

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Charakterizace aminoaldehyddehydrogenasy z kukuřice seté (*Zea mays*)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Petra Lakomá
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	26.4.2010

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

V Olomouci dne 26.4.2010

.....

Petra Lakomá

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Davidovi Kopečnému, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení při tvorbě této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Tylichové, Ph.D. za poskytnutí transgenní kultury a všestrannou pomoc při plnění experimentální části práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Petra Lakomá
Název práce	Charakterizace aminoaldehyddehydrogenasy z kukuřice seté (<i>Zea mays</i>)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>Cílem této diplomové práce bylo provést purifikaci a charakterizaci aminoaldehyddehydrogenasy z kukuřice seté (ZmAMADH). V rámci teoretické části byla provedena rešerše zabývající se metabolismem polyaminů a ω-aminoaldehydů se zaměřením na rostlinné AMADH. Tyto NAD-dependentní enzymy působí v metabolismu biogenních aminů. Následně byl popsán jejich vztah k rostlinným betainaldehyddehydrogenasám (BADH).</p> <p>Dvě izoformy ZmAMADH byly získány jako rekombinantní proteiny heterologní expesí dvou <i>AMADH</i> genů v buňkách <i>E. coli</i> a následně byly vyperifikovány afinitní chromatografií na koloně s imobilizovanými kobaltnatými ionty. MALDI-TOF peptidové mapování potvrdilo identitu rekombinantních proteinů. Kukuřičné AMADH se v nativní stavu vyskytují jako homodimery s molekulovou hmotností 111,5 kDa (ZmAMADH1) a 107,3 kDa (ZmAMADH2). ZmAMADH1 vykazovala teplotní stabilitu do 54.2 °C a ZmAMADH2 do 33.5 °C. Optimální pH reakce se pro oba enzymy pohybovalo v rozmezí 9.4-9.7. Kukuřičné AMADH vykazovaly širokou substrátovou specifičnost. K nejlépe přeměňovaným substrátům patřily u ZmAMADH1 přirozeně se vyskytující 3-aminopropionaldehyd (APAL), trimetyl-4-aminobutyraldehyd (TMABAL) a 4-aminobutyraldehyd (ABAL). Podobně tomu bylo i u ZmAMADH2, při 100 % aktivitě substrátu APAL, byl ABAL oxidován se zhruba poloviční relativní rychlostí. Ani jedna z izoform neoxidovala betainaldehyd. Přirozené substráty byly charakterizovány kinetickými parametry K_m a V_{max}.</p>
Klíčová slova	3-aminopropionaldehyd, polyaminy, aminoxidasa, aminoaldehyddehydrogenasa, betainaldehyddehydrogenasa, <i>Zea mays</i>
Počet stran	74
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc.Petra Lakomá
Title	Characterization of aminoaldehyde dehydrogenase from maize (<i>Zea mays</i>)
Type of thesis	master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstrakt	<p>The aim of this diploma thesis was to perform a purification and characterization of maize aminoaldehyde dehydrogenase (ZmAMADH). Theoretical part deals with the metabolism of polyamines and ω-aminoaldehydes and is focused on plant AMADHs. These NAD-dependent enzymes are involved in the metabolism of biogenic amines. Subsequently, their relationship to plant betaine aldehyde dehydrogenases (BADHs) has been described.</p> <p>Two ZmAMADH isoforms were obtained as recombinant proteins by recombinant expression of two AMADH genes in <i>E. coli</i> cells and subsequently purified by affinity chromatography on a column with immobilized cobalt ions. The identity of recombinant proteins was confirmed by MALDI-TOF peptide mass fingerprinting. Maize AMADHs exist as homodimers in the native state with a molecular mass of 111.5 kDa for ZmAMADH1 and 107.3 kDa for ZmAMADH2. ZmAMADH1 showed thermal stability up to 54 °C and ZmAMADH2 up to 33 °C. Optimal pH of enzymatic reaction was between 9.4 and 9.7 for both enzymes.</p> <p>Both maize AMADHs exhibited a broad substrate specificity. The best ZmAMADH1 substrates were naturally occurring 3-aminopropionaldehyde (APAL) trimethyl-4-aminobutyraldehyde (TMABAL) and 4-aminobutyraldehyde (ABAL). Similar results were obtained for ZmAMADH2, where ABAL was oxidized roughly half the relative speed of that with APAL. Neither of the two isoforms oxidized betaine aldehyde. Natural substrates were characterized by kinetic parameters K_m and V_{max}.</p>
Keywords	3-aminopropionaldehyde, polyamines, amine oxidase, aminoaldehyde dehydrogenase, betaine aldehyde dehydrogenase, <i>Zea mays</i>
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE	- 8 -
2	ÚVOD	- 9 -
3	TEORETICKÁ ČÁST	- 10 -
3.1	Polyaminy	- 10 -
3.1.2	Biosyntéza polyaminů	- 11 -
3.1.3	Katabolismus polyaminů	- 12 -
3.1.3.1	Aminoxidasy obsahující měď	- 13 -
3.1.3.2	Aminoxidasy obsahující FAD	- 15 -
3.2	Aminoaldehyddehydrogenasy	- 17 -
3.2.1	Purifikace, kinetické a molekulární vlastnosti AMADH	- 17 -
3.2.2	Lokalizace AMADH	- 22 -
3.2.3	Reakční mechanismus AMADH	- 24 -
3.3	Betainy	- 25 -
3.4	Betinaldehyddehydrogenasy	- 27 -
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 31 -
4.1	Biologický materiál chemikálie	- 31 -
4.2	Použité chemikálie	- 31 -
4.3	Přístrojové vybavení	- 34 -
4.4	Metody	- 35 -
4.4.1	Produkce rekombinantních kukuřičných proteinů z <i>E. coli</i>	- 35 -
4.4.2	Extrakce ZmAMADH	- 35 -
4.4.3	Purifikace ZmAMADH	- 35 -
4.4.4	Stanovení obsahu proteinů	- 36 -
4.4.5	Stanovení aktivity ZmAMADH	- 36 -
4.4.5.1	Testování substrátové specifčnosti, stanovení K_m a V_{max}	- 37 -
4.4.5.2	Stanovení optimálního pH a teplotní stability	- 39 -
4.4.5.3	Testování analog NAD^+	- 39 -
4.4.6	Gelová permeační chromatografie	- 40 -
4.4.7	SDS-PAGE	- 40 -
4.4.8	MALDI-TOF peptidové mapování („peptide mass fingerprinting“)	- 41 -
5	VÝSLEDKY	- 43 -
5.1	Expres, purifikace, stanovení aktivity kukuřičných AMADH a jejich identifikace MS peptidovým mapováním	- 43 -
5.2	Molekulové vlastnosti kukuřičných AMADH	- 47 -
5.3	Stanovení teplotní stability kukuřičných AMADH	- 48 -

5.4	Určení pH optima ZmAMADH1 a ZmAMADH2	- 49 -
5.5	Testování analog koenzymu NAD ⁺	- 50 -
5.6	Substrátová specifita ZmAMADH1 a ZmAMADH2	- 51 -
6	DISKUZE	- 59 -
7	ZÁVĚR	- 63 -
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 64 -
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 72 -

1 CÍLE PRÁCE

- **Teoretická část:**

Provést literární rešerši zaměřenou na:

- metabolismus polyaminů a ω -aminoaldehydů, se zaměřením na rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy a jejich vztah k rostlinným betainaldehyddehydrogenasam

- **Experimentální část:**

- Produkce rekombinantních aminoaldehyddehydrogenas (ZmAMADH) z transgenní kultury *E.coli* a purifikace ZmAMADH1 a ZmAMADH2 afinitní chromatografií
- Identifikace rekombinantních ZmAMADH pomocí metod hmotnostní spektrometrie
- Testování substrátové specifity obou enzymů
- Stanovení molekulové hmotnosti kukuřičných AMADH
- Určení teplotní stability a pH optima obou izoenzymů

2 ÚVOD

Aldehydy vznikající oxidační deaminací biogenních aminů se v buňce stejně jako samotné polyaminy účastní důležitých fyziologických pochodů. Nadměrná akumulace těchto sloučenin je ovšem pro buňku velmi škodlivá, proto musí být jejich vnitrobuněčná hladina regulována. Aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH) je oligomerní, tj. tetra- či dimerní NAD-dependentní enzym působící v metabolismu biogenních aminů. Katalyzuje reakci, při které jsou ω -aldehydy přeměňovány na odpovídající ω -aminokyseliny. Současně přeměňuje aldehydy vzniklé v metabolismu lysinu a také v metabolismu argininu.

Od počátku sedmdesátých let 20. století byly AMADH izolovány z rozličných kultur mikroorganismů a tkání živočichů. Rostlinná AMADH byla poprvé izolována, přečištěna a následně charakterizována v laboratoři na Katedře biochemie UP v roce 2000. Enzym byl vyizolován z etiolovaných semenáčků hrachu setého. Analýzou aminokyselinové sekvence tohoto enzymu byla potvrzena jeho blízkost s rostlinnými betainaldehyddehydrogenasami (BADH). BADH se podílí na biosyntéze kompatibilních osmolytů, což jsou látky účastnící se adaptace organismů na nepříznivé podmínky v prostředí (sucho, salinita....). AMADH i BADH jsou členy velké proteinové rodiny aldehyddehydrogenas (ALDH). V současné době jsou AMADH získávány jako rekombinantní proteiny heterologní expresí genu v buňkách *E.coli*, čímž je produkováno relativně velké množství vysoce aktivního enzymu umožňující strukturně-funkčních studie především hrachové AMADH a jejich mutantů.

Cílem diplomové práce je purifikace a charakterizace aminoaldehyddehydrogenasy z kukuřice seté (*Zea mays*). Tato práce volně navazuje na dříve publikované studie zabývající se charakterizací AMADH z jiných rostlinných zdrojů, na které se Katedra biochemie již řadu let zaměřuje.

3 TEORETICKÁ ČÁST

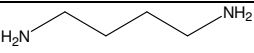
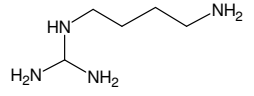
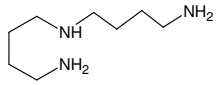
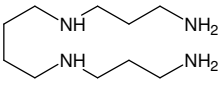
3.1 Polyaminy

Polyaminy patří mezi sloučeniny obsahující alifatické skupiny dusíku. Vyznačují se nízkou molekulovou hmotností a jsou přítomné ve všech živých organismech, tedy u živočichů i u rostlin kromě *Archaeobakterií* (Bouchereau *et al.*, 1999). Účastní se regulace širokého spektra buněčných procesů, mezi které patří např. buněčný růst a proliferace, diferenciaci tkání, replikace DNA, transformace buněčných kultur a dělení buněk. Polyaminy hrají důležitou roli při indukcii apoptózy (programované buněčné smrti). Jejich funkce je ale dvouznačná, protože zároveň díky svému stimulačnímu účinku na dělení buňky mají významnou ochrannou roli. Bylo prokázáno, že polyaminy se podílejí na procesech chránících rostlinu před stresem.

Většinou se polyaminy v přírodě vyskytují ve volné formě, díky svému pozitivnímu náboji (za fyziologického pH) jsou schopny asociace s polyanionty např. s DNA a RNA, čímž stimulují jejich biosyntézu a sbalování. Mohou být rozpustné, ale i nerozpustné ve vodě. Nerozpustné jsou kovalentně navázány na záporně nabitě fosfolipidové složky na membránách, čímž dochází ke změně stability těchto membrán. Ve své volné formě fungují jako faktory zamezující stárnutí. Polyaminy se mohou vyskytovat ve formě konjugátů. Ty vytváří s molekulami s nižší molekulovou hmotností např. s fenolovými kyselinami (Martin-Tanguy, 1997).

Mezi nejvýznamnější polyaminy se řadí tetraamin spermin [N,N'-bis-(3-aminopropyl)-1,4-butandiamin, SPM], triamin spermidin [N-(3-aminopropyl)-1,4-butandiamin, SPD] a jejich společný prekurzor diamin putrescin [1,4-butandiamin, PUT] (tabulka 1).

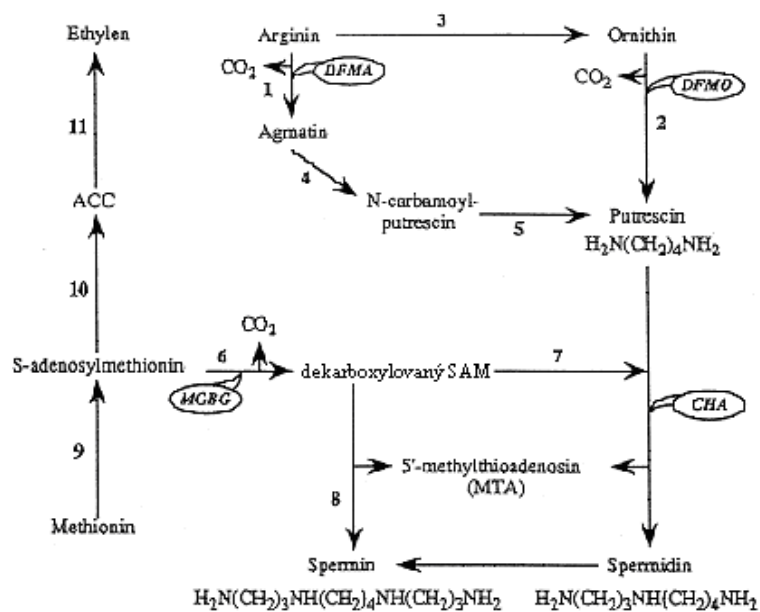
Tab. 1. Strukturální vzorce biogenních di- a polyaminů (upraveno podle Macholán, 2002).

Struktura	Název	Prekurzor
	putrescin	L-ornithin
	agmatin	L-arginin
	spermidin	L-ornithin + methionin
	spermin	L-ornithin + 2x methionin

Kromě již zmíněných polyaminů se můžeme setkat i s méně častými polyaminy, které se vyskytují v bakteriích, řasách, houbách i u živočichů. Příkladem méně častého polyaminu je kaldopeptamin, který se vyskytuje v extrémně termofilních bakteriích *Thermus thermophilus*, ale i v některých rostlinách čeledi bobovité (*Fabaceae*) (Bagni & Tassoni, 2001).

3.1.2 Biosyntéza polyaminů

Biosyntéza polyaminů vychází z dekarboxylace bazických aminokyselin (hlavní část uhlíkového skeletu poskytují lysin, arginin a ornithin). Prvním krokem biosyntézy polyaminů ve vyšších rostlinách a bakteriích je biosyntéza putrescinu (Bagni & Tassoni, 2001). Putrescin může vznikat pomocí dvou alternativních biosyntetických cest. První možnost syntézy se odvíjí přímo z ornithinu, reakcí katalyzovanou ornithindekarboxylasou (ODC, EC 4.1.1.17). Druhá cesta vede nepřímo z argininu za přítomnosti arginindekarboxylasy (ADC, EC 4.1.1.19) (obr.1) (Bouchereau *et al.*, 1999).



Obr.1. Schéma biosyntézy hlavních rostlinných polyaminů (spermin, putrescin a spermidin). 1, Arginindekarboxylasa (ADC); 2, Ornithindekarboxylasa (ODC); 3, Arginasa; 4, Agmatiniminohydrolasa; 5, N-karbamoylputrescinamidohydrolasa; 6, SAM dekarboxylasa; 7, Spermidinsynthasa; 8, sperminsynthasa; 9, SAM synthasa; 10, ACC synthasa; 11, ACC oxidasa. PA inhibitory: DFMA, difluoromethylarginin; DFMO, difluoromethylornithin; CHA, cyklohexylamin; MGBG, methyl-(glyoxal)-bis-guanylhydrazon (Bouchereau *et al.*, 1999).

V tomto případě vzniká meziprodukt agmatin, který je pomocí agmatiniminohydrolasy (AIH, EC 3.5.3.12) transformován na N-karbamoylputrescin. Tento druhý meziprodukt je pak za účasti N-karbamoylputrescinamidohydrolasy (NCPAH, EC 3.5.1.53) přeměněn na putrescin. U živočichů a hub vzniká putrescin pouze jedinou cestou a to dekarboxylací ornithinu (Kusano

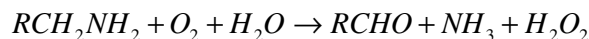
et al., 2007). Následně vzniká z putrescinu přidáním aminopropylových skupin spermidin. Reakce je katalyzovaná pomocí spermidinsynthasy (EC 2.5.1.16). Aminopropylové skupiny jsou přeneseny z dekarboxylovaného S-adenosylmethioninu. Spermin vzniká další kondenzací na primární skupině spermidinu působením sperminsynthasy (EC 2.5.1.22) (Bouchereau *et al.*, 1999).

