a glycerolem v aktivním místě. Modře PsAMADH1 (PDB: 3IWK), zeleně PsAMADH2 (PDB: 3IWJ) a červeně SlAMADH1 (4I9B). (zdroj dat: <https://www.rcsb.org/>, duben 2019).



Obr 8. Struktura podjednotky PsAMADH2 (PDB: 3IWJ) - oligomerizační doména zeleně, katalytická doména červeně a koenzym vázající doména modře. (zdroj dat: <https://www.rcsb.org/>, duben 2019).

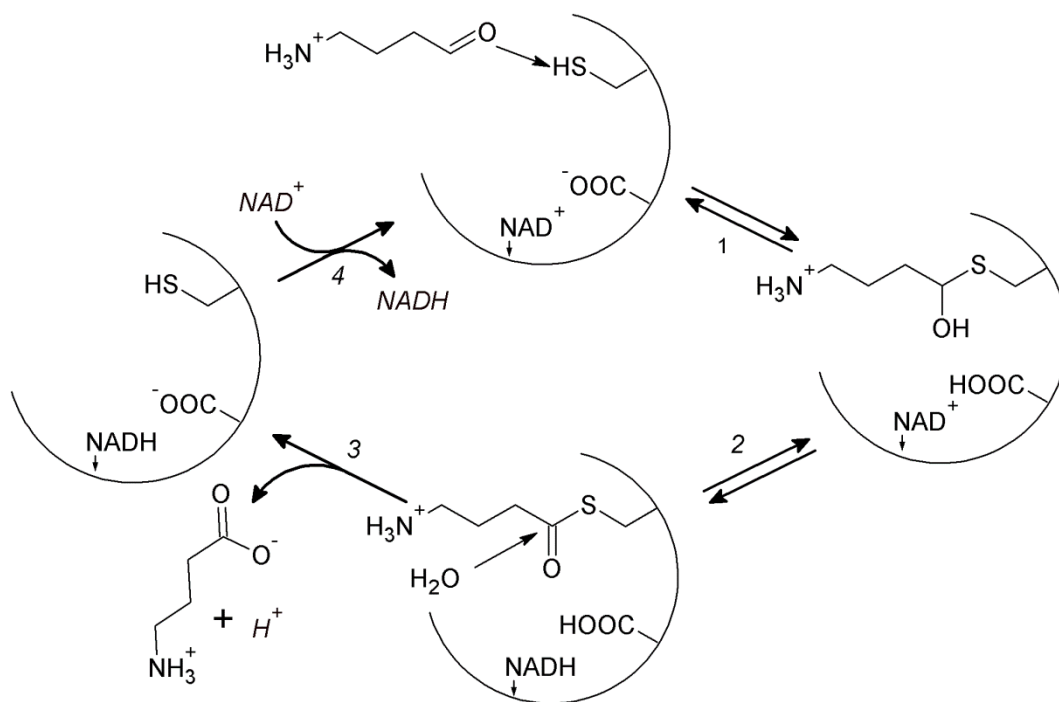
na dně, které interagují s kyslíkem substrátu. Tato tři residua vytváří aktivní místo AMADH. (Steinmetz *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1998).

Na opačné straně substrátového kanálku se nachází v těsné blízkosti katalytického cysteinu navázaný koenzym, který náleží ke koenzym vázající doméně, nacházející se v NAD^+ vázající dutině. Část NAD^+ je v dutině vázáno pevně, konkrétně ADP, zatímco nikotinamid a ribosa mají flexibilitu. Isoenzymy AMADH a BADH různých druhů mají proměnlivé složení této dutiny. Při redukci a oxidaci nikotinamidového kruhu dochází k jeho izomeraci, což souvisí s přenesením hydridu a thioesterovou hydrolýzou (Johansson *et al.*, 1998; Perez-Miller *et al.*, 2003; Tylichová *et al.*, 2010).

2.2.3 Reakční mechanismus

Mechanismus přeměny ω -aminoaldehydu na ω -aminokyselinu za katalýzy AMADH probíhá celkem ve čtyřech krocích (Obr 9.). Jedná o klasický uspořádaný sekvenční mechanismus, který je shodný u celé superrodiny ALDH (Wymore *et al.*, 2004).

Glu má za příčinu aktivaci nukleofilního cysteinu a aktivaci molekuly vody při hydrolýze thioesterového intermediátu. V prvním kroku dochází k nukleofilnímu ataku cysteinu na ω -aldehyd, který dá vzniku thiohemiacetalovému intermediátu. Ve druhém kroku dochází k přesunu hydridového kationtu na NAD^+ , přičemž vzniká thioester a redukovaný NADH. Třetím krokem je hydrolýza thioesteru. Báze naváže hydridový kationt vody, hydroxidový aniont následně hydrolyzuje thioesterový intermediát za



Obr 9. Reakční mechanismus odehrávající se v aktivním místě AMADH (upraveno podle Tylichová *et al.*, 2007)

uvolnění ω -aminokyseliny. Nakonec dochází k odštěpení NADH a navázání nové molekuly NAD^+ (Abriola *et al.*, 1987; Wymore *et al.*, 2004; Tylichová *et al.*, 2007).

2.2.4 Lokalizace

Prozatím není známa buněčná lokalizace eukaryotní AMADH. První záznamy o hrachové a ovesné AMADH uvádějí jejich asociaci s protoplastem (Flores a Filner, 1985). Pozdější experimenty s polyklonálními protilátkami ukázaly, že hrachová AMADH se nejpravděpodobněji vyskytuje v cytoplazmě (Tylichová *et al.*, 2007).

