

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**Analýza exprese vybraných genů aldehyddehydrogenas
v jednoděložných rostlinách**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Ivana Čečerová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radka Končítíková, Ph. D.
Rok:	2021

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

V Olomouci dne

V první řadě bych ráda poděkovala své vedoucí Mgr. Radce Končítikové, PhD., za to jakou se mnou měla trpělivost, za rady, při psaní bakalářské práce a práci v laboratoři. I přes to, že mi odcestovala do dalekých francouzských krajín, nevzdala to se mnou a bojovala se mnou až do konce. ♥

Také bych ráda poděkovala Sektě chemokatolické, která při mně stála v době, kdy jsem chtěla všeho nechat a podpořila mne v psaní bakalářské práce a studiu. Dík patří také Davidovi Sklenářovi, který vytrpěl všechny mé výkyvy nálad při psaní této práce a zároveň za oporu při skládání zkoušek. Dále děkuji všem pracovníkům Oddělení biochemie a proteinů za vytvoření přátelského prostředí na pracovišti.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Ivana Čečerová
Název práce	Analýza exprese vybraných genů aldehyddehydrogenas v jednoděložných rostlinách
Typ práce	bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky
Vedoucí práce	Mgr. Radka Končítíková, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Aldehyddehydrogenasy rodiny 3 jsou zejména v rostlinné říši málo prozkoumanou skupinou a rozdělují se do 6 podrodin. Doposud byly popsány především zástupci této rodiny v tabáku a arabidopsis. Krystalová struktura je známá pouze pro lidskou ALDH 3. Předpokládá se, že tato rodina by měla být exprimována v souvislosti se stresem, zejména salinitním, dehydratací, těžkými kovy a pesticidy. Doposud nebyla přesně popsána funkce rostlinných ALDH 3, podle dostupných hypotéz by se tyto enzymy mohly účastnit různých detoxifikačních drah, dle některých dostupných predikcí je exprese řízena kyselinou abscisovou. Tato bakalářská práce je zaměřená na studium vlivu abiotického stresu na změnu genové exprese aldehyddehydrogenas rodiny 3 u jednoděložných rostlin, jmenovitě kukuřice seté (*Zea mays*) a ječmene setého (*Hordeum vulgare*). Genová exprese byla studována pomocí qPCR, které předcházela reverzní transkripce. Byl pozorován pokles hladiny transkriptu ve vzorcích kukuřice, které byly vystaveny salinitnímu stresu v kombinaci s ošetřením vybranými polyaminy. U vzorku získaných z rostlin ječmene lze pozorovat významný rozdíl v expresi pro gen *ALDH3-2*, jehož hladiny vzrostly u listu rostlin kultivovaných v zasoleném prostředí. V kořeni byly naopak nadexprimovány geny *ALDH3-4* a *ALDH3-5*. Byla provedena fylogenetická analýza aldehyddehydrogenas rodiny 3.

Klíčová slova	genová exprese, qRT-PCR, fylogenetická analýza, ALDH, aldehyddehydrogenasa, ALDH 3, enzym, rostlina, rostlinný enzym, kukuřice, <i>Zea mays</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , ječmen
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Autor's first name, surname	Ivana Čečerová
Title	Analysis of aldehyde dehydrogenase gene expression in monocots
Type of thesis	bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics
Supervisor	Mgr. Radka Končítíková, Ph. D.
The year of presentation	2020

Abstract

Aldehyde dehydrogenases of family 3 are especially in the plant kingdom little investigated group of enzymes. They are divided into six subfamilies. Up to now, members of this family have been described mainly in tobacco and Arabidopsis species. The crystal structure is known only for human ALDH 3. It has been thought this family is expressed in association with stress, particularly salinity, dehydration, heavy metals, and pesticides. So far, the precise function of plant ALDH 3 has not been clarified. According to current hypotheses, these enzymes are involved in various detoxification pathways. The available predictions suggest that abscisic acid can control their expression. This bachelor thesis is aimed at studying the effect of abiotic stress on the altered gene expression of aldehyde dehydrogenase family 3 in monocotyledonous plants, namely maize (*Zea mays*) and barley (*Hordeum vulgare*). Gene expression was examined by the qPCR technique preceded by reverse transcription. A decrease in transcript levels was observed in maize samples exposed to salinity stress in combination with treatment with selected polyamines. A significant difference in the expression was observed for the samples obtained from barley plants. *ALDH3-2* levels have increased in the leaves samples under high-salt conditions. Unlike the root where ALDH 3-4 and ALDH 3-5 genes were overexpressed significantly. Phylogenetic analysis of aldehyde dehydrogenase family 3 was performed.

Keywords	gene expression, qRT-PCR, phylogenetic analysis, ALDH, aldehyde dehydrogenase, ALDH 3, enzyme, plant, plant enzyme, maize, <i>Zea mays</i> , barley, <i>Hordeum vulgare</i>
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 Úvod	8
2 Současný stav řešené problematiky	9
2.1 Nadrodina aldehyddehydrogenas	10
2.2 Aldehyddehydrogenasa 3	11
2.3 Real-time PCR	13
2.3.1 TaqMan	14
2.3.2 SYBR Green	15
2.3.3 Molecular beacon sondy	17
2.3.4 Scorpion sonda	19
2.3.5 FRET sonda	20
2.3.6 Microarray	21
3 Experimentální část	22
3.1 Biologický materiál	22
3.2 Chemikálie	22
3.3 Přístroje a pomůcky	22
3.4 Program	23
3.5 Metody	24
3.5.1 Izolace RNA	24
3.5.2 Ošetření Dnasou a precipitace (ošetření LiCl)	25
3.5.3 Stanovení koncentrace	26
3.5.4 Reverzní transkripce komplementární DNA	26
3.5.5 RT – qPCR	26
3.5.6 Fylogenetická analýza ALDH 3 a HvALDH	29
4 Výsledky a diskuze	33
4.1 Genová exprese HvALDH 3	33
4.2 Genová exprese ZmALDH 3 za hydroponických podmínek	35
4.3 Genová exprese ZmALDH 3 na polyaminech	36
4.4 Fylogenetická analýza ALDH 3	37
4.5 Fylogenetická analýza ALDH v ječmeni setém	39
5 Závěr	40
6 Literatura	41
7 Seznam použitých zkratk	46

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

Zpracování literární rešerše na téma aldehyddehydrogenasy rodiny 3 (ALDH 3)

Praktická část:

Příprava vzorků pro RT-qPCR

Analýza genové exprese pomocí RT-qPCR

Analýza genomu a fylogenetická analýza ALDH rodiny 3

1 Úvod

Nadrodina aldehyddehydrogenas (ALDH; EC 1.2.1.3) je tvořena velkou škálou enzymů účastnících se endogenních a exogenních aldehydových metabolismů. Kofaktorem ALDH enzymů jsou buď NAD^+ nebo NADP^+ , které oxidují aldehydy na příslušné karboxykyseliny za vzniku redukovaných kofaktorů NADH a NADPH. Sloučeniny s aldehydovou funkční skupinou jsou tvořeny jako důležité intermediáty v mnoha katabolických i anabolických metabolických drahách jako je metabolismus lipidů nebo aminokyselin. Kromě toho tvorba NADH/NADPH zprostředkovaná pomocí ALDH představuje jeden z mnoha zdrojů redukčních ekvivalentů potřebných pro udržení buněčné redoxní rovnováhy (Brocker *et al.*, 2013).

Důvod, proč byla studována právě aldehyddehydrogenasa rodiny 3 je, že nás zajímá její souvislosti s odpovědí na stres. Tato rodina je také zajímavá tím, že není nijak dobře prostudovaná v rostlinné říši a jaká je její přesná funkce je v aktuální chvíli otazník.

Při studii genů ALDH 3 byl pozorován stejný trend u kukuřice i ječmene. Podobný trend pozorovali také Kirch *at al.* (2004) u *A. thaliana*. Gen ALDH 3-2 byl nadexprimován v listech, zatímco gen ALDH 3-4 a ALDH 3-5 byly nadexprimovány v kořeni. Při studii vlivu abiotického stresu na expresi genů ALDH 3 rostliny *Zea mays* bylo pozorováno snížení exprese při salinitě u všech vzorků kromě vzorku stresované T-sperminem, který měl opačný spád.

2 Současný stav řešené problematiky

Aldehydy jsou generovány z celé řady endogenních a exogenních prekurzorů během četných fyziologických procesů, včetně biotransformace endogenních sloučenin, jako jsou aminokyseliny, neurotransmitery, uhlohydráty a lipidy (Vasiliou *at al.*, 2000; Vasiliou *at al.*, 2004, O'Brien *at al.*, 2008). Více než 200 druhů aldehydů vzniká oxidační degradací lipidů buněčných membrán, známých také jako peroxidace lipidů (LPO), včetně 4-hydroxy-2-nonenalu (4-HNE) a malondialdehydu (MDA) (Esterbauer *at al.*, 1991). Katabolismus aminokyselin vytváří několik aldehydových meziproduktů, včetně glutamátu γ -semialdehydu, neurotransmitery, jako je kyselina γ -aminomáselná (GABA), serotonin, noradrenalin, adrenalin a dopamin, také vedou k metabolitům aldehydu (Vasiliou *at al.*, 2004; Marchitti *at al.*, 2005).

Xenobiotika a léčiva – včetně ethanolu, který vytváří acetaldehyd, a protirakovinných léků cyklofosamidů (CP) a fosamidů, které vytvářejí akrolein – jsou důležitými exogenními prekurzory aldehydů. Různé aldehydy, včetně formaldehydu, acetaldehydu a akroleinu, jsou také všudypřítomné v životním prostředí a jsou přítomny ve smogu, cigaretovém kouři a výfukových plynech motorových vozidel. Aldehydy se také používají nebo vyrábějí v široké škále průmyslových aplikací, včetně výroby pryskyřic, polyuretanových a polyesterových plastů. Kromě toho, mnoho aldehydů v potravě, včetně citralu a benzaldehyd, přirozeně existují nebo jsou schválenými aditivami v různých potravinách, kde dodávají chuť a vůni (Marchitti *at al.*, 2008).

Ačkoli jsou některé účinky zprostředkované aldehydem, prospěšné, mnoho účinků je škodlivých, včetně cytotoxicity, mutagenity a karcinogenity (Lindahl, 1992). Aldehydy jsou vysoce reaktivní molekuly a toxické již při nízkých koncentracích díky elektrofilní povaze jejich karbonylové skupiny (Bartels a Sunkar, 2005; Lindahl, 1992). Je tedy třeba pečlivě regulovat hladiny aldehydů jako metabolického meziproduktu (Perozich *at al.*, 1999).

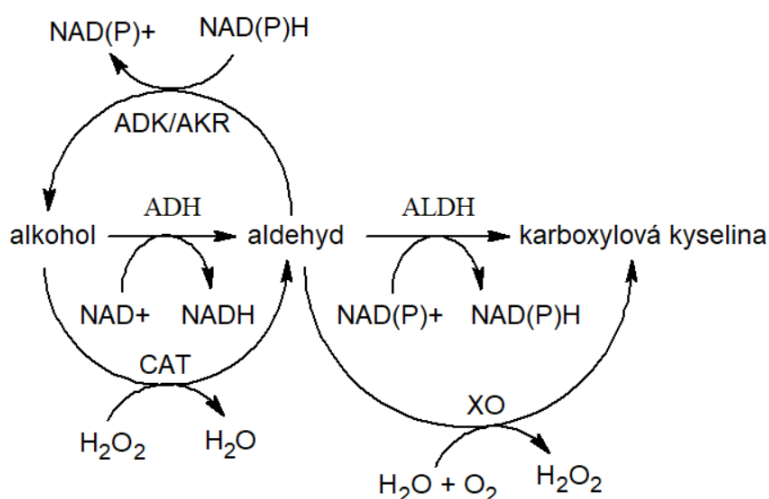
V genomu mnoha prostudovaných organismů je kódováno několik různých rodin aldehyddehydrogenas, které se uplatňují v různých fyziologických procesech. Tyto enzymy jsou rozhodující při přeměně toxických aldehydů na méně reaktivní formy

karboxylové kyseliny za pomoci kofaktorů NAD^+ nebo NADP^+ (Bartels a Sunkar, 2005). Je to především kvůli skutečnosti, že oxidační reakce je nevratná, zatímco redukční reakce jsou obecně reverzibilní (Lindahl, 1992). Některé aldehyddehydrogenasy jsou vysoce specifické, kdy oxidují jeden nebo jen velmi málo substrátů, zatímco jiné vykazují širokou substrátovou specifitu (Lindahl, 1992). Základní schéma enzymatických reakcí viz Obr. 1.

2.1 Nadrodina aldehyddehydrogenas

Genová superrodina je definována jako shluk evolučně příbuzných sekvencí a skládá se z homologních genových rodin, které jsou shluky genů z různých genomů, které zahrnují jak orthology, tak paralogy. Orthology jsou geny v různých druzích, které se vyvinuly ze společného předka separací, zatímco paralogové geny jsou produkty událostí genové duplikace ve stejném genomu. Orthology mají obvykle stejnou funkci, což umožňuje přenos funkčních informací z jednoho člena do všech ostatních (Tutosov *at al.*, 1997).