3.1.3 Katabolismus polyaminů

Nepostradatelnost polyaminů pro činnost buněk a naopak nebezpečnost jejich nahromadění má za následek velmi přesnou kontrolu jejich vnitrobuněčných hladin. Příslušná koncentrace polyaminů je dosažena vyváženou regulací jejich biosyntézy, degradace, transportu a konjugace (Bagni & Tassoni, 2001).

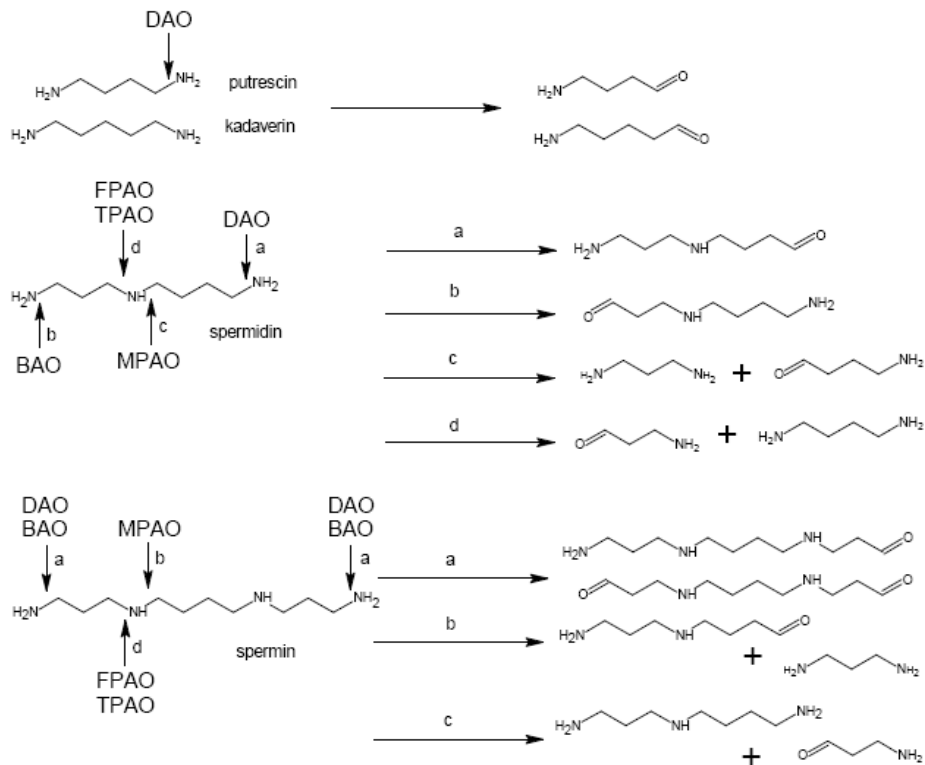
Degradace polyaminů probíhá oxidační deaminací prostřednictvím aminooxidas (AO). Tyto enzymy jsou zastoupené u bakterií, hub, vyšších rostlin i u živočichů (Federico & Angelini, 1991). Výskyt AO v rostlinném extraktu byl poprvé zaznamenán v roce 1948 (Werle & Raub, 1948; Werle E. & Zabel, 1948)

AO se účastní přeměny biogenních aminů na odpovídající aldehydy (Bílková *et. al.*, 2004). Při této reakci se uvolňuje amoniak a peroxid vodíku:



Aminoxidasy pocházející z různých zdrojů se liší především svou substrátovou specifičností. Také mechanismus degradace substrátu je u jednotlivých AO odlišný (obr.2). Proto se AO mohou klasifikovat na základě několika kritérií. Z hlediska substrátové specifičnosti se rozdělují na monoaminoxidas (MAO), diaminoxidas (DAO) a polyaminoxidas (PAO), tedy oxidující mono-, di- nebo polyaminy ((Federico & Angelini, 1991; Smith, 1985; Cohen, 1998). Substrátová specifičnost všech dosud studovaných enzymů je však široká, proto není toto rozdělení ideální.

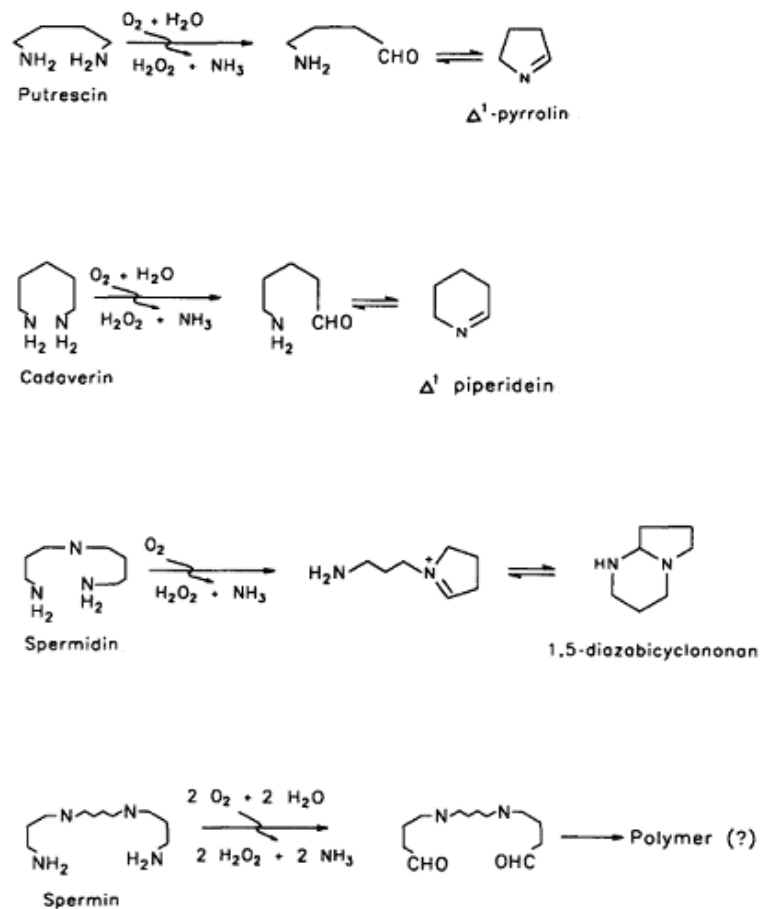
Druhé možné dělení je založené na charakteru prostetické skupiny. Známe tedy AO obsahující měď (CAO, EC 1.4.3.6) a AO obsahující flavin-adenin-dinukleotid (FAD) (PAO, EC 1.5.3.11) (Federico & Angelini, 1991). PAO mohou dělit podle toho, zda je produktem jejich reakce 3-aminopropanal nebo propan-1,3-diamin (Morgan, 1985).



Obr. 2. Oxidační deaminace polyaminů z různých zdrojů. DAO diaminoxidasa ze semenáčků čočky, BSAO aminoxidasa z hovězího séra, TPAO tkáňová polyaminoxidasa z krysích jater, MPAO kukuřičná polyaminoxidasa, FPAO polyaminoxidasa z hub (*Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum*) (Federico & Angelini, 1991).

3.1.3.1 Aminoxidasy obsahující měď

Aminoxidasy obsahující měď (CAO) se podle svých typických substrátů (diaminů) nazývají diaminoxidasy. DAO katalyzují oxidaci primární aminoskupiny diaminů, putrescinu a kadaverinu, kdy jako hlavní produkty reakce vznikají 4-aminobutyraldehyd (ABAL) a 5-aminovaleraldehyd (AVAL). Triamin spermidin je přeměňován na 4-(3-aminopropyl)aminobutyraldehyd (APBAL). Vedlejšími produkty těchto reakcí jsou amoniak a peroxid vodíku (Morgan, 1985). Vzniklý peroxid vodíku se následně v rostlinách podílí na maturaci a lignifikaci buněčné stěny, dále pak na hojení ran. V neposlední řadě se účastní zpevňování buněčné stěny, která slouží jako obrana při napadení patogeny. Aldehydy, které vznikají během reakce, podléhají spontánně cyklizaci na 1-pyrrolin, 1-piperidein a 1-(3-aminopropyl)-pyrrolinium (Smith *et al.*, 1986) (obr.3).



Obr. 3. Oxidační deaminace diaminů a polyaminů katalyzovaná CAO. Aminoaldehydy vzniklé z putrescinu, kadaverinu a spermidinu podléhají spontánně cyklizaci (Medda *et al.*, 1995).

CAO byly identifikovány v kulturách bakterií, v kvasinkách, houbách, také u živočichů a rostlin. CAO jsou nejčastěji v nativním stavu složeny ze dvou stejných podjednotek (McIntire & Hartmann, 1992). Molekulová hmotnost homodimerů se pohybuje v rozmezí 150-200 kDa. V každé z podjednotek se vyskytuje atom mědi ve formě iontu Cu^{2+} a topachinon (2,4,5-trihydroxyfenylalanin chinon, TPQ) jako redoxní faktor (Frébert & Adachi, 1995). Vzdálenost mezi Cu^{2+} a kyslíky topachinonu v aktivním místě umožňuje přímý přenos elektronu mezi oběma prostetickými skupinami (Malmström *et al.*, 1975). Měď je možno z aktivního místa CAO teoreticky snadno odstranit. Lze to provést za neredukujících podmínek reakcí s diethyldithiokarbamátem, po redukcí dithioničtanem na Cu^+ potom pomocí kyanidu (Suzuki *et al.*, 1984). Katalytickou aktivitu lze opět obnovit přidávkem volných Cu^{2+} iontů k apoenzymu (Hill & Mann, 1964).

V krystalickém stavu bylo již připraveno několik CAO. Jde o enzymy z hovězí a vepřové krevní plazmy (Yamada & Yasunobu, 1962, Buffoni *et al.*, 1977), vepřových ledvin (Yamada *et al.*, 1967), semenáčků hrachu (Vignevech *et al.*, 1993), kvasinky *Hansenula polymorpha*

(Li *et al.*, 1998) a bakterií *Escherichia coli* (Roh *et al.*, 1994) a *Arthrobacter globiformis* (Freeman *et al.*, 1996). První CAO, u které byla vyřešena trojrozměrná krystalová struktura, pochází z *E.coli* (Parsons *et al.*, 1995). Trojrozměrná struktura eukaryotické AO z hrachu (PSAO) byla objasněna roce 1996 (Kumar *et al.*, 1996). Molekula PSAO je dimer složený ze dvou krystalografických na sobě nezávislých, ale chemicky identických podjednotek. Atom mědi je koordinován imidazolovými skupinami tří histidinových residuí a dvěma molekulami vody. Do koordinace není zapojen TQF (Kumar *et al.*, 1996).

CAO umožňují prokaryotickým organismům využívat alkyl- či arylamid jako jediný zdroj uhlíku a dusíku. Obecná funkce těchto enzymů u vyšších organismů nebyla dosud objasněna (McIntire, 1992). Rostlinné AO se podílí na biosyntéze několika skupin alkaloidů. Dosud nejasný je také jejich vztah k lignifikaci buněčné stěny (Slocum & Furey, 1991). CAO jsou klasifikovány do čtyř skupin na základě substrátové specifity a původu. (Frébert & Adachi, 1995). Jsou to:

1. Savčí plazmové aminoxidas, které vykazují vysokou schopnost oxidovat polyaminy (spermin, spermidin) a monoaminy (benzylamin). Nejlépe prostudovanými enzymy této skupiny jsou enzymy z hovězí a vepřové krevní plazmy a séra. Byla rovněž provedena izolace enzymů z krevní plazmy ovčích, králičích a koňské.

2. Savčí diaminoxidas, které se vyskytují v ledvinách a placentě a přednostně oxidují diaminy (putrescin a kadaverin) a histamin. Ze savčích diaminoxidas jsou nejlépe charakterizované enzymy z lidských a vepřových ledvin, lidské placenty a tlustého střeva krysy.

3. Mikrobiální aminooxidas, které nejlépe přeměňují arylalkylaminy, např. benzylamin, fenethylamin, tyramin a histamin. Do této skupiny se řadí enzymy z plísně *Aspergillus niger*, kvasinek *Hansenula polymorpha* a *Pichia pastoris* atd. (Frébert & Adachi, 1995).

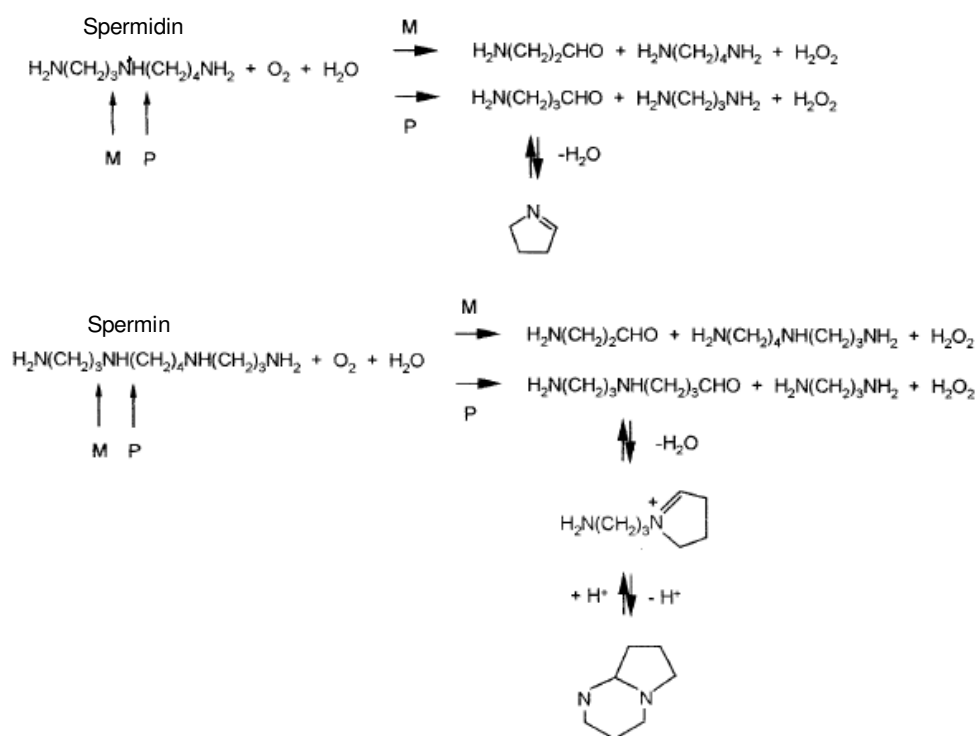
4. Rostlinné diaminoxidas disponující vysokou afinitou k putrescinu a kadaverinu, oxidují však i spermidin. Tvoří početně nejrozsašlejší skupinu aminoxidas. Tyto enzymy byly izolovány především z čeledi bobovité (*Fabaceae*), dále pak z čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Výchozím materiálem pro izolaci rostlinných DAO jsou především ve tmě pěstované semenáčky hrachu setého. Nejlépe prozkoumány jsou přitom CAO z čočky kuchyňské, latexu pryšce a právě semenáčků hrachu (Medda *et al.*, 1995; McIntire & Hartmann, 1992).

3.1.3.2 Aminoxidas obsahující FAD

Aminoxidas obsahující FAD se často nazývají polyaminooxidas. PAO katalyzují reakci na sekundárních aminoskupinách polyaminů (SPD, SPM). PAO byly vyizolovány z rozličných zdrojů. Byly nalezeny u živočichů, rostlin, hub i mikroorganismů. Rostlinné PAO se vyskytují nejčastěji u zástupců čeledi lipnicovité (*Gramineae*, *Poaceae*). Tento enzym byl nalezen např.

v ovsu (*Avena sativa*) (Federico *et al.*, 1989), kukuřici (*Zea mays*) (Suzuki & Yanagisawa, 1980), v ječmeni (*Hordeum vulgare*) (Radová *et al.*, 2001), v pšenici (*Triticum aestivum*) (Nadeau *et al.*, 1987) a v žitu (*Secale cereale*) (Federico & Angelini, 1991). Byla také provedena charakteristika PAO z vodního hyacintu (*Eichhornia crassipes*) (Yanagisawa *et al.*, 1987) a lilie (*Lilium longiflorum*) (Yanagisawa *et al.*, 1996). U dvouděložných rostlin byla detekována PAO aktivita u vojtěšky (*Medicago sativa*) (Bagga *et al.*, 1991).

