

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Interakce rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy
s inhibitory**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Radana Karlíková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Termín odevzdání práce:	srpen 2011

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

V Olomouci dne 2. 8. 2011

.....

Radana Karlíková

„Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli panu prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za odborné vedení, cenné rady a připomínky a v neposlední řadě i za čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla velice poděkovat Mgr. Janu Frömmelovi nejen za poskytnutí biologického materiálu pro experimentální část, ale především za trpělivost, ochotu a rady“.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Radana Karlíková
Název práce	Interakce rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy s inhibitory
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	

Cílem této bakalářské práce bylo objasnit interakce rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH, EC 1.2.1.19) s vybranými inhibitory.

AMADH je NAD(P)⁺ dependentní enzym náležící do rozsáhlé nadrodiny ALDH. Katalyzuje oxidaci ω -aminoaldehydů na příslušné ω -aminokyseliny. Reakční mechanismus AMADH se opírá o přítomnost cysteinu jako katalytického rezidua, není proto překvapením, že silný inhibiční efekt vykazují sulfhydrylová činidla jako je 4-chlormerkuribenzoan, *N*-methylmalenimid aj.

Vzhledem k prokázané inaktivaci příbuzných betainaldehyddehydrogenas (EC 1.2.1.8) sirnými sloučeninami byly za potencionální inhibitory izoenzymu aminoaldehyddehydrogenasy (PsAMADH2) hrachu setého (*Pisivum sativum*) zvoleny následující látky: tetraethylthiuramdisulfid (TETDS) a tetramethylthiuramdisulfid (TMTDS). V obou případech byla zjištěna inaktivace PsAMADH2 v čase. Na základě hodnot (K_i , k_{inact} , $t_{1/2}$, r) zjištěných z grafických závislostí byl TETDS shledán účinnějším ve srovnání s TMTDS. Analýza MALDI-TOF neprokázala vazbu inhibitorů mimo aktivní místo.

Klíčová slova	aminoaldehyddehydrogenasa, betainaldehyddehydrogenasa, disulfiram, inhibice
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Radana Karlíková
Title	Interactions of plant aminoaldehyde dehydrogenase with inhibitors
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2011
Abstract	

The aim of this thesis was to clarify interactions of plant aminoaldehyde dehydrogenase (AMADH, EC 1.2.1.19) with selected compounds suggested as possible inhibitors.

AMADH is an NAD(P)-dependent enzyme which belongs to aldehyde dehydrogenase superfamily. The enzyme catalyzes the oxidation of ω -aminoaldehydes to the corresponding ω -amino acids. The reaction mechanism of AMADH involves a catalytic cysteine residue at the active site. Therefore it isn't surprising that sulfhydryl reagents (e.g. 4-chloromerkuribenzoate, *N*-methylmaleimide) exhibit strong inhibitory effect.

It's known that sulfur compounds inactivate a similar enzyme betaine aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.8). On the basis of this fact, substances such as tetraethylthiuram disulfide (TETDS) and tetramethylthiuram disulfide (TMTDS) were selected as potential inhibitors of the isoenzyme aminoaldehyde dehydrogenase 2 (PsAMADH2) from pea (*Pisum sativum*). A time-dependent inactivation of PsAMADH2 was confirmed in both cases - TMTDS inhibited less potently than TETDS as follows from values of the determined kinetic parameters (K_i , k_{inact} , $t_{1/2}$, r) and graphical evaluation. MALDI-TOF analysis didn't confirm binding of the

	inhibitors outside the active site.
Keywords	aminoaldehyde dehydrogenase, betaine aldehyde dehydrogenase, disulfiram, inhibition
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah:

Cíle práce.....	8
Teoretická část.....	9
1 Polyaminy.....	9
2 Aminoaldehyddehydrogenasy.....	10
2.1 Výskyt AMADH.....	11
2.2 Lokalizace AMADH.....	13
2.3 Reakční mechanismus AMADH.....	13
2.4 Substráty a produkty AMADH reakce.....	15
2.4.1 ω -Aminoaldehydy.....	16
2.4.1.1 APAL.....	18
2.4.1.2 ABAL.....	19
3 Betainaldehyddehydrogenasa	20
3.1 Betainy.....	21
4 Inhibice AMADH, BADH.....	22
Experimentální část.....	26
5 Materiál a metody.....	26
5.1 Biologický materiál.....	26
5.2 Chemikálie.....	26
5.3 Přístroje.....	27
5.4 Izolace enzymu PsAMADH2.....	27
5.5 Kinetická měření.....	28
5.5.1 Stanovení aktivity PsAMADH2.....	28
5.5.2 Experimentální určení K_m a V_{lim}	29
5.5.3 Časová inaktivace enzymu.....	29
5.5.4 Stanovení rozdělovacího poměru („partition ratio“).	30
5.5.5 Ireverzibilita inhibice.....	30
5.6 Určení koncentrace enzymu.....	30
5.7 SDS-PAGE.....	31
5.8 MALDI TOF.....	32
6 Výsledky a diskuze.....	34
6.1 Stanovení kinetických parametrů enzymu PsAMADH2.....	34
6.2 Stanovení koncentrace enzymu.....	37
6.3 Inaktivace PsAMADH2.....	38

6.3.1 Úprava podmínek měření.....	39
6.3.2 Inaktivace PsAMADH2 pomocí TMTDS.....	41
6.3.3 Inaktivace PsAMADH2 pomocí TETDS.....	43
6.3.4 Souhrn výsledků časové inaktivace.....	45
6.4 Ireverzibilita inhibice.....	46
6.5 SDS-PAGE trypsinové štěpení a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.....	47
7 Závěr.....	53
8 Literatura.....	54
9 Seznam použitých zkratk.....	64

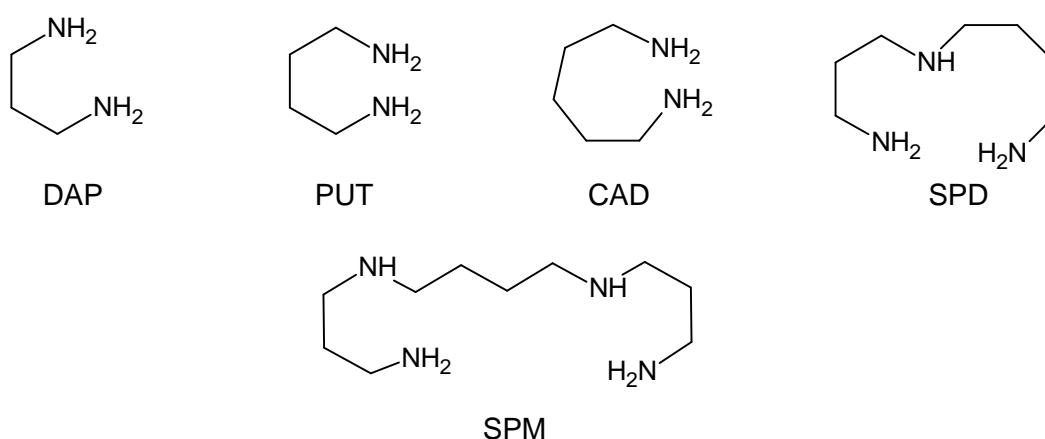
Cíle práce:

- Vypracování rešerše odborné literatury se zaměřením na aminoaldehyddehydrogenasy, betainaldehyddehydrogenasy a jejich inhibici.
- Experimentální proměření inhibičních závislostí vybraných sloučenin na spektrofotometru.
- Studium interakce enzym-inhibitor.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Polyaminy

Polyaminy jsou nízkomolekulární sloučeniny, které nalezneme v mikrobiální, rostlinné i živočišné říši. Nejznámějšími zástupci jsou propan-1,3-diamin (DAP), putrescin (PUT), kadaverin (CAD), spermidin (SPD) a spermin (SPM) (Walters, 2003).



Obř. 1: Strukturní vzorce vybraných polyaminů (Walters, 2003)

Klíčovou sloučeninou biosyntézy polyaminů je putrescin, který může být v případě vyšších rostlin a bakterií syntetizován přímo z ornithinu působením ornithindekarboxylasy (ODC, EC 4.1.1.17), či nepřímo - cestou přes arginin, jenž je arginindekarboxylasou (ADC, EC 4.1.1.19) odbouráván na agmatin (AGM). Z něj pak následnými enzymovými reakcemi vzniká putrescin - výchozí látka tvorby SPD. Přenos aminopropylové skupiny z dekarboxylovaného S-adenosylmethioninu na zmíněný PUT za vzniku SPD, je katalyzován spermidinsynthasou (EC 2.5.1.16). SPM vzniká obdobným způsobem, avšak akceptorem aminopropylové skupiny prostřednictvím sperminsynthasy (EC 2.5.1.22), je SPD. U hub a savců je syntéza putrescinu možná pouze z ornithinu. (Walters, 2003; Bouchereau et al., 1999).

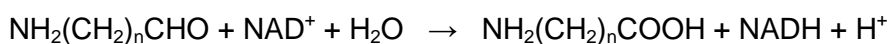
Za fyziologického pH nesou polyaminy kladný náboj a z toho důvodu se mohou vázat na záporně nabitě biomolekuly - například nukleové kyseliny (Takeda et al., 1983). V organismu zastávají mnoho důležitých funkcí. V případě vyšších rostlin se podílejí na růstu kořenů, somatické embryogenezi, indukci kvetení aj. Také jsou zapojeny v odpovědi rostlin při vystavení stresové situaci jako je např. sucho, nedostatek draslíku, osmotický šok či infekce patogeny, jak je shrnuto v recentní

publikaci Walters (2003). Polyaminy mají podíl i v procesech buněčné proliferace a diferenciaci (Heby, 1981).

Na druhé straně jsou produkty, vznikající v prvním kroku odbourávání polyaminů za katalytického účinku chinoproteinových diaminooxidás (CAO, EC 1.4.3.22), popř. flavinových polyaminooxidás (PAO, EC 1.5.3.17), jako jsou peroxid vodíku, některé ω -aminoaldehydy a případně amoniak, značně cytotoxické - zvláště pak při zvýšené koncentraci. Mohou například podmiňovat programovanou buněčnou smrt a inhibovat buněčné dělení (Agostinelli et al., 2004). Nejen z těchto důvodů je nutno dráhu přísně regulovat. Mezi enzymy, které zasahují do metabolismu polyaminů, patří i aminoaldehyddehydrogenasy.

2 Aminoaldehyddehydrogenasy

Aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH, EC 1.2.1.19) je NAD(P)^+ dependentní enzym, jenž se v živých systémech podílí na procesu degradace biogenních aminoaldehydů, vznikajících při oxidační deaminaci polyaminů (Šebela et al., 2000). Touto reakcí tak dochází k oxidaci ω -aminoaldehydů na příslušné ω -aminokyseliny za současné redukce koenzymu NAD^+ , dle rovnice:

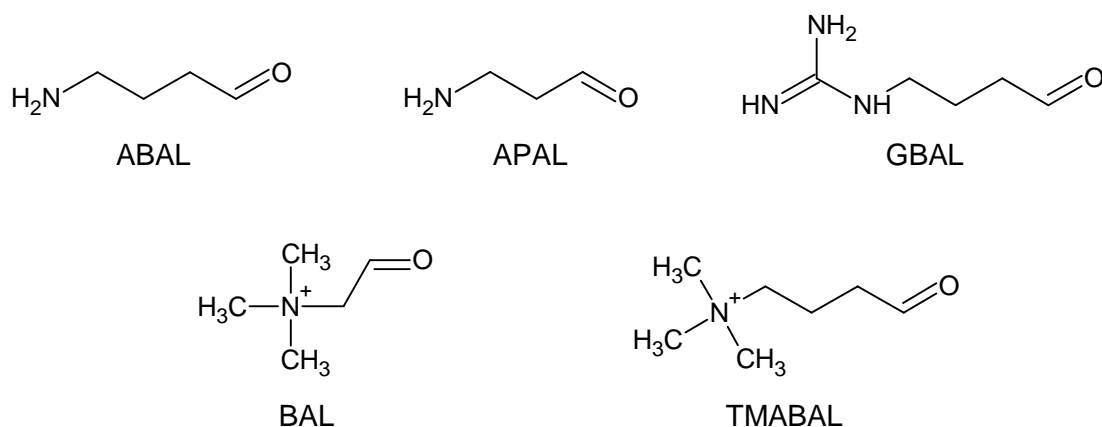


AMADH zařazujeme do rozsáhlé rodiny aldehyddehydrogenas 9 (ALDH9) náležejících do nadrodiny aldehyddehydrogenas (ALDH) (Perozich et al., 1999; Sophos et al., 2001).

Skupinu ALDH9 vzájemně propojují tři nesouvisející metabolické dráhy, a to metabolismus polyaminů, cholinu a lysinu - klasifikace jednotlivých členů ALDH9 je proto vztažena k substrátové specifičnosti, na základě které je dále rozdělujeme na:

- 4-aminobutyraldehyddehydrogenasy (ABALDH, EC 1.2.1.19)
- 4-guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (GBALDH, EC 1.2.1.54)
- betainaldehyddehydrogenasy (BADH, EC 1.2.1.8)
- 4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (TMABALDH, EC 1.2.1.47)

Mezi typické substráty tak můžeme zařadit 4-aminobutyraldehyd (ABAL), 3-aminopropionaldehyd (APAL), 4-guanidinobutyraldehyd (GBAL), betainaldehyd (BAL), *N,N,N*-trimethyl-4-aminobutyraldehyd (TMABAL) a dále několik aromatických a alifatických aldehydů (Tylichová et al., 2010).



Obr. 2: Strukturální vzorce vybraných ω-aminoaldehydů (Tylichová et al., 2010).

Rozsah substrátové specifčnosti daného enzymu, který byl izolován z různých organismů, není vždy striktně vymezen, proto by výše uvedené enzymy měly být obecněji považovány za AMADH (Tylichová et al., 2007; 2010).

2.1 Výskyt AMADH

Aminoaldehyddehydrogenasy byly nalezeny a následně izolovány z mikroorganismů, rostlin i živočichů - včetně člověka.

Z řad mikroorganismů, konkrétně z gramnegativní bakterie *Pseudomonas fluorescens*, byla ABALDH získána již v roce 1957, kdy jako jediný zdroj dusíku, uhlíku a energie pro její výživu, byl použit putrescin a pyrrolidin (Jakoby & Fredericks, 1959). Další v tomto ohledu studovanou bakterií z rodu *Pseudomonas* byla *P. putida*, produkující ABALDH i GBALDH. Bylo zjištěno, že ABALDH je schopná přeměny ABAL i GBAL, zatímco GBALDH je striktně specifická pouze pro GBAL (Yorifuji et al., 1986). V případě *Klebsiella aerogenes* (G-)^a se NAD⁺ dependentní ABALDH účastní procesu odbourávání agmatinu, a to přeměnou jednoho z meziproductů (ABAL) na 4-aminomáselnou kyselinu (GABA). Konečnou sloučeninou této degradační dráhy je sukcinát (Friedrich & Magasanik, 1979).

Poslední zde zmíněnou bakterií bude gramnegativní *Escherichia coli* (kmen K12), jejíž ABALDH (YdcW protein) je schopna oxidovat BAL a také i některé krátké aldehydy (Gruetz et al., 2004)

V roce 1984 byla popsána částečná purifikace NAD⁺ dependentní GBALDH z bobu obecného (*Vicia faba*), katalyzující přeměnu GBAL a ABAL. Inhibice tohoto enzymu byla provedena přidávkem *p*-chloromerkuribenzoátu, *N*-ethylmalenimidu

^a = gramnegativní

a zinkonu (2-karboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazybenzen) (Matsuda & Suzuki, 1984). O rok později byl publikován popis aktivity pyrrolindehydrogenasy (ABALDH) v hrachu a ovsu, avšak samotný enzym nebyl purifikován. Mimo výše zmíněné rostliny byl ABALDH nalezen také v kukuřici, ječmeni a sóji (Flores & Filner, 1985).

Nejlépe prozkoumanou rostlinou v této oblasti však zůstává výše zmíněný hrách setý (*Pisum sativum*), jehož AMADH byla částečně purifikována z epikotylu (Awal et al. 1997). Úplná purifikace homogenní AMADH se zdařila v roce 2000. Enzym vykazoval širokou substrátovou specifitu pro ω -aminoaldehydy C3-C6, kdy jako nejlépe vyhovující substráty byly vyhodnoceny APAL, ABAL a dále ω -guanidinová analoga aminoaldehydů. Molekulová hmotnost získaného tetramerního proteinu byla v nativním stavu 230 kDa, pro jednu podjednotku dosahovala 57 kDa (Šebela et al., 2000). V roce 2003 byla zveřejněna primární struktura hrachové AMADH. Současně bylo zjištěno, že existují dva izoenzymy, nyní označované jako PsAMADH1 a PsAMADH2 (Brauner et al., 2003).

V případě říše živočišné, je možné uvést studie výzkumu dimerních ABALDH z krysích jater (Testore et al., 1995) a také ze střevní sliznice, efektivně oxidující ABAL. Druhý jmenovaný enzym s podjednotkovou molekulovou hmotností 52 kDa má vysokou afinitu pro ABAL ($K_m = 18 \mu\text{M}$) a NAD^+ ($K_m = 14 \mu\text{M}$)^b, ovšem afinita pro betainaldehyd je mnohem nižší ($K_m = 285 \mu\text{M}$) a to při zachování podobné účinnosti, což je podmíněno vysokou hodnotou rychlosti přeměny V (Testore et al., 1999). Je překvapením, že ABALDH získaný z krysího mozku, vykazuje sníženou afinitu pro ABAL, a to vůči acetaldehydu, propionaldehydu a sukcinát-semialdehydu (Abe et al., 1990; Tylichová et al., 2007).

Studie pocházející z roku 1977 byla zaměřena na aldehyddehydrogenasy lidských jater. Byly objeveny dva izoenzymy (Greenfield et al., 1977): cytoplazmový (E1) a mitochondriální (E2), které jsou schopny oxidovat širokou škálu aldehydů, zahrnující jak alifatické, aromatické tak substituované (např. 2-hydroxy-, 2-halogen-) aldehydy na odpovídající kyseliny. ABAL je oxidován také, avšak až při zvýšených koncentracích (Ambroziak & Pietruszko, 1987).

O 12 let později byl v lidských játrech popsán izoenzym třetí (E3), který vykazoval pro zmíněný ABAL, narozdíl od dvou předchozích, afinitu vysokou. Můžeme jej tedy považovat za první ABALDH nalezenou v savčím organismu (Kurys et al., 1989; Tylichová et al., 2007).

^b hodnoty byly naměřeny při pH = 7,4

2.2 Lokalizace AMADH

Aktivita AMADH byla vizualizovaná v etioloovaných semenáčcích hrachu v roce 2001. Principem použité barvicí techniky, založené na přenosu elektronů, byla redukce nitrotetrazoliové modři, za přítomnosti fenazinmethosulfátu (PMS), na barevný produkt - formazan. Nejintenzivnější zbarvení a tedy i nejvyšší aktivita AMADH byla detekována v buňkách pericyklu a endodermis kořene a hypokotylu. Slabší zbarvení bylo pozorováno ve vaskulárním kambiu kořene. V případě epikotylu a vrcholku výhonu byla činnost AMADH prokázána zejména ve vaskulárním kambiu, dále pak v pericyklu a endodermis, kde již intenzita vybarvení byla nižší (Šebela et al., 2001).

