

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium genové exprese genů vybraných
aldehyddehydrogenas v kukuřici a mechu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jakub Bělíček
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radka Končítíková, Ph.D.
Rok:	2019

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

V Olomouci dne

Rád bych poděkoval své vedoucí Mgr. Radce Končítíkové, PhD. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracovávání praktické části této práce. Zároveň bych chtěl poděkovat pracovníkům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky za vytvoření přátelského prostředí na pracovišti.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jakub Bělíček
Název práce	Studium genové exprese genů vybraných aldehyddehydrogenas v kukuřici a mechu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky
Vedoucí práce	Mgr. Radka Končítíková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem abiotického stresu na změnu genové exprese genů aldehyddehydrogenas u kukuřice (*Zea mays*) a mechu (*Physcomitrella patens*) s využitím kvantitativních PCR experimentů v kombinaci s reverzní transkripcí RNA (qRT-PCR). Izolovaná RNA byla purifikována a transkribována do cDNA, jež sloužila jako základ pro qPCR experimenty. Pro detekci amplifikace byly použity FAM-TAMRA sondy. Naměřené hodnoty cyklu prahu (C_T) byly přepočítány na počet kopií genů vztažený na ng RNA. Byla rovněž provedena fylogenetická analýza enzymů aldehyddehydrogenas v kukuřici a mechu. Stres vyvolaný přidavkem soli zapříčinil zvýšení exprese u genů *PpALDH7* a *PpALDH10*, dále potom u *ZmALDH7* a *ZmALDH12* v kombinaci s přidavkem aminokyselin a všech *ZmAMDH* v kombinaci s přidavkem putrescinu. Tyto enzymy pravděpodobně v rostlinách zodpovídají za adaptaci na zvýšenou koncentraci solí v půdním roztoku. Vlivem dehydratace pak došlo k zesílení exprese u *PpALDH2A*, *PpALDH10* a *PpALDH21*, což poukazuje na jejich osmoprotektivní roli. Dehydratace naopak vyvolala snížení exprese u *PpALDH2B*.

Klíčová slova	Aldehyddehydrogenasa, genová exprese, abiotický stres, <i>Physcomitrella patens</i> , <i>Zea mays</i> , qRT-PCR, fylogenetická analýza
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jakub Bělíček
Title	Study of gene expression of selected aldehyde dehydrogenases in maize and moss
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics
Supervisor	Mgr. Radka Končítíková, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

This bachelor thesis deals with the effect of abiotic stress on difference in gene expression of aldehyde dehydrogenases genes in maize (*Zea mays*) and moss (*Physcomitrella patens*) using PCR experiments with the combination of reverse transcription of RNA (qRT-PCR). Isolated RNA was purified and transcribed into cDNA, the basis for qPCR assay. FAM-TAMRA probes were used for detection of amplification. The measured cycle threshold (C_T) values were converted to the number of gene copies relative to ng of RNA. The phylogenetic analysis of aldehyde dehydrogenases genes in maize and moss was solved too. Salt addition-induced stress caused increase of expression of *PpALDH7* and *PpALDH10*, followed by *ZmALDH7* and *ZmALDH12* in combination with addition of amino acids and all *ZmAMDHs* in combination with putrescine addition. The enzymes are likely to be responsible for salt-caused stress adaptation in these plants. Dehydration-caused stress upregulated expression of *PpALDH2A*, *PpALDH10* and *PpALDH21*, suggesting their osmoprotective role. Conversely, dehydration-caused stress induced a decrease of expression of *PpALDH2B*.

Keywords	Aldehyde dehydrogenase, gene expression, abiotic stress, <i>Physcomitrella patens</i> , <i>Zea mays</i> , qRT-PCR, phylogenetic analysis
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod	9
2 Současný stav řešené problematiky	10
2.1 Nadrodina aldehyddehydrogenas	10
2.1.1 Struktura a reakční mechanismus ALDH	10
2.2 ALDH2 rodina	12
2.2.1 Fylogenetická analýza ALDH2 rodiny	13
2.2.2 Substrátová specifita ALDH2A a ALDH2B	14
2.2.3 Struktura RF2A a RF2B	14
2.3 ALDH7 rodina	15
2.3.1 Fylogenetická analýza rodiny ALDH7	15
2.3.2 Substrátová specifita ALDH7	16
2.3.3 Struktura ALDH7	17
2.4 ALDH10 rodina	17
2.4.1 Fylogenetická analýza	19
2.4.2 Substrátová specifita ZmALDH10	20
2.4.3 Struktura ZmALDH10	20
2.5 ALDH12	20
2.5.1 Fylogenetická analýza ALDH12 rodiny	24
2.5.2 Substrátová specifita ZmALDH12 a PpALDH12	24
2.5.3 Struktura ZmALDH12	24
2.6 ALDH21	25
2.6.1 Fylogenetická analýza rodiny ALDH21	26
2.6.2 Substrátová specifita PpALDH21	26
2.6.3 Struktura PpALDH21	27
2.7 RT-PCR	28
2.7.1 SyberGreen technologie	29
2.7.2 TaqMan technologie	30
3 Experimentální část	32
3.1 Materiál a chemikálie	32
3.1.1 Biologický materiál	32
3.1.2 Použité chemikálie	32
3.1.3 Přístrojové vybavení	33
3.1.4 Použité programy	33
3.2 Metody	33
3.2.1 Kultivace čepenky odstálé (<i>Physcomitrella patens</i>)	33
3.2.2 Izolace a precipitace RNA	35
3.2.3 Reversní transkripce do cDNA	36
3.2.4 Real-time PCR	37
3.2.5 Fylogenetická analýza PpALDH a ZmALDH	38
4 Výsledky	39
4.1 Genová exprese <i>PpALDH2</i>	39
4.2 Genová exprese <i>ALDH7</i>	40
4.3 Genová exprese <i>ALDH10</i>	41
4.4 Genová exprese <i>ALDH12</i>	43
4.5 Genová exprese <i>PpALDH21</i>	44

4.6	Fylogenetická analýza PpALDH	45
4.7	Fylogenetická analýza ZmALDH	47
5	Diskuze	49
6	Závěr	52
7	Literatura	53
8	Seznam použitých zkratk	59

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

Zpracování literární rešerše na téma nadrodiny aldehyddehydrogenas (ALDH) a vybraných rodin ALDH.

Zpracování literární rešerše na téma RT-PCR se zaměřením na porovnání detekce amplifikace pomocí TaqMan sond a SYBR green barviva.

Praktická část:

1. Kultivace čepenky odstálé (*Physcomitrella patens*) za několika stresových podmínek.
2. Izolace a reversní transkripce RNA.
3. Provedení real-time PCR experimentů s použitím FAM-TAMRA sond proti vybraným *ALDH* genům indukovaným stresem.
4. Vypracování fylogenetické analýzy ALDH kukuřice (*ZmALDH*) a mechu. (*PpALDH*).

1 ÚVOD

Aldehyddehydrogenasová (ALDH) nadrodina je tvořena velkou škálou enzymů zapojených do endogenního i exogenního metabolismu aldehydů. ALDH enzymy využívají kofaktory NAD^+ či NADP^+ k oxidaci aldehydické skupiny na příslušnou karboxylovou kyselinu za současné tvorby NADH či NADPH. Sloučeniny s aldehydovou skupinou jsou tvořeny jako důležité intermediáty v řadě katabolických i anabolických drah. Tvorba NADH/NADPH během reakcí katalyzovaných ALDH navíc představuje významný zdroj redukčních ekvivalentů potřebných pro udržení redoxní buněčné rovnováhy (Brocker *et al.*, 2013).

Cytoprotektivní činnost těchto enzymů během vlivu oxidačního stresu představuje další z hlavních funkcí ALDH nadrodiny. Vlivem okolností indukujících oxidační stres ALDH enzymy metabolizují reaktivní aldehydy produkované vlivem oxidační degradace lipidových membrán, též známé jako peroxidace lipidů. Mnohé z těchto aldehydů jsou silné elektrofilny, které se ochotně vážou na fyziologicky důležité nukleofily, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny. Adice těchto molekul může způsobit mutace, bránit funkci těchto nukleofilů a vést k významným poruchám homeostázy (Brocker *et al.*, 2013). Mnoho studií ukazuje, že v rostlinách zvýšení exprese genů ALDH enzymů je běžným cílem aktivace odpovědi na stres, a proto je velký hospodářský zájem na utilizaci exprese ALDH ke zlepšení růstu i kvality plodin pěstovaných za drsných podmínek, jako jsou špatná kvalita půdy či sucho (Bartels a Sunkar, 2005).

Mnoho rostlinných ALDH genů reaguje na stres a změny v expresi jsou pozorovatelné po vystavení širokému spektru stresorů, jako jsou dehydratace, těžké kovy, vysoké koncentrace solí, teplo, chlad, oxidační stres či ultrafialové záření (Chugh *et al.*, 2011; Inostroza Blancheteau *et al.*, 2011; Sunkar *et al.*, 2003).

2 SOUČAŠNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

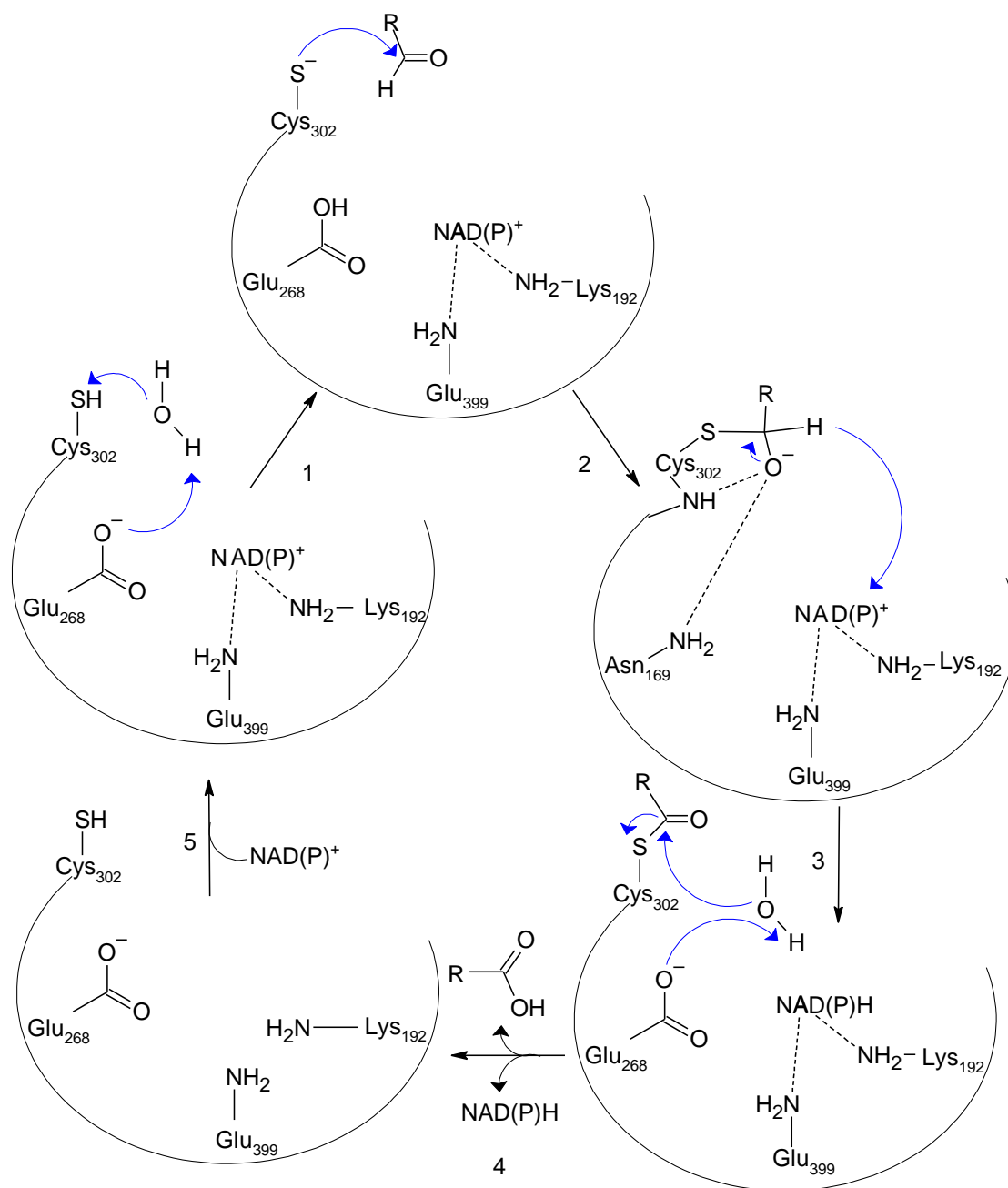
2.1 Nadrodina aldehyddehydrogenas

Rostlinná ALDH nadrodina obsahuje 13 odlišných rodin: ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24, z nichž rodiny ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7 a ALDH18 mají též savčí ortologní geny. Rodiny ALDH10, ALDH12, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24 jsou pro rostliny specifické (Brocker *et al.*, 2013). Mnohé z rodin ALDH jsou rozčleněny na jednotlivé podrodiny na základě míry shody mezi sekvencemi aminokyselin libovolných sad ALDH. Sekvence identické z přibližně 40 % či více spadají do stejné rodiny ALDH. Pokud jsou sekvence identické z 60 % či více, jsou seskupeny do stejné podrodiny (Vasiliou *et al.*, 1999). Celkový počet ALDH genů je napříč rostlinnými druhy velmi různý, vyšší počet genů je spojen s evolučním přechodem rostlin z vody na souš a s tím spojeným zvětšením míry komplexnosti (Brocker *et al.*, 2013).

2.1.1 Struktura a reakční mechanismus ALDH

ALDH enzymy se podílejí na široké škále společných fyziologických funkcí. Nicméně každý isoenzym má svou vlastní preferenci k určitému substrátu (Wang *et al.*, 2009). Rozdíly v uspořádání aktivního místa by tím pádem mohly usnadnit navrhování nových inhibitorů či substrátů selektivních pro každý isoenzym (Koppaka *et al.*, 2012).

Většina isoenzymů sdílí stejný reakční katalytický mechanismus pro aktivitu jak esterasovou, tak dehydrogenasovou (Koppaka *et al.*, 2012). Tento fakt je pravděpodobně zapříčiněn residui aminokyselin Cys302, Lys192 a Glu268, které jsou v rámci ALDH nadrodiny vysoce konzervovány. Mnohé ALDH vytvářejí homotetramery či homodimery s aktivním místem na každém monomeru. Tyto monomery bývají obvykle tvořeny 500 – 600 aminokyselinami (Takahashi *et al.*, 1981; Weiner *et al.*, 1983; Rodriguez-Zavala a Weiner, 2002). Krystalografické studie ukazují na to, že ALDH monomery napříč všemi rodinami sdílejí vysokou homologii ve třech odlišných funkčních oblastech: NAD(P)⁺-vazebné doméně, katalytické doméně a doméně oligomerizační (Liu *et al.*, 1997; Steinmetz *et al.*, 1997; Colby *et al.*, 1998; Cobessi *et al.*, 2000; D'Ambrosio *et al.*, 2006; Koppaka *et al.*, 2012).



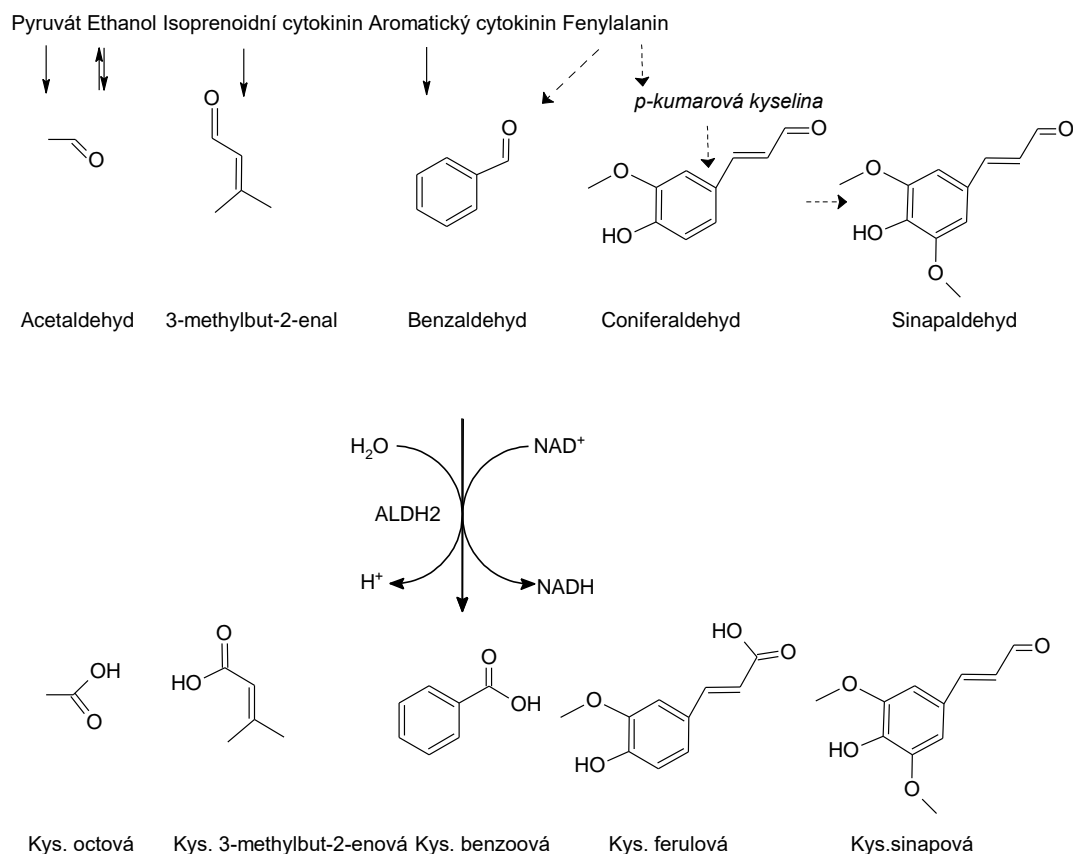
Obr. 1 Mechanismus oxidace aldehydu na karboxylovou kyselinu. Vytvořeno podle Koppaka *et al.* (2012)

Experimenty cílené mutagenese ukázaly, že mechanismus katalýzy probíhá v pěti krocích (Obr. 1) (Hempel *et al.*, 1999). Jako první dochází k aktivaci katalytického Cys302 pomocí Glu268, jehož karboxylová skupina atakuje molekulu vody, která následně deprotonizuje SH- skupinu cysteinu. Druhým krokem je nukleofilní atak elektrofilní aldehydové skupiny pomocí thiolátové skupiny Cys302. Ve třetím kroku dochází ke vzniku tetrahedrálního thiohemiacetalového intermediátu (deacylace).

Současně probíhá přesun hydridového aniontu na pyridinový kruh NAD(P)⁺. Čtvrtý krok vede k hydrolyze výsledného thioesterového intermediátu a na závěr dochází k odštěpení redukovaného kofaktoru a následné regeneraci enzymu vazbou NAD(P)⁺ (Wang a Weiner, 1995; Sheikh *et al.*, 1997). Předpokládá se, že první a čtvrtý krok je podmíněn přítomností molekuly vody navázané na postranní řetězec Glu268. Voda slouží k usnadnění deprotonace Cys302 i následné hydrolyze thioesterového intermediátu. Aktivní místo se nachází na bázi hydrofobního tunelu 12 Å od povrchu enzymu, poblíž tetramerního rozhraní a naproti vazebnému místu kofaktoru. Postranní řetězce tvořící tento tunel se zřejmě podílejí na substrátové specifitě jednotlivých isoenzymů (Koppaka *et al.*, 2012). Kofaktor NAD(P)⁺ je na enzym navázán prostřednictvím deseti vodíkových můstků, z nichž jsou 4 tvořeny residui Lys192 a Glu399. Tyto aminokyseliny jsou vysoce konzervovány ve všech ALDH isoenzymech (Ni *et al.*, 1997). Každé z těchto residuí vytváří 2 vodíkové můstky, jeden adenosinribosidu a druhý k nikotinamidribosidu NAD(P)⁺ (Koppaka *et al.*, 2012).