Fylogenetická analýza aldehyddehydrogenas ukazuje na 14 ALDH rodin popsaných v rostlinách (Perozich *at al.*, 1999): ALDH 2, ALDH 3, ALDH 5, ALDH 6, ALDH 7, ALDH 10, ALDH 11, ALDH 12, ALDH 18, ALDH 19, ALDH 21, ALDH 22, ALDH 23 a ALDH 24. Rodiny ALDH 10, ALDH 12, ALDH 21, ALDH 22, ALDH 23 a ALDH 24 (Jimenez-Lopez *at al.*, 2016) jsou specifické pro rostliny, zatímco rodiny ALDH 2,



Obr. 1: Enzymatický metabolismus aldehydů; ADH – alkoholdehydrogenasa (EC 1.1.1.1), AKR – aldo-ketoreduktasa (EC 1.1.1.21), ADK – adenylátkinasa (EC 2.7.4.3), ALDH – aldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.3), CAT – katalasa (EC 1.11.1.6), XO – xantinoxidasa (EC 1.17.3.2.); upraveno pomocí softwaru ACD/ChemSketch podle Marchitti *at al.*, 2008

ALDH 3, ALDH 5, ALDH 6, ALDH 7 a ALDH 18 mají savčí orthology. Celkový počet genů ALDH v daném rostlinném druhu se velmi liší (Brocker *et al.*, 2013). Nemůžeme však s jistotou konstatovat, že je počet již nalezených ALDH je konečné číslo. Časem se mohou objevit ještě další rodiny ALDH.

ALDH se shlukují do dvou hlavních kmenů fylogenetického stromu. Největší kmen obsahuje převážně ALDH specifické pro substrát, jakož i samotnou rodinu ALDH třídy 3. Druhý kmen obsahuje převážně variabilní substrátové ALDH, včetně rodin ALDH třídy 1 a 2. K divergenci substrátově specifických ALDH došlo dříve než k rozdělení mezi ALDH se širokými substrátovými specifitami (Perozich *et al.*, 1999).

Všechny enzymy z rodiny ALDH vyžadují kofaktor NAD(P)⁺. Díky jejich podobné primární struktuře mají velice podobné sekundární struktury. Kvartérní struktura je buď dimerní, tetramerní nebo hexamerní, monomer nevykazuje enzymovou aktivitu (Moore *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 2016).

2.2 Aldehyddehydrogenasa 3

Studie na savcích ukázaly, že homology ALDH 3 se nacházejí jak v cytosolu, tak v mitochondrii (EC 1.2.1.5) (Marchitti *et al.* 2008). Předpokládá se, že exprese mnoha genů v této rodině je regulována v souvislosti s kyselinou abscisovou (ABA). Rostlinná ALDH 3 se rozdělila do šesti podrodin, konkrétně ALDH 3E, ALDH 3F, ALDH 3H, ALDH 3I, ALDH 3J a ALDH 3K (Brocker *et al.*, 2013).

Je zajímavé, že stresem regulovaná exprese ALDH 3I1 je omezena na listy a transkript je téměř nezjistitelný v kořenech. Naproti tomu ALDH 3H1 je konstitutivně exprimován v nízkých hladinách v listech, ale je aktivován v odezvě na osmotický stres nebo po ošetření ABA v kořenové tkáni, zatímco exprese ALDH 3F1 vůbec na stres nereaguje (Kirch *et al.*, 2004).

Na základě velmi odlišných vzorců exprese a odezvy tří isoform ALDH (ALDH 3F, ALDH 3H a ALDH 3I) *A. thaliana* bylo navrženo, že se isoformy ALDH 3 vyvinuly v důsledku funkční specializace v konkrétních tkáních a subcelulárních organelách. Sekvenční analýza ALDH 3I1 prokázala předpokládaný peptid v chloroplastu o 60 aminokyselinách, zatímco ALDH 3F1 a ALDH 3H1 jsou pravděpodobně lokalizovány v cytosolu (Kirch *et al.*, 2004).

Proteiny ALDH 3 tvoří jednu z nejrozšířenějších a nejrozmanitějších skupin rostlinných genových rodin ALDH. Genomy *Z. mays*, *O. sativa* a *P. patens* obsahují pět homologů ALDH 3. *Sorghum bicolor* a *V. vinifera* obsahují vždy čtyři ALDH 3, zatímco *S. moellendorffii*, *A. thaliana* a *P. trichocarpa* obsahují dva, tři a šest genů ALDH 3. Již dříve bylo objeveno, že jednobuněčné řasy *C. reinhardtii* postrádají ALDH 3. Také řasy *V. carteri* postrádají ALDH 3, což naznačuje, že k expanzi a diverzifikaci rodiny genů ALDH 3 došlo ve spojení s evolučním pohybem vodních rostlin na půdu (Brocker *et al.*, 2013).

Doposud nebyla prostudována struktura rostlinné ALDH 3, známá je pouze krystalová struktura lidské ALDH 3A. Podrodina lidské ALDH 3A obsahuje ALDH 3A1 (Obr. 2) a ALDH 3A2, které se pravděpodobně podílejí na oxidaci alifatických a aromatických aldehydů se středním a dlouhým řetězcem (tzv. mastné aldehydy).



Obr. 2: Krystalová struktura lidské aldehyddehydrogenasy 3A1 (PDB ID 3SZA), převzato z Khanna *et al.*, 2011

Podrodina lidské ALDH 3B sestává ze dvou strukturně příbuzných genů, ALDH 3B1 a ALDH 3B2. Dosud neexistují žádná funkční data pro žádný tento enzym (Vasiliou *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 1998).

ALDH 3A1 (Obr. 2) je dimer skládající se ze 2 stejných podjednotek obsahující 43,8 % α -helixů, 4,2 % β skládaných listů, 28,2 % otoček a 23,8 % náhodných struktur (Liu *et al.*, 1997).

2.3 Real-time PCR

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (PCR v reálném čase), také známá jako kvantitativní PCR, se používá ke stanovení relativní genové exprese nebo ke kvantifikaci přesných hladin mRNA v buňkách nebo tkáních. Pro kvantitativní PCR se běžně používají čtyři různé typy chemických činidel: činidla vázající se na dsDNA (SYBR Green), hydrolytické sondy (TaqMan), vlásenkové sondy (molekulární majáky) a fluorescenčně značené hybridizační sondy (Light Cycler) (Chao, 2008).

Mezi výhody tohoto postupu v porovnání s konvekčními metodami měření RNA patří citlivost a přesná kvantifikace. Mnoho klíčových proteinů se nachází v tak nízké koncentraci, že kvantifikace jejich mRNA pomocí RT-PCR představuje jedinou techniku dostatečně citlivou na spolehlivé měření jejich exprese *in vivo* (Huggett *et al.*, 2005). Stanovení množství mRNA v buňkách je běžný způsob, jak monitorovat reakce biologických systémů na podněty prostředí, například na salinitu (Becker-André *et al.*, 1989). PCR je dnes rutinní analytickou metodou a lze technicky provádět i velké série experimentů najednou.

Kvantitativní PCR probíhá jako kontinuální sběr fluorescenčního signálu z jedné nebo více polymerázových řetězových reakcí (obvykle se používá 96-ti jamková destička) v průběhu každého cyklu. Kvantitativní PCR v reálném čase je převod fluorescenčních signálů z každé reakce na číselnou hodnotu pro každý vzorek (Dorak, 2006).

Existuje několik způsobů, jak vyšetřovat buňku na změny vyvolané umělými nebo přírodními činiteli během biologického procesu. Jedním ze způsobů je hledat změny v hladinách buněčných transkriptů, které mohou naznačovat změny v odpovídajících proteinech. V jiném případě se může zaměřit na přítomnost nebo nepřítomnost virového nebo bakteriálního patogenu. V tomto případě poskytuje detekce nejen přítomnosti, ale

také úrovně patogenu, což mohou být cenné informace při navrhování léčebného režimu. Alternativně může být otázkou zájmu zvýšení hladiny exprese z transgenu nebo inhibice exprese endogenního genu siRNA. Ve všech případech lze pro poskytnutí požadovaných informací použít technologii PCR v reálném čase (Dorak, 2006).

Aplikace technologie qPCR lze široce rozdělit na výzkumné a diagnostické aplikace. Výzkumné aplikace obvykle analyzují širokou škálu cílů s poměrně nízkou propustností a mnoha různými typy vzorků. Hlavní parametry, které je třeba řešit, se týkají analytické citlivosti a specifity testu, které v této souvislosti odkazují na to, kolik cílových kopií může test detekovat, a zda kontroly bez templátu jsou spolehlivě negativní (Bustin *at al.*, 2009). Analytická citlivost se týká minimálního počtu kopií ve vzorku, které lze přesně měřit pomocí testu. Typicky je citlivost vyjádřena jako mez detekce (LOD), což je koncentrace, která může být detekována s přiměřenou jistotou (běžně se používá 95% pravděpodobnost) při daném analytickém postupu (Persing, 2011). Experimentální výsledky menší než teoreticky možné LOD by nikdy neměly být uvedeny. Z toho také vyplývá, že výsledky „0“ jsou bezvýznamné a zavádějící. Odhady LOD v analýzách qPCR jsou komplikovány logaritmickou povahou C_T , protože C_T není definováno, když je koncentrace templátu nulová (Burns a Valdivia, 2008).

qPCR experiment lze vyhodnotit několika způsoby:

a) pomocí následné gelové elektroforézy a dalších časově náročných kroků, jako je Southern blot či DNA sekvencování

b) pomocí moderní technologie, kdy pro získání dat je v termocykleru zabudovaný detektor. Detektor zachytává signál ve formě fluorescenčního záření v každém cyklu (Bustin, 2000).

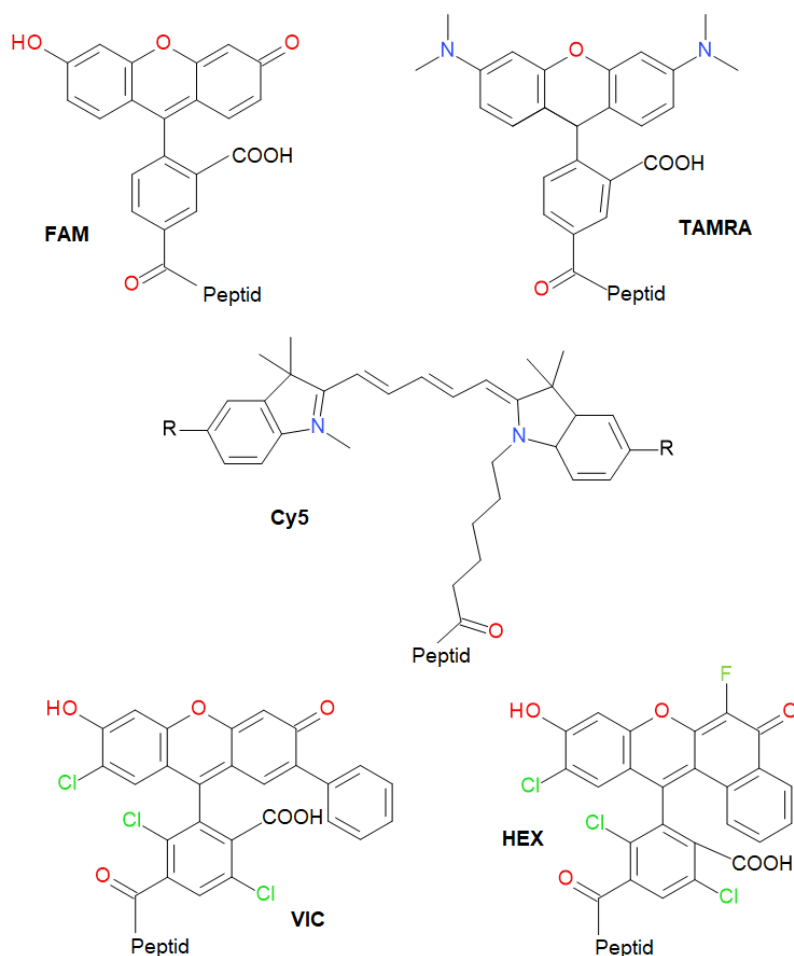
Pro kvantitativní PCR se běžně používá několik různých technologií, které slouží jako zdroj fluorescence: nejčastěji TaqMan sondy a SyberGreen. nebo Scorpion sondy, FRET a molekulární majáky (Molecular Beacon sondy).