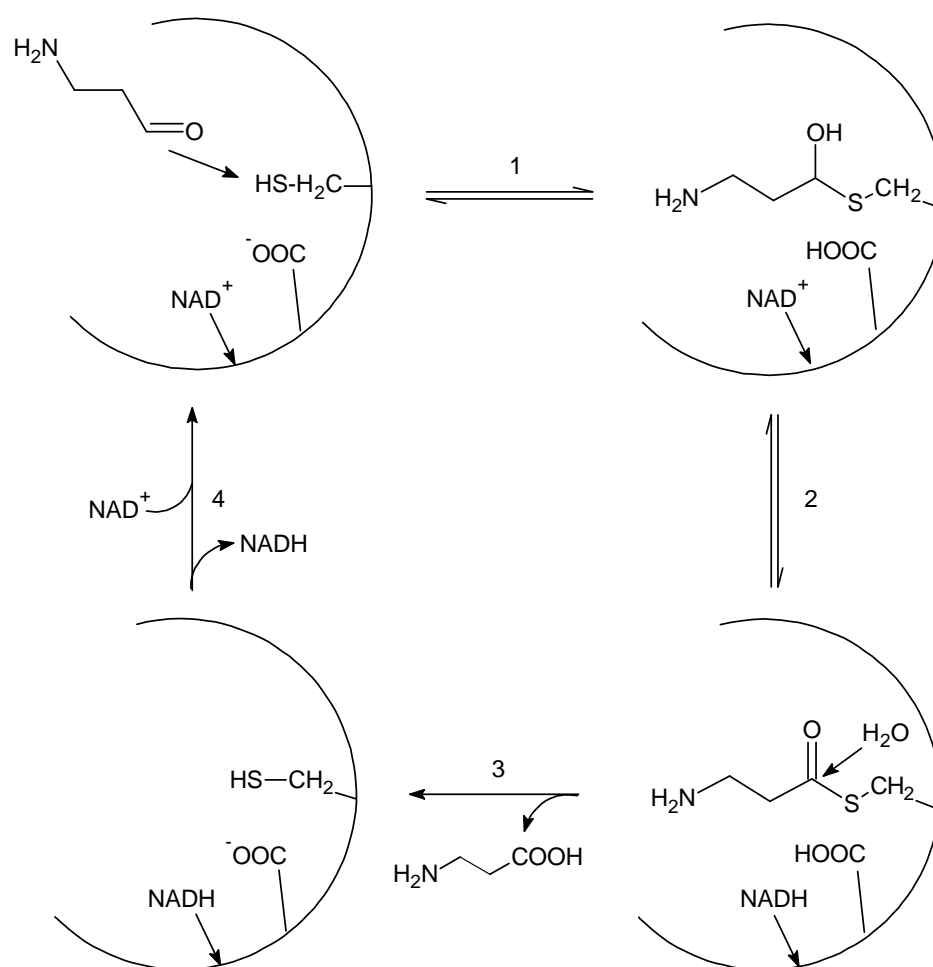
Činnost AMADH byla také studována v reakci na stres, konkrétně na mechanické poškození, které vyvolalo zvýšení aktivity enzymů účastnících se degradační dráhy polyaminů (jako jsou peroxidasy, aminooxidasy a aminoaldehyddehydrogenasy), paralelně s nárůstem PUT, CAD, SPD a 4-aminomáselné kyseliny. Zvýšená aktivita AMADH byla histochemicky lokalizovaná na řezech semenáčků hrachu, a to konkrétně v epidermálních buňkách a buňkách kortikálního parenchymu, jež přiléhaly k místu poškození (byla zde patrná i intenzivní lignifikace), (Petřivalský et al., 2007).

Metodou „Immunogold labeling“ - značení protilátkou s koloidním zlatem - byla provedena intracelulární lokalizace BADH. Ječmenná BADH exprimovaná v rostlinách transgenního tabáku byla detekována v peroxisomech, v malé míře také v chloroplastech a mitochondriích (Nakamura et al., 1997). Roku 2001 se klonováním odpovídající cDNA ječmene podařilo izolovat 2 izoenzymy BADH, konkrétně BBD1 a BBD2. První typ, obsahoval C-terminální tripeptid SKL, jenž je signálem směřujícím preproteiny do peroxisomů. U druhého jmenovaného, tripeptid SKL nebyl přítomen, přičemž jeho pravděpodobná lokalizace je tak směřována do cytosolu (Nakamura et al., 2001).

2.3 Reakční mechanismus AMADH

Reakční mechanismus AMADH, ale i dalších ALDH, se opírá o přítomnost cysteinu, jako katalytického rezidua, které se účastní svou thiolovou skupinou přeměny aldehydů na kyseliny (Šebela et al. 2000). V aktivním místě je také lokalizováno vazebné místo pro koenzym, kdy NAD^+ může být často nahrazen NADP^+ . Tato náhrada je však v některých případech provázena poklesem enzymové aktivity, což je pravděpodobně způsobeno elektrostatickou repulzí 2'-fosfátové skupiny (Perozich et al., 2000).

Princip katalytického mechanismu je znázorněn na obr. 3. Po navázání koenzymu dochází k nukleofilnímu ataku substrátu cysteinovou -SH skupinou za vzniku kovalentně vázaného thiohemiacetalového meziprojektu. Posléze je proton z tohoto meziprojektu přenesen na uhlík C4 nikotinamidového kruhu. Vzniká tak redukovaný koenzym NAD(P)H a thioester. Odstranění vodíkového iontu ze substrátu je však energeticky velmi náročné a to díky dipolárnímu charakteru karbonylové skupiny. V posledním kroku limitujícím rychlost enzymové reakce, dochází k aktivaci molekuly vody glutamátovým zbytkem (= obecná báze) a k následnému nukleofilnímu ataku acyl-sírné vazby za odštěpení aminokyseliny. Redukovaný koenzym poté oddisociuje z aktivního místa (Tylichová et al., 2007).



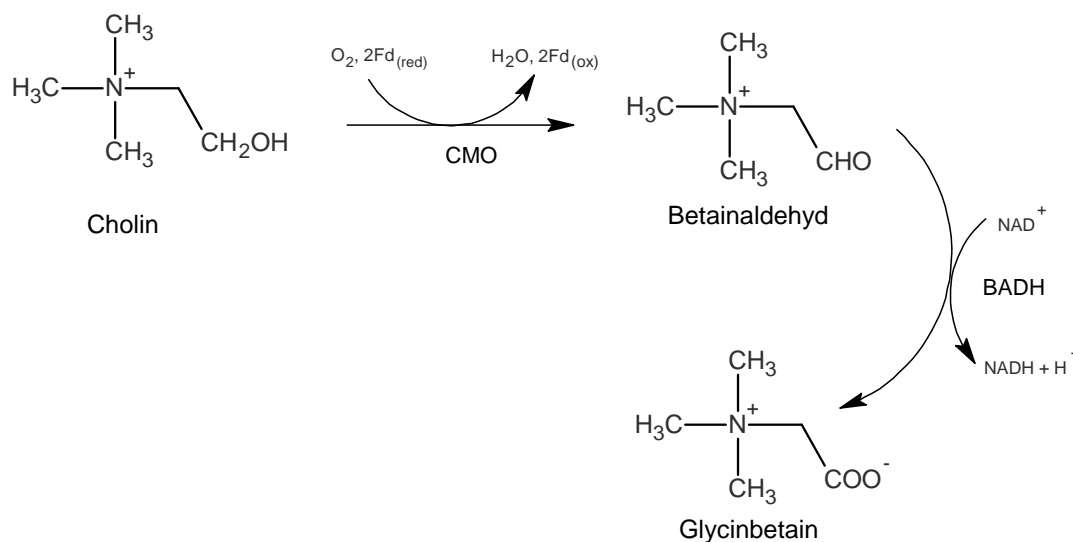
Obr. 3: Schéma reakčního mechanismu AMADH: 1: Substrát (znázorněn APAL) je nukleofilně atakován SH- skupinou cysteinového zbytku za vzniku thiohemiacetalového meziprojektu. 2: Přenos protonu z tohoto meziprojektu na NAD^+ za vzniku NADH a thioesteru. 3: Hydrolýza thioesteru za uvolnění odpovídající aminokyseliny (β -alanin). 4: Uvolnění NADH z aktivního místa a případné navázání dalšího NAD^+ . (Tylichová et al., 2007).

2.4 Substráty a produkty AMADH reakce

Již bylo zmíněno, že ALDH se účastní řady metabolických procesů. Počínaje degradační dráhou lysinu vedoucí k biosyntéze karnitinu - kdy methylací vzniklý *N,N,N*-trimethyllysin je enzymovým působením ϵ -*N*-trimethyllysinhydroxylasy (EC 1.14.11.8) nejprve hydroxylován na β -hydroxytrimethyllysin a posléze štěpen specifickou aldolasou na glycin a *N,N,N*-trimethyl-4-aminobutyraldehyd. Katalytickým působením TMABALDH (EC 1.2.1.47) vzniká dále γ -butyrobetain, jehož hydroxylací získáme zmiňovaný L-karnitin (Hulse et al., 1978). Kinetická a strukturní studie izoenzymů PsAMADH1 a PsAMADH2 hrachové AMADH dokládá jejich schopnost katalyzovat oxidaci TMABAL na γ -butyrobetain, čímž se tak otevírá možnost podílu AMADH v biosyntetické dráze karnitinu u rostlin (Tylichová et al., 2010). Biologicky zajímavý je L-karnitin, což je látka, podílející se na transportu aktivovaných mastných kyselin (acyl-CoA) z cytosolu do mitochondrií. Takto přenesené acyly jsou následně degradovány v procesu β -oxidace.

Neméně důležitou dráhou je pak metabolismus cholinu, kdy oxidací ferredoxin dependentní cholinmonooxygenasou (CMO, EC 1.14.15.7) je vzniklý betainaldehyd, za katalýzy betaindehydrogenasou (BADH, EC 1.2.1.8), odbouráván na glycinbetain (obr. 4), (Brouquisse et al., 1989). V případě některých organismů (např. *Arthrobacter globiformis*), může být syntéza glycinbetainu z cholinu zprostředkována pouze jedním enzymem - cholinoxidasou (COD, EC 1.1.3.17), (Ikuta et al., 1977).

Glycinbetain zastává v organismech řadu funkcí - jedná se například o vysoce efektivní osmoprotektant, sloužící jako ochrana vůči osmotickému stresu (Courtenay et al., 2000). Dále je donorem methylu pro syntézu methioninu, má důležitý podíl na stabilizaci thylakoidní membrány v chloroplastech (Ashraf & Foolad, 2007), aj.



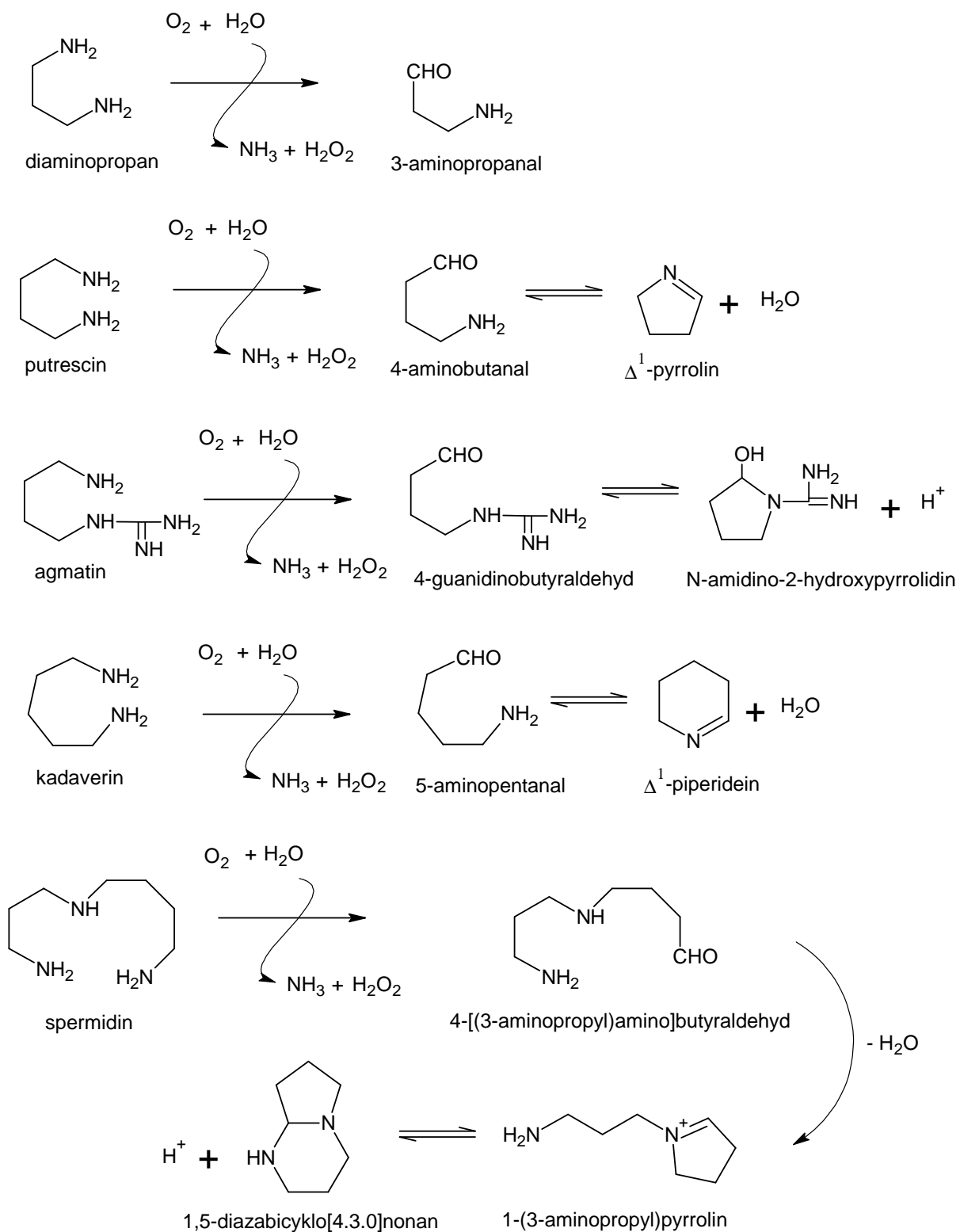
Obr. 4: Schéma biosyntetické dráhy glycinbetainu: Dvoustupňová oxidace cholinu na glycinbetain za využití ferredoxin dependentní cholinmonooxygenasy (CMO) a betainaldehyddehydrogenasy (BADH), (McNeil et al., 1999).

Velmi významnou roli pak plní AMADH při degradaci polyaminů, kdy ω -aminoaldehydy vzniklé v této dráze jsou převáděny na ω -aminokyseliny. Tato problematika bude proto popsána detailněji.

2.4.1 ω -Aminoaldehydy

ω -Aminoaldehydy vznikají jako primární produkty v procesu oxidačního odbourávání polyaminů za katalýzy chinoproteinovými aminosidasami (CAO, EC 1.4.3.22) nebo flavoproteinovými polyaminoxidasami (PAO, EC 1.5.3.17). Obvykle homodimerní CAO, obsahující v aktivním místě každé z podjednotek měď a topachinonový kofaktor, atakuje v reakci primární aminoskupinu polyaminu (Šebela et al., 2001; Tylichová et al., 2007). Po odštěpení vzniklého aminoaldehydu je redukováný kofaktor reoxidován za uvolnění peroxidu vodíku (Schwartz et al., 2000). Nejvhodnějšími substráty pro rostlinou CAO jsou diaminy putrescin (butan-1,4-diamin) a kadaverin (pentan-1,5-diamin), jejichž oxidací vzniká ABAL resp. 5-aminopentanal (5-aminovaleraldehyd, AVAL). Enzymy z luštěnin také efektivně oxidují spermidin [*N*-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin], agmatin [*N*-(4-aminobutyl)guanidin] a spermin [*N,N'*-bis-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin] (Medda et al., 1995).

Některé ω -aminoaldehydy následně spontánně cyklizují do relativně stabilních sloučenin (obr. 5), jiné (popř. jejich degradační produkty) jsou ale značně reaktivní, mají proto cytotoxické účinky (Tylichová et al., 2007).



Obr. 5: Schéma oxidace polyaminů rostlinnou CAO s následnou spontánní cyklizací (Tylichová et al., 2007).

V případě monomerní PAO, která v aktivním místě obsahuje nekovalentně vázaný FAD, je degradace katalyzována na sekundární aminoskupině polyaminu, a to buďto z vnější nebo vnitřní strany. Živočišné PAO katalyzují oxidaci z vnější strany - v případě SPM vzniká SPD, H₂O₂ a APAL; degradací SPD je opět uvolňován APAL a H₂O₂, třetím produktem je ovšem PUT. Je-li uhlík oxidován z vnitřní strany (zejména PAO rostlin), tvoří se ze SPD 4-aminobutanal, narozdíl od SPM, kdy vzniká [4-(3-aminopropylamino)-butyraldehyd] (APBAL), společnými produkty jsou dále peroxid vodíku a propan-1,3-diamin, jak je shrnuto v recentní publikaci Tylichová et al. (2007).

Bylo zjištěno, že i některé rostlinné PAO jsou schopny katalyzovat přeměnu SPM na SPD a také degradovat norspermin na norspermidin. Uvedená vlastnost byla popsána například pro AtPAO1 rostliny *Arabidopsis thaliana* (Tavladoraki et al., 2006).

Mezi nejvýznamnější ω -aminoaldehydy v této oblasti se zařazují APAL a ABAL.

2.4.1.1 APAL

3-Aminopropanal je obecně znám především díky svým cytotoxickým účinkům, vyskytuje se například v ischemické tkáni. Způsobuje apoptosu a nekrosu neuronů včetně gliových buněk. Příčinou je pravděpodobně protržení lyzozomů v důsledku intralyzozomální akumulace 3-aminopropanalu. Následné uvolnění lyzozomálních enzymů vede k aktivaci kaspas a apoptose buňky (Li et al., 2003).

K hromadění 3-aminopropanalu v mozku experimentálních zvířat, došlo krátce po nástupu mozkové ischemie. Podobné zvýšení bylo rovněž nalezeno v mozkomíšni tekutině pacientů s CNS ischemií, a to v koncentracích přímo souvisejících s rozsahem ischemické léze (Ivanova et al., 1998). Rozšíření cytotoxinů v mozkové tkáni mimo hlavní ischemické ložisko způsobuje jeho značné poškození (Ivanova et al., 2002).

Oxidací 3-aminopropanalu získáme β -alanin, známý také jako prekurzor karnosinu (β -alanyl-L-histidin). Karnosin zastává v organismu řadu důležitých funkcí, především se jedná o aktivátor myosinové ATPasy (Tiedje et al., 2010). Významná je však i jeho antioxidační schopnost - zejména vůči hydroxylovým radikálům (Aruoma et al., 1989), kdy případná oxidace esenciálních mastných kyselin, proteinů a nukleových kyselin buňky vede k jejímu poškození až buněčné smrti (Kil et al., 1996). Nedávné výzkumy, mimo jiné, poukázaly na schopnost karnosinu inhibovat růst buněčné kultury, izolované z lidských mozkových nádorových buněk (Renner et al., 2008).

U živočichů a některých druhů bakterií je β -alanin tvořen také degradací uracilu, kdy enzymatickým působením dihydropyrimidindehydrogenasy (EC 1.3.1.2) vzniklý

dihydrouracil je hydrolyticky odbouráván na *N*-karbamoyl- β -alanin, ze kterého reakcí katalyzovanou β -ureidopropionasou (EC 3.5.1.6), vzniká zmíněný β -alanin (Brown & Turan, 1995).