2.2 ALDH2 rodina

Genová *ALDH2* rodina obsahuje geny pro mitochondriální a cytosolické enzymy vykazující poměrně nízkou substrátovou specifitu (Obr. 2) (EC 1.2.1.3) (Marchitti *et al.*, 2008). První zástupci *ALDH2* rodiny byli identifikováni jako geny obnovující plodnost (RF) u rostlin. Mutace tohoto genu vedla k cytoplazmatické samčí sterilitě a následnému spojení s dalšími *RF* geny (Skibbe *et al.*, 2002). *RF* geny jsou však klasifikovány dle funkce, ne dle homologie, a proto nemusí být nutně evolučně příbuzné. Geny *ALDH* z kukuřice seté (*Zea mays*) byly původně identifikovány jako *RF* geny (*RF2A*, *RF2B*, *RF2C* a *RF2D*). Později však došlo k přejmenování na *ALDH2B1*, *ALDH2B6*, *ALDH2C2* a *ALDH2C3*, podle Skibbe *et al.* v roce 2002 (Cui *et al.*, 1996, Skibbe *et al.*, 2002). *RF2A*, *RF2B*, *RF2C* a *RF2D* byly také nezávisle přejmenovány na *ALDH2B2*, *ALDH2B5*, *ALDH2C1* a *ALDH2C2* podle Jimenez-Lopez *et al.* v roce 2010 po komplexní analýze celé rodiny genů *ZmALDH* porovnáním 3D struktur a specifických epitopových domén nalezených mezi mnoha již charakterizovanými krystalovými strukturami ALDH enzymů (Jimenez-Lopez *et al.*, 2010; Brocker *et al.*, 2013).



Obr. 2 Oxidace acetaldehydu, 3-methylbut-2-enalu, benzaldehydu, coniferaldehydu a sinapaldehydu na příslušné karboxylové kyseliny za katalýzy rostlinnými ALDH2. Acetaldehyd je oxidován na kyselinu octovou, 3-methylbut-2-enal na kyselinu 3-methylbut-2-enovou, benzaldehyd na kyselinu benzoovou, coniferaldehyd na kyselinu ferulovou a sinapaldehyd na kyselinu sinapovou. Upraveno podle Končítikové *et al.* (2015).

2.2.1 Fylogenetická analýza ALDH2 rodiny

Rostlinná ALDH2 rodina je poměrně rozmanitá, tvořená 4 odlišnými podrodinami (ALDH2B, C, D a E). K velkému rozvoji ALDH2 rodiny došlo během evolučního vývoje suchozemských rostlin. Počet zástupců ALDH2 rodiny mezi jednotlivými druhy rostlin je velmi odlišný. Proteiny ALDH2E z řas jsou více homologní s proteiny ALDH2B než ALDH2C či ALDH2D. Genom plavuní *S. moellendorf* obsahuje čtyři členy podrodiny ALDH2B a dva členy ALDH2D podrodiny. Oproti tomu genom *P. Patens* obsahuje pouze dva geny ALDH2B. Plavuně jsou považovány za první cévnaté rostliny, během jejichž vývoje došlo k velkému rozvoji různých fyziologických procesů, které u mechu pozorovatelné nejsou. Je tudíž možné, že rozvoj ALDH2 rodiny je úzce spjat s evolučním vývojem cévnatých rostlin z rostlin nižších. (Brocker *et al.*, 2013).

2.2.2 Substrátová specifita ALDH2A a ALDH2B

Mnoho enzymů ALDH je schopno jako koenzym využít NAD^+ i NADP^+ . ALDH2A i ALDH2B však reálně využívají pouze NAD^+ . Při použití NADP^+ nebyla během reakce se substrátem zjištěna žádná aktivita (Liu a Schnable, 2002).

Na základě hodnoty katalytické účinnosti lze vyvodit, že RF2A je schopen oxidovat velkou škálu různorodých substrátů, mezi něž patří alifatické aldehydy (např. acetaldehyd, propanal, butanal, valeraldehyd, hexanal, heptanal, octanal či nonanal), aromatické aldehydy (benzaldehyd, cinnamaldehyd, *p*-nitrobenzaldehyd, anisaldehyd a *o*-nitrocinnamaldehyd), či jiné další aldehydy (akrolein, chloroacetaldehyd, glykolaldehyd či indol-3-acetaldehyd), jejichž hodnoty K_m jsou v rozmezí mikromolárním a k_{cat} se pohybují v rozmezí $10 - 100 \text{ s}^{-1}$. Pro RF2B je nejlepším substrátem acetaldehyd. Dalšími velmi dobrými substráty jsou propionaldehyd, *o*-nitrocinnamaldehyd, butanal, 4-nitrobenzaldehyd a *m*-anisaldehyd. Vyjma *trans* 2-nonenal, indol-3-karboxylaldehyd, 2-naftaldehyd, 9-*cis*-retinal a *trans*-retinalu, které ALDH2A není schopno oxidovat, jsou nejhoršími substráty *trans*-2-hexenal, formaldehyd, decylaldehyd, methylglyoxal a citral. Naproti tomu ALDH2B (RF2B) enzym má velmi úzkou substrátovou specifitu k aldehydům s krátkým alifatickým řetězcem (acetaldehyd, propionaldehyd a butanal). U aldehydů s řetězcem delším než 6 uhlíků, aromatických aldehydů ani dalších aldehydů nebyla aktivita ALDH2B detekovatelná (Liu a Schnable, 2002).

2.2.3 Struktura RF2A a RF2B

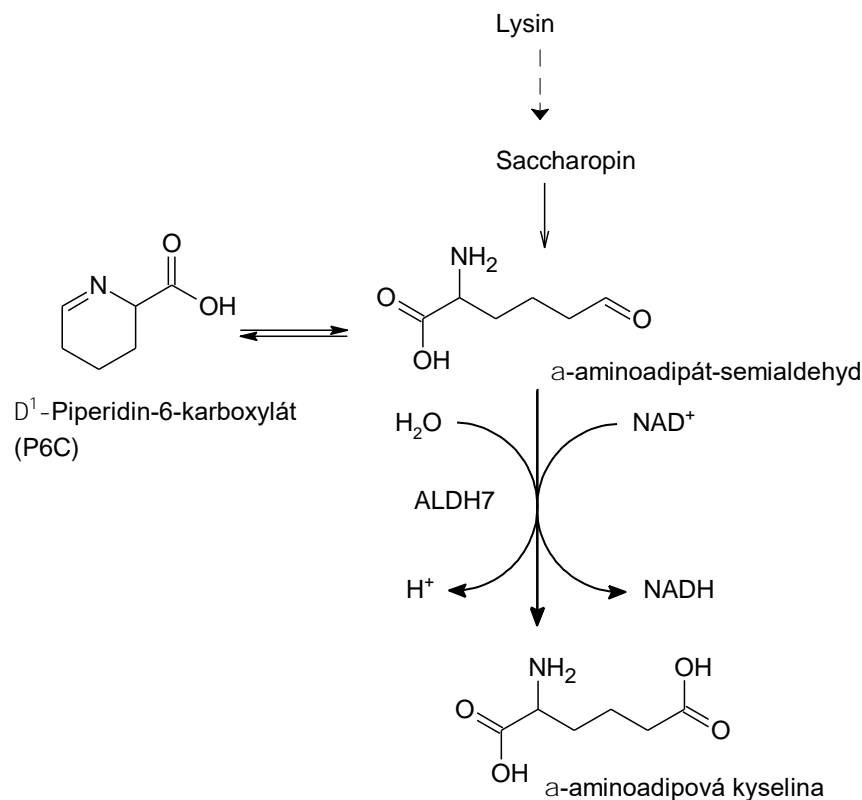
I přes 83% podobnost mezi sekvencí aminokyselin u RF2A a RF2B enzymů je mezi těmito enzymy velký rozdíl v kinetických vlastnostech a substrátové specifitě. Tento rozdíl pravděpodobně vytvářejí změny v nekonzervovaných aminokyselinách, které hrají důležitou roli v udílení funkce daného proteinu. Na základě 3D struktur a fylogenetické analýzy (Liu a Schnable, 2002) tuto změnu v kinetických vlastnostech RF2A a RF2B zřejmě způsobují residua Pro161/Thr162, Tyr162/Leu163, Asp395/Gly396, Asp296/Gly296 a Asp529/Tyr530. Tato residua jsou konzervována v rámci daného isoenzymu, avšak nikoli mezi isoenzymy (Liu a Schnable, 2002).

2.3 ALDH7 rodina

Enzymy ALDH7 rodiny (EC 1.2.1.31) jsou také známé jako Δ^1 -piperidin-6-karboxylátdehydrogenasy (P6CDH) či α -aminoadipát-semialdehyddehydrogenasy. Gen *ALDH7* má napříč evolucí vysoký stupeň konzervace. Tento gen konzervovaný v mnoha různými evolučně vzdálenými druhy naznačuje, že pravděpodobně došlo i ke konzervaci fyziologické funkce spjaté s tímto enzymem (Brocker *et al.*, 2013). Expze rostlinných ALDH7 je velmi citlivá na širokou škálu inzultů, neboť ALDH7 jsou spjaty se mnoha hlavními buněčnými odpověďmi na stres. Zvýšená expze *ALDH7B* je zapříčiněna mnoha různými stresovými faktory, jako je například ultrafialové záření, dehydratace, zvýšená salinita, nízká teplota či teplotní šok (Kotchoni *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006; Brocker *et al.*, 2013). *ALDH7B* je také přítomen v semenech rýže seté (*O. sativa*), kde je odpovědná za jejich klíčení. *Aldh7b* mutantní semena akumulovala malondialdehyd (MDA) a žlutý pigment, alkaloid pojmenovaný „oryzamutaic acid“ vzniklý polymerizací α -aminoadipát-semialdehydu, hlavního substrátu ALDH7 (Shen *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2009). Purifikovaný enzym byl schopen katalyzovat oxidaci MDA, acetaldehydu a glycerinaldehydu (Shin *et al.*, 2009; Brocker *et al.*, 2013).

2.3.1 Fylogenetická analýza rodiny ALDH7

Lidská ALDH7A1 (hALDH7) sdílí s rostlinnou ALD7B podrodinou lehce pod 60 % identity v sekvenci aminokyselin. I přes vysokou sekvenční identitu je však substrátová specifita hALDH7 a rostlinných ALDH7 různá (Končítíková *et al.*, 2015). Stejně jako ostatní *ALDH* genové rodiny jsou i ALDH7 proteiny vysoce konzervovány mezi jednotlivými rostlinnými druhy. Naproti tomu je překvapivé, že v řasách *Volvox carteri* ani *Chlamydomonas reinhardtii* se tyto geny nenacházejí. Geny *ALDH7*, u ostatních rostlin jinak přítomné, byly zřejmě ztraceny vlivem evolučního tlaku (Brocker *et al.*, 2013). ZmALDH7 sdílí s PsALDH7 78% sekvenční identitu, a proto oba tyto enzymy patří do jedné specifické ALDH7B podrodiny spolu s dalšími rostlinnými ALDH (Končítíková *et al.*, 2015).



Obr. 3 Oxidace α -aminoadipát-semialdehydu na α -aminoadipovou kyselinu za katalýzy ALDH7. Upraveno podle Končítíkové et al. (2015).

2.3.2 Substrátová specifita ALDH7

Z hodnot katalytické účinností vyplývá, že nejlepším substrátem pro hALDH7 i rostlinné ALDH7 je α -aminoadipát-semialdehyd (Obr. 3) (Končítíková *et al.*, 2015). Rostlinné ALDH7 mají oproti hALDH7 mnohem užší substrátovou specifitu. hALDH7 je schopen katalyzovat oxidaci ω -aminoaldehydů (betainaldehydu (BAL), 3-aminopropanalu (APAL), 4-aminobutanalu (ABAL), guanidinobutanalu (GBAL) a 3,3,3-trimethyl-3-aminopropanalu (TMAPAL) s vyšší katalytickou účinností. Z vyjmenovaných substrátů byly rostlinné ALDH7 schopny katalyzovat s obdobnou katalytickou účinností oxidaci guanidinobutanalu (Končítíková *et al.*, 2015). Alifatické i aromatické aldehydy jsou pro isoformy ALDH7 horší substráty, velmi nízkou aktivitu pak ALDH7 měly v kombinaci s produkty peroxidace lipidů, jako je *trans*-2-hexenal, *trans*-2-nonenal či malondialdehyd. Preferovanějším koenzymem u lidské i rostlinných ALDH7 je NAD⁺ (Končítíková *et al.*, 2015).

Rostlinná ALDH7 má významnou aminoaldehyddehydrogenasovou aktivitu, neboť enzymy jsou schopny oxidovat GBAL, APAL a ABAL, které poskytují cytosolické osmoprotektivní látky 4-guanidinobutyryát, β -alanin či GABA. GBAL je meziprodukt

katabolismu argininu. Uvolněný 4-guanidinobutyryát může poté být hydrolyzován ureohydrolasou na močovinu a GABA (Končítíková *et al.*, 2015).

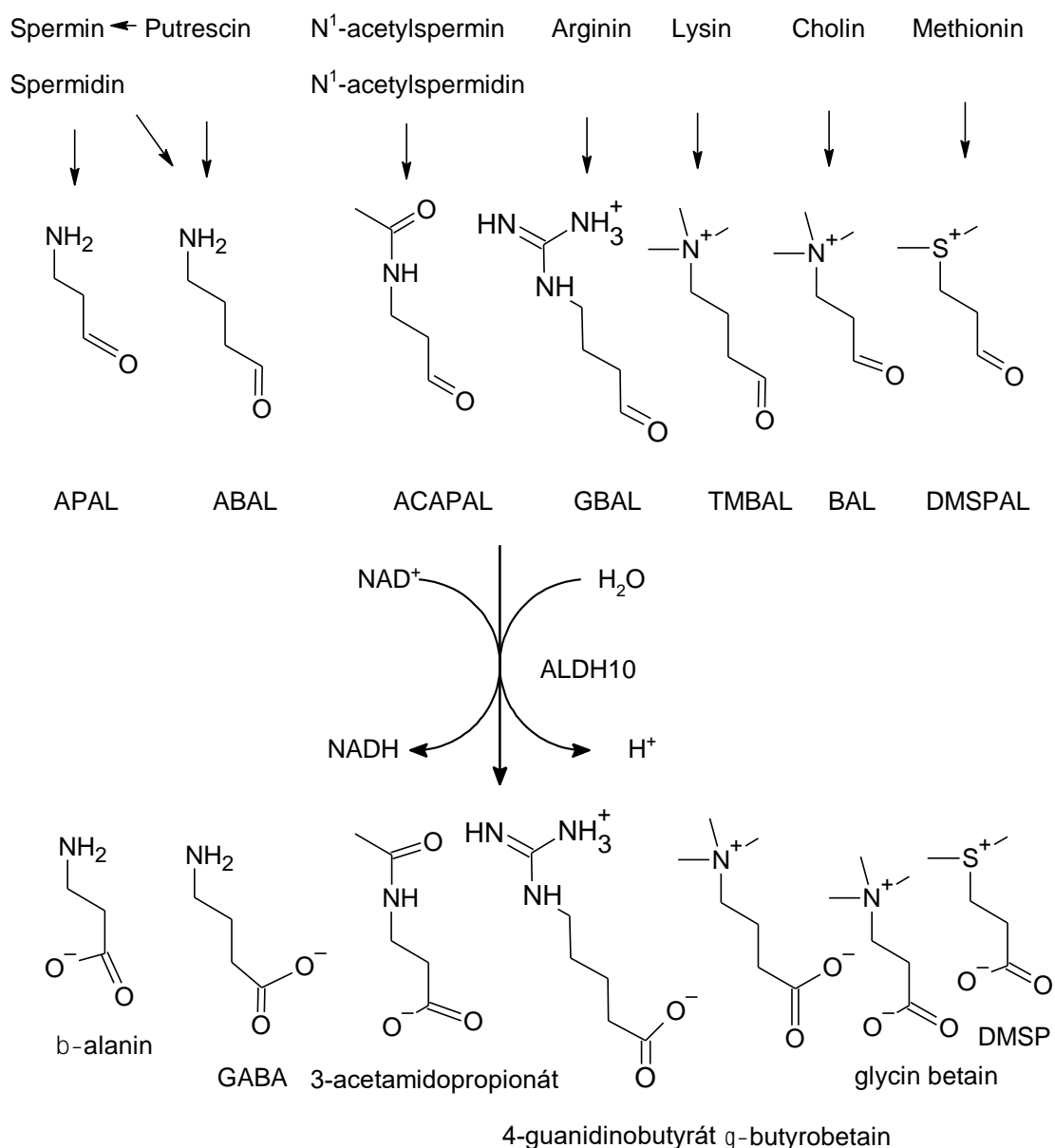
2.3.3 Struktura ALDH7

ZmALD7 enzym vytváří homotetramer, kdy je každá podjednotka tetrameru složena z domény, kde se váže koenzym, katalytické domény a oligomerizačního místa. Vstupy do substrátového tunelu a do NAD(P)⁺-vazebného místa leží na protějších stranách monomeru. Do dutiny blízko NAD(P)⁺-vazebného místa je navázán sodný ion, který má pravděpodobně vliv na strukturu monomeru (Končítíková *et al.*, 2015).

Monomer ZmALDH7 je velmi podobný hALDH7 a ALDH7 pražmy královské (*Sparus aurata*). Residua aktivního místa jsou téměř identická, což také poukazuje na možnost stejné role v buňkách rostlin, savců či ryb za použití AASAL jako preferovaného substrátu (Končítíková *et al.*, 2015). Vazebné místo pro substrát obsahuje tři konzervované residua Glu120, Arg300 a Thr302. Tyto aminokyseliny jsou specifické pro rodinu ALDH7. Na základě experimentů cílené mutagenese bylo zjištěno, že Glu120 residuum se váže na α -aminoskupinu AASAL, zatímco Arg300 vytváří vazbu s karboxylátovým postranním řetězcem AASAL. Význam Thr302 spočívá pravděpodobně ve tvorbě vazby na karboxylátový postranní řetězec AASAL, obdobně jako Arg300 (Tang *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2011). Na základě kinetické analýzy lze usoudit, že pro dosažení vyšší hodnoty k_{cat} enzymu je nutno, aby substrát obsahoval α -aminoskupinu. Pro snížení hodnoty K_m je nezbytné, aby substrát navíc obsahoval karboxylovou skupinu (Končítíková *et al.*, 2015).

2.4 ALDH10 rodina

Isoenzymy rodiny ALDH10 jsou též známé jako aminoaldehyddehydrogenasy (AMDH; EC 1.2.1.19), 4-aminobutyraldehyddehydrogenasy, 4-guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.54) či betainaldehyddehydrogenasy (BADH; EC 1.2.1.8). Tyto enzymy jsou spjaty s degradací polyaminů, konkrétně s oxidací reaktivních aminoaldehydů (APAL, ABAL), které vznikají při reakci polyaminů s rostlinnou aminoxidasou (Šebela *et al.*, 2000). Oxidací APAL a ABAL následně vznikají netoxické metabolity β -alanin a kyselina γ -aminomáslená (GABA) (Brocker *et al.*, 2013).