2.3.1 TaqMan

TaqMan používá 5'-3' exonukleázovou aktivitu Taq DNA polymerasy, která degraduje fluorescenční DNA sondu po hybridizaci a prodloužení v qPCR (Heid *at al.*, 1996). Sekvenčně specifické sondy TaqMan jsou značeny fluorescenčním reportérem (5' konec) a zhášecem (3' konec; molekulu barviva, která blokuje emisi fluorescence

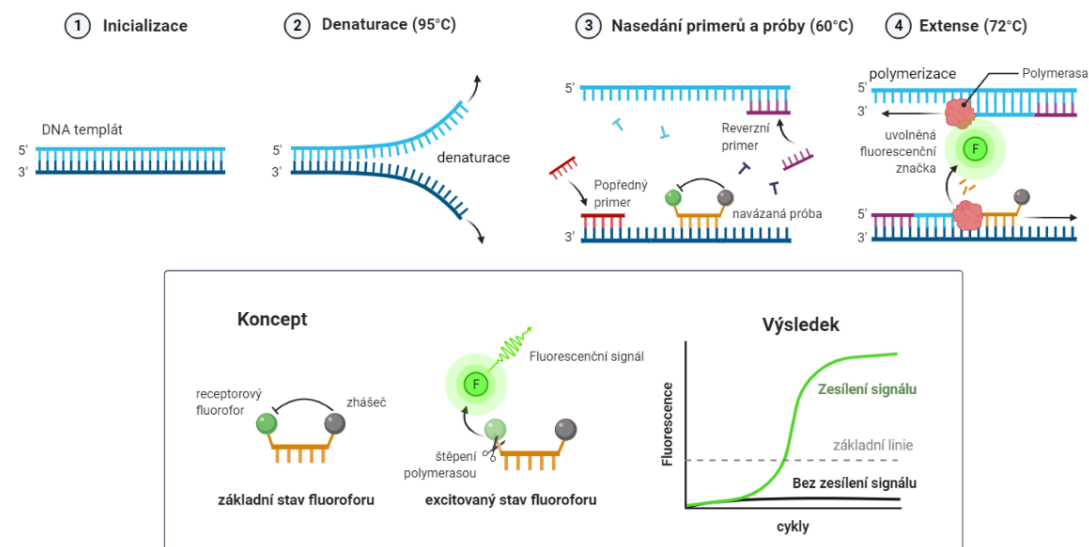
z fluoroforu), které jsou udržovány v těsné blízkosti, dokud nedojde k hybridizaci s cílem. V konvenční technologii TaqMan jsou reportér fluorofor [fluorescein (FAM)] a fluorescenční zhášec [rhodamin (TAMRA)] (Obr. 3) vázány na 5'a 3' konce sekvence sondy a přenos energie fluorescence-rezonance (FRET) z reportéru do zhášeče dosahuje potlačení fluorescence reportérové molekuly (Reynisson *at al.*, 2006; LabGuide, c2014-2019). Dají se však využít i jiné fluorofory jako HEX, VIC, Cy5, Texas red, JOE (Obr. 3) jako reportéry, NFQ jako zhášec (Thermo Fisher Scientific, 2018).

Po nasedání posměrných a reverzních primerů na cílovou sekvenci je TaqMan sonda navržena tak, aby nasedla mezi těmito místy primerů a je hydrolyzována 5'-3'exonukleázovou aktivitou Taq-polymerasy. Pokud není přítomen žádný produkt, sonda se neváže a není degradována; proto reportér zůstává ztlumený. Hydrolýza sondy má za následek depresi reportéru a následné kumulativní zvýšení fluorescence úměrné množství přítomného transkriptu (Obr. 4). Tento přístup oligonukleotidový primer/sonda zvyšuje přesnost a specifitu detekce produktu PCR v důsledku požadavku na přesné,



Obr. 3: Chemická struktura vybraných fluoroforů (vytvořeno v BIOVIA Draw 2021)

Real Time PCR (qPCR) technologie TaqMan



Obr. 4 Znáznornění kroků při metodě Taqman;

1 – vložením DNA templátu do jamky může začít první PCR cyklus

2 – denaturace dsDNA probíhá za zvýšené teploty (95 °C)

3 – annealing neboli nasedání primerů na ssDNA; blízkost signálního barviva (kruh) a zhášec potlačuje signál z fluorescenčního barviva na 5'-konci sondy; polymerizace probíhá při stejné teplotě jako nasedání sondy

4 – polymerasa vytěsňuje a hydrolyzuje značenou sondu; fluorescenční barvivo je uvolněno ze své blízkosti zhášec a je detekována fluorescence, tento signál je přímo úměrný počtu molekul přítomných na konci předchozího nebo začátku aktuálního cyklu (Bustin, 2000, obr. převzat z biorender.com)

genově specifické párování tří nezávislých nukleotidových sekvencí (Wang *et al.*, 1999).

Některé termální cyklovače PCR v reálném čase vyžadují vnitřní referenční barvivo, jako je ROX, k řízení variability v optickém systému a normalizaci rozdílů v intenzitě signálu.

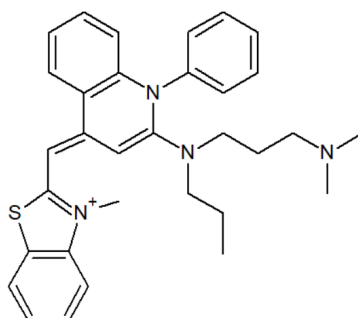
2.3.2 SYBR Green

„Sybегreen (Obr. 5) patří k nespecifickým fluorescenčním substrátům, tj. substrátům, které se váží pouze na přítomnou dvouvláknovou DNA bez jakékoliv specifity k sekvenci“ (LabGuide, c2014-2019).

Důležitý rozdíl mezi sondami TaqMan a chemickými barvivy SYBR Green barviva je v tom, že se SYBR Green váže všechny dvouvláknové DNA, včetně nespecifických reakčních produktů. Dobře optimalizovaná reakce je proto nezbytná pro přesné výsledky (Thermo Fisher Scientific, 2018). Planární aromatické kruhy SYBR Green se

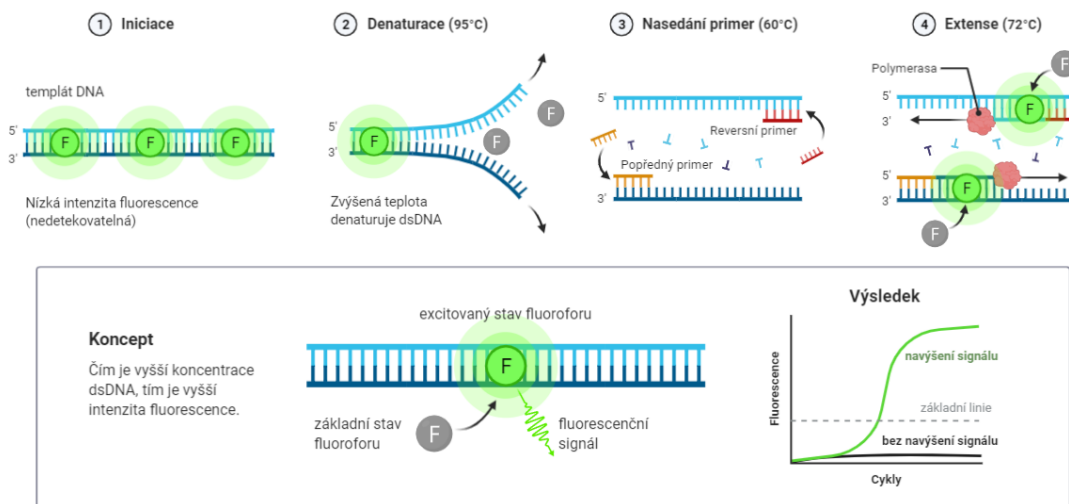
interkalují do DNA, díky energeticky výhodné interakci (Dragan *at al.*, 2012). Interakce v malé drážce DNA, interkalace mezi páry bází a stabilizace elektrostatického komplexu SYBR Green-DNA přispěly ke zvýšené afinitě SYBR Green k dvouřetězcové DNA (Cosa *at al.*, 2001).

Fluorescence je emitována úměrně množství dvouřetězcové DNA (Obr. 6). V PCR reakci je množství vstupní DNA nebo cDNA minimální, proto je nutné přítomnou dvouřetězcovou DNA replikovat v dostatečném množství, aby ji bylo možné detekovat (Dorak, c2006).



Obr. 5: Chemická struktura barviva SyberGreen (vytvořeno v ACD/ChemSketch)

Real Time PCR (qPCR) technologie SYBR Green



Obr. 6: Znázornění kroků při metodě SybrGreen:

- 1 – na začátku všech cyklů je nízká intenzita fluorescence kvůli nízké koncentraci dsDNA
- 2 – během denaturace (vznik ssDNA) nenavázané barvivo SYBR Green nevykazuje fluorescence
- 3 – při nasedání primerů a próby se několik molekul barviva váže na dvouřetězcový úsek, což vede k emisi světla po excitaci
- 4 – během polymeračního kroku se stále více molekul barviva váže na nově syntetizovanou DNA a zvýšení fluorescence lze monitorovat pomocí qPCR (Bustin, 2000) (obr. převzat z Biorender.com)

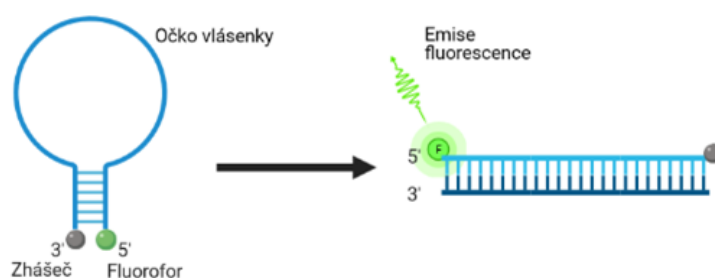
2.3.3 Molecular beacon sondy

Molecular beacon (MB) jsou jednovláknové sondy z nukleových kyselin. Snadno rozlišují cíle, které se od sebe liší v jediném nukleotidu. Díky tomu dokáže MB rozeznat svůj cíl s větší specifitou než próby, které nejsou schopny vytvořit vlásenkový tvar, např. TaqMan (Zhang *at al.*, 2021).

Díky specifické kapacitě cílů a možnosti výběru různých fluorescenčních barviv a zhášedel jsou MB pozoruhodně univerzální. Mezi jejich hlavní výhody patří jedinečné konstrukce, nízká fluorescence pozadí, vlastní produkce fluorescenčního signálu, příznivé termodynamické vlastnosti a rozpoznávání bez separace (Marras, 2008).

Fluorofor a zhášec jako signální molekuly vytvářejí signály zapnutí nebo vypnutí závislé na strukturním stavu MB. Když je fluorofor jako donorní část ve své excitované formě, může dojít k přenosu energie. Na druhou stranu se signál fluorescence snadno vytvoří, když je zhášecí molekula ve větší vzdálenosti (Obr. 7) (Kim *at al.*, 2008).

Real Time PCR (qPCR) Molecular Beacon sonda



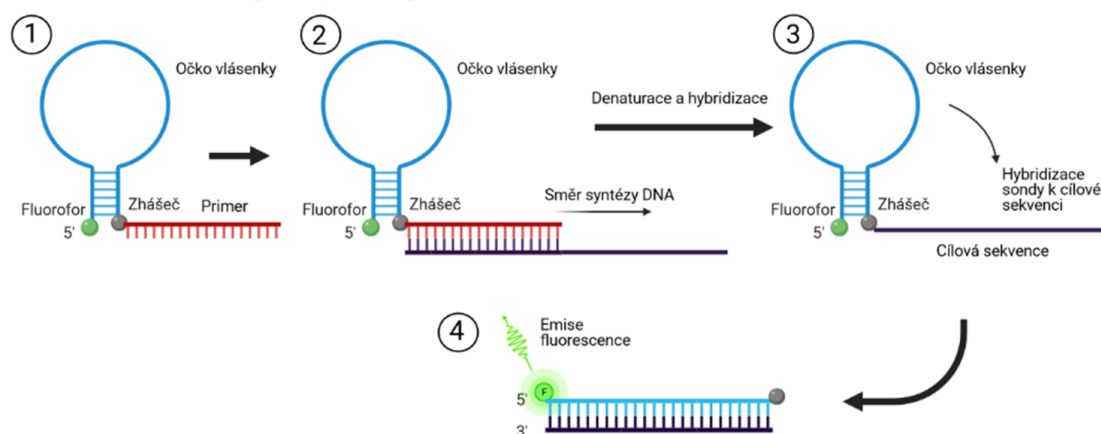
Obr. 7: Znázornění vzniku fluorescence u vlásenkové sondy MB (vytvořeno v *Biorender.com*)

2.3.4 Scorpion sonda

Scorpion sonda sestává z jednovláknové dvojznačené sekvence fluorescenční sondy držené v konformaci vlásenkové smyčky s 5' koncovým reportérem a interním zhášecem přímo spojeným s 5' koncem PCR primeru pomocí blokátoru. Blokátor zabráňuje polymerase v prodlužování PCR primeru.

Na začátku qPCR polymerasa prodlužuje PCR primer a syntetizuje komplementární vlákno specifické cílové sekvence. Během příštího cyklu se vlásenková smyčka odvíjí a smyčková oblast sondy intramolekulárně hybridizuje s nově syntetizovanou cílovou sekvencí. Nyní, když reportér již není v těsné blízkosti zhášedce, může docházet k emisi fluorescence (Obr. 8). Fluorescenční signál je detekován na detektoru a je přímo úměrný množství cílové DNA (Sigma-Aldrich spol. s.r.o., 2020).

Real Time PCR (qPCR) Scorpion sonda



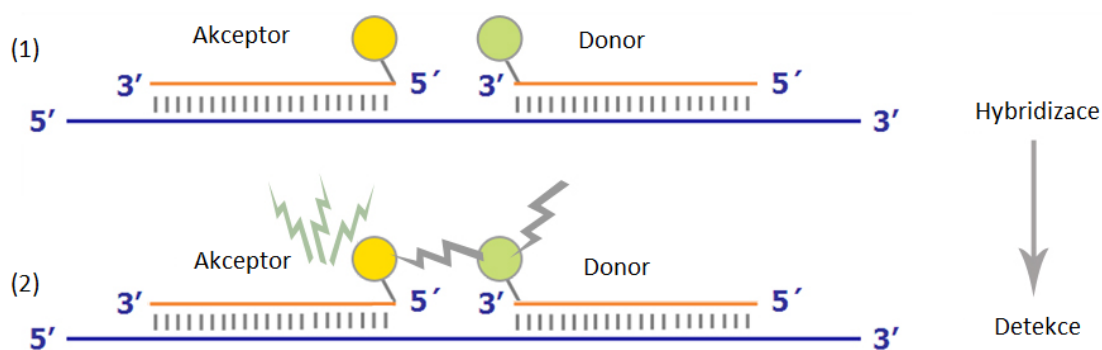
Obr. 8: Znázornění principu navázání a aktivování Scorpion sondy při qPCR:

- 1 – navázání deaktivované sondy na DNA pomocí primeru
- 2 – denaturace sondy pro následné navázání na cílovou sekvenci
- 4 – hybridizací sondy je způsobena fluorescence. (vytvořeno v *Biorender.com*)

2.3.5 FRET sonda

Fösterův přenos rezonanční energie, FRET, byl poprvé popsán Theodorem Fösterem v roce 1946 (Föster, 1946). FRET je založena na přenosu neradiační energie mezi excitovaným donorním fluoroforem a akceptorním fluoroforem (Pietraszewska-Bogiel a Gadella, 2011).