β -alanin je dále součástí koenzymu A, respektive kys. pantotenové (vitamín B₅), syntetizované ATP dependentní kondenzací β -alaninu s pantoátem za katalýzy pantotenatsynthetasy (EC 6.3.2.1), (Miyatake et. al., 1976; Raman & Rathinasabapathi, 2004). Nedostatek pantotenátu vede ke křečím, zvracení, bolestem břicha, doprovázených nespavostí a sníženou imunitou (Vandamme, 1992). Thioestery koenzymu A mají podstatný význam v metabolismusu lipidů, aminokyselin, syntéze steroidů a také v citrátovém cyklu (Raman & Rathinasabapathi, 2004). V současnosti je β -alanin zkoumán i jako pravděpodobný neurotransmitter (Tiedje et al., 2010).

β -Alaninbetain, vzniklý *S*-adenosylmethionin dependentními *N*-methylacemi β -alaninu, je znám pro své osmoprotektantní účinky, zejména u rostlin rodiny Plumbaginaceae, u nichž pravděpodobně zvyšuje toleranci vůči zasolení a hypoxii (Rathinasabapathi et al., 2000; 2001).

2.4.1.2 ABAL

Jednou z významných vlastností 4-aminobutanalu (ABAL) je jeho oxidace probíhající za přispění NAD⁺ dependentní dehydrogenasy (AMADH), na neproteinogenní γ -aminobutanovou kyselinu, známou také pod zkratkou GABA (Friedrich & Magasanik, 1979). Ta hraje významnou úlohu v řadě procesů, týkajících se prokaryotních a eukaryotních organismů (viz níže). U vyšších rostlin je primární reakcí syntézy jmenované kyseliny α -dekarboxylace L-glutamátu za katalýzy glutamátdekarboxylasou (EC 4.1.1.15), (Satya Narayan & Nair, 1990). Jako další variantu vzniku můžeme uvést bakteriální guanidinobutyrasu (EC 3.5.3.7), katalyzující hydrolýzu 4-guanidinobutyrátu na GABA a močovinu (Yorifuji et al., 1992).

U rostlin, které byly vystaveny stresové zátěži (např. chlad, sucho, mechanické poškození) dochází k výraznějšímu hromadění GABA. Jednou z příčin této akumulace může být, vzhledem ke vzniklé acidifikaci cytoplasmy, stimulace aktivity cytoplasmové Ca²⁺/kalmodulin dependentní glutamátdekarboxylasy s pH optimem cca 5,8. Tato cesta za produkce GABA, tak může zároveň přispívat k regulaci pH, neboť protony jsou zmíněnou přeměnou spotřebovávány (Tylichová et al. 2007; Shelp et al., 1999). Typický je také pokles pH cytosolu v důsledku nedostatku kyslíku, jenž je hlavním stresujícím faktorem zaplavených půd (Kinnarsley & Turano, 2000). V případě mechanického poškození, které bylo studováno u semenáčků hrachu, koreluje nejvyšší koncentrace kyseliny γ -aminobutanové s maximální aktivitou AMADH, čímž tak - při

zmíněné stresové situaci - pravděpodobně i ona zasahuje do syntézy GABA (Petřivalský et al., 2007).

Cyklické formy ABAL a AVAL, tj. Δ^1 -pyrrolin a Δ^1 -piperidein jsou známy také jako meziprodukty tvorby některých rostlinných alkaloidů (Tylichová, et al., 2007). Nedávno bylo zjištěno, že ABAL je výchozí sloučeninou pro syntézu 2-acetyl-1-pyrrolinu (2AP), který je hlavní složkou zodpovědnou za typickou vůni aromatických odrůd rýže jako jsou indická Basmati a jasmínová rýže z Thajska (Bradbury et al., 2008), dále je spolu zodpovědná za aroma jiných potravin - například pšeničného a žitného chleba (Schieberle & Grosch, 1985), zeleného čaje (Kumazawa et al., 2002) aj.

V živočišné říši je GABA významná především jako inhibiční neurotransmitter v centrálním nervovém systému, dále se například účastní při agregaci krevních destiček, akrozomální reakci spermií a také inhibice migrace buněk karcinomu tlustého střeva, čehož snad bude možno v budoucnu využít k potlačení invaze a metastazování různých typů rakoviny (Ortega, 2003).

3 Betainaldehyddehydrogenasa

Betainaldehyddehydrogenasa (BADH, betainaldehyd: NAD⁺ oxidoreduktasa, EC 1.2.1.8), enzym náležící do nadrodiny nefosforylujících ALDH, dostal svůj název díky schopnosti ireverzibilní NAD(P)⁺-dependentní oxidace betainaldehydu na glycinbetain^c. Vhodnými substráty jsou dále TMABAL, APAL, ABAL a v neposlední řadě některé terciální sulfoniové sloučeniny, jakým je i 3-dimethylsulfoniopropionaldehyd, jehož oxidací vzniká osmoprotektant 3-dimethylsulfoniopropionát (Muñoz-Clares et al., 2010; Trossat et al., 1997).

BADH byla purifikována a charakterizována z řady organismů. Z rostlin uveďme BADH špenátu (*Spinacia oleracea* L.) (Pan, 1988), se subcelulární lokalizací majoritního izoenzymu v chloroplastech a minoritního v cytosolu (Weigel et al., 1986). O intracelulární lokalizaci ječmenné BADH, jejíž částečná purifikace byla uskutečněna v roce 2001 (Nakamura et al., 2001), bylo pojednáno v kapitole 2.2. Poslední zde zmíněnou rostlinnou BADH bude BADH z ovsa (*Avena sativa*), jejíž izolovaný homodimerní enzym s molekulovou hmotností podjednotky 61 kDa, byl schopen mimo oxidace BAL, APAL, ABAL katalyzovat přeměnu GBAL (Livingstone et al., 2003).

V případě mikroorganismů nesmíme opomenout bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (detailnější popis v následující kapitole), jejíž PaBADH byla purifikována

^c rovnice syntézy glycinbetainu z betainaldehydu byla uvedena v kapitole 2.4

(Velasco-García et al., 1999) a posléze i krystalizována - za aerobních podmínek v přítomnosti 2-merkaptoetanolu, glycerolu, NADP⁺ a K⁺ iontů (González-Segura et al., 2009).

Z živočichů můžeme vzpomenout purifikaci mitochondriální BADH z krysích jater (Chern & Pietruszko, 1999).

3.1 Betainy

Betainy, deriváty aminokyselin s plně methylovaným atomem dusíku, se řadí mezi tzv. kompatibilní osmolyty (osmoprotektanty), jenž se podílejí v odpovědi organismů při vystavení abiotickému stresu (jako je např. nedostatek vody, zasolení půdy, chlad, působení vysokých teplot aj.). Mezi jejich hlavní úlohy v buňce patří zvyšování cytoplasmatického osmotického tlaku a dále stabilizace některých proteinů a membrán právě v reakci na nepříznivé koncentrace soli - kdy přítomností těchto osmoprotektantů je zabezpečen kontakt povrchu proteinu se solvatační vrstvou vody, vedoucí k zachování přirozené struktury proteinu v důsledku zamezení denaturačního účinku soli (McNeil et al., 1999; Hanson et al., 1985). Jedná se o látky netoxické a to i při zvýšené koncentraci, přičemž za fyziologického pH jsou neutrální (Livingstone et al., 2003).

Některé rostlinné plodiny postrádají schopnost výraznější akumulace betainů nebo jiných osmoprotektantů. Tato skutečnost je důvodem aktuálního zájmu vědců z oblasti genového inženýrství, kdy vložím genu pro syntézu BADH, je možno docílit zvýšené tolerance k suchu, zasolení a jiným stresovým událostem (McNeil et al., 1999). Budeme-li konkrétnější: rýže je rostlinou přirozeně neakumulující glycinbetain, třebaže vlastní geny pro syntézu BADH (BADH1, BADH2), je výsledná exprese tohoto enzymu poměrně nízká (Nakamura et al., 1997), navíc BADH1 má o mnoho vyšší afinitu vůči ABAL ($K_m = 498 \mu\text{M}$) než pro betainaldehyd ($K_m = 3233 \mu\text{M}$) (Bradbury et al., 2008). Transgenní rýže, s genem ječmenné BADH, byla schopna efektivněji přeměňovat vysoké exogenní koncentrace betainaldehydu na glycinbetain, ve srovnání s netransformovanými rostlinami. Ve výsledku vedl nárůst koncentrace glycinbetainu, u takto upravených rostlin, k výraznější toleranci vůči zasolení, chladu a tepelnému stresu (Kishitani et al., 2000). Zasolení půdy patří k hlavním stresujícím faktorům zemědělství - přispívá k němu například nadměrné používání hnojiv (Zhu, 2001). Transgenní mrkev exprimující BADH, je schopna růst i v přítomnosti NaCl o koncentraci vyšší jak 400 mM, což je zatím nejvyšší úroveň tolerance soli u takto geneticky modifikovaných plodin (Kumar et al., 2004).

4 Inhibice AMADH, BADH

Všechny nespecifické savčí ALDH se řadí mezi sulfhydrylové enzymy (Perozich et al., 2000), stejně jako rostlinné BADH (Weretilnyk et al., 1990), mikrobiální ABALDH a GBALDH (Yorifuji et al., 1986) aj. Volná SH- skupina v aktivním místě enzymu je tedy hlavním vodítkem v hledání nových inhibitorů.

Homogenní AMADH izolovaná ze semenáčků hrachu, o níž bylo pojednáno v oddíle 2.1, byla studována také z pohledu inhibice. Silný inhibiční efekt vykazovala sulfhydrylová činidla - 4-chlormerkuribenzoan a *N*-methylmalenimid, atakující cysteinový zbytek v aktivním místě. Slabší inhibice pak byla pozorována u chelatačních činidel (1,10-fenanthrolin, 2,2'-bipyridyl aj.), některých aldehydů (acetaldehyd, acrolein), aminů a aminoalkoholů (tab. 1). Je tedy možno předpokládat, že zmíněný enzym pravděpodobně nevyužívá kovových iontů, jako katalytických kofaktorů - vzhledem k relativně vysoké koncentraci chelatačního činidla a slabého inhibičního efektu. Inhibice enzymu nebyla prokázána v přítomnosti 1,4-diaminobutan-2-onu, aminoguanidinu, 1,3-diaminoacetonu a propan-1,3-diaminu, a to ani při koncentraci 10 mM (Šebela et al., 2000).

Tab. 1: Výsledky spektrofotometrického měření aktivity AMADH po inkubaci s jednotlivými inhibitory. Použitým substrátem byl APAL. Specifická aktivita 105 nKat.mg⁻¹ nativní (neinhibované) AMADH byla brána jako 100% (Šebela et al., 2000).

Inhibitor	Koncentrace (mM)	Reziduální aktivita enzymu (%)
4-Chlormerkuribenzoan	0,1	0
N-Ethylmalenimid	0,1	6
2,2'-Bipyridyl	1,0	45
1,10-Fenanthrolin	1,0	67
Diethyldithiokarbamát sodný	1,0	71
8-Hydroxychinolin	1,0	75
Akrolein	1,0	42
Acetaldehyd	1,0	60
3-Methylbut-2-enal	1,0	53
Arkain	1,0	37
1-Propylamin	1,0	81
2-Aminobutan-1-ol	1,0	85
4-Aminobutan-1-ol	1,0	80

Významné jsou studie zaměřující se na inhibici BADH resp. PaBADH lidského oportunního patogenu *Pseudomonas aeruginosa*. Tato gramnegativní bakterie často napadá pacienty trpící cystickou fibrosou (Zierdt & Williams, 1975), infekcí močových cest (Mittal et al., 2009), dále osoby s oslabenou imunitou, např. nemocí AIDS (Mendelson et al.1994), aj. Její schopnost růst na cholinu jako jediném zdroji uhlíku

a dusíku (Kortstee, 1970) je možno využít při potencionální léčbě. Skutečnost, že infikované tkáně, například plíce, epitelární buňky, epitel rohovky a také močové sliznice, jsou bohaté na choliny, popř. jejich prekurzory - fosfatidylcholin, acetylcholin (Pesin & Candia, 1982; Zaldívar-Machorro et al., 2011), vede k závěru, že inhibicí PaBADH lze docílit akumulace toxického betainaldehydu v bakteriálních buňkách (Sage et al., 1997).

Ireverzibilní inaktivace PaBADH byla, za podmínek *in vitro* a *in situ*, prokázána u metabolitů disulfiram: S-methyl-*N,N*-diethylthiokarbamoylsulfoxidu a S-methyl-*N,N*-diethylthiokarbamoylsulfonu, kdy byl bakteriální růst zastaven. V médiu, neobsahujícím cholin, inhibice těmito látkami nenastala. Zkoumanými sloučeninami byly také disulfiram a S-methyl-*N,N*-diethylthiokarbamoylsulfon, jež výborně inhibovaly v prostředí *in vitro*, narozdíl od *in situ*, kde k inaktivaci nedošlo - pravděpodobnou příčinou byla jejich vysoká reaktivita s méně významnými intracelulárními thioley, což vedlo k jejich vyčerpání (Zaldívar-Machorro et al., 2011).

V případě BADH laskavce červenoklasého (*Amaranthus hypochondriacus*) byla zjišťována inhibice produktem. K jejímu prokázání došlo u NADH, který v přítomnosti NAD⁺ a betainaldehydu, vykazoval inhibici smíšenou. Druhý produkt BADH reakce - glycinbetain, enzym neinhiboval, a to ani při vysoké koncentraci. Při experimentech s použitím AMP jako inhibitoru, za účasti betainaldehydu a NAD⁺, byla inhibice kompetitivní (Valenzuela-Soto & Munoz-Clares, 1993).

BADH izolovaná z *E. coli* byla efektivně inhibována některými aldehydy, obsahujícími ve své struktuře nepolární skupiny - pro příklad uveďme isovaleraldehyd ($K_i = 0,10$ mM), benzaldehyd ($K_i = 0,70$ mM), fenylacetaldehyd ($K_i = 0,53$ mM). Také *N*-methylované sloučeniny, jako jsou *N*-methylglycin ($K_i = 130$ mM), *N*-methylethanolamin ($K_i = 40$ mM) aj., vykazovaly inhibici, která se však projevila v menší míře. Úplná inhibice byla prokázána pro HgCl₂, ZnCl₂ a *p*-chlormerkuribenzoan. Jodacetát a jodoacetamid enzym inaktivovali také, ale oproti výše zmíněným, při daleko vyšší koncentraci (Falkenberg & Strøm, 1990).

Jedním z potencionálních inhibitorů aktivity PsAMADH2 studovaným v této bakalářské práci byl již výše zmiňovaný disulfiram (antabus; bis(diethylkarbamoyl)disulfid), běžně užívaný při léčbě alkoholismu. Ta spočívá v ireverzibilní inhibici mitochondriální aldehyddehydrogenasy jater (ALDH2), kdy požitím alkoholu dochází k akumulaci acetaldehydu, vznikajícího degradací ethanolu. Nastává tzv. disulfiram-ethanolová reakce, která bývá doprovázena nevolností, zvracením, návaly horka, závratí, bolestmi břicha a tachykardií. Principem léčby je tedy

vyvarování se příjmu alkoholických nápojů, vzhledem k následné nežádoucí reakci pro pacienta (Hempel et al., 1984; Fuller et al., 1986).

Při studiu ireverzibilních inhibicí se často setkáváme s grafickým vyjádřením dle Kitz a Wilsona, užívaného k získání kinetických parametrů jako jsou konstanta inaktivace K_i , představující koncentraci požadovanou pro dosažení poloviny maximální inaktivace, dále rychlostní konstanta inaktivace k_{inact} , vyjadřující maximální rychlost inaktivace při saturaci enzymu a $t_{1/2}$, jež je doba potřebná k inaktivaci polovičního množství enzymu v přítomnosti saturační koncentrace inhibitoru (Kitz & Wilson, 1962; Lamplot et al., 2004).

Princip Kitz-Wilsonovy metody vychází z rovnice (rov. 1) popisující ztrátu aktivity enzymu v čase - v níž zkratka $E(0)$ reprezentuje maximální enzymovou aktivitu po preinkubaci v nepřítomnosti inhibitoru a $E(t)$ je maximální aktivita enzymu po preinkubaci s inhibitorem za dobu t . Hodnota k_{app} se nazývá zdánlivá rychlost inaktivace (odpovídá směrnici, získané z primárního grafu inaktivace pseudoprvního řádu, závislosti $\ln(v/v_0) \cdot 100$ na době inaktivace).

rov. 1:
$$\ln\left(\frac{E(t)}{E(0)}\right) = \frac{-k_{inact} \cdot t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} = -k_{app} \cdot t$$

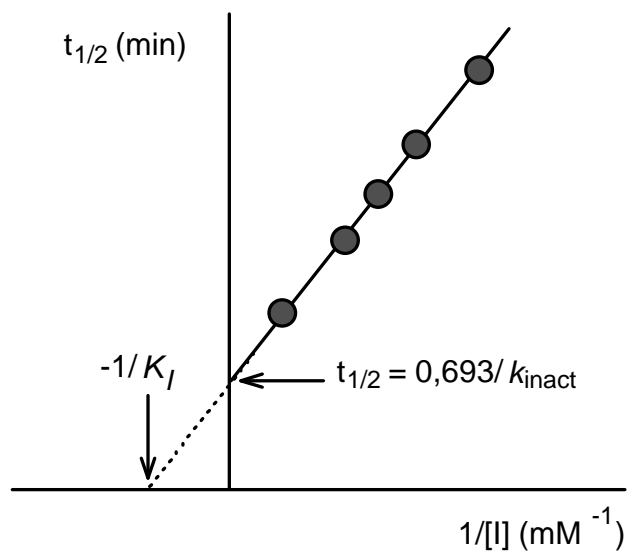
odtud úpravou získáme vztah:

rov. 2:
$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{1}{k_{inact}} + \frac{K_i}{k_{inact} \cdot [I]}$$

Vynesením $1/k_{app}$ v závislosti na $1/[I]$ získáme přímku, jejíž průsečík s osou x je roven $-1/K_i$ a průsečík s osou y představuje $1/k_{inact}$. Sklon přímky je roven K_i/k_{inact} (Maurer & Fung, 2000; Kitz & Wilson, 1962). Hodnotu $t_{1/2}$ pak určíme z následující rovnice (rov.3):

rov. 3:
$$t_{1/2} = (\ln 100 - \ln 50) / k_{inact}$$

Vynést lze také závislost $t_{1/2}$ na $1/[I]$, hodnotu K_i a k_{inact} pak odečteme způsobem znázorněným na obr. 6 (Purich & Allison, 2000)



Obr. 6: Kitz-Wilsonovo vynesení. Znáornění závislosti $t_{1/2}$ na reciproké koncentraci inhibitoru převzato z Purich & Allison, 2000.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Materiál a metody

5.1 Biologický materiál

V této bakalářské práci byla použita transformovaná bakteriální kultura *Escherichia coli* (BL21 Star) s expresním vektorem pET28b. Baktérie byly namnoženy kultivací a sklizeny centrifugací. V této formě byly získány od Mgr. Jana Frömmela.