Obr. 4 Reakce katalyzované ALDH10. 3-aminopropanal (APAL) je oxidován na β -alanin, 4-aminobutanal (ABAL) na kyselinu γ -aminomáselnou (GABA), 3-acetamidopropanal (ACAPAL) na 3-acetamidopropionát, 4-guanidinobutanal (GBAL) na 4-guanidinobutyrát, N, N, N-trimethylaminobutanal (TMBAL) na γ -butyrobetain, betainaldehyd (BAL) na glycin betain a 3-dimethylsulfiopropanal (DMSPAL) na 3-dimethylsulfiopropionát (DMSP). Upraveno podle Kopečného *et al.* (2013).

ALDH10 isoenzymy mají z hlediska svého studia ekonomický potenciál, neboť se v rostlinách podílejí na řadě různých fyziologických pochodů, jako je například obrana proti stresu pomocí produkce osmoprotektivního glycin betainu (GB). GB je hlavním buněčným osmolytem a taktéž se chová jako molekulární chaperon, který slouží ke stabilizaci struktury a funkce proteinů (Allakhverdiev *et al.*, 2008). Vyšší rostliny na

základě schopnosti akumulace GB můžeme dělit na GB-akumulující a GB-neakumulující (Fitzgerald *et al.*, 2009). Je však zajímavé, že obě tyto skupiny ve svých genomech obsahují *ALDH10* geny ve svých genomech, což naznačuje, že funkce těchto enzymů je mnohostranná (Brocker *et al.*, 2013).

AMDH isoenzymy mají taktéž roli v dalších ekonomicky významných aspektech. Bylo například prokázáno, že vlivem mutace *AMDH* genu vedlo k acetylaci volného ABAL a následné akumulaci 2-acetyl- Δ^1 -pyrrolinu, který udílí charakteristickou vůni odrůdám Jasmine nebo Basmati (Arikiti *et al.*, 2011; Bradbury *et al.*, 2008).

Rodina *ALDH10* se v genomu savců nevyskytuje, pravděpodobně je totiž nahrazena rodinami *ALDH9* a *ALDH7*, které jsou schopny katalyzovat syntézu GB a γ -butyrobetainu (Brocker *et al.*, 2013; Vaz *et al.*, 2000).

2.4.1 Fylogenetická analýza

ALDH10 geny identifikované ve většině rostlinných druhů jsou vysoce homologní a spadají do podrodiny *ALDH10A*. Nižší rostliny jako mechy či řasy obsahují vždy jeden samostatný *ALDH10* gen. *ALDH10* gen identifikovaný v jednobuněčné řase *Chlamydomonas reinhardtii* kóduje protein sdílející 72 % sekvenční identity s genem identifikovaným v řase *Volvox carteri* a 60 % sekvenční identity s ostatními sekvencemi rostlinných genů včetně genů identifikovaných ve vyšších rostlinách, díky čemuž taktéž tento gen spadá do *ALDH10A* podrodiny. Naproti tomu je gen *V. carteri* méně homologní s ostatními *ALDH10* sekvencemi a tím pádem spadá do nové podrodiny pojmenované *ALDH10C1* (Brocker *et al.*, 2013).

Cévnaté rostliny obsahují dva *ALDH10A* geny, což naznačuje, že k duplikaci genu došlo až po divergenci vyšších rostlin od nižších. Na tento fakt poukazuje přítomnost dvou *ALDH10* genů identifikovaných v topolu chlupatoplodém (*Populus trichocarpa*), *ALDH10A8* a *ALDH10A9*, které leží na různých chromozomech, avšak architektura tohoto genu je shodná včetně okolní oblasti chromozomu, což poukazuje na duplikaci segmentu vlivem evoluce. Taktéž je znám důkaz o přítomnosti i více než dvou *ALDH10* genů, a sice v genomu kukuřice (*Z. mays*). Gen kukuřice obsahuje tři *ALDH10* geny, z nichž dva (*ALDH10A8* a *ALDH10A9*, též známé jako *AMDH1A* a *AMDH1B*) jsou duplikovány zcela (Brocker *et al.*, 2013).

2.4.2 Substrátová specifita ZmALDH10

Všechny isoenzymy ZmALDH10 jsou NAD⁺-specifické, neboť jejich koenzym-vazebná doména obsahuje konzervovanou aminokyselinu glutamát, která zabraňuje vazbě 2'-fosfátové skupiny NADP⁺ (Kopečný *et al.*, 2013).

Isoenzymy ZmAMDH jsou schopny katalyzovat nejlépe tří- a čtyřuhlíkaté aldehydy či aminoaldehydy. Isoenzymy ZmALDHAMDH1A, ZmAMDH1B i ZmAMDH2 nejlépe katalyzují ω -aminoaldehydu 3-aminopropanalu (APAL). Methylové a guanidinové deriváty, jako je N,N,N-trimethyl-3-aminopropanal (TMAPAL) a 3-guanidinopropanal (GPAL), jsou těmito enzymy taktéž oxidovány, oproti tomu jsou však hydroxyderiváty oxidovány mnohem pomaleji. ZmAMDH1A má překvapivě vysokou aktivitu při použití betain aldehydu (BAL) (Kopečný *et al.*, 2013).

2.4.3 Struktura ZmALDH10

ZmALDH10 je homodimer, jehož jednotlivé podjednotky jsou složeny ze tří charakteristických domén, NAD(P)⁺-vazebné domény (residua 1 – 131, 152 – 261 a 456 – 480), katalytické domény (residua 262 – 455) a oligomerizační C-terminální domény (132 – 151 a 481). Dimery zároveň obsahují monovalentní kation ukotvený v konzervované jamce tvořené třemi karboxylovými skupinami (Val-30, Asp-101 a Leu-191) a jednou karboxylovou skupinou Asp-101 (Kopečný *et al.*, 2013). Homodimer je spojen oligomerizačními doménami tak, aby NAD(P)⁺-vazebné domény a katalytické domény ležely naproti sobě, přičemž katalytický cystein leží mezi těmito doménami (Kopečný *et al.*, 2013).

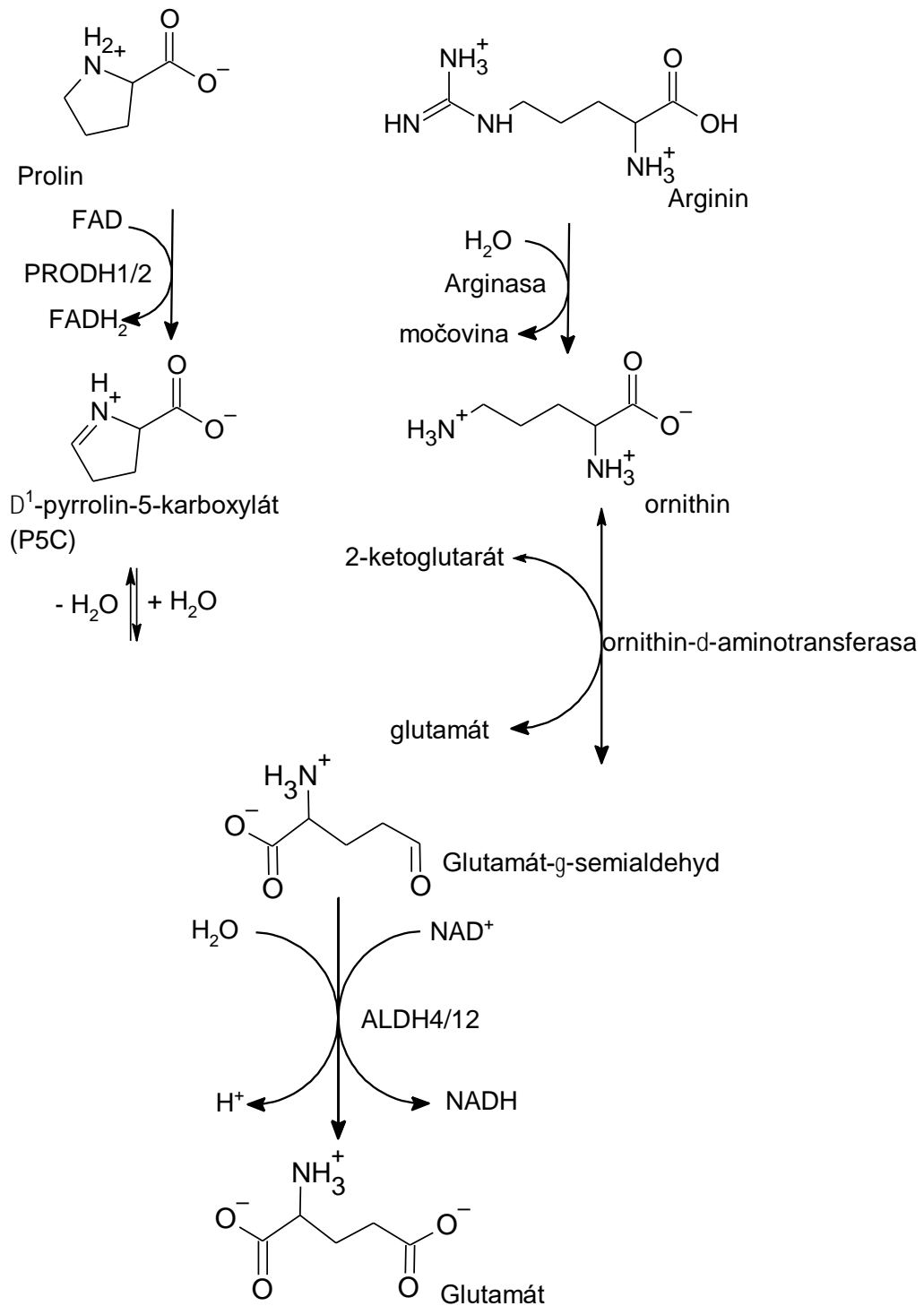
2.5 ALDH12

Rodina genů ALDH12 je rodina rostlinných enzymů ze skupiny GSALDH enzymů (glutamát- γ -semialdehyddehydrogenasy, E. C. 1.2.1.88). Aby daný enzym patřil do stejné ALDH rodiny, je potřeba, aby se svou primární strukturou shodoval alespoň ze 40 % s ostatními členy dané ALDH rodiny (Vasiliou *et al.*, 1999). Tyto rostlinné enzymy se však svou aminokyselinovou sekvencí shodují pouze ze zhruba 24 % s rodinou ALDH4 vyskytující se u ostatních organismů mimo rostliny, proto bylo nutné tuto rodinu vyčlenit (Brocker *et al.*, 2013).

ALDH12 enzymy mají klíčovou roli v katabolismu prolinu a argininu (Obr. 5) (Brocker *et al.*, 2013). V rámci katabolismu prolinu vzniká jako meziprodukt glutamát- γ -semialdehyd (GSAL), který vzniká hydratací Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátu (P5C) za katalýzy flavinovým enzymem prolindehydrogenasa (PRODH, E. C. 1.5.5.2)

(Nakashima *et al.*, 1998; Funck, Eckard a Muller, 2010). GSAL je následně pomocí GSALDH oxidován na glutamát. Prolin a jeho metabolismus je v rostlinách uplatňován jako odpověď na změny v osmolaritě půdního roztoku (Hare, Cress, 1997), napadení patogeny (Cecchini *et al.*, 2011) nebo jako zdroj energie při zrání pylových zrn a klíčení (Schwacke *et al.*, 1999). Má též vliv na oddálení senescence (Zhang a Becker, 2015). Arginin je prekurzor syntézy polyaminů (Bagni a Tassoni, 2001; Illingworth *et al.*, 2003), látek podílejících se na odpovědi na stres u rostlin a taktéž na embryogenezi, organogenezi, růstu rostlin i následné senescenci (Page *et al.*, 2012; Majumdar *et al.*, 2013; Pathak *et al.*, 2014). Taktéž má vliv na produkci oxidu dusnatého a udržování rovnováhy koncentrace organického dusíku v buňce (Maiale *et al.*, 2004; Marco *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Minocha *et al.*, 2014; Pathak *et al.*, 2014; Tiburcio *et al.*, 2014).

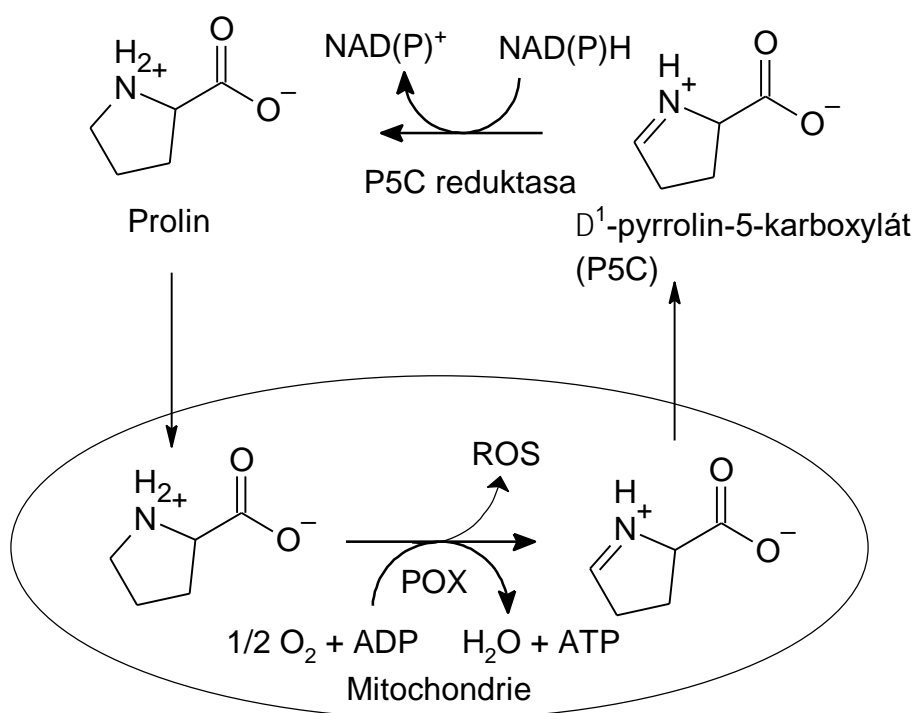
Důkladně byl prozkoumán enzym P5CDH u *Arabidopsis thaliana*. Tento enzym se nachází v matrix mitochondrií. K indukci exprese dochází vlivem zvýšení koncentrace prolinu, nikoli však vlivem osmotického stresu (Deuschle *et al.*, 2001; Kirch *et al.*, 2005). Mutanti *p5cdh* jsou hypersenzitivní na prolin, arginin či ornithin. Předpokládá se, že akumulace P5C jakožto meziprojektu katabolismu prolinu je příčinou následné buněčné smrti. Jednotlivé analyzované rostlinné druhy obsahují pouze jediný *ALDH12* gen. Veškeré aminokyselinové sekvence předpokládané při expresi tohoto genu vykazují více než 60% identitu, proto patří do stejné podrodiny ALDH12A. Při tak vysokém stupni konzervace pozorované napříč evolučně vzdálenými druhy naznačuje existenci selektivního tlaku na udržení funkce daného genu (Brocker *et al.*, 2013).



Obr. 5 Reakční schéma katabolismu prolinu a argininu. Obě aminokyseliny jsou během své degradace přeměněny na glutamát- γ -semialdehyd (GSAL), který je následně oxidován ALDH12 na glutamát za použití koenzymu NAD⁺. Stejnou reakci v jiných organismech katalyzuje ALDH4. Upraveno podle Korasick *et al.* (2018).

Katabolická dráha prolinu je u rostlin negativně regulována vlivem osmotického stresu spouštějícího akumulaci prolinu. Na akumulaci se podílí existence P5C-prolinového cyklu. Tento mitochondriálně-cytosolický cyklus způsobuje redukci

vzniklého P5C zpět na prolin. Vlivem hyperaktivity cyklu však dochází ke vzniku mitochondriálních reaktivních forem kyslíku (ROS). Nedostatečná aktivita P5CDH způsobená nárůstem koncentrace prolinu za světla i tmy vede k vyšší produkci ROS a zároveň k hypersenzitivitě na teplotní stres. Kompenzace produkce mitochondriálního ROS během zvýšené oxidace prolinu je proto zásadní pro vyloučení toxických účinků. Oxidace P5C na Glu katalyzovaná P5CDH je tudíž klíčem k zabránění hyperaktivity P5C-Pro cyklu a k inhibici produkce ROS z odběru elektronů. (Miller *et al.*, 2009).



Obr. 6 P5C-prolinový cyklus. Prolin, který je možno transportovat skrz membránu mitochondrie, je pomocí POX (prolinoxidasy) oxidován na P5C. Během této oxidace dochází zároveň ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). Vyvořeno podle Millera *et al.* (2009).

2.5.1 Fylogenetická analýza ALDH12 rodiny

Rostlinný gen *ALDH12* je gen umístěný na jediném lokusu, obsahující 15 či 16 exonů (Korasick *et al.*, 2018). Gen *ALDH12* se poprvé vyskytl napříč infraříše Alveolata protista, zahrnující kmen obrněnky (Dinoflagellata), mezi něž se řadí například jednobuněčná řasa *Symbiodinium microadriaticum*, patogen ústřic *Perkinsus marinus* či savčí patogen *Toxoplasma gondii* (Korasick *et al.*, 2018). V říši Excavata je *ALDH12* přítomna v *Stygiella incarcerata* (A0A192ZIT0), bičíkaté protista z kmene Jakobea (Korasick *et al.*, 2018).

Kompletní sekvence *ALDH12* byla nalezena v genomech zelených řas a ve všech studovaných vyšších rostlinách (*Embryophyta*). *ALDH12* je přítomen v obou odděleních zelených řas (Chlorophyta a Charophyta), v červených kryptomonádách, zelených Chlorarachniophyta, Haptophyta či v bezbarvých rostlinných patogenech, jako je například *Phytophthora*. Porovnání s výskytem *ALDH4* a *ALDH12* vykazuje výměnu *ALDH4* za *ALDH12* mezi nejstaršími eukaryoty během evoluce endosymbiotických rostlinných předků již před vývojem zelených řas a suchozemských rostlin (Korasick *et al.*, 2018).

2.5.2 Substrátová specifita ZmALDH12 a PpALDH12

Oba isoenzymy mají úzkou substrátovou specifitu k GSAL a semialdehydu kyseliny glutarové (GRSAL), přičemž u GSAL vykazují nejvyšší katalytickou účinnost. (Korasick *et al.*, 2018). Tyto dva substráty se liší pouze v přítomnosti pozitivně nabitě aminoskupiny u GSAL. Ostatní testované substráty z řady alifatických i aromatických aldehydů či semialdehydů však vykazovaly výrazně nižší aktivitu než preferovaný substrát GSAL (Korasick *et al.*, 2018).

ZmALDH12 využívá jako svůj koenzym především NAD^+ , což dokazuje hodnota zdánlivé katalytické účinnosti (k_{cat}/K_m), která je pro NAD^+ 60krát vyšší než pro NADP^+ (Korasick *et al.*, 2018).

2.5.3 Struktura ZmALDH12

Celková podoba ZmALDH12 je srovnatelná s ostatními enzymy ALDH nadrodiny. ZmALDH12 je složená ze tří (Vasilliou *et al.*, 1999) domén: NAD^+ -vazebného místa (residua 28 – 170, 190 – 295 a 519 – 527), katalytického α/β místa (residua 296 – 497) a oligomerizační klapky (residua 171 – 189 a 528 – 549). NAD^+ -vazebná doména je tvořena, podobně jako u jiných GSALDH, zkráceným Rossmannovým záhybem složeným do struktury paralelního β -listu z pěti vláken. Katalytické α/β místo obsahuje

katalytické residuum Cys330 na kličce ležící mezi katalytickou doménou a NAD⁺-vazebnou doménou. C-terminální oligomerizační klapka vytváří antiparalelní třívláknový β -list zprostředkovávající klasický ALDH dimer s prohozenými doménami. Residua 498 – 518 vytvářejí interdoménový linker, který slouží jako víko aktivního místa, a kotvící smyčce pro aldehyd v aktivním místě (Korasick *et al.*, 2018).