Donor (sonda na 3' konci) shromažďuje záření (externí zdroj světla) na excitační vlnové délce a přenáší tuto energii do akceptoru (sonda na 5' konci), který ji emituje na delší vlnové délce. Když emisní spektrum donoru překrývá absorpční spektrum akceptoru, může dojít k radiačnímu přenosu energie z donoru na akceptor. Když je donor excitovaný, můžeme pozorovat fluorescenční emisi akceptoru v důsledku přenosu energie (Obr. 9). Díky této metodě může být snížena chyba detekce fluorescence a samovznícení (Sun *at al.*, 2020).



Obr. 9: Znázornění principu aktivování FRET sondy při qPCR; (1) navázání donoru a akceptoru na DNA (2) excitace donoru pomocí externího zdroje světla, transport energie do akceptorového fluoroforu, detekce excitovaného akceptoru (převzato z *eurofinsgenomics.eu*)

2.3.6 Microarray

Microarray je laboratorní nástroj používaný k detekci exprese tisíců genů současně. Mikročipy DNA jsou mikroskopická sklíčka, která jsou potištěna tisíci drobných skvrn v definovaných pozicích, přičemž každá skvrna obsahuje známou sekvenci DNA nebo gen. Tyto sklíčka se často označují jako genové čipy nebo DNA čipy. Molekuly DNA připojené ke každému sklíčku fungují jako sondy k detekci genové exprese, která je také známá jako transkriptom nebo sada transkriptů messengerové RNA (mRNA) exprimovaných skupinou genů (Tarca *at al.*, 2006).

Takové vysoce výkonné profilování exprese lze použít k porovnání úrovně transkripce genů v klinických podmínkách za účelem:

- 1) identifikace diagnostického nebo prognostického biomarkeru
- 2) klasifikovat nemoci (např. nádory s různou prognózou, které nelze odlišit mikroskopickým vyšetřením)
- 3) sledovat reakci na terapii
- 4) pochopit mechanismy podílející se na genezi chorobných procesů (Bethin *at al.*, 2003).

mRNA je extrahováno z tkání nebo buněk, reverzně transkribováno a označeno barvivem (obvykle fluorescenční) a hybridizováno na matrici. Hybridizace a promývání se provádějí za velmi přísných podmínek, aby se minimalizovala pravděpodobnost křížové hybridizace mezi podobnými geny. Princip kvantifikace úrovně exprese spočívá v tom, že množství fluorescence měřené v každém místě specifickém pro sekvenci je přímo úměrné množství mRNA s komplementární sekvencí přítomnou v analyzovaném vzorku. Tyto experimenty neposkytují údaje o absolutní úrovni exprese konkrétního genu (skutečné koncentrace mRNA), ale jsou užitečné pro srovnání úrovně exprese mezi podmínkami a geny (např. zdraví, nemocní) (Gibson *at al.*, 2009).

3 Experimentální část

3.1 Biologický materiál

- Ječmen setý Golden promise (*Hordeum vulgare*), poskytla Radka Končítíková, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky
- Kukuřice setá Cellux 225 (*Zea mays*), poskytla Nuria Diego, Oddělení chemické biologie a genetiky, CRH – vzorky s polyaminy
- Kukuřice setá Cellux 225 (*Zea mays*), poskytla Radka Končítíková, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky – vzorky stresované PEG, zasolení

3.2 Chemikálie

- DNasa turbo (Invitrogen, USA)
- dusík (Messer Technogas s.r.o., CZ)
- Elution solution (Thermo Fisher Scientific, USA)
- MyTaq™ Mix (Bioline, UK)
- oligo (dT) primer (Thermo Fisher Scientific, USA)
- plazmid s genem *Z. mays* ALDH 3-1 (poskytla vedoucí práce)
- plazmid s genem *Z. mays* ALDH 3-2 (poskytla vedoucí práce)
- plazmid s genem *Z. mays* ALDH 3-3 (poskytla vedoucí práce)
- plazmid s genem *Z. mays* ALDH 3-4 (poskytla vedoucí práce)
- plazmid s genem *Z. mays* ALDH 3-5 (poskytla vedoucí práce)
- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ROX reference Dye (Invitrogen, USA)
- Invitrogen™ RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.3 Přístroje a pomůcky

- automatické pipety (Eppendorf, NSR)
- centrifuga 5430R (Eppendorf, NSR)
- folie na 96-jamkovou destičku (Thermo Fisher Scientific, USA)

- inkubátor (termocykler) (Sanyo, Japonsko)
- kádinka na odpad (100 ml) (p-LAB)
- mikrokolona; filter cartrifge (Thermo Fisher Scientific, USA)
- mikrozkuhavky (Eppendorf, NSR; Thermo Fisher Scientific, USA)
- PCR 96-jamková destička (Thermo Fisher Scientific, USA)
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)
- rotační třepačka (IKA, SRN)
- Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific, USA)
- třecí miska s tloučkem (p-LAB)

3.4 Program

- ACD/Chemsketch 12.0 (Advanced Chemistry Development, Kanada)
- BioEdit 7.2 (Tom Hall)
- Biorender (dostupné z <https://app.biorender.com/>)
- Biovia Draw 2011 (BIOVIA, www.3ds.com/biovia/)
- Dendroscope 3 (Daniel H. Huson, 2012)
- NCBI (National Center for Biotechnology Information, dostupné z <http://ncbi.nlm.nih.gov/>)
- PhyML 3.0 (Guindon *at al.*, 2010) (dostupné z <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>)
- QuantStudio^{MT} Design & Analysis software (Thermo Fisher Scientific, USA)
- T-Coffee (EMBL-EBI, 2020) (dostupné z <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>)
- UniProt (**U**niversal **P**rotein resource) (UniProt, 2015)

3.5 Metody

3.5.1 Izolace RNA

Rostlinný materiál byl homogenizován pomocí tekutého dusíku ve třecí misce. 100 mg takto připraveného vzorku bylo převedeno do 2 ml zkumavky a byl připipetován 1 ml lyzačního vazebného roztoku. Mikrozukmavky byly třepány 5 minut při 4 °C a poté zcentrifugovány při 14 000 g po dobu 5 min o teplotě 4 °C. Supernatant byl odpipetován do čisté 2 ml zkumavky, do které bylo následně přidán stejný objem 64% ethanolu. Zkumavky byly promíchány.

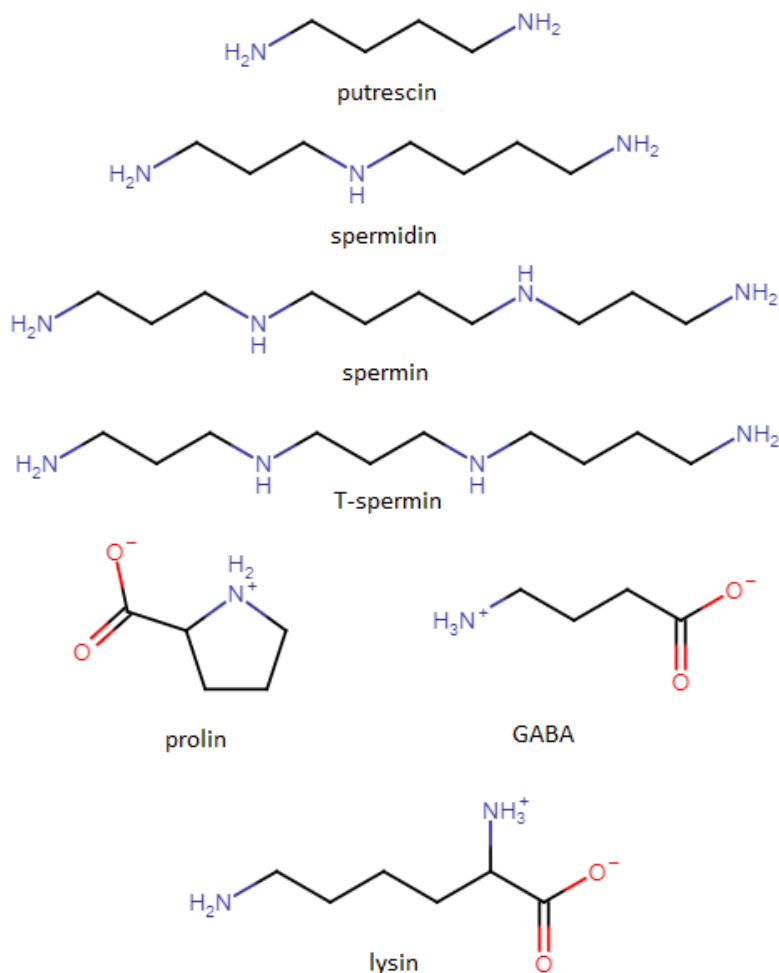
Takto připravený vzorek byl nanesen na kolonu (vždy 700 µl; Filter Cartridge) a zkumavka s kolonou byla centrifugována 30 s při 10 000 g a 4 °C. Jakmile byl celý objem z původní zkumavky zcentrifugován přes kolonu, filtr byl promyt pomocí 700 µl promývacího roztoku 1 (Wash Solution 1) a roztok byl centrifugován přes kolonu 30 s při 4 °C a 10 000 g. Následně bylo použito 500 µl druhého promývacího roztoku (Wash Solution 2) a proběhla centrifugace 30 s při 4 °C a 10 000 g.

Filtr byl po promytí vložen do nové čisté zkumavky a RNA byla eluována nejdříve pomocí 60 µl elučního roztoku (Elution Solution) vytemperovaného na 80 °C a zcentrifugováno (10 000 g, 30 s, 4 °C) a poté 40 µl elučního roztoku vytemperovaného na 80 °C za následné centrifugace (10 000 g, 30 s, 4 °C).

RNA byla izolována z kukuřice a z ječmene s různými stresovými podmínkami (Tabulka 1; Obr. 10).

Tabulka 1 Stresové podmínky růstu *Zea mays* a *Hordeum vulgare*

Ječmen setý (48 h stres)	Kukuřice setá
NaCl (200 mmol · dm ⁻³)	0,1 mmol · dm ⁻³ Spermin (+ 150 mmol · dm ⁻³ NaCl)
PEG 6000 (20%)	0,1 mmol · dm ⁻³ Spermidin (+ 150 mmol · dm ⁻³ NaCl)
Bez dusíku	0,1 mmol · dm ⁻³ Putrescin (+ 150 mmol · dm ⁻³ NaCl)
Bez stresu	0,1 mmol · dm ⁻³ Prolin (+ 150 mmol · dm ⁻³ NaCl)
	0,1 mmol · dm ⁻³ Lysin (+ 150 mmol · dm ⁻³ NaCl)
	0,1 mmol · dm ⁻³ GABA (+ 150 mmol · dm ⁻³ NaCl)
	0,1 mmol · dm ⁻³ T-spermin (+ 150 mmol · dm ⁻³ NaCl)
	NaCl (150 mmol · dm ⁻³)
	PEG 6000 (20%)
	Bez stresu



Obr. 10: Chemické struktury polyaminů použitých při stresu rostlin (vytvoreno v ACD/ChemSketch)

3.5.2 Ošetření DNasou a precipitace (ošetření LiCl)

K 90 μl RNA bylo přidáno 13 μl směsi DNA turbo pufru (10 μl) a DNasy turbo (3 μl). Směs byla inkubována při 37 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 45 minut. Poté byly přidány 2 μl DNasy turbo a roztok byl opět inkubován při 37 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 45 minut. Inaktivace byla poté provedena při 70 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut.

Po ošetření DNasou bylo ke vzorku přidáno 50 μl LiCl. Inkubace probíhala přes noc při -20°C . Po rozmražení byl roztok zcentrifugován (20 min, 16 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$). Roztok nad precipitátem byl opatrně odpipetován. Poté byl precipitát promyt 70% vychlazeným ethanolem. Suspenze byla centrifugována (20 min 16 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$), supernatant byl odpipetován a vysušen 10 minut v digestoři. (pelet však nesměl být vysušen zcela, jelikož se poté snižuje jeho rozpustnost). Poté byl pelet rozpuštěn ve 25 μl RNA-free H_2O .

3.5.3 Stanovení koncentrace

Koncentrace RNA byla stanovena pomocí nanodropu.

2 μl roztoku byly pipetovány na senzor. Absorbance byla měřena při 260 a 280 nm. Koncentrace byla určena ze vztahu $c = A_{260} \cdot 40 \cdot \text{zředění}$, tedy pokud je $A_{260} = 1$ v kyvetě je právě $40 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pokud je preparát čistým poměr $A_{260}/A_{280} = 2,1$.

RNA byla naředěna pro reverzní transkripci na koncentraci 1 μg .