Výskyt v pletivech semenáče hrachu byl prokázán pomocí barviva NB (nitroblue-tetrazolium). U kořene a hypokotylu se největší intenzita zbarvení projevila v pericyklu a endodermis. Slabší zbarvení bylo pozorováno v kambiu. V epikotylu a ve stonkovém vrcholu byla největší intenzita pozorována v kambiu, přičemž slabší zbarvení bylo pozorováno u pericyklu a endodermis (Šebela *et al.*, 2001).

Izoenzymy BADH byly lokalizovány v různých buněčných strukturách, jako jsou chloroplast, peroxizom a cytoplasma. Jako první byla charakterizována špenátová BADH. Později byl jeden z jejích izoenzymů nalezen majoritně v chloroplastu, zatímco druhý se v malé koncentraci nacházel v cytosolu (Weigel *et al.*, 1986). Rýžové izoenzymy BADH byly nalezeny pouze v peroxizomech (Nakamura *et al.*, 1997; Shirasawa *et al.*, 2006).

Zatímco v ječmeni byly isoenzymy lokalizovány v peroxizomech a cytoplazmě (Nakamura *et al.*, 2001).

Analýzou aminokyselinových sekvencí různých sekvencí AMADH a BADH bylo zjištěno, že část těchto enzymů nese C-terminální peroxizomální zaměřovací sekvenci typu 1. Odhaduje se současná existence peroxizomálních a neperoxizomálních isoenzymů u dvouděložných a jednoděložných rostlin (Reumann *et al.*, 2004).

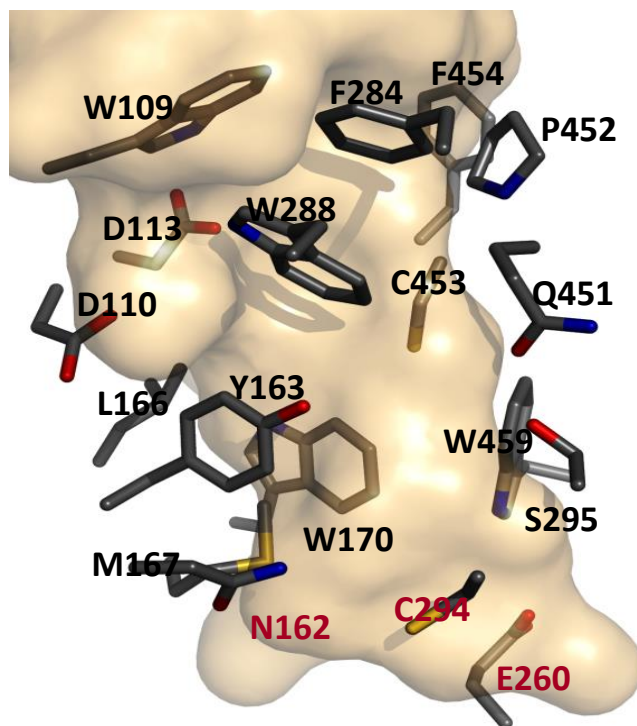
Peroxisomy jsou buněčné organely, které se účastní velkého počtu oxidativních reakcí. Kromě jejich funkce při fotorespiraci a mobilizaci lipidů, mají také důležitou funkci při biosyntéze fytohormonů, metabolismu dusíku a degradaci aminokyselin. Jejich důležitý potenciál při reakci na oxidativní stres je také předurčen, díky jejich produkci glycin betainu (Reumann *et al.*, 2004). Předpokládá se úzký vztah s detoxifikací při oxidačním stresu způsobeném kyslíkovými radikály. Je známo, že počet peroxisomů se zvětšuje při oxidativních stresových podmínkách (del Rio *et al.*, 2002). Zatím není známo, zda-li BADH a AMADH jsou v peroxizomech pouze skladovány až do jejich uvolnění při reakci na podnět, nebo se aktivně účastní na zmírnění stresu a detoxifikaci (Cona *et al.*, 2006). Nicméně prozatím není lokalizace BADH a AMADH v peroxizomech prokázána (Tylichová *et al.*, 2007).

2.2.5 Specifičnost

Nejlépe prozkoumanými rostlinnými AMADH, co se týče specifičnosti a struktury, jsou hrachové isoenzymy (*Pisum sativum* AMADH) PsAMADH1 (PDB kód 3IWK) a PsAMADH2 (PDB kód 3IWJ) a rajčatové isoenzymy (*Solanum lycopersicum* AMADH) SlAMADH1 (PDB kód 4I9B) a SlAMADH2. Rozdílná struktura jejich substrátového kanálu (Tab 1.) způsobuje různě širokou specifičnost jednotlivých isoenzymů AMADH (Tylichová *et al.*, 2010; Kopečný *et al.*, 2011; Kopečný *et al.*, 2013).

Tři residua typická pro celou rodinu rostlinných AMADH jsou Asn162, Cys 294 a Glu260 (číslování podle PsAMADH2). Ta se nacházejí na dně substrátového kanálku (Obr 10.). Role katalytického cysteinu byla studována mutací krysí jaterní ALDH2 a lidské ALDH2, kdy byl nahrazen katalytický cystein alaninem, což mělo za následek ztrátu aktivity. Nahrazení cysteinu serinem, jakožto slabým nukleofilem, způsobilo snížení dehydrogenasové aktivity (Farrés *et al.*, 1995; Perez-Miller a Hurley, 2003).