Aktivní místo je tvořeno katalytickým Cys330 umístěným na smyčce lemované z každé strany konzervovanými Lys329 a Ser331, které koordinují karboxylovou skupinu GSAL. Residuum Asn201 vytvářející vodíkový můstek s atomem kyslíku aldehydové skupiny se nachází na smyčce přilehlé ke katalytické smyčce. Pro stabilizaci alifatického řetěze GSAL slouží box tvořený aromatickými residui Phe202 a Phe205. Tyto aminokyseliny jsou konzervovány ve všech ALDH4 i ALDH12 enzimech. Kotvící smyčka tvořená residui 497 – 499 vytváří dutinu pro substrát kolem karboxylové i aminoskupiny substrátu/produktu. Tato struktura, podobná svou konformací i myší ALDH4 (MmALDH4), naznačuje, že smyčka stabilizuje aminokyselinový skelet substrátu/produktu pomocí vodíkových můstků. Zbylý prostor aktivního místa je tvořen dvěma hydrofobními aminokyselinami Ile206 a Ila516 (Korasick *et al.*, 2018).

2.6 ALDH21

Rodina ALDH21 byla relativně nedávno objevena jakožto součást nadrodiny ALDH, která se vyskytuje u rostlin a bakterií (Brocker *et al.*, 2013). Exprese *ALDH21* genu u mechů *Syntrichia (Tortula) ruralis* a *Syntrichia caninervis* je silně indukována jako odpověď na stres vytvořený suchem, přičemž po rehydrataci dochází k opětovnému zeslabení exprese (Chen *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2012). Taktéž bylo prokázáno, že zvýšení exprese v bavlníku a tabáku zvyšuje zároveň jejich odolnost vůči suchu a vyšší koncentraci solí (Yang *et al.*, 2015, 2016).

Enzymy ALDH21 jsou cytosolické enzymy katalyzující oxidaci sukcinyl-semialdehydu (SSAL) na kyselinu sukcinovou za použití NADP⁺ koenzymu. Tyto enzymy mají významný podíl v metabolismu kyseliny γ -aminomáselné (GABA) (Bouché *et al.*, 2003; Fait *et al.*, 2008). V rostlinách se vyskytuje konzervovaná metabolická dráha zvaná GABA přepínač, která umožňuje obejít dva kroky Krebsova cyklu. GABA je syntetizována z glutamátu enzymem glutamátdekarboxylasa (GAD, E. C. 4. 1. 1. 15) v cytosolu. Alternativní dráha pro syntézu GABA z polyaminů je katalyzována aminoxidasami obsahujícími měď (Fincato *et al.*, 2011; Planas-Portell

et al., 2013) nebo pomocí FAD-dependentních aminoxidas a AMDH (Tylichová *et al.*, 2010; Kopečný *et al.*, 2013; Zarei *et al.*, 2016). Po vstupu GABA do mitochondrie dochází ke konverzi na SSAL, který je v mitochondriích oxidován za katalýzy ALDH5 na sukcinát. Sukcinát je následně metabolizován pomocí Krebsova cyklu (Kopečná *et al.*, 2017). Konverze SSAL však nemusí probíhat pouze v mitochondriích, což naznačuje, že SSAL se může pohybovat mezi mitochondriemi, cytosolem a chloroplasty. SSAL může taktéž být produkován těmito kompartmenty. Přítomnost ALDH21 v cytosolu v nižších rostlinách, který katalyzuje stejnou reakci jako ALDH5 v mitochondriích, činí tím pádem tuto metabolickou dráhu mnohem různorodější (Kopečná *et al.*, 2017).

2.6.1 Fylogenetická analýza rodiny ALDH21

Kompletní sekvence *ALDH21* genu je přítomna v genomech zelených řas *Coccomyxa subellipsoidea* a *Klebsormidium flaccidum*, mechorostech (*P. patens*, *Sphagnum fallax*, *Tortula ruralis*, *S. caninervis*) a plavuních (*S. moellendorffii*). Různé fragmenty tohoto genu se nacházejí rovněž v kaprad'orostech, avšak v genomech kvetoucích rostlin již *ALDH21* chybí zcela (Kopečná *et al.*, 2017).

ALDH21 gen je taktéž možné nalézt v genomech některých bakterií a prvoků. Původní předpoklad byl, že *ALDH21* geny kódují proteiny, které jsou nejvíce podobně členům ALDH11 rodiny, a tím pádem by ALDH11 a ALDH21 rodiny mohly mít společný původ (Brocker *et al.*, 2013). Novější studie však poukazují na to, že fylogenetická analýza poukazuje na spojení mezi rodinou ALDH21 a rodinou ALDH5, nikoli ALDH11 (Kopečná *et al.*, 2017). *ALDH5* geny se vyskytují v genomech bakterií a různých rostlinných druhů včetně řas, mechorostů a plavuní, přičemž zelené řasy *Coccomyxa* a *Klebsormidium*, mechorosty i plavuně obsahují i geny *ALDH21*. Genom *P. patens* obsahuje dva geny, *ALDH5F1* a *ALDH5F2*, které jsou tvořeny 19 a 20 exony (Brocker *et al.*, 2013), zatímco *ALDH21* je tvořen 8 exony, nachází se na jediném chromozomu a kóduje protein složený ze 497 aminokyselin (Kopečná *et al.*, 2017).

2.6.2 Substrátová specifita PpALDH21

Na rozdíl od ALDH5 isoenzymů, PpALDH21 má 1000krát vyšší hodnotu katalytické účinnosti při použití NADP⁺ než při použití NAD⁺ jako koenzymu. Z toho vyplývá, že PpALDH21 je NADP⁺- dependentní (Kopečná *et al.*, 2017).

PpALDH21 má velmi úzkou substrátovou specifitu, neboť katalyzuje především sukcinyl-semialdehyd. Druhý nejlepší substrát, semialdehyd kyseliny glutarové, je

katalyzován pouze z 1,2% relativní aktivity vztažené k aktivitě enzymu při použití SSAL a NADP⁺ jako koenzymu. Ostatní substráty, jako jsou alifatické a aromatické aldehydy či aminoaldehydy, byly katalyzovány tímto enzymem velmi pomalu (relativní aktivita byla menší než 0,1 % v porovnání s aktivitou při použití SSAL) (Kopečná *et al.*, 2017).

2.6.3 Struktura PpALDH21

PpALDH21 je, obdobně jako sukcinyl-semialdehyddehydrogenasy *E. coli* či lidská SSALDH, homotetramer, jehož jednotlivé podjednotky jsou charakteristické struktury jako ostatní ALDH členové. Každý monomer obsahuje katalytickou (residua 269–455), oligomerizační (138–161 a 484–497) a koenzym vazebnou doménu (residua 17–137, 162–268 a 456–483). Oligomerizační doména jedné podjednotky se váže do žlábků mezi katalytickou a koenzym vazebnou doménou podjednotky druhé (Kopečná *et al.*, 2017).

Komplex tetrameru PpALDH21 se sukcinátem je téměř identický s apoformou. Nálevkovitě tvarovaný substrátový kanál se nachází na rozhraní katalytické a koenzym vazebné domény jednoho monomeru a oligomerizační domény monomeru druhého. Povrch tohoto tunelu je bohatý na residua argininu (Arg-148, Arg-492 a Arg-289), které slouží k nasměrování negativně nabitě karboxylátové skupiny SSAL do úzkého aktivního místa (Kopečná *et al.*, 2017).

Uvnitř aktivního místa tvoří Arg121 a Arg457 solné můstky s jednou z karboxylátových skupin sukcinátu, která rovněž interaguje s flexibilním residuem Tyr296. Zatímco v apoformě je tento tyrosinový zbytek vázán vodíkovou vazbou k residuu Ser301, v přítomnosti SSAL dochází ke změně konformace vedoucí k navázání na karboxylátovou skupinu a zároveň na guanidylovou skupinu Arg121. Tato změna vede k vytěsnění rozpouštědla. Oba argininové zbytky jsou pro katalýzu nezbytné a na rozdíl od tyrosinu svou konformaci nemění, neboť interagují prostřednictvím vody s vysoce konzervovanými aminokyselinami Asp459 a Glu474. Residuum Arg121 tvoří solný můstek s residuem Asp459, který je fixován interakcí s residui His179 a Asn175. Druhá karboxylátová skupina, která vznikla oxidací SSAL, vytváří vodíkovou vazbu s residuem Ser301, atomem dusíku katalytického Cys302 a s residuem Asn171. Katalytický Cys302 má postranní řetězec otočený pryč od produktu sukcinátu (Kopečná *et al.*, 2017).

Vazebné místo pro koenzym obsahuje v ALDH21 vysoce konzervované aminokyseliny Ser197 a Arg228, které vytvářejí vodíkové můstky s fosfátovým aniontem NADP⁺ (Kopečná *et al.*, 2017).

2.7 RT-PCR

RT-PCR je *in vitro* metoda enzymatické amplifikace definovaných sekvencí RNA, která umožňuje analýzu různých sekvencí z jediné buňky v rámci jediného experimentu (Rappolee *et al.*, 1988). Jedná se jednu z nejcitlivějších a nejrozšířenějších kvantifikačních metod sloužících pro porovnání hladiny mRNA v různých vzorcích, charakterizaci exprese mRNA v daném organismu, analýzu RNA či rozlišení velmi podobných mRNA (Wang a Brown, 1999). RT-PCR lze taktéž využít pro syntézu kompletních komplementárních DNA (cDNA) inzertů pro klonování nebo pro určení libovolných sekvencí cDNA knihoven (Borson *et al.*, 1992; Neto *et al.*, 1997; Bustin, 2000).

V průběhu vývoje RT-PCR technik bylo cílem maximalizovat citlivost, což na druhou stranu v případě některých technik a postupů vedlo k ohrožení specifity reakce. Tyto techniky zvyšují pravděpodobnost kontaminace a detekce falešně pozitivních signálů, kdy není možnost rozlišit pravou transkripci na nízké úrovni od transkripce nežádané (Kwok a Higuchi, 1989; Chelly *et al.*, 1989; Henke *et al.*, 1997; Bustin, 2000).

RT-PCR je komplexní experiment, při němž jsou veškeré fyzikální aspekty i chemické komponenty vzájemně závislé, proto je nutné tyto aspekty při optimalizaci metody vždy pečlivě zvážit. Taktéž je velmi důležité pochopení hlavního cíle daného testu. Při klinických testech je nejdůležitější dosáhnout co největší specifity, senzitivity a opakovatelnosti metody. Naopak věrohodnost metody je důležitým faktorem při analýze mutací, genové exprese či klonování (Bustin, 2000).

Prvním krokem RT-PCR je reverzní transkripce RNA do cDNA, která je následně amplifikována pomocí PCR reakce. Tento krok je nutný, neboť samotná RNA není templátem pro PCR. Reverzní transkripce využívá vyhraněných DNA- a RNA-dependentních DNA polymeras buď v oddělených (dva enzymy/dvě zkumavky), nebo ve společných (dva enzymy/jedna zkumavka) reakcích. Použití těchto enzymů umožňuje přizpůsobení jednotlivých testů RT-PCR. Separace kroků reverzní transkripce a PCR je výhodná v tom, že je získána stabilní zásoba cDNA, která může

být skladována bez omezení. Kromě těchto postupů lze též využít bifunkční RNA- i DNA- dependentní polymerasy, která minimalizuje riziko kontaminace (Bustin, 2000).

Po reverzní transkripci následuje samotná PCR. Dříve byla RT-PCR vyhodnocována pomocí následné gelové elektroforézy a dalších časově náročných kroků, jako je Southern blot či DNA sekvencování. V dnešní době jsou však již k dispozici moderní techniky real-time RT-PCR, které pro získání dat mají v termocykleru zabudovaný detektor. Detektor zachytává signál ve formě fluorescenčního záření po každém cyklu. Kvantitativní výsledek je následně zpracován počítačem (Bustin, 2000).

V dnešní době se využívá mnohých technologií, které slouží jako zdroj fluorescence při real-time PCR, mezi něž patří například technologie molekulárních majáků (Molecular Beacon sondy), Scorpion sondy či velmi často používané TaqMan sondy a SyberGreen interkalační barvivo.

2.7.1 SyberGreen technologie

SYBR barvivo detekuje produkty polymerázové řetězcové reakce navázáním na dvouvláknovou DNA, která se vytváří během PCR. SYBR barvivo se po přidání ke vzorku okamžitě váže na veškerou dvouvláknovou DNA, která se v daném vzorku nachází. Během PCR dochází k amplifikaci cíleného DNA produktu a SYBR barvivo se váže na každou novou kopii dvouvláknové DNA. Během každého cyklu dochází k vytvoření dalšího PCR produktu a tím pádem i k nárůstu intenzity fluorescence, která je úměrná vytvořenému PCR produktu. Metoda SYBR Green je využitelná při studii genové exprese, DNA kvantifikace pro detekci patogenů či metodě imunoprecipitace chromatinu (Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html> (2. 4. 2019)).

Mezi hlavní výhody SYBR barviva patří to, že toto interkalační barvivo se váže nespecificky na jakoukoli dvouvláknovou DNA. Tato výhoda spočívá v tom, že k hodnocení amplifikace není potřeba použít specifickou sondu. Další výhodou je v použití SYBR barviva při amplifikaci jakékoli DNA sekvence (Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html> (2. 4. 2019)).

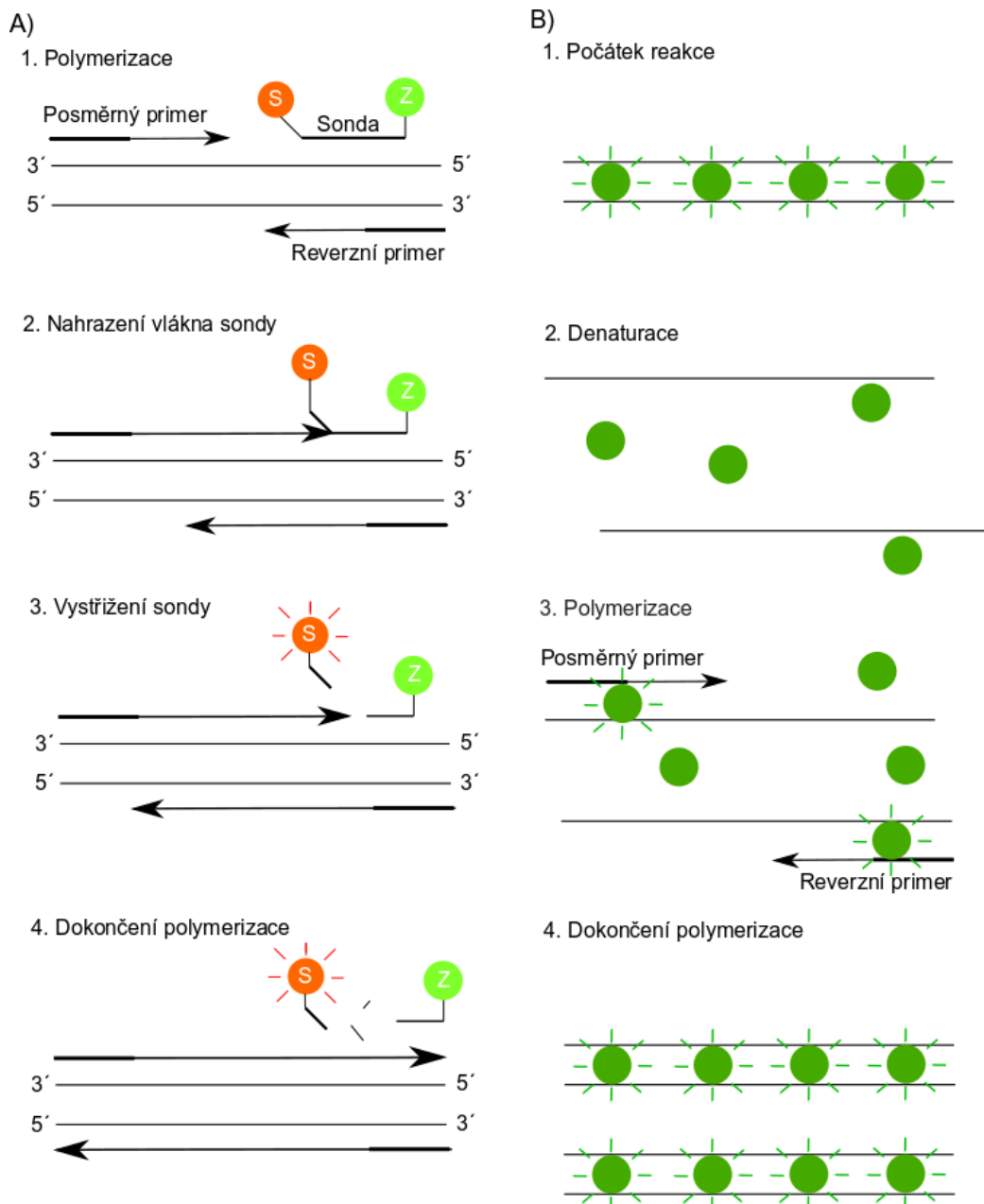
Tato metoda má však i řadu nevýhod. Hlavní nevýhodou je možnost tvorby falešně pozitivního signálu, kdy se SYBR může navázat na jakoukoli nespecifickou

dvouvláknovou sekvenci DNA. Další nevýhoda tkví v nutnosti mít správně navržené primery, které nebudou amplifikovat necílové sekvence (Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html> (2. 4. 2019)).

2.7.2 TaqMan technologie

TaqMan technologie byla vyvinuta kvůli zamezení získávání falešně pozitivního signálu. TaqMan využívá fluorogenně značené sondy v kombinaci s 5' nukleasovou aktivitou *Taq* DNA polymerasy. Tato sonda obsahuje signální fluorescenční barvivo na 5' konci a zhášedlo na 3' konci. Pokud je sonda neporušená, blízká vzdálenost zhášedla významně omezuje fluorescenční záření emitované signálním barvivem kvůli Försterovu rezonančnímu přenosu energie (FRET). Pokud je ve vzorku přítomna cílová sekvence, dochází k navázání sondy po směru jednoho z primerů. Sonda je následně vlivem prodloužení primeru štěpena 5' nukleasovou aktivitou *Taq* DNA polymerasy. Vlivem tohoto štěpení dochází k uvolnění signálního barviva od zhášedla a zároveň k odstranění sondy z cílového řetězce, což umožňuje prodloužení řetězce až na konec řetězce templátu. Použití sondy tím pádem neinhibuje celkový proces PCR. Během každého cyklu se uvolní další molekuly signálního barviva, což vede ke zvýšení intenzity fluorescence, která je opět úměrná množství vyrobeného amplikonu (Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html> (2. 4. 2019)).

Výhody použití TaqMan technologie tkví v zajištění specifické hybridizace mezi sondou a primerem, a tím pádem omezení falešné positivity signálu. Sondy navíc mohou být značeny různými signálními barvivy, což umožňuje detekci amplifikace dvou odlišných sekvencí v jediné reakční zkumavce. Hlavní nevýhodou je nutnost syntézy různých sond pro detekování různých sekvencí (Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html> (2. 4. 2019)).