5.2 Chemikálie

1-Amino-3,3-dietoxypropan (Sigma-Aldrich Chemie, Německo); acetonitril (Sigma-Aldrich Chemie, Německo); akrylamid (Bio-Rad, USA); B-PER - tj. Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, USA); Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad, USA); dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo); DNAsa (Top-Bio, Česká republika); ethanol (Lach-Ner, Česká republika); fenylmethylsulfonylfluorid - tj. PMSF (Sigma-Aldrich Chemie, Německo); glycerol (Lach-Ner, Česká republika); hovězí trypsin (MP Biomedicals, USA); hydrogenuhličitan amonný (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo); chlorid hořečnatý (Lachema, Česká republika); chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika); chromatografický sorbent IDA-Sepharose (Sigma-Aldrich Chemie, Německo); imidazol (značka Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo); jodacetamid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo); kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (Bruker Daltonik, Německo); kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika); L-cystein hydrochlorid (Lachema, Česká republika); Laemmliho vzorkový pufr (Sigma-Aldrich Chemie, Německo); lysozym (značka: Fluka analytical, dodala firma Sigma-Aldrich Chemie, Německo); *N,N*-methylenbisakrylamid (Bio-Rad, USA); *N,N,N,N*-tetramethylethylendiamin (Bio-Rad, USA); nikotinamidadenindinukleotid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo); persíran amonný (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo); proteinový standard pro SDS-PAGE (Bio-Rad, USA); RNAsa (Fermentas, Litva), tetraethylthiuramdisulfid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo); tetramethylthiuramdisulfid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), tris(hydroxymethyl)aminomethan - tj. Tris (MP Biomedicals, Francie).

5.3 Přístroje

Analytické váhy (Sartorius, Německo); centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); elektroforetická komůrka (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); inkubátor (Inkubat 85, Německo); MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, Německo); MALDI terčik AnchorChip 600/96 (Bruker Daltonik GmbH, Německo); magnetická míchačka (IKA, Německo); spektrofotometr Beckman DU 7500 (Beckman Coulter, USA); spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu, USA); termostat (Grant, UK); třepačka VXR basic (IKA, Německo); ultrafiltrační zařízení Amicon (Millipore, USA); vortex (Stuart, UK); vodní lázeň (Grant, UK); zařízení pro afinitní nízkotlakou kapalinovou chromatografii: peristaltická pumpa P3 (GE Healthcare, UK), kolona Co-(II)-IDA-sepharose, řídicí jednotka a detektor UV1 (GE Healthcare, UK), sběrač frakcí SC 100 (Beckman Coulter, USA), dvoukanálový zapisovač Recorder 2210 (LKB Bromma, Kanada).

5.4 Izolace enzymu PsAMADH2

Byla provedena lýze buněk výše uvedené bakteriální kultury *E. coli*. K rozmrazenému peletu získanému centrifugací bylo napipetováno 2,50 ml resuspendujícího pufru o složení: 1,25 ml 400 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 μ l 400 mM $MgCl_2$, 150 μ l inhibitoru proteas (fenylmethylsulfonylfluorid 50 mM v ethanolu) a 850 μ l deionizované H_2O . Po promíchání na vibrační třepačce bylo k suspenzi přidáno 2,50 ml extrakčního činidla B-PER (Bacterial Protein Extraction Reagent). Obdobným způsobem byla směs protřepána a ponechána 10 minut stát při pokojové teplotě. Po přidání 0,3 ml lysozymu (50 mg/ml), inkubaci 30-60 min, došlo ke zgelovatění vzorku. Do této soustavy bylo napipetováno 5 ml deionizované vody, 20 μ l RNAsy (10 μ g/ml) a 10 μ l DNAsy1 (10 IU/ μ l), následovalo promíchání (5x obrácením zkumavky). Dalším krokem byla inkubace vzorku a to 30 minut při 37 $^{\circ}C$. Poté bylo přidáno 1,25 ml 1 M NaCl a 1,37 ml 50 % glycerolu. Centrifugace byla provedena v Nalgene kyvetách - 30 minut, při 12 000 g a 10 $^{\circ}C$. Supernatant byl přenesen do nové uzavíratelné zkumavky, zmrazen a další den podroben purifikaci pomocí afinitní chromatografie.

Pro afinitní chromatografii byla použita kolona naplněná Co(II)-IDA-Sepharosou (2,5 x 10 cm). Po ekvilibraci ekvilibračním pufrům (obsahujícím 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol a 5% (v/v) glycerol) byl na kolonu nanesen vzorek. Dalším promýváním tímto pufrům došlo k odstranění balastních proteinů. Následně byl zachycený protein vymyt elučním pufrům o stejném složení avšak s navýšenou

koncentrací imidazolu 250 mM. Rozsah detektoru: Abs 0,05; nastavení zapisovače: 0,1 V, průtok při nanášení byl 1-1,5 ml/min, pro eluci 1,5-2 ml/min.

V dalším kroku došlo k zahuštění eluátu ultrafiltrací na ledové lázni v komůrce Amicon 8200 (Millipore, USA) s aplikací pozitivního tlaku inertního plynu - dusíku, 1 bar. Po zredukování objemu bylo ke vzorku přidáno 50 ml pufru o složení 20 mM Tris-HCl pH 8.0 s obsahem glycerolu 3 %. Opakováním tohoto kroku došlo k odsolení vzorku, následně byla směs rozpipetována a zamrazena (Tylichová et al., 2008).

5.5 Kinetická měření

Princip níže uvedených kinetických měření spočívá v detekci redukováného koenzymu NADH, vzniklého přeměnou NAD^+ v přítomnosti substrátu APAL za katalytického účinku enzymu PsAMADH2. Stanovení byla prováděna spektrofotometricky na přístroji Beckman DU 7500 při vlnové délce 340 nm (Šebela et al., 2000).

5.5.1 Stanovení aktivity PsAMADH2

Fotometrické stanovení katalytické aktivity enzymu je založeno na skutečnosti, že změna koncentrace substrátu či produktu reakce za jednotku času je přímo úměrná změně absorbance za stejný časový interval (Vodrážka et al., 1991). Jestliže není produkt ani reaktant schopen absorpce ve viditelné nebo ultrafialové oblasti spektra je nutné využít nepřímých metod.

Vztah absorbance a koncentrace stanovované látky je definován Lambert-Beerovým zákonem (rov. 4), kde A - je absorbance, ε - molární absorpční koeficient (pro NADH = $6220 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a d - tloušťka absorbující vrstvy (cm).

rov. 4:
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Vzorec pro výpočet aktivity enzymu (v kataltech) získáme úpravou výše uvedeného vztahu. Jeden kat je charakterizován jako množství enzymu, katalyzující přeměnu jednoho molu substrátu za vteřinu.

rov. 5:
$$a[\text{kat}] = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\varepsilon \cdot l}$$

Měření enzymové aktivity bylo prováděno za laboratorní teploty 21-23 °C. Reakční směs obsahovala 1850 μl 0,1622 M^d Tris-HCl pufru (pH 9.0), jehož teplota byla vytemperována na 25 °C, dále 30 μl deionizované vody, 50 μl 20 mM NAD^+

^d koncentrace použitá pro dosažení 0,15 M konc. Tris-HCl v kyvetě

a 20 μl 10x ředěného enzymu PsAMADH2 o původní koncentraci 3,4 mg/ml. Po vynulování přístroje byl do systému přidán substrát APAL o objemu 50 μl a koncentraci 100 mM čímž byla nastartována reakce (uvedený aldehyd byl získán z diacetalu 1-amino-3,3-dietoxypropanu, který byl podroben kyselé hydrolyze v prostředí 0,4 M HCl). Měření probíhalo za stálého míchání s detekcí po 6 sekundových intervalech po dobu 3 minut.

5.5.2 Experimentální určení K_m a V_{lim}

Michaelisova konstanta (K_m), definovaná jako konstanta poloviční saturace, vyjadřuje koncentraci substrátu, při níž je rychlost enzymové reakce rovna polovině rychlosti limitní (V_{lim}). Zároveň ji považujeme za míru afinity enzymu vůči substrátu - čím vyšší je hodnota K_m , tím nižší je schopnost substrátu vázat se do aktivního místa enzymu (Macholán, 1979).

Měření bylo prováděno obdobným způsobem - za laboratorní teploty, kdy k 1850 μl Tris-HCl pufru (pH 9.0) s výslednou koncentrací 0,15 M v kyvetě a s teplotou vytemperovanou na 25 °C, bylo přidáno 10 μl výše uvedeného 50x ředěného enzymu, 40 μl deionizované vody a 50 μl 20 mM NAD^+ , následovalo vynulování přístroje a přidavek substrátu APAL vždy 50 μl v rozsahu výsledných koncentrací 2,5-500 μM . Měření probíhalo za stálého míchání s detekcí po 6 sec intervalech po dobu 3 minut.

5.5.3 Časová inaktivace enzymu

Pro tuto bakalářskou práci byly za potencionální inhibitory enzymu PsAMADH2 vybrány následující sloučeniny: tetramethylthiuramdisulfid (TMTDS) a tetraethylthiuramdisulfid (TETDS).

Rozpouštědlem byl v případě TMTDS 96% (v/v) ethanol; TETDS byl z důvodu precipitace inhibitoru rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO).

Byla připravena reakční směs pro sérii měření s danou koncentrací inhibitoru, ze které byl, v průběhu inkubace při 25 °C po zvolených časových intervalech, odebírán alikvotní podíl, dále podrobený spektrofotometrickému stanovení.

Pro jedno měření se inkubační směs sestávala: z 1850 μl 0,1622 M pufru Tris-HCl pH 9.0 (při práci s TETDS bylo do pufru z důvodu již zmíněné precipitace přidáno DMSO 2% (v/v)), 20 μl 10x ředěného enzymu, 30 μl inhibitoru v rozsahu koncentrací v kyvetě 0-150 μM , kdy v případě kontroly byla použita deionizovaná voda a 1 μl 20 mM NAD^+ (z důvodu tepelné nestability enzymu). Po inkubaci bylo do kyvety přidáno 49 μl 20 mM NAD^+ , následovalo vynulování spektrofotometru. Reakce byla nastartována 50 μl substrátu o konc. 100 mM.

5.5.4 Stanovení rozdělovacího poměru („partition ratio“)

Rozdělovací poměr (r) vyjadřuje počet molekul inhibitoru, jenž je potřebný k inaktivaci jedné molekuly enzymu. Určíme jej z grafického vyjádření reziduální aktivity enzymu v závislosti na poměru koncentrací [inhibitor]/[enzym]. Číslo odečtené z průsečíku osy x přímkou, získanou proložením vhodných hodnot grafu (před zakřivením), je rovno $r+1$ (Kent et al., 1999).

Směsi obsahující vhodně zvolené koncentrace inhibitoru (rozsah v kyvetě: TETDS 0-60 μM a TMTDS 0-150 μM) byly inkubovány při 25 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut v případě TMTDS, či 90 minut u TETDS. Následně došlo k spektrofotometrickému proměření směsi (množství reagensů je shodné s oddílem 5.5.3).

5.5.5 Ireverzibilita inhibice

Inhibitory jsou látky snižující rychlost enzymové reakce, jinými slovy zapříčiňují pokles enzymové aktivity. Na základě pevnosti vazby vůči enzymu je možné je zařadit do dvou skupin - ireverzibilní a reverzibilní. V případě reverzibilních inhibic lze aktivitu enzymu obnovit např. zvýšením koncentrace substrátu, dialýzou apod. Ireverzibilní inhibitory (inaktivátory) naopak blokují aktivitu enzymu nevratně, tvorbou pevného komplexu enzym - inhibitor (Macholán, 1979).

Směs v mikrozkuhavce se skládala z 200 μl 10x ředěného enzymu, 700 μl 0,1622 M pufru Tris-HCl (pH 9.0), 50 μl 10 mM inhibitoru a 50 μl 20 mM NAD^+ . Po dvouhodinové inkubaci (25 $^{\circ}\text{C}$) byla tato soustava po drobená dialýze, v prostředí pufru Tris-HCl (pH 8.0) s 3% přidavkem glycerolu, do dalšího dne. Následné spektrofotometrické měření bylo provedeno se 100 μl dialyzační směsi (toto množství odpovídalo koncentraci enzymu v kyvetě, s níž bylo pracováno ve výše uvedených případech), k níž bylo dále přidáno 1800 μl 0,1622 M pufru Tris-HCl (pH 9.0) a 50 μl 20 mM NAD^+ . Po vynulování přístroje byla reakce iniciována přidavkem 50 μl 100 mM substrátu APAL.

5.6 Určení koncentrace enzymu

Koncentrace PsAMADH2 byla stanovena na přístroji BioSpec-nano (Shimadzu). Tento spektrofotometr pracuje s extrémně nízkými objemy vzorků (1-2 μl) v rozsahu vlnových délek (220-800 nm).

Pomocí Edelhochovy metody byl, ze znalosti aminokyselinové sekvence proteinu, spočten extinkční koeficient ($\epsilon_{280} = 1,823 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^e, jehož hodnota je potřebná pro samotné stanovení. Po vynulování spektrofotometru byl enzym (10x ředěný) v objemu 2 μl nanesen na čočku přístroje (optická dráha pro toto množství byla 7 mm) a proměřen při vlnové délce 280 nm.

5.7 SDS-PAGE

Jedná se o elektroforetickou separační techniku, jejíž princip spočívá v rozdílné rychlosti migrace částic v elektrickém poli. Přítomností detergentu, dodecylsulfátu sodného (SDS), získávají částice uniformní náboj - jejich pohyblivost tak závisí zejména na velikosti, resp. molekulové hmotnosti.

Vzorek tvořený 20 μl 10x ředěného enzymu, 1 μl NAD^+ a 30 μl inhibitoru (TETDS; TMTDS o vhodné koncentraci určené z rozdělovacího poměru r), popř. 30 μl deionizované vody (kontrola) byl, po dvouhodinové inkubaci při 25 $^{\circ}\text{C}$, smísen se stejným objemem Leammliho vzorkového pufru (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) Směs byla poté promíchána a následně podrobena pěti minutové tepelné denaturaci při 100 $^{\circ}\text{C}$.

Každý z těchto vzorků byl dále rozdělen na dva podíly o objemu 50 μl . K první části bylo přidáno 15 μl 1 M jodacetamidu, do druhé byl napipetován stejný objem deionizované vody. Po půlhodinové inkubaci v temnu byly tyto vzorky podrobeny SDS PAGE.

Složení zaostřovacího i dělicího gelu je uvedeno v tabulce č. 2. Mezi skleněné desky v nalévací kazetě byl napipetován dělicí gel, jenž byl následně převrstven *n*-butanolem. Ten byl po 30-ti minutové polymeraci odstraněn. Poté byl nanesen pás zaostřovacího gelu, zasunut hřebínek a soustava byla opět ponechána cca 30 minut stát. Po přenesení do elektroforetické komůrky, zalití elektrodoým puftrem (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % SDS, pH 8.3) bylo do vzniklých jamek napipetováno po 18 μl výše uvedených vzorků a vhodné množství standardu. Komůrka byla připojena ke zdroji elektrického napětí. Po dokončení elektroforézy byly pásy vizualizovány ponořením do barvicího roztoku „standard staining coomassie brilliant blue R-250“ přes noc, odbarvování se uskutečnilo v roztoku „standard destaining“ obsahujícím 7 % octanu a 5 % methanolu.

^e hodnota je uvedena pro dimer

Tab. 2: Složení zaostřovacího a dělicího gelu

Složky	Zaostřovací gel (4%)	Dělicí gel (12%)
	[ml]	[ml]
AA/BIS (30%/8%)	0,65	4,00
0,5 M Tris HCl (pH 6.8)	1,25	-
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	-	2,50
deionizovaná voda	2,95	3,20
SDS (10%)	0,10	0,10
APS (10%)	0,06	0,05
TEMED	0,01	0,01

5.8 MALDI TOF

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (laserová desorpční ionizace za účasti matrice v kombinaci s průletovým analyzátozem) je metodou hojně využívanou např. k separaci biomakromolekul. Jejím principem je nepřímá ionizace vzorku pomocí matrice, kdy vzniklé ionty jsou analyzovány na základě doby letu v závislosti na poměru hmoty a náboje (m/z). Tato technika je dále vhodná k identifikaci proteinů, pro studium interakcí (např. vazba inhibitor-enzym), různých modifikací atd.

Po provedení SDS-PAGE byly vzorky z gelu vyříznuty a nakrájeny na kostičky (velikosti cca 1x1 mm) v mikrozkuhavce. Odbarvení gelových kousků proběhlo ve směsi 100 mM NH_4HCO_3 :acetonitril 1:1 (v/v) s inkubační dobou 45 min. Poté byl modrý roztok odpipetován. Následně byla provedena redukce a alkylace. Po promytí deionizovanou vodou byl do mikrozkuhavky přidán acetonitril - zhruba v trojnásobném nadbytku vůči gelu, ten byl po 15 minutách důkladně odstraněn. Dále byl přidán 10 mM dithiotreitol/0,1M NH_4HCO_3 , v množství dostačujícím na pokrytí gelu. Po 30ti minutové inkubaci při 56 °C byla tekutina odpipetována. Opět byl do soustavy vnesen acetonitril - po jeho odstranění následoval přidavek roztoku 55 mM jodacetamid/0,1M NH_4HCO_3 . Tato směs byla dále 20 min inkubována v temnu při pokojové teplotě. Po odstranění roztoku bylo, na dobu 15 min, přidáno 200 μl 0,1M NH_4HCO_3 - následovalo odstranění tekutiny, přidavek acetonitrilu a nakonec vysušení.

Dalším krokem bylo trypsinové štěpení, uskutečněné vnesením směsi o složení 50 mM NH_4HCO_3 , 5 mM CaCl_2 a 12,5 ng/ μl trypsinu s inkubací při 4 °C po 30-45 min. Po jeho odstranění následoval přidavek 5-25 μl výše uvedené směsi avšak bez obsahu trypsinu. Inkubace při 37 °C přes noc.

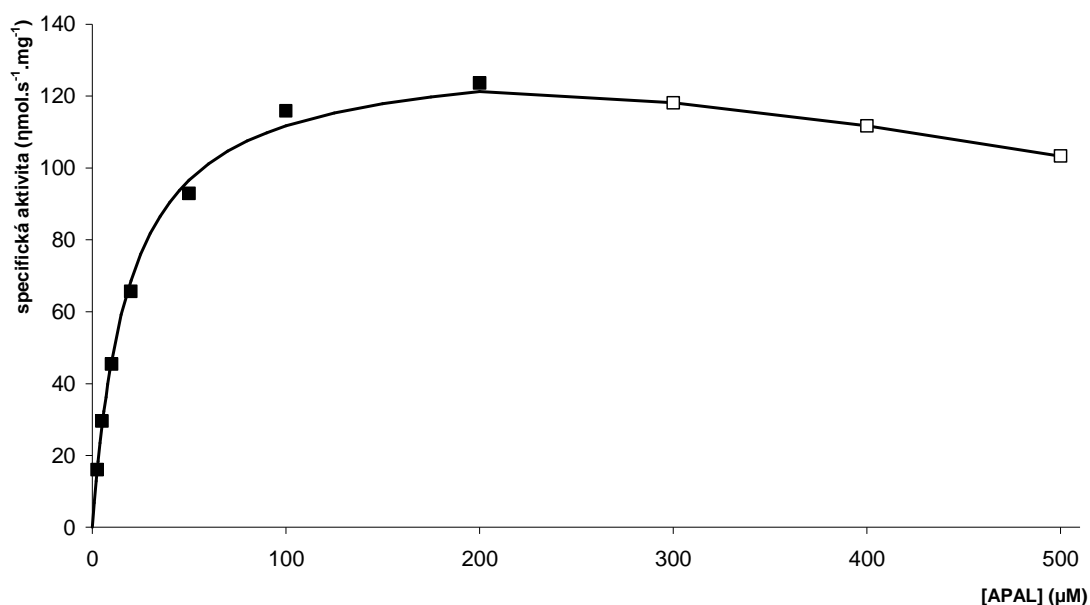
MALDI-TOF analýza byla provedena na přístroji Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, Německo) s dusíkovým laserem (337 nm). Na MALDI terčik byla nanášena směs: 0,6 μl matrice α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny (5 mg/ml ve směsi

acetonitril:2,5% kyselina trifluoroctová, 2:1, v/v) a stejný objem vzorku digestu. Po vysušení, kalibraci spektrometru, následovala pulsní ionizace laserem o vhodné intenzitě. Získaná spektra byla vyhodnocena na softwaru FlexAnalysis 3.0 a Biotools 3.2 (Bruker Daltonics), porovnána s internetovou databází NCBI pomocí programu PeptideMass (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>) a také Mascot (Matrix Science, London, UK) a vyhodnocena.