Rostlinné a živočišné PAO se ve svém účinku liší. Savčí PAO přeměňují spermidin na putrescin a 3-aminopropionaldehyd (APAL). Následně je spermin přeměňován na spermidin a APAL. Jako vedlejší produkt této reakce se uvolňuje peroxid vodíku. Rostlinné a bakteriální PAO katalyzují přeměnu spermidinu a sperminu na ABAL a APBAL (obr. 4)



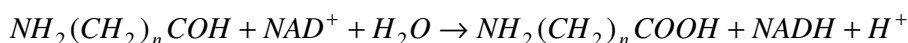
Obr. 4. Schéma reakcí katalyzovaných savčími (M) a rostlinnými (P) PAO (Binda *et al.*, 1999).

Aldehydy produkované touto reakcí následně spontánně cyklizují na 1-pyrrolin a 1-(3-aminopropyl)pyrrolinium, dále pak až na 1,5-diazobicyklo[4.3.0]nonan. Vedlejšími produkty reakce jsou 1,3-propandiamin (DAP) a peroxid vodíku (Smith *et al.*, 1985). DAP může být převeden na β -alanin, zatímco pyrrolin může být dále převeden na γ -aminomáselnou kyselinu (GABA). Tato reakce probíhá za katalýzy pyrrolindehydrogenasy (PYRR-DH). Kyselina γ -aminomáselná je postupně transaminována a oxidována na kyselinu jantarovou, která je posléze začleněna do Krebsova cyklu (Aribaud & Martin-Tanguy, 1994).

Reakci katalyzovanou rostlinnou PAO lze obecně rozdělit na dvě fáze. V první, redukční, probíhá současně redukce flavinu a oxidace polyaminu. Ve druhé části je redukovaný flavin reoxidován molekulárním kyslíkem, při tomto ději je uvolňován peroxid vodíku (Seiler, 1995; Binda *et al.*, 1999). Meziproduktem oxidace polyaminů je iminosloučenina (azomethin), která je hydrolyzována na finální produkt. Všechny rostlinné PAO jsou monomerní enzymy, některé jsou glykoproteiny (Šebela *et al.*, 2001a). Krystalová struktura PAO byla vyřešena pouze u kukuřice. Kukuřičná PAO je monomerní enzym skládající se ze dvou domén.

3.2 Aminoaldehyddehydrogenasy

Aminoaldehydy, které vznikají oxidačními deaminacemi biogenních aminů, jsou dále metabolizovány účinkem aminoaldehyddehydrogenas (AMADH, EC 1.2.1.1). AMADH jsou NAD-dependentní enzymy katalyzující přeměnu ω -aminoaldehydů na příslušné ω -aminokyseliny. Při této reakci dochází k redukci NAD^+ na NADH podle následující reakce:



Aminoaldehyddehydrogenasy přísluší k velké rodině aldehyddehydrogenas 9 a 10 (ALDH9, ALDH 10), které patří do ALDH nadrodiny (Perozich *et al.*, 2000; Kirch *et al.*, 2004). Tyto rodiny spojují tři nesouvisející metabolické cesty. Jedná se o metabolismus polyaminů, cholinu a lysinu. V enzymovém katalogu jsou AMADH rozděleny na:

- 4-aminobutyraldehyddehydrogenasy (ABALDH, EC 1.2.1.19)
- 4-guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (GBALDH, EC 1.2.1.54)

Mezi členy ALDH9 a ALDH 10 rodin řadíme také:

- betainaldehyddehydrogenasy (BADH, EC 1.2.1.8)
- 4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (TMABALDH, EC 1.2.1.47)

3.2.1 Purifikace, kinetické a molekulární vlastnosti AMADH

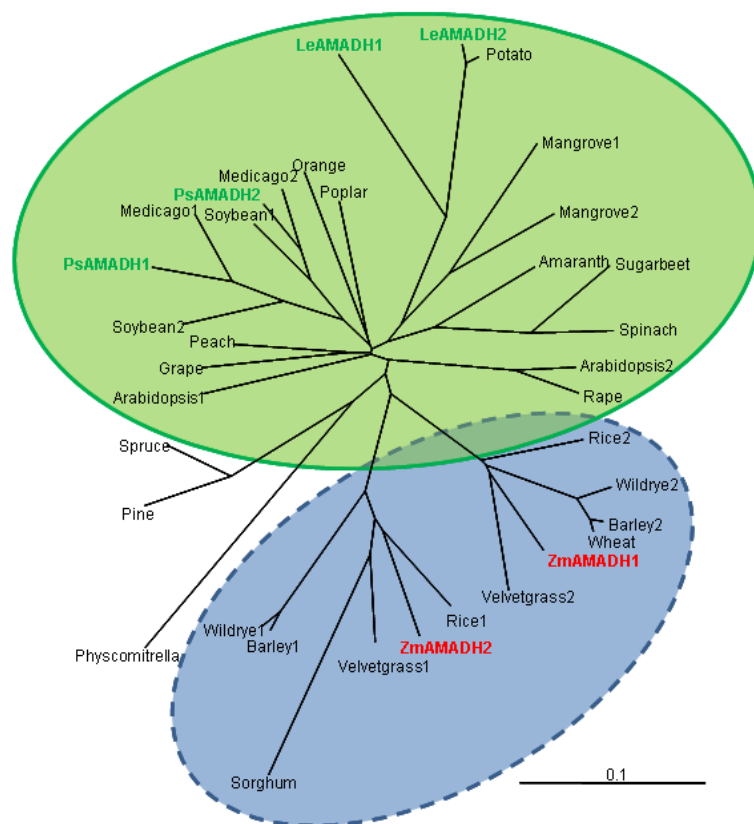
AMADH byly vypurifikovány z řady kultur mikroorganismů, rostlin i živočišných tkání. V roce 1959 byla částečně vyizolována ABALDH z bakterie *Pseudomonas fluorescens* (Jakoby & Fredericks, 1959), dále z bakterie *Pseudomonas putida* (Yorifuji *et al.*, 1986) a také z *Escherichia coli* (Prieto *et al.*, 1987). Během 80. a 90. let byly purifikovány ALDH ze savčích organismů, např. ABAL dehydrogenasy z krysího (Abe *et al.*, 1990) a z hovězího mozku (Lee & Cho, 1992).

U rostlin byla nalezena aminoaldehyddehydrogenasová aktivita v polovině 80. let především v luštěninách a travinách (Flores & Filner, 1985). Enzymy ovšem nebyly izolovány v homogenním stavu ani charakterizovány (Trossat *et al.*, 1997). Byla taktéž provedena částečná purifikace GBALDH z bobu (*Vicia faba*) (Matsuda & Suzuki, 1984). Molekulová hmotnost tohoto enzymu činila 83 kDa. Optimální pH reakce bylo 9.5 a teplotní optimum GBALDH bylo při 45 °C. Účinek tohoto enzymu oxidujícího úspěšně pouze substráty GBAL (4-guanidinobutyraldehyd) a ABAL byl inhibován přidavkem *p*-chloromerkuribenzoátu, *N*-ethylmaleimidu a zinkonu (2-karboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylbenzen). Následně byla charakterizována APAL dehydrogenasa z prosa (*Setaria italica*) (Awal, 1995). Její pH optimum mělo hodnotu 9.3 a největší stabilitu vykazovala při pH 5.4-6.0. Molekulová hmotnost byla 70 kDa a nevhodnějším substrátem byl určen APAL (100 %) při využití NAD⁺ jako koenzymu. Pokud bylo NAD⁺ zaměněno za NADP⁺ došlo k poklesu relativní rychlosti na 15 %. Substrát ABAL byl přeměňován zhruba s poloviční relativní rychlostí. APAL-dehydrogenasa byla inhibována účinkem *p*-chloromerkuribenzoátu a *N*-ethylmaleimidu (Awal *et al.*, 1995). O dva roky později byla provedena částečná purifikace AMADH z hrachu (Awal, 1997). Enzym byl vyizolován z 5-ti denních semenáčků hrachu pěstovaných za tmy při 25 °C. Během purifikace byla použita frakcionace pomocí síranu amonného. Separace byla provedena kolonovou chromatografií na DEAE-celulose, hydroxyapatitu a Sephacrylu S-200. Molekulová hmotnost byla určena jako 82 kDa. Nejvyšší stability dosahoval enzym při pH 6.0. Optimální pH reakce přeměňující APAL a 1,5-diazobycyklo[4.3.0]nonan (1,5-DBN) bylo 9.0. Z hlediska substrátové specifičnosti se jako nejúčinnější substrát jevil APAL (100 %). V případě záměny NAD⁺ za NADP⁺ byl APAL přeměňován s relativní rychlostí 12 %. Velmi dobrými substráty byly také ABAL (57 %) a indol-3-acetaldehyd (54 %). Relativní rychlosti reakcí s 5-aminovaleraldehydem, 1,5-DBN a glutaraldehydem byly 33 %, 21 % a 27 %. V případě substrátů propionaldehydu (C3) a acetaldehydu (C2) nebyla zaznamenána žádná aktivita (Awal, 1997).

První purifikace, při které byla rostlinná AMADH z hrachu (PsAMADH1) získána v homogenním stavu, byla provedena v roce 2000 na Katedře biochemie UP (Šebela *et al.*, 2000). Enzym byl vyizolován z etiolovaných semenáčků hrachu pěstovaných ve tmě po dobu 1-10 dnů. Nejdříve byla provedena frakcionace 65 % síranem amonným, dále následovaly 3 kroky nízkotlaké chromatografie na kolonách: Octyl Sepharose 4, Sephadex G-25 a DEAE-celulosa SH-23. Částečně purifikovaný enzym byl poté nanesen na iontoměničovou kolonu Mono Q HR 5/5 a nakonec přečištěn afinitní chromatografií na 5'AMP Sepharose 4B. Aktivita AMADH byla detekována u hrachových semáčků již 3 dny starých. Následně docházelo ke kontinuálnímu nárůstu aktivity po dobu dalších čtyř dnů až do 7. dne. Poté nastal výrazný pokles aktivity tohoto enzymu. Celá izolace byla znesnadněna díky značné nestabilitě AMADH. Aktivita hrubě přečištěných enzymových preparátů se snižovala jejich zamražením

a dialýzou. Částečně purifikovaný enzym mohl být skladován jen jako zamražený síranový precipitát po dobu 1 týdne. Čistá PsAMADH1 mohla být skladována zamražená při $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ jako koncentrovaný roztok v 20 mM Bis-Tris/HCl pufru (5 mM 2-merkaptoethanol, 1 mM EDTA, 5 % glycerol). Pomocí SDS-PAGE byla stanovena molekulová hmotnost tohoto enzymu na 57 kDa. V nativním stavu měl enzym $M_r = 230\text{ kDa}$. PsAMADH1 patří mezi kyselé proteiny s hodnotou izoelektrického bodu (pI) 5.4. Optimální pH enzymu bylo 8.5. Teplotní optimum pro enzym bylo při $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, nad $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ aktivita významně poklesla (Šebela *et al.*, 2000).

PsAMADH1 vykazovala širokou substrátovou specifitost. Obecně byla aktivnější při přeměně substrátů C3 a C4 aminoaldehydů (APAL a ABAL) než při oxidaci jejich methyl- či guanidino- derivátů. Nejlepším substrátem byl APAL. Hydroxylové deriváty byly přeměňovány s menší relativní rychlostí než přirozené aminoaldehydy, ale rychleji než C2-C8 *n*-alkylaldehydy, které byly velmi špatnými substráty. V této skupině patřily mezi nejlepší substráty butyraldehyd (C4), valeraldehyd (C5) a kapronaldehyd (C6), jejichž oxidace díky absenci atomu dusíku v molekule aldehydu probíhala rychlostí pouze okolo 3 % v porovnání se substrátem APAL. 3- a 4-Pyridinkarbaldehydy (3-, 4-PCAL) byly překvapivě oxidovány s obdobnou rychlostí jako zmiňované *n*-alkylderiváty. Zajímavé bylo, že C2 aminoaldehyd (betainaldehyd, BAL) byl také špatně oxidován (Tylichová *et al.*, 2010). V roce 2003 byla popsána primární struktura rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy, konkrétně PsAMADH (Brauner *et al.*, 2003). Klonováním cDNA hrachové AMADH byly izolovány dvě kompletní sekvence, které byly vzájemně vysoce homologní (81 % identita, 92 % vzájemná podobnost). Díky tomu byla potvrzena existence dvou izoform enzymu nazvaných PsAMADH1 a PsAMADH2. Ačkoliv obě hrachové AMADH jen stěží přeměňovaly BAL, jejich aminokyselinové sekvence vykazovaly podobnost se sekvencemi rostlinných betainaldehyddehydrogenas (BADH, EC 1.2.1.8). Podobnost se pohybovala v rozmezí 70-80 %. Obecně lze shrnout, že se rostlinné enzymy dají rozdělit do dvou skupin podle příslušnosti k jednoděložným či dvouděložným rostlinám (obr. 5) (Tylichová, 2009).

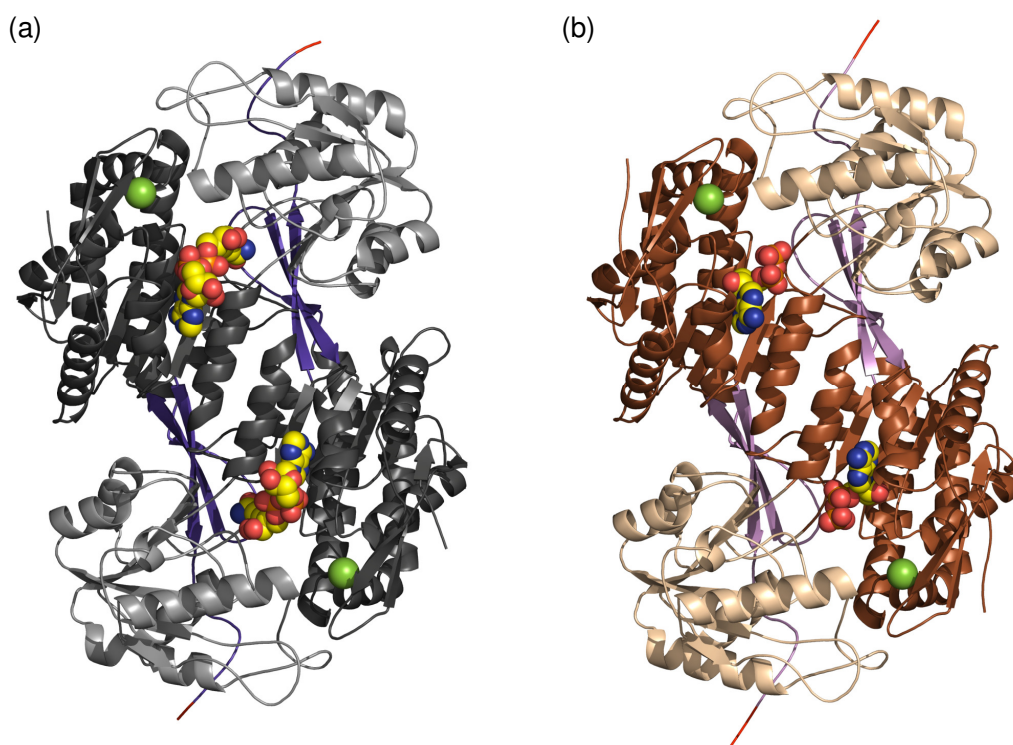


Obr. 5 Fylogenetická analýza rostlinných AMADH a BADH. Fylogenetický strom byl sestaven pomocí programů CLUSTAL W a TreeView (Tylichová, 2009).

Oba izoenzymy byly posléze připraveny jako rekombinantní proteiny díky expresi v transformovaných buňkách *E.coli*, čímž byly umožněny další studie zaměřené na strukturně-funkční vlastnosti obou enzymů. Ty byly zkrystalizovány a poté analyzovány rentgenovou difrakcí. Asymetrická jednotka krystalu PsAMADH1 obsahovala 6 velmi podobných dimerů, zatímco asymetrická jednotka PsAMADH2 obsahovala pouze jeden dimer. Z tohoto zjištění vyplývá, že aktivní forma v roztoku je dimer. Krystal PsAMADH1 je charakterizován jednoklonnou krystalovou soustavou $P2_1$ s parametry elementární buňky $a = 86.4 \text{ \AA}$, $b = 216.9 \text{ \AA}$, $c = 205.8 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 98.02^\circ$, $\gamma = 90^\circ$. Parametry krystalové soustavy $P2_12_12_1$ krystalu PsAMADH2 jsou $a = 66.3 \text{ \AA}$, $b = 86.9 \text{ \AA}$, $c = 179.3 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ (Tylichová *et al.*, 2008; Tylichová *et al.*, 2010) (obr. 6).