Obr. 7 Porovnání detekce amplifikace pomocí TaqMan sond a SYBR Green barviva. A) Technologie TaqMan sond. 1. Během navázání primerů dochází zároveň k navázání sondy nesoucí signální barvivo (S) a zhášedlo (Z). 2. Dokud je sonda neporušená, dochází ke zhášení emise signálního barviva. 3. Jakmile dojde k odštěpení signálního barviva od zbytku sondy, signální barvivo začne emitovat fluorescenční záření. 4. Po dokončení polymerizace stále dochází k emisi fluorescenčního záření signálním barvivem. B) Technologie SYBR Green barviva. 1. Při smíchání barviva se vzorkem se barvivo naváže na dvouvláknovou DNA. 2. Vlivem vysoké teploty dochází k denaturaci DNA, barvivo je uvolněno a jeho emise fluorescenčního záření je výrazně omezena. 3. Po navázání primerů a započnutí syntézy nového vlákna se barvivo opět váže mezi na dvouvláknové řetězce. 4. Po dokončení polymerizace dochází k nárůstu signálu fluorescenčního záření emitovaného barvivem navázaným na dvouvláknovou DNA. Upraveno podle internetové stránky Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html> (2. 4. 2019).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Biologický materiál

- kukuřice setá (*Zea mays*), vzorky poskytla Nuria Diego, Oddělení chemické biologie a genetiky, Centrum regionu Haná
- čepenka odstálá (*Physcomitrella patens*)

3.1.2 Použité chemikálie

- agar (Sigma-Aldrich, USA)
- bromid draselný (Sigma-Aldrich, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, USA)
- dusičnan vápenatý tetrahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- glukosa (Sigma-Aldrich, USA)
- hydroxid draselný (Sigma-Aldrich, USA)
- hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid cínatý dihydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid draselný (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid kobaltnatý hexahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid lithný (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid manganatý tetrahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid nikelnatý hexahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- jodid draselný (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina nikotinová (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina trihydrogenboritá (Sigma-Aldrich, USA)
- Luna® Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, UK)
- MyTaq™ Mix (Bioline, UK)
- *p*-aminobenzoová kyselina (Sigma-Aldrich, USA)
- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit (Invitrogen, USA)
- ROX reference Dye (Invitrogen, USA)

- síran hlinitý oktadekahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- síran hořečnatý heptahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- síran měďnatý pentahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- síran zinečnatý heptahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- síran železnatý heptahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
- D-sorbitol (Sigma-Aldrich, USA)
- thiamin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA)
- TURBO™ DNase (2 U/μl) (Invitrogen, USA)
- vínan amonný (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.3 Přístrojové vybavení

- automatické pipety (Eppendorf, NSR)
- centrifuga 5430R (Eppendorf, NSR)
- elektromagnetická míchačka (IKA, SRN)
- inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- laminární box
- parní sterilizátor (Tuttnauer, NSR)
- pH metr (XS Instruments, Itálie)
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)
- rotační třepačka (IKA, SRN)
- termocykler Mastercycler EP Gradient (Eppendorf, NSR)
- třepačka stolní orbitální Minitron (Infors HT, Švýcarsko)

3.1.4 Použité programy

- QuantStudio^{MT} Design & Analysis software (Thermo Fisher Scientific, USA)
- MEGA7 (Kumar, Stecher a Tamura, 2016)
- Muscle (Edgar, 2004)
- PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010; Lefort, Longueville a Gascuel, 2017)

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace čepeny odstálé (*Physcomitrella patens*)

Příprava 3 l Knop media (Reski a Abel, 1985): Jednotlivé roztoky složek media (viz Tab. 1 a 2) byly odměřeny do 3l odměrné baňky. Po přidavku zhruba 2,5 l destilované vody bylo následně pomocí roztoku KOH upraveno pH celkového roztoku na hodnotu

5,7 a roztok byl doplněn po rysku vodou. Medium bylo rozděleno na roztoky 1 l kontrolního média, 1 l média obsahujícího NaCl o koncentraci 200 mmol.l⁻¹ a 1 l média obsahujícího sorbitol o koncentraci 400 mmol.l⁻¹. Jednotlivé roztoky byly následně sterilizovány v autoklávu.

Kultivace *Physcomitrella patens*: Ve sterilním laminárním boxu byla již napěstovaná rostlina divokého typu rozdělena na celkem 4 části, které byly následně umístěny do 4 sterilních Erlenmeyerových baněk. K jednotlivým fragmentům rostlin bylo přidáno po 300 ml připraveného roztoku média (do první a druhé baňky byl přidán kontrolní roztok, do třetí roztok obsahující NaCl a do čtvrté roztok obsahující sorbitol). Rostliny byly následně inkubovány po dobu 5 dní při 25 °C.

Tab. 1 Jednotlivé složky Knopova media

Látka	Koncentrace		Objem v 3 l roztoku [ml.3l ⁻¹]	Hmotnost v 3 l roztoku [g.3l ⁻¹]
	[mmol.l ⁻¹]	[g.l ⁻¹]		
KH ₂ PO ₄	1,800	0,2500	30	-
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1,000	0,2500	30	-
KCl	3,400	0,2500	30	-
Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	4,000	1,0000	30	-
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,045	0,0125	-	0,0375
Roztok mikroprvků	-	-	3	-

Tab. 2 Jednotlivé složky roztoku mikroprvků (upraveno podle (Ashton a Cove, 1977))

Látka	Koncentrace (1000x konc. roztok)		Koncentrace v 1 l media
	[mmol.l ⁻¹]	[mg.l ⁻¹]	[μmol.l ⁻¹]
H ₃ BO ₃	9,900	614,0	9,900
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1,970	389,0	1,970
NiCl ₂ . 6 H ₂ O	0,220	59,0	0,220
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,230	55,0	0,230
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,220	55,0	0,220
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,190	55,0	0,190
Al ₂ (SO ₄) ₃ . 18 H ₂ O	0,058	38,6	0,058
KBr	0,240	28,0	0,240
KI	0,169	28,0	0,169
LiCl	0,660	28,0	0,660
SnCl ₂ . 2 H ₂ O	0,120	28,0	0,120

3.2.2 Izolace a precipitace RNA (použití PureLink RNA Mini Kit, AmbionTM – Thermo Fisher Scientific)

Izolace RNA: Jednotlivé vzorky rostliny byly pomocí tekutého dusíku a sterilní třecí misky s tloučkem homogenizovány. Z homogenní směsi bylo odváženo 100 mg do 2ml mikrozkušavky. Poté byl do zkumavky přidán 1 ml lyzačního vazebného roztoku (Lysis binding solution). Mikrozkušavky byly následně zcentrifugovány při 16 000 g po dobu 5 minut. Supernatant byl odebrán a v nové tubě smíchán s ekvivalentním množstvím 64% roztoku ethanolu. Vzniklý roztok byl pomocí centrifugy (10 000 g, 30 s) přefiltrován přes filtrační patronu (Filter Cartridge). Filtrační patrona byla následně promyta 700 µl promývacího roztoku 1 (Wash Solution #1) a 2x 500 µl promývacího roztoku 2 (Wash Solution #2). Mezi každým promytím byla mikrozkušavka s filtrační patronou zcentrifugována (10 000 g, 30 s). Po promytí byla RNA eluována z filtrační patrony pomocí 60 µl a 40 µl elučního roztoku (Elution Solution) vytemperovaného na teplotu 80 °C.

Precipitace RNA pomocí roztoku chloridu lithného: Roztok RNA o objemu 100 µl byl smíchán s 50 µl LiCl precipitačního roztoku (Precipitation solution) a inkubován přes noc při teplotě -20 °C. Po rozmražení byl roztok zcentrifugován (16 000 g, 15 min). Supernatant byl opatrně odstraněn od peletu, který byl promyt 70% roztokem ethanolu. Vzniklý roztok byl zcentrifugován (16 000 g, 15 min) a ponechán v laminárním boxu, kde došlo k odpaření ethanolu. K promytému peletu bylo přidáno 20 µl RNA-free H₂O.

Odstranění DNA ze vzorku RNA (TURBO DNA – *free*TM Kit – Thermo Fisher Scientific): K roztoku RNA bylo přidáno 3,5 µl DNA TURBO pufru, 2 µl DNasa TURBO a vzniklá směs byla inkubována při 37 °C po dobu 40 minut. Po uplynutí inkubační doby byl do centrifugy přidán 1 µl DNasa TURBO a roztok byl opět inkubován při 37 °C po dobu 40 minut. Inaktivace DNasy byla provedena přidáním 1 µl 50mmol.l⁻¹ roztoku EDTA a směs byla inkubována při 70 °C po dobu 10 minut.

3.2.3 Reversní transkripce do cDNA (použití RevertAid H Minus Reverse Transcriptase – Thermo Scientific)

K jednotlivým vzorkům RNA zředěných na celkové množství 4 ng ve 23 μ l roztoku bylo přidáno 2 μ l Oligo(dT)₁₈ (#SO131) primeru. Roztok byl inkubován při 65 °C po dobu 5 minut. Po uplynutí doby inkubace bylo k roztoku přidáno 15 μ l reakční směsi (Tab. 3). Po promíchání byl roztok inkubován při 42 °C po dobu 60 minut. Reakce byla ukončena zvýšením inkubační teploty na 70 °C po dobu 10 minut. Získaná cDNA byla uskladněna při teplotě -20 °C.

Tab. 3 Jednotlivé složky reakční směsi pro syntesu cDNA.

Dílčí komponent	V [μ l]
5X Reaction Buffer	4
Thermo Scientific TM RiboLock TM Rnase Inhibitor (#EO0381)	0,5
dNTP Mix (#R0191]	2
ReverdAid H Minus Reverse Transcriptase	1

3.2.4 Real-time PCR

Stanovení rovnice kalibrační přímky jednotlivých stanovovaných genů izoenzymů *ALDH*: Zásobní roztoky plazmidů genů jednotlivých izoenzymů *ALDH* byly naředěny na koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Z takto připravených roztoků byly následně připraveny kalibrační řady (ředění 1:2 pro *ZmALDH* plazmidy, 1:4 pro *PpALDH* plazmidy). Roztoky kalibrační řady byly aplikovány po 2,5 μl do jednotlivých jamek 96jamkové mikrotitrační destičky spolu se 7,5 μl reakční směsí (TaqMan – Thermo Fisher Scientific). Destička byla pečlivě zalepena fólií, zcentrifugována (30 s) a poté vložena do rt-PCR termocyklieru. Podmínky PCR reakce byly nastaveny v počítačovém softwaru (QuantStudio™). Na základě známé koncentrace a velikosti jednotlivých plazmidů byl spočítán počet molekul plazmidů v jednotlivých jamkách. Rovnice kalibrační přímky byla vyhodnocena s ohledem na počet molekul plazmidů a ředění jednotlivých jamek.

Měření jednotlivých vzorků cDNA: Jednotlivé vzorky cDNA byly aplikovány po 2,5 μl do 96jamkové mikrotitrační destičky spolu se 7,5 μl reakční směsí obsahující MyTaq™ DNA polymerasu, nukleotidy a specifické primery a proby pro elongační faktor. Byla provedena PCR reakce při specifických podmínkách (tento krok je nutný pro naředění jednotlivých vzorků na stejnou hodnotu C_T). Po zředění byly vzorky cDNA získané z RNA kukuřice aplikovány po 2,5 μl do 96jamkové mikrotitrační destičky spolu se 7,5 μl reakční směsí obsahující primery a proby pro jednotlivé isoenzymy *ALDH*. U vzorků cDNA získané z RNA mechu bylo použito 2 μl cDNA a 8 μl reakční směsí (Luna Master Mix). Po provedení PCR reakce byla z naměřených hodnot C_T (cyklus prahu) určena průměrná hodnota C_T jednotlivých genů isoenzymů *ALDH*, ze které pomocí rovnic (1) a (2) byl vypočten počet kopií genů isoenzymů *ALDH*.

$$N_{kontrola} = \frac{10^{\frac{C_T-p}{s}}}{c_{cDNA}} \quad (1)$$

$$N_{vzorek} = N_{kontrola} * \frac{2^{C_{T,kontrola}-C_{T,elongační faktor}}}{2^{C_{T,vzorek}-C_{T,elongační faktor}}} \quad (2)$$

$N_{kontrola}$... počet kopií genu v nestresovaném vzorku

N_{vzorek} ... počet kopií genu ve stresovaném vzorku

C_T ... cyklus prahu

c_{cDNA} ... koncentrace rekombinantní DNA (v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)

p ... hodnota průsečíku (odečtena z kalibrační přímky)

s ... hodnota sklonu (odečtena z kalibrační přímky)

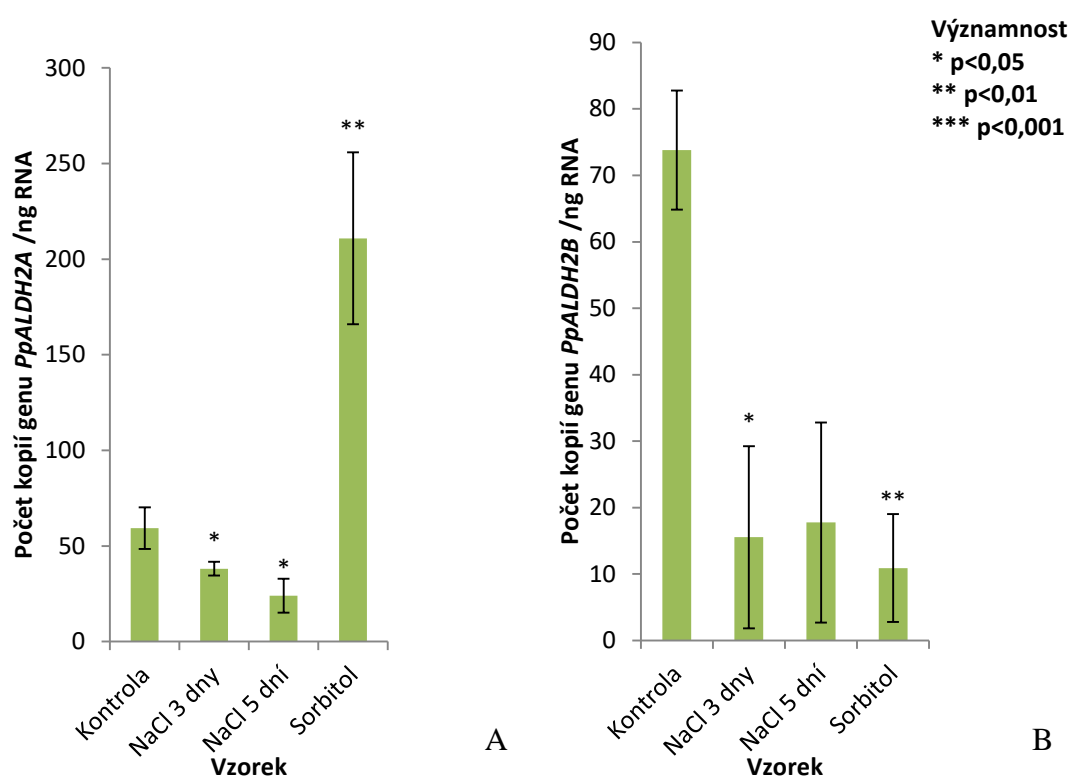
3.2.5 Fylogenetická analýza PpALDH a ZmALDH

Na základě předchozí studie (Brocke *et al.*, 2013) byly v databázi proteinů UniProt vyhledány aminokyselinové sekvence jednotlivých isoenzymů ZmALDH a PpALDH. Pomocí softwaru MEGA7 bylo provedeno zarovnání (alignment) sekvencí programem MUSCLE. Výsledný alignment byl konvertován do formátu PHYLIP. Soubor byl následně uploadován do PhyML 3.0 softwaru, který slouží k výpočtu příbuznosti mezi jednotlivými sekvencemi a generování grafického zobrazení fylogenetických stromů (Guindon *et al.*, 2010).

4 VÝSLEDKY

4.1 Genová exprese *PpALDH2*

Na základě analýzy genové exprese *PpALDH2* mechu *P. patens* lze vyvodit, že exprese obou *PpALDH* genů (Obr. 8A a 8B) je vlivem stresu solí inhibována. Oproti *PpALDH2B* (Obr. 8B), jehož exprese byla dehydratací rovněž inhibována, vlivem dehydratace dochází u *PpALDH2A* (Obr. 8A) k výraznému zvýšení exprese.

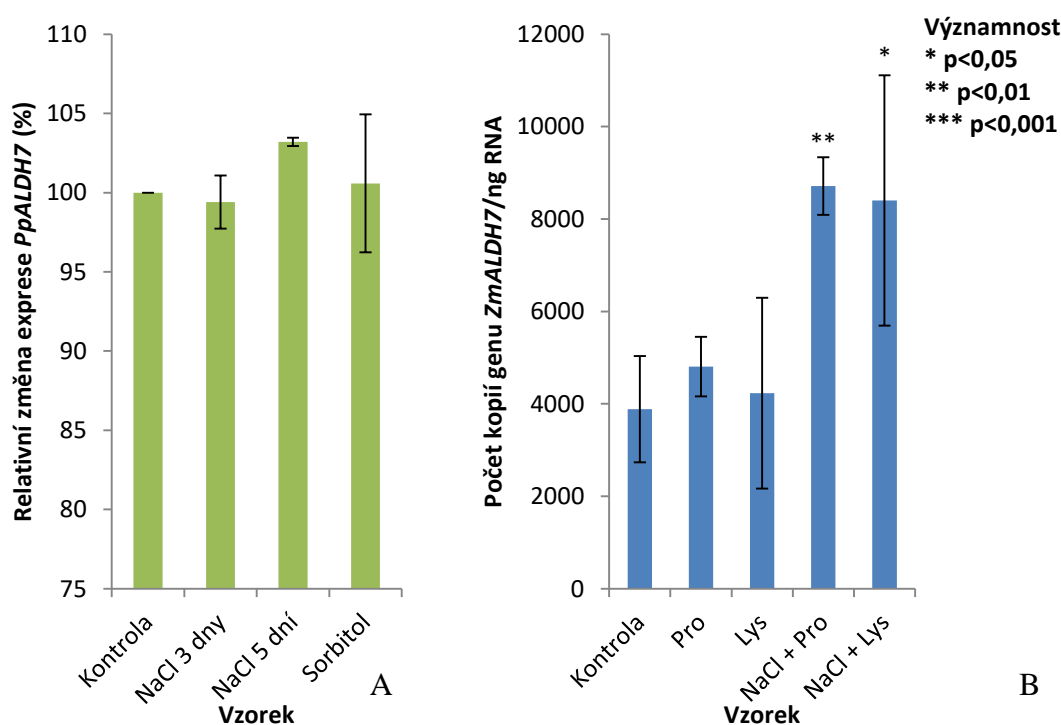


Obr. 8 Profil exprese *PpALDH2* v mechu. (A) Genová exprese *PpALDH2A* v rostlinách vystavených soli (NaCl, koncentrace 200 mmol.l⁻¹) po dobu 3 a 5 dní a dehydrataci (sorbitol, koncentrace 400 mmol.l⁻¹) po dobu 3 dní. (B) Genová exprese *PpALDH2B* v rostlinách vystavených soli (NaCl, koncentrace 200 mmol.l⁻¹) po dobu 3 a 5 dní a dehydrataci (sorbitol, koncentrace 400 mmol.l⁻¹) po dobu 3 dní. Rostliny byly pěstovány v Knopově médiu. Hodnoty C_T byly normalizovány pomocí elongačního faktoru 1α mechu a účinnosti amplifikace.

4.2 Genová exprese *ALDH7*

U analýzy genové exprese *PpALDH7* (Obr. 9A) nebylo z důvodu chybějícího plazmidu možné zjistit rovnici kalibrační přímky, a tudíž kvantifikovat hodnoty počtu kopií genu. Na základě hodnot C_T lze však vyhodnotit relativní změnu genové exprese. Oproti divokému typu došlo k mírnému nárůstu genové exprese u vzorku vystaveného stresu solí po dobu 5 dní.

Analýza genové exprese *ZmALDH7* vykazuje výrazné zvýšení exprese genu v přítomnosti prolinu a lysinu s přidavkem soli. Tento trend však nebyl pozorován u vzorků pěstovaných na samotném prolinu a lysinu.