Mutagenese PsAMADH2, ukázala, že dvě aspartátová residua lokalizovaná okolo vstupu substrátového kanálu jsou zodpovědná za vysokou afinitu k ω -aminoaldehydům (Asp110 a Asp113) (Kopečný *et al.*, 2011). Rovněž residua v pozicích 163, 288, 289, 444



a 454 (číslování podle PsAMADH2) mají významný vliv na substrátovou specifitu AMADH. Tyr163 a Trp288 jsou nezbytné pro vysokou afinitu k ω -aminoaldehydům. AMADH s Ile444 mají pouze slabou aktivitu vůči BAL, zatímco ty s Asn289 mohou vykazovat aktivitu vůči BAL. Vysoká afinita vůči ω -aminoaldehydům s nejlepším substrátem APALem je zajištěna Thr288, který se nachází ve tří-čtvrtinách AMADH, spolu s Tyr163, Trp170 a Trp459 (Kopečný *et al.*, 2013). Absence Trp u SlAMADH1 a současná přítomnost Thr454, místo Cys nebo Ser u dalších AMADH (Cys/Ser 453 u PsAMADH), má za následek zvětšení substrátového kanálu a zvýšení substrátové specifity. Pozice Thr454 vede ke většímu, méně polárnímu kanálku, proto je SlAMADH1 schopna oxidovat alifatické i aromatické aldehydy efektivněji, než je tomu u SlAMADH2 a obou isoenzymů PsAMADH (Kopečný *et al.*, 2011).

PsAMADH mají v pozici 453 Cys nebo Ser, což má za následek zmenšení
 Obr 10. Substrátový kanálek PsAMADH2. Residua aktivního místa vyznačena červeně (Frömmel, 2014).

substrátového kanálu a tedy i nižší substrátovou specifitu vůči alifatickým a aromatickým aldehydům. Rozdíl mezi PsAMADH1/2 je pouze ve 3 residuech a proto vykazují podobné substrátové preference. Rozdíl v pozici 288 má za následek rozdílnou aktivitu vůči TMABAL, zatímco difference v pozici 109 má vliv na afinitu k GBAL (Tylichová *et al.*, 2010).

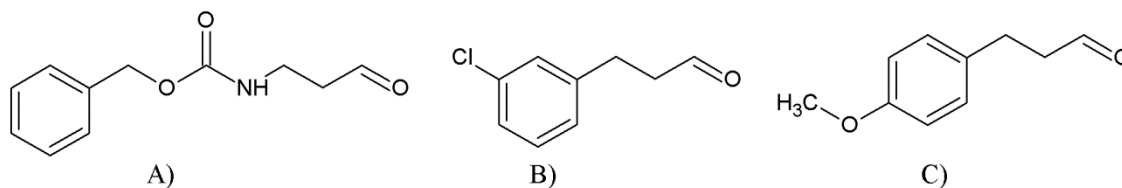
AMADH prokázaly širokou substrátovou specifíčnost jak u přirozených substrátů, tak i syntetických substrátů. Jsou schopné oxidovat N-acyl- ω -aminoaldehydy (Frömmel *et al.*, 2015), dusíkaté heterocyklické aldehydy odvozené od pyridinu, pyrimidinu, purinu, pyrazolu či imidazolu (Frömmel *et al.*, 2012; Frömmel *et al.*, 2019).

Tab 1. Pozice jednotlivých residuí v substrátovém kanálu isoenzymů PsAMADH, SIAMADH a kukuřičných AMADH (*Zea mays*, ZmAMADH) (číslování dle PsAMADH2). Žlutě vyznačeny jsou residua, která jsou jiná oproti většině AMADH. (přejato a upraveno z Kopečný *et al.*, 2013).

	109	110	113	162	163	166	167	170	260	284	288	293	294	295	444	451	452	453	459
PsAMADH2	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	I	Q	P	C	W
PsAMADH1	A	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	F	I	C	S	I	Q	P	S	W
SIAMADH1	A	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	A	V	C	S	I	Q	P	T	W
SIAMADH2	S	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	I	Q	P	C	W
ZmAMADH1a	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	C	Q	P	C	W
ZmAMADH1b	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	I	Q	P	C	W
ZmAMADH2	G	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	A	V	C	S	I	Q	P	C	W

3. Experimentální část

3.1 Vybrané substráty pro testování



Obr 11. Substráty vybrané pro testování.

Jako potenciální substráty pro AMADH byly vybrány celkem tři aldehydy (Obr 11.). Jednalo se o deriváty 3-karbamoylpropanalu, konkrétně 3-[(benzyloxykarboxy)amino]propanal (Obr 11.A), Bn-O-CO-APAL), a 3-fenylpropanalu, konkrétně 3-(3-chlorofenyl)propanal (Obr 11.B), Cl-Ph-PAL) a 3-(4-methoxyfenyl)propanal (Obr 11.C), Me-O-Ph-PAL), které byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich Chemie GmbH. Jako fyziologický substrát byl použit APAL, který byl připraven kyselou hydrolýzou z příslušného diethylacetalu.

3.2 Biologický materiál

Pro produkci studovaných enzymů byly využity geneticky modifikované bakterie *Escherichia coli* s vloženým vektorem nesoucí gen pro příslušný enzym. Pro PsAMADH1 (GenBank no. AJ315852) byl použit vektor pET28b, zatímco pro PsAMADH2 (GenBank no. AJ315853), SIAMADH1 (GenBank no. AY796114) a SIAMADH2 (GenBank no. FJ228482) byl použit vektor pCDFDuet. Oba vektory obsahují polyhistidinovou kotvu. Jednotlivé bakteriální kmeny byly poskytnuty Mgr. Martinou Kopečnou, Ph.D.