V roce 2002 byla provedena purifikace a charakterizace AMADH z ovesa setého (*Avena sativa*) (Livingstone *et al.*, 2002). Aktivita aminoaldehyddehydrogenasy byla zaznamenána v extraktu z etiolovaných semenáčků ovesa pěstovaných po dobu 3-9 dní. Aktivita tohoto enzymu rostla do 7. dne, poté došlo k jejímu poklesu. Při purifikaci enzymu byl opět použit síran amonný na frakcionaci. K separaci byla použita kolonová chromatografie na

DEAE-Sephacel, hydroxyapatitu, 5'-AMP Sepharose 4B, Mono a TSK-GEL. Enzym byl nejvíce stabilní při pH 6.5. Přídavek glycerolu, 2-merkptoethanolu a NAD^+ zvýšil stabilitu tohoto enzymu. Molekulová hmotnost enzymu byla určena pomocí SDS-PAGE a TSK-GEL kolonové chromatografie jako 55 kDa. Bylo zjištěno, že AMADH se v nativní formě vyskytuje jako monomer. Teplotní a pH optimum bylo $40\text{ }^\circ\text{C}$, respektive 8.6. Hodnota pI byla stanovena na 5.3. Nejlepším substrátem pro tento enzym byl APAL, substráty ABAL a 4-guanidinobutyraldehyd (GBAL) patřily mezi velmi dobré, jejich relativní rychlost byla 51 % a 52 %. Oproti tomu alifatické uhlovodíky jako např. propionaldehyd a acetaldehyd nebyly vůbec oxidovány (Livingstone *et al.*, 2002). Molekulární a kinetické vlastnosti vybraných AMADH jsou shrnuty v tabulce 2.



Obr. 6. Trojrozměrná struktura AMADH z hrachu. (a) PsMADH1 dimer. Katalytická doména, koenzym vázající doména a oligomerizační doména jsou vyznačeny světle šedou, černou a modrou barvou. Dále jsou zobrazeny NAD^+ koenzym a kation (zeleně zbarvený). (b) PsAMADH2 dimer. Katalytická doména, koenzym vázající doména a oligomerizační doména jsou vyznačeny béžovou, hnědou a fialovou barvou. Peroxisomální signální sekvence (S/A)KL na C-konci je označena červeně (Tylichová *et al.*, 2010)

Tab. 2. Kinetické a molekulární vlastnosti vybraných AMADH. Uvedené AMADH pocházejí z následujících zdrojů: *Pseudomonas putida* (Yorifuji *et al.*, 1986), *Escherichia coli* (Prieto *et al.*, 1987), bob obecný - *Vicia faba* (Matsuda & Suzuki, 1984), proso - *Setaria italica* (Awal *et al.*, 1995), hrách setý - *Pisum sativum* (Šebela *et al.*, 2000; Awal *et al.*, 1997), bob obecný - *Vicia faba* (Matsuda & Suzuki, 1984), oves setý - *Avena sativa* (Livingstone *et al.*, 2002), mozek krysy (Abe *et al.*, 1990) a mozek krávy (Lee & Cho, 1992).

Zdrojový organismus	Enzym	Molekulová hmotnost		Hodnoty K_m (μM)		
		nativní	podjednotka	APAL	ABAL	NAD ⁺
<i>Pseudomonas putida</i>	ABALDH	240	57	-	260	50
<i>Escherichia coli</i>	ABALDH	195	95	-	31	54
<i>Vicia faba</i>	GBALDH	83	-	-	25	84
<i>Setaria italica</i>	APALDH	70	-	27	420	38
<i>Pisum sativum</i>	AMADH1	230	57	260	480	55
<i>Avena sativa</i>	AMADH	55	55	1.5	2.2	11
Mozek krysy	ABALDH	210	50	-	151	87
Mozek krávy	ABALDH	230	58	-	154	53

3.2.2 Lokalizace AMADH

V prvních studiích zaměřených na lokalizaci hrachové a ovesné AMADH se předpokládala jejich asociace s protoplastem (Flores & Filner, 1985). S využitím anti-AMADH polyklonálních protilátek byla potvrzena nitrobuněčná lokalizace hrachové AMADH, enzym se s největší pravděpodobností nachází v cytoplasmě (Luhová *et al.*, nepublikované výsledky). AMADH aktivita v pletivech hrachových semenáčků byla lokalizována použitím tetrazoliových solí, jejichž redukcí vzniká barevný precipitát formazan. Atom vodíku přenášený ze substrátu na koenzym (např. NAD⁺) při reakci katalyzované AMADH, může být za přítomnosti fenazin methosulfátu (PMS) spontánně přenesen na tetrazoliovou sůl, například nitrotetrazoliovou modř (Nitro Blue Tetrazolium, NBT) nebo thiazolylovou modř (Thiazolyl Blue, MTT) za vzniku modrofialového formazanu, jehož intenzita byla následně detekována. V kořeni a hypokotylu bylo nejintenzivnější zbarvení zjištěno v buňkách pericyklu a endodermis. Slabší zbarvení (hlavně v kořeni) bylo pozorováno ve vaskulárním kambiu. V epikotylu a apexu byla hlavní aktivita detekována v buňkách vaskulárního kambia. Pozitivní zbarvení bylo objeveno i v pericyklu a endodermis. Intenzita tohoto zbarvení byla ovšem nižší (Šebela *et al.*, 2001b). Předpokládá se vzájemná korelace mezi lokalizací AMADH v pletivech a fyziologickou funkcí tohoto enzymu. Aminoaldehydy vznikající v procesu oxidační deaminace polyaminů jsou transportovány do kambia, pericyklu a endodermis, kde jsou účinkem reakce katalyzované AMADH metabolizovány na odpovídající aminokyseliny (APAL na β -alanin a ABAL na γ -aminomáselnou kyselinu). Tyto látky jsou pak transportovány floémem do nově vznikajících pletiv (Fischer *et al.*, 1998). Co se subcelulární lokalizace týče, AMADH jsou pravděpodobně lokalizovány v peroxisomech. Obsahují totiž C-koncový PST1 (peroxisomal targeting signal type 1), nejčastěji SKL nebo AKL motiv (Tylichová *et al.*, 2007).

Aminoaldehyddehydrogenasy se účastní procesů, při nichž se rostlina přizpůsobuje na různé stresové podmínky. Byla sledována aktivita AMADH během procesu hojení poranění semenáčku vzniklého účinkem mechanického poškození. Bylo prokázáno, že během hojení poškozených semenáčku vzrostla aktivita AMADH, CAO a peroxidasa ve stonkových segmentech. Výrazné zvýšení aktivity AMADH bylo detekováno již druhý den po poranění. V případě CAO došlo k nárůstu aktivity o den později, tedy třetí den. Peroxidasová aktivita narůstala kontinuálně po celou dobu pozorování. Současně došlo také ke zvýšení obsahu putrescinu, kadaverinu spermidinu a kyseliny γ -aminomáselné. Použití histochemických metod umožnilo vizuálně sledovat nárůst aktivity AMADH v příčných řezech poškozených semenáčků. Aktivita AMADH v neporaněných semenáčcích hrachu byla detekována jako fialové zabarvení v buňkách pericyklu, vaskulárního kambia a endodermis. Buňky kortikálního parenchymu a epidermis, které se vyskytovaly na povrchu stonku a tudíž byly vystaveny možnému mechanickému poškození, nebyly v tomto případě zbarveny. Avšak aktivita enzymu byla objevena u buněk kortikálního parenchymu a epidermis sousedících s poškozeným místem. Nárůst aktivity enzymu byl současně doprovázený intenzivní lignifikací v tomto místě (Petřivalský *et al.*, 2007).

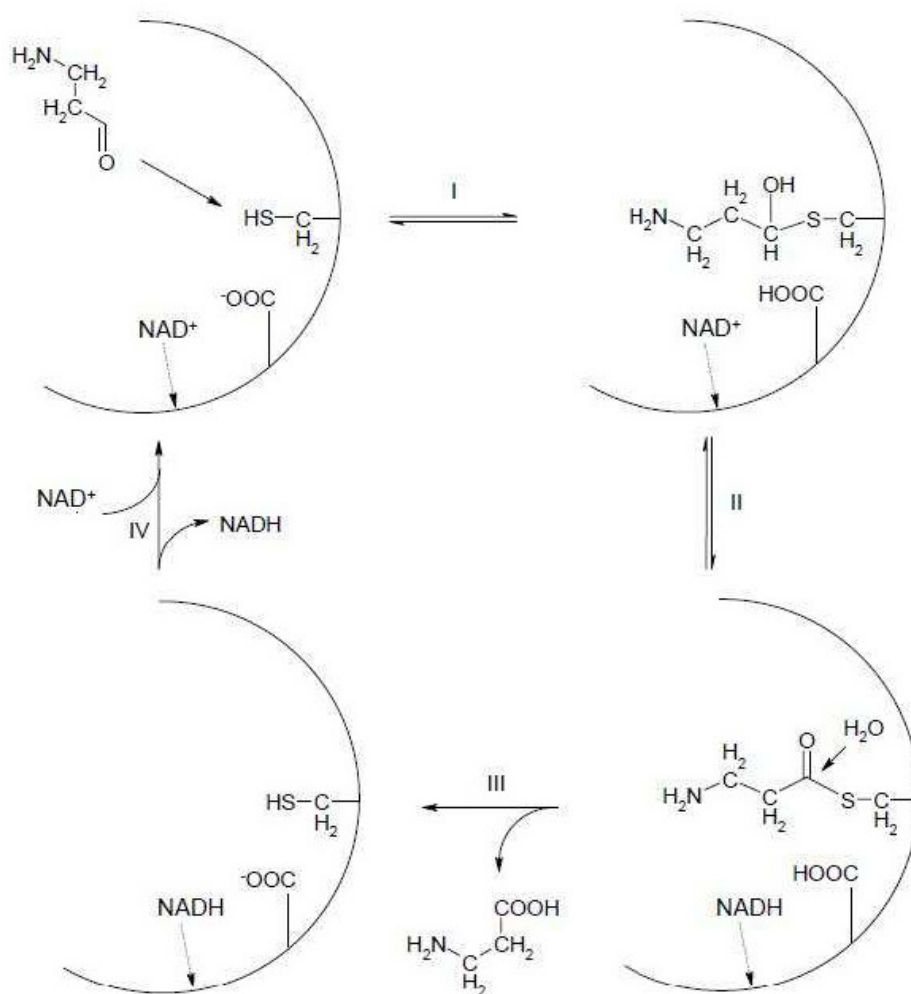
Byla také studována účast AMADH v mechanismu obranné reakce vyvolané salinitním stresem. Poznatek, že v hrachu setém pěstovaném právě za těchto podmínek nebyla zaznamenána betainaldehyddehydrogenasová aktivita podílející se na tvorbě glycinbetainu (kompatibilní sloučeniny), vedl k úvaze, že AMADH plní úlohu v obranné reakci rostlin vystavených tomuto druhu stresu. AMADH se může zapojit do mechanismu obranné reakce rostlin na salinitní stres účastí na produkci β -alaninu, který může být následně přeměněn na β -alaninbetain, důležitý buněčný osmoprotektant.

Nejnižší hodnota AMADH aktivity byla zaznamenána v prostředí 10 mM NaCl (KCl). Společně se stoupající koncentrací sodných a draselných iontů (20-80 mM) byl detekován výrazný nárůst AMADH aktivity. Sodné ionty vykazovaly větší vliv na změnu enzymové aktivity ve srovnání s K^+ ionty (Luhová *et al.*, 2005).

V následné studii byl sledován vliv rozdílného zastoupení Na^+ a K^+ iontů a vliv přídavku Ca^{2+} iontů k růstovému mediu obsahujícímu zvýšenou koncentraci solí. Nejvyšší nárůst produkce biomasy a s ním spojený výrazný pokles aminoaldehyddehydrogenasové aktivity byl detekován u hrachu setého pěstovaného v prostředí Na^+ a K^+ iontů v poměru 1:2 při celkové koncentraci solí 40 mM. Současně byl prokázán pozitivní vliv přídavku Ca^{2+} iontů do media obsahujícího 60 mM NaCl nebo KCl na produkci biomasy, ovšem za současného snížení AMADH aktivity (Piterková *et al.*, 2006).

3.2.3 Reakční mechanismus AMADH

Bakteriální, rostlinné i živočišné aminoaldehyddehydrogenasy obsahují v aktivním místě podjednotky enzymu kalytický cysteinový zbytek (Brauner *et al.*, 2003). Z tohoto důvodu jsou inaktivovány SH-činidly, např. *N*-ethylmaleimidem a 4-chloromerkuribenzoátem (Šebela *et al.*, 2000). Jako redoxní koenzym AMADH využívají NAD^+ . U některých AMADH včetně hrachové, může být koenzym NAD^+ nahrazen nikotinamid adenin dinukleotid fosfátem (NADP^+). Ovšem nahrazení není rovnocenné. Např. u hrachové AMADH dochází při této záměně k výraznému poklesu rychlosti přeměny substrátu APAL či ABAL (Šebela *et al.*, 2000). Důvodem je nejspíše existence elektrostatické repulze (odpudivá síla) 2'fosfátové skupiny NADP^+ . Tento jev byl pozorován i u některých ALDH (Perozich *et al.*, 2000). Katalytický mechanismus AMADH je zobrazen na obr. 7. Podobně jako ALDH využívají i AMADH kovalentní meziprodukty ke konverzi aminoaldehydových substrátů na aminokyseliny. Aminoaldehyd (substrát) je nukleofilně atakován katalytickým cysteinovým residuem. Vzniká tak kovalentně vázaný thiohemiacetal. Z tohoto meziproduktu je přenesen atom vodíku na C4 atom nikotinamidového kruhu NAD^+ . Přemístění vodíkového iontu ze substrátu vyžaduje spotřebu energie. Energetická náročnost je způsobena bipolárním charakterem karbonylové skupiny. V posledním katalytickém kroku je molekula vody aktivována glutamátovým residuem. Molekula vody umožní nukleofilní atak (hydrolýzu) na thioesteru a tím dojde k rozštěpení acyl-sírné vazby za uvolnění příslušné aminokyseliny. NADH je poté oddisociováno z vazebného místa koenzymu (Perez-Miller & Hurley, 2003).



Obr. 7. Katalytický mechanismus AMADH. Schéma aktivního místa enzymu je znázorněno s katalytickým cysteinovým zbytkem, který váže substrát. Šipky znázorňují navázané NAD/NADH. Obecnou bázi představuje karboxylový zbytek. **Reakce I:** Nukleofilní atak substrátu (v tomto případě APAL) katalytickým cysteinovým zbytkem za vzniku thiohemiacetalového meziproduktu. **Reakce II:** Přenos protonu z meziproduktu na NAD⁺ za vzniku NADH a thioesteru. **Reakce III:** Hydrolýza thioesteru, z aktivního místa odpovídající aminokyselina (v tomto případě β-alanin). **Reakce IV:** Uvolnění NADH a následné navázání jiného NAD⁺ (Tylichová *et al.*, 2007).

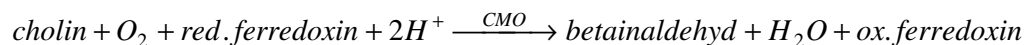
3.3 Betainy

Betainy se řadí mezi deriváty aminokyselin, jejichž aminoskupina je plně methylována. Jejich název vznikl odvozením od nejjednoduššího zástupce této skupiny, kterým je glycinbetain. Byl nalezen ve šťávě cukrové řepy, jejíž latinský název je *Beta vulgaris*. Výskyt betainů je zaznamenán především u rostlin, u nichž plní funkci kompatibilních osmolytů (osmoprotektantů). Tyto látky jsou pro rostlinu nesmírně důležité, protože se podílejí na adaptaci rostlin na abiotický stres, tedy na nedostatek vody, nízké či naopak vysoké teploty, zasolení půdy či vody. Osmoticky aktivní látky jsou nízkomolekulární sloučeniny, netoxické

i při vyšších koncentracích. Osmoprotektanty jsou dobře rozpustné a při fyziologickém pH neutrální látky (Livingstone *et al.*, 2003). Neinteragují se základními metabolickými drahami. Osmolyty vyrovnávají tlak způsobený zvýšenou koncentrací iontů mimo buňku a ve vakuole nebo kompenzují poruchy turgoru při nedostatku vody. Ve vysokém množství se akumulují především v cytoplazmě. V nižších koncentracích také mívají schopnost stabilizovat kvartérní strukturu bílkovin a membrán, fungují tedy i jako osmoprotektivní molekuly. Betainy prolinu a stereoisomerních hydroxyprolinů z hlíz čičů a z bukvice lékařské bývají též řazeny mezi alkaloidy. V zemědělství se využívají komerční extrakty z hnědých mořských řas, které zlepšují výnosy. Indukují resistenci rostlin vůči mrazu a stresu, stimulují příjem anorganických prvků z půdy a snižují ztráty ovoce při skladování (Macholán, 2002).