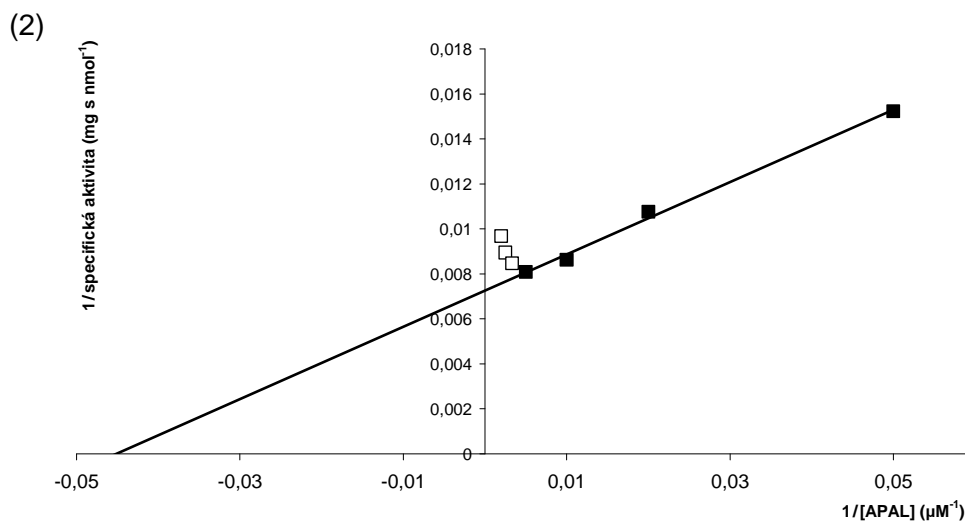
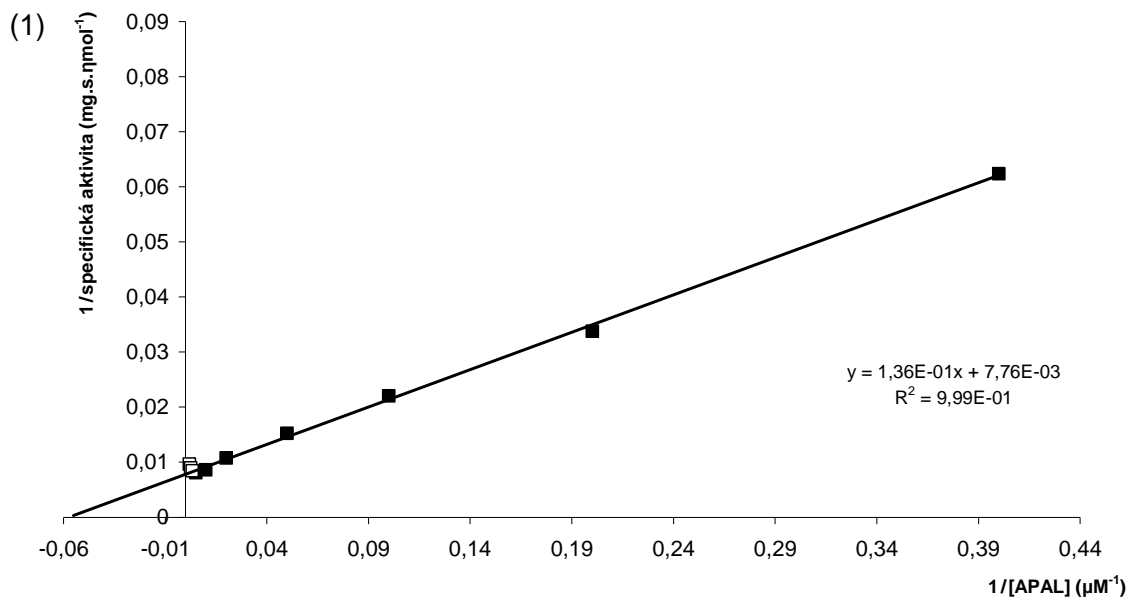
6 Výsledky a diskuze

6.1 Stanovení kinetických parametrů enzymu PsAMADH2

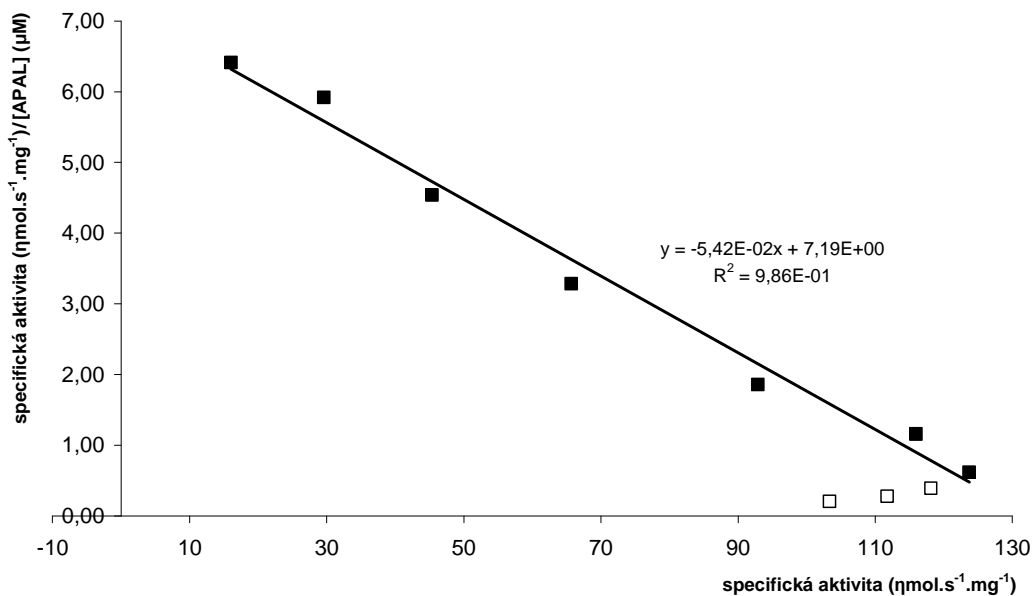
Pro stanovení Michaelisovy konstanty a limitní rychlosti k základní charakterizaci izolovaného enzymu byl použit přirozený substrát APAL v rozsahu koncentrací v květi 2,5-500 μM . Výsledky byly graficky vyhodnoceny dle Michaelise a Mentenové (saturační křivka), Lineweavera-Burka, Eadie-Scatcharda, Hanese-Woolfa s následným porovnáním získaných hodnot v tabulce 3.



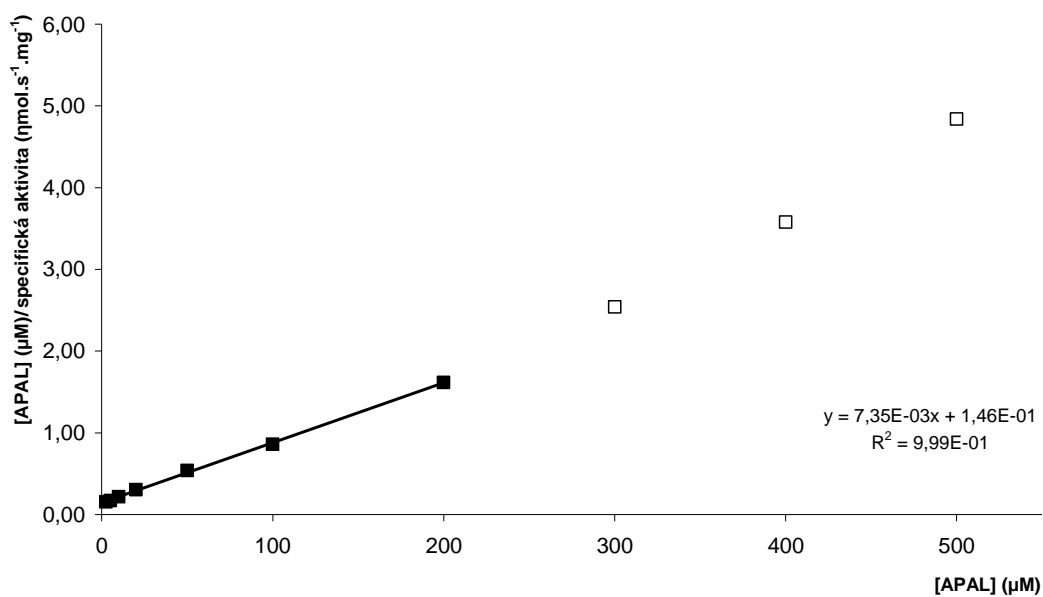
Obr. 7: Graf Michaelise a Mentenové. Znárodnění závislosti specifické aktivity enzymu ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) na koncentraci substrátu (μM). Bílé čtverce poukazují na inhibici enzymu substrátem, týkající se rozsahu koncentrací 300-500 μM .



Obr. 8: Vynesení dle Lineweavera-Burka (1; 2). Závislost reciproké specifické aktivity na reciproké koncentraci substrátu. V detailu (2) patrné zakřivení v důsledku inhibice substrátem (bílé čtverce).



Obr. 9: Eadie-Scatchardovo vynesení. Závislost podílu specifické aktivity a koncentrace substrátu na specifické aktivitě.



Obr. 10: Grafické vyjádření dle Hanese–Woolfa, znázorňující závislost podílu konc. substrátu a specifické aktivity na koncentraci substrátu.

Tab. 3: Srovnání hodnot K_m a V_{lim} získaných z výše uvedených grafů

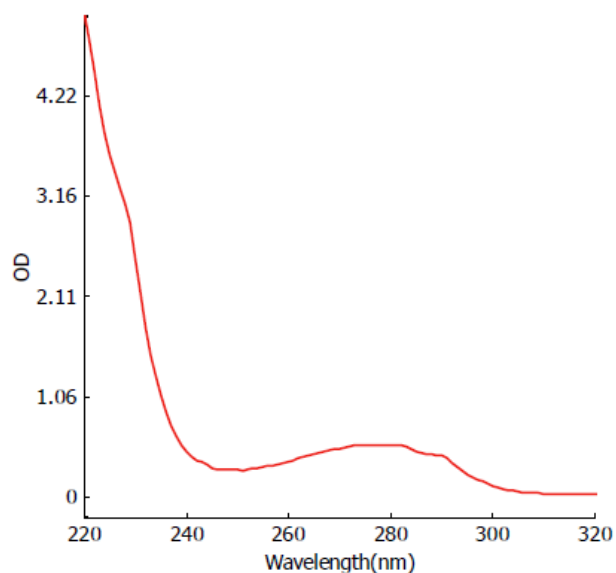
Typ vynesení	K_m (μM)	V_{lim} ($\eta\text{mol.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)
Lineweaver-Burk	17,5	128,9
Eadie-Scatchard	18,5	132,7
Hanes-Woolf	19,9	136,1
průměr	18,6	132,6
Tylichová et al., 2010	10	190

Michaelisova konstanta získána z průměru experimentálních dat byla rovna 18,6 μM , limitní rychlost vztažená na hmotnostní jednotku byla stanovena jako 132,6 $\eta\text{mol.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Data řádově odpovídají výsledkům, publikovaným v článku Tylichová et al. (2010), (pro 20 °C). Rozdíl je dán mírně odlišnými podmínkami měření (teplota) a také byl k dispozici jiný enzymový preparát.

6.2 Stanovení koncentrace enzymu

Koncentrace PsAMADH2 byla stanovena spektrofotometricky na přístroji BioSpec-nano (Shimadzu), její hodnota činila 3,4 mg.ml^{-1} . Naměřené spektrum enzymu, v rozsahu vlnových délek 220-320 nm, je uvedeno na obr. 11.

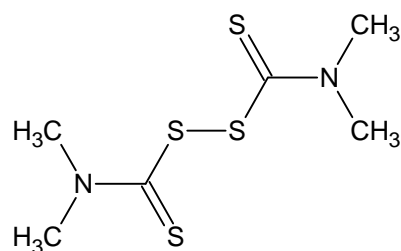
Extinkční koeficient pro dimerní protein ($\epsilon_{280} = 1,823.10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) byl určen pomocí Edelhochovy metody.



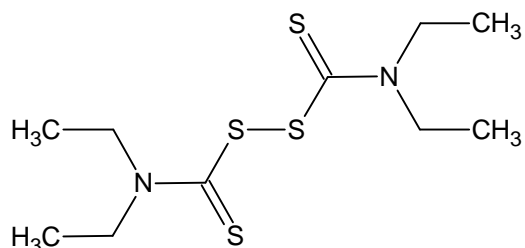
Obr. 11: Spektrum PsAMADH2. Závislost absorpance na vlnové délce (měřeno s 10x ředěným enzymem).

6.3 Inaktivace PsAMADH2

V této bakalářské práci byly za potencionální inhibitory PsAMADH2 zvoleny následující sloučeniny:



TMTDS, tetramethylthiuramdisulfid



TETDS, tetraethylthiuramdisulfid

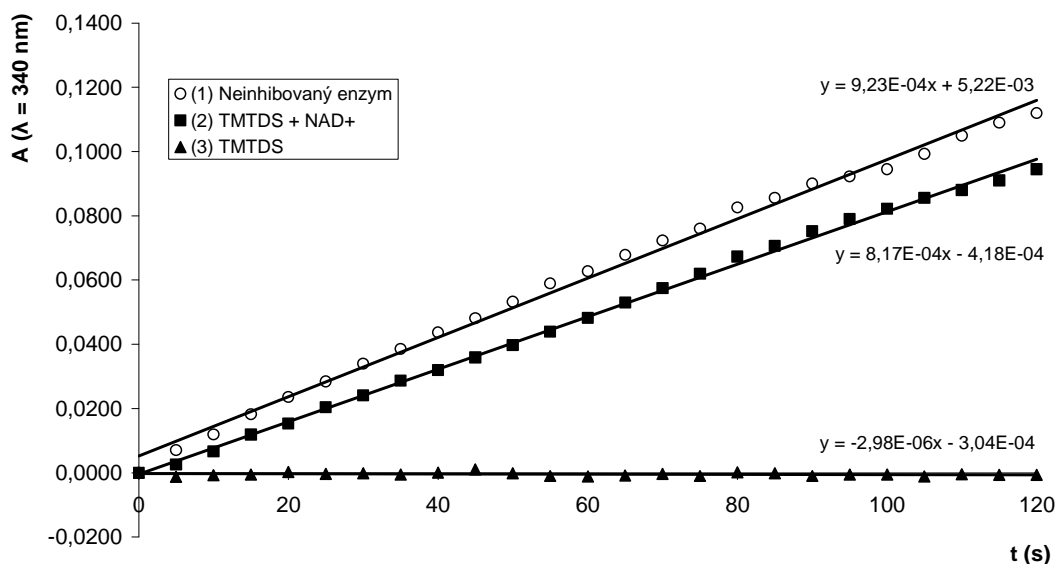
TETDS byl vybrán cíleně, vzhledem k prokázané časové inaktivaci příbuzných BADH, izolovaných z organismů *Amaranthus hypochondriacus* a *Pseudomonas aeruginosa* (Velasco-García et al., 2003). TMTDS byl zvolen na základě analogické struktury.

Výsledky inhibičních měření obou sloučenin byly graficky vyhodnoceny znázorněním inhibice pseudoprvního řádu, Kitz-Wilsonovým vyjádřením a stanovením rozdělovacího poměru. Z nich získané hodnoty (K_i , k_{inact} , $t_{1/2}$ a r) byly porovnány v tab. 4. Ireverzibilita reakce mezi inhibitorem a enzymem byla potvrzena experimentem popsáním v kapitole 6.4.

6.3.1 Úprava podmínek měření

Jak je patrné z obr. 12, přítomnost NAD^+ přímo v inkubační směsi vedla ke znatelnému snížení vlivu TMTDS na aktivitu enzymu. Navázaný koenzym tak pravděpodobně stéricky brání vstupu inhibitoru do aktivního místa.

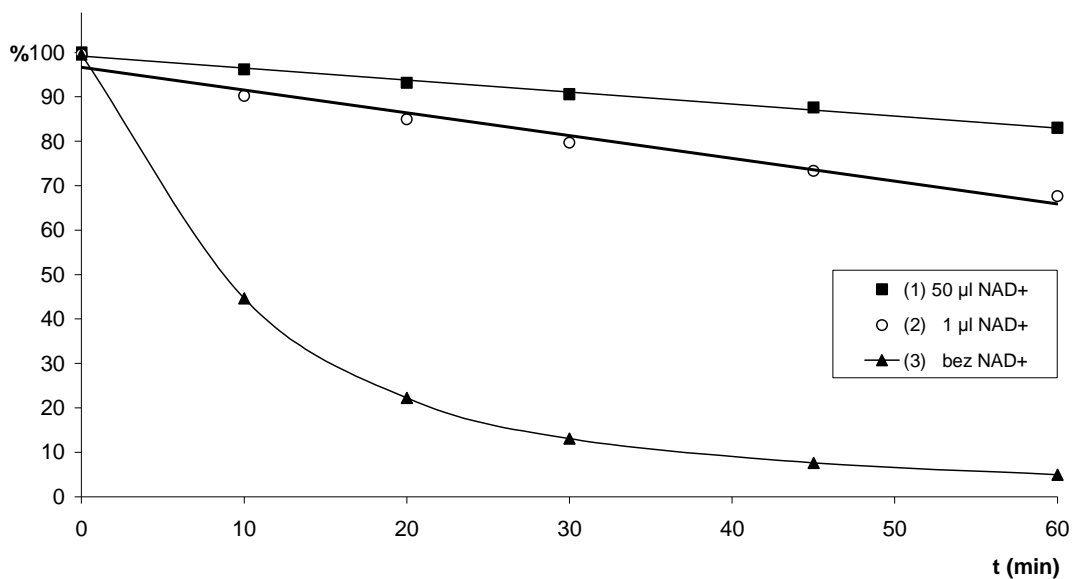
Není bez zajímavosti, že v případě BADH byla inaktivace TETDS v přítomnosti NAD(P)^+ rychlejší, než bez koenzymu (Velasco-García et al., 2003).



Obr. 12: Srovnání spektrofotometricky získaných dat po 5 minutové inkubaci při teplotě 25 °C. V závislosti na typu inkubační směsi bylo do soustavy obsahující pufr, enzym a vodu (inhibitor) přidáváno 50 μl 20 mM NAD^+ , a to buďto před (2) nebo po (1,3) pětiminutové inkubaci. Reakce byla posléze zahájena přidavkem substrátu. Konečná koncentrace NAD^+ v objemu 2 ml (po přidavku všech reagentů) byla 0,5 mM a inhibitoru 100 μM .

V průběhu měření inaktivace v čase však bylo zjištěno, že PsAMADH2 je bez přítomnosti koenzymu tepelně nestabilní, tj. docházelo k výrazné ztrátě enzymové aktivity (obr. 13). Bylo proto nutné zvolit takovou koncentraci NAD^+ , při níž byl enzym ještě dostatečně stabilní, ale zároveň nebylo bráněno v působení inhibitoru.