3.5.4 Reverzní transkripce komplementární DNA

K naředěné RNA (na 1 μg) byly přidány 2 μl oligo (dT) primeru a 1 μl 10 mmol $\cdot \text{dm}^{-3}$ dNTP. Roztok byl inkubován při 65 °C po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 7,5 μl směsi složené z 4 μl PS II pufru, 2 μl 0,1 mol $\cdot \text{dm}^{-3}$ DTT, 1 μl RT-PS II a 0,5 μl inhibitoru. Po promíchání byl roztok inkubován při 42 °C po dobu 60 minut. Inaktivace enzymů byla poté provedena zvednutím teploty na 70 °C na 10 minut. Takto získaná cDNA byla uskladněna při teplotě -20 °C.

3.5.5 RT – qPCR

3.5.5.1 Příprava primerů a prób

Ředění primerů a prób probíhalo podle návodu od výrobce.

Tabulka 2: Použité próby a primery pro *Hordeum vulgare* a *Zea mays* a endogenní kontroly; FW – popřední primer, R – reverzní primer, Pb – próba

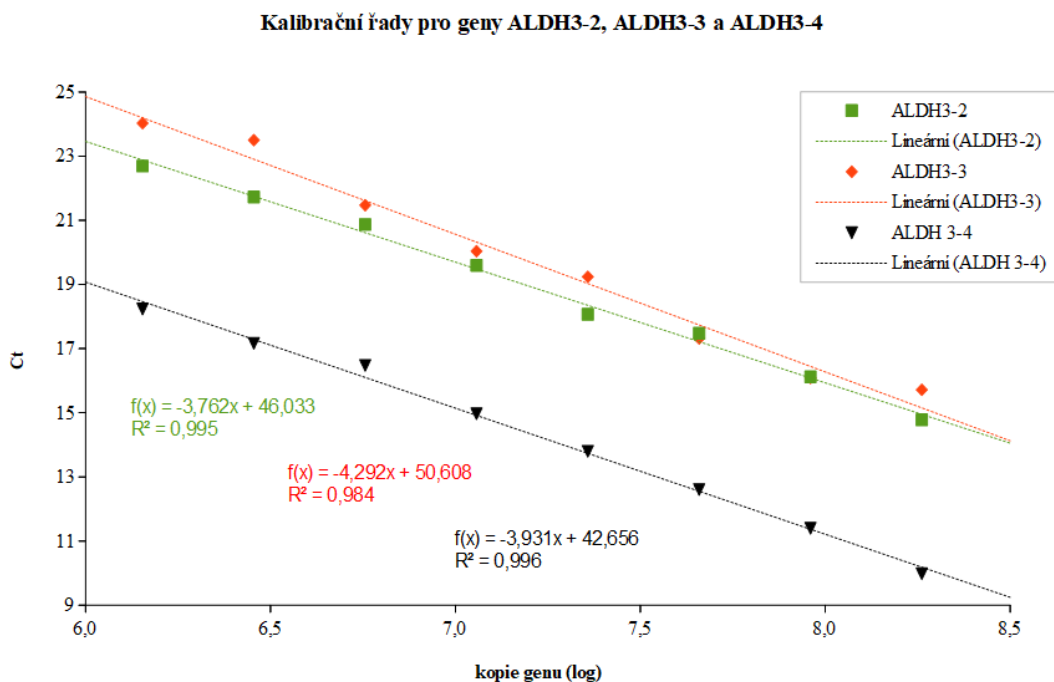
HvALDH3-1	FW	GCTTCCTGGTGGAGTTCATGTT
	R	CGCAAGCAACCCGAGTTTG
	Pb	(6FAM)ACCCGCCGTGGAACGACGAA(TAM)
HvALDH3-2	FW	GCCACTAGGTTTGGCTTTGG
	R	CGGAGGGCTTTACAACACTACAACA
	Pb	(6FAM)ACTCTCTGGCGCACTAGCAGCTGGC(TAM)
HvALDH3-4	FW	CAAGTTCTACGGAAAGGATCCACTT
	R	CCTGTTGAAATGGTCGACATTC
	Pb	(6FAM)TATCGGCAGACTTGTCCCGCGTC(TAM)
HvALDH3-5	FW	TYTCGTCATATCAGCCTGGAAC
	R	CAGCATTCCCAGCAGCAATT
	Pb	(6FAM)TCCTTTCTTGCTATCTATCGAGCCCGTCA(TAM)

Tabulka 2: Použité próby a primery pro *Hordeum vulgare* a *Zea mays* a endogenní kontroly; FW – popřední primer, R – reverzní primer, Pb – próba (*pokračování*)

Endogenní kontrola		
HvEf2	FW	AAGTCCTGCCGCACTGTCAT
	R	GGGCGAGCTTCCATGTAAAG
	Pb	(6FAM)AGCAAGTCCCCCAACAAGCATAACCG(TAM)
HvACT	FW	ATCCTCGGCTTCTCATTCCA
	R	CCAAGTATCCTCCAGCATGTCA
	Pb	(6FAM)AAGAGTTCCCTCCACCTCCCCGACC(TAM)
ZmALDH3-1	FW	TCCCATAATCACGGTGGACAA
	R	CTTGAGCTGCCCCGTCGTT
	Pb	(6FAM)CCAAGCCGCTGGCAGCTTACCTC(TAM)
ZmALDH3-2	FW	ATGGAGCCCACGCTTCTG
	R	GCAGCGGGCCGAATATCT
	Pb	(6FAM)AACCCTCCGCTCGACTCCGACA(TAM)
ZmALDH3-4	FW	GTCCTCCGCCCAAATCGT
	R	CTGGGTCGATAGAGAGTATGAAAGG
	Pb	(6FAM)CCCCTCGGCGTCGTGCTCAT(TAM)
ZmALDH3-5	FW	GGATGAAGCCCCAGAAGATACC
	R	GCTCCGGCACGATTTGAG
	Pb	(6FAM)CGGCCTTAACCACGTTCCCGTCC(TAM)
Endogenní kontrola		
ZmEF1a	FW	TGATACCCACCAAGCCTATGGT
	R	CATGTCGCGGACAGCAAAC
	Pb	(6FAM)AGACATTCTCCGCGTTTCTCCCCT(TAM)
ZmACT	FW	CCGCATGAGCAAGGAGATTAC
	R	GCGGAGCAACCACCTTCA
	Pb	(6FAM)CACTTGCCCCCAGCAGCATGAA(TAM)

3.5.5.2 Kalibrace a kalibrační křivka

Byla připravena kalibrační řada se snižující se koncentrací vždy o polovinu od předchozí koncentrace. Tedy do 1 ependorfy bylo odpipetováno 20 μl plazmidu ALDH o koncentraci $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ do zbylých 9 bylo napipetováno po 10 μl H_2O . Postupně bylo vždy 10 μl z předchozí ependorfy přeneseno a promícháno (z 1 do 2; z 2 do 3; ...). Posledních 10 μl bylo odpipetováno do odpadu.



Obr. 11: Kalibrační řada pro geny ALDH 3-2, ALDH 3-3, ALDH 3-4, jejich regresní přímky, rovnice přímky a koeficient determinace.

Vždy 2,5 μl roztoku kalibrační řady bylo pipetováno do PCR destičky. K těmto roztokům bylo přidáno 7,5 μl směsi Taqman, primer, próba. Destička byla zalepena folií, zcentrifugována po dobu 20 s a poté vložena do termálního cyklovače PCR. Podmínky byly nastaveny v softwaru QuantStudio™.

Ve všech jamkách byl vypočítán počet molekul pomocí koncentrace a velikosti plazmidů. Z takto upravených hodnot byla sestavena kalibrační přímka ().

3.5.5.3 Měření vzorku cDNA

Na přípravu Taqman qPCR mixu bylo použito 1 ml 2x MyTaqMix (Bioline), 950 μl RNA-free H_2O a 50 μl ROX (invitrogen). Pro přípravu směsi 1,2 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ primerů a 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ próby bylo smícháno 1,2 μl 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ FP (posměrný primer), 1,2 μl 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ RP (reversní primer), 1 μl 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ próby a 96,6 μl RNA-free H_2O .

Na PCR destičku bylo napipetováno 2,5 μl cDNA a 7,5 μl směsi (2,5 μl 1,2 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ primerů a 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ próby; 5 μl 2x Taqman qPCR směs). Destička byla zalepena folií, zcentrifugována (20 s, 18000 g, normální teplota) a poté vložena do termálního cyklovače PCR. Podmínky byly nastaveny v softwaru QuantStudio™.

Vzorky byly naředěny tak, aby hodnoty C_T pro endogenní kontrolu byly přibližně stejné. Po zředění byly vzorky komplementární DNA vloženy po 2,5 μ l na jamku spolu s 7,5 μ l směsí Taqman, proba, primer. Naměřené hodnoty C_T byly použity pro výpočet kopií genů jednotlivých enzymů ALDH.

3.5.5.4 Výpočet množství transkriptu

Z rovnice regresní přímky (Rovnice 1) byl vypočítán počet kopií genu (Rovnice 2). Po vydělení množstvím enzymu dostaneme počet transkriptu v jamce na 1 ng enzymu (Rovnice 3).

$$y_{C_i} = k \cdot x_{\log \text{ kopie genu}} + q$$

Rovnice 1: Obecná rovnice regresní přímky

$$\text{kopie genu} = 10^{\frac{C_{t_{\text{ALDH}}} - q}{k}}$$

Rovnice 2: Úprava obecné rovnice regresní přímky pro výpočet kopií genu

$$\text{počet transkriptu} = \frac{\text{kopie genu}}{c}$$

Rovnice 3: Rovnice výpočtu množství transkriptu v jamce

3.5.6 Fylogenetická analýza ALDH 3 a HvALDH

V databázi proteinů Phytozome v12.1 a NCBI (*Homo sapiens*) byly vyhledány aminokyselinové sekvence různých isoenzymů (pro ALDH 3) a enzymů, které obsahuje *Hordeum vulgare*. Tyto sekvence byly vkládány do softwaru BioEdit, kde byla utvořena vlastní knihovna sekvencí (.fas). Soubor byl zarovnán pomocí T-Coffee do souboru. PHYLIP. Takto vytvořený soubor byl přenesen do PhyML 3.0. Tento software vypočítal příbuznost mezi jednotlivými sekvencemi a vytvořil fylogenetický strom. Pro tvorbu fylogenetického stromu však byl využit software dendroscope, který je využíván právě na tvorbu fylogenetického stromu a jeho grafickým úpravám.

Pro tvorbu fylogenetického stromu ALDH 3 byly použity tyto organismy viz Tabulka 3, pro fylogenetický strom HvALDH byly použity enzymy vypsány v Tabulce 4.

Tabulka 3 Přehled enzymů použitých pro vytvoření fylogenetického stromu a jejich identifikátorů z databáze Phytozome a NCBI

Organismus	Zkratka enzymu	Phytozome ID
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	ALDH 3H1	AHYP O_015529-RA
	ALDH 3I1	AHYP O_021297-RA
	ALDH 3F1	AHYP O_002497-RA
<i>Ananas comosus</i>	ALDH 3I1	Aco003277.1
<i>Arabidopsis lyrata</i>	ALDH 3I1	AL7G17050.tl
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ALDH 3I1	AT4G34240.4
	ALDH 3H1	AT1G44170.1
	ALDH 3F1	AT4G36250.4
<i>Carica papaya</i>	ALDH 3I1	evm.model.supercontig_64.104
<i>Citrus sinensis</i>	ALDH 3I1	Orangel.lg014164m
<i>Eucalyptus grandis</i>	ALDH 3I1	Eucgr. F03800.1
<i>Homo sapiens</i>	ALDH 3A1	NP_001128639.1
	ALDH 3A2	NP_001026976.1
	ALDH 3B1	NP_000685.1
	ALDH 3B2	NP_001341274.2
<i>Hordeum vulgare</i>	ALDH 3-1	HORVU6Hr1G061220.6
	ALDH 3-2	HORVU6Hr1G061270.10
	ALDH 3-3	HORVU2Hr1G092530.1
	ALDH 3-4	HORVU5Hr1G037200.2
	ALDH 3-5	HORVU4Hr1G017450.1
<i>Kalanchoe laxiflora</i>	ALDH 3I1	Kalax0059s0050.1
<i>Mimulus guttatus</i>	ALDH 3I1	Migut. C01106.1
<i>Malus domestica</i>	ALDH 3I1	MDP0000531301
<i>Oropetium thomaeum</i>	ALDH 3H1	Oropetium_20150105_10808A
	ALDH 3F1	Oropetium_20150105_02896A
<i>Oryza sativa</i>	ALDH 3E1	LOC_Os02g43194
	ALDH 3E3	LOC_Os02g43280.2
	ALDH 3E2	LOC_Os04g45720.4
	ALDH 3H2	LOC_Os11g08300.11
	ALDH 3H1	LOC_Os12g07810.12
<i>Panicum virgatum</i>	ALDH 3	Pavir. Ha00899.1
<i>Physcomitrella patens</i>	ALDH 3H1	Pp1s71_128V6
	ALDH 3H2	Pp1s272_3V6

Tabulka 3 Přehled enzymů použitých pro vytvoření fylogenetického stromu a jejich identifikátorů z databáze Phytozome a NCBI (*pokračování*)