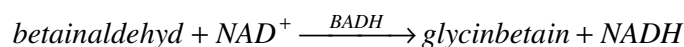
Osmoticky aktivní látky mohou mít různou chemickou povahu. Ze sacharidů to může být rafinosa, trehalosa, sacharosa, fruktany, cukerné alkoholy, jako je např. galaktinol (Yokoi *et al.*, 2002). Dále to mohou být alkoholy (pinitol, ononitol, glycerol, manitol), aminokyseliny (prolin, asparagin) a v neposlední řadě kvartérní amoniové báze, mezi které patří β -alaninbetain, prolinbetain (stachydrin, kadabin) a již zmiňovaný glycinbetain (obr. 8). Prolinbetain byl mimo jiné nalezen v červených mořských řasách a v měkkýši *Elysia chlorotica*. Tyto organismy využívají zmiňovaný osmoprotektant k regulaci buněčného obsahu (Blunden *et al.*, 1983; Pierce *et al.*, 1984).

Glycinbetain (N,N,N-trimethylglycin, GB) se přirozeně vyskytuje u živočichů, hub, kyanobakterií, řas a v mnoha rostlinách. Akumulace byla u rostlin potvrzena především v čeledi *Chenopodiaceae* (merlíkovité), *Amaranthaceae* (laskavcovité), *Poaceae* (lipnicovité) a *Malvaceae* (slézovité) (Rhodes & Hanson, 1993). K nahromadění glycinbetainu dochází především v listech, květech, semenech, kořenech, stoncích a dělohách. Ovšem koncentrace glycinbetainu v jednotlivých orgánech se liší. Obsah glycinbetainu v listech je nejvyšší v období jejich rozvoje, naopak nejnižší v průběhu jejich zrání a senescence. Obsah glycinbetainu v kořenech je během celého životního cyklu rostliny nízký (Wang *et al.*, 2004). Tato kvartérní amoniová sloučenina je ve většině rostlin syntetizována dvou krokovou oxidací vycházející z cholinu. V prvním kroku katalyzuje ferredoxin-dependentní cholinmonooxygenasa (CMO, EC 1.14.15.7) přeměnu cholinu na betainaldehyd (BAL). Reakce probíhá podle následujícího schématu:

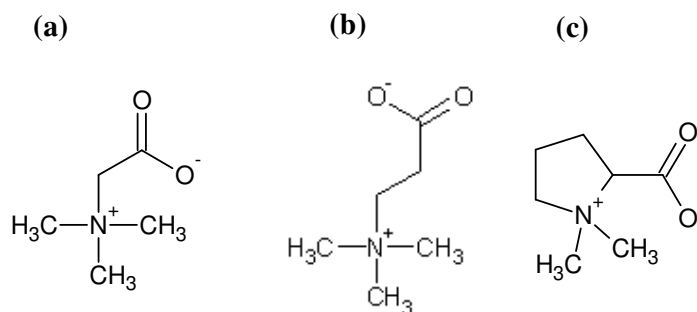


Kofaktory CMO jsou Mg^{2+} a ferredoxin (2Fe-2S). Enzym byl izolován např. z cukrové řepy, špenátu a amarantu. Inhibitory tohoto enzymu jsou glycinbetain deriváty cholinu. V následující reakci je betainaldehyd ireverzibilně oxidován za účasti

betainaldehyddehydrogenasy (BADH, EC 1.2.1.8) na glycinbetain (Burnet *et al.*, 1995). Reakce probíhá podle následujícího schématu:



Oba enzymy byly mimo jiné lokalizovány v chloroplastech. U živočichů a ve většině mikroorganismů je první krok syntézy glycinbetainu katalyzován na membránu navázanou cholindehydrogenasou (EC 1.1.99.1) nebo cholinoxidasou (COD, EC 1.1.3.17). U těchto organismů plní vznikající glycinbetain nejenom funkci osmoprotektivní molekuly, ale slouží i jako donor methylových skupin při syntéze methioninu a je také důležitým metabolickým meziproduktem v katabolismu cholinu (Du Vigneaud *et al.*, 1946).



Obr. 8. Struktury kvartérních amoniových bází. (A) glycinbetain, (B) β -alaninbetain, (C) prolinbetain

3.4 Betainaldehyddehydrogenasy

Betainaldehyddehydrogenasa je NAD(P)-dependentní enzym, jehož aktivita byla v souvislosti se studiem jeho role při produkci glycinbetainu zaznamenána u mnoha organismů. Exprese genů tohoto enzymu, který je nezbytný pro biosyntézu glycinbetainu, je indukována za stresových podmínek (McNeil *et al.*, 1999). Ovšem BADH geny byly nalezeny i u rostlin nekumulujících glycinbetain, jako jsou např. rýže, sojové boby či hrách (Weretilnyk *et al.*, 1989; Ishitani *et al.*, 1993). Právě tyto plodiny jsou v popředí zájmu vědců. Metodami genového inženýrství jsou geny BADH zavedeny do rostlin, které přirozeně neakumulují glycinbetain. Tím dojde k produkci druhů, které se vyznačují zvýšenou tolerancí vůči suchu, zasolení půd a dalším stresovým faktorům. Tyto metody byly posáány u několika transgenních rostlin, např. u tabáku (Holmström *et al.*, 2000), u mrkve (Kumar *et al.*, 2004) a u rajčete (Jia *et al.*, 2002).

BADH byla v homogenním stavu vypurifikována z řady odlišných organismů, např. z listů špenátu (*Spinacia oleracea*) (Weretilnyk & Hanson, 1989), z ječmene (*Hordeum*

vulgare) (Nakamura *et al.*, 2001), z laskavce (*Amaranthus hypochondriacus*) (Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1994), z cukrové řepy (Trossat *et al.*, 1997), dále z bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 1999), *Escherichia coli* (Falkenberg & Strom, 1990), *Xanthomonas translucens* (Mori *et al.*, 1992), *Cylindrocarpon didymium* (Mori *et al.*, 1980), také z prasečích ledvin (Guzman-Partida & Valenzuela-Soto, 1998) a z tresčích jater (Johansson *et al.*, 1998). Částečná purifikace BADH byla provedena např. z jater ovce a ze srdce kraba (Dragalovich & Pierce, 1994, Goldberg & McCaman, 1968).

U čeledi merlíkovité byla BADH lokalizována převážně ve stromatu chloroplastu, zatímco v cytosolu byl enzym prokázán jen v menší míře (Weigel *et al.*, 1986; Weretilnyk & Hanson, 1988). Většina zástupců čeledi lipnicovitých obsahuje na C-konci signální peptid pro lokalizaci proteinu v mikrotělíscích (peroxisomech, glyoxysomech.....). Bylo zjištěno, že BADH z ječmene exprimovaná v buňkách transgenního tabáku se vyskytuje v peroxisomech (Nakamura *et al.*, 1997). Většina savčích BADH je lokalizována v cytoplazmě. Oproti tomu většina BADH aktivity ze srdeční tkáně kraba a jater křavy byla zaznamenána v mitochondriích (Dragalovich & Pierce, 1994, Pietruszko & Chern, 1999). Pomocí imunohistochemických studií bylo zjištěno, že BADH se ve vepřových ledvinách vyskytuje v kůře a dřeni, přičemž v kůře ledvin se BADH vyskytovala ve vyšší koncentraci (Figuroa-Soto *et al.*, 1999).

BADH izolovaná z ovsy ve srovnání s AMADH ze stejného zdroje vykazovala vyšší stabilitu při vysokých teplotách (Livingstone *et al.*, 2002). Dokonce ani při teplotě 50 °C nedocházelo k významnému poklesu aktivity, přestože teplotní optimum se nacházelo při 40 °C. Obdobnou teplotní stabilitu vykazovaly BADH z laskavce a mangrovníku, narozdíl od BADH z bakterie *P.aeruginosa*, která ztratila aktivitu již při 40 °C. Aktivita tohoto enzymu mohla být ovšem znovu obnovena ochlazením na 30 °C (Velasco-Garcia *et al.*, 1999). BADH z *Arthrobacter globiformis* měla teplotní optimum při 65 °C (Mori *et al.*, 2002). Z hlediska hodnot isoelektrických bodů řadíme většinu BADH do skupiny kyselých proteinů s hodnotami pI = 6,3 u ovsy, 5.65 u špenátu, 5.1 u *P.aeruginosa*, 4.93 a 4.85 u divoce rostoucího laskavce, 5.5 a 5.3 u lidské BADH. Optimální pH se pohybovalo téměř u všech BADH okolo 8, výjimku tvořily BADH z *X.translucens* a *A. globiformis*, jejichž pH optima se pohybovala mezi 9.5 a 10. Lidská, tresčí a bakteriální (*Escherichia coli*) BADH jsou popsány jako homotetramery s molekulovou hmotností 213-219 kDa (Johansson *et al.*, 1998, Chern & Petruszko, 1995). V rostlinách se BADH nejčastěji objevuje jako homodimer s molekulovou hmotností 40-63 kDa. (Weretilnyk & Hanson, 1989, Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1994). Molekulární a kinetické vlastnosti vybraných BADH jsou shrnuty v tabulce 3.

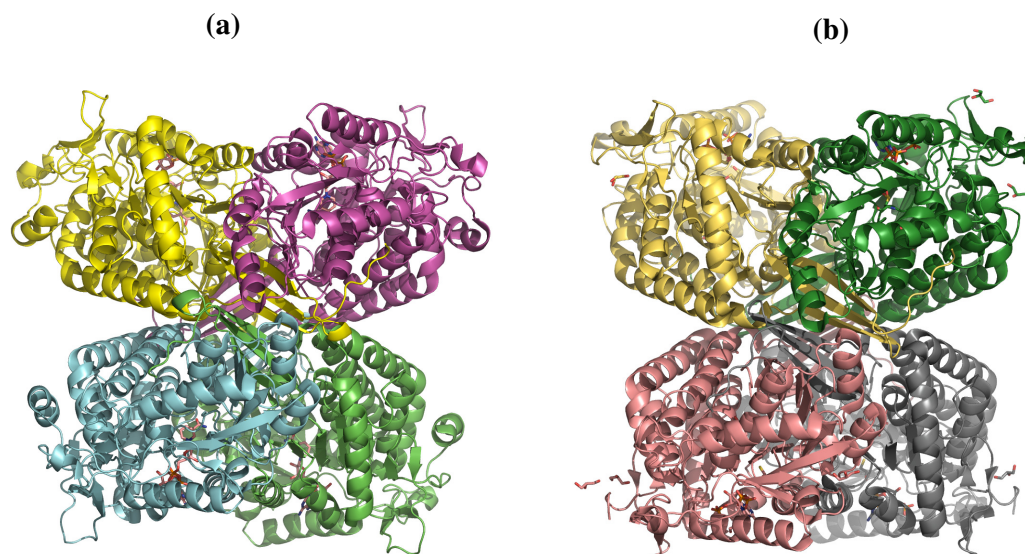
Bylo prokázáno, že BADH jsou nespecifické enzymy disponující schopností přeměňovat nejenom glycinbetain, ale i obsáhlou skupinu aldehydů. BADH z ovsy má dokonce vyšší afinitu k substrátu APAL než k BAL (Livingstone *et al.*, 2003). Zatímco lidská, špenátová a řepná BADH oxidují různé ω -aldehydy, BADH z mangrovníku není schopna přeměňovat ω -aldehydy

jako je APAL či ABAL (Hibino *et al.*, 2001). Naopak BADH z cukrové řepy přeměňovala substráty jako 3-dimethylsulfoniopropionaldehyd (DMSPAL), ABAL, APAL se stejnou rychlostí jako BAL (Trossat *et al.*, 1997; Vojtěchová *et al.*, 1997). DMSPAL je prekurzorem dimethyl-sulfoniopropionátu (DMSP), který se akumuluje jako osmoprotektant v kvetoucích rostlinách a řasách (James *et al.*, 1995). BADH z laskavce vykazuje vysokou specifčnost vůči substrátu BAL a koenzymu NAD⁺. Ostatní aldehydy a NADP⁺ nedosahují aktivity vyšší než 2,5 % ve srovnání s aktivitou betainaldehydu (Figueroa-Soto & Valenzuela-Soto, 2001). Lidská a vepřová BADH disponují širokou substrátovou specifčností. BADH izolovaná z prasečích ledvin přeměňuje opět nejúčinněji substrát BAL, mezi dobře oxidované substráty patří i acetaldehyd, butyraldehyd a glycerinaldehyd (Guzman-Partida & Valenzuela-Soto, 1998, Chern & Pietruzko, 1999).

Tab. 3. Kinetické a molekulární vlastnosti vybraných BADH. Uvedené BADH pocházejí z následujících zdrojů: *Pseudomonas aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 1999), *Escherichia coli* (YdcW) (Falkenberg & Strom, 1990), špenát - *Spinacia oleracia* (Weretilnyk & Hanson, 1989), oves setý - *Avena sativa* (Livingstone *et al.*, 2003), laskavec - *Amaranthus hypochondriacus* (Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1994), cukrová řepa (Trossat *et al.*, 1997) játra krysy (Vaz *et al.*, 2000) a vepřová ledvina (Guzman-Partida & Valenzuela-Soto, 1998).

Zdrojový organismus	Molekulová hmotnost		Hodnoty Km(μM)		
	nativní	podjednotka	BAL	NAD ⁺	NADP ⁺
<i>P. aeruginosa</i>	139	61	453	229	62
<i>E. coli</i> (YdcW)	202	51	6.5	54	484
<i>Spinacia oleracia</i>	120	60	208	20	320
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	125	63	69	80	2500
<i>Beta vulgaris</i>	-	55	51	-	-
<i>Avena sativa</i>	120	61	5	4	-
Vepřová ledvina	688	52	127	40	-
Krysí játra	-	51	123	28	1630

První aminokyselinová sekvence BADH byla určena již v roce 1990. Trojrozměrná struktura byla ovšem dosud stanovena jen u několika BADH. Jedná se o BADH pocházející z jater tresky a z bakterie *E.coli* (Johansson *et al.*, 1998, Gruez *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že se vyskytují ve formě tetramerů (obr. 9). Každá podjednotka obsahuje 3 domény: NAD-vazebnou, oligomerizační a katalytickou. K asociaci podjednotek do formy dimerů dochází, tak že pomocí vodíkové vazby dochází k propojení vlákn z oligomerizační domény z jedné podjednotky s vláknem z katalytické domény z druhé podjednotky. Tetramer se pak vytvoří interakcí dvou dimerů (Johansson *et al.*, 1998). Krystal BADH z tresčích jater je charakterizován trojklonnou krystalovou soustavou P1 s parametry elementární buňky a = 84.2 Å, b = 86.2Å, c = 88.4 Å, α = 105.2°, β = 115.1°, γ = 100°. V roce 2008 byla také určena trojrozměrná struktura BADH z bakterie *Staphylococcus aureus* (Halavaty *et al.*, 2008) a o rok později z lidské patogenní bakterie *P. aeruginosa* (González-Segura *et al.*, 2009).

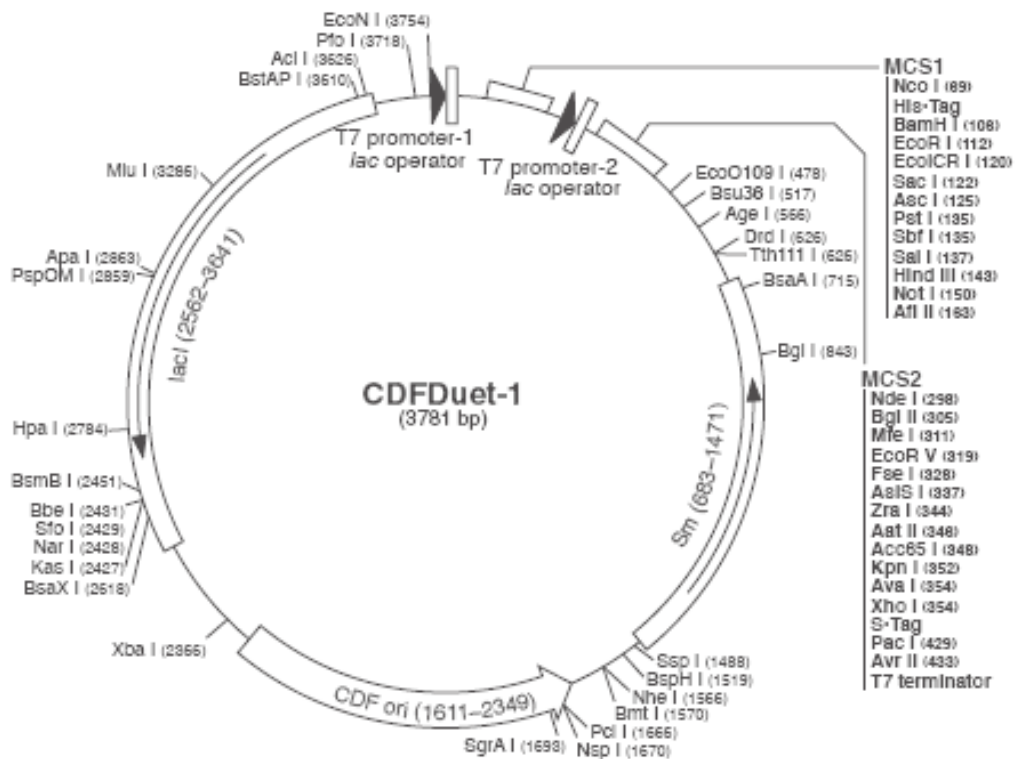


Obr. 9. Trojrozměrné struktury BADH. (a) BADH z jater tresky (Johansson *et al.*, 1998), (B) BADH z *P.aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 1999).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál chemikálie

- konstrukty *ZmAMADH1* (1518 bp; EMBL/GenBank GQ184593) a *ZmAMADH2* (1521 bp; EMBL/GenBank GQ184594) ve vektoru pCDFDuet (3781 bp) (obr. 10) a vložené v expresních buňkách T7 express (New England Biolabs), genotyp: *fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10*, byly poskytnuty školitelem



Obr. 10. Mapa expresního vektoru pCDFDuet-1. Oba geny *ZmAMADH* byly amplifikovány specifickými primery obsahujícími EcoRI a XhoI restriční místa. Ty jsou zobrazeny vpravo nahoře v klonovacích místech MCS1 a MCS2.

