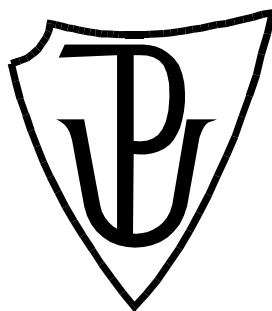


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Studium nukleosidas a aldehyddehydrogenas ve vybraných jednoděložných rostlinách**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Lenka Fingerová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. David Kopečný, Ph.D.</b>
Rok:	: 2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a 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 .....

..... *podpis diplomanta*

#### Poděkování:

Tímto chci bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce Mgr. Davidu Kopečnému, Ph.D., především za jeho odborné vedení, čas, ochotu a cenné rady, které mi udělil během psaní této diplomové práce. Dále chci poděkovat Mgr. Radce Končítíkové, Ph.D. a Mgr. Evě Ľuptákové za čas, ochotu a rady při zpracování praktické části této práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Lenka Fingerová
Název práce	Studium nukleosidas a aldehyddehydrogenas ve vybraných jednoděložných rostlinách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, CRH, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého
Vedoucí práce	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

### Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat funkci aldehyddehydrogenas z rodiny 2 v *Hordeum vulgare* a nukleosidas z rodiny 2 a 3 v *Zea mays*. V rámci teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše zabývající se problematikou aldehyddehydrogenas, jejich výskytu a funkce v rostlinách i živočiších. Dále byl popsán metabolismus purinových a pyrimidinových bází a funkce nukleosidas v rostlinách.

V experimentální části je obsaženo vyhledávání genů ALDH v genomu ječmene ve webových databázích GenBank, Phytozome a UniProt s užitím softwaru BLAST, kdy bylo nalezeno 15 genů. Dále byla tato část zaměřena na klonování, expresi, purifikaci proteinu ALDH2 z ječmene. Pro tento enzym bylo stanoveno pH optimum a byla proměřena substrátová specifita. Na základě výsledků bylo vybráno šest substrátů, u kterých byly stanoveny saturační křivky a z nich dopočítány kinetické parametry  $K_m$ ,  $V_{lim}$  a relativní poměr  $V_{lim}/K_m$ . Nakonec byly exprimovány a purifikovány enzymy NRH2b a NRH3 z kukuřice. U těchto proteinů byla změřena specifická a relativní aktivita se substráty uridinem a 5-methyluridinem a pomocí nelineární regrese podle Michaelise a Mentenové a dvojitě reciprokého vynesení podle Lineweavera a Burka byly ze saturačních křivek stanoveny  $K_m$ ,  $V_{lim}$  a relativní poměr  $V_{lim}/K_m$ .

Klíčová slova	aldehyddehydrogenasy, nukleosidasy, <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Zea mays</i> , cytokininy, aldehydy, metabolismus purinů a pyrimidinů
Počet stran	71
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Lenka Fingerová
Title	Study of nucleosidases and aldehyde dehydrogenases in selected monocotyledonous plants
Type of thesis	Master
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, CRH, Faculty of Science Palacky University
Supervisor	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
The year of presentation	2020

### Abstract

The aim of this Master thesis was to characterize the function of aldehyde dehydrogenases from family 2 in *Hordeum vulgare* and nucleosidases from families 2 and 3 in *Zea mays*. Within the theoretical part of this work, the literature restrictions dealing with the issue of aldehyde dehydrogenases, their occurrence and function in plants and animals. Another was described the metabolism of purine and pyrimidine bases and the functions of nucleosides in plants.

The experimental part includes a search for ALDH genes in the barley genome in the web databases GenBank, Phytozome and UniProt using BLAST software, where 15 genes were found. This part was also focused on cloning, expression and purification of ALDH2 protein from barley. The optimal pH for this enzyme was determined and the substrate specificity was measured. Based on the results, six substrates were selected, for which saturation curves were determined and from them the kinetic parameters  $K_m$ ,  $V_{lim}$  and the relative ratio  $V_{lim}/K_m$  were calculated. Finally, the enzymes NRH2b and NRH3 from maize were expressed and purified. The specific and relative activity of these proteins was measured with the substrate uridine and 5-methyluridine and determined by  $K_m$ ,  $V_{lim}$  and relative ratio  $V_{lim} / K_m$  from saturation curves by non-linear regression according to Michaelis and Menten and double reciprocal yield according to Lineweaver and Burke.

Keywords	Aldehyde dehydrogenases, nucleosidases, <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Zea mays</i> , cytokinins, aldehydes, metabolism of purines and pyrimidines
Number of pages	71
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b>	<b>2</b>
2.1	Souvislost cytokininů s aldehydy	2
2.2	Studované organismy	4
2.2.1	Ječmen ( <i>Hordeum vulgare L.</i> )	4
2.2.2	Kukuřice ( <i>Zea mays L.</i> )	6
2.3	Aldehyddehydrogenasy	8
2.3.1	Zastoupení aldehyddehydrogenas v rostlinách	9
2.3.2	ALDH2	10
2.3.2.1	Lidský ALDH2	10
2.3.2.2	Rostlinný ALDH2	11
2.3.2.3	Struktura genu ALDH2	12
2.3.3	Ostatní ALDH vyskytující se i v savcích	12
2.3.3.1	ALDH3	12
2.3.3.2	ALDH5	13
2.3.3.3	ALDH6	13
2.3.3.4	ALDH7	14
2.3.3.5	ALDH18	14
2.3.4	ALDH specifické pouze pro rostliny	15
2.3.4.1	ALDH10	15
2.3.4.2	ALDH12	15
2.3.4.3	ALDH19	15
2.3.4.4	ALDH21	15
2.3.4.5	ALDH22	16
2.3.4.6	ALDH23 a ALDH24	16
2.4	Nukleosid-N-ribohydrolasy	16
2.4.1	Nukleové báze	17
2.4.1.1	Purinové báze	17
2.4.1.2	Pyrimidinové báze	18
2.4.1.3	Metabolismus purinových bází	20
2.4.1.4	Biosyntéza a metabolismus pyrimidinových bází	21
2.4.2	Druhy NRH	22
<b>3</b>	<b>Praktická část</b>	<b>24</b>
3.1	Materiál a chemikálie	24
3.1.1	Biologický materiál	24
3.1.2	Chemikálie	25
3.1.3	Přístrojové vybavení	27
3.2	Metody	28
3.2.1	Fylogenetická analýza HvALDH2E	28
3.2.2	Klonování	28
3.2.2.1	Izolace mRNA a prepis do cDNA	28
3.2.2.2	PCR amplifikace přepsané cDNA	29
3.2.2.3	Agarosová elektroforéza a purifikace z gelu	30
3.2.2.4	Štěpení restrikčními enzymy a ligace	30
3.2.2.5	Transformace buněk <i>E. coli</i>	31
3.2.3	Exprese proteinů	31
3.2.4	Extrakce proteinů ALDH i NRH	31
3.2.5	Purifikace HvALDH2E a ZmNRH2b	32
3.2.6	Kontrola čistoty proteinu pomocí SDS-PAGE	32

3.2.7	Stanovení koncentrace proteinu	33
3.2.8	Měření s HvALDH2E	33
3.2.8.1	Zjištění aktivity proteinu HvALDH2E	33
3.2.8.2	Stanovení pH optima	34
3.2.8.3	Stanovení substrátové specificity	34
3.2.8.4	Měření kinetických parametrů HvALDH2E	34
3.2.9	Měření s ZmNRH2b a ZmNRH3	35
3.2.9.1	Ověření aktivity proteinů	35
3.2.9.2	Porovnání aktivity proteinů při použití dvou substrátů	35
3.2.9.3	Měření kinetických parametrů enzymů	35
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	37
4.1	Aldehyddehydrogenasy 2	37
4.1.1	Přehled genů ALDH v <i>Hordeum vulgare</i>	37
4.1.2	Klonování a porovnání sekvencí ALDH2D a ALDH2E	39
4.1.3	Expres a purifikace HvALDH2E	40
4.1.4	Stanovení pH optima a substrátové specificity	41
4.1.5	Kinetické vlastnosti HvALDH2E	41
4.2	Nukleosid- <i>N</i> -ribohydrolasy	47
4.2.1	Porovnání sekvencí NRH2b a NRH3	47
4.2.2	Kontrola exprese a purifikace ZmNRH2b a ZmNRH3	47
4.2.3	Kinetické parametry ZmNRH2b a ZmNRH3	48
<b>5</b>	<b>Diskuze</b>	45
5.1	HvALDH2E	52
5.2	ZmNRH2b a ZmNRH3	53
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	55
<b>7</b>	<b>Literatura</b>	56
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b>	62

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část:**

- Vypracování literární rešerše na téma funkce aldehydehydrogenas a nukleosid-N-ribohydrolas v rostlinách a charakterizace těchto enzymů.

### **Experimentální část:**

- Na základě dostupných sekvencí v GenBank, Phytozome a UniProt vyhledat dostupné geny ALDH v ječmeni a rozřídít je do jednotlivých rodin.
- Klonování a exprese vybraných ALDH z ječmene.
- Změření kinetických parametrů vybraných NRH z kukuřice a ALDH z ječmene.



# 1 ÚVOD

Cytokinininy jsou jednou ze základních skupin rostlinných hormonů a podílejí se na řadě důležitých životních pochodů v rostlinách, např. regulují buněčné dělení, oddalují senescenci rostlin listů, účastní se klíčení a vývoje semen a vývoje kořene i prýtu. V rostlinách je funkce cytokininů propojena s funkcí dalších fytohormonů.

Během metabolismu cytokininů jsou v rostlinách produkovány reaktivní molekuly aldehydy, které mohou být následně účinkem aldehyddehydrogenas (ALDH) detoxifikovány. Experimentálně bylo objeveno více než 20 rodin ALDH a jednotlivé rostlinné obsahují jen některé rodiny. Zastoupení ALDH v rostlinách, respektive i v bakteriích a živočiších, je dáno potřebou organismu metabolizovat jen některé typy aldehydů. Nukleosid-*N*-ribohydrolasy (NRH) se při metabolismu cytokininů účastní přeměny zásobních a transportních forem (ribosidů) na aktivní formy fytohormonů (base).

V současné době se výzkum na Oddělení biochemie proteinů a proteomiky v Olomouci zaměřuje na studium rostlinných ALDH, konkrétně na enzymové rodiny ALDH2, ALDH7, ALDH10, ALDH12 a ALDH21 (Tylichová *et al.*, 2010; Kopečný *et al.*, 2011; Kopečný *et al.*, 2013; Končítíková *et al.*, 2019) a do budoucna je v plánu i výzkum ALDH22 a ALDH23. Také zde paralelně probíhá výzkum NRH, konkrétně isoformy NRH2 a NRH3. Vzhledem ke studovaným rostlinám na oddělení byly vybrány právě ječmen (*Hordeum vulgare*) a kukuřice (*Zea mays*), které nyní patří k nejvíce zkoumaným.

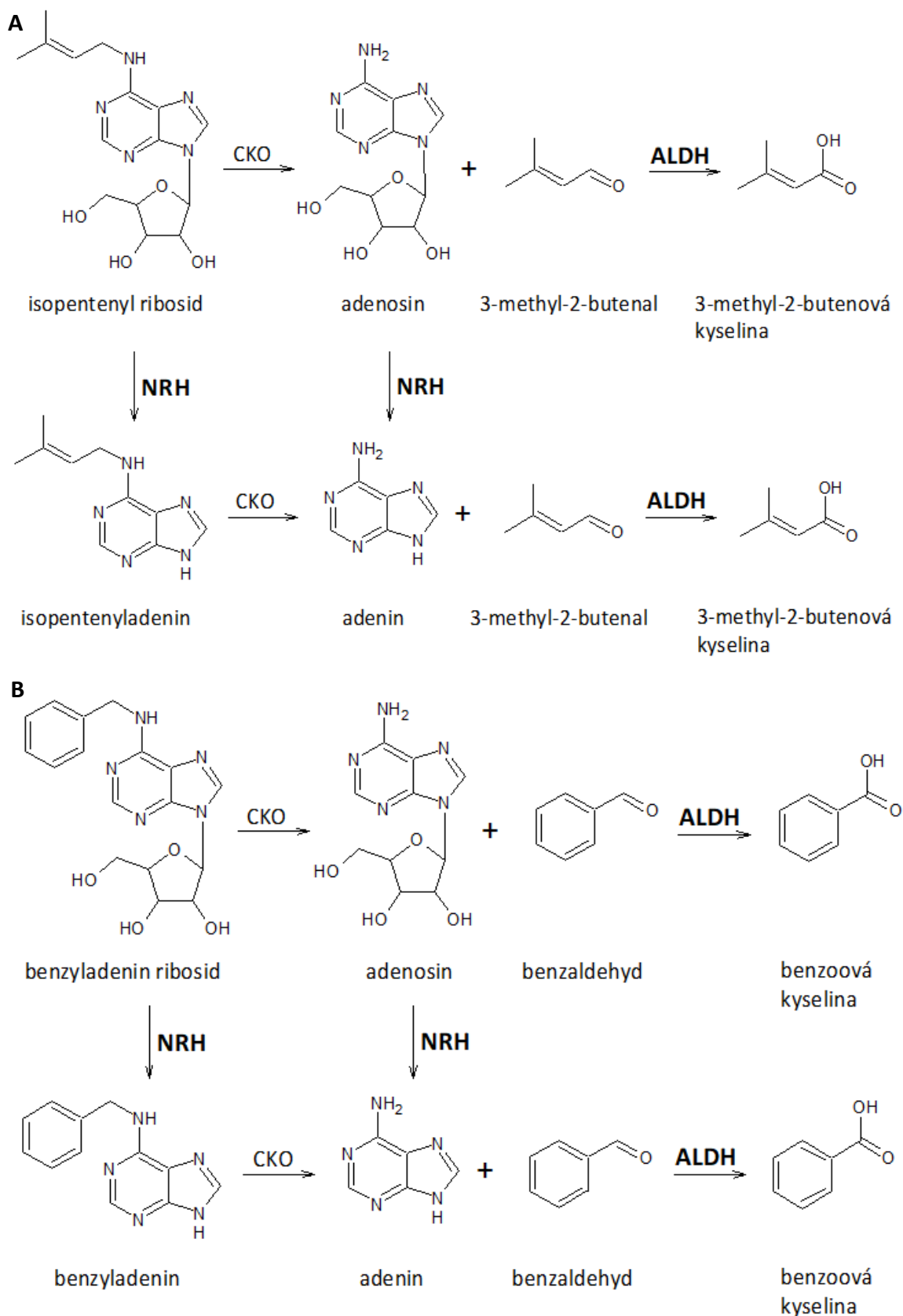
## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Souvislost cytokininů s aldehydy

Cytokininy (CK) jsou jednou ze základních skupin rostlinných hormonů, tzv. fytohormonů a jsou známy již od druhé poloviny 20. stol. (Schmülling, 2004). Chemicky se jedná o přirozeně se vyskytující molekuly derivátů adeninu, který je substituován v poloze  $N^6$ . Podle postranního řetězce jsou CK děleny na isoprenoidní, které jsou dále rozdělovány na isopentenyladeninový a zeatinový typ, a aromatické (Kakimoto, 2003). K nejčastějším isoprenoidním cytokininům se řadí  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP) a *trans*-zeatin (*tZ*), k aromatickým náleží benzyladenin (BA) a *meta*-topolin (*mT*; Strnad, 1997). Oproti přírodním existují i vysoce aktivní syntetické CK, které se v přírodě běžně nevyskytují. Mezi nejznámější je zařazena difenylmočovina nebo thidiazuron (Schmülling, 2004). CK se mohou vyskytovat v několika formách. Buď mohou být v rostlinách přítomny jako volné báze, ribosidy, *N*- a *O*-glykosidy. Je známo, že aktivní formy cytokininů jsou volné báze, ostatní formy slouží jako zásobní, nebo transportní molekuly (Mok a Mok, 2001).

Pro udržení homeostáze v rostlinách je důležitá vhodná koncentrace cytokininů. Při nadměrné akumulaci exogenních i endogenních CK dochází k jejich degradaci enzymem cytokininoxidasa/dehydrogenasa (CKO). Účinkem tohoto enzymu jsou molekuly fytohormonu degradovány na příslušný aldehyd a adenin (příp. adenosin, viz Obr. 1; Brownlee *et al.*, 1975, Galuzska *et al.*, 2007).

Aldehydy jsou organické molekuly obsahující karbonylovou skupinu. Na karbonylovém uhlíku je substituován alespoň jeden vodík. Aldehydy jsou obecně označovány R-CHO. Podle charakteru R jsou rozděleny na alifatické a aromatické a dále mohou být děleny podle délky a nasycenosti uhlíkatého řetězce (O'Brien *et al.*, 2005). Aldehydy se běžně vyskytují v přírodě. Přirozeně vznikají ve všech organismech, tedy od různých mikroorganismů až po člověka, včetně rostlin. Mohou vznikat různými fyziologickými reakcemi, např. peroxidací lipidů, během metabolismu aminokyselin a sacharidů, jaterní detoxikací xenobiotik a dalšími (Feron *et al.*, 1998). V organismu však jejich nadměrné množství škodí.



Obr. 1 Schéma metabolismu cytokininů za účasti enzymů aldehyddehydrogenas (ALDH) a nukleosid-*N*-ribohydrolas (NRH). **A** – metabolismus isopentenylribosidu (isopentenyladeninu) za vzniku meziproduktu 3-methyl-2-butenalu a následně kyseliny 3-methyl-2-butenové. **B** – metabolismus benzyladeninribosidu (benzyladeninu) za vzniku meziproduktu benzaldehydu a následně kyseliny benzoové.

Aldehydy jsou velmi reaktivní molekuly, které mohou reagovat s biomakromolekulami, např. s proteiny nebo nukleovými kyselinami, a poškozovat je (Kirch *et al.*, 2005). Proto je důležité udržovat jejich stálou hladinu v organismu. To je zajištěno působením enzymů aldehyddehydrogenas (ALDH), které oxidují aldehydy na jejich příslušné karboxylové kyseliny (Hartley *et al.*, 1995). Dalším regulačním mechanismem je redukce aldehydů na příslušné alkoholy účinkem enzymů alkoholdehydrogenas (Hartley *et al.*, 1995), těmi se však tato práce nebude zabývat.

## 2.2 Studované organismy

V této práci jsou zkoumány enzymy aldehyddehydrogenasa z ječmene setého (*Hordeum vulgare L.*) a nukleosid-N-ribohydrolasy z kukuřice seté (*Zea mays L.*).

### 2.2.1 Ječmen (*Hordeum vulgare L.*)

Obecně existuje mnoho druhů ječmene (*Hordeum vulgare*), které se liší v mnoha ohledech. Rozšíření ječmene není výrazně limitováno podnebím, můžeme jej nalézt prakticky ve všech vnitrozemních oblastech – některé druhy se vyskytují i v extrémních oblastech, např. v himalájských a tibetských výšinách kolem 4 500 m n. m., nebo v oblastech oáz Sahary. Možnost růstu v různých oblastech je dána jeho malou náročností na teplotu a vodu, ovšem o to více je na půdu. Nejvhodnější jsou černozemě a hnědozemě.

Všechny typy náleží k jednoděložným rostlinám do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Některé druhy, např. ječmen setý (také obecný) jako kulturní plodina, patří k jednoletým rostlinám, ovšem některé plané druhy jsou i víceleté. Velký rozdíl mezi jednotlivými druhy je také v počtu chromozomů. Asi polovina druhů, kam spadá i *H. vulgare L.*, má klasicky diploidní počet, ale u některých můžeme nalézt tetra-, nebo dokonce hexaploidní počet chromozomů (Čurn, 1998).

Ječmen náleží ke skupině prvních domestikovaných organismů a je druhou nejstarší obilovinou – existují zmínky o nálezu z 8. tis. př. n. l. v Egyptě a ze 7. tis. př. n. l. v Asii. V současné době je ječmen setý 4. nejvíce pěstovanou plodinou, která je využívána především jako krmivo pro zvířata, v pivovarnictví a lihovarnictví jako surovina pro výrobu piva a whisky a v menší míře je používán i k lidské výživě vzhledem ke známým antiseptickým a léčebným účinkům (Čurn, 1998).

Ve státech Evropské unie v roce 2018 vypěstováno a sklizeno 56,6 mil. tun ječmene. Hlavními producenty ječmene v Evropě jsou Francie (~20 %), Německo (~17 %), Španělsko (~16 %), Velká Británie (~12 %) a Dánsko (~7 %). V České

republice se běžně pěstují dva typy ječmene – jarní a ozimý. Podle výroční zprávy ministerstva zemědělství bylo v roce 2018 z českých polí sklizeno 510,5 tis. tun ozimého a ~1,1 mil. tun jarního ječmene. V roce 2019 vzrostla pouze sklizeň ozimého ječmene na 644,1 tis. tun, sklizeň jarního ječmene zůstala stejná jako předešlý rok, avšak výnosnost (v t.ha<sup>-1</sup>) obou typů se zvýšila (Zemedelstvi\_2019\_web.pdf).