3.3 Přístrojová technika

- Inkubátor (Sanyo MIR-154)
- Vortex (IKA MS 3 basic)
- Spektrofotometr (Agilent 8453) s láznovým termostatem (Huber CC1-106A)
- Suchá lázeň (Labnet D1200)
- Centrifuga (Thermo Fisher Scientific - Heraeus Multifuge X3R)
- Desintegrátor buněk (Constant systems LTD One Shot)
- Rotátor (IKA Loopster digital)
- Třepačka (Barnstead/Lab-Line MAX^Q 4000)
- Laminární box Merci (SCS 2-4 196)
- Parní sterilizátor (Tuttnauer 3870)

3.4 Chemikálie

- 1-amino-3,3-diethoxypropan (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- acetonitril (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- BSA - hovězí sérový albumin (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Co^{II}-agarosa (Thermo Fisher Scientific)
- DNAsa (VWR Leuven Belgie)
- glycerol (Lach-Ner, s.r.o.)
- guanidin HCl (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- HCl 37% (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- imidazol 99% (Alfa Aesar GmbH)
- inhibitor proteas - EDTA-free Proteas Cocktail tablets (Roche Diagnostic GmbH)
- IPTG - isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (VWR Leuven Belgie)
- kanamycin sulfát (Carl Roth GmbH & Co. Kg)
- LB médium (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- NaCl (Lach-Ner, s.r.o.)
- RNAsa (VWR Leuven Belgie)
- set bicinchoninové kyseliny pro analýzu koncentrace proteinů - činidlo A a B (Thermo Fisher Scientific)
- streptomycin sulfát (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- TritonX-100 (Honeywell FlukaTM)
- β -Nikotinamidadenindinukleotid (Sigma Aldrich Chemie GmbH)

3.5 Programy

- Data ze spektrofotometru
 - Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System (B.02.01 SP1 [50])
- Vyhodnocení dat
 - Microsoft Office Excel 2003 (11.8404.8405) SP3
 - GraphPad Prism 5 (verze 5.04)
- Obrázky
 - PyMOL 1.3
 - ChemSketch 14.01

3.6 Metody

3.6.1 Exprese rekombinantního proteinu

Při přípravě PsAMADH1 byl použit kanamycin (finální koncentrace $30 \mu\text{g.ml}^{-1}$) a streptomycin (finální koncentrace $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$) u zbylých isoenzymů.

Příprava prekultury a kultury včetně exprese probíhala ve sterilním prostředí za využití laminárního boxu, sterilního média a sterilního vybavení.

- Bylo připraveno LB médium rozpuštěním v deionizované vodě (25 g LB média na 1 l vody) a následnou sterilizací ve sterilizátoru při 121°C po dobu 20 minut.
- Z připraveného média bylo odebráno po 20 ml pro přípravu prekultury, která se celkově skládala z 20 ml LB média, 2 μl kultury a antibiotika o příslušné koncentraci. Prekultura se nechala inkubovat na třepačce přes noc při 37°C .
- LB médium se rozlilo do Erlenmayerových baněk po 400 ml a přidal se anitibiotikum do každé baňky.
- Prekultura se zcentrifugovala na centrifuze při 4000 G po dobu 3 minut. Supernatant se odstranil a k precipitátu bylo přidáno 10 ml LB média a směs byla promíchána na vortexu. Směs pak byla nalita do připravených Erlenmayerových baněk s LB médiem.
- Erlenmayerovy baňky se poté nechaly kultivovat na třepačce alespoň po dobu 3 hodin při 30°C .
- Po 3 hodinách se provedla kontrola nárůstu kultury pomocí optické denzity. Měření se provádělo na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm proti blanku (čisté médium). Ideálně se absorbance měla pohybovat mezi $O_{D600} = 0,8 - 1,0$. Pokud toto rozmezí hodnot nebylo splněno, pokračovalo se v kultivaci až do dosažení požadované absorbance.
- Poté bylo do kultury přidáno IPTG ($0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$) do finální koncentrace $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a pokračovalo se v inkubaci přes noc při 20°C .
- Celý objem kultury byl postupně zcentrifugován v centrifugačních zkumavkách (50 ml) při 5000 G po 5 minutách. Supernatant se vždy odstranil a byl přidán další objem kultury.
- Nakonec bylo k precipitátu přidáno 25 ml 0,9% (w/w) NaCl. Směs se promíchala na vortexu a zcentrifugovala při 5000 G po dobu 2 minut.
- Supernatant byl odstraněn a kultura obsažená v peletu se zamrazila.

3.6.2 Extrakce a purifikace rekombinantního proteinu

- K rozmraženým vzorkům bakteriálního peletu bylo přidáno po 6 ml 50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0) a 50 µl (10 mmol.l⁻¹) inhibitoru proteas. Tato směs se důkladně promíchala pomocí vortexu a poté vložila do desintegrátoru buněk, kde došlo k desintegraci buněk rekombinantní *E. coli* při tlaku 20000 psi (138 MPa).
- Lyzát byl přepipetován do čistých centrifugačních zkumavek a bylo přidáno 20 µl (0,01 µg.ml⁻¹) RNAsy a 20 µl (0,04 U.µl⁻¹) DNAsy. Obsah zkumavky se promíchal pomocí pěti obrátů zkumavkou.
- Lyzát se poté nechal inkubovat při 37 °C po dobu 30 minut v inkubátoru.
- Po inkubaci byl přidán 1 mmol.l⁻¹ NaCl (finální koncentrace 100 mmol.l⁻¹) a 50% (v/v) glycerol do finální koncentrace 5 % (v/v).
- Celá směs se opět promíchala a následně centrifugovala po dobu 30 min. při 12000 G.
- Supernatant se poté nanesl do připravených centrifugačních kolonek s Co^{II}-agarosou.
- Byly připraveny celkem 3 pufrы.
 - Ekvilibrační pufr s výslednou koncentrací 20 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0), 300 mmol.l⁻¹ NaCl, 10 mmol.l⁻¹ l imidazolu, 5% (v/v) glycerolu.
 - Eluční pufr s výslednou koncentrací 20 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0), 300 mmol.l⁻¹ NaCl, 250 mmol.l⁻¹ imidazolu a 5% (v/v) glycerolu.
 - Promývací pufr s výslednou koncentrací 20 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0) a 5% (v/v) glycerolu.
- Provedla se příprava centrifugační kolonky s Co^{II}- agarosou.
 - Přidalo se 10 ml vody, kolonka se zašpuntovala a nechala se rotovat na rotátoru po dobu 5 min. za stálého chlazení. Poté se voda odstranila centrifugací při 100-250 G po dobu 30 sekund. Tento postup se opakoval ještě jednou.
 - Dále se přidaly 3 ml čistícího roztoku obsahujícího 6 mol.l⁻¹ guanidin HCl a 1%(v/v) roztoku Triton-X a kolonky se nechaly opět 5 min. rotovat a opět se zcentrifugovaly při 100 G.
 - Poté došlo ještě třikrát k promytí vodou (viz. bod 1).