4.2 Použité chemikálie

- 2,2-Bis-(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitriлотriethanol, tj. Bis-Tris (MP Biomedicals, USA)
- 2-merkptoethanol (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- 2-pyridinkarbaldehyd (Acros Organics, Belgie)
- 3-pyridinkarbaldehyd (Acros Organics, Belgie)
- 4-pyridinkarbaldehyd (Acros Organics, Belgie)
- 3-aminopropionaldehyd diethylacetal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)

- 3-kyanopropionaldehyd diethylacetal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- 3-guanidinopropionaldehyd diethylacetal (syntetizoval prof. Šebela, KBC PřF UP Olomouc)
- 3-methyl-2-butenal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- 4-aminobutyraldehyd diethylacetal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- 4-guanidinobutyraldehyd diethylacetal (syntetizoval prof. Šebela, KBC PřF UP Olomouc)
- 4-amino-2-hydroxybutyraldehyd diethylacetal (syntetizoval prof. Macholán, KBC PřF MU Brno)
- 4-guanidino-2-hydroxybutyraldehyd diethylacetal (syntetizoval prof. Šebela, KBC PřF UP Olomouc)
- acetaldehyd (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- acetonitril (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- B-Per (Thermo, USA)
- BioSafe Coomassie (Bio-Rad, USA)
- betinaldehyd dimethylacetal (syntetizoval prof. Šebela, KBC PřF UP Olomouc)
- butyraldehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Merck, Německo)
- dimethylaminobutyraldehyd diacetal (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- dodecylsírán sodný (Bio-Rad, USA)
- DNAsa (Top-Bio, ČR)
- ethanol (Lach-Ner, ČR)
- fenylmethylsulfonylfluorid (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- glukosa (Chemapol, ČR)
- glycerol (Lach-Ner, ČR)
- glycin (Lach-Ner, ČR)
- heptanal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- hovězí trypsin (MP Biomedicals, USA)
- hydrogenfosforečnan draselný (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- hydrogenuhličitan amonný (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR)
- chlorid hořečnatý (AppliChem, SRN)
- chlorid sodný (Lach-Ner, ČR)
- chromatografický sorbent Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Švédsko)

- chromatografický sorbent: HIS-Select Cobalt (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- imidazol (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- inhibitor proteas (Sigma, ČR)
- isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (Fermentas, Litva)
- isovaleraldehyd (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- guanidin hydrochlorid (AppliChem, SRN)
- kapronaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (Bruker Daltonik GmbH, SRN)
- kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR)
- kyselina octová (Lach-Ner, ČR)
- kyselina trifluorooctová (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- Laemmliho vzorkový pufr (Bio-Rad, USA)
- LB-medium (Roth, SRN)
- lysozym (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- methanol (Lach-Ner, ČR)
- *n*-butanol (Lach-Ner, ČR)
- nikotinamidadeninukleotid (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- *N,N'*-metylen-bisakrylamid (Bio-Rad, USA)
- *N,N,N,N'*-tetramethylethylendiamin (Bio-Rad, USA)
- oktanal (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- peroxidisíran amonný (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- propionaldehyd (syntetizoval prof. Šebela, KBC PřF UP Olomouc)
- proteinové standardy pro gelovou permeační chromatografii (Bio-Rad, USA)
- Protein Ladder (10-250 kDa) (BioLabs, USA)
- RNAsa (Fermentas, Litva)
- sacharosa (Lachema, ČR)
- streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- trimethyl APAL diethylacetal (syntetizoval prof. Šebela, KBC PřF UP Olomouc)
- trimethylaminobutylaldehyd (syntetizoval prof. Šebela, KBC PřF UP Olomouc)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan tj. Tris-HCl pufr (MP Biomedicals, USA)
- triton X-100 (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- uhličitan sodný (Lachema, ČR)
- valeraldehyd (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)

4.3 Přístrojové vybavení

- analytické váhy (Sartorius, SRN)
- autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, SRN)
- centrifuga 6K15 (Sigma, SRN)
- centrifuga 5415R (Eppendorf, SRN)
- centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie)
- digitální pH metr (Multical WTW, SRN)
- digitální předvážky (KERN, SRN)
- elektroforetická komůrka (Bio-Rad, USA)
- elektromagnetická míchačka (IKA, SRN)
- laminární box (Schoeller, ČR)
- MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, SRN)
- MALDI terčík AnchorChip 600/96 (Bruker Daltonik, SRN)
- kapalinový chromatograf pro nízkotlakou chromatografii s pumpou P-1, řídící jednotkou UV-1, dvoukanálovým zapisovačem REC-112 a sběračem frakcí Frac-920 (Amersham Biosciences, Švédsko)
- kapalinový chromatograf pro střednětlakou chromatografii BioLogic Duo Flow (Bio-Rad, USA)
- magnetická míchačka (IKA, SRN)
- PCR termocykler (Eppendorf, SRN)
- sada pipet (5000, 1000, 200, 100, 20, 10, 2.5 µl) (Eppendorf, SRN)
- spektrofotometr Beckman DU 7500 (Beckman Coulter, USA)
- spektrofotometr LightWave II UV-Vis II diode array UV/Visible (Boichrom Ltd, UK)
- termostat (Grant, UK)
- třepačka RCT basic (IKA, SRN)
- ultrafiltrační zařízení Amicon (Millipore, USA)
- vortex (Stuart, UK)
- vodní lázeň (Grant, UK)

Základní vybavení laboratoře: mikrozkušavky, Erlenmayerovy baňky, falkonky, kádinky, kyvety do do spektrofotometru, lžička, magnetická míchadla, mísa na ledovou tříšť, Nalgene kyvety, odměrné válce, parafilm, rukavice, stojan na zkumavky, stříčka s destilovanou vodou a ethanolem, špachtle.

4.4 Metody

4.4.1 Produkce rekombinantních kukuřičných proteinů z *E. coli*

Do Erlenmayerovy baňky obsahující 20 ml Luria-Bertani (LB) media, 1 ml 20 % glukosy (finální koncentrace 1 %) a antibiotikum streptomycin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) byla ze zásobní ependorfky inokulována kultura *E. coli* (2-5 μl). Inkubace prekultury probíhala přes noc za mírného třepání (200 rpm) na třepačce při 37 °C. Buňky v kultuře byly následující den separovány centrifugací (4000 g, 5 minut, 4 °C), supernatant byl odlit a pelet poté resuspendován v 10 ml LB media obsahujícího opět streptomycin. Poté bylo medium s kulturou přelito do Erlenmayerovy baňky obsahující 190 ml LB media s antibiotikem. Kultura byla následně inkubována na třepačce při 30 °C (do $\text{OD}_{600} = 0,5$) po dobu asi 1 hodiny. Expres rekombinantního proteinu byla indukována přidávkou 200 μl 100 mM isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) při 20 °C přes noc na třepačce. Všechny výše zmíněné kroky byly provedeny ve sterilním prostředí flowboxu, použité LB medium a další chemikálie byly sterilizovány v autoklávu.

4.4.2 Extrakce ZmAMADH

Kultura byla nejprve centrifugována (4000 g, 20 minut, 4 °C), vzniklý pelet byl promyt 30 ml 0.9 % NaCl a centrifugován v 50 ml falkonce (4000 g, 20 minut, 4 °C). Následně mohl být pelet zamražen na -20 °C nebo resuspendován v 10 ml pufru obsahujícího 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM MgCl_2 , 150 μl fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) a 0.85 ml vody. Dále bylo přidáno 2.5 ml B-PER (bacterial protein extraction reagent) a směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 0.3 ml čerstvě připraveného lysozymu (50 mg ml^{-1}) a vzorek byl inkubován při laboratorní teplotě až do zgelovatění (zhruba 1 hodinu). Potom byl vzorek doplněn na objem 10 ml vodou a bylo přidáno 20 μl RNAsy ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) a 10 μl DNAsy1 (10U/ μl). Směs byla inkubována 30 minut při 37 °C ve vodní lázni. Nakonec bylo přidáno 1.25 ml 1 mM NaCl a 1.37 ml 50 % (w/v) glycerolu. Lyzát byl následně centrifugován (12000g, 30 minut, 10 °C) v centrifugačních kyvetách (Nalgene). Vzniklý supernatant byl přenesen do nové falkonky.

4.4.3 Purifikace ZmAMADH

Pro purifikaci rekombinantních proteinů byla použita afinitní chromatografická kolona His selected cobalt gel (Sigma-Aldrich). Afinitní chromatografie využívá specifických interakcí biomolekuly nesoucí histidinovou s atomy Co^{2+} upevněnými na nosiči. Po nanesení lyzátu a vymytí balastních proteinů ekvilibračním pufrem obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 8),

100 mM NaCl, 10 mM imidazol a 5 % glycerol. Průtoková rychlost mobilní fáze činila 1.5 ml min⁻¹. Navázaný protein byl následně eluován z kolony pomocí elučního pufru, který měl až na koncentraci imidazolu (250 mM) stejné složení jako pufr ekvilibrační. Získaný protein byl následně zahuštěn ultrafiltrací na objem 5-10 ml a uchován v zamraženém (-20 °C) stavu pro další měření.

4.4.4 Stanovení obsahu proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky metodou Bradfordové. Tato metoda je založena na tvorbě komplexu mezi proteiny a triarylmethanovým barvivem Brilliant Blue G-250 v kyselém prostředí.

Ze zásobního roztoku 25 µg/ml byla připravena koncentrační řada standardů (hovězí sérový albumin, BSA) od 2,5 do 20 µg. K 1 ml standardu / vzorku proteinu bylo přidáno 2 ml činidla Bradfordové (50 mg Coomassie Blue G250 bylo rozpuštěno ve 25 ml MeOH a 50 ml 85 % H₃PO₄ a doplněno deionizovanou H₂O na 100 ml). Směs byla inkubována po dobu 5-ti minut. Následně byla změřena absorbance při 595 nm proti slepému vzorku (1 ml H₂O + 2 ml činidla Bradfordové).

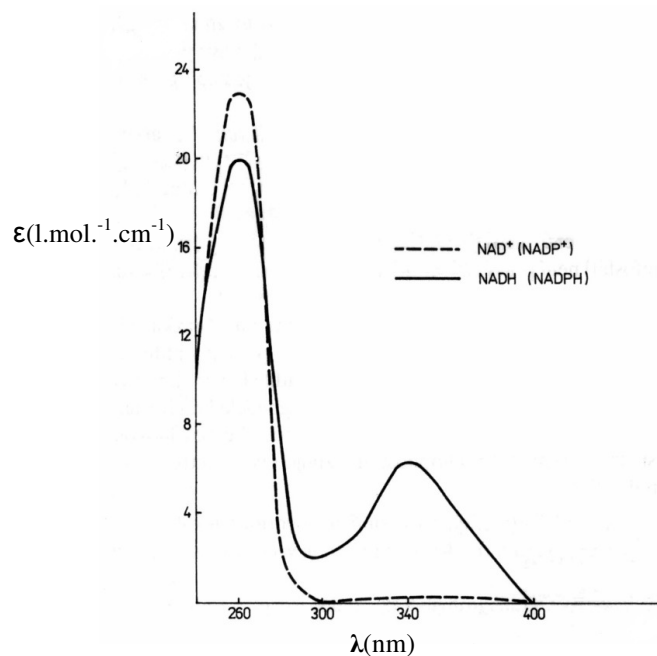
4.4.5 Stanovení aktivity ZmAMADH

Aktivita enzymu je definována jako rychlost katalyzované reakce. Základní jednotkou je 1 katal (kat). 1 katal udává množství enzymu, které přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu. Tato jednotka je ale příliš vysoká, proto se běžně využívají její zlomky (µkat nebo nkat). Aktivita enzymu se vypočítá na základě vztahu:

$$a[\text{kat}] = \frac{\Delta A}{\Delta t} \frac{V}{\epsilon \cdot l}$$

přičemž ΔA je změna absorbance, Δt je doba reakce (s), V udává objem reakční směsi v kyvetě (ml), ϵ je molární absorpční koeficient (M⁻¹ cm⁻¹) a l je šířka kyvety (cm).

Aktivita ZmAMADH byla měřena spektrofotometricky s využitím Warburgova optického testu podle Awal *et al.* (1997). Při reakci katalyzované AMADH dochází současně k oxidaci substrátu a k redukci (hydrogenaci) NAD⁺. Vznik redukované formy tohoto koenzymu (NADH) je doprovázen změnou absorpčního spektra. Oxidovaná forma (NAD⁺) má absorpční maximum při vlnové délce 260 nm, redukovaná forma (NADH) má charakteristickou absorbanci při 340 nm (obr.11). Molární absorpční koeficient pro NADH je 6220 M⁻¹ cm⁻¹



Obr. 11. Změna absorpčního maxima. Oxidovaná forma (NAD⁺) má absorpční maximum při vlnové délce 260 nm, redukovaná forma (NADH) má charakteristickou absorbanci při 340 nm.

Reakční směs v kyvetě obsahovala 1,55 ml 150 mM Tris/HCl pufru, pH 9,0, 50 μl 20 mM NAD⁺, příslušné množství enzymu a odpovídající množství vody. Celkový objem v kyvetě byl 2 ml. Reakce byla zahájena přidávkem 20 μl 100 mM substrátu (konečná koncentrace substrátu v kyvetě byla 1 mM). Nárůst absorpance při 340 nm byl monitorován po dobu 5 minut.

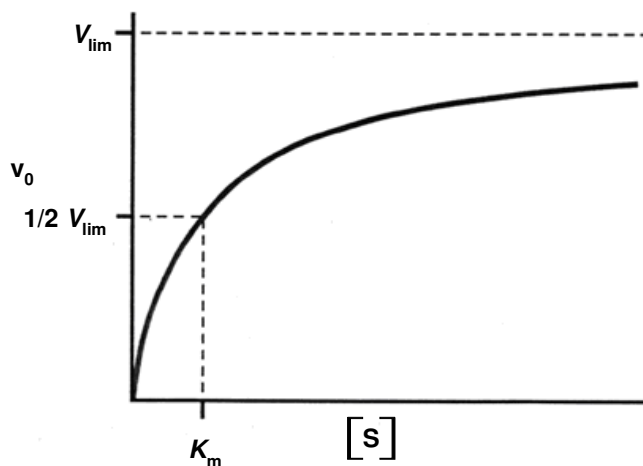
4.4.5.1 Testování substrátové specifčnosti, stanovení K_m a V_{max}

Pro testování substrátové specifčnosti byly připraveny substráty zahříváním příslušných diacetalů s 0,2 M HCl (tabulka 4) při 100 °C po dobu 10 minut. Alifatické aldehydy a pyridinkarbaldehydy byly připraveny smísením příslušného množství jejich kapalné formy a vody. Finální koncentrace všech připravených substrátů byla 100 mM.

Konstanta K_m (Michaelisova konstanta) vyjadřuje koncentraci substrátu, při níž reakce probíhá polovinou maximální rychlosti (obr. 12). K_m je mírou afinity enzymu k substrátu. Maximální rychlost (V_{max} , V_{lim}) je mírou celkové koncentrace enzymu. Rovnice Michaelise-Mentenové zní:

$$v_0 = \frac{V_{lim} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

příčemž v_0 je počáteční rychlost reakce, V_{lim} udává limitní reakční rychlost a $[S]$ udává koncentraci substrátu.