Organismus	Zkratka enzymu	Phytozome ID
<i>Physcomitrella patens</i>	ALDH 3I1	Pp1s26_253V6
	ALDH 3I2	Pp1s90_226V6
	ALDH 3I3	Pp1s124_90V6
<i>Populus trichocarpa</i>	ALDH 3F1	POPTR_0007s13650
	ALDH 3H1	POPTR_0005s20150
	ALDH 3H4	POPTR_0002s08230
	ALDH 3H5	POPTR_0001s42150
	ALDH 3H6	POPTR_0005s07090
	ALDH 3J1	POPTR_0001s26630
<i>Prunus persica</i>	ALDH 3I1	Prupe.4G279800.2
<i>Selaginella moellendorffii</i>	ALDH 3H2	168397
	ALDH 3H1	227647
<i>Sorghum bicolor</i>	ALDH 3E1	Sb04g033420
	ALDH 3H1	Sb08g004840
	ALDH 3H2	Sb05g005470
<i>Triticum aestivum</i>	ALDH 3	Traes_4AL_ADF93BAC5.2
<i>Vitis vinifera</i>	ALDH 3H1	GSVIVT01008845001
	ALDH 3F1	GSVIVT01018842001
	ALDH 3H5	GSVIVT01022356001
	ALDH 3J1	GSVIVT01025276001
<i>Z. mays</i>	ALDH 3E1	Zm00008a022472_T01
	ALDH 3E2	Zm00008a038328_T01
	ALDH 3H1	Zm00008a036562_T01
	ALDH 3H2	Zm00008a018184_T01
	ALDH 3H3	Zm00008a008139_T01

Tabulka 4: Přehled enzymů a jejich identifikátorů z databáze Phytozome použitých pro tvorbu fylogenetického stromu HvALDH

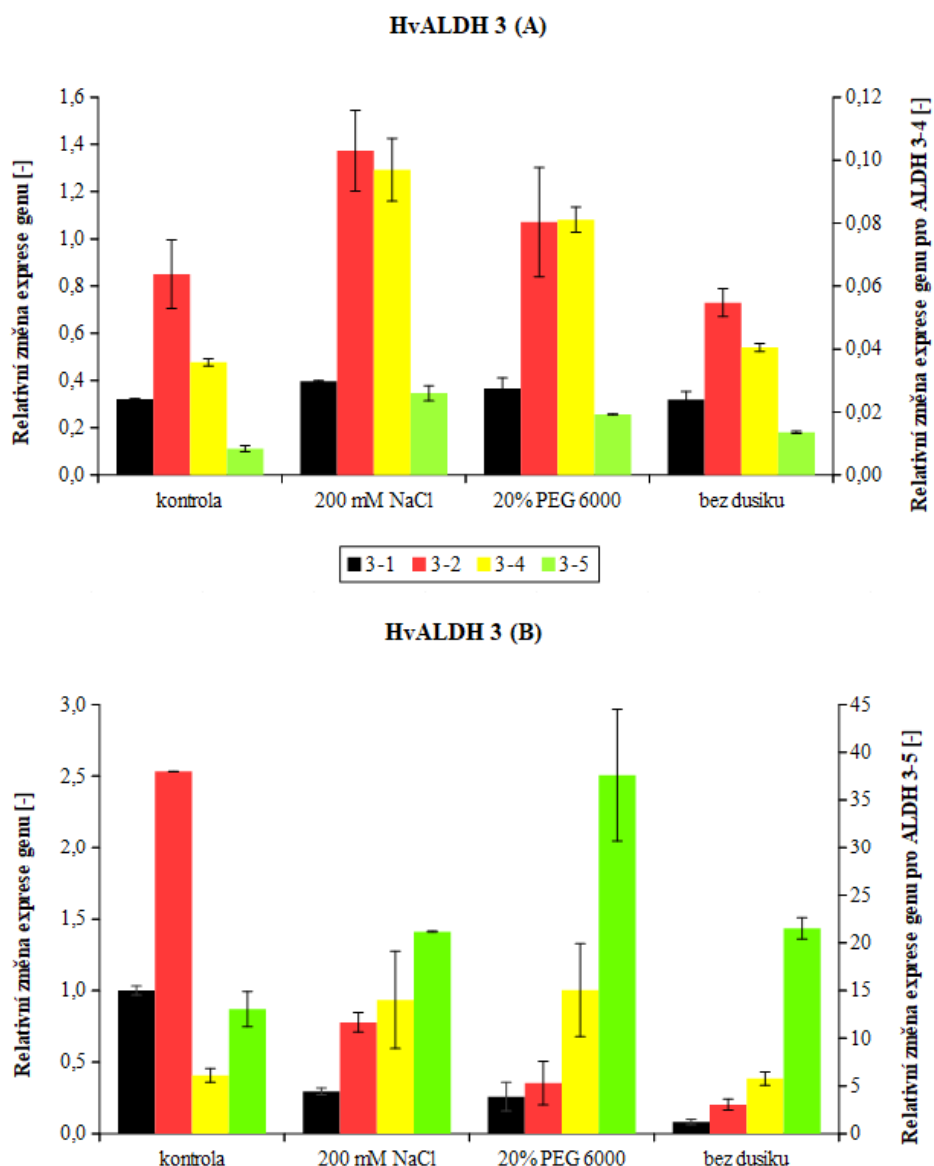
ALDH rodina	Zkratka enzymu	Phytozome ID
Rodina 2	HvALDH 2A	HORVU7Hr1G042880.2
	HvALDH 2B	HORVU6Hr1G072830.2
	HvALDH 2C	HORVU3Hr1G092680.2
	HvALDH 2D	HORVU1Hr1G068020.1
	HvALDH 2E	HORVU0Hr1G031700.1
	HvALDH 2F	HORVU7Hr1G085120.1
Rodina 3	HvALDHE 3-1	HORVU6Hr1G061220.6
	HvALDH 3-2	HORVU6Hr1G061270.10
	HvALDH 3-3	HORVU2Hr1G092530.1
	HvALDH 3-4	HORVU5Hr1G037200.2
	HvALDH 3-5	HORVU4Hr1G017450.1
Rodina 5	HvALDH 5F1	HORVU6Hr1G031480.3
Rodina 6	HvALDH 6B1	HORVU2Hr1G107550.1
Rodina 7	HvALDH 7B6	HORVU5Hr1G062090
Rodina 10	HvAMADH 1	HORVU6Hr1G087460.1
	HvAMADH 2	HORVU2Hr1G080970.1
Rodina 11	HvALDH 11A3	HORVU2Hr1G036110.11
Rodina 12	HvALDH 12	HORVU1Hr1G080320.2
Rodina 18	HvALDH 18B1	HORVU1Hr1G072780.1
	HvALDH 18B2	HORVU3Hr1G085760.5
Rodina 22	HvALDH 22A1	HORVU2Hr1G016040

4 Výsledky a diskuze

4.1 Genová exprese HvALDH 3

Analýzou genové exprese ALDH 3 v listu *Hordeum vulgare* (Obr. 12A) bylo zjištěno, že k největšímu nárůstu exprese došlo u vzorku stresovaným 20% PEG 6000 i 200 mM NaCl, a to u ALDH 3-2, ALDH 3-4 a ALDH 3-5.

V listu ječmene nevykazovala exprese ALDH 3-1 žádný vliv vůči stresům, hodnota exprese byla více méně kontantní, zároveň stresováním rostliny nepřítomností dusíku



Obr. 12: Porovnání exprese ALDH 3 v listu a kořeni ječmene po 48 hodinovém stresu. Relativní změna genové exprese HvALDH 3 v listu (A) a v kořeni (B) ječmene vystavené $200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl, 20% PEG 6000 a stresovaném bez přítomnosti dusíku.

také nevykazovalo velké výkyvy od kontrolní rostliny. HvALDH 3-2 byl exprimován při salinitě a dehydrataci více než bez stresu, zároveň při nedostatku dusíku byla exprese velmi mírně inhibována. HvALDH 3-4 je nejméně exprimovanou isoformou v listu. HvALDH 3-5 byl exprimován při všech zkoumaných stresech více než při vzorku bez stresu.

Genová exprese HvALDH 3-1 a HvALDH 3-2 v kořeni *Hordeum vulgare* (Obr. 12B) byla inhibována při všech stresech v porovnání exprese vzorku bez stresu. V Gao a Bin (2009) popsali podobný trend u rýže.

HvALDH 3-4 vykazovala minimální nárůst exprese při dehydrataci, v ostatních případech byla srovnatelná s kontrolou. HvALDH 3-5 je nejvíce exprimovaná isoformou v kořeni a to ve všech případech stresu i bez stresu. Podobně Kirch *et al.* (2004) predikuje, že se isoformy ALDH 3 vyvinuly v důsledku specializace v konkrétních tkáních a subcelulárních orgánech, a také prokázal, že ALDH 3F1 a ALDH 3H1 jsou zastoupeny převážně v kořeni *A. thaliana*, což je v souladu s výsledky publikovanými v této práci. Je tedy více než pravděpodobné, že tyto isoenzymy jsou zodpovědné za adaptaci rostlin na vysokou salinitu půdy a dehydrataci.

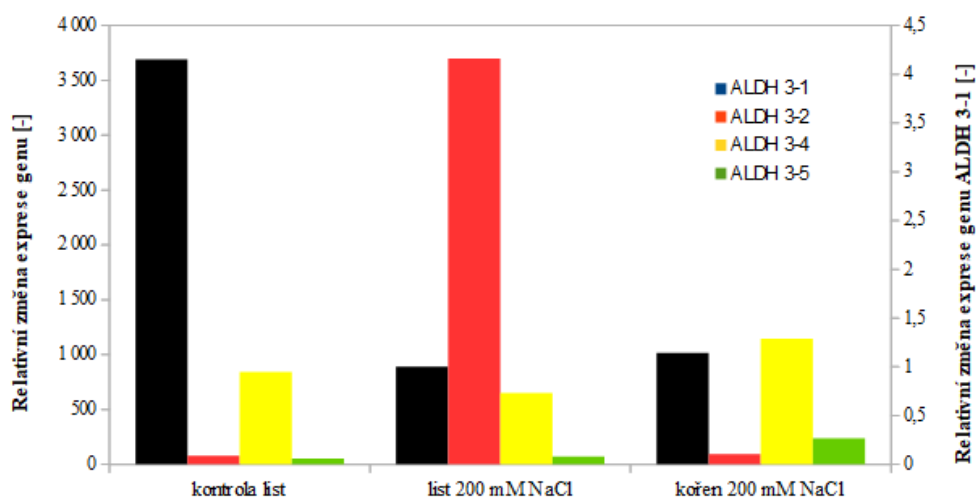
Při porovnání exprese genů ALDH 3 listu a kořene je patrné, že v kořeni jsou téměř všechny studované geny exprimovány vždy více než v listech. Na základě tohoto poznatku můžeme usuzovat, že právě v kořenu se tvoří více toxických aldehydů a odehrává se zde hlavní detoxikační proces.

4.2 Genová exprese ZmALDH 3 za hydroponických podmínek

Podobný experiment jako u ječmene byl proveden na hydroponicky pěstované kukuřici. Bohužel u tohoto experimentu došlo ke kontaminaci vzorku, a proto nemohla být většina dat použita pro vyhodnocení. Do vyhodnocení jsou zahrnuty rostliny kontrolní a stresované $200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl. Hodnoty byly vyneseny relativně do grafu (Obr. 13).

Podobně jako u ječmene, *ALDH 3-2* je významně nadexprimována v listech kukuřice při salinitním stresu, zatímco v kořeni je pozorováno jen malé množství transkriptu. I pro geny *ALDH 3-4* a *ALDH 3-5* je pozorován podobný trend, při salinitním stresu jsou více exprimovány v kořeni než v listu, podobně jak bylo popsáno u Kirch *et al.* (2004).

Genová exprese aldehyddehydrogenasy rodiny 3 v hydroponicky pěstované kukuřici



Obr. 13: Porovnání exprese ALDH 3 v listu a kořeni kukuřice po 48 hodinovém stresu, vystavené $200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl. Absolutní hodnota pro kontrolu ALDH 3-2 je 152 transkriptů, pro kontrolu ALDH 3-4 je 112 transkriptů.

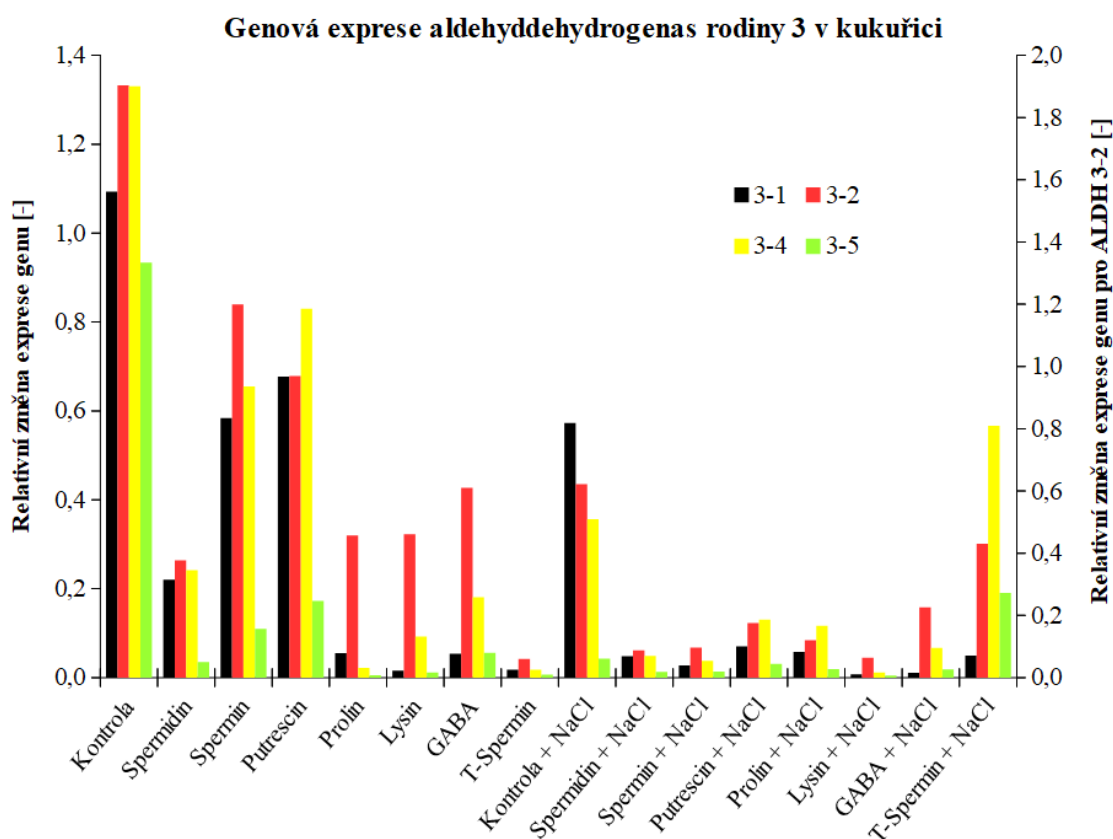
4.3 Genová exprese ZmALDH 3 na polyaminech

Genová exprese genu ZmALDH 3 v kukuřici seté (Obr. 14) byla vlivem abiotického stresu (stresu způsobeným vystavením různým aminům, aminokyselinám a salinitě) inhibována v různém poměru.