Vzhledem k využití ječmene se pěstované odrůdy rozdělují na české pivo, sladovnické a nesladovnické. Každá odrůda musí projít tříletými registračními zkouškami ÚKZÚZ (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský), kdy se zkoumají vlastnosti jednotlivých odrůd, např. výnosnost zrna v různých oblastech pěstování, odolnost proti poléhání, odolnost proti chorobám, kvalita zrna a další. V současné době je v ČR je pro jarní ječmen doporučeno k pěstování 12 odrůd – 5 s označením České pivo (BOJOS, FRANCIN, LAUDIS 550, MALZ a MANTA), 4 sladovnické (KWS AMADORA, KWS IRINA, OVERTURE a SPITFIRE) a 3 nesladovnické (AZIT, BENTE a OVATION).

Rostlina ječmene, běžně vysoká 60 – 120 cm, se skládá z kořenového systému, stébla, listu a klasu (Obr. 2). Kořenový systém je adventivní a hloubka kořenů závisí na podmínkách, ve kterých ječmen roste. Vzpřímené stéblo je tvořeno dutými články (tzv. internodii) a plnými kolénky (nody). Z kolének vyrůstají listové pochvy, které je objímají. Pochva přechází v listovou čepel, v místě přechodu je viditelný blanitý výrůstek, tzv. jazýček, a zašpičatělé výrůstky, tzv. ouška. Podle jazýčku a oušek lze rozeznat jednotlivé obilniny ještě před kvetením (kromě ovsa, který tyto výrůstky nemá). Květenstvím u ječmene je klas. Osa klasu je tvořena vřeténkem, z něhož vyrůstají klásky. Klásky jsou chráněny dvojicí plev. Uvnitř klásku se nacházejí kvítky, kde každý je chráněn drsnější pluchou, která přechází v osinu, a jemnější pluškou. Mezi pluchou a pluškou se nacházejí semeník se dvěma bliznami a třemi tyčinkami. Dále ze semeníku vyrůstají dvě tzv. plenky, které napomáhají rozevření kvítku a jeho opylení. Po oplození vzniká plod – obilka. Obilka je tvořena třemi hlavními částmi – obalovými vrstvami, endospermem a zárodkem. Endosperm zaujímá největší podíl hmotnosti obilky. V endospermu je vysoký obsah bílkovin a škrobových zrn ([www.agrobiologie.cz](http://www.agrobiologie.cz)).

V roce 2017 bylo dokončeno čtení celého genomu ječmene setého (Beier *et al.*, 2017, Mascher *et al.*, 2017). Na výzkumu se podílel výzkumný tým profesora Doležela z Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR ve spolupráci s dalšími týmy z Německa, Velké Británie, Číny, Švýcarska a mnoha dalších zemí. Výsledkem bylo zjištění, že ječmenný genom má velikost 5 Gbp. Znalost genomu nadále

usnadní práci při šlechtění odrůd ječmene odolných proti škůdcům, různým chorobám, nebo klimatickým změnám.

### 2.2.2 Kukuřice (*Zea mays L.*)

Kukuřice setá (*Zea mays L.*) spadá, stejně jako ječmen, do skupiny jednoděložných rostlin čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Dále se řadí ke skupině rostlin *Tripsacine*, které se vyskytují především v amerických oblastech. Plané příbuzné druhy kukuřice jsou označovány jako teosinty, kam spadají 4 druhy. Vzhledem k výskytu především v teplejších oblastech Střední Ameriky a Mexika, odkud byla kukuřice rozšířena do dalších oblastí, je patrné, že se jedná o teplomilnou rostlinu, proto bylo třeba šlechtěním zvýšit její odolnost vůči chladnějším podmínkám našeho prostředí. Obdobně jako ječmen patří kukuřice k brze domestikovaným organismům a v celosvětové produkci se pohybuje na předních místech. To je zapříčiněno nejen jejím využitím jako zdroje obživy pro zvířata a lidi, ale také jejím uplatněním při výzkumných studiích (Čurn, 1998).

V Evropské unii bylo v roce 2018 sklizeno 69,1 mil. tun kukuřice (na zrno i klasů), což odpovídá 23,4 % všech sklizených plodin. Nejvíce sklizené evropské kukuřice pochází z Rumunska (~27,5 %), Francie (~19 %) Maďarska (~11,5 %) a Itálie (~10,5 %). V ČR bylo v roce 2018 sklizeno ~489,2 tis. tun kukuřice na zrno, v roce 2019 se sklizeň vzrostla na ~ 620,3 tis. tun. Ovšem v roce 2018 nebyla na českých polích pěstována žádná geneticky modifikovaná kukuřice MON810, tzv. *Bt*-kukuřice. Jako důvod byla uvedena administrativní náročnost a přísné dodržování podmínek pěstování (nutnost sousedství *Bt*-kukuřice s běžnou kukuřicí; Zelena\_zprava\_2018.pdf, Zemedelstvi\_2019\_web.pdf).

Kukuřice jako studovaný organismus byla používána již na konci 60. let 19. stol. Gregorem Mendelem k potvrzení šlechtitelských experimentů vyzkoušených na hrachu. To postupně vedlo k užívání kukuřice jako modelového organismu. Genom kukuřice je považován za středně velký (2,5 Gpb) v porovnání s dalšími studovanými rostlinami – ječmenný genom obsahuje 5 Gpb, pšeničný 17 Gpb, oproti tomu genom rýže obsahuje „pouze“ 0,4 Gpb. Vzhledem k velikosti a kompletní znalosti genomu je kukuřice používána k mnoha biologickým studiím, např. k výzkumu domestikace, genomové evoluce, epigenetiky, ale také ke zkoumání odolnosti vůči škůdcům, či heterózy.



Obr. 2 Dospělá rostlina *Hordeum vulgare* L. **A** – adventivní kořenový systém a nadzemní vegetativní část rostliny. Stéblo je rozděleno na duté články pomocí plných kolének. Z kolének vyrůstají listy – listové pochvy přecházející v listové čepele s přidruženým jazýčkem a oušky. **B** – klas ječmene tvořený věténkem a klásků. **C** – skupina klásků tvořený plevami a kvítky se semeníkem s bliznami a tyčinkami **D** – obilka tvořená obalovými vrstvami, endospermem a zárodkem. Obrázek podle McCartney *et al.*, 2006.

## 2.3 Aldehyddehydrogenasy

Aldehyddehydrogenasy (ALDH) patří do skupiny  $\text{NAD}^+$ -dependentních (případně  $\text{NADP}^+$ -dependentních) enzymů, které se uplatňují při metabolismu endogenních i exogenních, alifatických i aromatických aldehydů. ALDH jako kofaktor využívají  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ , kdy jejich činností z aldehydu vzniká příslušná karboxylová kyselina a redukovaná forma kofaktoru ( $\text{NADH}/\text{NADPH}$ ) s  $\text{H}^+$ . Vznik redukovaných forem kofaktorů touto cestou je považován za jeden z důležitých zdrojů udržení redoxní rovnováhy v buňce. Další důležitou funkcí těchto enzymů je cytoprotektivní účinek ALDH během oxidativního stresu. Za podmínek oxidativního stresu ALDH oxidují vzniklé reaktivní formy aldehydů, které vznikly enzymaticky i neenzymaticky v nadměrném množství (Fritz *et al.*, 2013) a které jsou vzhledem ke své silné elektrofilitě schopné reagovat s dalšími důležitými makromolekulami, jako jsou nukleové kyseliny či proteiny (Kirch *et al.*, 2005, Brocker *et al.*, 2013). Dále mohou způsobovat inaktivaci enzymů, narušení buněčné homeostáze a v krajním případě až buněčnou smrt. U rostlin byla v případě stresových podmínek jako je nedostatek vody, salinita, teplo, či napadení patogenem potvrzena zvýšená exprese ALDH genu v odpovědi na tyto faktory. Proto je studium exprese ALDH i ekonomicky významné, neboť může dojít k ovlivnění růstu i kvality plodin rostoucích v nepříznivých podmínkách (Bartels a Sunkar, 1998).

Nadrodina ALDH jsou polymorfní enzymy, pro které jsou charakteristické některé sekvenční a strukturní motivy – v aktivním místě se vyskytuje katalytický thiol a kyselina glutamová (Glu), poté je pro enzymy typický Rossmannův fold (Kirch *et al.*, 2004). Ovšem dále jsou ALDH rozlišovány a klasifikovány dle jejich sekvence – pokud se alespoň ze 40 % sekvence jednotlivých proteinů shoduje, jedná se enzymy stejné rodiny a označují se stejnou číslicí. Pokud je tato shoda minimálně 60 %, proteiny se řadí do stejné podrodiny a kromě číslice jsou označeny i stejným písmenem. ALDH stejné podrodiny jsou následně rozlišovány další následující číslicí. Tato nomenklatura byla zavedena v roce 1999 a řídí se pravidly Human Gene Nomenclature Comitee (Komise pro názvosloví lidského genomu; Vasiliou *et al.*, 1999).

ALDH se vyskytují u prokaryotních i eukaryotních organismů a také se účastní řady metabolických drah včetně metabolismu polyaminů, fenylylpropanoidů, glykolýzy, glukoneogeneze či metabolismu aminokyselin (Sophos a Vasiliou, 2003, Marchitti *et al.*, 2008). Rostlinné ALDH se vyskytují v řadě buněčných organel včetně cytosolu, mitochondrií, peroxisomů a dalších (Mitsuya *et al.*, 2009,



Missihoun *et al.*, 2011). Jsou například zodpovědné i za vůni u aromatických druhů rýže (basmati, jasmínová) (Sakthivel *et al.*, 2009). Dále se také účastní při vývoji a zrání semen (Shin *et al.*, 2009). Dle současných výzkumů nadrodina ALDH obsahuje dvacet čtyři odlišných rodin klasifikovaných podle ALDH Gene Nomenclature Committee (AGNC; Vasiliou *et al.*, 1999). V rostlinách je známo třináct rodin, přičemž sedm z nich, konkrétně ALDH10, ALDH12, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24, je unikátní pro rostliny (Zhang *et al.*, 2012). Zbytek těchto enzymů, tedy ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7 a ALDH18, se vyskytuje ve svých ortholozích i u savců (Brockner *et al.*, 2013).

### 2.3.1 Zastoupení aldehyddehydrogenas v rostlinách

V rámci rostlinných enzymů je rozlišováno, ve kterých rostlinách se nachází, tedy zda se vyskytují v méně vyvinutých rostlinách (jako jsou řasy a mechy), nebo naopak v komplexnějších cévnatých jednoděložných a dvouděložných rostlinách, u nichž je typický vyšší počet genů pro ALDH. Rozdíly v zastoupení ALDH u jednotlivých rostlinných tříd jsou pravděpodobně zapříčiněny vlivem přechodu organismů z vodního prostředí na souš, kdy bylo třeba přizpůsobit se novým environmentálním podmínkám. Tímto docházelo ke ztrátě genů ALDH potřebných ve vodním prostředí k ochraně proti působícím stresům a zároveň k rozvoji genů pro ochranu proti abiotickým suchozemským stresům (Cronk *et al.*, 2001).

U některých druhů řas byla zjištěna nízké množství genů ALDH rodin – u druhu *Volvox carteri* bylo nalezeno sedm genů (Brockner *et al.*, 2013), u řas rodu *Ostreococcus tauri* a *Chlamydomonas reinhardtii* bylo objeveno šest a devět genů těchto genů (Wood a Duff, 2009). Překvapivé je, že v řasách se nevyskytují geny pro rodinu ALDH7, které v rámci evoluce velmi konverzované a jsou rozšířené napříč různými druhy organismů od komplexnějších rostlin po živočichy (Wood a Duff, 2009; Brockner *et al.* 2013).

Na rozdíl od řas, v mechu *Physcomitrella patens* bylo objeveno dvacet jedna ALDH genů. Toto vyšší číslo pravděpodobně souvisí právě s přechodem rostlin z vodního prostředí na souš (respektive na přizpůsobení se obojímu prostředí; Cronk *et al.*, 2001). V *P. patens* je patrný zvýšení výskytu genů *ALDH3* a *ALDH11*, nalezení nových genů *ALDH21* a *ALDH23*. Naopak zde úplně chybí typický gen *ALDH22* (Hou a Bartels, 2014).

V zelených cévnatých rostlinách bylo nalezeno devět genových rodin společných s nižšími rostlinami. Konkrétně jde o rodiny ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18 a ALDH22. U těchto rostlin se již právě objevuje i gen pro rodinu ALDH7. Naopak se z této skupiny vytrácí enzymové rodiny ALDH21, ALDH23 a ALDH24, které nejspíše měli význam při reakci na stres ve vodním prostředí. Další enzymová rodina, která je u cévnatých rostlin výjimečná a uplatňuje se při metabolismu prolinu, nese označení ALDH19 a byla identifikována pouze v rostlinách rajčete, což může naznačovat specifický vývoj této linie enzymů (García-Ríos *et al.*, 1997).

### 2.3.2 Aldehyddehydrogenasy 2

Aldehyddehydrogenasová rodina 2 (ALDH2) je velmi důležitá enzymová rodina jak u rostlin, tak u živočichů. ALDH2 byly studovány v rostlinném modelovém organismu huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*), dále v kukuřici (*Zea mays*) a rýži (*Oryza sativa*; Liu *et al.*, 2002, Skibbe *et al.*, 2002, Nakazono *et al.*, 2000). Kromě rostlin byly studovány také lidské ALDH2 a enzymy vyskytující se v kvasnicích (Yoshida *et al.*, 1998, Navarro-Aviño *et al.*, 1999). V každém studovaném organismu mají ALDH2 své specifické označení. Tato enzymová rodina je u rostlin rozlišována na několik podrodin. Podle studií subcelulární lokalizace jsou rozlišovány na mitochondriální (*mtALDH*) a cytosolické (*cALDH*) isoformy (Liu *et al.*, 2001).

#### 2.3.2.1 Lidský ALDH2

Funkce enzymu ALDH2 byla důkladně zkoumána především u člověka. Experimentálně bylo zjištěno, že aktivita ALDH2 se vyskytuje téměř ve všech tkáních, ale nejvyšší byla naměřena v játrech (Yoshida *et al.*, 1984, Yoshida *et al.*, 1991). Zároveň byla zaznamenána vysoká aktivita enzymu při oxidaci acetaldehydu na kyselinu octovou. Z tohoto důvodu je lidskému enzymu ALDH2 přisuzována hlavní funkce při detoxikaci alkoholu (ethanolu) v játrech, jehož oxidací vzniká acetaldehyd (Yoshida *et al.*, 1991).

S těmito poznatky byly zkoumány geny ALDH2 různých skupin lidí. Bylo zjištěno, že ve skupině asijské populace se u 50 % jedinců projevuje deficit tohoto enzymu vlivem bodové mutace na exonu 12, kde proběhla záměna Glu → Lys v pozici 487 (Yoshida *et al.*, 1991, Novorudsky *et al.*, 1995). Další mutace byly objeveny v testované skupině amerického původu, kde došlo k substituci G → A. V této pozici (471) však aminokyselinový zbytek Ser zůstal, neboť Ser je kódován původním i novým kodónem

(Novorudsky *et al.*, 1995). Přesto každou změnou vznikají jiné isoenzymy, které se vyskytují v různých populacích a liší se svou aktivitou metabolismu. Proto je u některých skupin lidí zvýšená citlivost na alkohol. Nicméně nebyly zpozorovány žádné evoluční problémy u jedinců s neaktivním ALDH2, proto pravděpodobně nepatří k nezbytným enzymům pro život (Yoshida *et al.*, 1991, Yoshida *et al.*, 1998).

### 2.3.2.2 Rostlinné ALDH2

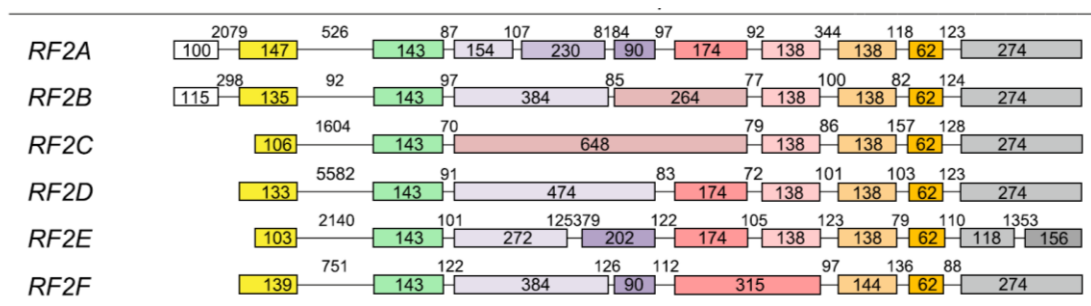
U rostlin byla tato enzymová rodina zkoumána mnohem méně. K prvním výzkumům se řadí zkoumání kukuřičného enzymu v souvislosti se samčí sterilitou (Cytoplasmic Male Sterility, CMS) s využitím modelu texaské kukuřice. Tato sterilita byla pozorována přibližně u 150 druhů rostlin a spočívá v neschopnosti rostliny produkovat funkční pyl (Laser a Lersten, 1972). Plodnost však může být obnovena. Jedním typem, jak k obnově může dojít, je přítomnost *RF2A* genu. Rozpustné proteiny kódované genem *RF2A* jsou ukládány v matrix mitochondrií (jde tedy o mitochondriální isoenzym) a svou aktivitou obnovují samčí plodnost. Navíc bylo prokázáno, že tyto proteiny jsou důležité pro správný vývoj prašníku v normální kukuřici (Liu *et al.*, 2001). Kromě kukuřice byl objeven význam *mtALDH* i v rýži. Zde má svou funkci při detoxikaci acetaldehydu, který vzniká opakovaným provzdušňováním rostlinek rýže. Zároveň to naznačuje důležitou roli enzymu při fermentaci ethanolu (Tsuji *et al.*, 2003).

Po objevení *RF2A* byl v kukuřici dále identifikován enzym *RF2B*. Protein *RF2A* má širokou substrátovou specifitu, je schopen oxidovat alifatické i aromatické aldehydy. Oproti tomu *RF2B* má omezenou specifitu na alifatické aldehydy s krátkým uhlíkatým řetězcem (Liu *et al.*, 2002).

Gen pro *mtALDH* se tedy vyskytuje ve více variantách nejen v kukuřici, ale ve všech rostlinách. V *Arabidopsis thaliana* nesou označení *ALDH2B4* a *ALDH2B7*. Příslušné enzymy vykazují acetaldehydovou a glykolaldehydovou aktivitu (Skibbe *et al.*, 2002). Rozdíl nastává u *cALDH*, kdy u kukuřice byly objeveny 4 geny kódující proteiny *RF2C* až *RF2F*, kdežto v *A. thaliana* je pouze jediný gen pro *ALDH2C4*. Oproti *mtALDH* se liší i svou aktivitou. kdy je schopen oxidovat nejen acetaldehyd a glykolaldehyd, ale také L-laktaldehyd, sinapaldehyd a coniferaldehyd (Nair *et al.*, 2004).

### 2.3.2.3 Struktura genů *ALDH2*

Téměř všechny geny kódující enzymy kukuřice a huseníčku obsahují konzervované oblasti exonů (Skibbe *et al.*, 2002). První dva exony jsou konzervované u všech a poslední tři exony jsou konzervované u všech kromě *RF2E*, jehož poslední exon je inzercí transpozonu rozdělen na dva. Ve střední části sekvence se počet exonů pohybuje v rozmezí 2 – 5. Pro mitochondriální isoformy enzymu je typická signální sekvence navádějící molekulu do mitochondrie na 5' konci genu (viz Obr. 3; Končítíková *et al.*, 2015).



Obr. 3 Genový model *ZmALDH2* (*RF2A – B* spadají do *mtALDH*, *RF2C – F* do *cALDH*; převzato z Končítíková *et al.*, 2015).

### 2.3.3 Ostatní ALDH vyskytující se i v savcích

#### 2.3.3.1 ALDH3

Lidský enzym ALDH3 (*HsALDH3*) se v těle vyskytuje ve čtyřech izoenzimech (*HsALDH3A1*, *HsALDH3A2*, *HsALDH3B1*, *HsALDH3B2*), ale jsou poznatky, že se nachází také u jiných savců (Yoshida *et al.*, 1998). Jeho největší účinek se projevuje při ochraně buněk před oxidativním stresem a toxicitou vzniklých aldehydů. *HsALDH3A1* je nejvíce zastoupena v rohovce a uplatňuje se při detoxikaci derivátů aldehydů vzniklých lipidovou peroxidací. Tímto je rohovka chráněna před UV zářením a oxidativním poškozením 4-hydroxynonenalem (Pappa *et al.*, 2003, Lassen *et al.*, 2007). Izoenzym *HsALDH3A2* je lokalizován v membránách peroxisomů a účastní se oxidace aldehydů, které vznikly z mastných kyselin. *HsALDH3B1* se nachází ve tkáních se zvýšenou tvorbou reaktivních aldehydů a volných radikálů, např. v játrech, plicích a dalších (Seitz a Becker, 2007) a účastní se obranných reakcí při oxidativním stresu (Marchitti *et al.*, 2007).