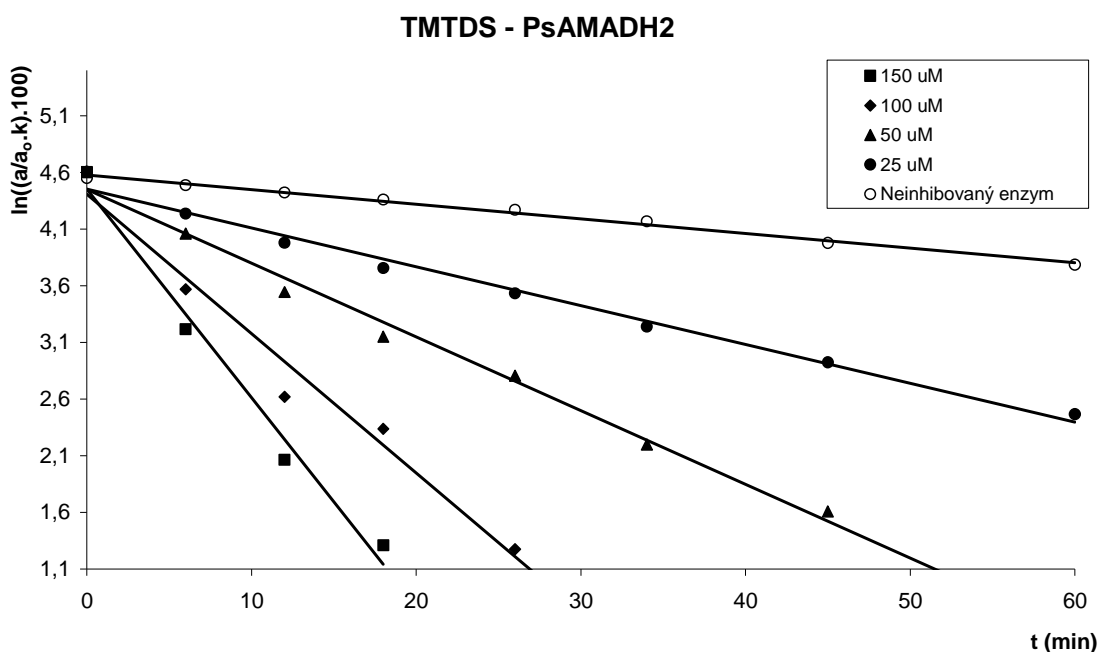
Za vhodné množství NAD^+ v inkubační směsi byla určena koncentrace 10,5 μM , což představuje 1 μl 20 mM NAD^+ v celkovém objemu soustavy 1901 μl . Zbývající objem NAD^+ (49 μl) byl spolu se substrátem (50 μl) dopipetován po inkubaci. Celková koncentrace NAD^+ tedy stejně jako u předchozích měření činila 0,5 mM.



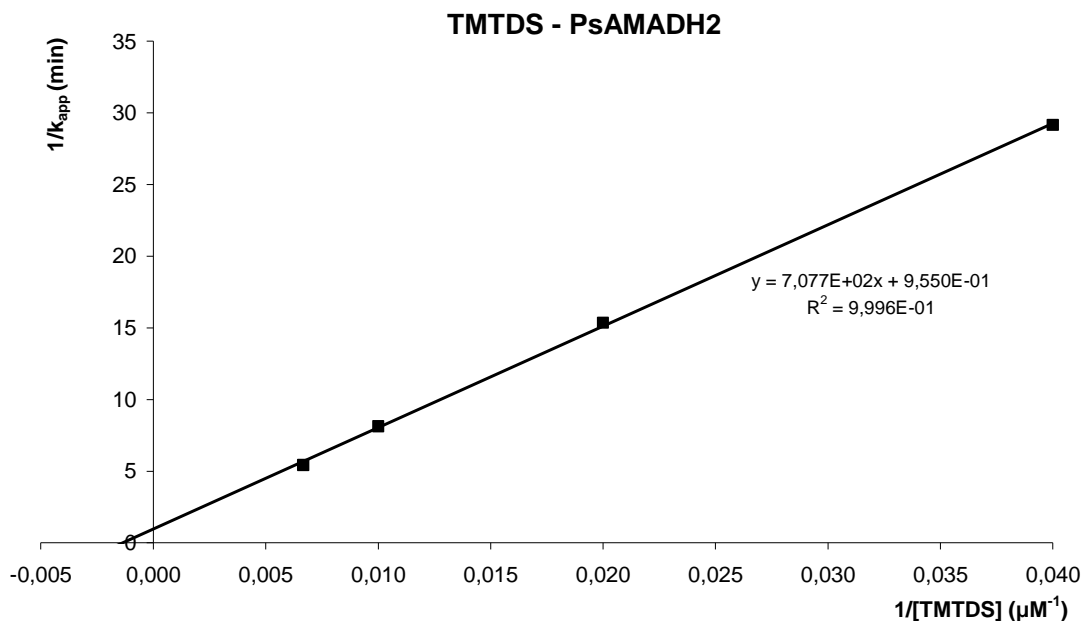
Obr. 13: Ztráta enzymové aktivity v čase (0, 10, 20, 30, 45, 60 min), inkubace při 25 °C. Pufr, enzym a voda byly inkubovány v přítomnosti (1) 50 µl 20 mM NAD⁺, (2) 1 µl 20 mM NAD⁺, kdy přidavek druhého podílu koenzymu (49 µl) byl uskutečněn po inkubaci, (3) inkubační směs neobsahovala NAD⁺, celý objem byl dodán těsně před spektrofotometrickým měřením. Konečná koncentrace NAD⁺ v objemu 2 ml (po přidavku všech reagensů) byla vždy 0,5 mM.

6.3.2 Inaktivace PsAMADH2 pomocí TMTDS

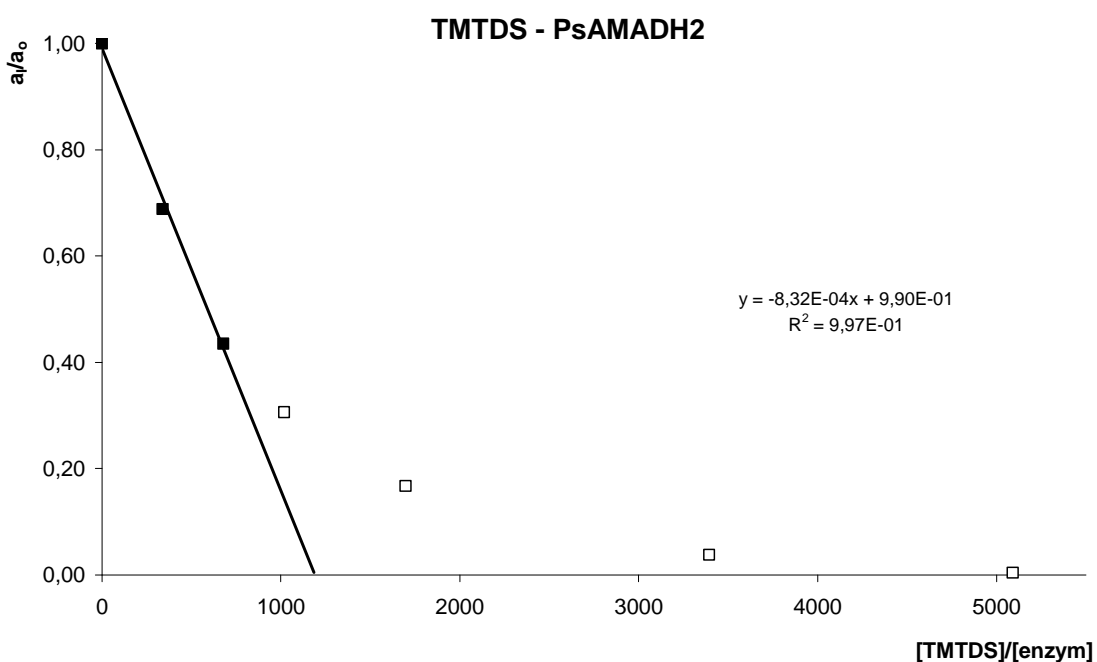
Oba inhibitory byly velmi špatně rozpustné ve vodném prostředí, jako rozpouštědlo byl proto v případě TMTDS volen 96% (v/v) ethanol.



Obr. 14: Časová inaktivace pseudoprvního řádu. Závislost podílu přirozeného logaritmu aktivit inhibovaného (a) a neinhibovaného enzymu (a_0) na době inkubace (při 25 °C). Hodnota k je korekcí na inhibitorem neovlivněný samovolný pokles aktivity enzymu. Určíme ji z podílu aktivity neinhibovaného enzymu v čase t a aktivity neinhib. enzymu na počátku měření. Rozsah koncentrací TMTDS byl 0-150 μM ; doba inkubace až 60 min (měřeno po 0, 6, 12, 18, 26, 34, 45, 60 min).



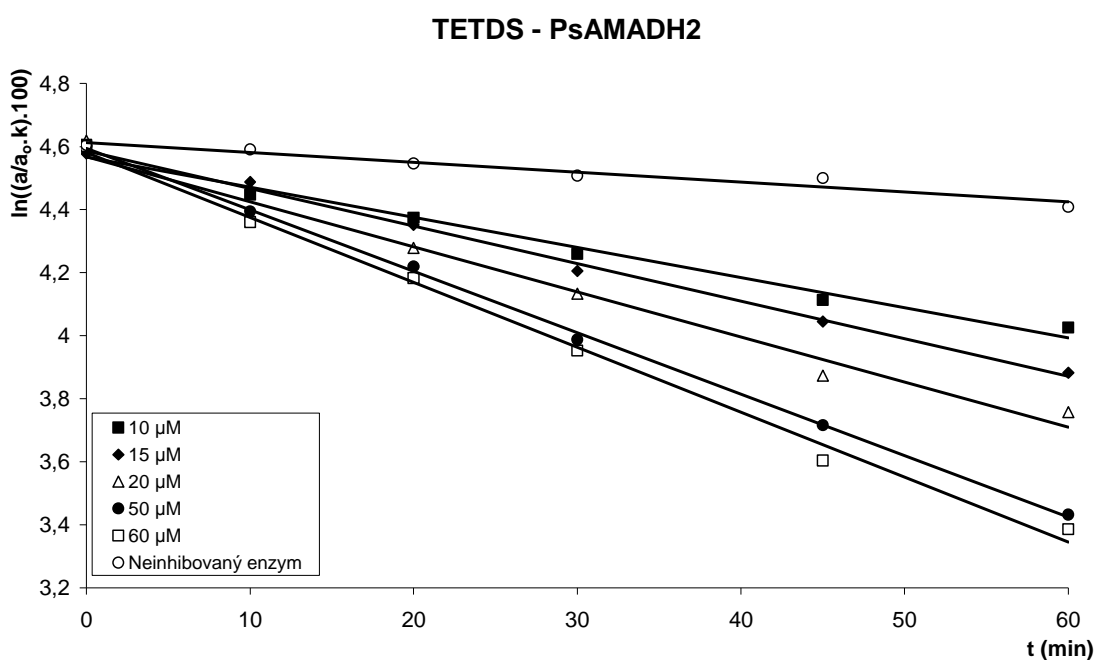
Obr. 15: Kitz-Wilsonovo vynesení. Závislost $1/k_{app}$ (hodnoty k_{app} získáme ze směrnice primárního grafu pseudoprvního řádu) na reciproké hodnotě koncentrace inhibitoru.



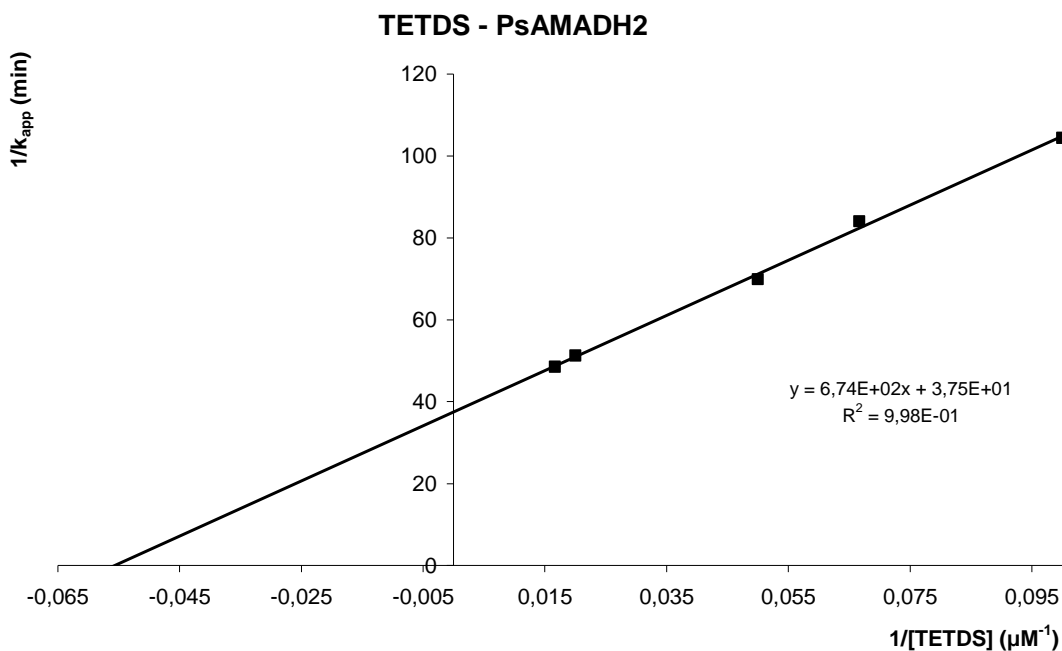
Obr. 16: Grafické vyjádření pro stanovení rozdělovacího poměru. Podíl zbytkové (a) a počáteční aktivity enzymu (a_0) v závislosti na podílu koncentrací inhibitoru a enzymu. Měření proběhlo po 30ti minutách inkubace, při 25 °C. Koncentrace inhibitoru ve výsledných směsích byla 0, 10, 20, 30, 50, 100 a 150 μM ; konečná koncentrace enzymu se rovnala $2,95 \cdot 10^{-8}$ M.

6.3.3 Inaktivace PsAMADH2 pomocí TETDS

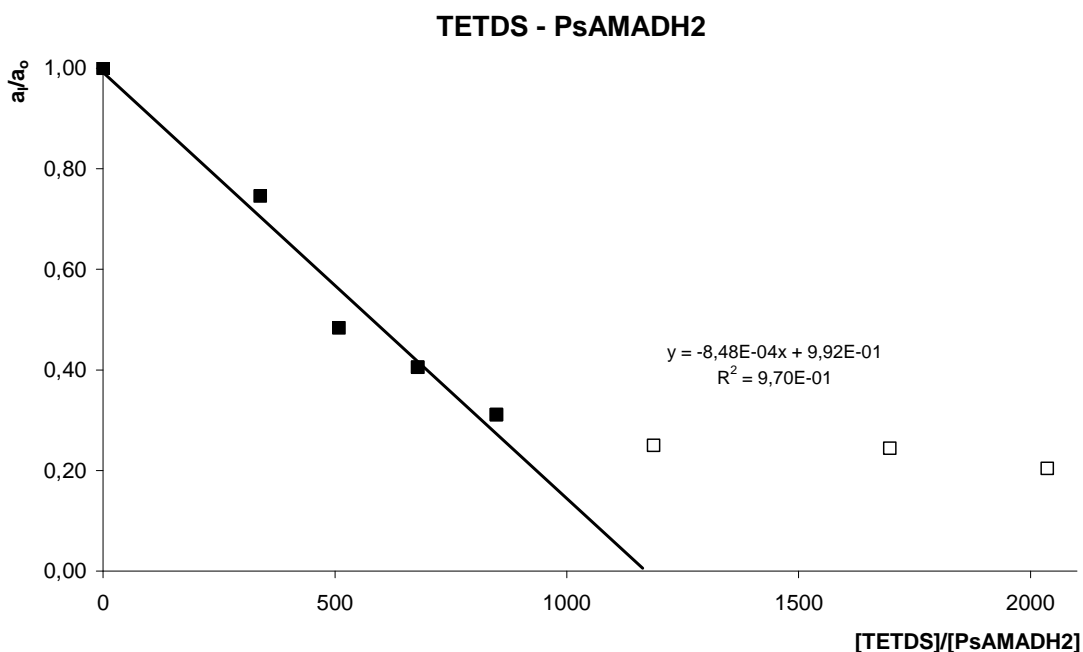
Práce s TETDS byla zkomplikována precipitací inhibitoru v reakční směsi. Proto bylo hledáno rozpouštědlo, které by zmíněný efekt minimalizovalo. První volbou byl 96% (v/v) ethanol, ovšem vzhledem k citelnému srážení TETDS, následovalo postupné zvyšování podílu ethanolu také v pufru (až 15 %). Ani tento krok však nebyl vyhodnocen za dostatečný. Proto byl za rozpouštědlo zvolen dimethylsulfoxid s konečnou 2% koncentrací DMSO v pufru. I přesto ale bylo nutné snížit koncentraci inhibitoru na 60 μM , což byla zároveň nejvyšší hodnota v reakční směsi se kterou se pracovalo.



Obr. 17: Časová inaktivace pseudoprvního řádu. Rozsah koncentrací TETDS byl 0-60 μM ; doba inkubace až 60 min (měřeno po 0, 10, 20, 30, 45, 60 min).



Obr. 18: Kitz-Wilsonovo vynesení. Závislost $1/k_{app}$ na reciproké hodnotě koncentrace inhibitoru.



Obr. 19: Grafické vyjádření pro stanovení rozdělovacího poměru. Měření proběhlo po 90ti minutové inkubaci, při 25 °C. Koncentrace inhibitoru ve výsledných směsích byla 0, 15, 20, 25, 35, 50 a 60 μM ; konečná koncentrace enzymu se rovnala $2,95 \cdot 10^{-8}$ M.

6.3.4 Souhrn výsledků časové inaktivace

Po porovnání experimentálních dat (tab. 4) získaných z výše uvedených kinetických závislostí je zřejmé, že TETDS inhibuje PsAMADH2 účinněji než TMTDS. Tento závěr byl vyvozen zejména z konstanty inaktivace, která byla u TETDS řádově nižší než v případě druhého inhibitoru. Výsledné hodnoty byly vzhledem k možné skryté precipitaci zaokrouhleny.

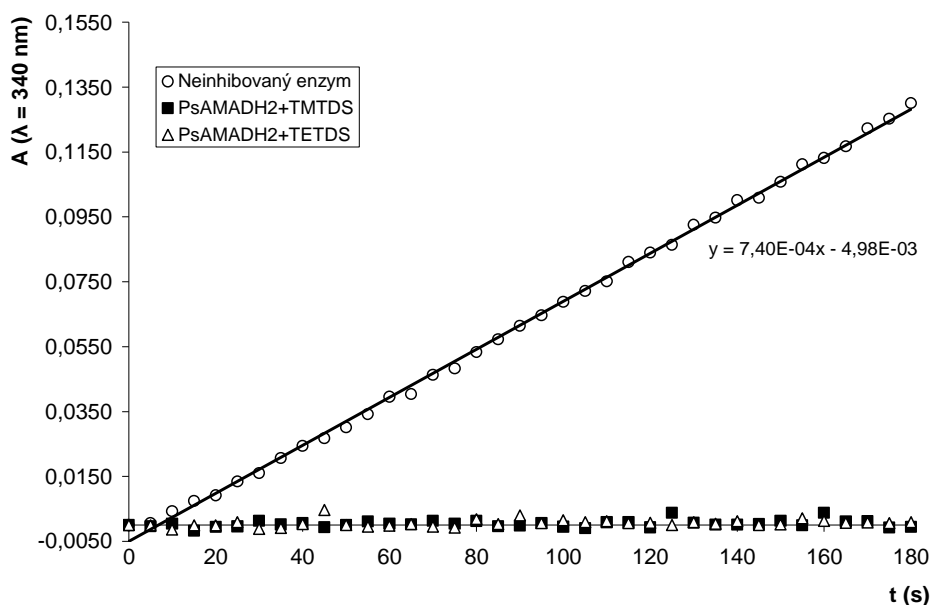
Tab. 4: Srovnání inhibičních dat (TMTDS, TETDS). Konstanta inaktivace K_i a rychlostní konstanta inaktivace k_{inact} byly získány z grafu Kitz-Wilsona, jak je popsáno v kapitole 4 (hodnota $t_{1/2}$ pochází z rovnice uvedené na obr. 6). Rozdělovací poměr r byl vyjádřen z průsečíku osy x přímkou (obr. 16 a 19) a upraven dle rovnice: průsečík = $r+1$.