- Nakonec se přidalo 10 ml ekvilibračního pufru. Kolonky se nechaly 20 min. rotovat a pufr se odstranil centrifugací při 100 G. Tento postup se opakoval celkem třikrát, z toho poslední dvě inkubace se prováděly v chladu (4 °C).
- Do kolonek se nanese supernatant z extrakce a nechaly se rotovat v chladu (4 °C) po dobu 60 min.
- Následovala centrifugace při 100 G podobu cca 3 min. (až tekutina vytekla z kolonky).
- Do kolonek se přidalo po 10 ml ekvilibračního pufru, nechaly se rotovat po dobu 5 min. s následnou centrifugací při 100 G cca 3 min. (do vytečení pufru). Tento postup se opakoval třikrát.
- Eluce se uskutečnila přidáním 5 ml elučního pufru, následovanou 30 minutami rotování a centrifugací cca 3 min. při 100 G (do vytečení eluátu). Tento postup se opakoval celkem dvakrát.
- Eluát se přenesl do centrifugačního 10 kDa filtru (centrikon), který byl předem připraven centrifugací 5 ml čistého promývacího pufru při 4000 G (do vytečení).
- Vzorek nanesený z eluce se nechal centrifugovat při 4000 G po dobu asi 15 minut.
- K roztoku enzymu bylo přidáno 10 ml promývacího pufru. Vzorek byl centrifugován 15 min. při 4000 G. Tento odsolovací krok byla proveden celkem třikrát.
- Zakoncentrovaný enzym se poté přepipetoval do mikrozkušavek a zamrazil. (Centrifugace a rotování na rotátoru se prováděla za stálého chlazení (4 °C).

3.6.3 Měření koncentrace proteinu (Bicinchoninová metoda)

- Příprava činidla
 - Činidlo se připravilo smísením 1 ml činidla A a 50 ml činidla B.
- Příprava kalibrační řady
 - Roztok BSA o koncentraci 1 mg.ml⁻¹ byl rozpipetován do 16 mikrozkušavek v množstvích od 0,5 µl až do 100 µl.
 - Připravené činidlo se napipetovalo po 1 ml do mikrozkušavek s připraveným BSA.
 - Celkem byly připraveny dvě kalibrační řady.
- Příprava vzorků

- Do tří mikrozkušavek bylo napipetováno po 2 μl , 5 μl a 10 μl roztoku enzymu.
- Následně byl přidán do každé 1 ml činidla.
- Celkem takto byly vytvořeny 3 řady vzorků.
- Mikrozkušavky byly promíchány za pomoci vortexu a ponechány v inkubátoru po dobu 30 minut při 37 °C.
- Po inkubaci byla změřena absorbance za pomoci spektrofotometru vůči blanku (1 ml čistého činidla) při 562 nm vlnové délky.
- Po sestrojení kalibrační křivky BSA byly naměřené hodnoty vzorků porovnány s křivkou a koncentrace proteinů byla vypočítána podle rovnice lineární regrese.

3.6.4 Měření aktivity enzymu

Byl použit klasický Warburgův optický test což je spektrofotometrická metoda založena na detekci vznikajícího NADH s absorpčním maximem 340 nm ($\epsilon = 6620 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Warburg a Christian, 1943).

3.6.4.1 Měření substrátové specifity

- Příprava APAL
 - APAL byl připraven kyselou hydrolýzou z 1-amino-3,3-diethoxypropanu.
 - Pro roztok o koncentraci $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo potřeba 16,7 μl 1-amino-3,3-diethoxypropanu a 983 μl vody.
 - Tato směs se poté nechala zahřívát v mikrozkušavce při 100 °C po dobu 10 minut v suché lázni.
- Příprava aldehydů
 - Aldehydy byly rozpuštěny řádným promícháním za pomoci vortexu v roztoku 50% (v/v) acetonitrilu ve výsledné koncentraci 100 mmol/l.
- Pro aldehydy
 - V plastové (PMMA) kyvetě bylo ve finální koncentraci $120 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 9,0), $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NAD⁺, a 3 μl roztoku enzymu.
 - Takto byly připraveny 4 kyvety.
- Po vyblankování přístroje byla zahájena reakce přidáním příslušného aldehydu ve finální koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.
- Absorbance se měřila při 340 nm po dobu 10-30 minut dle rychlosti reakce při 37°C s frekvencí měření 10 sekund.

3.6.4.2 Měření kinetiky enzymových reakcí

- Aldehydy a APAL byly připraveny stejně jako je tomu u měření specifčnosti.
- Měření rychlosti reakce
 - V plastové (PMMA) kyvetě bylo ve finální koncentraci 120 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 9,0), 1 mmol.l⁻¹ NAD⁺ a 5 až 10 µl enzymu, dle potřeby.
 - Vždy byly připraveny 3 kyvety o stejné koncentraci.
- Po vyblankování přístroje byla zahájena reakce přidáním příslušného aldehydu ve finální koncentraci od 10 až po 4000 mmol.l⁻¹. Přesné rozmezí finální koncentrace substrátu bylo závislé na průběhu měření.
- Absorbance se měřila při 340 nm po dobu 10-20 minut, dle reakční rychlosti při 37 °C s frekvencí měření 10 sekund.