V rostlinách byl ALDH3 objeven v rostlině *Craterostigma plantagineum* při snaze o identifikaci genů, které se účastní reakce na stres při účasti kyseliny abscisové. Dle studií bylo prokázáno, že enzym CpALDH se účastní při detoxifikaci aldehydů vzniklých lipidovou peroxidací (Kirch *et al.*, 2001, Kirch *et al.*, 2004). V modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* byly objeveny tři izoenzymy – AtALDH3F1, AtALDH3I1 a AtALDH3H1. Expres každého izoenzymu je regulována jiným způsobem. Expres AtALDH3H1 především v kořenech je, podobně jako u CpALDH, indukována dehydratací, vysokou salinitou, přítomností peroxidu vodíku, těžkých kovů nebo herbicidů a kyselinou abscisovou (Kirch *et al.*, 2004). AtALDH3H1 se tedy účastní odpovědi na oxidativní stres (Sunkar *et al.*, 2003). AtALDH3I1 je exprimována především v listech a po exogenní aplikaci kyseliny abscisové je jeho enzymová aktivita velmi vysoká. Na rozdíl od předešlých dvou izoenzymů, AtALDH3F1 není závislá na přítomnosti kyseliny abscisové a její exprese není ovlivněna stresem (Kirch *et al.*, 2004).

### **2.3.3.2 ALDH5**

Stewart *et al.*, 1995 uvádí, že lidský mitochondriální enzym ALDH5 je exprimován již v aktivní formě a má degradační účinek vůči acetaldehydu vzniklému z alkoholu. Ovšem při experimentu se *Sacharomyces cerevisiae* nebyla zjištěna žádná aktivita při oxidaci acetaldehydu (Wang *et al.*, 1998). Účinky ALDH5 v rostlinách jsou trochu více prozkoumány. V genomu *Arabidopsis thaliana* byl objeven jediný gen pro ALDH5 - *AtALDH5F1*. Jedná se o mitochondriální enzym. AtALDH5F1, jinak také zvaný sukcinátsemialdehyddehydrogenasa, se účastní metabolismu kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné (Bouché a Fromm, 2004) a, jak již název napovídá, byla pro něj zjištěna specifita k sukcinátsemialdehydu. Bylo zjištěno, že ALDH5 se účastní obraně proti stresu tím, že zabraňuje akumulaci kyslíkových radikálů (Kirch *et al.*, 2004).

### **2.3.3.3 ALDH6**

Nejen v lidském organismu, ale také v kuřecím, myším a dalších, je prokázána spojitost mezi ALDH6 a retinolem. Tento cytosolární enzym může syntetizovat kyselinu retinovou, oxidovanou formu vitamínu A, která ovlivňuje buněčnou proliferaci, diferenciaci nebo apoptózu. Dle výzkumu je ALDH6 přibližně 10x lepší při signalizaci závislé na kyselině retinové než ALDH1 (Grün *et al.*, 2000).

Podobně jako ALDH5 je v genomu *A. thaliana* obsažen jediný gen pro enzym ALDH šesté rodiny. Kódovaný enzym, AtALDH6B2, se podílí na degradaci valinu a

propionyl-CoA a můžeme jej nalézt také pod názvem methylmalonylsemialdehyddehydrogenasa (Steele *et al.*, 1992).

#### **2.3.3.4 ALDH7**

Enzym ALDH7, v lidském těle konkrétně ALDH7A1, je známý také jako  $\alpha$ -aminoadipátsemialdehyddehydrogenasa nebo antikvitin. Jedná se o mitochondriální i cytosolický enzym. Substrátem tohoto enzymu je  $\alpha$ -aminoadipátsemialdehyd (AASAL) a účastní se metabolismu lysinu. Při deficienci tohoto enzymu vzniká epilepsie závislá na pyridoxinu. Vlivem nedostatku enzymu dochází k akumulaci AASAL, piperidin-6-karboxylátu a kyseliny pipekolové, které slouží jako markery tohoto onemocnění (Stockler *et al.*, 2011).

Rostlinný antikvitin je výhradně cytosolický enzym. Předpokládá se, že jeho fyziologická funkce souvisí s regulací turgoru v buňce nebo s obranou odpovědí na vyvolaný stres (Guerrero *et al.*, 1990, Strocher *et al.*, 1995).

#### **2.3.3.5 ALDH18**

U savců se ALDH18, známý také jako  $\alpha$ -pyrrolin-5-karboxylátsynthasa, vyskytuje jako mitochondriální bifunkční enzym –  $\gamma$ -glutamylkinasa (N-koncová doména) a  $\gamma$ -glutamylfosfátoreduktasa (C-koncová doména). Působením enzymu dochází k redukci glutamátu na  $\alpha$ -pyrrolin-5-karboxylát, který je dále převeden na ornitin a je použit k biosyntéze argininu a prolinu (Hu *et al.*, 1999, Marchitti *et al.*, 2008).

U suchozemských rostlin dochází vlivem dehydratace k nadexpresi *ALDH18*. Předpokládá se, že ALDH18 zvyšuje biosyntézu a akumulaci prolinu v rostlině, čímž dochází k potlačení osmotické nerovnováhy vlivem nedostatku vody (Yoshida *et al.*, 1997).

## 2.3.4 ALDH specifické pouze pro rostliny

### 2.3.4.1 ALDH10

Rostlinné ALDH10 jsou známé také jako aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH). Tyto enzymy jsou schopny oxidovat  $\omega$ -aminoaldehydy, jako jsou 3-aminopropionaldehyd (APAL), 4-aminobutyraldehyd (ABAL), které byly vyprodukovány za normálních nebo i stresových podmínek. Tyto reaktivní molekuly jsou vlivem enzymu převedeny na netoxický  $\beta$ -alanin a kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (Bouché a Fromm, 2004, Tylichová *et al.*, 2010). Proto AMADH bývají spojeny s osmoprotekcí, katabolismem polyaminů, sekundárním metabolismem nebo biosyntézou karnitinu (Raman a Rathinasabapathi, 2003, Moschou *et al.*, 2008, Charrier *et al.*, 2012). AMADH se vyskytují i u mnoha živočichů, ovšem vlivem nízké sekvenční shody (35 – 39 %) spadají k jiným enzymovým rodinám – u savců se jedná o ALDH9 (Sophos a Vasiliou, 2003).

### 2.3.4.2 ALDH12

Podle nedávné studie Korasick *et al.*, 2019 se jedná o enzymy  $\text{NAD}^+$ -dependentní glutamát- $\gamma$ -semialdehyddehydrogenasy (GSALDH). Účinkem jejího působení je ireverzibilně přeměněn glutamát- $\gamma$ -semialdehyd, meziprodukt prolinového a argininového metabolismu, na glutamát. Regulace množství prolinu je důležitá, protože ovlivňuje homeostázu buňky a udává toleranci vůči biotickému i abiotickému stresu. Katabolismus prolinu ovlivňuje signalizační procesy spojené s patogeny a oddaluje stárnutí pletiv (Cecchini *et al.*, 2011).

### 2.3.4.3 ALDH19

Ačkoliv dříve vylo známo, že ALDH19 je unikátní pro rostliny, v dnešní době nebyl tento enzym zaznamenán v žádné jiné cévnaté rostlině, kromě rajčete *Solanum lycopersicum*. Z toho důvodu je teorie, že se enzym ALDH19 vyvinul konkrétně v jedné rostlině (García-Ríos *et al.*, 1997).

### 2.3.4.4 ALDH21

Podle nedávné studie Kopečná *et al.*, 2017 se v případě ALDH21 jedná  $\text{NADP}^+$ -dependentní sukcinátsemialdehyddehydrogenasu katalyzující přeměnu sukcinát semialdehydu na sukcinát, který je dále součástí citrátového cyklu. Enzym ALDH21 se

vyskytuje v některých zelených řasách, mechorostech, plavuních a kapradinách. Ovšem v kvetoucích cévnatých rostlinách nebyl detekován, pravděpodobně došlo ke ztracení genu během vývoje (Wood a Duff, 2009). Enzym je výrazně upregulován během dehydratace (Chen *et al.*, 2002). Studie s využitím bavlny a tabáku prokázaly, že nadměrná exprese ALDH21 zvyšuje odolnost rostliny vůči soli a suchu (Yang *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2016).

#### **2.3.4.5 ALDH22**

Geny tohoto enzymu byly zatím objeveny pouze v *Arabidopsis thaliana* a *Zea mays* (Kirch *et al.*, 2004, Kirch *et al.*, 2005). Podle výzkumu Huang *et al.*, 2008 exprese kukuřičného genu *ALDH22A1* probíhala ve všech tkáních po vystavení různým stresovým podmínkám. Současně při výzkumu bylo zpozorováno, že zvýšená tolerance vůči stresu u transgenních rostlin, jejichž gen *ALDH22A1* byl nadměrně exprimován, byla doprovázena redukcí malondialdehydu (MDA), který vznikal během lipidové peroxidace. Toto tvrzení bylo podpořeno výsledky, kdy při sníženém obsahu MDA transgenní *A. thaliana* vykazovala zvýšenou toleranci vůči stresu (Kotchoni *et al.*, 2006).

#### **2.3.4.6 ALDH23 a ALDH24**

Stejně jako ALDH21 tak i ALDH23 se vyskytuje pouze v nižších rostlinách (*Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*) a v cévnatých jeho gen chybí (Brocker *et al.*, 2013). Prozatím není zcela známa funkce tohoto enzymu. Enzym ALDH24 byl také poměrně nedávno. Jeho gen se podařilo objevit v *Chlamydomonas reinhardtii*. Funkce je protazím také neznámá (Brocker *et al.*, 2013).

### **2.4 Nukleosid-N-ribohydrolasy**

Další velkou skupinou enzymů, kterou se zabývá tato práce, jsou nukleosid-N-ribohydrolasy (NRH), také známé jako nukleosidasy, nukleosidhydrolasy nebo ribohydrolasy. Tyto enzymy jsou klasifikovány jako hydrolasy (EC 3.2.2.x), konkrétně glykosidasy, a účastní se metabolismu nukleosidů, kdy jejich účinkem dochází k hydrolýze N-glykosidové vazby v molekulách za vzniku ribosy a volné báze (Jung *et al.*, 2009). Pro organismy je tento proces energeticky výhodný, neboť nové báze nemusí vznikat *de novo* syntézou, ale již existující jsou recyklovány. V přírodě jsou tyto enzymy velmi rozšířené. Vyskytují se v různých druzích bakterií, kvasinek, prvoků i v řadě rostlin, ale ne u savců (Verseés *et al.*, 2001, Jung *et al.*, 2009, Jung *et al.*, 2011).



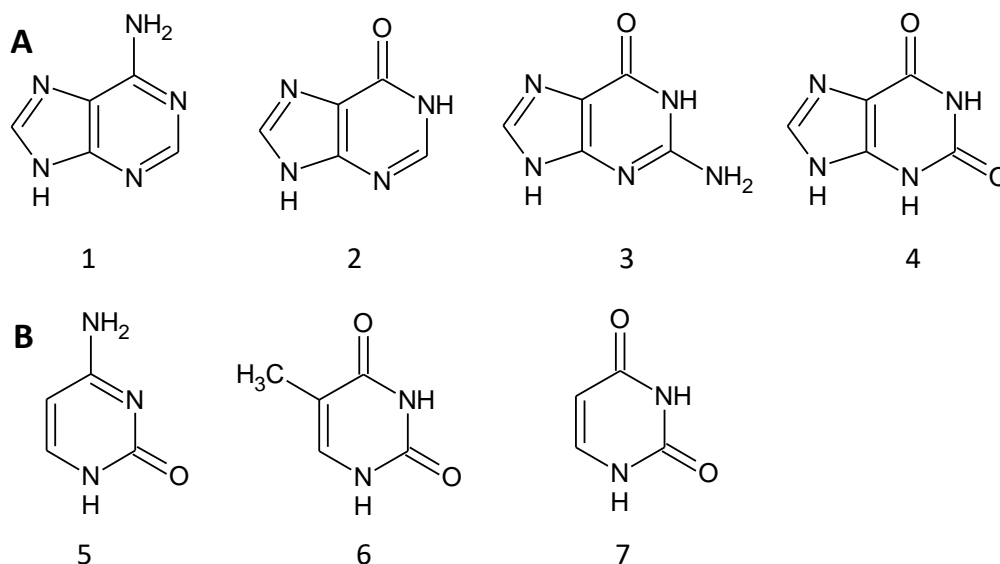
## 2.4.1 Nukleové báze

Nukleové kyseliny (deoxyribonukleová – DNA, ribonukleová – RNA) jsou tvořeny třemi základními složkami – nukleovou bází, cukernou složkou a fosfátem. Je známo pět bází běžně se vyskytujících v molekulách DNA a RNA – adenin (A), cytosin (C), guanin (G), thymin (T) a uracil (U) a další dvě báze vyskytující se v jejich metabolismu (Obr. 4). Báze jsou podle základní struktury molekuly rozděleny na purinové a pyrimidinové. Nukleové báze se v nukleových kyselinách vyskytují ve formě nukleotidu, tzn. že obsahují  $N^3$ -substituovaný cukr (ribózu v RNA, deoxyribózu v DNA) s navázaným fosfátem v pozici C5.

### 2.4.1.1 Purinové báze

Do skupiny purinových bází jsou řazeny základní adenin (A) a guanin (G) a dále hypoxanthin (H) a xanthin (X), které se objevují během jejich biosyntézy nebo metabolismu. Všechny báze se mohou vyskytovat také ve svých nukleosidech – molekulách volných bází s navázanou cukernou složkou v pozici N9. V takovém případě jde o adenosin, guanosin, inosin a xanthosin. Adenin je základní bází vyskytující se v nukleových kyselinách ve všech živých organismech. Ve formě ribosidu je také složkou životně důležitých sloučenin. K těmto sloučeninám se řadíme adenosintrifosfát (ATP), makroergní molekulu. Tato sloučenina dodává potřebnou energii pro fungování metabolismu a k pohybu motorických proteinů (kinesinu a dyneinu). Další sloučeninou je adenosinmonofosfát (AMP, ukládání energie) a cyklický AMP (cAMP), který slouží jako signální molekula. Dále je adenosin součástí molekul nikotinamidadenindinukleotidu ( $NAD^+$ ) a nikotinamidadenindinukleotidfosfát ( $NADP^+$ ), které fungují jako koenzymy řady enzymů (Lutwak-Mann, 1939).

Guanin má na rozdíl od A v organismu odlišnou funkci. Ve formě guanosintrifosfátu (GTP) se uplatňuje se při buněčném transportu (zkracování a prodlužování mikrotubulů). Dále je důležitou součástí některých molekul, např. elongačních faktorů působících během peptidové syntézy a G-proteinů, které se uplatňují při buněčné signalizaci (Vetter, 2001).

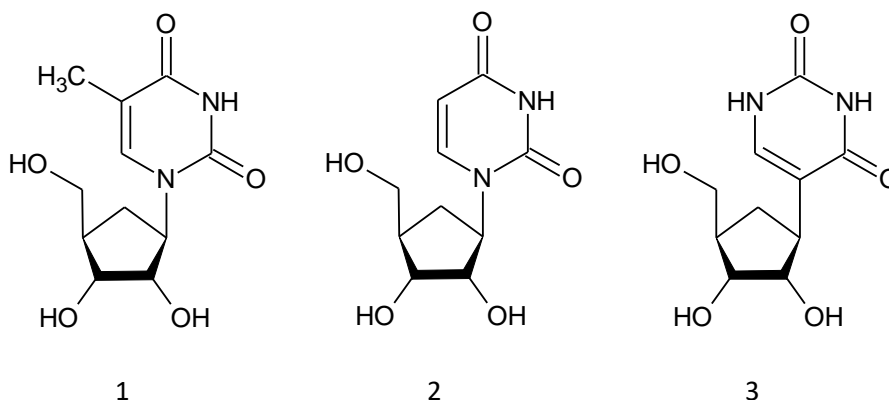


Obr. 4 Strukturní vzorce nukleových bází. **A** – báze odvozené od purinu: adenin (1), hypoxanthin (2), guanin (3), xanthin (4); **B** – báze odvozené od pyrimidinu: cytosin (5), thymin (6) a uracil (7).

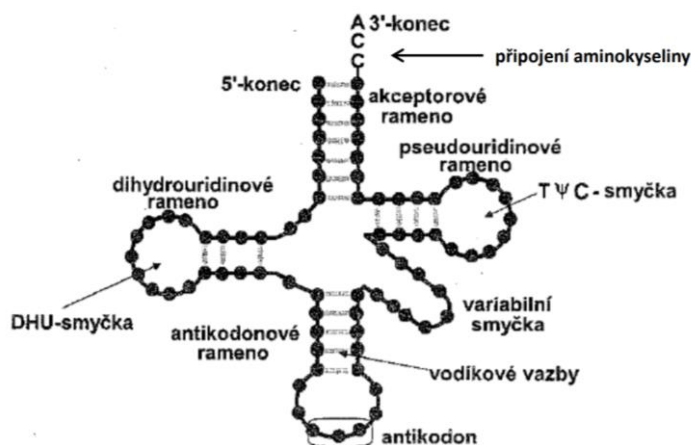
### 2.4.1.2 Pyrimidinové báze

K pyrimidinovým nukleovým bázím jsou zařazeny cytosin (C), thymin (T) a uracil (U). Podobně jako purinové báze vytvářejí nukleosidy navázáním cukru v poloze *N3*. Cytosin je součástí všech nukleových kyselin. C se také ve formě cytidintrifosfátu (CTP) účastní syntézy CDP-cholinu – meziprojektu biosyntézy fosfatidylcholinu, který je důležitou součástí buněčných membrán (Secades a Frontera, 1995). Uracil (U) a thymin (T) jsou poslední báze běžně se vyskytující v nukleových kyselinách. Ze strukturálního hlediska se jedná o velmi podobné molekuly, T však v poloze *C5* navíc obsahuje methylovou skupinu. T nalezneme pouze v DNA a U v RNA. Toto zastoupení je dáno skutečností, že sekvence DNA je životně důležitá, proto je předávána z generace na generaci. V případě výskytu změny sekvence v oblasti kódující protein může vzniknout pozměněný protein, který může ohrozit životaschopnost buňky. Tato změna sekvence by právě mohla vzniknout v případě C deaminací, kdy by se z něj vytvořil U a tím by místo párování C s G vznikl pár UA. Proto se U vyskytuje v RNA, která je v buňce obsažena ve větším množství a náhodná mutace není tolik závažná. Navíc U je oproti T energeticky méně náročný na syntézu než T (Krokan *et al.*, 2002). U je v buňkách ve formě uridintrifosfátu (UTP) důležitou molekulou účastnící se metabolismu sacharidů, např. při syntéze sacharózy nebo glykogenu za vzniku meziprojektu tzv. aktivované glukosy (UDP-glukosy; Shapiro a Wertheimer, 1943).

U se však ve formě nukleosidu uridinu může v buňkách vyskytovat i modifikovaný. Nejznámější a zároveň nejhojnější jsou 5-methyluridin (5mU) a pseudouridin (psU) (Obr. 5), které se nalézají v transferové RNA (tRNA), ale mohou být i v jiných druzích RNA. Bylo zjištěno, že psU se vyskytuje v množství ~ 45 % všech modifikovaných nukleotidů v tRNA a 5mU v množství ~ 14 % (Panwar a Raghava, 2014). Podle této studie se 5mU vyskytuje pouze na T smyčce (Obr. 6) za předpokladu, že se zde nachází vysoce konzervovaná sekvence GpsU5mUC. Naopak pro psU je konzervace sekvence velmi nízká, obecně se vyskytuje v oblasti sekvence psU5mUC, ale i v dalších sekvencích. Funkce psU v tRNA (i v rRNA) byla zjištěna především jako stabilizace a udržování struktury molekuly pro správné fungování translace mRNA ().



Obr. 5 Strukturální vzorce 5-methyluridinu (1), uridinu (2) a pseudouridinu (3).



Obr. 6 Sekundární struktura transferové RNA (tRNA) s ukázkou výskytu 5-methyluridinu a pseudouridinu.