	K_i (μM)	k_{inact} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	r
TMTDS	741	1,05	0,66	1200
TETDS	18,0	0,03	23,2	1200

V případě publikace týkající se BADH organismů *P. aeruginosa* a *A. hypochondriacus*, byla sledována časově závislá inaktivace disulfiramem, s následným vyhodnocením rychlostní konstanty inaktivace druhého řádu. U bakteriální BADH byla kinetika inaktivace monofázová, přičemž hodnota zmiňované konstanty se rovnala $4,9 \pm 0,4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (pro pH 6.9), zatímco u rostlinné BADH se jednalo o dvoufázový proces, kdy pro pH = 7.5 bylo dosaženo hodnot $6,8 \pm 0,6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $0,33 \pm 0,04 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Při pH 8.8 byla rychlostní konstanta inaktivace druhého řádu PaBADH stanovena na $1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, což je dobře srovnatelné s konstantou interakce lidské ALDH2 s disulfiramem rovnající se $840 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, určené za podobných podmínek. Pseudoprvní rychlostní konstanta inaktivace bakteriální BADH v přítomnosti $50 \mu\text{M}$ disulfiramu a $3,7 \text{ mM}$ NADP⁺ byla rovna $82,6 \pm 5,5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ avšak v případě koenzymu NAD⁺, stejné koncentrace byla rovná $122 \pm 8,9 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (Velasco-García et al., 2003).

6.4 Ireverzibilita inhibice

Ireverzibilita reakce PsAMADH2 a inhibitoru byla experimentálně potvrzena spektrofotometricky (obr. 20).



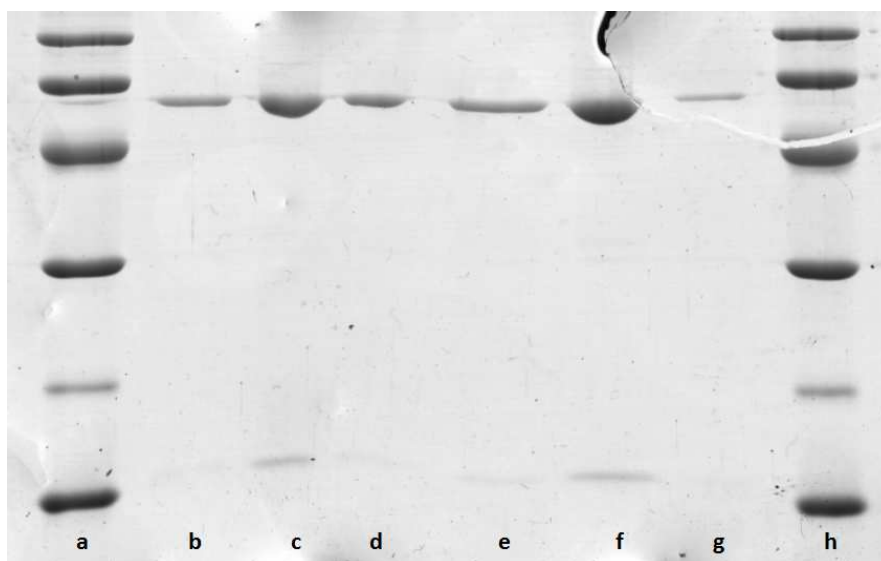
Obr. 20: Ireverzibilní inhibice PsAMADH2. Směs sestávající se z pufru Tris-HCl (pH 9.0), inhibitoru, enzymu a NAD^+ byla, po dvouhodinové inkubaci (25 °C), podrobena dialýze v Tris-HCl (pH 8.0). Po přidavku zbývajících reagensů byla spektrofotometricky sledována závislost absorbance po dobu 3 min.

Z grafu je patrné, že absorbance směsí po dvouhodinové inkubaci s inhibitorem (TMTDS, TETDS) a následné dialýze se pohybovaly v oblastech blízkých nule, na rozdíl od vzorku, v němž inhibitor nebyl přítomen a jehož absorbance v čase rostla. Je tedy zřejmé, že enzym byl vazbou inhibitoru ireverzibilně inaktivován. Ireverzibilita reakce s disulfiramem byla prokázána např. pro aldehyddehydrogenasu izolovanou z ovčích jater (Kitson, 1975). Při léčbě alkoholismu se pak využívá, již popsaná, ireverzibilní inaktivace jaterní ALDH2, vedoucí k akumulaci acetaldehydu a k tzv. disulfiram-ethanolové reakci (Hempel et al., 1984). V kapitole 4 byla rovněž zmíněna ireverzibilní inaktivace disulfiramem pro PaBADH (Velasco-García et al., 2003).

6.5 SDS-PAGE trypsinové štěpení a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Byla provedena SDS-PAGE s následným MALDI-TOF měřením na přístroji Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, Německo). Cílem bylo objasnit interakci mezi inhibitorem a enzymem, zapříčiňující jeho inaktivaci. Předpokládá se, že inhibitor se váže na cysteinový zbytek v aktivním místě. Laemmliho vzorkový pufr pro elektroforézu obsahuje merkaptoethanol, v jehož přítomnosti by však tato vazba byla štěpena. Nicméně jsme se zajímali o to, zda nedochází k modifikaci jiných aminokyselinových zbytků.

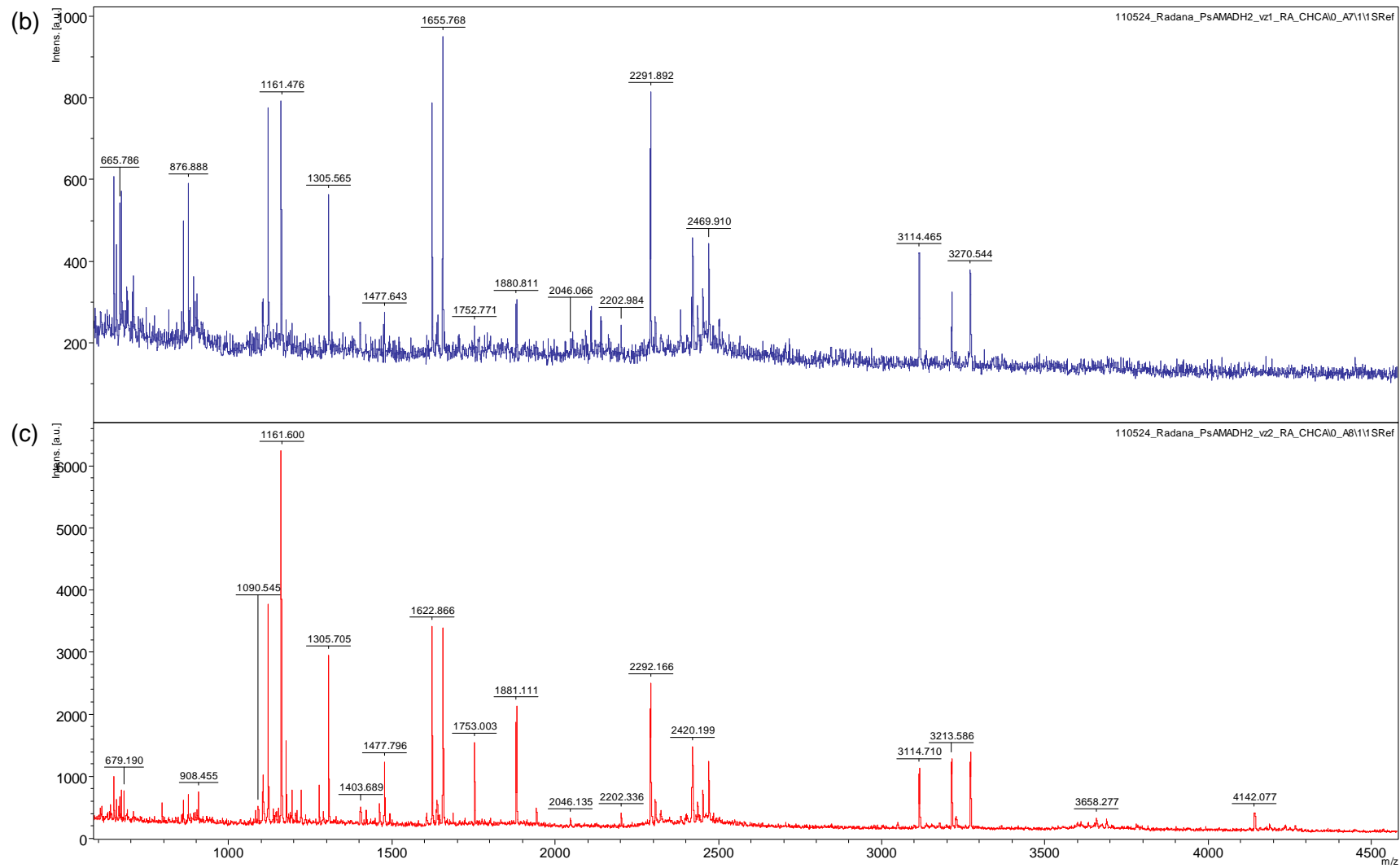
Směs obsahující inhibitor, enzym a NAD^+ (stabilita enzymu) byla po dvouhodinové inkubaci při 25 °C smísena s Laemmliho vzorkovacím pufrům (1:1). Po tepelné denaturaci, přidavku alkylačního činidla jodacetamidu (či vody jako kontroly), bylo na polyakrylamidový gel nanášeno po 18 μl z jednotlivých směsí (obr. 21).



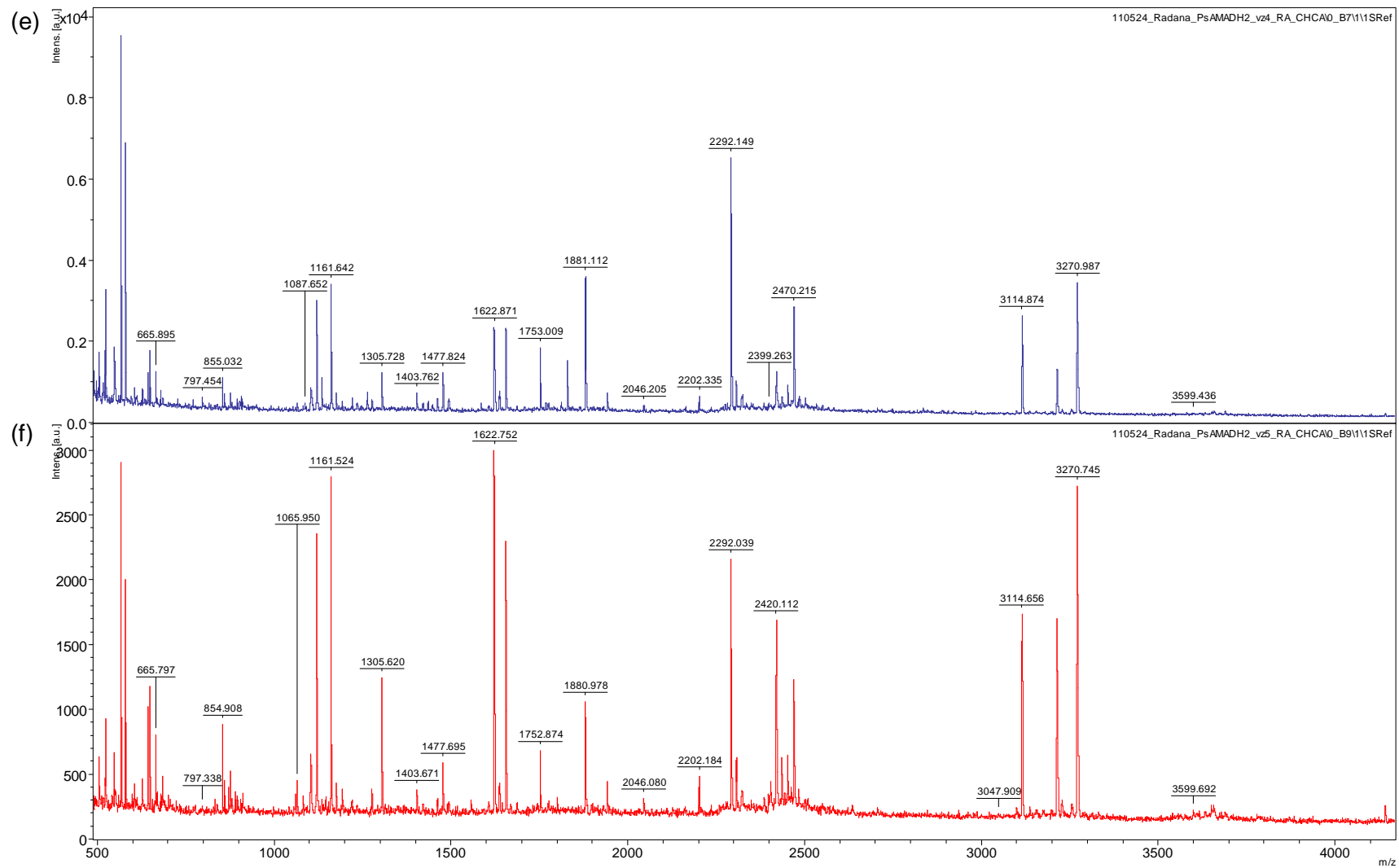
Obr. 21: Elektroforéza směsi inhibitor-enzym. Jamky: (a,h) proteinový LMW standard, jehož molekulové hmotnosti odpovídají: shora 97.0, 66.0, 45.0, 30.0, 20.1 a 14.4 kDa; (b,c,d) směsi s jodacetamidem v pořadí: enzym-voda, enzym-TMTDS, enzym-TETDS; (e,f,h) soustava neobsahující jodacetamid v pořadí: enzym-voda, enzym-TMTDS, enzym-TETDS. Širší bendy v případě jamek (e,f) byly pravděpodobně způsobeny chybou v koncentraci nastalou během manipulace se vzorkem. Teoreticky, ze sekvence určená molekulová hmotnost PsAMADH2, činí pro monomer 58.44 kDa.

Následně byly působením trypsinu připraveny proteinové digesty pro MALDI analýzu, a to konkrétně ze vzorků: (b,c) v případě alkylovaného enzymu a (e,f) pro

nealkylovaný enzym. Hmotnostní spektrum peptidů z PsAMADH2 alkylovaných jodacetamidem je znázorněno na obr. 22, bez alkylace pak na obr. 23, parametry identifikace jsou shrnuty v tabulce 5.



Obr. 22: Hmotnostní spektra alkylovaného enzymu: (b) směs PsAMADH2-voda, (c) směs PsAMADH2-TMTDS.



Obr. 23: Hmotnostní spektra nealkylovaného enzymu: (e) směs PsAMADH2-voda, (f) směs PsAMADH2-TMTDS.

Tab. 5: Parametry identifikace trypsinových digestů jednotlivých vzorků metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (peptidové mapování). Kód v proteinové databázi NCBI nr pro tento enzym je gi|284055630.

vzorek	hodnota skóre	počet nalezených peptidů	počet zidentifikovaných peptidů	pokrytí sekvence
b	190	32	18	47%
c	219	50	24	60%
e	249	51	27	56%
f	262	42	25	58%

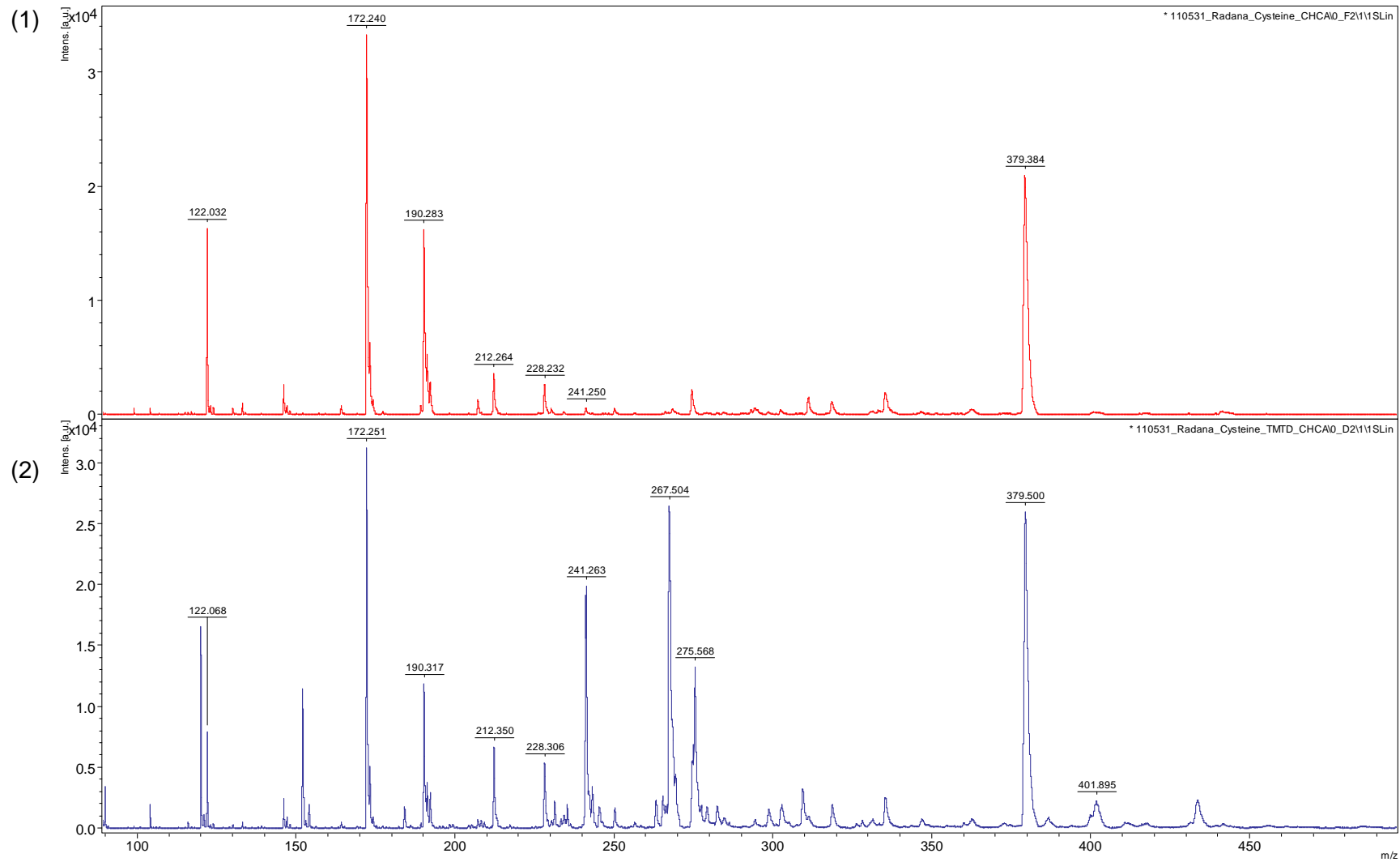
Porovnáním hmotnostních spekter nebyly pozorovány žádné modifikace PsAMADH2.