4. Výsledky a diskuze

Bude zveřejněno na podzim 2020.

5. Závěr

Bude zveřejněno na podzim 2020.

6. Citace

- Abriola D. P., Fields R., Stein S., MacKerell Jr A. D., Pietruszko R. (1987): Active site of human liver aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **26**, 5679–5684.
- Agostinelli E., Arancia G., Dalla Vedova L., Belli F., Marra M., Salvi M., Toninello A. (2004): The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases: perspectives of clinical applications. *Amino acids* **27(3-4)**, 347-358.
- Ahmadifar S., Le T. C., Marcocci L., Pietrangeli P., Mateescu M. A. (2017): Zymographic approach to determine the intrinsic enzyme specific activity of diamine oxidase in presence of interfering enzymes. *Analytica chimica acta* **975**, 78-85.
- Allakhverdiev S. I., Kreslavski V. D., Klimov V. V., Los D. A., Carpentier R., Mohanty P. (2008): Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis research* **98(1-3)**, 541.
- Angelidis A. S., Smith G. M. (2003): Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* **69(12)**, 7492-7498.
- Arakawa N., Igarashi M., Kazuoka T., Oikawa T., Soda, K. (2003): D-Arginase of *arthrobacter* sp. kuj 8602: characterization and its identity with (Zn²⁺)-guanidinobutyrase. *Journal of biochemistry* **133(1)**, 33-42.
- Ascenzi P., Fasano M., Marino M., Venturini G., Federico R. (2002): Agmatine oxidation by copper amine oxidase: Biosynthesis and biochemical characterization of N-amidino-2-hydroxypyrrolidine. *European journal of biochemistry* **269(3)**, 884-892.
- Bartels D., Sunkar R. (2005): Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences* **24(1)**, 23-58.
- Bouche N., Fromm H. (2004): GABA in plants: just a metabolite?. *Trends in plant science* **9(3)**, 110-115.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999): Polyamines and enviromental challenges: recent development. *Plant science* **140**, 103-125.
- Bown A. W., Hall D. E., MacGregor K. B. (2002): Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. *Plant Physiology* **129(4)**, 1430-1434.
- Bradbury L. M., Gillies S. A., Brushett D. J., Waters D. L., Henry R. J. (2008): Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant molecular biology* **68(4-5)**, 439-449.
- Breitkreuz K. E., Shelp B. J., Fischer W. N., Schwacke R., Rentsch D. (1999): Identification and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* **450(3)**, 280-284.
- Brocker C., Vasiliou M., Carpenter S., Carpenter C., Zhang Y., Wang X., Kotchoni S. O., Wood A. J., Kirch H. H., Kopečný D., Vasiliou V., Nebert D. W. (2013): Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* **237(1)**, 189-210.
- Caldwell R.B., Toque H.A., Narayanan S.P., Caldwell R.W.(2015): Arginase: an old enzyme with new tricks. *Trends in Pharmacological Sciences* **36(6)**, 395–405.
- Charrier A., Rippa S., Yu A., Nguyen P. J., Renou J. P., Perrin Y. (2012): The effect of carnitine on *Arabidopsis* development and recovery in salt stress conditions. *Planta* **235(1)**, 123-135.

- Chern M. K., Pietruszko R. (1995): Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochemical and biophysical research communications* **213**(2), 561-568.
- Chugh V., Kaur N., Gupta A. K. (2011): Role of antioxidant and anaerobic metabolism enzymes in providing tolerance to maize (*Zea mays* L.) seedlings against waterlogging. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **48**, 346–352.
- Cohen S. S. (1998): A Guide to Polyamines, Oxford University Press, New York U.S.A., 396-442.
- Coleman S.T., Fang T.K., Rovinski S.A., Turano F.J., Moye-Rowley W.S. (2001): Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**(1), 244-250.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006): Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in plant science* **11**(2), 80-88.
- Cona A., Tisi, A., Ghuge S. A., Franchi S., De Lorenzo G., Angelini R. (2014): Wound healing response and xylem differentiation in tobacco plants over-expressing a fungal endopolygalacturonase is mediated by copper amine oxidase activity. *Plant physiology and biochemistry* **82**, 54-65.
- Davis, R. H., Morris, D. R., Coffino, P. (1992): Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **56**(2), 280-290.
- Del Río L. A., Corpas F. J., Sandalio L. M., Palma J. M., Gómez M., Barroso J. B. (2002): Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of experimental botany* **53**(372), 1255-1272.
- 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 Science*, **163**(3), 639-646.
- Farres J., Wang T. T., Cunningham S. J., Weiner, H. (1995): Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**(8), 2592-2598.
- Federico, R. and Angelini, R. (1991): Polyamine catabolism in plants. In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants* (Slocum R.D., Flores H.E. eds.), CRC Press, Boca Raton, U.S.A., 41-56.
- Fitzgerald T. L., Waters D. L., Henry, R. J. (2009): Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant biology* **11**(2), 119-130.
- Frébort I., Adachi O. (1995): Copper/quinone-containing amine oxidases, an exciting class of ubiquitous enzymes. *Journal of fermentation and bioengineering* **80**(6), 625-632.
- Frömmel J., Končítiková R., Kopečný D., Soral M., Šebela M. (2019): Oxidation of imidazole- and pyrazole-derived aldehydes by plant aldehyde dehydrogenases from the family 2 and 10. *Chemico-Biological Interactions* **304**, 194-201.
- Frömmel J., Šebela M., Demo G., Lenobel R., Pospíšil T., Soral M., Kopečný D. (2015): N-acyl- ω -aminoaldehydes are efficient substrates of plant aminoaldehyde dehydrogenases. *Amino acids* **47**(1), 175-187.
- Frömmel J., Soral M., Tylichová M., Kopečný D., Demo G., Wimmerová M., Šebela M. (2012): Plant aminoaldehyde dehydrogenases oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydes. *Amino acids* **43**(3), 1189-1202.
- Frömmel J.: *Substrátová specifická a imobilizace rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy*. (2014), Disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CR.

- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010): Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant signaling & behavior* **5**(1), 26-33.
- Gruez A., Roig-Zamboni V., Grisel S., Salomoni A., Valencia C., Campanacci V., Tegoni M., Cambillau, C. (2004): Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase. *Journal of molecular biology* **343**(1), 29-41.
- Hanfrey C., Sommer S., Mayer M. J., Burtin D., Michael A. J. (2001): Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *The Plant Journal* **27**(6), 551-560.
- Hanson A. D., Rathinasabapathi B., Rivoal J., Burnet M., Dillon M. O., Gage D. A. (1994): Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**(1), 306-310.
- Hasse K, Schühler K. (1962): Derivate des g-aminobutyraldehyds and d-aminovalerylaldehyds. *Biochemische Zeitschrift* **336**, 20-34.
- Hasse K., Maisack H. (1957): Delta1-azacylcoheptene, an enzymic oxidation product of hexamethylenediamine. *Biochemische Zeitschrift*, **328**(6), 429-432.
- Hibino T., Meng Y. L., Kawamitsu Y., Uehara N., Matsuda N., Tanaka Y., Ishikawa H., Baba S., Takabe T., Wada K., Ishii T., Takabe T. (2001): Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine-aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Plant molecular biology* **45**(3), 353-363.
- Inostroza-Blancheteau C., Reyes-Díaz M., Aquea F., Nunes-Nesi A., Alberdi M., Arce-Johnson P. (2011): Biochemical and molecular changes in response to aluminium-stress in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* **49**(9), 1005-1012.
- Iyer R., Iverson T. M., Accardi A., Miller C. (2002): A biological role for prokaryotic CIC chloride channels. *Nature* **419**(6908), 715.
- Johansson K., Ramaswamy S., Eklund H., El-Ahmad M., Hjelmqvist L., Jörnvall H., Eklund H. (1998): Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Science* **7**(10), 2106-2117.
- Kaufman R. A, Broquist H. P. (1977): Biosynthesis of carnitine in *Neurospora crassa*, *Journal of Biological Chemistry* **252**, 7437-7439.
- Kerner J., Hoppel C. (2000): Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1486**(1), 1-17.
- Kinnersley A. M., Turano F. J. (2000): Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* **19**(6), 479-509.
- Kopečný D., Končítiková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Soral M., Šebela M., Moréra S. (2013): Plant ALDH10 Family: Identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 9491-9507.
- Kopečný D., Tylichová M., Snegaroff J., Popelková H., Šebela, M. (2011): Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *The FEBS journal* **278**(17), 3130-3139.
- Lefevre I., Gratia E., Lutts S. (2001): Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). *Plant Science* **16**, 943-52.
- Matsuda H., & Suzuki Y. (1984): gamma-Guanidinobutyraldehyde Dehydrogenase of *Vicia faba* Leaves. *Plant physiology* **76**(3), 654-657.

- Medda R., Padiglia A., Floris G. (1995): Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* **39(1)**, 1-9.
- 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(2)**, 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 letters* **583(22)**, 3625-3629.
- Nakamura T., Nomura M., Mori H., Jagendorf A. T., Ueda A., Takabe T. (2001): An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant and Cell Physiology* **42(10)**, 1088-1092.
- Nakamura T., Yokota S., Muramoto Y., Tsutsui K., Oguri Y., Fukui K., Takabe, T. (1997): Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *The Plant Journal* **11(5)**, 1115-1120.
- Nuccio M. L., Russell B. L., Nolte K. D., Rathinasabapathi B., Gage D. A., Hanson A. D. (1998): The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *The Plant Journal* **16(4)**, 487-496.
- Pegg A. E., McCann P. P. (1982): Polyamine metabolism and function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **243(5)**, C212-C221.
- Perez-Miller S. J., Hurley T. D. (2003): Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **42(23)**, 7100-7109.
- Ramputh A. I., Bown A. W. (1996): Rapid [gamma]-aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae. *Plant physiology* **111(4)**, 1349-1352.
- Rathinasabapathi B., Burnet M., Russell B. L., Gage D. A., Liao P. C., Nye G. J., Scott P., Golbeck J. H., Hanson, A. D. (1997): Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94(7)**, 3454-3458.
- Rathinasabapathi B., Fouad W. M., Sigua C. A. (2001): beta-Alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae. Purification and characterization of a trifunctional, S-adenosyl-L-methionine-dependent N-methyltransferase from Limonium latifolium leaves. *Plant physiology* **126(3)**, 1241-1249.
- Reumann S., Ma C., Lemke S., Babujee L. (2004): AraPerox. A database of putative Arabidopsis proteins from plant peroxisomes. *Plant physiology* **136(1)**, 2587-2608.
- Rippa S., Zhao Y., Merlier F., Charrier A., Perrin Y. (2012): The carnitine biosynthetic pathway in Arabidopsis thaliana shares similar features with the pathway of mammals and fungi. *Plant physiology and biochemistry* **60**, 109-114.
- Riveros-Rosas H., González-Segura L., Julián-Sánchez A., Díaz-Sánchez Á. G., Muñoz-Clares R. A. (2013): Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chemico-biological interactions* **202(1-3)**, 51-61.
- Russell B. L., Rathinasabapathi B., Hanson A. D. (1998): Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant physiology* **116(2)**, 859-865.
- Šebela M., Brauner F., Radová, A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1480(1-2)**, 329-341.