### 2.4.1.3 Metabolismus purinových bází

Biosyntéza purinových a pyrimidinových bází probíhá v mitochondriích nebo plastidech. Struktura purinové báze je vytvořena z aktivovaného  $\alpha$ -D-ribose-5-fosfátu (5-fosforibosyl- $\alpha$ -pyrofosfátu, PRPP), dvou molekul glutaminu, glycinu, dvou  $N^{10}$ -formyl-THF,  $\text{HCO}_3^-$  a aspartátu. Při syntéze purinových bází je výchozí molekulou PRPP, na který se následně přidávají další atomy nebo skupiny atomů za spotřeby ATP. Takto vzniká meziprodukt inosin-5'-monofosfát, který je převeden enzymy adenylosukcinátsynthetasou a IMP dehydrogenasou na adenylosukcinát a xanthosin-5'-monofosfát, z nichž dále vzniká AMP a GMP. Pro zabudování nukleosidů do nukleové kyseliny jsou třeba jejich trifosfáty, které vzniknou účinkem enzymu nukleosidmonofosfátkinasy a následně nukleosiddifosfátkinasy. Biosyntéza AMP a GMP je regulována ve dvou úrovních. První způsob je regulace tvorby IMP, při vysoké koncentraci purinových nukleosidmonofosfátů dochází k inhibici syntézy IMP. Druhým typem regulace je rychlost syntézy GTP, která se zvyšuje s vyšší koncentrací ATP, a syntézy AMP, která vzrůstá v přítomnosti vyššího množství GTP (van der Graaff *et al.* 2004).

Během odbourávání (katabolismu) purinových nukleosidmonofosfátů jsou NMP převedeny na příslušné nukleosidy. Jednak může dojít ke konverzi za katalýzy enzymy nukleotidasami a současném odštěpení fosfátu, nebo mohou být nukleotidy defosforylovány fosfatasou s následným hydrolyzováním umožněným nukleosidasou (NRH). Navíc v případě AMP existují dvě možnosti odbourání na nukleosid inosin. První možností je deaminace AMP na IMP za přítomnosti AMP deaminasy a následné převedení na inosinnukleotidasou (případně fosfatasou s následnou hydrozylací), nebo v druhém případě je AMP defosforylováno na adenosin, který je poté adenosindeaminasou deaminován na inosin. Dále jsou všechny nukleosidy účinkem purinnukleosidfosforylas a za odštěpení ribosa-1-fosfátu převedeny na příslušné báze (inosin na hypoxanthin, xanthosin na xanthin a guanosin na guanin). Nukleové báze hypoxanthin a guanin jsou pro úplnou degradaci a vyloučení z organismu účinkem enzymů xanthinoxidasou a guanindeaminasou přeměněny na xanthin. Ten je dalším působením enzymu xanthinoxidasy převeden na kyselinou močovou, hlavní zdroj odpadového dusíku, která je finálním produktem degradace purinů pro primáty, ptáky, plazy a hmyz. Kyselina močová však může být dále konvertována na allantoin enzymem urátoxidasou, poté allantoinasou na kyselinu allantoinovou s následným působením

allankoitasou na močovinu. V posledním kroku je močovina degradována enzymem ureasou na  $\text{CO}_2$  a  $\text{NH}_4^+$ . Tímto způsobem je dusík vylučován např. u mořských bezobratlých, ale především u rostlin, které dusík potřebují ke svému životu a jsou schopné jej v této formě zpracovat a dále využít (Guranowski, 1982).

Kromě degradace purinových nukleotidů je pro rostliny také velmi významná recyklace purinů. Právě při *de novo* syntéze je spotřebováno 5 ATP na vznik jedné molekuly AMP a dokonce 7 ATP pro vznik GMP. Oproti tomu během recyklace je spotřebována pouze jedna molekula ATP, je tedy energeticky mnohem méně náročná. Z tohoto důvodu je recyklace rostlinami hojně využívána. Tato dráha probíhá v cytosolu, kde jsou uloženy všechny účastníci se enzymy. Purinové báze, adenin, guanin a hypoxanthin, jsou konvertovány na příslušné nukleotidy působením enzymů adeninfosforibosyltransferasou a hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasou za přítomnosti PRPP jako zdroje fosfátu. Recyklovány mohou být již vzniklé nukleosidy adenosin, inosin a guanosin. Ke vzniku IMP, XMP a GMP jsou využity enzymy adenosinkinasa a inosin-guanosinkinasa, nebo nukleosidfosfotansferasa. Recyklace se také účastní enzymy adenosindeaminasa, guanosindeaminasa a adenosinnukleosidasa, které se účastní katabolismu purinů (Zrenner *et al.*, 2006). V rostlinné recyklaci purinů jsou velmi důležité enzymy adeninfosforibosyltransferasa a adenosinkinasa (Moffatt a Somerville, 1988, Moffatt *et al.*, 2002), které se mimo jiné účastní metabolismu cytokininů (Moffatt a Ashihara, 2002).

#### **2.4.1.4 Biosyntéza a metabolismus pyrimidinových bází**

Na rozdíl od *de novo* syntézy purinových probíhá biosyntéza pyrimidinových bází odlišně. Nejprve je syntetizován pyrimidinový kruh a až poté se připojí cukerná složka. Pyrimidinová struktura je složena z atomů pocházejících z aspartátu,  $\text{CO}_2$  a glutaminu. Produktem biosyntézy je UMP, který je prekurzorem pro další pyrimidinové nukleotidy. Syntéza trifosfátů, konkrétně UTP, je obdobou reakce u purinů, kdy se uplatňují enzymy nukleosidmonofosfátkinasy a nukleosiddifosfátkinasy. Aminací z UTP vzniká CTP reakcí katalyzované enzymem CTP synthasa. Donorem dusíku je u živočichů glutamin, u bakterií je využit přímo  $\text{NH}_3$ . TTP, konkrétněji dTTP, vzniká z molekuly dUMP, pocházející z hydrolýzy dUTP. Následuje methylace dUMP s přítomným  $N^5,N^{10}$ -metylen-THF za katalýzy enzymem thymidylátsynthasy. Vzniklý dTMP je okamžitě převeden na dTTP, aby zabránil vstupu dUTP do DNA (Pérignon *et al.*, 1987).

Katabolismus pyrimidinových bází probíhá přes uridin (případně deoxythymidin), který vzniká působením nukleotidasy na UMP (dTMP), nebo v případě CMP působením nukleotidasy a cytidindeaminasy. Uridin (thymidin) je následně za odštěpení ribosy (deoxyribosy) převeden na U (T). Za spotřeby NADPH vzniká dihydrouracil (DHU), nebo dihydrothymin. DHU je druhým nejhojnějším modifikovaným U, který se vyskytuje v tRNA, nejvíce v DHU smyčce. Nicméně při degradaci bází je DHU a dihydrothymin působením enzymu hydroypyrimidinhydratasy přeměněn na  $\beta$ -ureidopropionát a  $\beta$ -ureidoisobutyrát, z nichž následně vzniká  $\beta$ -alanin a  $\beta$ -aminobutyrát. V posledních krocích jsou tyto molekuly převedeny na malonyl-CoA a methylmalonyl-CoA. Malonyl-CoA je dále spotřebován během syntézy mastných kyselin. Methylmalonyl-CoA je důležitým meziproduktem řady reakcí v metabolismu, např. může být působením enzymu mutasy přeměněn na sukcinyl-CoA, který se dále uplatní v citrátovém cyklu (Pérignon *et al.*, 1987).

Stejně jako v případě purinových bází je pro rostliny energeticky výhodnější molekuly recyklovat, než-li syntetizovat *de novo*. U pyrimidinových nukleosidů se během recyklace uplatňují enzymy nukleosidkinasy. Výjimku tvoří U, který je působením uracilfosforibosyltransferasy přímo převeden na UMP (Moffatt a Ashihara, 2002). Nejdůležitějšími enzymy recyklace pyrimidinů jsou uridinkinasa a uracilfosforibosyltransferasa (Chen a Thelen, 2011). Předpokládá se, že recyklace probíhá v cytosolu a plastidech, neboť enzymy zodpovědné za tuto reakci byly lokalizované v těchto organelách (Schmid *et al.*, 2005).

## 2.4.2 Druhy NRH

Metaloproteinové enzymy NRH byly poprvé identifikovány a charakterizovány v prvocích parazitického původu, kteří nejsou schopni sami syntetizovat nukleotidy *de novo*, a proto jsou závislí na recyklaci purinů a pyrimidinů. Následně byly NRH identifikovány a charakterizovány i v dalších organismech, např. bakteriích, kvasinkách, či hmyzu (Versées a Steyaert, 2003). Zajímavé je, že nikdy nebyly identifikovány u savců (Parkin *et al.*, 1991). Všechny typy NRH vykazují přísnou specifitu pro navázanou ribosu, naopak se liší v substrátové specifitě přírodních nukleových bází. Enzymy NRH byly dle své substrátové specifity rozděleny do čtyř základních skupin: nespecifické NRH, hydrolyzující inosin a uridin (IU-NRH; Parkin *et al.*, 1991), purinové specifické NRH (pro inosin, adenosin a guanosin; Parkin, 1996), 6-oxopurin specifické NRH (pro

inosin a guanosin; Estupiñán and Schramm, 1994) a NRH specifické pro pyrimidinové nukleosidy (cytidin a uridin, CU-NRH; Giabbai a Degano, 2004).

V rostlinách bylo identifikováno několik druhů NRH. Např. ve fazoli mungo (*Phaseolus radiatus*) byl identifikována NRH specifická pro uridin (Achar a Vaidyanathan, 1967), v *Lupinus luteus* byla objevena NRH specifická pro inosin a guanosin s inosinem (Guranowski, 1982; Szewart et al., 2006) a v kávě *Coffea arabica*, ječmeni a pšenici byla zjištěna NRH specifická pro adenosin (Guranowski a Schneider, 1977; Chen and Kristopeit, 1981; Campos *et al.*, 2005). Ovšem žádný z těchto enzymů nebyl detailně prozkoumán.

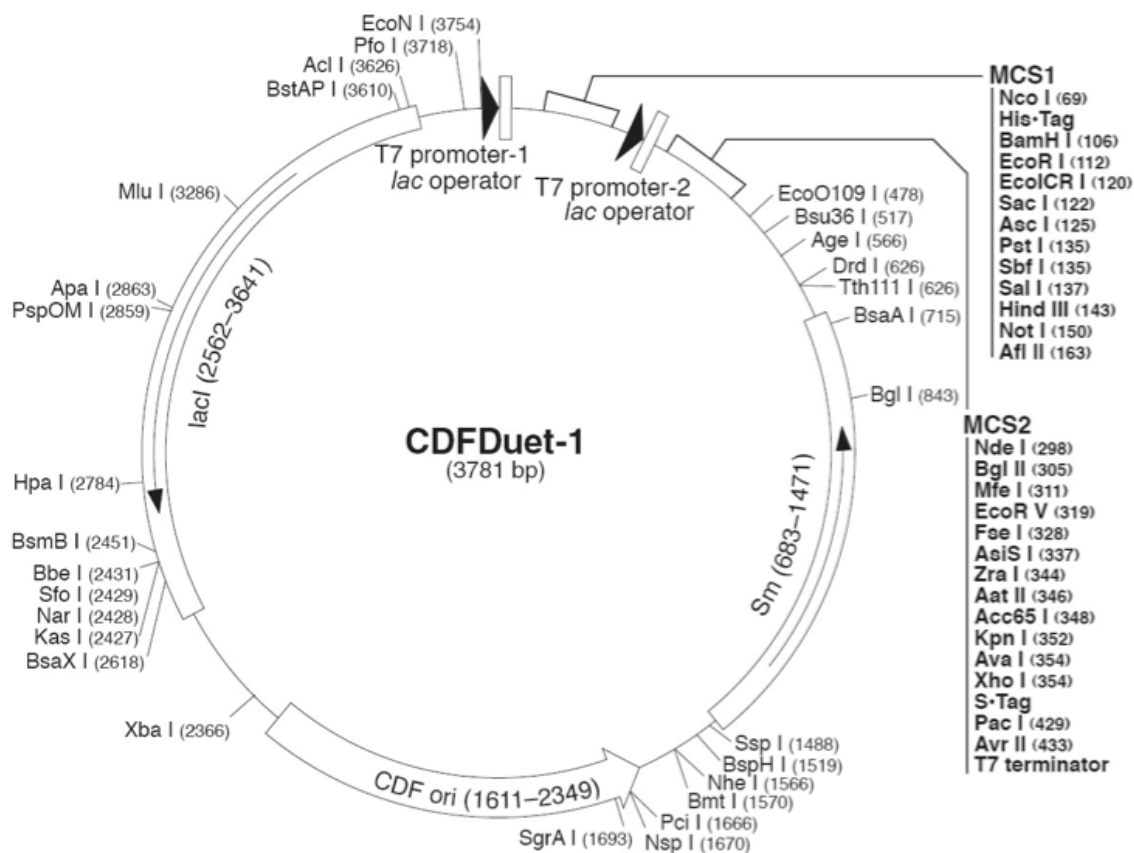
Nejvíce byly prostudovány geny *Arabidopsis thaliana*. Bylo zjištěno, že AtNRH1 vykazuje vysokou aktivitu vůči uridinu a xanthosinu. Zároveň bylo prokázáno, že může hydrolyzovat glykosidickou vazbu v cytokininovém ribosidu  $N^6$ -(2-isopentenyl)adenosinu (iPR), proto vznikly teorie, že by se tento enzym mohl podílet na metabolismu cytokininů v rostlině (Jung *et al.*, 2009, Jung *et al.*, 2011). Tato teorie byla však vyvrácena výzkumem Riegler *et al.* (2011). AtNRH2 se projevuje v pozdější fázi stárnutí a bylo prokázáno, že katalyzuje hydrolyzu inosinu. Dále byly podobným způsobem charakterizovány enzymy z mechu *Physcomitrella patens* a kukurice *Zea mays* (Kopečná *et al.*, 2013).

## 3 PRAKTICKÁ ČÁST

### 3.1 Materiál a chemikálie

#### 3.1.1 Biologický materiál

- 5tidenní sazeničky *Zea mays*
- kořeny a stonky *Hordeum vulgare*
- expresní vektor pCDF Duet (3781 pb; Obr. 7)
- kompetentní expresní buňky *Escherichia coli* (NEB 5- $\alpha$ )



Obr. 7 Expresního vektoru pCDFDuet-1. Mapa zobrazuje klonovací místa MCS1 a MCS2, kam byl vklonován gen *HvALDH2E* s použitím restričních enzymů *EcoRI* a *XhoI*.



### 3.1.2 Chemikálie

- $\alpha$ -methyluridin (Sigma-Aldrich, USA)
- 5X Reaction Buffer (Thermo Scientific, USA)
- 10X Buffer (BioLabs, USA)
- Agarosa (SERVA, Německo)
- aldehydy: 3-hydroxybenzaldehyd (Sigma-Aldrich, USA), 3-methyl-2-butenal (Sigma-Aldrich, USA), 3-methylbutyraldehyd (Sigma-Aldrich, USA), 4-hydroxybenzaldehyd (Sigma-Aldrich, USA), acetaldehyd (Sigma Aldrich, USA), benzaldehyd (Sigma-Aldrich, USA), butyraldehyd (Sigma-Aldrich, USA), citral (Sigma-Aldrich, USA), heptanal (Sigma-Aldrich, USA), hydrocinnamaldehyd (Sigma-Aldrich, USA), isobutyraldehyd (Sigma-Aldrich, USA), kapronaldehyd (Sigma Aldrich, USA), koniferaldehyd (Sigma-Aldrich, USA) *m* anisaldehyd (Sigma-Aldrich, USA), nonanal (Sigma-Aldrich, USA), oktanal (Sigma-Aldrich, USA), *p*-anisaldehyd (Sigma-Aldrich, USA), phenylacetaldehyd (diacetal; Sigma-Aldrich, USA), propionaldehyd (Sigma-Aldrich, USA), sinapaldehyd (Sigma-Aldrich, USA), *trans*-2-hexenal (Sigma-Aldrich, USA), *trans*-2-nonenal (Sigma Aldrich, USA), *trans*-cinnamaldehyd (Sigma-Aldrich, USA), valeraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- Bacterial Protein Extraction Reagent (B-Per; Thermo Scientific, USA)
- BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA)
- Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad, USA)
- CutSmart (BioLabs, USA)
- DNA Turbo Buffer (Invitrogen, USA)
- DNAsa (VWR, USA)
- Denerasa (c-LEcta, Germany)
- dodecylsírán sodný (VWR, USA)
- Dream Taq Green (Thermo Scientific, USA)
- Dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, USA)
- ethidium-bromid (Bio-Rad, USA)
- ethanol (Lach:Ner, ČR)

- GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA)
- GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA)
- glycerol (Lach:Ner, ČR)
- guanidin (Sigma-Aldrich, USA)
- HEPES pufr, pH 7,5 (Sigma-Aldrich, USA)
- hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid draselný (Lach:Ner, ČR)
- chlorid hořečnatý (VWR, USA)
- chlorid sodný (Lach:Ner, ČR)
- imidazol (Sigma-Aldrich, USA)
- inhibitor proteas (Roche, Švýcarsko)
- isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG; Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina chlorovodíková (Lach:Ner, ČR)
- Laemliho vzorkovací pufr (Bio-Rad, USA)
- Luria-Bertani medium (LB-medium; ROTH, Německo)
- močovina (Sigma-Aldrich, USA)
- *n*-butanol (Sigma-Aldrich, USA)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma-Aldrich, USA)
- Nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>; Sigma-Aldrich, USA)
- Nuclease-Free voda (Ambion, USA)
- peroxidisíran amonný (APS; Bio-Rad, USA)
- restrikční enzymy: EcoR I, Xho I
- RNAqueous Total RNA isolation kit (Thermo Scientific, USA)
- RNAsa (VWR, USA)
- Streptomycin
- Super Optimal broth with Catabolite medium (SOC; BioLabs, USA)
- T4 DNA ligasa (BioLabs, USA)
- Tris-HCl pufr, pH 6,8 (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris-HCl pufr, pH 7,5 (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris-HCl pufr, pH 8,8 (Sigma-Aldrich, USA)
- Uridin (Sigma-Aldrich, USA)

### 3.1.3 Přístrojové vybavení

- analytické váhy (Sartorius, SRN)
- běžné laboratorní vybavení
- centrifuga 5430 (Eppendorf, SRN)
- centrifuga 5430R (Eppendorf, SRN)
- centrifuga Benchtop 4-16 K (Sigma, SRN)
- digitální pH metr (Multical WTW, SRN)
- elektroforetická komůrka (Bio-Rad, USA)
- elektromagnetická míchačka (IKA, SRN)
- inkubátor (Schoeller, ČR)
- laminární box (Schoeller, ČR)
- magnetická míchačka (IKA, SRN)
- minicentrifuga BLUE (Labnet, SRN)
- PCR termocykler (Eppendorf, SRN)
- rotátor (Biosan, USA)
- spektrofotometr UV-VIS s (Agilent, SRN)
- termostat (Labnet, USA)
- třepačka RCT basic (IKA, SRN)
- vortex (Stuart, UK)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Fylogenetická analýza HvALDH2E

Pro vyhledávání jednotlivých genů ALDH v genomu ječmene byl využit software BLAST, především blastp (protein-protein blast) nebo tblastn (protein-translated nucleotide blast). Tento software byl využit na veřejných webových stránkách NCBI, Phytozome a UniProt, kdy byla zadána požadovaná sekvence ve formátu FASTA a byl vybrán soubor (organismus), ve kterém měla být daná sekvence nalezena. Následně byly na základě nejvyššího scoringu (podobnosti) vybrány sekvence proteinů, které byly dále zpracovány. V databázi Phytozome je navíc možné zjistit, i pozici, na kterém se daný gen proteinu v ječmeni nachází, a počet exonů.

Následně byly staženy sekvence ječmenného HvALDH2E a sekvence cytosolárních enzymů ALDH2 z dalších rostlin (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Triticum urartu*, *Zea mays* a dalších) a pár sekvencí enzymu z živočišných organismů (*Homo sapiens* a *Mus musculus*). V programu BioEdit byl proveden tzv. ClustalW multiple alignement, kdy došlo k zarovnání opakujících se částí sekvencí proteinů. Takto upravené sekvence byly nahrány do programu MEGA-X, kde byl vytvořen fylogenetický strom s ohodnocením větví pomocí bootstrapu.