Interakce mezi cysteinem (jako modelem zbytku aktivního místa) a inhibitorem byla sledována v samostatném experimentu. Vzorek pro MALDI-TOF analýzu sestával z TMTDS v methanolu, který byl vůči vodnému roztoku L-cystein hydrochloridu ve dvacetinásobném molárním nadbytku. Jako matrice byla použita α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA).

Signály (iontové species) v hmotnostních spektrech (1,2) znázorněných na obr. 24 byly vyhodnoceny následovně: pík v oblasti (m/z) 122 odpovídá protonizované molekule cysteinu, pík 172 (m/z) byl určen jako protonizovaná matrice po neutrální ztrátě vody. Samotná $[\text{CHCA}+\text{H}]^{\pm}$ odpovídá píku 190 (m/z). Pík 241 (m/z) může znázorňovat jak protonizovanou molekulu inhibitoru, tak zvláště pro spektrum (1), protonizovaný cystin.

Pík 240 (m/z), jenž by odpovídal protonizované kyselině 2-amino-3-[(2-methylpropanthiyl)-disulfanyl]propanové (vzniklé spojením cysteinu s polovinou molekuly TMTDS disulfidovou vazbou) není patrný - pravděpodobně je překrýván píkem 241. Zbývající píky 212, 228 (m/z) odpovídají aduktu CHCA se sodným, resp. draselným iontem. V případě píků 379 a 401 (m/z) se pravděpodobně jedná o $[\text{CHCA}+\text{CHCA}+\text{H}]^{\pm}$, resp. $[\text{CHCA}+\text{CHCA}+\text{Na}]^{\pm}$.

Píky hmotnostního spektra (2) v pozicích 150, 267 a 275 (m/z) nebyly přiřazeny domnělým strukturám, s největší pravděpodobností se však, po srovnání se spektrem (1), jedná o souvislost s přítomností TMTDS ve vzorku.



Obr. 24: Hmotnostní spektra: (1) cystein + CHCA; (2) cystein + TMTDS + CHCA

7 Závěr

V úvodu teoretické části této bakalářské práce bylo pojednáno o polyaminech a významu aminoaldehyddehydrogenasy při jejich oxidačním odbourávání. V navazujících kapitolách byly shrnuty poznatky týkající se enzymů aminoaldehyddehydrogenasy, betainaldehyddehydrogenasy a vlivu inhibitorů na tyto proteiny.

V praktické části bylo sledováno působení sloučenin TMTDS a TETDS, jako potencionálních inhibitorů, na aktivitu PsAMADH2. Na základě výsledků spektrofotometrických měření, byla u obou látek prokázána irreverzibilní inhibice enzymu s časově závislou inaktivací. Porovnáním hodnot K_i , k_{inact} , $t_{1/2}$ a r získaných z grafických závislostí (inhibice pseudoprvního řádu, Kitz-Wilsonovým vynesemím a stanovením dělicího poměru) byl TETDS shledán účinnějším inhibitorem ve srovnání s TMTDS. Metodou MALDI-TOF nebyly zjištěny interakce inhibitoru a enzymu mimo aktivní místo.

8 Literatura

- 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
- Agostinelli E., Arancia G., Dalla Vedova L., Belli F., Marra M., Salvi M., Toninello A. (2004) The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases: Perspectives of clinical applications. *Amino Acids* **27**, 347-358
- Ambroziak W., Pietruszko R. (1987) Human aldehyde dehydrogenase: Metabolism of putrescine and histamine. *Alcoholism* **11**, 528-532
- Aruoma O. I., Laughton M. J., Halliwell B. (1989) Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants *in vivo*? *Biochem. J.* **264**, 863-869
- Ashraf M., Foolad M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* **59**, 206-216
- Awal H. M. A., Kinoshita T., Yoshida I., Doe M., Hirasawa E. (1997) Aminoaldehyde dehydrogenase of pea epicotyls. *Phytochemistry* **44**, 997-1000
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* **140**, 103-125
- Bradbury L. M. T., Gillies S. A., Brushett D. J., Waters D. L. E., Henry R. J. (2008) Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant Mol. Biol.* **68**, 439-449
- Brauner F., Šebela M., Snégaroff J., Peč P., Meunier J.-C. (2003) Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 1-10
- Brouquisse R., Weigel P., Rhodes D., Yocum Ch. F., Hanson A. D. (1989) Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiol.* **90**, 322-329

- Brown E. G., Turan Y. (1995) Pyrimidine metabolism and secondary product formation; biogenesis of albizziine, 4-hydroxyhomoarginine and 2,3-diaminopropanoic acid. *Phytochemistry* **40**, 763-771
- Courtenay E. S., Capp M. W., Anderson C. F., Record M. T. Jr. (2000) Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: Implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of "osmotic stress" experiments in vitro. *Biochemistry* **39**, 4455-4471
- Falkenberg P., Strøm A. R. (1990) Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. acta* **1034**, 253-259
- Flores H. E., Filner P. (1985) Polyamine catabolism in higher plants: Characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regul.* **3**, 277-291
- Friedrich B., Magasanik B. (1979) Enzymes of agmatine degradation and the control of their synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **137**, 1127-1133
- Fuller R. K., Branchey L., Brightwell D. R., Derman R. M., Emrick C. D., Iber F. L., James K. E., Lacoursiere R. B., Lee K. K., Lowenstam I., Maany I., Neiderhiser D., Nocks J. J., Shaw S. (1986) Disulfiram treatment of alcoholism. A Veterans Administration cooperative study. *JAMA.* **256**, 1449-1455
- 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 a novel cation binding site. *J. Mol. Biol.* **385**, 542-557
- Greenfield N. J., Pietruszko R. (1977) Two aldehyde dehydrogenases from human liver. Isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. *Biochim. Biophys. Acta* **483**, 35-45
- Gruez A., Roig-Zamboni V., Grisel S., Salomoni A., Valencia Ch., 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
- Hanson A. D., May A. M., Grumet R., Bode J., Jamieson G. C., Rhodes D. (1985) Betaine synthesis in chenopods: Localization in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 3678-3682
- Heby O. (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* **19**, 1-20
- Hempel J., von Bahr-Lindström H., Jörnvall H. (1984) Aldehyde dehydrogenase from human liver. Primary structure of the cytoplasmic isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **141**, 21-35
- Hulse J. D., Ellis S. R., Henderson L. M. (1978) Carnitine biosynthesis. β -Hydroxylation of trimethyllysine by an α -ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **253**, 1654-1659
- Chern M.-K., Pietruszko R. (1999) Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: purification, characterization, and comparison with human cytoplasmatic E3 isozyme. *Biochem. Cell Biol.* **77**, 179-187
- Ikuta S., Imamura S., Misaki H., Horiuti Y. (1977) Purification and characterization of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *J. Biochem.* **82**, 1741-1749
- Ivanova S., Batliwalla F., Mocco J., Kiss S., Huang J., Mack W., Coon A., Eaton J. W., Al-Abed Y., Gregersen P. K., Shohami E., Connolly E. S., Tracey K. J. (2002) Neuroprotection in cerebral ischemia by neutralization of 3-aminopropanal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5579-5584
- Ivanova S., Botchkina G. I., Al-Abed Y., Meistrell M., Batliwalla F., Dubinsky J. M., Iadecola C., Wang H. C., Gregersen P. K., Eaton J. W., Tracey K. J. (1998) Cerebral ischemia enhances polyamine oxidation: Identification of enzymatically formed 3-aminopropanal as an endogenous mediator of neuronal and glial cell death. *J. Exp. Med.* **188**, 327-340

- Jakoby W. B., Fredericks J. (1959) Pyrrolidine and putrescine metabolism: γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **234**, 2145-2150
- Kent U. M., Yanev S., Hollenberg P. F. (1999) Mechanism-based inactivation of cytochromes P450 2B1 and P450 2B6 by *n*-propylxanthate. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 317-322
- Kil H. Y., Zhang J., Piantadosi C. A. (1996) Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**, 100-106
- Kinnersley A. M., Turano F. J. (2000) Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**, 479-509
- Kishitani S., Takanami T., Suzuki M., Oikawa M., Yokoi S., Ishitani M., Alvarez-Nakase A. M., Takabe T. & Takabe T. (2000) Compatibility of glycinebetaine in rice plants: evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley. *Plant Cell Environ.* **23**, 107-114
- Kitson T. M. (1975) The effect of disulfiram on the aldehyde dehydrogenases of sheep liver. *J. Biochem.* **151**, 407-412
- Kitz R., Wilson I. B. (1962) Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **237**, 3245-3249
- Kortstee G. J. J. (1970) The aerobic decomposition of choline by microorganisms. *Arch. Microbiol.* **71**, 235-244
- 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
- Kumazawa K., Masuda H. (2002) Identification of potent odorants in different green tea varieties using flavor dilution technique. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5660-5663

- Kurys G., Ambroziak W., Pietruszko R. (1989) Human aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of the third isozyme with low K_m for γ -aminobutyraldehyde. *J. Biol. Chem.* **264**, 4715-4721
- Lamplot Z., Šebela M., Maloň M., Lenobel R., Lemr K., Havliš J., Peč P., Qiao Ch., Sayre L. M. (2004) 1,5-Diamino-2-pentyne is both a substrate and inactivator of plant copper amine oxidases. *Eur. J. Biochem.* **271**, 4696-4708
- Li W., Yuan X.-M., Ivanova S., Tracey K. J., Eaton J. W., Brunk U. T. (2003) 3-Aminopropanal, formed during cerebral ischaemia, is a potent lysosomotropic neurotoxin. *Biochem. J.* **371**, 429-436
- 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**, 133-140
- Macholán L. (1979), Přehled enzymové kinetiky, pp 15, Univerzita J.E. Purkyně, Brno
- Matsuda H., Suzuki Y. (1984) γ -Guanidinobutyraldehyde dehydrogenase of *Vicia faba* leaves. *Plant. Physiol.* **76**, 654-657
- Maurer T., Fung H. L. (2000) Comparison of methods for analyzing kinetic data from mechanism-based enzyme inactivation: application to nitric oxide synthase. *AAPS PharmSci* **2**, 68-77
- McNeil S. D., Nuccio M. L., Hanson A. D. (1999) Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* **120**, 945-949
- Medda R., Padiglia A., Floris G. (1995) Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* **39**, 1-9
- Mendelson M. H., Gurtman A., Szabo S., Neibart E., Meyers B. R., Policar M., Cheung T. W., Lillienfeld D., Hammer G., Reddy S., Choi K, Hirschman S. Z. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **18**, 886-895

- Mittal R., Aggarwal S., Sharma S., Chhibber S., Harjai K. (2009) Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *J. Infect. Public Health* **2**,101-111
- Miyatake K., Nakano Y., Kitaoka S. (1976) Pantothenate synthetase of *Escherichia coli* B. I. Physicochemical Properties. *J. Biochem.* **79**, 673-678
- Muñoz-Clares R. A., Díaz-Sánchez Á. G., González-Segura L., Montiel C. (2010) Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: Mechanistic and regulatory implications. *Arch. Biochem. Biophys.* **493**, 71-81
- Nakamura T., Nomura M., Mori H., Jagendorf A. T., Ueda A., Takabe T. (2001) An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant cell physiol.* **42**, 1088-1092
- Nakamura T., Yokota S., Muramoto Y., Tsutsui K., Oguri Y., Fukui K., Takabe T. (1997) Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J.* **11**,1115-1120
- Ortega A. (2003) A new role for GABA: inhibition of tumor cell migration. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 151-154
- Pan S.-M. (1988) Betaine aldehyde dehydrogenase in spinach. *Bot. Bull. Academia Sinica* **29**, 255-263
- 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.
- Pesin S. R., Candia O. A. (1982) Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **22**, 651-659
- Petrivalský 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

- Purich D. L., Allison R. D. (2000) Handbook of biochemical kinetics pp 410, Academic Press
- Raman S. B., Rathinasabapathi B. (2004) Pantothenate synthesis in plants. *Plant Sci.* **167**, 961-968
- Rathinasabapathi B. (2000) Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Ann. Bot.* **86**, 709-716
- Rathinasabapathi B., Fouad W. M., Sigua C. A. (2001) β -alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae. Purification and characterization of a trifunctional, S-adenosyl-L-methionine-dependent N-methyltransferase from *Limonium latifolium* leaves. *Plant Physiol.* **126**, 1241–1249
- Renner Ch., Seyffarth A., Garcia de Arriba S., Meixensberger J., Gebhardt R., Gaunitz F. (2008) Carnosine inhibits growth of cells isolated from human glioblastoma multiforme. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **14**, 127-135
- Sage A. E., Vasil A. I., Vasil M. L. (1997) Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* **23**, 43-56
- Satya Narayan V., Nair P. M. (1990) Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* **29**, 367-375
- Shelp B. J., Bown A. W., McLean D. (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* **4**, 446-452
- Schieberle P., Grosch W. (1985) Identification of the volatile flavour compounds of wheat bread crust - comparison with rye bread crust. *Eur. Food Res. Technol.* **180**, 474-478
- Schwartz B., Dove J. E., Klinman J. P. (2000) Kinetic analysis of oxygen utilization during cofactor biogenesis in a copper-containing amine oxidase from yeast. *Biochemistry* **39**, 3699-3707

- Sophos N. A., Pappa A., Ziegler T. L. & Vasiliou V. (2001). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chem.-Biol. Interact.* **130–132**, 323–337.
- 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-Protein Struct. Molec. Enzym.* **1480**, 329–341.
- Šebela M., Luhová L., Brauner F., Galuszka P., Radová A., Peč P. (2001) Light microscopic localisation of aminoaldehyde dehydrogenase activity in plant tissues using nitroblue tetrazolium-based staining method. *Plant Physiol. Biochem.* **39**, 831-839
- Takeda Y., Samejima K, Nagano K., Watanabe M., Sugeta H., Kyogoku Y., (1983) Determination of protonation sites in thermospermine and in some other polyamines by ¹⁵N and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **130**, 383-389
- Tavladoraki P., Rossi M. N., Saccuti G., Perez-Amador A., Polticelli F., Angelini R., Federico R. (2006) Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiol.* **141**, 1519-1532
- Testore G., Cravanzola C., Bedino S. (1999) Aldehyde dehydrogenase from rat intestinal mucosa: purification and characterization of an isozyme with high affinity for γ -aminobutyraldehyde. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 777-786
- Testore G., Colombatto S., Silvagno F., Bedino S. (1995) Purification and kinetic characterization of γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase from rat liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 1201-1210
- Tiedje K. E., Stevens K., Barnes S., Weaver D. F. (2010) β -Alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem. Int.* **57**, 177-188
- Trossat C., Rathinasabapathi B., Hanson A. D. (1997) Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopro-pionaldehyde and ω -aminoaldehydes. *Plant Physiol.* **113**, 1457-1461

- 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 from *Pisum sativum*. *Acta cryst.* **64**, 88-90
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010) Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *J. Mol. Biol.* **396**, 870-882
- Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M. (2007) Plant aminoaldehyde dehydrogenases: has the time now come for new interesting discoveries? *Curr. Topics Plant Biol.* **8**, 45-70.
- Valenzuela-Soto E. M., Muñoz-Clares R. A. (1993) Betaine-aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an iso ordered Bi Bi steady state mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 23818-23823
- Vandamme E. J. (1992) Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **53**, 313-327
- Velasco-García R., Chacón-Aguilar V. M., Hervert-Hernández D., Muñoz-Clares R. A. (2003) Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram. *Chem.-Biol. Interact.* **143-144**, 149-158
- 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
- Vodrážka Z., Rauch P., Káš J. (1991), Enzymologie, pp 122, VŠCHT, Praha
- Walters D. R. (2003) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **64**, 97-107
- 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. (1990) Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2745-2749
- Yorifuji T., Koike K., Sakurai T., Yokoyama K. (1986) 4-Aminobutyraldehyde and 4-guanidinobutyraldehyde dehydrogenases for arginine degradation in *Pseudomonas putida*. *Agric. Biol., Chem.* **50**, 2009-2016
- Yorifuji T., Shimizu E., Hirata H., Imada K., Katsumi T., Sawamura S. (1992) Guanidinobutyrase for L-arginine degradation in *Brevibacterium helvolum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 773-777
- Zaldívar- Machorro V. J., López-Ortiz M., Demare P., Regla I., Muñoz-Clares R. A. (2011) The disulfiram metabolites S-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfoxide and S-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both *in vitro* and *in situ*, and arrest bacterial growth. *Biochimie* **93**, 286-295
- Zierdt Ch. H., Williams R. L. (1975) Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis of the pancreas. *J. Clin. Microbiol.* **1**, 521-526
- Zhu J. K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**, 66-71

9 Seznam použitých zkratk

2AP	2-acetyl-1-pyrrolin
AA/BIS	akrylamid/bisakrylamid
ABAL	4-aminobutanal; 4-aminobutyraldehyd
ABALDH	4-aminobutyraldehyddehydrogenasa
ADC	arginindekarboxylasa
AGM	agmatin; <i>N</i> -(4-aminobutyl)guanidin
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALDH2	mitochondriální aldehyddehydrogenasa jater
APAL	3-aminopropanal; 3-aminopropionaldehyd
APBAL	4-(3-aminopropylamino)butyraldehyd
APS	persíran amonný
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
AtPAO	polyaminoxidasa z rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i>
AVAL	5-aminopentanal; 5-aminovaleraldehyd
BADH	betainaldehyddehydrogenasa
BAL	betainaldehyd
BBD	izoenzym betainaldehyddehydrogenasy ječmene
B-PER	bacterial protein extraction reagent
CAD	kadaverin; pentan-1,5-diamin
CAO	chinoproteinová diaminoxidasa
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
CMO	cholinmonooxygenasa
COD	cholinoxidasa
DAP	propan-1,3-diamin
DMSO	dimethylsulfoxid
FAD	flavinadenindinukleotid
G ⁻	gramnegativní
GABA	γ -aminobutanová kyselina; 4-aminomáselná kyselina
GBAL	4-guanidinobutyraldehyd
GBALDH	4-guanidinobutyraldehyddehydrogenasa
k_{app}	zdánlivá rychlost inaktivace
K_i	konstanta inaktivace
K_i	inhibiční konstanta

k_{inact}	rychlostní konstanta inaktivace
K_M	Michaelisova konstanta
NAD^+	nikotinamidadenindinukleotid
NADP^+	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
MALDI-TOF	laserová desorpční ionizace za účasti matrice v kombinaci s průletovým analyzátozem
PAO	flavinová polyaminoxidasa
PMS	fenazinmethosulfát
PaBADH	betainaldehyddehydrogenasa bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PsAMADH	aminoaldehyddehydrogenasa hrachu setého - <i>Pisum sativum</i>
PUT	putrescin; butan-1,4-diamin
r	rozdělovací poměr
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza za účasti dodecylsulfátu sodného
SPD	spermidin; <i>N</i> -(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin
SPM	spermin; <i>N,N</i> -bis-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin
ODC	ornithindekarboxylasa
$t_{1/2}$	doba potřebná pro inaktivaci polovičního množství enzymu v přítomnosti saturační koncentrace inhibitoru
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TETDS	tetramethylthiuramdisulfid
TMABAL	<i>N,N,N</i> -trimethyl-4-aminobutyraldehyd
TMABALDH	4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasa
TMTDS	tetramethylthiuramdisulfid