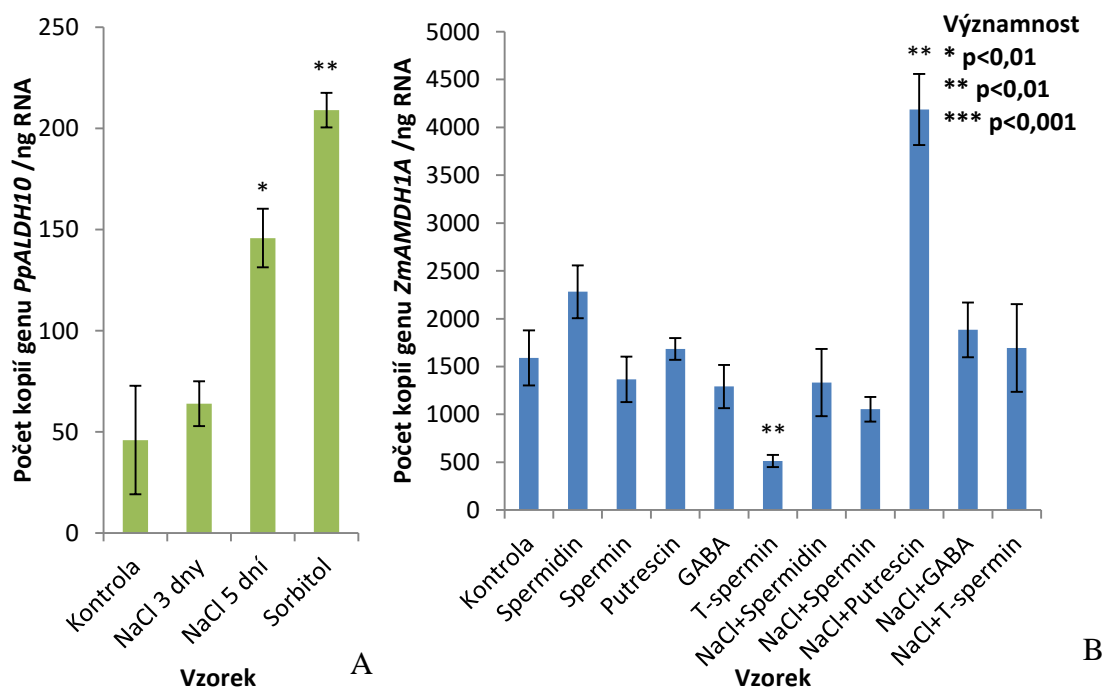
Obr. 9 Profil exprese *ALDH7* v mechu a kukuřici. (A) Relativní změna genové exprese *PpALDH7* v rostlinách vystavených soli (NaCl, koncentrace 200 mmol.l^{-1}) po dobu 3 a 5 dní a dehydrataci (sorbitol, koncentrace 400 mmol.l^{-1}) po dobu 3 dní. Rostliny byly pěstovány v Knopově médiu. (B) Genová exprese *ZmALDH7* v rostlinách vystavených exogennímu prolinu (koncentrace 1 mmol.l^{-1}) a lysinu (koncentrace 1 mmol.l^{-1}) s přidavkem soli (NaCl, koncentrace 150 mmol.l^{-1}). Hodnoty C_T byly normalizovány pomocí elongačního faktoru 1 α mechu a kukuřice a účinnosti amplifikace.

4.3 Genová exprese *ALDH10*

Genová exprese *PpALDH10* (Obr. 10A) vykazovala nárůst v případě vystavení vzorku mechu stresu solí po dobu 5 dní. K ještě výraznějšímu nárůstu genové exprese pak došlo v případě vystavení rostliny stresu dehydratací (sorbitol).

Analýzou genové exprese *ZmAMDH1A* (Obr. 10B) bylo zjištěno, že oproti nestresovanému vzorku došlo k největšímu poklesu genové exprese u vzorku stresované přidavkem exogenního T-sperminu. Výrazné zvýšení exprese pak bylo pozorováno u vzorku stresovaného přidavkem putrescinu v kombinaci se stresem solí.

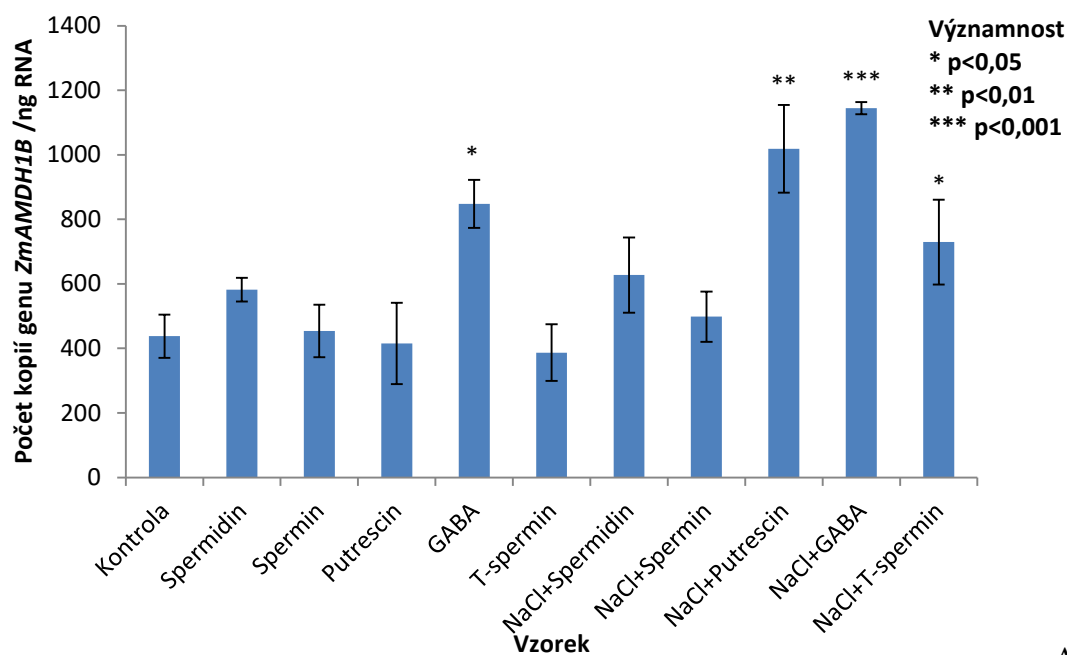
Genová exprese *ZmAMDH1B* (Obr. 11A) se oproti kontrole i oběma *AMDH* genům zvýšila v případě vzorku s přidavkem GABA. K největšímu zvýšení exprese došlo v případě kombinace stresu vyvolaného γ -aminomáselnou kyselinou a stresu solí. Významný nárůst byl rovněž zaznamenán v případě vzorku s putrescinem a solí.



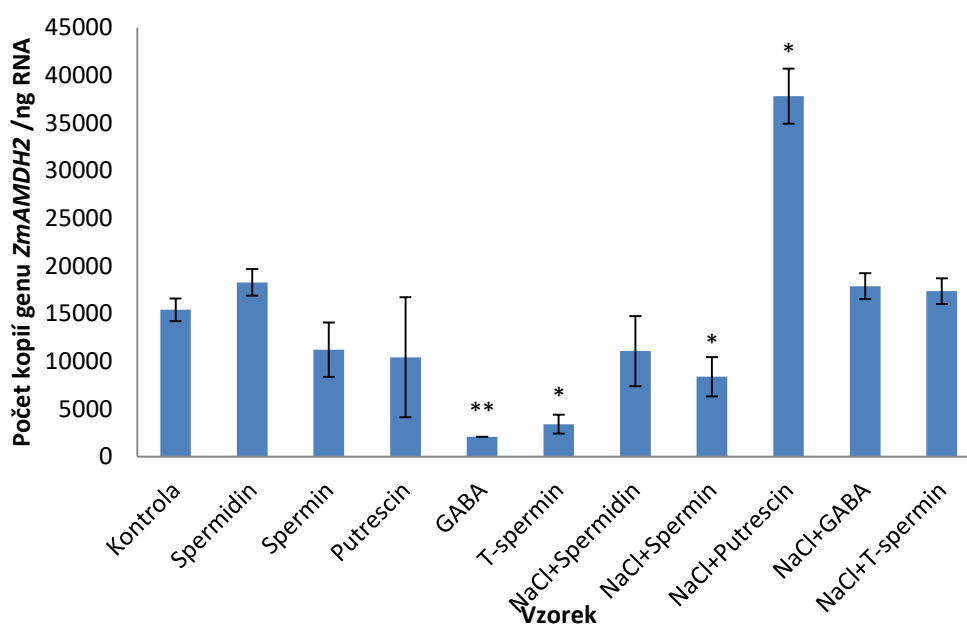
Obr. 10 Profil exprese *ALDH10* v mechu a kukuřici. (A) Genová exprese *PpALDH7* v rostlinách vystavených soli (NaCl , koncentrace 200 mmol.l^{-1}) po dobu 3 a 5 dní a dehydrataci (sorbitol, koncentrace 400 mmol.l^{-1}) po dobu 3 dní. Rostliny byly pěstovány v Knopově médiu. (B) Genová exprese *ZmAMDH1A* v rostlinách vystavených exogennímu spermidinu (koncentrace $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$), sperminu ($0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$), putrescinu (1 mmol.l^{-1}), kyselině γ -aminomáselné (GABA, koncentrace 1 mmol.l^{-1}) a T-sperminu ($0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$) s přidavkem soli (NaCl , koncentrace 150 mmol.l^{-1}). Hodnoty C_T byly normalizovány pomocí elongačního faktoru 1α mechu a kukuřice a účinnosti amplifikace.

Nárůst genové exprese genu *ZmAMDH2* byl pozorován pouze u vzorku s přidavkem soli a putrescinu. Genová exprese byla nejvýrazněji inhibována u vzorku stresovaného přidavkem GABA. K inhibici exprese došlo též u vzorku s T-sperminem a kombinace sperminu se solí.

Počet kopií genů u všech *ZmAMDH* byl výrazně vyšší než v případě *PpALDH10*.



A



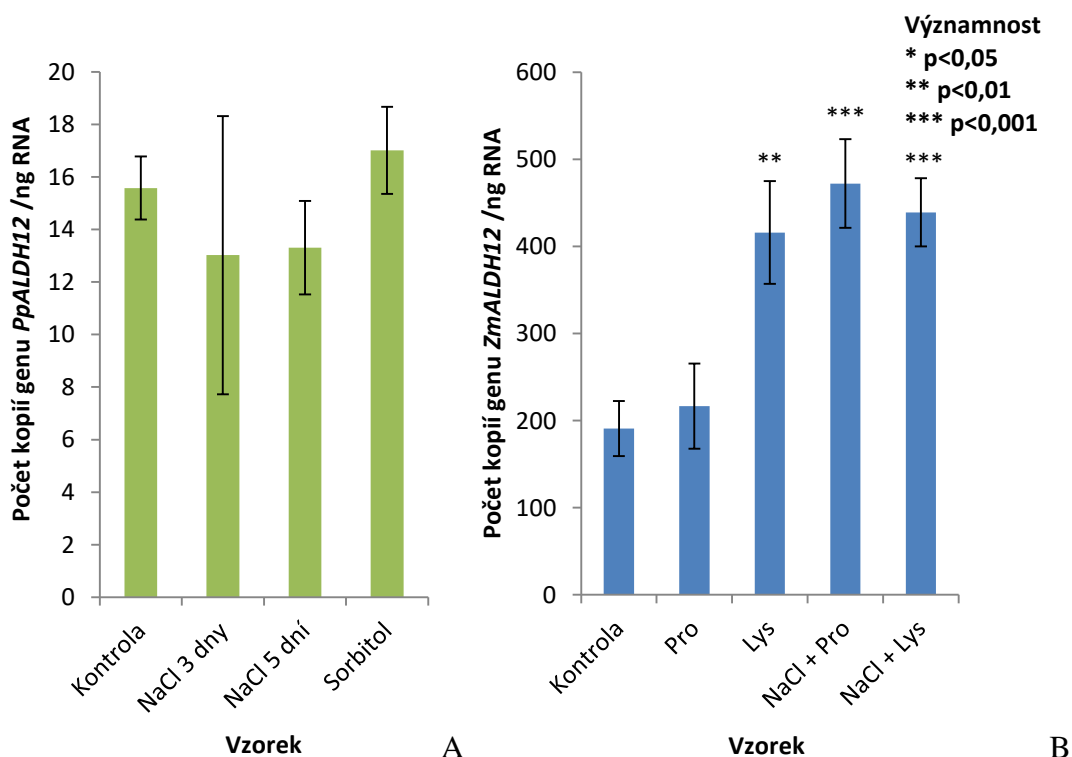
B

Obr. 11 Profil exprese *ZmALDH10* v kukuřici. Genová exprese *ZmAMDH1B* (A) a *ZmAMDH2* (B) v rostlinách vystavených exogennímu spermidinu (koncentrace $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$), sperminu ($0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$), putrescinu (1 mmol.l^{-1}), kyselině γ -aminomáselné (GABA, koncentrace 1 mmol.l^{-1}) a T-sperminu ($0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$) s přidavkem soli (NaCl, koncentrace 150 mmol.l^{-1}). Hodnoty C_T byly normalizovány pomocí elongačního faktoru 1α mechu a kukuřice a účinnosti amplifikace.

4.4 Genová exprese *ALDH12*

Analýzou genové exprese *PpALDH12* (Obr. 12A) nebyla v případě stresu dehydratací ani solí zjištěna žádná signifikantní změna exprese.

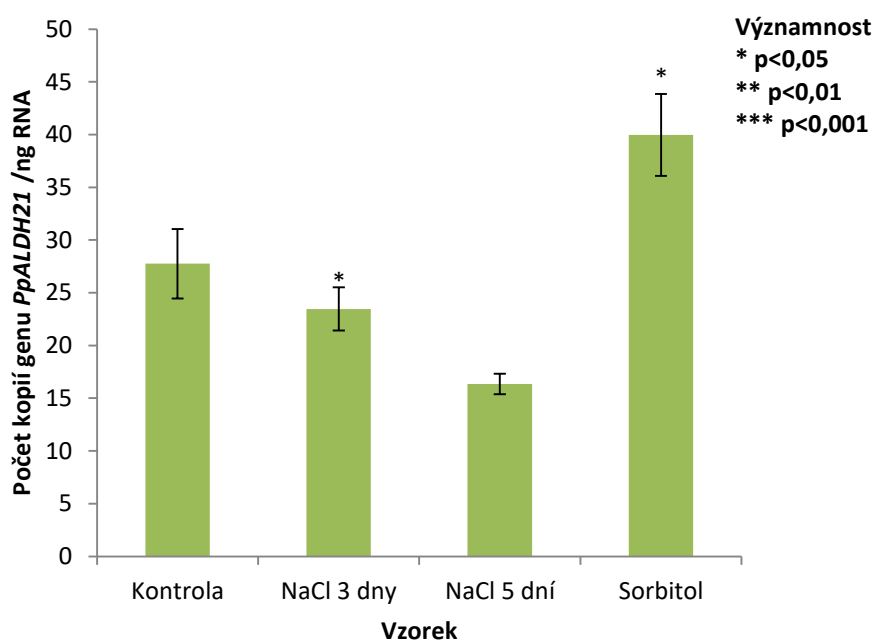
Genová exprese *ZmALDH12* (Obr. 12B) vykazovala nejvýznamnější nárůst v případě kombinace stresu solí a prolinu. Významný nárůst byl rovněž zaznamenán v případě stresu vyvolaném přidavkem lysinu. Tento nárůst byl významnější u kombinace lysinu a soli.



Obr. 12 Profil exprese *ALDH7* v mechu. (A) Genová exprese *PpALDH7* v rostlinách vystavených soli (NaCl, koncentrace 200 mmol.l⁻¹) po dobu 3 a 5 dní a dehydrataci (sorbitol, koncentrace 400 mmol.l⁻¹) po dobu 3 dní. Rostliny byly pěstovány v Knopově médiu. (B) Genová exprese *ZmALDH7* v rostlinách vystavených exogennímu prolinu (koncentrace 1 mmol.l⁻¹) a lysinu (koncentrace 1 mmol.l⁻¹) s přidavkem soli (NaCl, koncentrace 150 mmol.l⁻¹). Hodnoty C_T byly normalizovány pomocí elongačního faktoru 1α mechu a kukuřice a účinnosti amplifikace.

4.5 Genová exprese *PpALDH21*

Analýzou exprese *PpALDH21* bylo zjištěno, že došlo k inhibici exprese u vzorků pěstovaných v mediu se solí. Vlivem dehydratace (sorbitol) byla exprese tohoto genu zvýšena.

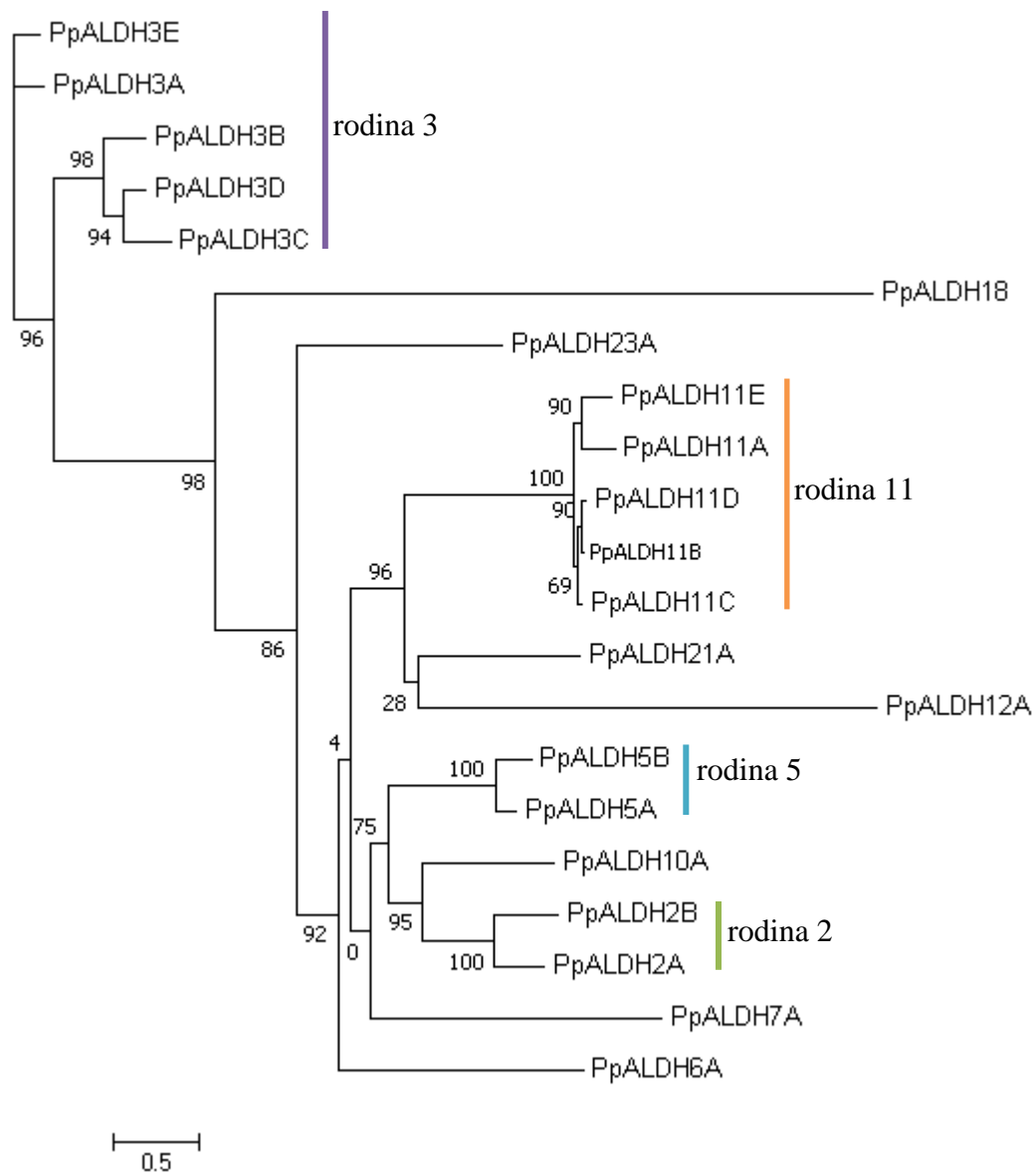


Obr. 13 Profil exprese *PpALDH21* v mechu. Genová exprese *PpALDH21* v rostlinách vystavených soli (NaCl, koncentrace 200 mmol.l⁻¹) po dobu 3 a 5 dní a dehydrataci (sorbitol, koncentrace 400 mmol.l⁻¹) po dobu 3 dní. Rostliny byly pěstovány v Knopově médiu. Hodnoty C_T byly normalizovány pomocí elongačního faktoru 1 α mechu a účinnosti amplifikace.