### 3.2.2 Klonování

#### 3.2.2.1 Izolace mRNA a přepis do cDNA

Zamražené listy a kořeny ječmene byly rozdrceny v třecí misce za stálého udržování zmraženého stavu pomocí tekutého dusíku. K izolaci mRNA byl použit RNAqueous Total RNA isolation kit. Přibližně 100 mg vzorku bylo odebráno do 2 ml mikrokumavky, kam byl poté napipetován 1 ml Lysis-Binding Solution. Obsah v mikrokumavkách byl stočen při 16 000 g po dobu 5 min a získaný supernatant byl oddělen. K supernatantu bylo napipetováno ekvimolární množství 64% ethanolu a obsah byl smíchán. Směs byla přepipetována do mikrokumavek s filtrační cartridge, které byly součástí kitu, a následně byly mikrokumavky stočeny (10 000 g, 5 s). Filtry v cartridge byly promyty jednou 700 µl a dvakrát 500 µl Wash Solution (po každém napipetování roztoku byly mikrokumavky centrifugovány při 10 000 g, 30 s). Mikrokumavky byly dále stočeny naprázdno (10 000 g, 30 s), aby byl odstraněn zbylý Wash Solution. RNA byla eluována

přídavkem 50  $\mu\text{l}$  a 40  $\mu\text{l}$  Elution Solution (zahřátého na 80  $^{\circ}\text{C}$ ), 2min inkubací při pokojové teplotě a následnou centrifugací (10 000 g, 30 s).

K odstranění interferující DNA bylo ke 30  $\mu\text{l}$  eluátu přidáno 3,5  $\mu\text{l}$  DNA TURBO Buffer a 2  $\mu\text{l}$  DNasa TURBO. Směs byla inkubována 40 min při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Poté byl ke směsi přidán 1  $\mu\text{l}$  DNasa TURBO a opět byla směs zahřívána 40 min na 37  $^{\circ}\text{C}$ . Nakonec byla směs inaktivována přídavkem 1  $\mu\text{l}$  50mmol.l<sup>-1</sup> EDTA a inkubací 10 min při 70  $^{\circ}\text{C}$ .

K odstranění dalších interferujících komponent (např. sacharidů) byla použita precipitace pomocí LiCl. K 500  $\mu\text{l}$  vzorku bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  LiCl Precipitation Solution. Po řádném promíchání byla směs inkubována 30 min při -20  $^{\circ}\text{C}$ . Po ukončení inkubace byla směs centrifugována (16 000 g, 20 min) a supernatant byl opatrně odstraněn z mikrozkušky. Zachovaný pelet byl promyt ledovým 70% ethanolem, opět centrifugován (16 000 g, 20 min) a supernatant odstraněn. Pelet byl vysušen při laboratorní teplotě a rozpuštěn ve 20  $\mu\text{l}$  nuclease-free vody.

K přepsání mRNA byl využit protokol k syntéze cDNA. Do chlazené sterilní mikrozkušky bylo přidáno 5  $\mu\text{g}$  templátové RNA, 0,5  $\mu\text{g}$  primeru Oligo(dT) a voda s DEPC (diethyl pyrokarbonát) do finálního objemu 12,5  $\mu\text{l}$ . Za stálého chlazení byly do mikrozkušky napipetovány 4  $\mu\text{l}$  5X Reaction Buffer, 0,5  $\mu\text{l}$  Thermo Scientific<sup>TM</sup> RiboLock<sup>TM</sup> RNase Inhibitor, 2  $\mu\text{l}$  dNTP Mix a 1  $\mu\text{l}$  RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (celkový reakční objem odpovídal 20  $\mu\text{l}$ ). Směs byla opatrně promíchána, šetrně centrifugována a inkubována 60 min při 42  $^{\circ}\text{C}$ . Reakce byla ukončena zahřátím směsi na 70  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 min.

### 3.2.2.2 PCR amplifikace přepsané cDNA

Do mikrozkušek pro PCR bylo napipetováno 22,5  $\mu\text{l}$  AccuPrime<sup>TM</sup> PlxSuperMix, 1  $\mu\text{l}$  forward a reverse primeru (Tabulka 2) a 0,5  $\mu\text{l}$  templátové cDNA. Mikrozkušky byly mírně stočeny a vloženy do cycleru. PCR reakce proběhla v 35 cyklech. Amplifikovaná DNA byla podrobena agarosové elektroforéze.

Tabulka 1: Sekvence forward a reverse primeru použitých během amplifikace cDNA.

Primer	Sekvence
Forward	5'-TAATACGACTCACTATAGGG
Reverse	5'-CTAGTTATTGCTCAGCCGGT

### 3.2.2.3 Agarosová elektroforéza a purifikace z gelu

1% agarosový gel pro agarosovou elektroforézu byl připraven rozpuštěním 1 g agarosy v 100 ml 1x ředěného TAE pufru. Do komůrky pro agarosovou elektroforézu byla nalita rozpuštěná agarosa, dále byl přidán 0,07% ethydium bromid (cca 40 – 50  $\mu$ l) a vše bylo řádně promícháno. Se vsazeným hřebínkem se gel nechal tuhnout přibližně 30 minut. Do vzniklých jamek byly po ztuhnutí napipetovány produkty PCR (celý objem) smíchané s barvivem 6x OrangeLoading Dye a do jedné jamky 5  $\mu$ l markeru GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. Elektroforetická komůrka byla připojena ke zdroji napětí a elektroforéza byla spuštěna při napětí 100 V.

Po skončení elektroforézy byl gel opatrně vyjmut a přenesen na transluminátor. Zde byly vyřezány bandy amplifikovaného produktu o odpovídající velikosti. Bandy byly vloženy do mikroskopových káderek. K purifikaci z gelu byl využit kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. K vyřezaným bandám byl napipetován Membrane Binding Solution v poměru 100  $\mu$ l roztoku na 100 mg gelu. Obsah káderek byl zahříván na termobloku na 58 °C, dokud se všechn gel nerozpustil. Kolonka určená na purifikaci byla vložena do sběrné tuby, na filtr byl napipetován všechn rozpuštěný gel a vše bylo centrifugováno (16 000 g, 1 min). Kolonka byla promyta 700  $\mu$ l a 500  $\mu$ l Wash Solution a po každém nanesení roztoku centrifugována (16 000 g, 1 min a 5 min). Filtr byl nakonec přenesen do čisté mikroskopové kádery a zachycená DNA byla eluována 50  $\mu$ l nuclease-free vody.

### 3.2.2.4 Štěpení restrikčními enzymy a ligace

Při restrikčním štěpení DNA byla použita směs obsahující 0,1  $\mu$ g cDNA, 5  $\mu$ l CutSmart pufru, 1  $\mu$ l restrikčních enzymů *EcoRI* a *XhoI*. Směs byla inkubována min. 1 hod při 37 °C a nakonec inaktivována inkubací 20 min při 65 °C. DNA po štěpení byla smíchána s barvivem 6x OrangeLoading Dye, podrobena agarosové elektroforéze, vyříznutí z gelu a purifikaci.

K ligaci byla připravena směs obsahující 50 ng lineárního vektoru pCDFDuet, DNA insert v molárním poměru 3:1 proti vektoru, 2  $\mu$ l 10X T4 DNA Ligase Buffer, 0,5  $\mu$ l T4 DNA Ligase a nuclease-free vodu k doplnění do finální objemu 20  $\mu$ l. Připravená směs byla inkubována 1 hod při 22 °C. Inaktivace byla provedena zahřátím směsi na 65 °C po dobu 10 min.

### 3.2.2.5 Transformace buněk *E. coli*

K transformaci plasmidu obsahující klonovaný gen *HvALDH2D/E* byly použity komerční kompetentní buňky *E. coli* NEB 5-*a*. K 25  $\mu$ l buněk uložených 10 min na ledu bylo přidáno 5  $\mu$ l legačního produktu a směs byla ponechána chladit 30 min. Poté byla směs zahřáta na 30 s na 42 °C v termobloku a opět chlazená v ledu 5 min. Dále bylo přidáno 200  $\mu$ l SOC média a směs se nechala promíchávat na rotátoru 60 min při 37 °C. Nakonec byla směs křížovým roztěrem nanášena na Petriho misky s LB agarem a antibiotikem streptomycinem (koncentrace 50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>). Takto připravená směs se nechala inkubovat přes noc při 37 °C.

### 3.2.3 Expres proteinu

První den bylo do čtyř 50ml Erlenmayerových baněk nalito 20 ml LB média a 20  $\mu$ l antibiotika streptomycinu (o finální koncentraci 50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) a 5  $\mu$ l transformovaných kolonií *E. coli*. Připravená prekultura byla ponechána na třepačce přes noc v inkubátoru při 37 °C. Další den byly prekultury centrifugovány (5 min, 5 000 g, 20 °C). Vzniklý pelet byl suspendován v 15 ml připraveného LB média se streptomycinem (o finální koncentraci 50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) a přenesen do 500ml Erlenmayerových baněk se zbylými 200 ml LB média a 200  $\mu$ l streptomycinu. Kultura byla inkubována po dobu minimálně 1 hod na třepačce při 30 °C, dokud její optická densita při 600 nm nedosáhla hodnoty 0,6. Poté byla kultura ponechána 30 min mimo inkubátor, aby obsah vychladl, a následně bylo do kultury přidáno 200  $\mu$ l IPTG. Indukce probíhala přes noc na třepačce v inkubátoru při 20 °C.

### 3.2.4 Extrakce proteinů ALDH i NRH

Po noční inkubaci kultur s IPTG byl obsah Erlenmayerových baněk zcentrifugován ve čtyřech 50ml centrifugačních zkumavkách (7 min, 5 000 g, 4 °C). Po stočení veškerého obsahu byl pelet rozpuštěn v 15 ml 0,9% NaCl a opět centrifugován (7 min, 5000 g, 4 °C). Získané pelety byly následně rozpuštěny ve 3 ml extrakčního pufru (50mmol.l<sup>-1</sup>Tris-HCl o pH 7,5, 50  $\mu$ l inhibitoru proteas, 150  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> – u extrakce NRH bez Mg<sup>2+</sup>, zbytek doplnit vodou do objemu 3 ml). Směs byla napipetována do cell lyzeru a skrz vychlazenou lyzační celu byl obsah lyzován při 25 katm. Lyzovaný obsah byl odebrán zpět do centrifugační zkumavky, byl přidán B-Per o objemu 500  $\mu$ l, směs byla zvortexována a poté se nechala inkubovat 10 min při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno

10  $\mu$ l DNAsy a 10  $\mu$ l RNAsy (případně 10  $\mu$ l denaturasy), zkumavka s obsahem byla 5x převrácena a poté se směs nechala inkubovat 30 min při 37 °C v inkubátoru. Nakonec ke směsi byl přidán 1 ml 1M NaCl (finální koncentrace je 100 mmol.l<sup>-1</sup>) a 1 ml 50% glycerolu (finální koncentrace je 5 %) a lyzáty byly centrifugovány (12 000 g, 30 min, 4 °C).

### **3.2.5 Purifikace HvALDH2E a ZmNRH2B**

K purifikaci HvALDH2E i ZmNRH2B a ZmNRH3 byly využity kolony s imobilizovanými Co<sup>2+</sup> (HIS-Selected Cobalt gel, Sigma-Aldrich) určených k afinitní chromatografii. Na kolony, které byly aktivovány 3x promytím ekvilibračním pufrem (50mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 300mmol.l<sup>-1</sup> NaCl, 5% glycerol, 20mmol.l<sup>-1</sup> imidazol), byl nanesen supernatant získaný z extrakce a kolony se směsí byly inkubovány 1 hod při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byly kolony centrifugovány (300 g, 30 s, 4 °C), aby se uvolnily nezachycené částice (tzv. flow-through frakce). Kolony byly následně 3x promyty ekvilibračním pufrem a poté 2x inkubovány s elučním pufrem (50mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 300mmol.l<sup>-1</sup> NaCl, 5% glycerol, 250mmol.l<sup>-1</sup> imidazol) na rotátoru 30 min při 4 °C. Po centrifugování (300 g, 30 s, 4 °C) byly získané frakce s elučním pufrem zakoncentrovány centrifugační filtrací (Centricon, Millipore) na finální objem přibližně 2 ml, které byly následně promývány promývacím roztokem (50mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 7,5, 5% glycerol), dokud výsledná koncentrace imidazolu v roztoku nebyla nižší než 1 mmol.l<sup>-1</sup>. Přečištěný enzym byl nakonec zmražen a uschován pro další měření.

### **3.2.6 Kontrola čistoty proteinu pomocí SDS-PAGE**

Ke kontrole čistoty po purifikaci byl během exprese obou druhů proteinů odebrán 1 ml kultury před indukcí IPTG (PI), 2 hod po indukci (2PI) a po indukci pře noc (POI) – všechny vzorky se stejnou optickou při 600 nm densitou byly zcentrifugovány a pelety rozpuštěny v 20  $\mu$ l 8mmol.l<sup>-1</sup> močoviny. Během extrakce před centrifugací bylo odebráno 200  $\mu$ l směsi, která byla následně také zcentrifugována (10 000 g, 10 min, 4 °C). Supernatant (S) byl oddělen a uložen, pelet (P) byl rozpuštěn ve 20  $\mu$ l 8mmol.l<sup>-1</sup> močoviny. Poslední vzorky pro SDS-PAGE byly tzv. flow-through frakce (F) a přečištěný eluát (čistý enzym, E).



Pro SDS-PAGE elektroforézu bylo odebráno 15  $\mu$ l každého výše uvedeného vzorku a byl k nim přidán Laemmliho vzorkovací pufr v poměru 1:1. Vzorky byly dále inkubovány při 100 °C 10 min a stočeny na mikrocentrifuze.

Do připravené elektroforetické aparatury byl nalit 12% dělicí (tzv. running) gel, který byl převrstven malým množstvím n-butanolu. Po ztuhnutí gelu byl n-butanol odstraněn vylitím a opláchnutím gelu destilovanou vodou. Dále byl po vrch aparatury nalit 4% zaostřovací (tzv. stacking) gel, do kterého byl vsazen hřebínek. Po ztuhnutí obou gelů bylo do vzniklých jamek napipetováno 10  $\mu$ l povahařeného vzorku a do jedné jamky 5  $\mu$ l markeru. Gely se vzorky byly v elektroforetické komůrce připojeny ke zdroji elektrického napětí. Dokud obarvené vzorky neopustili stacking gel, elektroforéza běžela při napětí 100 V. Po přechodu vzorků do druhého gelu bylo napětí navýšeno na 150 V. Po ukončení elektroforézy byly gely vyjmuty a opláchnuty destilovanou vodou. Přes noc byly gely barveny barvivem BioSafe Comassie-Blue (Bio-Rad) a po obarvení byly ponořeny do odbarvovacího roztoku (40% metanol, 7% kyselina octová).

### **3.2.7 Stanovení koncentrace proteinu**

Pro měření kinetických parametrů enzymu je potřeba znát jeho přesnou koncentraci. Pro jistotu byla jeho koncentrace zjišťována dvěma způsoby. První způsob bylo zjištění koncentrace za využití přístroje Nanodropu, kde se množství zjišťovalo spektrofotometricky proti blanku (promývací roztok) při 280 nm.

Druhý způsob využíval BCA metodu. Byl připraven roztok ze zásobních roztoků A a B BCA Protein Assay kitu v poměru 50:1. Do tří mikrozkušavek se 2 ml tohoto roztoku bylo napipetováno 50  $\mu$ l, 25  $\mu$ l a 10  $\mu$ l vypurifikovaného proteinu, ve čtvrtá mikrozkušavka sloužila jako blank. Všechny vzorky byly 30 min inkubovány při 37 °C. Poté byla spektrofotometricky změřena jejich absorbance při 562 nm a koncentrace byla dopočítána pomocí kalibrační křivky.

### **3.2.8 Měření s HvALDH2E**

#### **3.2.8.1 Zjištění aktivity proteinu HvALDH2E**

Aktivita enzymu HvALDH2E byla spektrofotometricky měřena při 340 nm, kdy docházelo ke sledování míry redukce  $\text{NAD}^+$  za vzniku NADH a  $\text{H}^+$  (tzv. Wartburgův optický test).

Aktivita proteinu byla dopočítána podle vztahu:

$$a = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V}{\epsilon \times l}$$

$\Delta A$  odpovídá změně absorbance,  $\Delta t$  odpovídá době reakce (v sekundách),  $V$  odpovídá objemu reakční směsi (v litrech),  $\epsilon$  udává molární extinkční koeficient pro NADH ( $6\,220\text{ mol}^{-1}\text{ l cm}^{-1}$ ),  $l$  uvádí šířku použité kyvety (v centimetrech),  $a$  odpovídá aktivitě (v kataltech).

### 3.2.8.2 Stanovení pH optima

Stanovení pH optima enzymu HvALDH2E bylo prováděno spektrofotometricky při 340 nm. K měření pH optima byl použit Britton-Robinsonův pufr o pH 5,72 – 9,12. Reakční směs o objemu 2 ml obsahovala 1,55 ml pufru, 5  $\mu\text{l}$  enzymu, 300  $\mu\text{mol l}^{-1}$  NAD<sup>+</sup>, 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  substrátu nonanal a zbytek do 2 ml byl doplněn destilovanou vodou.

### 3.2.8.3 Stanovení substrátové specificity

Substráty pro zjištění substrátové specificity byly připraveny dvěma způsoby. Některé aldehydy byly připraveny povařením s 0,2 mol.l<sup>-1</sup> HCl, ostatní byly smíchány s 50% ethanolem

Substrátová specificita byla měřena spektrofotometricky při 340 nm. Reakční směs obsahovala 1,55 ml 150 mmol l<sup>-1</sup> HEPES pufru, 5  $\mu\text{l}$  enzymu, 350  $\mu\text{mol l}^{-1}$  NAD<sup>+</sup>, 250  $\mu\text{mol l}^{-1}$  substrát a destilovanou vodu k doplnění na výsledný objem 2 ml.

### 3.2.8.4 Měření kinetických parametrů HvALDH2E

Pro zjištění kinetických parametrů jednotlivých enzymů byly spektrofotometricky stanoveny saturační křivky NAD<sup>+</sup> a substrátu při 340 nm.

Nejprve však byly určeny vhodné podmínky pro stanovení všech saturačních křivek. Reakční směs pro toto úvodní stanovení obsahovala 1,55 ml 150 mmol l<sup>-1</sup> HEPES pufru, 5  $\mu\text{l}$  enzymu, NAD<sup>+</sup> o koncentracích 0 – 800  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , substrát v koncentracích 0 – 250  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a destilovanou vodu k doplnění do 2 ml.

Reakční směs pro stanovení saturační křivky NAD<sup>+</sup><sub>substrát</sub> obsahovala 1,55 ml 150 mmol l<sup>-1</sup> HEPES pufru, 5  $\mu\text{l}$  enzymu, 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  substrátu (nonanal, kapronaldehyd, ...), nebo 250  $\mu\text{mol l}^{-1}$  substrát isobutyraldehyd, NAD<sup>+</sup> o koncentraci 0 – 750  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a destilovanou vodu k doplnění do objemu 2 ml.

Reakční směs pro stanovení saturační křivky substrátu obsahovala 1,55 ml 150 mmol l<sup>-1</sup> HEPES pufru, 5 μl enzymu, 350 μmol l<sup>-1</sup> NAD<sup>+</sup>, substrát o koncentraci 0 – 20 μmol l<sup>-1</sup> (v případě isobutylaldehydu 0 – 1000 μmol l<sup>-1</sup>).

Ze získaných saturačních křivek byly dopočítány kinetické parametry enzymu HvALDH2E: konstanta Michaelise-Mentenové (K<sub>m</sub>), limitní rychlost (V<sub>lim</sub>), relativní poměr V<sub>lim</sub>/K<sub>m</sub>, u saturačních křivek substrátu i inhibiční konstanta (K<sub>i</sub>). Ke grafickému znázornění saturačních křivek byl použit program GraphPad Prism 8. Zde byly využity rovnice nelineární regrese podle Michaelise a Mentenové a substrátové inhibice ke stanovení konstant.

### **3.2.9 Měření s ZmNRH2b a ZmNRH3**

#### **3.2.9.1 Ověření aktivity proteinů**

Aktivita enzymů ZmNRH2B a ZmNRH3 byla stanovena spektrofotometricky. V závislosti na substrátu byla měřena při dvou vlnových délkách: při 280 nm za použití substrátu uridinu a při 275 nm za použití 5-methyluridinu. Aktivita obou enzymů byla dopočítána podle stejného vzorce uvedeného v kapitole 3.2.7.1 s využitím extinkčních koeficientů (Kopečná *et al.*, 2013)  $\Delta\epsilon = -1800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a  $-2960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### **3.2.9.2 Porovnání aktivity proteinů při použití dvou substrátů**

Při měření s enzymy ZmNRH2B a ZmNRH3 byly běžně používány substráty uridin a 5-methyluridin. Proto byla porovnána aktivita obou enzymů s těmito substráty. Reakční směs obsahovala 500 μl 400 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufru s obsahem 400 mmol.l<sup>-1</sup> KCl a 1 mmol.l<sup>-1</sup> DTT, 200 μmol l<sup>-1</sup> substrátu a vodu k doplnění do konečného objemu 2 ml. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm (uridin) a 275 nm (5-methyluridin).