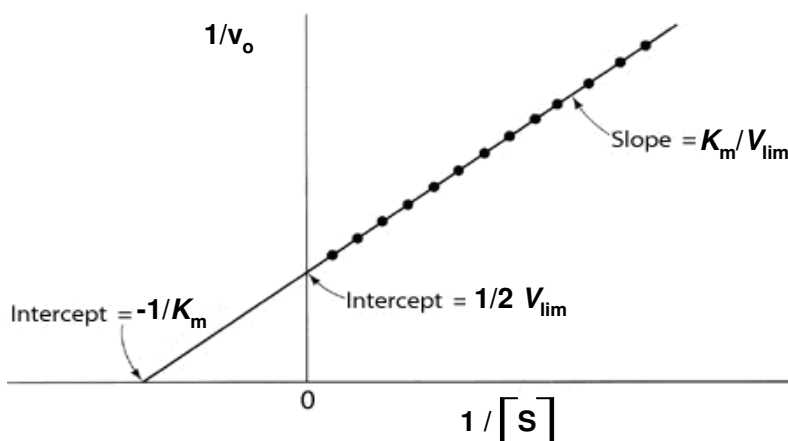


Obr. 12. Saturační křivka. Závislost rychlosti katalyzované reakce na koncentraci substrátu.

Existuje řada možností pro stanovení K_m a V_{lim} . V této diplomové práci bylo použito vynesení podle Lineweavera a Burka (obr.13):

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{lim}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{lim}}$$

příčemž v_0 je počáteční rychlost reakce, V_{lim} udává limitní reakční rychlost a $[S]$ udává koncentraci substrátu a K_m je Michaelisova konstanta.



Obr. 13. Dvojitě reciproké vynesení hodnot koncentrace substrátu proti příslušné počáteční rychlosti reakce.

Pro kinetická stanovení hodnot K_m a V_{im} byly připraveny roztoky substrátů vhodných konečných koncentrací naředěním připravených zásobních roztoků. Substráty byly skladovány po dobu měření na ledu.

Tabulka 4. Příprava substrátů.

Název substrátu	Zkratka	Příprava
3-aminopropionaldehyd	APAL	16.2 μ l + 983.8 μ l HCl
Trimethyl APAL	TMAPAL	31.7 mg + 970 μ l HC
3-aminobutyraldehyd	ABAL	17.9 + 982.1 μ l HCl
3-guanidinopropionaldehyd	GPAL	25 mg + 1000 μ l HCl
3-guanidinobutyraldehyd	GBAL	26.5 mg + 1000 μ l HCl
4-guanidino-2-hydroxybutyraldehyd	GHBAL	28 mg + 1000 μ l HCl
4-amino-2-hydroxybutyraldehyd	AHBAL	19 μ l + 981 μ l HCl
Betainaldehyd	BAL	27.5 mg + 1000 μ l HCl
Acetaldehyd	C2	5.7 μ l + 994.3 μ l H ₂ O
Propionaldehyd	C3	7.3 μ l + 992.7 μ l H ₂ O
Butyraldehyd	C4	8.8 μ l + 991.2 μ l H ₂ O
Valeraldehyd	C5	10.7 μ l + 989.9 μ l H ₂ O
3-methyl-2-butanal	IzoC5	10.8 μ l + 989.2 μ l H ₂ O
Kapronaldehyd	C6	12.3 μ l + 987.7 μ l H ₂ O
Heptanal	C7	14 μ l + 986 μ l H ₂ O
Oktanal	C8	15.6 μ l + 984 μ l H ₂ O
2-pyridinkardaldehyd	2-PCAL	9.6 μ l + 990.4 μ l H ₂ O
3-pyridinkardaldehyd	3-PCAL	9.4 μ l + 990.6 μ l H ₂ O
4-pyridinkardaldehyd	4-PCAL	9.4 μ l + 990.6 μ l H ₂ O

4.4.5.2 Stanovení optimálního pH a teplotní stability

Pro stanovení optimálního pH obou enzymů byl použit 150 mM glycin/NaOH pufr (pH v rozmezí 8.8-10.6), reakční směs dále obsahovala 50 μ l enzymu, 50 μ l 20 mM NAD⁺ a 0,4 ml vody. Reakce byla zahájena přidávkem 20 μ l 100 mM substrátu APAL. (konečná koncentrace substrátu v kyvetě byla 1 mM)

Pro určení teplotní stability bylo zvoleno rozmezí teplot od 31 °C do 62 °C. Samotný enzym byl inkubován při zvolené teplotě po dobu 30 minut. Inkubované enzymy byly poté skladovány na ledu a následně byla změřena jejich zbytková aktivita. Reakční směs obsahovala 1,55 ml 150 mM Tris/HCl pufru, pH 9.0, 50 μ l 20 mM NAD⁺, 20 μ l enzymu a odpovídající množství vody. Jako substrát byl opět použit 100 mM APAL (20 μ l). (konečná koncentrace substrátu v kyvetě byla 1 mM).

4.4.5.3 Testování analog NAD⁺

Byla testována následující analoga NAD⁺ koenzymu: NADP⁺, Thio-NAD⁺, 3-Pyr-NAD⁺, 3-APyr-NAD⁺, Deamino NAD⁺. Reakční směs obsahovala 1,55 ml 150 mM Tris/HCl pufru, pH 9.0, 50 μ l 20 mM zvoleného koenzymu, 20 μ l enzymu a 360 μ l vody. Finální koncentrace

jednotlivých analog NAD^+ byla 500 μM . Jako substrát byl opět použit 100 mM APAL (20 μl). (konečná koncentrace substrátu v kyvetě byla 1 mM). Následující absorpční maxima a extinkční koeficienty redukovaných forem těchto analog byla použita pro korekci aktivit: NADPH ($\epsilon_{340} = 6.62 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), Thio-NADH ($\epsilon_{400} = 11.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 3-pyridinaldehyd-NADH ($\epsilon_{358} = 9.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 3-acetylpyridin-NADH ($\epsilon_{363} = 9.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), Deamino NADH ($\epsilon_{338} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Siegel *et al.*, 1959; Stein *et al.*, 1963).

4.4.6 Gelová permeační chromatografie

Pro stanovení molekulové hmotnosti enzymu v nativním stavu byla použita gelová permeační chromatografie. Tato metoda, která se využívá např. i na odsolování bílkovin či frakcionaci podle hmotnosti, je založena na separaci molekul podle jejich molekulové hmotnosti, tvaru a velikosti. Byla použita kolona Superdex 200 HR 10/30, což je kopolymer agarosy a dextranu. Kolona byla napojena na střednětlaký chromatograf BioLogic Duo Flow. Jako mobilní fáze byl použit 50 mM K-fosfátový pufr, pH 7 obsahující 100 mM NaCl. Přítomnost soli potlačuje nespecifické interakce proteinů s gelovou maticí. Eluce probíhala při průtokové rychlosti 0.7 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Proteiny byly detekovány při 280 nm. Jako proteinové standardy (Sigma-Aldrich) byly použity thyroglobulin (670 kDa), hovězí γ -globulin (158 kDa), kuřecí ovalbumin (44 kDa), koňský myoglobin (17 kDa) a vitamin B12 (1.35 kDa).

4.4.7 SDS-PAGE

Elektroforéza se řadí mezi elektromigrační metody sloužící ke stanovení molekulové hmotnosti látek. Jednou z nejvíce používaných modifikací diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu je elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). SDS uděluje proteinům uniformní záporný náboj a proto se pohybují k anodě. K separaci nabitých částic dochází na základě rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli, která je dána velikostí molekuly.

Vzorky pro samotnou elektroforézu byly připraveny smísením 30 μl enzymu se stejným objemem Laemmliho vzorkovacího pufru (62.5 mM Tris/HCl, 2 % (w/v) SDS, 25 % (w/v) glycerol, a 0.01 % (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8, před použitím byl přidán ještě 2-merkptoethanol v objemovém poměru 1:19 vůči pufru). Směs byla promíchána a 5 minut inkubována při 100 $^{\circ}\text{C}$. Po ochlazení byl vzorek centrifugován (6000 g, 5 minut). Dělicí a zaostřovací gel byly připraveny podle tabulky 5.

Dělicí gel byl nalit mezi skla upevněná v nalévacím stojanu, následně byl převrstven *n*-butanolem, který byl po 30-ti minutách polymerace odstraněn. Poté byla mezi skla nalita

vrstva zaostřovacího gelu, do níž byl ihned zasunut hřebínek. Po 30-ti minutách tuhnutí byl hřebínek vyjmut a skla s připraveným gelem vložena do elektroforetické komůrky. Do komůrky byl nalit elektroodový pufr (0.025 M Tris, 0.192 M glycin, 0.1 % SDS, pH 8.3). Do jamek, které byly propláchnuty elektroodovým pufrem, bylo aplikováno 7 μ l standardu a vhodné množství vzorku. Komůrka byla uzavřena víkem a celá aparatura byla následně připojena ke zdroji napětí. Samotná elektroforéza probíhala zhruba 1 hodinu. Pro vizualizaci bylo použito barvení pomocí Bio-Safe Coomassie Stain (Bio-Rad). Gel byl nejprve několikrát promyt deionizovanou vodou (odstranění SDS), pak byl po dobu několika hodin vložen do barvicího roztoku. Gel byl poté vyjmut a nechal se odbarvovat přes noc v destilované vodě.

Tab. 5. Složení dělicího a zaostřovacího gelu.

	Dělicí gel (12%)	Zaostřovací gel (4%)
AA/BIS	4	0.65
Tris/HCl, 1.5 M, pH 8.8	2.5	-
Tris/HCl, 0.5 M, pH 6.8	-	1.25
H ₂ O	3.2	2.95
SDS (10 %)	0.1	0.1
APS (10 %)	0.05	0.06
TEMED	0.015	0.015

4.4.8 MALDI-TOF peptidové mapování („peptide mass fingerprinting“)

MALDI-TOF peptidové mapování se využívá k identifikaci neznámého proteinu nebo k ověření totožnosti studovaného proteinu. Protein je nejprve s použitím proteolytického enzymu, v tomto případě trypsinu, specificky naštěpen na směs peptidových fragmentů, které jsou následně analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Výsledné hmotnostní spektrum peptidů je pak vyhodnoceno užitím software a porovnáno s teoretickými štěpy proteinů v databázi.

Proteinové vzorky obou enzymů byly separovány metodou SDS-PAGE (viz. výše). Štěpení jednotlivých proteinů v gelu bylo provedeno po redukci a alkylaci 2 μ M trypsinem modifikovaným rafinosou (Šebela *et al.*, 2006) přes noc při teplotě 37 °C. Výsledné peptidové směsi pak byly analyzovány na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, Brémy, SRN). Roztok α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny (2 mg.ml⁻¹) ve směsi acetonitril / 2.5 % trifluoroctová kyselina (2:1, v/v) byl použit jako matrice (Thomas *et al.*, 2004). Stejný poměr roztoku vzorku (5 μ l) a matrice (5 μ l) se promíchal ve zkumavce a poté se 0.5 μ l výsledné směsi napipetovalo na MALDI terčik (AnchorChip 600/96) a nechalo vysušit. Spektra se shromažďovala ze 100 – 200 laserových výstřelů při frekvenci laseru 10 Hz

a rozsahu m/z 500 - 4000. Získaná spektra se poté vyhodnotila pomocí softwaru FlexAnalysis 2.4 a Biotoools 3.0 (Bruker Daltonik) a porovnána s proteinovou databází NCBIInr a MSDB pomocí programu Mascot Server 2.2 (Matrix Science, London, UK).

7 ZÁVĚR

- V teoretické části této diplomové práce byly shrnuty poznatky o metabolismu polyaminů a jejich oxidačních produktů ω -aldehydů. Byly podrobně popsány některé rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy a jejich vztah k rostlinným betainaldehyddehydrogenasám.
- V rámci experimentální části byla provedena purifikace rekombinantních ZmAMADH1 a ZmAMADH2 afinitní chromatografií na koloně s imobilizovanými kobaltnatými ionty a oba enzymy byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Získané enzymy byly dále charakterizovány z hlediska základních molekulových a kinetických vlastností. Z výsledků měření AMADH aktivity při použití různých substrátů vyplynulo, že zkoumané kukuřičné izoenzymy vykazují podobnou substrátovou specifitnost. Oba jsou schopny kromě ω -aminoaldehydů katalyzovat i oxidaci některých alifatických aldehydů. Pro nejvýznamnější substráty byly stanoveny hodnoty K_m a relativní poměr V_{im}/K_m .

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abe T., Takada K., Ohkawa K., Matsuda M. (1990) Purification and characterization of a rat brain aldehyde dehydrogenase able to metabolize γ -aminobutyraldehyde to γ -aminobutyric acid. *Biochem. J.* **269**, 25-29.
- Aribaud M., Martin-Tanguy J. (1994) Polyamine metabolism in normal and sterile chrysanthemum plants. *Phytochemistry* **37**, 927-932.
- Awal H. M. A., Yoshida I., Doe M., Hirasawa E. (1995) 3-aminopropionaldehyde dehydrogenase of millet shoots. *Phytochemistry* **40**, 393-395.
- Awal H. M. A., Kinoshita T., Yoshida I., Doe M., Hirasawa E. (1997) Aminoaldehyde dehydrogenase of pea epicotyls. *Phytochemistry* **44**, 997-1000.
- Bagga S., Dharma A., Phillips G. C., Kuehn G. D. (1991) Evidence for the occurrence of polyamine oxidase in the dicotyledonous plant *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant Cell Rep.* **10**, 550-554.
- Bagni N., Tassoni A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**, 301-317.
- Bílková A., Bilka F., Bezáková L. (2004) Characterization of *papaver somniferum* L. amine oxidase. *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* **51**, 51-59.
- Binda C., Coda A., Angelini R., Federico R., Ascenzi P., Mattevi A. (1999) A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure* **7**, 265-276.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* **140**, 103-125.
- Blunden G., Gordon S. M., McLean W. F., Keysell G. R. (1983) Beta stachydrine, a novel betaine from *Griffithsia flosculosa*. *Phytochemistry* **22**, 293.
- Brauner F., Šebela M., Snégaroff J., Peč P., Meunier J.-C. (2003) Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Phys. Biochem.* **41**, 1-10.
- Buffoni F., Della Corte L., Hope D. B. (1977) Immunofluorescence Histochemistry of Porcine Tissues Using Antibodies to Pig Plasma Amine Oxidase. *Proc. Roy. Soc. B.* **195**, 417-423.
- Burnet M., Lafontaine P. J., Hanson A. D. (1995) Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant. Physiol.* **108**, 581-588.
- Chern M. K., Pietruszko R. (1995) Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 561-568.
- Cohen S. S. (1998) A Guide to Polyamines, pp. 69-93, Oxford University Press, New York.
- Dragolovich J., Pierce S. K. (1994) Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) cardiac mitochondria. *J. Exp. Zool.* **270**, 417-425.
- Du Vigneaud V., Simmonds S., Chandler J. P., Cohn M. (1946) A further investigation of the role of betaine in transmethylations reactions in vivo. *J. Biol. Chem.* **165**, 639-48.

- Falkenberg P., Strom A. R. (1990) Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**, 253–259.
- Federico R., Alisi C., Forlani F., Angelini R. (1989) Purification and characterization of oat polyamine oxidase. *Phytochemistry* **28**, 2045-2046.
- Federico R., Angelini R. (1991) Polyamine catabolism in plants. v: Slocum R. D., Flores H. E. (Eds.) (1991) *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. pp. 41-56, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Figuroa-Soto C. G., Lopez-Cervantes G., Valenzuela-Soto E. M. (1999) Immunolocalization of betaine aldehyde dehydrogenase in porcine kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 732-736.
- Figuroa-Soto C. G., Valenzuela-Soto E. M. (2001) Purification of a heterodimeric betaine aldehyde dehydrogenase from wild amaranth plants subjected to water deficit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 1052-1058.
- Fischer W. N., André B., Rentsch D., Krolkiewicz S., Tegeder M., Breikreuz K., Frommer W. B. (1998) Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci.* **3**, 188-194.
- Flores H. E., Filner P. (1985) Polyamine catabolism in higher plants: Characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regul.* **3**, 277-291.
- Frébert I., Adachi O. (1995) Copper/Quinone-Containing Amine Oxidases, an Exciting Class of Ubiquitous Enzymes. *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 625-632.
- Freeman H. C., Guss J. M., Kumar V., McIntire W. S., Zubak V. (1996) Purification, crystallization and preliminary X-ray crystal structure analysis of copper amine oxidase from *Arthobacter globiformis*. *Acta Cryst.* **52**, 197-198.
- Goldberg M. A., McCaman R. E. (1968) Betainealdehyde dehydrogenase: assay and partial purification. *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 186-189.
- González-Segura L., Rudiño-Piñera E., Muñoz-Clares R. A., Horjales E. (2009) The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺ and novel cation binding site. *J. Mol. Biol.* **385**, 542-557.
- Gruetz 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. *J. Mol. Biol.* **343**, 29-41.
- Guzman-Partida A. M., Valenzuela-Soto E. M. (1998) Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: Purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **119**, 485-491.
- Halavaty A. S., Minasov G., Shuvalova L., Winsor J., Peterson S. N., Anderson W. F. (2008) 1.85 Angstrom resolution crystal structure of betaine aldehyde dehydrogenase (betB) from *Staphylococcus aureus* in complex with NAD⁺. To be published.