Při porovnání vlivu stresu způsobeným salinitou ($150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$) a bez zasolení, je téměř vždy vidět pokles exprese genu. Pouze po vystavení polyaminu T-sperminu v kombinaci se zasolením vykazovala exprese nárůst a to u všech čtyř isoform aldehyddehydrogenas. Všechny ostatní vzorky vykazovaly opačný spád, tedy vyšší expresi bez zasolení.

V porovnání stresu Pro a Pro+NaCl vykazoval isoenzym ZmALDH 3-1 jako jediný v této kombinaci stresu stejnou expresi.

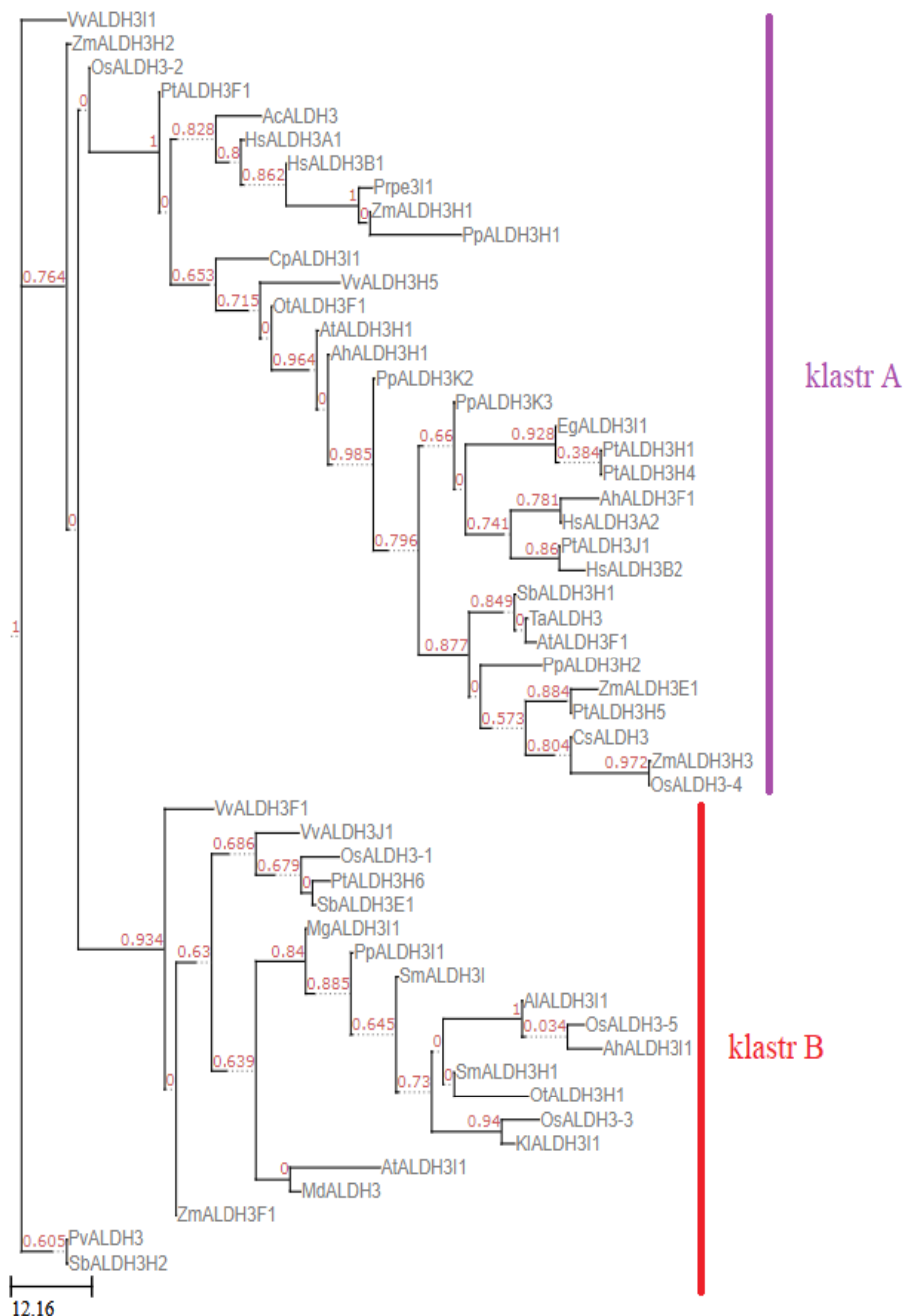
K největšímu poklesu exprese oproti nestresovanému vzorku došlo u stresu T-sperminem. K největšímu poklesu exprese u stresu salinitou došlo u lysinu.



Obr. 14: Relativní změna genové exprese ZmALDH 3 v kukuřici vystavené různým aminům ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a aminokyselinám ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v salinitě ($150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$) a bez salinity. Pro přehlednost jsou data vynesena relativně. Absolutní hodnota pro kontrolu ALDH 3-2 je 63 822 transkriptů, pro kontrolu ALDH 3-4 je 1 643 transkriptů.

4.4 Fylogenetická analýza ALDH 3

Byl sestrojen fylogenetický strom (Obr. 15) pomocí fylogenetické analýzy pro rodinu enzymů aldehyddehydrogenas 3 v různých genomech. Bylo prohledáno celkem 21 organismů (Tabulka 3) a nalezeno bylo 55 isoenzymů.



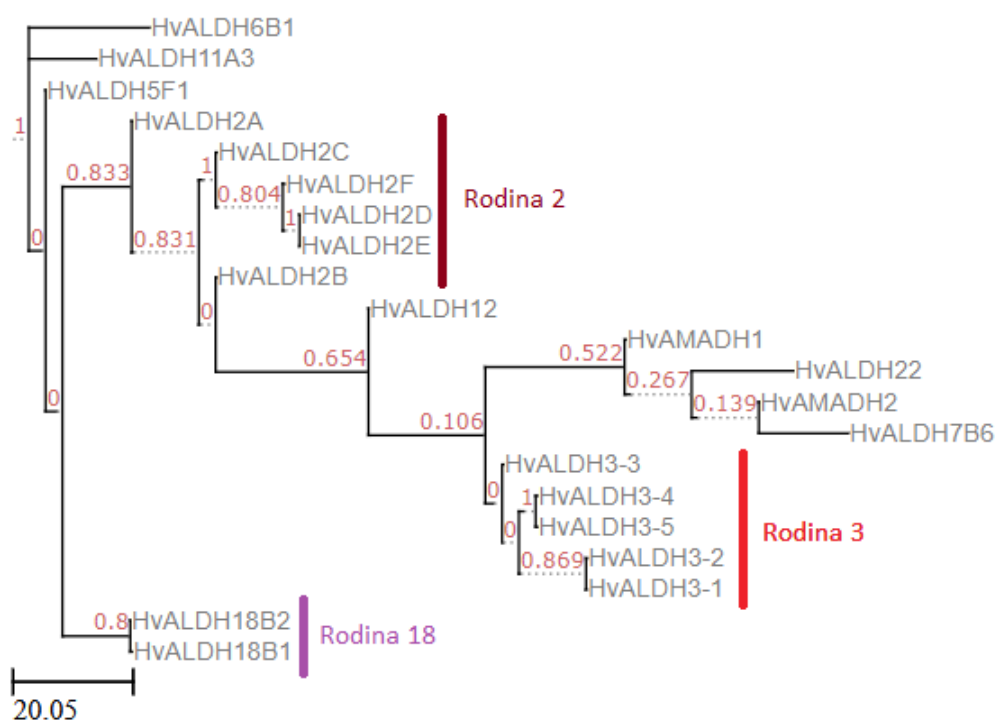
Obr. 15: Fylogenetický strom aldehyddehydrogenas 3. Analýza byla provedena pomocí PhyML 3.0, který vypočítal příbuznost mezi jednotlivými sekvencemi. Sestrojeno pomocí substitučního modelu LG. Grafické zobrazení bylo vytvořeno pomocí softwaru dendroscope.

Na první pohled je zřejmé, že se rodina 3 rozděluje do 2 hlavních klastřů, na podrodiny A, B a H (klastř A) a na podrodiny F a I (klastř B). Rozdělení vyšších a nižších rostlin je zastoupené v obou klastrech přibližně stejně. Je zajímavé, že řasy, zástupci nižších rostlin, jsou pouze v klastru B.

4.5 Fylogenetická analýza ALDH v ječmeni setém

Byl sestrojen fylogenetický strom pro rodiny aldehyddehydrogenas v ječmeni setém (*Hordeum vulgare*). Celkem bylo nalezeno 21 enzymů z 10 rodin aldehyddehydrogenas. Tyto rodiny jsou ALDH 2, ALDH 3, ALDH 5, ALDH 6, ALDH 7, ALDH 10 (známé jako AMADH), ALDH 11, ALDH 12, ALDH 18 a ALDH 22.

Z fylogenetického stromu (Obr. 16) lze odvodit, že rodina ALDH 2 se skládá z 6 isoform – 2A, 2B, 2C, 2D, 2E a 2F, které se rozdělují na 2 větve. První větev obsahuje pouze isoenzym 2B, druhá větev se dále větví na vysoce příbuzné 2D a 2E, dále 2F a 2C. Rodina ALDH 3 je zastoupena 5 isoformami, jmenovitě 3-1, 3-2, 3-3, 3-4 a 3-5. Nejpříbuznějšími jsou 3-1 s 3-2 a 3-4 společně s 3-5. Z rodiny 3 je vyčleněna rodina 10, rodina 22 a rodina 7. Rodina ALDH 18, která se zcela vyčlenila od ostatních rodin, má 2 isoformy – 18B1 a 18B2.



Obr. 16: Fylogenetický strom aldehyddehydrogenas v ječmeni setém (*Hordeum vulgare*). Analýza byla provedena pomocí PhyML 3.0, který vypočítal příbuznost mezi jednotlivými sekvencemi. Sestrojeno pomocí substitučního modelu LG. Grafické zobrazení bylo vytvořeno pomocí softwaru dendroscope.

5 Závěr

Byla vypracována literární rešerše na téma nadrodiny aldehyddehydrogenas a aldehyddehydrogenasy rodiny 3 (ALDH 3). Dále byla vypracována literární rešerše na téma RT-qPCR a porovnání sondy TaqMan, SYBR green barviva, Scorpion sondy a FRET sondy.

Izolovaná RNA byla purifikována a transkribována do cDNA. Takto získaná cDNA byla použita pro experimentální stanovení genové exprese pomocí metody qPCR s využitím TaqMan signálních molekul pro geny *Z. mays* ZmALDH 3-1, ZmALDH 3-2, ZmALDH 3-3, ZmALDH 3-4 a ZmALDH 3-5 a geny *H. vulgare* HvALDH 3-1, HvALDH 3-2, HvALDH 3-3, HvALDH 3-4 a HvALDH 3-5. Exprese kukuřičného genu ALDH 3-3 bohužel nebyla detekována. Mohlo by se jednat buď o nesprávně navrženou próbu s primery, nebo gen nebyl v rostlině za daných podmínek exprimován.

Byla provedena fylogenetická analýza aldehyddehydrogenas rodiny 3 v různých genomech a fylogenetická analýza *Horgeum vulgare* pro aldehyddehydrogenasy.