#### **3.2.9.3 Měření kinetických parametrů enzymů**

K určení kinetických parametrů ZmNRH2B a ZmNRH3 se substráty uridinem a 5-methyluridinem byly stanoveny saturační křivky. Pro každou saturační křivku reakční směs obsahovala 500 μl 400 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl s obsahem 400 mmol.l<sup>-1</sup> KCl a 1 mmol.l<sup>-1</sup> DTT, substrát v rozmezí koncentrací 0 – 400 μmol l<sup>-1</sup>. Množství enzymu se lišilo v závislosti na typu enzymu a substrátu (ZmNRH2B bylo použito 5 μl 20x ředěného,

ZmNRH3 bylo použito 20  $\mu\text{l}$  (při vyšších koncentracích substrátu) a 40  $\mu\text{l}$  (při nižších koncentracích substrátu).

Ze získaných saturačních křivek (v programu GraphPad Prism 8) byly pro enzymy ZmNRH2B a ZmNRH3 dopočítány kinetické parametry  $K_m$ ,  $V_{\text{lim}}$  a relativní poměr  $V_{\text{lim}}/K_m$ . Tyto hodnoty byly získány z nelineární regrese podle Michaelise a Mentenové. Pro kontrolu k těmto hodnotám byly získány také hodnoty z dvojité reciprokého vynesení podle Lineweavera a Burka.

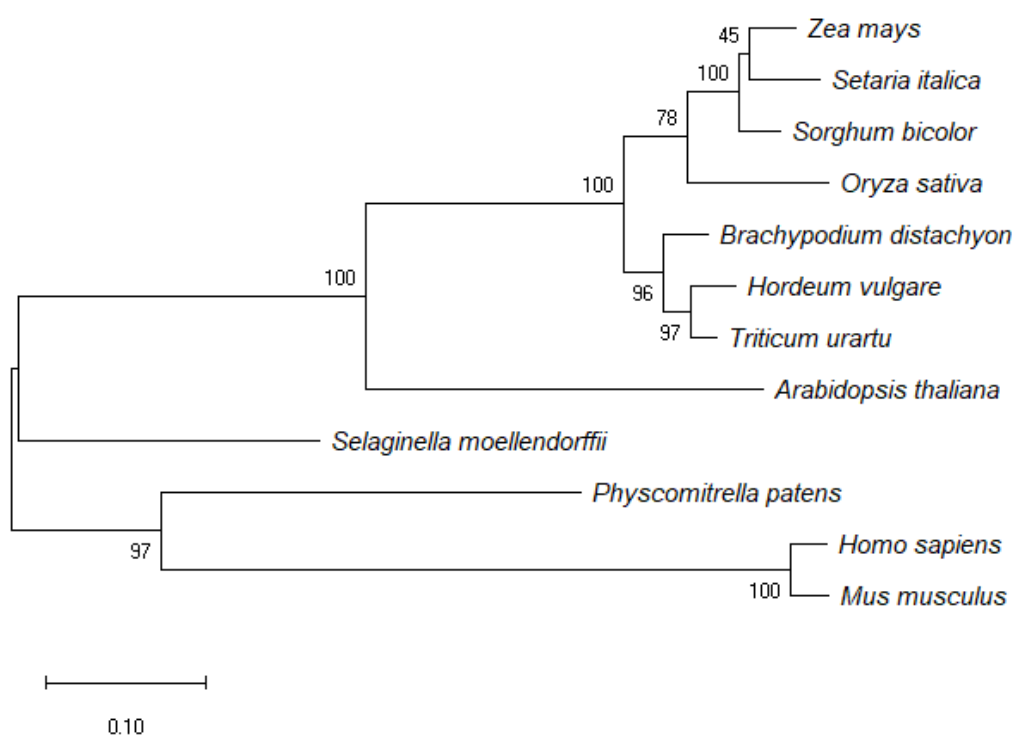
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Aldehyddehydrogenasy 2

#### 4.1.1 Přehled genů ALDH v *Hordeum vulgare*

V rámci praktické části diplomové práce jsou zkoumány dva druhy enzymů – ALDH2 a NRH. Nejprve byla provedena analýza genomu *Hordeum vulgare* za využití online webových databází NCBI GenBank, Phytozome a UniProt. Výsledkem tohoto zkoumání je nalezení 15 genů ALDH na 7 chromosomech. Získané geny jsou zaznačeny v Tabulce 2, včetně jejich velikostí, umístění na chromozomech, počtu exonů i ID v jednotlivých webových databázích.

Dále v rámci fylogenetické analýzy byl vytvořen fylogenetický strom v programu MEGA-X s využitím Bootstrapu pro porovnání příbuznosti ječmenného HvALDH2E s dalšími rostlinami a jinými organismy (viz Obr. 8).



Obr. 8 Fylogenetický strom pro cytosolární enzym z rodiny ALDH2 s ohodnocením jednotlivých větví pomocí Bootstrap (vytvořený v programu MEGA-X). Sekvence ječmenného ALDH2E je porovnána s některými anotovanými sekvencemi z Brocker *et al.*, 2013. Další sekvence byly zvoleny pro podobnost organismu. Měřítko 0,1 odpovídá míře odlišnosti sekvence o 10 %.

Tabulka 2 Geny ALDH přítomné v ječmeni (*Hordeum vulgare*). Genom ječmene byl prohledán webovými databázemi Phytozome, NCBI Genbank a UniProt. V tabulce jsou zaznačeny ID proteinů v jednotlivých databázích, jejich velikosti, lokalizace genů v rámci chromozomů a zjištěné počty exonů.

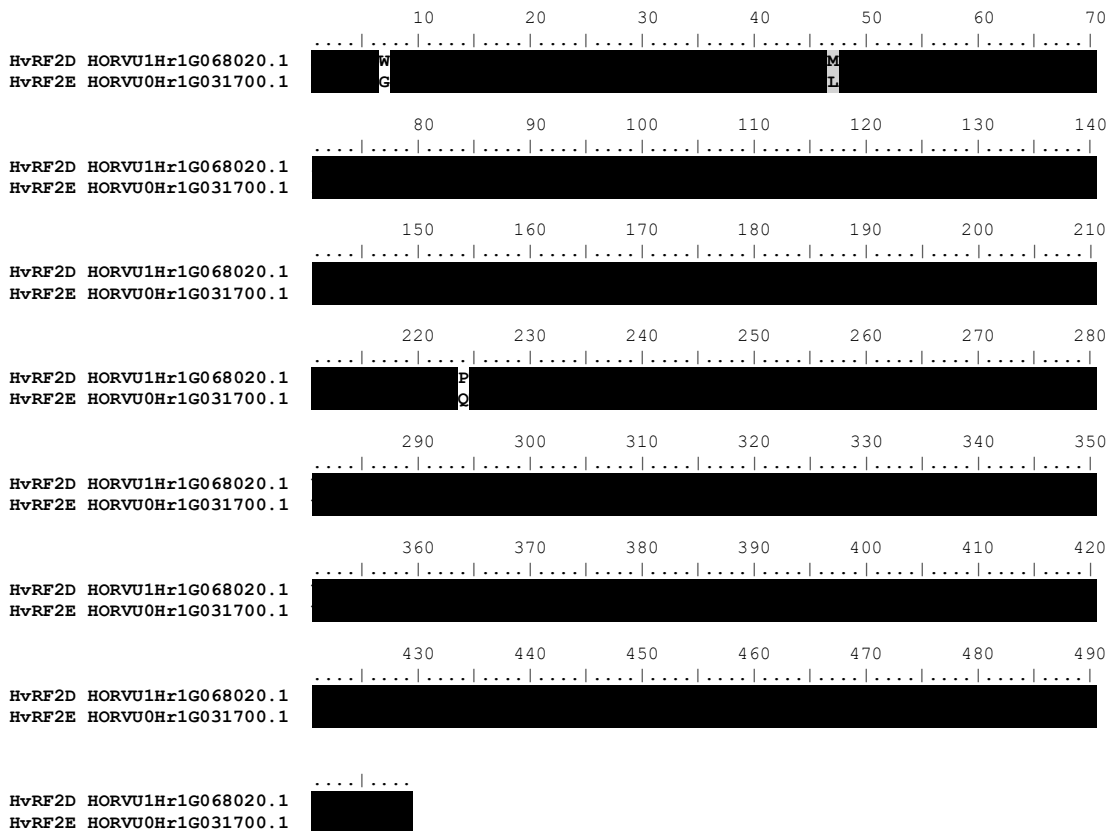
Rodina	Gen	ID proteinu - NCBI	ID proteinu - Phytozome	ID proteinu - UniProt	Chromozom	Exony	Počet aminokyselin
Rodina 2	<i>ALDH2B2</i>	KAE8805142.1	HORVU7Hr1G042880.2	F2CVN4-1	7	11	549
	<i>ALDH2C1</i>	BAJ87654.1	HORVU3Hr1G092680.2	A0A287MAQ5-1	3	7	500
	<i>ALDH2C4</i>	KAE8810808.1	HORVU1Hr1G068020.1	A0A287EAH0-1	1	9	499
Rodina 3	<i>ALDH3F1</i>	KAE8794672.1	HORVU2Hr1G092530.1	A0A287IYJ1-1	2	7	490
	<i>ALDH3H1</i>	KAE8813888.1	HORVU4Hr1G017450.1	F2E3L5-1	4	10	489
Rodina 5	<i>ALDH5F1</i>	KAE8768437.1	HORVU6Hr1G031480.15	A0A287TSU5-1	6	19	526
Rodina 6	<i>ALDH6B2</i>	KAE8807750.1	HORVU2Hr1G107550.1	A0A287JCX0-1	2	19	580
Rodina 7	<i>ALDH7B</i>	KAE8784643.1	HORVU5Hr1G062090.1	A0A287RGY4-1	5	14	572
Rodina 10	<i>ALDH10A8</i>	KAE8801815.1	HORVU6Hr1G087460.1	A0A287V2G5-1	6	15	503
	<i>ALDH10A9</i>	KAE8808834.1	HORVU2Hr1G080970.1	A0A287ILZ1-1	2	15	506
Rodina 11	<i>ALDH11A3</i>	KAE8788262.1	HORVU2Hr1G036110.11	M0Z5J0-1	2	9	496
Rodina 12	<i>ALDH12A1</i>	KAE8773815.1	HORVU1Hr1G080320.1	A0A287GFP0-1	1	15	551
Rodina 18	<i>ALDH18A1</i>	KAE8778594.1	HORVU1Hr1G072780.1	A0A287G756-1	1	19	716
	<i>ALDH18A2</i>	KAE8797306.1	HORVU3Hr1G085760.12	A0A287M228-1	3	20	682
Rodina 22	<i>ALDH22A1</i>	KAE8788488.1	HORVU2Hr1G016040.1	A0A287H6A1-1	2	14	594

#### 4.1.2 Klonování a porovnání sekvencí ALDH2D a ALDH2E

Hlavní část je tedy zaměřena na klonování a expresi *ALDH2* z ječmene (*Hordeum vulgare*). Z důvodu úspory času probíhalo klonování pro několik rodin najednou (viz Obr. 9). Nakonec se podařilo naklonovat *ALDH2D*, který byl klonován do vektoru Zero Blunt a následně bude vložen expresního vektoru pCDFDuet pro heterologní expresi v *E. coli*. Avšak vzhledem k pandemii COVID-19 byl nasyntetizován duplicitní gen *ALDH2E*, který na aminokyselinové úrovni představuje 3 záměny ze 499 aminokyselin (Obr. 10), proto byl pro následující kinetické měření použit enzym HvALDH2E.



Obr. 9 Elektroferogram k posouzení úspěšnosti klonování různých ALDH rodin ječmene za využití Zero Blunt a M13 primerů.

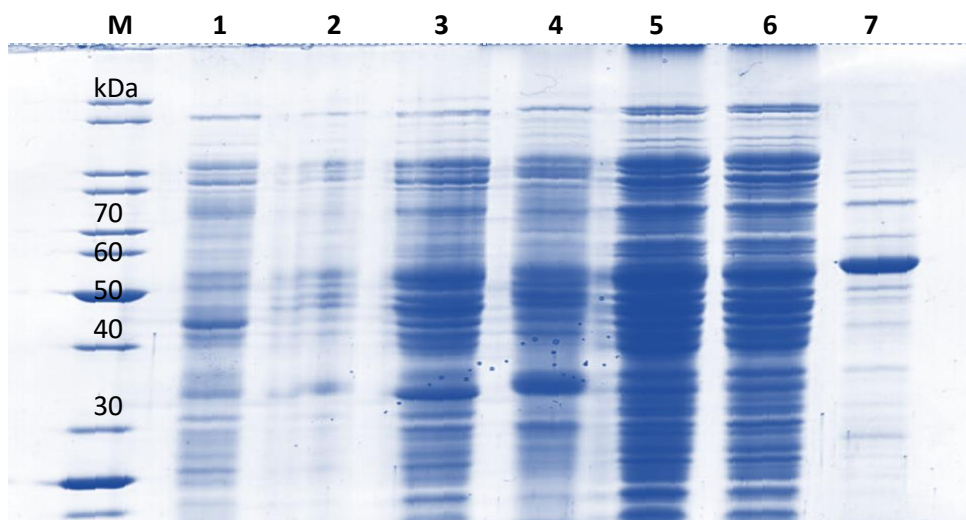


Obr. 10 Porovnání aminokyselinové sekvence HvALDH2D (HvRF2D) a HvALDH2E (HvRF2E). Záměny u HvALDH2E jsou pozorovány v pozicích 7 (záměna W za G), 47 (M za L) a 224 (P za Q).

### 4.1.3 Exprese a purifikace HvALDH2E

Po dokončení klonování probíhala exprese a purifikace enzymu HvALDH2E podle daného protokolu. K ověření exprese a purifikace proteinu byla použita SDS-PAGE elektroforéza, získaný elektroferogram je zobrazen na Obr. 11. Požadovaný enzym má velikost přibližně 50 kDa. Po indukci je již viditelný enzym. V menším množství se HvALDH2E vyskytuje i v inkluzních tělískách (nerozpustné fázi). Po přečištění za využití kolonek s imobilizovanými  $\text{Co}^{2+}$  ionty během afinitní chromatografie zbyl v eluátu jeden významný band odpovídající požadovanému proteinu. Další zadržené proteiny nijak neinterferovaly aktivitě enzymu. Ostatní látky byly vymyty.





Obr. 11 Elektroferogram z SDS-PAGE elektroforézy jako kontrola extrakce a purifikace enzymu HvALDH2E. Pořadí vzorků: M – marker Unstained Protein Standard, Broad Range (10 – 200 kDa; NEB), 1 – vzorek před indukcí, 2 – 2 hodiny po indukci, 3 – po indukci přes noc, 4 – nerozpustná fáze (inkluzie), 5 – rozpustná fáze, 6 – flow-through frakce, 7 – čistý enzym.

#### 4.1.4 Stanovení pH optima a substrátové specificity

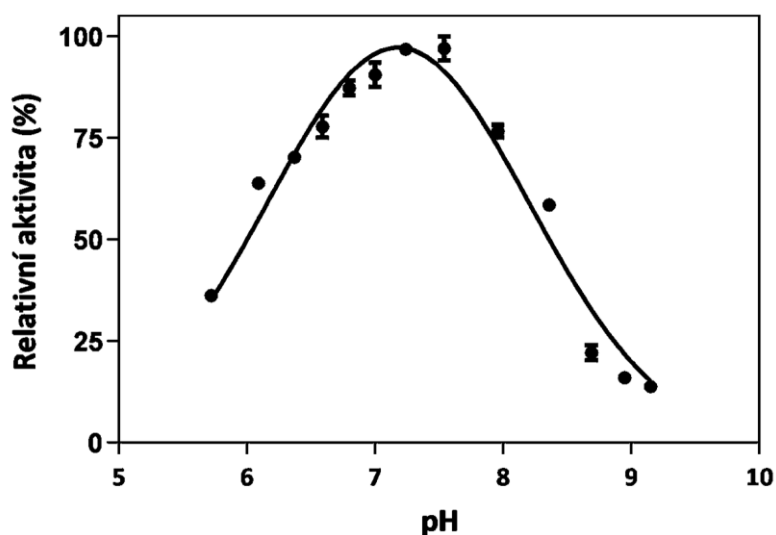
Pro správnou aktivitu enzymu HvALDH2E bylo potřeba zjistit pH optimum tohoto proteinu, které bylo proměřeno v Britton-Robinsonově pufru v hodnotách pH 5,72 – 9,12 v přítomnosti  $300 \mu\text{mol l}^{-1}$   $\text{NAD}^+$  a za použití nonanalů ve finální koncentraci  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Získané aktivity jsou zobrazeny na Obr. 12. Dle měření vyšlo najevo, že pro HvALDH2E je optimální pH o hodnotě 7,5.

Pro změření substrátové specificity byly použity substráty o koncentraci  $250 \mu\text{mol l}^{-1}$  a následně byly jednotlivé aktivity vztaženy relativně vůči nonanal. Již dříve bylo zjištěno, že se jedná o nejvhodnější substrát pro enzym mechu *Physcomitrella patens* PpALDH2A. Na základě této specificity (viz Obr. 13) byly vybrány aldehydy, pro něž byla stanovena saturační křivka a určeny hodnoty  $K_m$ ,  $V_{lim}$ , a  $V_{lim}/K_m$ . Jedná se o substráty nonanal (vybrán na základě předchozích zjištění), hexanal, butyraldehyd, isobutyraldehyd, 3-methyl-2-butenal a *trans*-2-hexenal

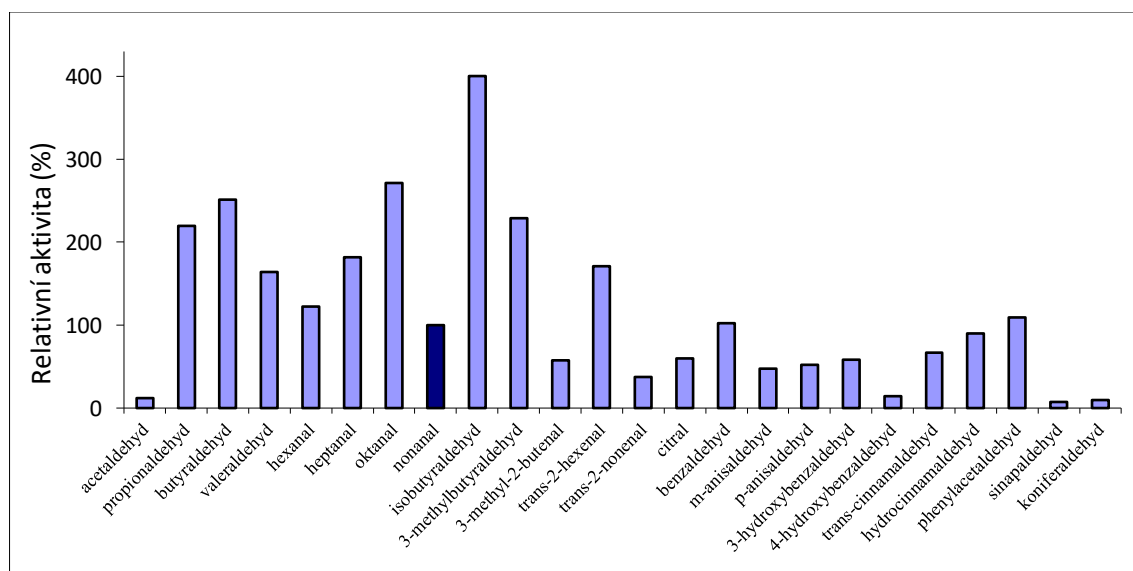
#### 4.1.5 Kinetické vlastnosti HvALDH2E

Po vybrání vhodných aldehydů pro změření kinetických parametrů proběhlo nejprve předběžné zkoumání a určení optimálních podmínek pro nonanal, hexanal a isobutyraldehyd (nejvhodnější koncentrace  $\text{NAD}^+$  a substrátu), aby bylo možné dále správně stanovit saturační křivky pro  $\text{NAD}^+$  s jednotlivými substráty (Obr. 14). Během

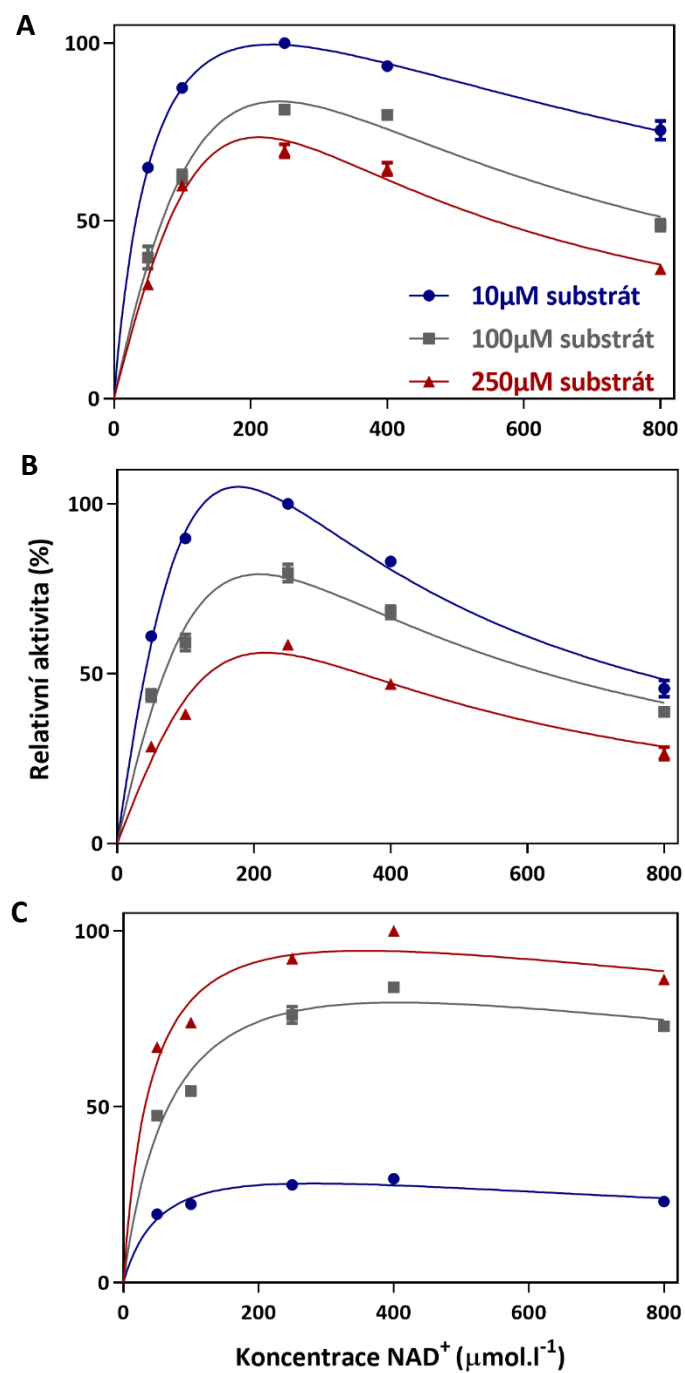
tohoto předběžného měření bylo prokázáno, že nejvyšší aktivita enzymu je při použití  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$  nonanal a hexanal, při vyšších koncentracích dochází k inhibici substrátem. Naopak u isobutyraldehydu bylo zjištěno, že nejvyšší aktivita enzymu je při použití koncentrace substrátu  $250 \mu\text{mol l}^{-1}$  a při vyšších koncentracích dochází k mírnému poklesu aktivity.