- Hibino T., Meng Y. L., Kawamitsu Y., Uehara N., Matsuda N., Tanaka Y., Ishikawa H., Bab S., Takabe T. (2001) Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine-aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Plant Mol. Biol.* **45**, 353-63.
- Hill J. M., Mann P. J. G. (1964) Further properties of the diamine oxidase of pea seedlings. *Biochem. J.* **91**, 171-182.
- Holmström K. O., Somersalo S., Mandal A., Palva T. E., Welin B. (2000) Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J. Exp. Bot.* **51**, 177-185.
- Ishitani M., Arakawa K., Mizuno K., Kishitani S., Takabe T. (1993) Betaine aldehyde dehydrogenase in the *Gramineae*: levels in leaves both betaine-accumulating and nonaccumulating cereal plants. *Plant Cell Physiol.* **34**, 493-495.
- Jakoby W. B., Fredericks J. (1959) Pyrrolidine and putrescine metabolism: γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **234**, 2145-2150.
- James F., Paquet L., Sparace S. A., Gage D. A., Hanson A. D. (1995) Evidence Implicating Dimethylsulfiopropionaldehyde as an Intermediate in Dimethylsulfiopropionate Biosynthesis. *Plant Physiol.* **108**, 1439-1448.
- Jia G. X., Zhu Z. Q., Chang F. Q., Li Y. X. (2002) Transformation of tomato with the BADH gene from *Atriplex* improves salt tolerance. *Plant Cell Rep.* **21**, 141-146.
- Johansson K., El-Ahmad M., Ramaswamy S., Hjelmqvist L., Jornvall H., Eklund H. (1998) Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* **7**, 2106-2117.
- Kirch H. H., Bartels D., Wei Y., Schnableand P. S., Wood A. J. (2004) The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*. *TRENDS in Plant Science* **8**, 371-377
- Kumar V., Dooley D. M., Freeman H. C., Guss J. M., Harvey I., McGuirl M. A., Wilce M. C., Zubak V. M. (1996) Crystal structure of a eucaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure* **4**, 943-955.
- Kumar S., Dhingra A., Daniell H. (2004) Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol.* **136**, 2843-2854.
- Kurys G., Ambroziak W., Pietruzsko R. (1989) Human aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of a third isoenzyme with low K_m for gamma-aminobutyraldehyde. *J. Biol. Chem.* **264**, 4715-4721.
- Kusano T., Yamaguchi K., Berberich T., Takahashi Y. (2007) Advances in polyamine research in 2007. *J. Plant. Res.* **120**, 345-350.
- 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.

- Livingstone J. R., Maruo T., Yoshida I., Tarui Y., Hirooka K., Yamamoto Y., Tsutui N., Hirasawa E. (2003) Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *J. Plant Res.* **116**, 133-40.
- Lee J. E., Cho Y. D. (1992) Purification and characterization of bovine brain γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 450-454.
- Li R., Klinman J. P., Mathews 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.
- Luhová L., Piterková J., Petřivalský M., Hofman J., Peč P. Aminoaldehyddehydrogenasová aktivita u hrachu setého v podmínkách salinitního stresu. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2005. Praha 2005, pp. 185-189.
- Macholán L. (2002) Sekundární metabolity, pp. 24-25, Vydavatelství PřMU, Brno.
- Malmström B. G., Andreasson L. E., Reinhammar B. (1975) The Enzymes, pp. 507, Academic Press, New York.
- Martin-Tanguy J. (1997) Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol. Plant.* **100**, 675-688.
- Matsuda H., Suzuki Y. (1984) γ -Guanidinobutyraldehyde dehydrogenase of *Vicia faba* leaves. *Plant. Physiol.* **76**, 654-657.
- Medda R., Padiglia A., Floris G. (1995) Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* **39**, 1-9.
- McIntire W. S., Hartmann C. (1992) Principles And Applications of Quinoproteins (Davidson V. L., ed.), pp.97, Marcel Dekker, New York.
- McNeil S. D., Nuccio M. L., Hanson A. D. (1999) Betaines and related osmoprotectants. Targer for metabolit engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* **120**, 945-949.
- Morgan D. L. (1985) Polyamine oxidases. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 322-326.
- Morgan M. L. (1987) Oxidized polyamines and the growth of human vascular endothelial cells. *Biochem J.* **242**, 347-352.
- Mori N., Yoshida N., Kitamoto Y. (1992) Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 352-356.
- Mori N., Fuchigami S., Kitamoto Y. (2002) Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase with high affinity for NADP from *Arthrobacter globiformis*. *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 130-135.
- Mori N., Kawakami B., Hyakutome K., Tani Y., Yamada H. (1980) Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpum didymium*. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 3015-3016.
- Moskalíková H. (2009) Charakterizace aminoaldehyddehydrogenasy z rajčete jedlého (*Lycopersicon esculentum*). Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci.

- Nadeau P., Delaney S., Chouinard L. (1987) Effects of cold hardening on the regulation of polyamine levels in wheat (*Triticum aestivum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **84**, 73-77.
- Nakamura T., Nomura M. S., Mori H., Jagendorf A. T., Ueda A., Takabe T. (2001) An Isoenzyme of Betaine Aldehyde Dehydrogenase in Barley. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1088-1092.
- Parsons M. R., Convery M. A., Wilmot C. M., Yadav K. D., Blakeley V., Corner A. S., Phillips S. E., McPherson M. J., Knowles P. F. (1995) Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution. *Structure* **3**, 1171-1184.
- Perez-Miller S. J., Hurley T. D. (2003) Coenzyme Isomerization Is Integral to Catalysis in Aldehyde Dehydrogenase. *Biochemistry* **42**, 7100-7109.
- Perozich J., Nicholas H., Wang B. C., Lindahl R., Hempel J. (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci.* **8**, 137-146.
- Perozich J., Kuo I., Wang B. C., Boesch J. S., Lindahl R., Hempel J. (2000) Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6197-6203.
- Petřivalský M., Brauner F., Luhová L., Gagneul D., Šebela M. (2007) Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *J. Plant Physiol.* **164**, 1410-1418.
- Pierce S. K., Edwards S.C., Mazzochi P. H., Klingler L. J., Warren M. K. (1984) Proline betaine: a unique osmolyte in an extremely euryhaline osmoconformer. *Biol. Bull.* **167**, 495-500.
- Pietruszko R., Chern M. K. (1999) Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: purification, characterization, and comparison with human cytoplasmic E3 isozyme. *Biochem. Cell Biol.* **77**, 179-187.
- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. Studium obranných mechanismů při salinitním stresu u hrachu setého. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2006. Praha 2006, pp. 184-187.
- Prieto M. I., Martin J., Balaña-Fouce R., Garrido-Pertierra A. (1987) Properties of gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochimie* **69**, 1161-1168.
- Radová A., Šebela M., Galuszka P., Frébort I., Jacobsen S., Faulhammer H. G., Peč P. (2001) Barley polyamine oxidase: characterization and analysis of the cofactor and the N-terminal amino acid sequence. *Phytochem Anal.* **12**, 166-173.
- Rhodes D., Hanson A. D. (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 357-384.
- Roh J. H., Suzuki H., Kumagai H., Yamashita M., Azakami H., Muruoka Y., Mikami B. (1994) Crystallization and preliminary X-ray analysis of copper amine oxidase from *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **238**, 635-637.
- Seiler N. (1995) Polyamine oxidase, properties and functions. *Prog. Brain Res.* **106**, 333-344.

- Siegel J. M., Montgomery G. A., Bock R. M. (1959) Ultraviolet absorption spectra of DPN and analogs of DPN. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 288-299.
- Slocum R. D., Furey M. J. (1991) Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in pea and maize tissues. *Planta* **183**, 443-450.
- Smith T. A. (1985) The di- and polyamine oxidases of higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 319-322.
- Smith T. A., Broker S. J., Loeffler R. S. T. (1986) Occurrence in higher plants of 1-(3-aminopropyl)pyrrolinium and pyrroline: products of polyamine oxidation. *Phytochemistry* **25**, 683-689.
- Stein A. M., Lee J. K., Anderson C. D., Anderson B. M. (1963) The thionicotinamide analogs of DPN and TPN. I. Preparation and analysis. *Biochemistry* **2**, 1015-1017.
- Suzuki Y., Yanagisawa H. (1980) Purification and properties of maize polyamine oxidase: a flavoprotein. *Plant Cell Physiol.* **21**, 1085-1094.
- Suzuki S., Sakurai T., Nakahara A., Manabe T., Okuyama T. (1984) Roles of two copper ions in bovine serum amine oxidase. *Biochemistry* **25**, 338-341.
- Suzuki Y. (1996) Purification and characterization of diamine oxidase from *Triticum aestivum* shoots. *Phytochemistry* **42**, 291-293.
- 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., Radová A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001a) FAD-containing oxidases: a timely challenge of researches in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**, 197-207.
- Šebela M., Luhová L., Brauner F., Galuszka P., Radová A., Peč P. (2001b) Light microscopic localisation of aminoaldehyde dehydrogenase activity in plant tissues using nitroblue tetrazolium-based staining method. *Plant Physiol. Biochem.* **39**, 831-839.
- Šebela M., Štosová T., Havliš J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z., Shevchenko A. (2006) Thermostable trypsin conjugates for high throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959-2963.
- Thomas H., Havliš J., Peychl J., Shevchenko A. (2004) Dried-droplet probe preparation on AnchorChip™ targets for navigating the acquisition of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight spectra by fluorescence of matrix/analyte crystals. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 923-930.
- Trossat C., Rathinasabapathi B., Hanson A. D. (1997) Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and ω-aminoaldehydes. *Plant Physiol.* **113**, 1457-1461.

- Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M. (2007) Plant aminoaldehyde dehydrogenases. Has the time now come for new interesting discoveries? *Curr. Topics Plant Biol.* **8**, 45-70.
- Tylichová M., Briozzo P., Kopečný D., Ferrero J., Moréra S., Joly N., Snégaroff J., Šebela M. (2008) Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Acta Cryst.* **64**, 88-90.
- Tylichová M. (2009) Study of plant aminoaldehyde dehydrogenase. Allergenic properties of wheat prolamins. Ph.D thesis, Palacky University Olomouc.
- 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.
- Valenzuela-Soto E. M., Muñoz-Clares R. A. (1994) Purification and properties of betainealdehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* **143**, 145-152.
- 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**, 7390-394.
- Velasco-García R., Mújica-Jiménez C., Mendoza-Hernández G., Muñoz-Clares R. A. (1999) Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 1292-1300.
- Vignevich V., Dooley D. M., Guss J. M., Harvey I., McGuirl M. A., Freeman H. C. (1993) Crystallisation and preliminary crystallographic characterisation of the copper-containing amine oxidase from pea seedlings. *J. Mol. Biol.* **229**, 243-245.
- Vojtěchová M., Hanson A. D., Muñoz-Clares R. A. (1997) Betaine-aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 81-88.
- Wang Y., Meng Y., Nii N. (2004) Changes in Glycine Betaine and Related Enzyme Contents in *Amaranthus tricolor* Under Salt Stress. *J. Plant Physiol.* **30**, 496-502.
- Weigel P., Weretilnyk E. A., Hanson A. D. (1986) Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **82**, 753-759.
- Weretilnyk E. A., Hanson A. D. (1988) Betaine aldehyde dehydrogenase polymorphism in spinach: genetic and biochemical characterization. *Biochem. Genet.* **26**, 143-151.
- Weretilnyk E. A., Bednarek S., McCue K. F., Rhodes D., Hanson A. D. (1989) Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons. *Planta* **178**, 342-352.

- Weretilnyk E. A., Hanson A. D. (1989) Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 56-63.
- Werle E., Raub A. (1948) Über Vorkommen, Bildung und Abbau biogener Amine bei Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung des Histamins. *Biochem. Z.* **318**, 538-553.
- Werle E., Zabel A. (1948) Über die Verbreitung der Histaminase im Pflanzenreich. *Biochem. Z.* **318**, 554-559.
- Yamada H., Yasunobu K. (1962) Monoamine oxidase. I. Purification, crystallization and properties of plasma monoamine oxidase. *J. Biol. Chem.* **237**, 1511-1516.
- Yamada H., Kumagai H., Kawasaki H., Matsui H., Ogata K. (1967) Crystallization and properties of diamine oxidase from pig kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 723-727.
- Yanagisawa H., Kato A., Hoshiai S., Kamiya A., Torii N. (1987) Polyamine oxidase from water hyacinth. *Plant Physiol.* **85**, 906-909.
- Yanagisawa H., Hamasina N., Kato T. (1996) Polyamine oxidase from leaves of *Lilium longiflorum*: purification and properties. *J. Plant Physiol.* **149**, 657-662.
- Yokoi S., Quintero F.J., Cubero B., Ruiz M.T., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Pardo J.M. (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant Journal* **30**, 529-539.
- Yorifuji T., Koike K., Samuraj T., Yokoyama K. (1986) 4-Aminobutyraldehyde and 4-guanidobutyraldehyde dehydrogenases for arginine degradation in *Pseudomonas putida*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2009-2016.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Å	Angström (dévková jednotka)
AA/BIS	akrylamid/bisakrylamid
ABAL	4-aminobutyraldehyd
ABALDH	4-aminobutyraldehyddehydrogenasa
ADC	arginindekarboxylasy
AGM	agmatin
AHBAL	4-amino-2-hydroxybutyraldehyd
AIH	agmatiniminohydrolasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
AO	aminoxidasa
APAL	3-aminopropionaldehyd
APBAL	4-(3-aminopropyl)-aminobutyraldehyd
APS	persíran amonný
AVAL	5-aminovaleraldehyd
BADH	betainaldehyddehydrogenasa
BAL	betainaldehyd
B-PER	bacterial protein extraction reagens
BSAO	aminoxidasa z hověžího séra
CAO	aminoxidasa obsahující měď
CDH	cholindehydrogenasa
CMO	cholinmonooxygenasa
COD	cholinoxidasa
CPAL	3-kyanopropionaldehyd
DAO	diaminoxidasa
DAP	propan-1,3-diamin
DEAE	diethylaminoethyl
DFMA	difluoromethylarginin
DFMO	difluoromethylornithin
DMABAL	dimethylaminobutyraldehyd
DMSP	dimethyl-sulfoniopropionát
DMSPAL	3-dimethylsulfoniopropionaldehyd
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAD	flavinadenindinukleotid

FPAO	polyaminoxidasa z hub
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GB	glycinbetain
GBAL	4-guanidinobutyraldehyd
GBALDH	gunidinobutyraldehyddehydrogenasa
GHBAL	4-guanidino-2-hydroxybutyraldehyd
GPAL	3-guanidinopropionaldehyd
CHA	cyklohexylamin
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
KAD	kadaverin
K_m	Michaelisova konstanta
MAO	monoaminoxidasa
MGBG	methyl-(glyoxal)-bis-guanylhydrazon
MPAO	kukuřičná polyaminoxidasa
MTT	Thiazolyl Blue (thiazolylovou modř)
NAD^+	nikotinamidadenindinukleotid
$NADP^+$	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBT	Nitro Blue Tetrazolium (nitrotetrazoliová modř)
NCPAH	N-karbamoylputrescinamidohydrolasa
ODC	ornithindekarboxylasa
PAO	polyaminoxidasa
PMS	fenazin methosulfát
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PTS1	peroxisomal targeting signal type 1
PUT	putrescin
PYRR-DH	pyrrolindehydrogenasa
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SMO	sperminoxidasa
SPD	spermidin
SPM	spemin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Thio- NAD^+	thionikotinamidadenindinukleotid
TMABAL	trimethylaminobutyraldehyd
TMABALDH	4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasa
TMAPAL	trimethyl APAL

TPAO	tkáňová polyaminoxidasa z krysích jater
TPQ	2,4,5-trihydroxyfenylalanin chinon