- 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 Science* **160**(2), 197-207.
- Seiler N. (2004): Catabolism of polyamines. *Amino acids* **26**(3), 217-233.
- Sekowska A., Danchin A., Risler J. L. (2000): Phylogeny of related functions: the case of polyamine biosynthetic enzymes. *Microbiology* **146**(8), 1815-1828.
- Shelp B. J., Bown A. W., McLean M. D. (1999): Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in plant science* **4**(11), 446-452.
- Shirasawa K., Takabe T., Takabe T., Kishitani S. (2006): Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. *Annals of botany* **98**(3), 565-571.
- Slocum R.D. (1991): Polyamine biosynthesis in plants. In: *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. (Slocum R.D., Flores H.E. eds.), CRC Press, Boca Raton, U.S.A., 23-40.
- Smith T. A. (1972): Purification and properties of the polyamine oxidase of barley plants. *Phytochemistry* **11**(3), 899-910.
- Smith T.A. (1975): Recent advances in the biochemistry of plant amines. *Phytochemistry* **14**, 865-890.
- Smith T.A., Meeuse B.J.D. (1976): Production of volatile amines in some Arum lily species. *Plant Physiology* **41**, 343-347.
- Sophos N. A., Pappa A., Ziegler T. L., Vasiliou V. (2001): Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chemico-biological interactions* **130**, 323-337.
- Steinmetz C. G., Xie P., Weiner H., Hurley T. D. (1997): Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**(5), 701-711.
- Stephens F. B., Constantin-Teodosiu D., Greenhaff P. L. (2007): New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *The Journal of physiology*, **581**(2), 431-444.
- Steward F. C. (1949): γ -Aminobutyric acid: a constituent of the potato tuber?. *Science* **110**, 439-440.
- Strijbis K., van Roermund C. W., Hardy G. P., van den Burg J., Bloem K., de Haan, J., van Vlies N., Wanders R. J., Vaz F. M., Distel, B. (2009): Identification and characterization of a complete carnitine biosynthesis pathway in *Candida albicans*. *The FASEB Journal* **23**(8), 2349-2359.
- Sunkar R., Bartels D., Kirch H. H. (2003): Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal* **35**(4), 452-464.
- Tabor H. (1951): Diamine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **188**(1), 125-136.
- Tabor, C. W., Tabor, H. (1984): Polyamines. *Annual review of biochemistry*, **53**(1), 749-790.
- Tiburcio A. F., Kaur-Sawhney R., Galston A. W. (1990): Polyamine metabolism. In: *The Biochemistry of Plants, Intermediary Nitrogen Metabolism*. Vol. 16, (Mifflin B. J., Lea P. J. eds.), Academic Press, New York, U.S.A., 283-325.
- Trossat C., Rathinasabapathi B., Hanson A. D. (1997): Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and [ω]-aminoaldehydes. *Plant Physiology* **113**(4), 1457-1461.
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010): Structural and Functional Characterization of Plant Aminoaldehyde

- Dehydrogenase from *Pisum sativum* with a Broad Specificity for Natural and Synthetic Aminoaldehydes. *Journal of Molecular Biology* **396**, 870-882.
- Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M. (2007): Plant aminoaldehyde dehydrogenases. Has the time now come for new interesting discoveries? *Current Topics in Plant Biology* **8**, 45-70.
- van Roermund C. W., Hettema E. H., van den Berg M., Tabak H. F., Wanders R. J. (1999): Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *The EMBO Journal* **18**(21), 5843-5852.
- van Vlies N., Liqun T. I. A. N., Overmars H., Bootsma A. H., Kulik W., Wanders R. J. (2005): Characterization of carnitine and fatty acid metabolism in the long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse. *Biochemical Journal* **387**(1), 185-193.
- Vasiliou V., Thompson D. C., Smith, C., Fujita M., Chen Y. (2013): Aldehyde dehydrogenases: from eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells. *Chemico-biological interactions* **202**(1-3), 2-10.
- Vujcic S., Liang P., Diegelman P., Kramer D. L., Porter C. W. (2003): Genomic identification and biochemical characterization of the mammalian polyamine oxidase involved in polyamine back-conversion. *Biochemical Journal* **370**(1), 19-28.
- Warburg O., Christian W. (1943): Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Zymohexase. *Biochemische Zeitschrift* **314**, 149-176.
- Weigel P., Weretilnyk E. A., Hanson A. D. (1986): Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiology* **82**(3), 753-759.
- Weretilnyk E. A., Hanson A. D. (1990): Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**(7), 2745-2749.
- Wymore T., Hempel J., Cho S. S., MacKerell Jr A. D., Nicholas Jr H. B., Deerfield D. W. (2004): Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenase and mechanism of nucleophile activation. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **57**(4), 758-771.

7. Seznam zkratek

ABAL - 4-aminobutanal

ABALDH - 4-aminobutanaldehyddehydrogenasa

ALDH - aldehyddehydrogenasy

AMADH - aminoaldehyddehydrogenasy

APAL - 3-aminopropanal

APBAL - 4-[(3-aminopropyl)amino)]-butyraldehyd

BADH - betain aldehyddehydrogenasa

BAL - betain aldehyd

Bn-O-CO-APAL - 3-[(benzyloxykarboxy)amino]propanal

Cl-Ph-PAL - 3-(3-chlorofenyl)propanal

DAP - 1,3-diaminopropan

GABA - kyselina γ -aminomáselná

GBAL - 4-guanidinobutyraldehyd

GBALDH - 4-guanidinobutyraldehyddehydrogenasa

HTML - 3-hydroxy-6-N-trimethyllysin

IPTG - isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid

Me-O-Ph-PAL - 3-(4-methoxyfenyl)propanal

SAM - S-adenosylmethionin

TMABADH - 4-N-trimethylaminobutanaldehyddehydrogenasa

TMABAL - 4-N-trimethylaminobutanal

TML - 6-N-trimethyllysin

γ -BB - γ -butyrobetain - 4-N-trimethylaminobutyrate