Obr. 12 Měření pH optima enzymu HvALDH2E při užití různých pH hodnot pufru během měření pro zjištění optimální hodnoty. Měřeno při  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  koncentraci aldehydu nonanal a koncentraci  $300 \mu\text{mol.l}^{-1}$   $\text{NAD}^+$  v Britton-Robinsonově pufru, pH 5,72 – 9,12.



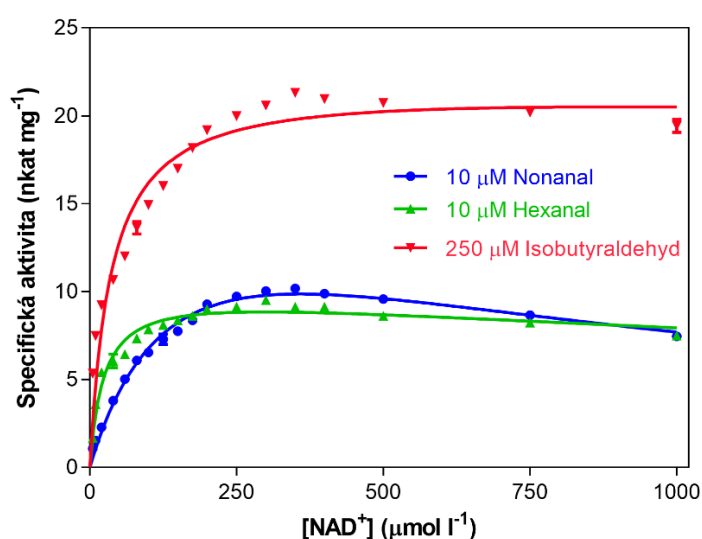
Obr. 13 Substrátová specifita HvALDH2E vůči alifatickým a aromatickým aldehydům o koncentraci  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Hodnoty zobrazují relativní aktivitu daného substrátu vztahenou k aktivitě nonanal. Měřeno při  $350 \mu\text{mol l}^{-1}$   $\text{NAD}^+$  v HEPES pufru, pH 7,5.



Obr. 14 Optimální podmínky (koncentrace NAD<sup>+</sup> a substrátu) nejvyšší aktivity enzymu HvALDH2E s nonanalem (A), hexanalem (B) a isobutyraldehydem (C). Použité tři koncentrace substrátu: 10 μmol l<sup>-1</sup> (modrá), 100 μmol l<sup>-1</sup> (šedá) a 250 μmol l<sup>-1</sup> (červená). Měřeno v HEPES pufru, pH 7,5.

Dále byly proměřeny saturační křivky pro  $\text{NAD}^+$ , které jsou zobrazeny na Obr. 15. Pro jejich stanovení byla použita koncentrace substrátu  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro nonanal a hexanal a  $250 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro isobutyraldehyd (koncentrace substrátu byla vybrána na základě měření optimálních podmínek). Dle těchto saturačních křivek pro  $\text{NAD}^+$  byla zjištěna jeho optimální koncentrace, která odpovídá hodnotě  $350 \mu\text{mol l}^{-1}$ , a také hodnoty  $K_m$ ,  $V_{lim}$  a  $K_i$ , které jsou zobrazeny v Tabulce 3.

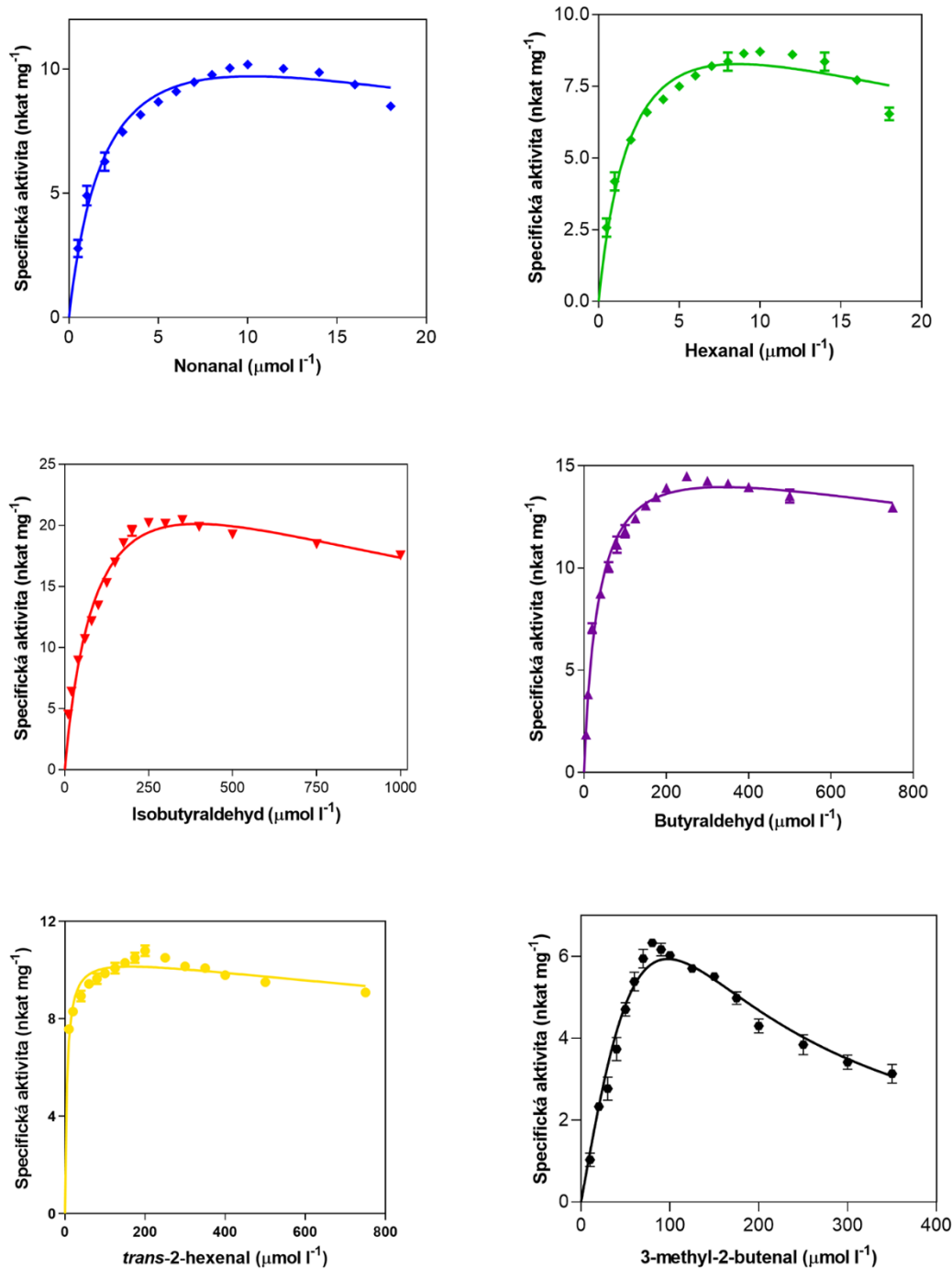
Tato koncentrace  $\text{NAD}^+$  ( $350 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) byla použita pro následovné stanovení saturačních křivek substrátu (viz Obr. 16), z nichž byly určeny hodnoty  $K_m$ ,  $V_{lim}$ ,  $V_{lim}/K_m$  pro jednotlivé substráty nonanal, hexanal, isobutyraldehyd, butyraldehyd, *trans*-2-hexenal a 3-methyl-2-butenal (viz Tabulka 4).



Obr. 15 Saturační křivky pro  $\text{NAD}^+$  při oxidaci substrátů nonanal (modrá), hexanal (zelená) a isobutyraldehydu (červená) za katalýzy enzymem HvALDH2E a za použití kofaktoru  $\text{NAD}^+$  o koncentracích 5 - 1000  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Měřeno v HEPES pufru, pH 7,5. Křivky získány z nelineární regrese podle rovnice substrátové inhibice v programu GraphPad.

Tabulka 3 Získané hodnoty  $V_{lim}$ ,  $K_m$ ,  $K_i$  z nelineární regrese podle rovnice substrátové inhibice ze saturačních křivek pro enzym HvALDH2E katalyzující oxidaci substrátu nonanal (C9), hexanal (C6) a isobutyraldehydu (iC4) za použití koncentrací  $\text{NAD}^+$  jako kofaktoru v rozmezí od 5 do 1000  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Hodnoty získány z programu GraphPad.

	$\text{NAD}^+_{(C9)}$	$\text{NAD}^+_{(C6)}$	$\text{NAD}^+_{(iC4)}$
$K_m$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$172,5 \pm 18$	$24,1 \pm 3$	$50,3 \pm 9$
$V_{lim}$ ( $\text{nmol mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$19,36 \pm 1$	$10,26 \pm 0,3$	$24,6 \pm 2$
$K_i$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$744 \pm 103$	$3706 \pm 941$	$15438 \pm 23590$



Obr. 16 Saturační křivky oxidace substrátů nonanal (modrá), hexanal (zelená), isobutyraldehydu (červená), butyraldehydu (fialová), *trans*-2-hexenal (žlutá) a 3-methyl-2-butenal (černá) za katalýzy enzymem HvALDH2E a za použití kofaktoru NAD<sup>+</sup> o koncentraci 350 μmol l<sup>-1</sup>. Měřeno v HEPES pufru, pH 7,5. Křivky získány z nelineární regrese podle rovnice substrátové inhibice v programu GraphPad Prism 8.

Tabulka 4 Hodnoty  $V_{lim}$ ,  $K_m$ ,  $K_i$  a relativní  $V_{lim}/K_m$  z nelineární regrese podle rovnice substrátové inhibice ze saturačních křivek pro enzym HvALDH2E katalyzující oxidaci substrátu nonanal (C9), hexanal (C6), isobutyraldehydu (iC4), butyraldehydu (C4), *trans*-2-hexenal (tC6) a 3-methyl-2-butenalu. Hodnoty byly získány z programu GraphPad Prism 8.

	<b>Nonanal</b>	<b>Hexanal</b>	<b>Isobutyraldehyd</b>
$K_m$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$2,19 \pm 0,1$	$2,34 \pm 0,4$	$102,1 \pm 12$
$V_{lim}$ ( $\text{nmol mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$13,87 \pm 1$	$12,75 \pm 1,1$	$30,57 \pm 1,7$
$K_i$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$47,77 \pm 13$	$31,92 \pm 9$	$1517 \pm 282$
Relativní $V_{lim}/K_m$	1	0,86	0,05
	<b>Butyraldehyd</b>	<b><i>Trans</i>-2-hexenal</b>	<b>3-methyl-2-butenal</b>
$K_m$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$35,7 \pm 2,7$	$5,24 \pm 0,7$	$493181 \pm 371766872$
$V_{lim}$ ( $\text{nmol mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$16,91 \pm 0,4$	$10,79 \pm 0,2$	$59964 \pm 45197728$
$K_i$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$3199 \pm 665$	$5068 \pm 1352$	$0,019 \pm 14,59$
Relativní $V_{lim}/K_m$	0,07	0,33	0,02

Již dříve bylo prokázáno, že nonanal je nejvhodnějším substrátem pro ALDH2 z *Physcomitrella patens*. Na základě naměřených hodnot je patrné, že je nejvhodnějším substrátem i pro HvALDH2E. Sice hodnoty  $V_{lim}$  ( $13,89 \pm 1 \text{ nmol mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) tohoto substrátu nejsou nejvyšší, ovšem relativní poměr  $V_{lim}/K_m$  ano. Proto jsou poměry dalších proměřených aldehydů vztaženy k nonanalu ( $V_{lim}/K_m = 1$ ). Dalším vhodným substrátem pro tento enzym se jeví hexanal s poměrně vysokou hodnotou relativního poměru (0,86) a podobnými hodnotami  $V_{lim}$  ( $12,75 \pm 1,1 \text{ nmol mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Ovšem *trans*-2-hexenal, strukturně podobný hexanalu, vykazuje třetinovou hodnotu  $V_{lim}/K_m$  oproti nonanalu (0,33).  $K_m$  *trans*-2-hexenalu je přibližně dvakrát větší než hodnota hexanal (5,24  $\pm$  0,7  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ), na rozdíl od  $V_{lim}$ , které je podobné ( $10,79 \pm 0,2 \text{ nmol mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ ).

I přesto, že isobutyraldehyd má ze všech dosud proměřených aldehydů nejvyšší hodnoty  $K_m$  a  $V_{lim}$  ( $102,1 \pm 12 \mu\text{mol l}^{-1}$  a  $30,57 \pm 1,7 \text{ nmol mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), relativní  $V_{lim}/K_m$  je velmi nízké (hodnota 0,05). Podobně je na tom butyraldehyd s naměřenými hodnotami  $K_m$  a  $V_{lim}$  ( $35,7 \pm 2,7 \mu\text{mol l}^{-1}$  a  $16,91 \pm 0,4 \text{ nmol mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) a  $V_{lim}/K_m$  (0,07). To znamená, že isobutyraldehyd a butyraldehyd jsou špatnými substráty pro HvALDH2E.

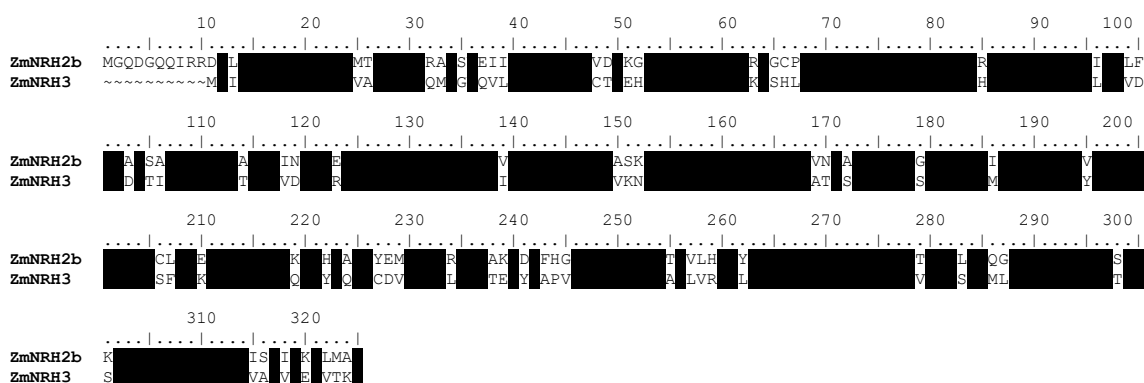
## 4.2 Nukleosid *N*-ribohydrolasy

### 4.2.1 Porovnání sekvencí NRH2b a NRH3

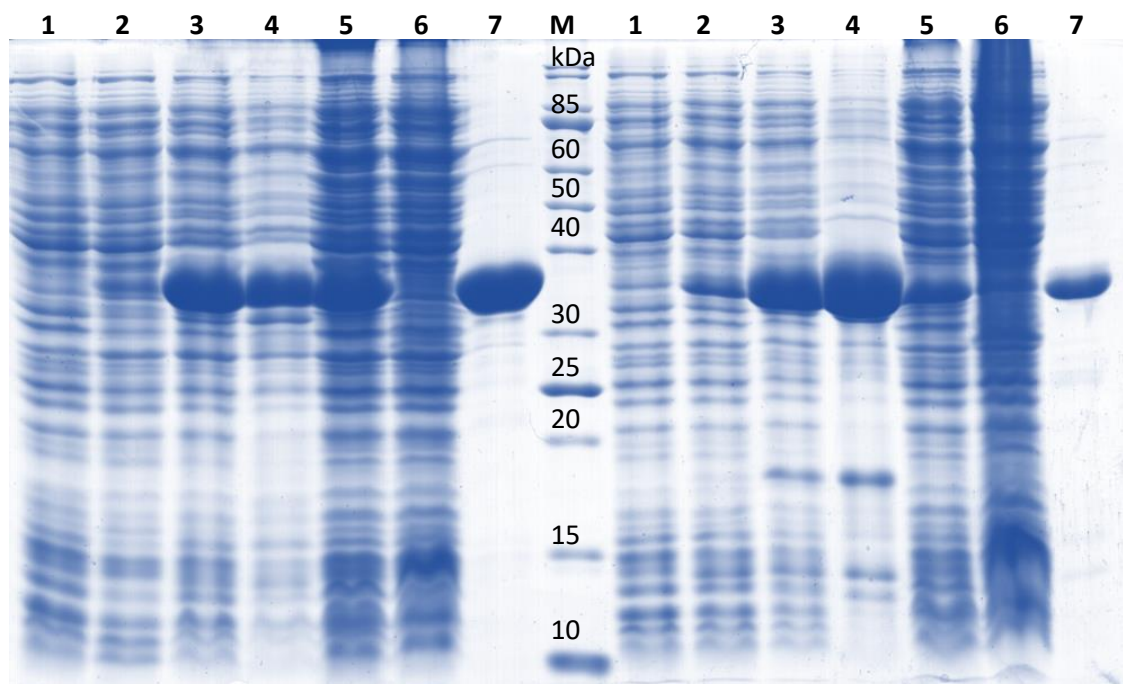
V programu BioEdit byly porovnány sekvence dvou zkoumaných kukuřičných enzymů – ZmNRH2b a ZmNRH3. Jejich sekvence je zobrazena na Obr. 17. Sekvence se mezi sebou liší v 74 aminokyselinách. ZmNRH2b navíc na 5'-konci obsahuje o 10 AMK více.

### 4.2.2 Kontrola exprese a purifikace ZmNRH2b a ZmNRH3

Enzymy ZmNRH2b a ZmNRH3 byly purifikovány dle zavedeného protokolu pro extrakci a purifikaci. Exprese a purifikace zkoumaných enzymů byla ověřena SDS-PAGE elektroforézou. Získaný elektroferogram je zobrazen na Obr. 18. Oba enzymy NRH mají molekulovou hmotnost přibližně 35 kDa. Již 2 hodiny po indukci je možné vidět požadované enzymy. Také je patrné, že NRH jsou součástí inkluzních tělísek i rozpustné fáze.



Obr. 17 Porovnání aminokyselinové sekvence ZmNRH2b a ZmNRH3. (Sekvence byly staženy z GenBank a porovnány v programu BioEdit.)