4.6 Fylogenetická analýza PpALDH

Byla vypracována fylogenetická analýza rodiny ALDH v čepence odstálé (*Physcomitrella patens*). Celkem se v rostlině nachází 21 enzymů rozdělených do 11 rodin ALDH (jmenovitě ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH21 a ALDH23).

Na základě fylogenetického stromu (Obr. 14) lze odvodit, že rodina 2 je zastoupena 2 isoformami PpALDH2A a PpALDH2B. Tato rodina se vyčlenila od rodiny 5 (enzymy PpALDH5A a PpALDH5B) a rodiny 10 (PpALDH10A). Rodina 3 vytváří samostatnou větev, níže příbuznou s ostatními rodinami. Tato rodina, složená z 5 členů, se dělí na 2 další větve, a sice vysoce příbuzné PpALDH3E a PpALDH3A, a méně příbuzné PpALDH3C, PpALDH3D a samostatně vyčleněný PpALDH3B. Po rodině 3 došlo k vyčlenění rodiny 18 (PpALDH18), která vykazuje vůči ostatním rodinám velmi malou míru příbuznosti. Po této rodině se vyčlenily další méně příbuzné rodiny 23 (PpALDH23A), 6 (PpALDH6A) a 7 (PpALDH7A). Rodina 11, vyčleněná spolu s málo příbuznými rodinami 12 (PpALDH12A) a 21 (PpALDH21A), se skládá z 5 členů, rozdělených na větev PpALDH11A a PpALDH11E, a větev PpALDH11C, PpALDH11B a PpALDH11D, které jsou spolu vysoce příbuzné.

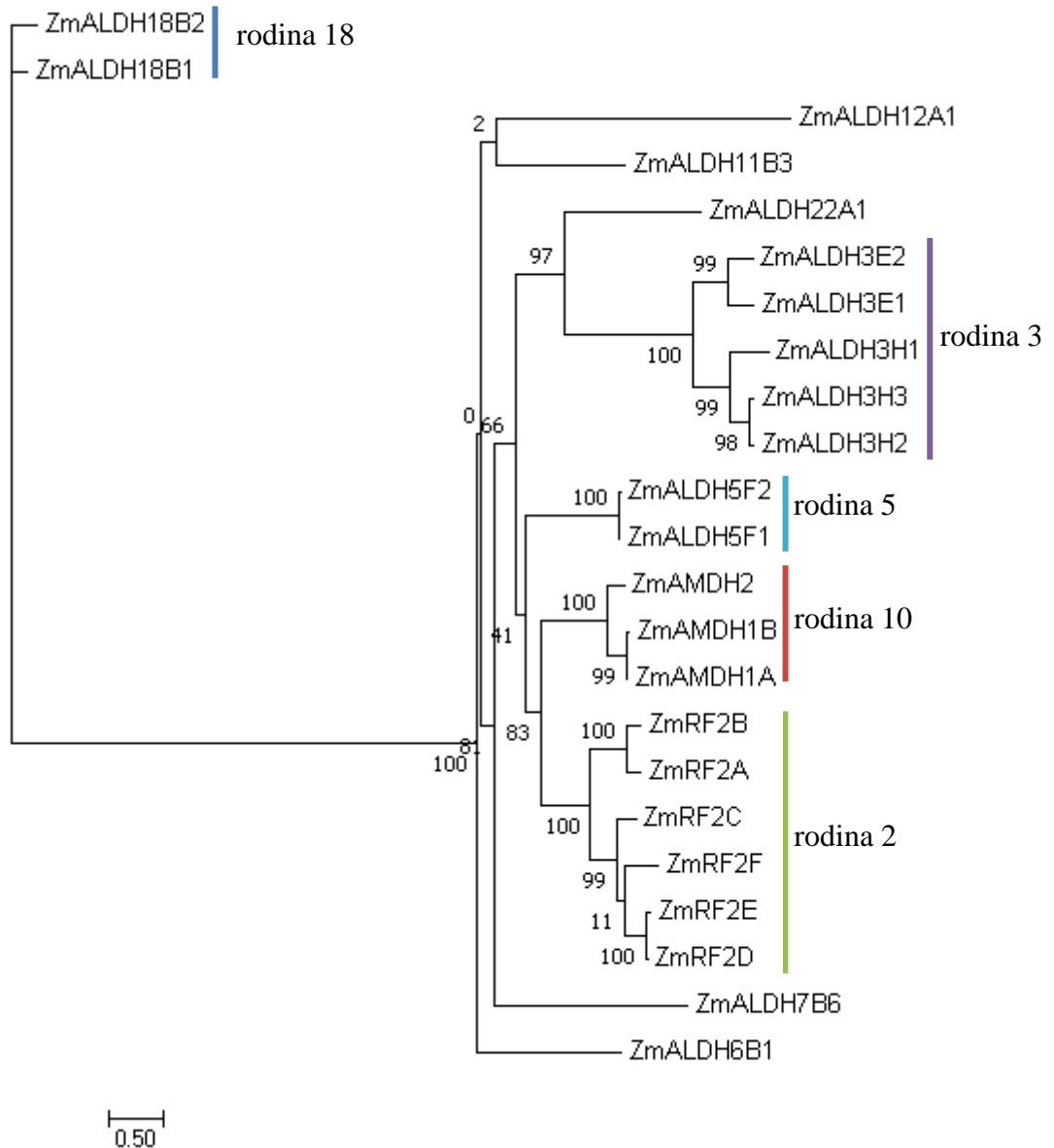


Obr. 14 Fylogenetický strom PpALDH enzymů čepeny odstálé (*P. patens*). Analýza byla provedena pomocí PhyML 3.0 softwaru, který slouží k výpočtu příbuznosti mezi jednotlivými sekvencemi a generování grafického zobrazení fylogenetických stromů (Guindon *et al.*, 2010; Lefort, Longueville a Gascuel, 2017). Byl použit substituční model LG. (Le a Gascuel, 2008).

4.7 Fylogenetická analýza ZmALDH

Byla vypracována fylogenetická analýza rodiny ALDH v kukuřici seté (*Z. mays*). Celkem se v rostlině nachází 23 enzymů rozdělených do 10 rodin ALDH (jmenovitě ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, a ALDH22).

Z fylogenetického stromu (Obr. 15) vyplývá, že rodina ALDH2 se skládá z 6 členů dělících se na větev dvou vysoce příbuzných enzymů ZmRF2A a ZmRF2B a větev čtyř enzymů ZmRF2C, ZmRF2D, ZmRF2E a ZmRF2F, z nichž poslední dva jmenované jsou opět vysoce příbuzné. Rodina ZmALDH3, vyčlenená spolu s enzymem ZmALDH22A1 od rodin ZmALDH2, 5 a 10, se skládá z 5 členů rozdělených na větev ZmALDH3E1 a ZmALDH3E2, a uzel, který se dále dělí na větev ZmALDH3H2 a ZmALDH3H3 a větev ZmALDH3H1. Rodina ZmALDH5, vyčleněná od rodiny ZmALDH10 a rodiny 2, se skládá ze 2 vysoce příbuzných isoform. ZmALDH6B1 enzym byl vyčleněn na samostatnou větev stejně jako ZmALDH7B6. Rodina 10, sestávající ze 2 vysoce příbuzných členů ZmAMDH1A a ZmAMDH1B a enzymu ZmAMDH2, se vyčlenila od rodiny 2. Rodiny 11 i 12 jsou rodiny zastoupené vždy po 1 isoenzymu. Rodina 18, sestávající ze 2 členů, se vyčlenila již od ostatních rodin a vykazuje jen nízkou příbuznost s ostatními členy ZmALDH.



Obr. 15 Fylogenetický strom ZmALDH enzymů kukuřice seté (*Z. mays*). Analýza byla provedena pomocí PhyML 3.0 softwaru, který slouží k výpočtu příbuznosti mezi jednotlivými sekvencemi a generování grafického zobrazení fylogenetických stromů (Guindon *et al.*, 2010; Lefort, Longueville a Gascuel, 2017). Byl použit substituční model LG. (Le a Gascuel, 2008).

5 DISKUZE

Expresí genů *PpALDH2A* a *PpALDH2B* u *P. patens* byla vlivem působení stresu vyvolaného solí inhibována. Vlivem sucha pak došlo ke zvýšení exprese *PpALDH2A* a snížení exprese *PpALDH2B*. U genů rýže seté (*Oryza sativa*) *OsALDH2B* za přítomnosti soli a sóje luštinaté (*Glycine max*) *GmALDH2A* za stresu vyvolaném suchem dochází rovněž ke snížení exprese (Gao a Ban, 2008; Wang *et al.*, 2017). U genů *GhdALDH2B* a *GhaALDH2B* bavlníků *G. hirsutum* a *G. arboreum* však vlivem působení soli dochází jen ke krátkodobému snížení exprese, která je následně výrazně zesílena. Tyto enzymy pravděpodobně hrají roli v ochraně rostliny před stresem vyvolaným solí (Guo *et al.*, 2017). Rozdíl v expresi genů u *P. patens* a bavlníků je pravděpodobně zapříčiněn různým mechanismem buněčné signalizace k expresi enzymů u nižších a vyšších rostlin. Guo *et al.*, (2017) uvádějí, že exprese *GhaALDH2B* byla vystavením vlivu sucha překvapivě snížena, jako je tomu u *PpALDH2B*.

U genu *PpALDH7* došlo k mírnému zvýšení exprese při přidavku soli. Přídavek soli pak měl v kombinaci s aminokyselinami prolin a lysin výrazný vliv na zvýšení exprese u *ZmALDH7*. Geny *OsALDH7*, *GmALDH7*, *AtALDH7*, *GhdALDH7* vykazovaly rovněž výrazný nárůst exprese vlivem sucha či přidavku soli, což nasvědčuje, že ALDH7 rodina má v rostlinách velmi důležitou roli v adaptaci rostlin na různé formy abiotického stresu (Guo *et al.*, 2017; Gao a Ban, 2008; Wang *et al.*, 2017; Zhao, Missihoun a Bartels, 2017; Stiti *et al.*, 2011). Zhao, Missihoun a Bartels (2017) navíc poukazují na umocnění tohoto nárůstu v případě kombinace stresu vyvolaného dehydratací se stresem tepelným. *OsALDH7* je rovněž regulován nahoru vlivem napadení rostliny patogenem, což poukazuje i na možnou roli ALDH7 v obraně rostlin vůči stresu biotickému (Wu *et al.*, 2007).

PpALDH10 reaguje na stres způsobený dehydratací či přidavkem soli výrazným zvýšením exprese. Dittami *et al.* (2011) uvádějí, že vlivem stresu vyvolaného přidavkem soli dochází u zelené řasy *Ectocarpus silicolus* k akumulaci GABA, která je syntetizována jakožto produkt degradační dráhy putrescinu. Dá se tudíž předpokládat, že tato dráha je rovněž katalyzována ALDH10. U genů *ZmAMDH1A*, *ZmAMDH1B* i *ZmAMDH2* kukuřice, jakožto zástupce vyšších rostlin, dochází k výraznému nárůstu exprese v případě kombinace stresu solí s přidavkem putrescinu. AMDH enzymy jsou unikátní svou schopností metabolizovat toxické aminoaldehydy vzniklé degradací polyaminů na aminokyseliny. Rovněž jsou odpovědné za udržování koncentrace

ω -aminoaldehydů během zrání semene (Kopečný *et al.*, 2013). AMDH enzymy mají u nižších i vyšších rostlin velký význam z hlediska adaptace rostlin na stres suchem či solí. U mutantů *Arabidopsis thaliana aldh10a8* a *aldh10a9* došlo ke zvýšení senzitivity na salinitu, přičemž koncentrace GABA u divokého typu stresovaného solí byla až 3krát vyšší než u mutantů (Zarei, Trobacher a Shelp, 2016). Gao a Ban (2008) rovněž prokázali nárůst exprese *OsALDH10* vlivem stresování solí i suchem u mladých listů, která byla umocněna přidavkem kyseliny abscisové. AMDH mají rovněž vliv i na vedlejší charakteristické znaky určitých rostlin. Arikiti *et al.* (2011) uvádějí, že vlivem přítomnosti genu *GmAMDH2* dochází u sóje k produkci AMDH enzymu, který zabraňuje akumulaci 2-acetyl-1-pyrrolinu. Tato volatilní látka, typická pro mnohé obiloviny, je charakteristická svou vůní připomínající vůni popcornu.

PpALDH12 nehraje roli v případě odolnosti mechu vůči stresu vyvolaného dehydratací ani přidavkem soli. Deuschle *et al.* (2004) při studiu exprese *AtP5CDH* (*AtALDH12*) u *A. thaliana* rovněž nezaznamenali žádnou změnu v koncentraci Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátu mezi rostlinami stresovanými a nestresovanými. Ani *GaALDH12A1* bavlíku nereagoval na abiotický stres (Guo *et al.*, 2017). *ALDH12* tudíž není nezbytný v případě adaptace na stres vyvolaný solí. Je však zajímavé, že gen traviny *Cleistogenes songorica CsALDH12A1* kontrtransformovaný do alfaly (*Medicago sativa L.*) vykazoval až 6krát vyšší hladinu exprese u rostlin stresovaných dehydratací (15 dní) a přidavkem soli (10 dní). U rostlin stresovaných solí došlo zároveň k poklesu koncentrace Na^+ a nárůstu koncentrace K^+ , čímž došlo k zabránění poškození rostliny vlivem toxicity či vysokého osmotického tlaku. Rostliny alfaly s *CsALDH12A1* kromě toho taktéž vykazovaly vyšší toleranci vůči teplotnímu či světelnému stresu nebo vůči patogenům (Duan *et al.*, 2015). Deuschle *et al.* (2004) zároveň uvádí, že vlivem napadení rostliny *A. thaliana* patogenem došlo k výraznému nárůstu exprese *AtALDH12*. Byla taktéž zaznamenána zvýšená exprese *AtALDH12* v případě kombinace stresu solí s přidavkem aminokyselin prolinu či argninu. Tato zvýšená hladina exprese byla zaznamenána i v případě *ZmALDH12*. *ALDH12* enzym je nezbytný pro odbourávání P5C, který ve zvýšených koncentracích aktivuje signální kaskádu vedoucí k buněčné smrti (Deuschle *et al.*, 2004).

Gen *PpALDH21* je exprimován ve větší míře v případě stresu vyvolaného dehydratací rostliny. Předchozí studie provedené s genem *ScALDH21* *Synchitria caninervis* kotransformovaným do bavlíku potvrzují tento závěr. *ScALDH21* byl překvapivě za přidavku soli regulován nahoru. *ALDH21* slouží v nižších rostlinách jako

enzym zodpovědný za adaptaci rostliny na suché podmínky (Yang *et al.*, 2016). Přítomnost enzymu ALDH21 v řasách, meších, a dalších nižších rostlinách dává těmto rostlinám možnost katalyzovat reakce GABA-přepínače nejen v mitochondriích, ale i v cytosolu. V nižších rostlinách je tudíž GABA-přepínač mnohem rozmanitější metabolická dráha než u vyšších rostlin (Kopečná *et al.*, 2017).

6 ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše na téma nadrodiny aldehyddehydrogenas (ALDH) a rodin ALDH2, ALDH7, ALDH10, ALDH12 a ALDH21 se zaměřením na jejich fylogenetickou analýzu, substrátovou specifitu a strukturu.

Byla vypracována literární rešerše na téma RT-PCR se zaměřením na porovnání detekce amplifikace pomocí TaqMan sond a SYBR green barviva.

Vzorky rostlin čepenky odstálé (*Physcomitrella patens*) byly úspěšně kultivovány.

Izolovaná RNA byla purifikována a následně přepsána do cDNA.

Byly provedeny q-PCR experimenty s použitím FAM-TAMRA sond proti *PpALDH2A*, *PpALDH2B*, *PpALDH7*, *PpALDH10*, *PpALDH12* a *PpALDH21* genům *P. patens* a proti *ZmALDH7*, *ZmAMDH1A*, *ZmAMDH1B*, *ZmAMDH2* a *ZmALDH12* genům *Z. mays*.

Byla vypracována fylogenetická analýza aldehyddehydrogenas zastoupených v kukuřici (*Z. mays*) a mechu (*P. patens*).

Vlivem stresu vyvolaného přidavkem soli byla zvýšena exprese *PpALDH7* a *PpALDH10*. Přídavek soli v kombinaci s aminokyselinami prolin a lysin měl taktéž vliv na zvýšení exprese *ZmALDH7* a *ZmALDH12*. Ke zvýšení exprese vlivem soli rovněž došlo u všech *ZmAMDH*, a to především v případě kombinace soli s polyaminem putrescinem. Stres způsobený salinitou na druhou stranu inhiboval expresi *PpALDH2A*, *PpALDH2B*.

Zvýšení exprese vlivem dehydratace bylo prokázáno u *PpALDH2A*, *PpALDH10* a *PpALDH21*. Dehydratované prostředí naopak snížilo expresi u genu *PpALDH2B*.

7 LITERATURA

- Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Mohanty P. (2008): Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research* **98**, 541–550.
- Arikiti S., Yoshihashi T., Wanchana S., Uyen T.T., Huong N.T., Wongpornchai S., Vanavichit A. (2011): Deficiency in the amino aldehyde dehydrogenase encoded by *GmAMADH2*, the homologue of rice *Os2AP*, enhances 2-acetyl-1-pyrroline biosynthesis in soybeans (*Glycine max L.*). *Plant biotechnology journal* **9**, 75-87.
- Ashton N. W., Cove D.J. (1977): Isolation and Preliminary Characterization of Auxotrophic and Analog Resistant Mutants of Moss (*Physcomitrella patens*). *Molecular & General Genetics* **154**, 87-95.
- Bagni N., Tassoni A. (2001): Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino acids* **20**, 301-317.
- Bartels D., Sunkar R. (2005): Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* **24**, 23-58.
- Borson N.D., Strausbauch M.A., Wettstein P.J., Oda R.P., Johnston S.L., Landers J.P. (1998): Direct quantitation of RNA transcripts by competitive single-tube RT-PCR and capillary electrophoresis. *Biotechniques* **25**, 130–137.
- Bouché N., Fait A., Bouchez D., Møller S.G. and Fromm H. (2003): Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **100**, 6843–6848.
- Bradbury L.M., Gillies S.A., Brushett D.J., Waters D.L., Henry R.J. (2008): Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant Molecular Biology* **68**, 439–449.
- Brocker C., Vasiliou M., Carpenter S., Carpenter C., Zhang Y., Wang X., Kotchoni S. O., Wood A.J., Kirch H.H., Kopečný D., Nebert D.W., Vasiliou V. (2013): Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* **237**, 189-210.
- Bustin S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* **25**, 169-193.
- Cecchini N.M., Monteoliva M.I., Alvarez M.E. (2011): Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **155**, 1947-1959.
- Cobessi D., Tête-Favier F., Marchal S., Branlant G., Aubry A. (2000): Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Biology* **300**, 141–152.
- Colby T.D., Bahnson B.J., Chin J.K., Klinman J.P., Goldstein B.M. (1998): Active site modifications in a double mutant of liver alcohol dehydrogenase: structural studies of two enzyme-ligand complexes. *Biochemistry* **37**, 9295–9304.
- Cui X., Wise R.P., Schnable P.S. (1996): The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science* **272**, 1334–1336.
- D'Ambrosio K., Pailot A., Talfournier F., Didierjean C., Benedetti E., Aubry A., Branlant G., Corbier C. (2006): The first crystal structure of a thioacylenzyme intermediate in the ALDH family: new coenzyme conformation and relevance to catalysis. *Biochemistry* **45**, 2978–2986.
- Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister D. van der Graaff E., Kunze R., Frommer W.B. (2004): The Role of D1-Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase in Proline Degradation. *The Plant Cell* **16**, 3413–3425.
- Deuschle K., Funck D., Hellmann H., Daschner K., Binder S., Frommer W.B. (2001): A nuclear gene encoding mitochondrial Deltapyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The plant journal for cell and molecular biology* **27**, 345–356.