6 Literatura

BARTELS, D. a R. SUNKAR. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* [online]. 2005, **24** (1), 23-58 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.1080/07352680590910410. ISSN 0735-2689. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352680590910410>

BECKER-ANDRÉ, M. a K. HAHLBROCK. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Research* [online]. 1989, **17** (22), 9437-9446 [cit. 2020-01-25]. DOI: 10.1093/nar/17.22.9437. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/17.22.9437>

BETHIN, K. E., Y. NAGAI, R. SLADEK, M. ASADA, Y. SADOVSKY, T. J. HUDSON a L. J. MUGLIA. Microarray Analysis of Uterine Gene Expression in Mouse and Human Pregnancy. *Molecular Endocrinology* [online]. 2003, **17**(8), 1454-1469 [cit. 2021-04-23]. ISSN 0888-8809. Dostupné z: doi: 10.1210/me.2003-0007

BROCKER, Ch., M. VASILIOU, S. CARPENTER, et al. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* [online]. 2013, **237** (1), 189-210 [cit. 2019-10-14]. DOI: 10.1007/s00425-012-1749-0. ISSN 0032-0935. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-012-1749-0>

BURNS, M. a H. VALDIVIA. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *European Food Research and Technology* [online]. 2008, **226** (6), 1513-1524 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1007/s00217-007-0683-z. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-007-0683-z>

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* [online]. 2000., 169-193 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1677/jme.0.0250169. ISSN 0952-5041. Dostupné z: <https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/25/2/169.xml>

BUSTIN, S. A., V. BENES, Jeremy A GARSON. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* [online]. 2009, **55** (4), 611-622 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/55/4/611/5631762>

COSA, G., J. R N. MCLEAN, J. P. MCNAMEE a J. C. SCAIANO. Photophysical Properties of Fluorescent DNA-dyes Bound to Single- and Double-stranded DNA in Aqueous Buffered Solution. *Photochemistry and Photobiology*. **73** (6), 585-599. DOI: 10.1562/0031-8655 (2001) 073<0585: PPOFDD>2.0. CO; 2.

DORAK, M. Tevfik. *Real-time PCR*. New York: Taylor & Francis, c2006. ISBN 0-4153-7734-x.

DRAGAN, A. I., R. PAVLOVIC, J. B. MCGIVNEY, J. R. CASAS-FINET, E. S. BISHOP, R. J. STROUSE, M. A. SCHENERMAN a C. D. GEDDES. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. *Journal of Fluorescence* [online]. 2012, **22** (4), 1189-1199 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1007/s10895-012-1059-8. ISSN 1053-0509. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10895-012-1059-8>

ESTERBAUER, H., R. J. SCHAUR a H. ZOLLNER. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and*

Medicine [online]. 1991, **11** (1), 81-128 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1016/0891-5849(91)90192-6. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0891584991901926>

FÖRSTER, T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Die Naturwissenschaften* [online]. 1946, **33**(6), 166-175 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1007/BF00585226. ISSN 0028-1042. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00585226>

GAO, CH. a B. HAN. Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in rice (*Oryza sativa*). *Gene* [online]. 2009, **431** (1-2), 86-94 [cit. 2020-05-25]. DOI: 10.1016/j.gene.2008.11.010. ISSN 03781119. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111908005933>

GIBSON, G. a S. V. MUSE. *A primer of genome science*. 3rd Edition. Sunderland, c2009, 370 p. ISBN 978-0878932368.

GUINDON, S., J. DUFAYARD, V. LEFORT, M. ANISIMOVA, W. HORDIJK a O. GASCUEL. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* [online]. 2010, **59** (3), 307-321 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1093/sysbio/syq010. ISSN 1076-836X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/sysbio/article/59/3/307/1702850>

HEID, C. A., J. STEVENS, K. J. LIVAK a P. M. WILLIAMS. Real time quantitative PCR. *Genome Research* [online]. 1996, **6** (10), 986-994 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1101/gr.6.10.986. ISSN 1088-9051. Dostupné z: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.6.10.986>

HUGGETT, J., K. DHEDA, S. BUSTIN a A. ZUMLA. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes & Immunity* [online]. 2005, **6** (4), 279-284 [cit. 2020-01-25]. DOI: 10.1038/sj.gene.6364190. ISSN 1466-4879. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/6364190>

CHAO, W. S. Real-Time PCR as a Tool to Study Weed Biology. *Weed Science* [online]. 2008, **56** (2), 290-296 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1614/WS-07-063.1. ISSN 0043-1745. Dostupné z: cambridge.org/core/product/identifier/S0043174500024279/type/journal_article

JIMENEZ-LOPEZ, J. C., F. J. LOPEZ-VALVERDE, P. ROBLES-BOLIVAR, E. LIMA-CABELLO, E. W. GACHOMO, S. O. KOTCHONI a W. L. ARAUJO. Genome-Wide Identification and Functional Classification of Tomato (*Solanum lycopersicum*) Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Gene Superfamily. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(10) [cit. 2021-04-21]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0164798

KHANNA, M., Ch. CHEN, A. KIMBLE-HILL, et al. Discovery of a Novel Class of Covalent Inhibitor for Aldehyde Dehydrogenases*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, **286**(50), 43486-43494 [cit. 2021-02-24]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi: 10.1074/jbc.M111.293597

KIM, Young Dae a Daniel DE KEE. Measuring static yield stress of electrorheological fluids using the slotted plate device. *Rheologica Acta* [online]. 2008, **47**(1), 105-110 [cit. 2021-04-22]. ISSN 0035-4511. Dostupné z: doi: 10.1007/s00397-007-0217-4

KIRCH, H., D. BARTELS, Y. WEI, P. S. SCHNABLE a A. J. WOOD. The ALDH gene superfamily of Arabidopsis. *Trends in Plant Science* [online]. 2004, **9** (8), 371-377 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.06.004. ISSN 13601385. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138504001529>

LabGuide: průvodce laboratoří [online]. c2014-2019 [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: <https://labguide.cz/taqman-sondy/>

LightCycler / FRET Probes: Principle of FRET probes. *Eurofins genomics* [online]. 2020 [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/optimised-application-oligos/qpcr-probes/lightcycler-probes.aspx?gclid=CjwKCAjwr7X4BRA4EiwAUXjbt5hrdMi4VYo5IbMjxGd94EFGsVAB1zWrl5phpyEyp9MMl3T2sKEMkRoCbScQAvD_BwE

LINDAHL, R. Aldehyde Dehydrogenases and Their Role in Carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 1992, **27** (4-5), 283-335 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.3109/10409239209082565. ISSN 1040-9238. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10409239209082565>

LIU, Z., Yuh-J. SUN, J. ROSE, et al. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nature Structural Biology* [online]. 1997, **4**(4), 317-326 [cit. 2021-04-22]. ISSN 1072-8368. Dostupné z: doi: 10.1038/nsb0497-317

MARCHITTI, S. A., Ch. BROCKER, D. STAGOS a V. VASILIOU. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [online]. 2008, **4** (6), 697-720 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.1517/17425255.4.6.697. ISSN 1742-5255. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.4.6.697>

MARCHITTI, S. A., R. A. DEITRICH a V. VASILIOU. Neurotoxicity and Metabolism of the Catecholamine-Derived 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyde: The Role of Aldehyde Dehydrogenase. *Pharmacological Reviews* [online]. 2007, **59** (2), 125-150 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1124/pr.59.2.1. ISSN 0031-6997. Dostupné z: <http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.59.2.1>

MARRAS, Salvatore A. E. Interactive Fluorophore and Quencher Pairs for Labeling Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. *Molecular Biotechnology* [online]. 2008, **38**(3), 247-255 [cit. 2021-04-22]. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi: 10.1007/s12033-007-9012-9

MOORE, Stanley A, Heather M BAKER, Treena J BLYTHE, Kathryn E KITSON, Trevor M KITSON a Edward N BAKER. Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* [online]. 1998, **6**(12), 1541-1551 [cit. 2021-04-22]. ISSN 09692126. Dostupné z: doi: 10.1016/S0969-2126(98)00152-X

MORETTI, A., J. LI, S. DONINI, R. W. SOBOL, M. RIZZI a S. GARAVAGLIA. Crystal structure of human aldehyde dehydrogenase 1A3 complexed with NAD⁺ and retinoic acid. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1) [cit. 2021-04-22]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi: 10.1038/srep35710

O'BRIEN, P. J., A. G. SIRAKI a N. SHANGARI. Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. 2008, **35** (7), 609-662 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1080/10408440591002183. ISSN 1040-8444. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408440591002183>

PEROZICH, J., H. NICHOLAS, B. WANG, R. LINDAHL a J. HEMPEL. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Science* [online]. 1999, **8** (1), 137-146 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.1110/ps.8.1.137. ISSN 09618368. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1110/ps.8.1.137>

PERSING, D. H. *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 2011. ISBN 9781555814977.

PIETRASZEWSKA-BOGIEL, A. a T. W. J. GADELLA. FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology. *Journal of Microscopy* [online]. 2011, **241**(2), 111-118 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2010.03437.x. ISSN 00222720. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2818.2010.03437.x>

REYNISSON, E., M. H. JOSEFSEN, M. KRAUSE a J. HOORFAR. Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2006, **66** (2), 206-216 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.11.006. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701205003465>

Sigma-Aldrich spol. s.r.o.: Scorpions Probes [online]. 2020 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/scorpions-probes.html>

SUN, X., T. LIU, J. SUN a X. WANG. Synthesis and application of coumarin fluorescence probes. *RSC Advances* [online]. 2020, **10** (18), 10826-10847 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1039/C9RA10290F. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9RA10290F>

TARCA, Adi L., Roberto ROMERO a Sorin DRAGHICI. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 2006, **195**(2), 373-388 [cit. 2021-04-23]. ISSN 00029378. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ajog.2006.07.001

TATUSOV, R. L. A Genomic Perspective on Protein Families. *Science* [online]. 1997 **278** (5338), 631-637 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1126/science.278.5338.631. ISSN 00368075. Dostupné z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.278.5338.631>

Thermo Fisher Scientific. Introduction to Gene Expression Getting Started Guide. *ThermoFisher* [online]. Worldwide, 24 January 2018 [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4454239_IntrotoGeneEx_GSG.pdf

UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, **43** (D1), D204-D212 [cit. 2020-05-25]. DOI: 10.1093/nar/gku989. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D204/2439939>

Universal SYBR Green Quantitative PCR Protocol [online]. Darmstadt: Merck, c2020 [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.html>

VASILIOU, V., A. PAPPA a D. R. PETERSEN. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2000, **129** (1-2), 1-19 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1016/S0009-2797(00)00211-8. ISSN 00092797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279700002118>

VASILIOU, V., A. PAPPA a T. ESTEY. Role of Human Aldehyde Dehydrogenases in Endobiotic and Xenobiotic Metabolism. *Drug Metabolism Reviews* [online]. 2004, **36** (2), 279-299 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1081/DMR-120034001. ISSN 0360-2532. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/DMR-120034001>

WANG, T. a M. J. BROWN. mRNA Quantification by Real Time TaqMan Polymerase Chain Reaction: Validation and Comparison with RNase Protection. *Analytical Biochemistry* [online]. 1999, **269** (1), 198-201 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1006/abio.1999.4022. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269799940228>

YOSHIDA, A., A. RZHETSKY, L. C. HSU a Ch. CHANG. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *European Journal of Biochemistry* [online]. 1998, **251**(3), 549-557 [cit. 2021-04-22]. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2510549.x

ZHANG, W., K. LIU, P. ZHANG, et al. All-in-one approaches for rapid and highly specific quantification of single nucleotide polymorphisms based on ligase detection reaction using molecular beacons as turn-on probes. *Talanta* [online]. 2021, **224** [cit. 2021-04-22]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi: 10.1016/j.talanta.2020.121717

7 Seznam použitých zkratk

ABA	kyselina abscisová
ADH	alkoholdehydrogenasa (EC 1.1.1.1)
ADK	adenylákinasa (EC 1.11.1.6)
AKR	aldo-ketoreduktasa (EC 1.1.1.21)
ALDH	aldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.3)
ALDH10	aldehyddehydrogenasa rodiny 10
ALDH11	aldehyddehydrogenasa rodiny 11
ALDH12	aldehyddehydrogenasa rodiny 12
ALDH18	aldehyddehydrogenasa rodiny 18
ALDH2	aldehyddehydrogenasa rodiny 2
ALDH21	aldehyddehydrogenasa rodiny 21
ALDH22	aldehyddehydrogenasa rodiny 22
ALDH23	aldehyddehydrogenasa rodiny 23
ALDH24	aldehyddehydrogenasa rodiny 24
ALDH3	aldehyddehydrogenasa rodiny 3
ALDH5	aldehyddehydrogenasa rodiny 5
ALDH6	aldehyddehydrogenasa rodiny 6
ALDH7	aldehyddehydrogenasa rodiny 7
CAT	katalasa (EC 1.11.1.6)
cDNA	komplementární DNA
CRH	Centrum regionu Haná
C _T	prahový cyklus
Cy5	cyanin 5
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát

dsDNA	z angl. double-stranded, dvouřetězcová DNA
DTT	dithiothreitol
FAM	6-karboxygluorescein – značení 5'-konce
FRET	Fösterův přenos (transport) rezonanční energie
FW nebo FP	forward primer, posměrný primer
GABA	kyselina γ -aminomáselná
HEX	hexachloro-fluorescein
HvALDH	<i>Hordeum vulgare</i> aldehyddehydrogenasa
HvAMADH	<i>Hordeum vulgare</i> aminoaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.19)
HvRF2	<i>Hordeum vulgare</i> aldehyddehydrogenasa rodiny 2
LOD	mez detekce
MB	molecular beacon
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NFQ	nefluorescenční zhášec
Pb	próba
PEG	polyethylenglykol
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
ROX	5-karboxy-X-rhodamin
RP nebo R	reverse primer, reverzní primer
RT-qPCR	reverzní transkripce qPCR
siRNA	z angl. short interfering RNA
ssDNA	z angl. single-stranded, jednořetězcová DNA (denaturovaná)
T-spermin	Thermospermin
VIC	Victoria Blue B

XO	xantinoxidasa (EC 1.17.3.2)
ZmALDH3	<i>Zea mays</i> aldehyddehydrogenasa rodiny 3