- Dittami S.M., Gravot A., Renault D., Goulitquer S., Eggert A., Bouchereau A., Boyen C. Tonon T. (2011): Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant, cell & environment* **34**, 629-642.
- Duan Z., Zhang D., Zhang J., Di H., Wu F., Hu X., Meng X., Luo K., Zhang J., Wang Y. (2015): Co-transforming bar and *CsALDH* genes enhanced resistance to herbicide and drought and salt stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in plant science* **6**, 1115.
- Edgar R.C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792-97.
- Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie A.R. (2008): Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science* **13**, 14–19.
- Fincato P., Moschou P.N., Spedaletti V., Tavazza R., Angelini R., Federico R., Roubelakis-Angelakis K.A., Tavladoraki P. (2011): Functional diversity inside the *Arabidopsis* polyamine oxidase gene family. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1155–1168.
- Fitzgerald T.L., Waters D.L., Henry R.J. (2009): Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biology* **11**, 119–130.
- Funck D., Eckard S., Müller G. (2010): Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **10**, 70.
- Gao C., Han B. (2009): Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in rice (*Oryza sativa*). *Gene* **431**, 86-94.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. (2010): New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* **59**, 307-321.
- Guo X., Wang Y., Lu H., Cai X., Wang X., Zhou Z., Wang Ch., Wang Y., Zhang Z., Wang K. Liu F. (2017): Genome-wide characterization and expression analysis of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily under abiotic stresses in cotton. *Gene* **628**, 230-245.
- Guo Z., Tan J., Zhuo C., Wang C., Xiang B., Wang Z. (2014): Abscisic acid, H₂O₂ and nitric oxide interactions mediated cold-induced S-adenosylmethionine synthetase in *Medicago sativa* subsp. *falcata* that confers cold tolerance through up-regulating polyamine oxidation. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 601–612.
- Gupta K., Dey A., Gupta B. (2013): Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 2015–2036.
- Hare P. D., Cress W. A. (1997): Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant growth regulation* **21**, 79-102.
- Hempel J., Perozich J., Chapman T., Rose J., Boesch J.S., Liu Z.J., Lindahl R., Wang B.C. (1999): Aldehyde dehydrogenase catalytic mechanism. A proposal. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **463**, 53–59.
- Henke W., Jung M., Jung K., Lein M., Schlechte H., Berndt C., Rudolph B., Schnorr D., Loening S.A. (1997): Increased analytical sensitivity of RT-PCR of PSA mRNA decreases diagnostic specificity of detection of prostatic cells in blood. *International Journal of Cancer* **70**, 52–56.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**, 1026–1030.
- Chan C.L., Wong J.W., Wong C.P., Chan M.K. a Fong W.P. (2011): Human antiquitin: structural and functional studies. *Chemico-Biological Interactions* **191**, 165–170.
- Chelly J., Concordet J.P., Kaplan J.C., Kahn A. (1989): Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *PNAS* **86**, 2617–2621.
- Chen X., Zeng Q., Wood A.J. (2002): The stress-responsive *Tortula ruralis* gene *ALDH21A1* describes a novel eukaryotic aldehyde dehydrogenase protein family. *Journal of Plant Physiology* **159**, 677–684.
- Chugh V., Kaur N., Gupta A. (2011): Role of antioxidant and anaerobic metabolism enzymes in providing tolerance to maize (*Zea mays* L.) seedlings against waterlogging. *Indian journal of biochemistry & biophysics* **48**, 346-52.

- Illingworth C., Mayer M.J., Elliott K., Hanfrey C., Walton N.J., Michael A.J. (2003): The diverse bacterial origins of the *Arabidopsis* polyamine biosynthetic pathway. *FEBS letters* **549**, 26-30.
- Inostroza-Blancheteau C., Aquea F., Reyes-Díaz M., Alberdi M., Arce-Johnson P. (2011): Identification of Aluminum-Regulated Genes by cDNA-AFLP Analysis of Rots in Two Contrasting Genotypes of Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Molecular biotechnology* **49**, 32-41.
- Jimenez-Lopez J.C., Gachomo E.W., Seufferheld M.J., Kotchoni S.O. (2010): The maize ALDH protein superfamily: linking structural features to functional specificities. *BMC Structural Biology* **10**, 43.
- Kirch H.H., Schlingensiepen S., Kotchoni S., Sunkar R., Bartels D. (2005): Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **5**, 315–332.
- Končítiková R., Vigouroux A., Kopečná M., Andree T., Bartoš J., Šebela M., Solange M, Kopečný D. (2015): Role and structural characterization of plant aldehyde dehydrogenases from family 2 and family 7. *Biochemical Journal* **468**, 109-123.
- Kopečná M., Vigouroux A., Vilím J., Končítiková R., Briozzo P., Hájková E., Jašková L., von Schwartzberg K., Šebela M., Solange M, Kopečný D. (2017): The *ALDH 21* gene found in lower plants and some vascular plants codes for a NADP⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase. *The Plant Journal* **92**, 229-243.
- Kopečný D., Končítiková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Soral M., Šebela M., Moréra S. (2013): Plant ALDH10 family identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 9491-9507.
- Koppaka V., Thompson D.C., Chen Y., Ellermann M., Nicolaou K.C., Juvonen R.O., Petersen D., Deitrich R.A., Hurley T.D., Vasiliou V. (2012): Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacological Reviews* **64**, 520-539.
- Korasick D. A., Končítiková R., Kopečná M., Hájková E., Vigouroux A., Moréra S., Becker D.F., Šebela M., Tanner J.J., Kopečný, D. (2019): Structural and Biochemical Characterization of Aldehyde Dehydrogenase 12, the Last Enzyme of Proline Catabolism in Plants. *Journal of molecular biology* **431**, 576-592.
- Kotchoni S.O., Kuhns C., Ditzer A., Kirch H.H., Bartels D. (2006): Overexpression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, Cell & Environment* **29**, 1033–1048.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K., (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870–1874.
- Kwok S., Higuchi R. (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* **339**, 237–238.
- Le S., Gascuel O. (2008): An improved general amino-acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1307–1320.
- Lefort V., Longueville J.L., Gascuel O. (2017): SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution* **149**, 2422–2424.
- Liu F. a Schnable P.S. (2002): Functional specialization of maize mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Plant Physiology* **130**, 1657–1674.
- Liu Z.J., Hempel J., Sun J., Rose J., Hsiao D., Chang W.R., Chung Y.J., Kuo I., Lindahl R., Wang B.C. (1997): Crystal structure of a class 3 aldehyde dehydrogenase at 2.6 Å resolution. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **414**, 1–7.
- Maiale S., Sánchez D.H., Guirado A., Vidal A., Ruiz O.A. (2004): Spermine accumulation under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **161**, 35–42.
- Majumdar R., Shao L., Minocha R., Long S., Minocha S.C. (2013): Ornithine: the overlooked molecule in the regulation of polyamine metabolism. *Plant Cell Physiology* **54**, 990–1004.
- Marco F., Alcázar R., Tiburcio A. F., Carrasco P. (2011): Interactions between polyamines and abiotic stress pathway responses unraveled by transcriptome analysis of polyamine overproducers. *OMICS* **15**, 775–781.

- Marchitti S.A., Brocker C., Stagos D., Vasiliou V. (2008): Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **4**, 697–720.
- Miller G., Honig A., Stein H., Suzuki N., Mittler R., Zilberstein A. (2009): Unraveling Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 26482-26492.
- Minocha R., Majumdar R., Minocha S. C. (2014): Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Frontiers in Plant Science* **5**, 175.
- Nakashima K., Satoh R., Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998): A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**, 1233-1241.
- Neto E.D., Harrop R., Correa-Oliveira R., Wilson R.A., Pena S.D., Simpson A.J. (1997): Minilibraries constructed from cDNA generated by arbitrarily primed RT-PCR: an alternative to normalized libraries for the generation of ESTs from nanogram quantities of mRNA. *Gene* **186**, 135–142.
- Ni L., Sheikh S., Weiner H. (1997): Involvement of glutamate 399 and lysine 192 in the mechanism of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 18823–18826.
- Page A. F., Minocha R., Minocha S. C. (2012): Living with high putrescine: expression of ornithine and arginine biosynthetic pathway genes in high and low putrescine producing poplar cells. *Amino Acids* **42**, 295–308.
- Pathak M.R., Teixeira Silva J.A., Wani S.H. (2014): Polyamines in response to abiotic stress tolerance through transgenic approaches. *GM Crops Food* **5**, 87–96.
- Planas-Portell J., Gallart M., Tiburcio A.F., Altabella T. (2013): Coppercontaining amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **13**, 109.
- Rappolee D.A., Mark D., Banda M.J., Werb Z. (1988): Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* **241**, 708–712.
- Reski R., Abel W. O. (1985): Induction of budding of chloromenata and caulomenata of the moss (*Physcomitrella patens*) using isopentenyladenine. *Planta* **165**, 354-358.
- Rodrigues S.M., Andrade M.O., Gomes A.P., Damatta F.M., Baracat Pereira M.C., Fontes E.P. (2006): *Arabidopsis* and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like *ALDH7* gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1909–1918.
- Rodriguez-Zavala J.S., Weiner H. (2002): Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. *Biochemistry* **41**, 8229–8237.
- Sheikh S., Ni L., Hurley T.D., Weiner H. (1997): The potential roles of the conserved amino acids in human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 18817–18822.
- Shen Y., Zhang Y., Yang C., Lan Y., Liu L., Liu S., Chen Z., Ren G., Wan J. (2012): Mutation of *OsALDH7* causes a yellow-coloured endosperm associated with accumulation of oryzamutaic acid A in rice. *Planta* **235**, 433–441.
- Shin J.H., Kim S.R., An G. (2009): Rice aldehyde dehydrogenase 7 is needed for seed maturation and viability. *Plant Physiology* **149**, 905–915.
- Schwacke R., Grallath S., Breikreuz K.E., Stransky E., Stransky H., Frommer W.B., Rentsch D. (1999): LeProT1, a Transporter for Proline, Glycine Betaine, and γ -Amino Butyric Acid in Tomato Pollen. *The Plant Cell* **11**, 377-391.
- Skibbe D.S., Liu F., Wen T.J., Yandau M.D., Cui X., Cao J., Simmons C.R., Schnable P.S. (2002): Characterization of the aldehyde dehydrogenase gene families of *Zea mays* and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **48**, 751–764.
- Steinmetz C.G., Xie P., Weiner H., Hurley T.D. (1997): Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**, 701–711.

- Stiti N., Missihoun T.D., Kotchoni S., Kirch H.H., Bartels D. (2011): Aldehyde dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: biochemical requirements, metabolic pathways, and functional analysis. *Frontiers in plant science* **2**, 65.
- Šebela M., Brauner F., Radova A., Jacobsen S., Havlis J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1480**, 329–341.
- Takahashi K., Weiner H., Filmer D.L. (1981): Effects of pH on horse liver aldehyde dehydrogenase: alterations in metal ion activation, number of functioning active sites, and hydrolysis of the acyl intermediate. *Biochemistry* **20**, 6225–6230.
- Tang W.K., Wong K.B., Lam Y.M., Cha S.S., Cheng C.H. a Fong W.P. (2008): The crystal structure of seabream antiquitin reveals the structural basis of its substrate specificity. *FEBS Letters* **582**, 3090–3096.
- Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html> (2. 4. 2019)
- Tiburcio A. F., Altabella T., Bitrian M., Alcazar R. (2014): The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* **240**, 1–18.
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela, M. (2010): Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *Journal of Molecular Biology* **396**, 870–882.
- Vaz F.M., Fouchier S.W., Ofman R., Sommer M., Wanders R.J. (2000): Molecular and biochemical characterization of rat gamma-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7390–7394.
- Wang M.F., Han C.L., Yin S.J. (2009): Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions* **178**, 36–39.
- Wang T., Brown M.J. (1999): RNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Analytical Biochemistry* **269**, 198–201.
- Wang W., Jiang W., Liu J., Li Y., Gai J., Li Y. (2017): Genome-wide characterization of the aldehyde dehydrogenase gene superfamily in soybean and its potential role in drought stress response. *BMC genomics* **18**, 518–535.
- Wang X., Weiner H. (1995): Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**, 237–243.
- Weiner H. (1979): Alcohol dehydrogenase, in *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*. Plenum Press 125–144.
- Weiner H., Takahashi K. (1983): Effects of magnesium and calcium on mitochondrial and cytosolic liver aldehyde dehydrogenases. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **18**, 109–112.
- Yang H., Zhang D., Li H., Dong L., Lan H. (2015): Ectopic overexpression of the aldehyde dehydrogenase ALDH21 from *Syntrichia caninervis* in tobacco confers salt and drought stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* **95**, 83–91.
- Yang H., Zhang D., Li X., Li H., Zhang D., Lan H., Wood A.J., Wang J. (2016): Overexpression of *ScALDH21* gene in cotton improves drought tolerance and growth in greenhouse and field conditions. *Molecular Breeding* **36**, 34.
- Yang H., Zhang D., Wang J., Wood A.J., Zhang Y. (2012): Molecular cloning of a stress-responsive aldehyde dehydrogenase gene *ScALDH21* from the desiccation-tolerant moss *Syntrichia caninervis* and its responses to different stresses. *Molecular Biology Reports* **39**, 2645–2652.
- Zarei A., Trobacher C.P., Shelp B.J. (2016): Arabidopsis aldehyde dehydrogenase 10 family members confer salt tolerance through putrescine-derived 4-aminobutyrate (GABA) production. *Scientific Reports* **6**, 35115.

- Zarei A., Trobacher C.P., Shelp B.J. (2018): Corrigendum: *Arabidopsis* aldehyde dehydrogenase 10 family members confer salt tolerance through putrescine-derived 4-aminobutyrate (GABA) production. *Scientific reports* **8**, 46967.
- Zhang L., Wu H.C., Chan S.C. (2015): Large-scale dynamic gene regulatory networks analysis for time course DNA microarray data from *C. elegans*, preliminary results and findings. 2015 IEEE International Conference on Digital Signal Processing (DSP), Singapore, 552-556.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AASAL	α -aminoadipát-semialdehyd
ABAL	4-aminobutanal
ACAPAL	3-acetamidopropanal
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALDH10	aldehyddehydrogenasa rodiny 10
ALDH12	aldehyddehydrogenasa rodiny 12
ALDH12A	aldehyddehydrogenasa rodiny 12 podrodiny A
ALDH18	aldehyddehydrogenasa rodiny 18
ALDH2	aldehyddehydrogenasa rodiny 2
ALDH21	aldehyddehydrogenasa rodiny 21
ALDH23	aldehyddehydrogenasa rodiny 23
ALDH24	aldehyddehydrogenasa rodiny 24
ALDH2B	aldehyddehydrogenasa rodiny 2 podrodiny B
ALDH2C	aldehyddehydrogenasa rodiny 2 podrodiny C
ALDH2D	aldehyddehydrogenasa rodiny 2 podrodiny D
ALDH2E	aldehyddehydrogenasa rodiny 2 podrodiny E
ALDH3	aldehyddehydrogenasa rodiny 3
ALDH4	aldehyddehydrogenasa rodiny 4
ALDH5	aldehyddehydrogenasa rodiny 5
ALDH5F1	aldehyddehydrogenasa rodiny 5 podrodiny F1
ALDH5F2	aldehyddehydrogenasa rodiny 5 podrodiny F2
ALDH6	aldehyddehydrogenasa rodiny 6
ALDH7	aldehyddehydrogenasa rodiny 7
ALDH7B	aldehyddehydrogenasa rodiny 7 podrodiny B
<i>Aldh7b</i>	mutant s delecí genu <i>ALDH7B</i>
AMDH	aminoaldehyddehydrogenasa
AMDH1A	aminoaldehyddehydrogenasa 1A
AMDH1A, ALDH10A8	aminoaldehyddehydrogenasa 1A
AMDH1B, ALDH10A9	aminoaldehyddehydrogenasa 1B
AMDH2	aminoaldehyddehydrogenasa 2
APAL	3-aminopropanal
AtALDH	aldehyddehydrogenasa z <i>A. thaliana</i>
AtP5CDH	Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa z <i>A. thaliana</i>
BAL	betainaldehyd
cDNA	komplementární DNA
DMSP	3-dimethylsulfoniopropionát
DMSPAL	3-dimethylsulfoniopropanal
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
GAD	glutamátdekarboxylasa
GBAL	4-guanidinobutanal
GhaALDH	aldehyddehydrogenasa z bavlíku (<i>G. arboreum</i>)
GhdALDH	aldehyddehydrogenasa z bavlíku (<i>G. hirsutum</i>)
GmALDH	aldehyddehydrogenasa ze sóje (<i>G. max</i>)
GPAL	3-guanidinopropanal
GRSAL	semialdehyd kyseliny glutarové
GSAL	glutamát- γ -semialdehyd
GSALDH	glutamát- γ -semialdehyddehydrogenasa
hALDH7 (ALDH7A1)	lidská aldehyddehydrogenasa rodiny 7

MDA	malondialdehyd
MmALDH4	aldehyddehydrogenasa z myši domácí (<i>M. musculus</i>)
OsALDH	aldehyddehydrogenasa z rýže (<i>O. sativa</i>)
P5C	Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylát
<i>p5cdh</i>	mutant s delecí genu <i>p5cdh</i>
P5DCH	Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa
P6C	Δ^1 -piperidin-6-karboxylát
P6CDH	Δ^1 -piperidin-6-karboxylátdehydrogenasa
PpALDH	aldehyddehydrogenasa z mechu (<i>P. patens</i>)
PsALDH7	aldehyddehydrogenasa 7 hrachu setého (<i>P. sativum</i>)
q-PCR	kvantitativní polymerázová žetězová reakce
qRT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
RF2A, ALDH2B2	aldehyddehydrogenasa rodiny 2 podrodiny B2
RF2B, ALDH2B5	aldehyddehydrogenasa rodiny 2 podrodiny B5
RF2C, ALDH2C1	aldehyddehydrogenasa rodiny 2 podrodiny C1
RF2D, ALDH2C2	aldehyddehydrogenasa rodiny 2 podrodiny C2
ROS	reaktivní formy kyslíku
ScALDH21	aldehyddehydrogenasa rodiny 21 z řasy <i>S. caninervis</i>
SSAL	sukcynyl-semialdehyd
TMBAL	N, N, N-trimethylaminobutanal
TMPAL	3, 3, 3-trimethylaminopropanal
ZmALDH	aldehyddehydrogenasa z kukuřice (<i>Z. mays</i>)
ZmAMDH	aminoaldehyddehydrogenasa z kukuřice (<i>Z. mays</i>)