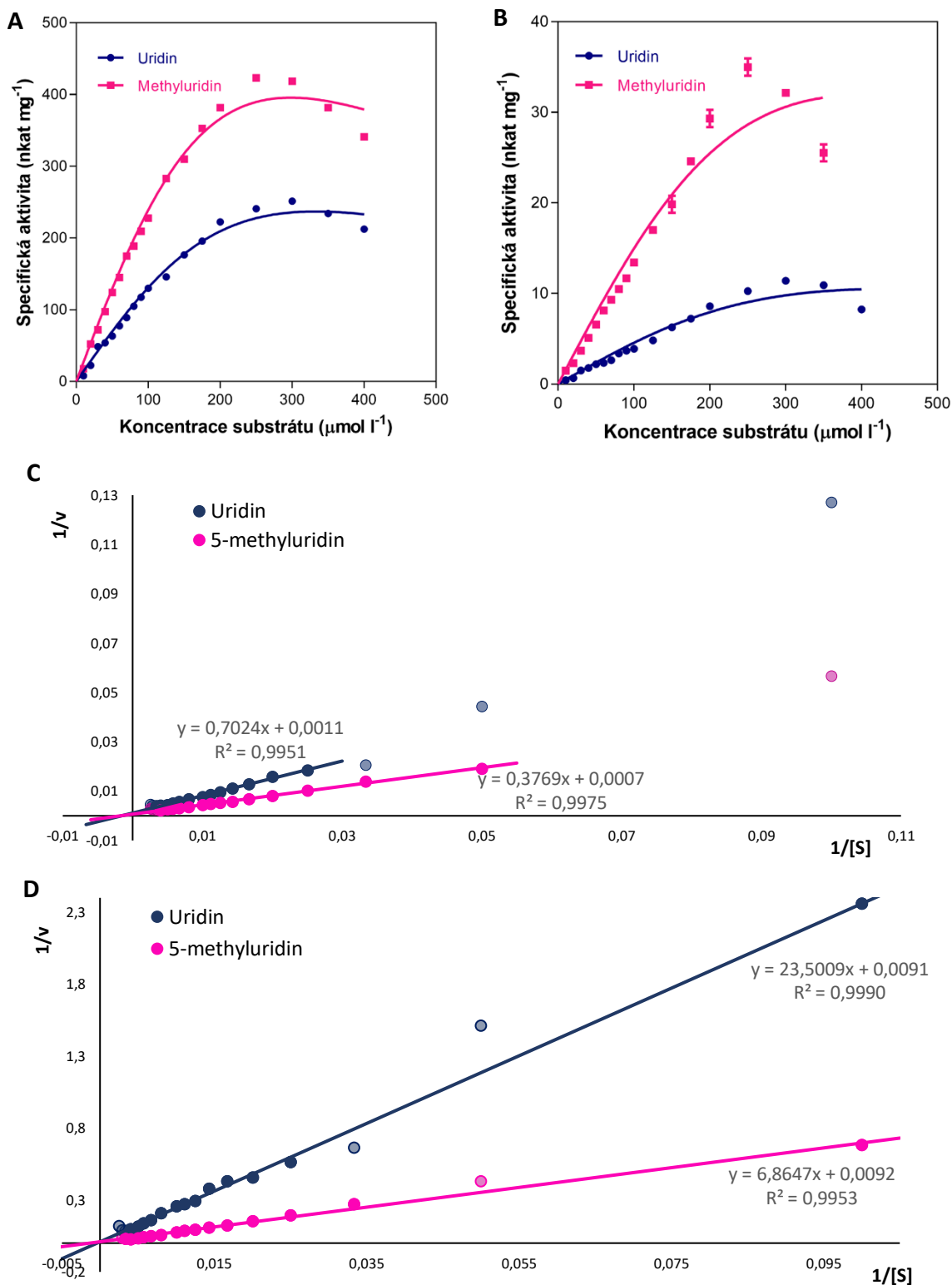
Obr. 18 Elektroferogram z extrakce a purifikace enzymů ZmNRH. Pořadí vzorků: ZmNRH2B (pravá část) a ZmNRH3 (levá část); M – marker Unstained Protein Standard, Broad Range (10-200 kDa; NEB), 1 - vzorek před indukcí, 2 - 2 hodiny po indukcí, 3 - po indukcí přes noc, 4 - nerozpustná fáze (inkluzie), 5 - rozpustná fáze, 6 – flow-trought frakce, 7 - čistý enzym.

Po přečištění pomocí afinitní chromatografie za využití kolonek s imobilizovanými  $\text{Co}^{2+}$  ionty zbyl v eluátu jediný band odpovídající požadovanému proteinu. Ostatní látky byly vymyty.

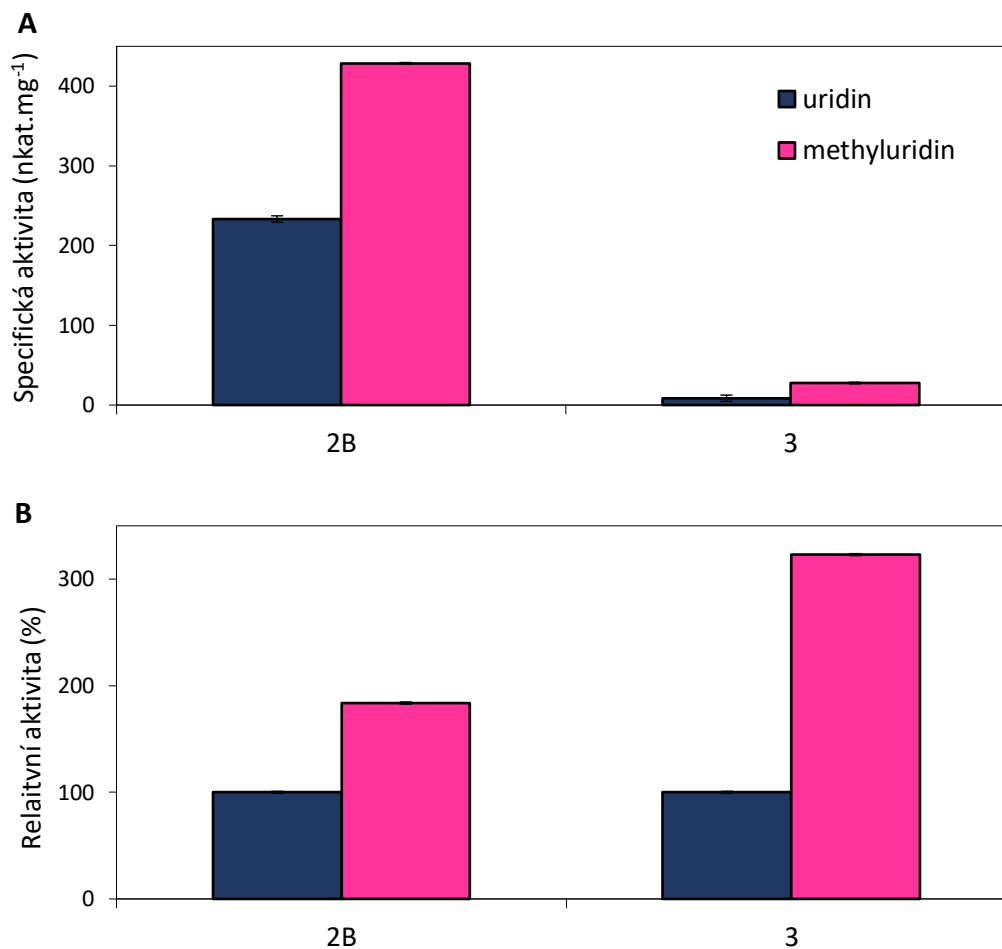
#### 4.2.3 Kinetické parametry ZmNRH2b a ZmNRH3

Následně byly změřeny kinetické parametry enzymů pro hydrolýzu různých substrátů. Konkrétně šlo o porovnání hydrolýzy uridinu, který pochází z degradace mRNA a 5-methyluridinu, který pochází z hydrolýzy tRNA. Současně byla stanovena saturační křivka pro oba ribosidy (zobrazena na Obr. 19). Bylo zjištěno, že 5-methyluridin je vhodnějším substrátem než uridin (porovnání aktivit obou substrátů viz Obr. 20). V Tabulce 3 jsou porovnány hodnoty  $V_{\text{lim}}$ ,  $K_m$  a  $V_{\text{lim}}/K_m$  obou enzymů se substráty.





Obr. 19 Saturační křivky nelineární regrese podle rovnice Michaelise a Mentenové (**A,B**) a dvojité reciproké zobrazení podle Lineweavera a Burkeho (**C,D**) pro enzym ZmNRH2B (**A,C**) a ZmNRH3 (**B,D**) katalyzujících hydrolýzu uridinu (modrá) a 5-methyluridinu (růžová). Měřeno v Tris-HCl pufru s obsahem 400mM KCl a 1mM DTT, pH 7,5.



Obr. 20 Porovnání specifických aktivit (A) a relativních aktivit (B) enzymů ZmNRH2b a ZmNRH3 se substráty uridinem (modrá) a 5-methyluridinem (růžová). Měřeno při  $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$  koncentraci ribosidů v Tris-HCl pufru, s obsahem 400mM KCl a 1mM DTT, pH 7,5. Pro výpočet byl použit relativní extinkční koeficient pro uridin  $\Delta_{\text{euridin nm}} = -1800 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  a pro 5-methyluridin  $\Delta_{\text{e5-methyluridin nm}} = -2960 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

Z těchto získaných hodnot je patrné, že 5-methyluridin je obecně lepším substrátem – u obou enzymů při využití nelineární regrese vyšly relativní hodnoty  $V_{\text{lim}}/K_m$  pro 5-methyluridin vyšší než u uridinu (u ZmNRH2b téměř dvakrát vyšší, u ZmNRH3 více jak třikrát vyšší). Při porovnání specifických aktivit daných enzymů s oběma substráty je dále zřejmé, že uridin i 5-methyluridin jsou hydrolyzovány mnohem rychleji ZmNRH2b než ZmNRH3.

Nakonec byla proměřena aktivita enzymů s užitím substrátu pseudouridinu. Dle naměřených hodnot se nejedná o substrát, neboť aktivita enzymu se po jeho přidání nemění.

Tabulka 3: Získané hodnoty  $V_{lim}$ ,  $K_m$  a  $V_{lim}/K_m$  z nelineární regrese podle rovnice Michaelise a Mentenové a z dvojité reciprokého znázornění Lineweavera a Burke pro enzymy ZmNRH2B (vlevo) a ZmNRH3 (vpravo) s použitými substráty uridinem a 5-methyluridinem. Hodnoty nelineární regrese byly získány z programu GraphPad Prism 8.

		ZmNRH2B		ZmNRH3	
		Uridin	5-methyluridin	Uridin	5-methyluridin
Nelineární regrese	$K_m$ ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	367 ± 32	280,9 ± 24	3465 ± 145	1147 ± 422
	$V_{lim}$ ( $\text{nmol.mg}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )	589,3 ± 35	874,5 ± 46	148,1 ± 58	175,5 ± 55
	Relativní $V_{lim}/K_m$	1,00	1,94	1,00	3,58
Dvojité reciproké zobrazení	$K_m$ ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	638,55	538,43	2582,52	746,16
	$V_{lim}$ ( $\text{nmol.mg}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )	909,09	1428,57	109,89	108,7
	Relativní $V_{lim}/K_m$	1,00	1,86	1,00	3,42

## 5 DISKUZE

### 5.1 HvALDH2E

V genomu ječmene bylo celkem nalezeno 15 genů pro enzymy ALDH, z toho tři pro ALDH z rodiny 2. Dle fylogenetické analýzy je nejvyšší evoluční příbuznost s rostlinami rodu *Triticum*. Naopak nejvíce se odlišují sekvence genů *Mus musculus* a *Homo sapiens*, které se řadí do živočišné zvíře.

Po optimalizaci klonování, za využití konstruktů s pCDFDuet, se podařilo získat gen *HvALDH2D*. Ovšem za nedostatku času byla pro následné měření využita exprese *HvALDH2E*, který se od *HvALDH2D* liší v sekvenci aminokyselin ve třech pozicích – v pozici 7 (záměna W za G), 47 (M za L) a 224 (P za Q). Proto by měly mít tyto enzymy podobné vlastnosti.

Pro HvALDH2E bylo stanoveno jako optimální pH hodnota 7,5, konkrétně 7,54, takže se jedná o mírně zásadité pH. V *Zea mays* bylo objeveno 6 isoenzymů, dva mitochondriální a čtyři cytosolární. Pro mitochondriální byly zjištěny hodnoty pH optima 9 a 7,5 (Liu a Schnable, 2002). Hodnota pH optima pro enzym HvALDH2E odpovídá skutečnosti, že se jedná o cytosolární enzym.

Během měření substrátové specificity enzymu HvALDH2E byla naměřena nejvyšší aktivita při 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  koncentraci substrátu během oxidace isobutyraldehydu. Změřená aktivita byla vztažena k aktivitě enzymu během oxidace nonanal, který se již dříve projevil jako nejvhodnější substrát pro řadu rostlin.

Pro měření kinetických parametrů byly na základě substrátové specificity vybrány aldehydy nonanal, hexanal, isobutyraldehyd, butyraldehyd, *trans*-2-hexenal a 3-methyl-2-butenal. Nonanal a hexanal byly původně vybrány dle předešlých studií, kdy se jevíly jako vhodné substráty pro enzymy ALDH2 u jiných druhů rostlin. Isobutyraldehyd byl vybrán na základě vyšších změřených aktivit enzymu HvALDH2E, butyraldehyd a *trans*-2-hexenal byly zvoleny podle vyšších aktivit během oxidace a strukturní podobnosti s proměřenými aldehydy. A v neposlední řadě aktivita enzymu s 3-methyl-2-butenalem byla proměřena, neboť se jedná o aldehydový meziprodukt odbourávání jednoho z nejrozšířenějších isoprenoidních cytokininů –  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP).

Hodnoty  $K_m$  se u jednotlivých substrátů lišily. Pro nonanal a hexanal byly zjištěny podobné hodnoty  $K_m$  (2,19 $\pm$ 0,1 a 2,34 $\pm$ 0,4  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Ovšem strukturně podobný *trans*-2-hexenal již vykazoval přibližně dvojnásobnou hodnotu  $K_m$  (5,24 $\pm$ 0,7  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

Dle substrátové specificity vybranému isobutyraldehydu a jemu podobnému butyraldehydu byly naměřeny hodnoty  $K_m$   $102,1 \pm 12$  a  $35,7 \pm 2,7 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Z tohoto pohledu by byl nejlepším substrátem isobutyraldehyd, čemuž již napověděla substrátová specificita. Ovšem důležitější pro posouzení vhodnosti substrátu je relativní poměr  $V_{lim}/K_m$ . Při porovnání těchto získaných hodnot je jasné, že nejvhodnějším substrátem pro HvALDH2E, podobně jako u jiných druhů rostlin, je nonanal s hodnotou 1. Dalším vhodným substrátem je hexanal s hodnotou poměru 0,86. Ostatní substráty vykazovaly třetinovou, nebo nižší relativní hodnotu poměru  $V_{lim}/K_m$  (*trans*-2-hexenal 0,33, butyraldehyd 0,07, isobutyraldehyd 0,05 a 3-methyl-2-butenal 0,02). Z tohoto se dá usuzovat, že ječmenný ALDH2E se nepodílí na metabolismu rozšířeného cytokininu iP. Zároveň během měření aktivity enzymu během oxidace aldehydů byla zaznamenána inhibice za vyšších koncentrací substrátů.

## 5.2 ZmNRH2b a ZmNRH3

Porovnáním sekvencí ZmNRH2b a ZmNRH3 bylo zjištěno, že se enzymy liší v mnoha pozicích. To také odpovídá jejich rozdílné aktivitě se stejnými substráty. U obou enzymů byla proměřena aktivita za použití substrátů uridinu a 5-methyluridinu. Vycházelo se z výzkumu Kopečná *et al.*, 2013, kdy bylo zjištěno, že oba enzymy vykazují katalytickou aktivitu právě s uridinem. Otázka byla, jak budou enzymy aktivní při reakci s derivátem uridinu.

Při měření specifické a relativní aktivity vyšlo najevo, že oba enzymy lépe reagují s 5-methyluridinem, tedy že je vhodnějším substrátem. To také dokazují získané hodnoty  $K_m$  z nelineární regrese podle Michaelise a Mentenové (pro ZmNRH2b  $280,9 \pm 24 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a pro ZmNRH3  $1147 \pm 422 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) a z dvojité reciprokého znázornění Lineweavera a Burke ( $538,43 \mu\text{mol.l}^{-1}$  pro ZmNRH2b a  $746,16 \mu\text{mol.l}^{-1}$  pro ZmNRH3). Rozdílnost hodnot nejspíše byla díky použití dvou různých typů výpočtů. Ovšem relativní poměry  $V_{lim}/K_m$  vztažené k hodnotě uridinu s enzymy (vždy hodnota 1) jsou již podobné. Hodnoty relativních poměrů  $V_{lim}/K_m$  pro 5-methyluridin získané z nelineární regrese podle Michaelise a Mentenové jsou 1,94 a 3,58 (pro ZmNRH2b a ZmNRH3) a z dvojité reciprokého znázornění Lineweavera a Burke jsou 1,86 a 3,42 (pro ZmNRH2b a ZmNRH3). Tyto hodnoty však nelze porovnávat mezi typy enzymů, neboť se nevycházelo ze stejné původní hodnoty. Tímto je dokázána aktivita 5-methyluridinu vůči uridinu. Tedy že v případě NRH2b je enzym téměř dvakrát aktivnější za použití derivátu a v případě NRH3 je tato aktivita více než trojnásobná.

Ovšem při porovnání enzymů mezi sebou, je jasné, že ZmNRH2b je za použití jakékoliv struktury uridinu aktivnější. Měřením při  $200\mu\text{mol.l}^{-1}$  koncentraci substrátů vyšla specifická aktivita uridinu a 5-methyluridinu pro ZmNRH2b 233 a 428,7  $\text{nkat.mg}^{-1}$  a pro ZmNRH3 8,6 a 27,7  $\text{nkat.mg}^{-1}$ . Tyto výsledky korespondují se studií Kopečná *et al.*, 2013, kdy bylo také zjištěno, že ke kukuřičnému NRH2b je nejvhodnější substrát uridin, naopak pro NRH3 byl nejvhodnější inosin. Rozdíl aktivit mezi oběma enzymy byl přibližně dvacetinásobný. V této práci byly získány podobné výsledky – rozdíl aktivit mezi NRH2b a NRH3 byl přibližně pětadvacetinásobný v případě uridinu, v případě derivátu (který nebyl ve zmíněné práci zkoumán) byla aktivita ZmNRH2b 15x vyšší než aktivita ZmNRH3.

V neposlední řadě byla zkoumána aktivita enzymů s použitím substrátu pseudouridinu, dalším derivátem uridinu. V tomto případě se však dospělo k závěru, že se nejedná o substrát, neboť jeho přidáním k enzymu nedochází ke změně aktivity. Pravděpodobně se jedná o druh inhibitoru, ale pro toto tvrzení je třeba další výzkum.

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše zabývající se charakterizací funkcí aldehyddehydrogenas a nukleosidas-*N*-ribohydrolas v rostlinách a ději, kterých se tyto enzymy účastní.

Praktická část byla rozdělena na dvě hlavní témata. První téma se zabývalo aldehyddehydrogenasami z rodiny 2 v ječmeni. Úspěšně bylo optimalizováno klonování HvALDH2D a vzhledem k času byl v expresních buňkách *E. coli* exprimován enzym HvALDH2E, který byl následně vypurifikován a použit k měření kinetických parametrů. V rámci měření bylo nejprve stanoveno pH optimum enzymu a následně substrátová specificita, podle níž bylo vybráno šest aldehydů, u kterých byly stanoveny kinetické parametry. Nejvhodnějším substrátem pro HvALDH2E byl prokázán aldehyd nonanal.

Druhým tématem praktické části bylo studium kinetických parametrů enzymů ZmNRH2b a ZmNRH3 za použití substrátů uridinu, 5-methyluridinu a pseudouridinu. Bylo prokázáno, že u obou enzymů je vhodnějším substrátem 5-methyluridin. Zároveň bylo dokázáno, že ZmNRH2b je aktivnější za použití uridinu, nebo jeho derivátu, což odpovídá již dřívějším studiím. V případě pseudouridinu naopak bylo vyvráceno, že se jedná o substrát, ale spíše o druh inhibitoru.

## 7 LITERATURA

- Agrobiologie: [http://agrobiologie.cz/SMEP3/Pestovani\\_rostlin\\_cviceni\\_Obilninny/etext.czu.cz/php/skripta/kapitolaf0d5.html?titul\\_key=81&idkapitola=4](http://agrobiologie.cz/SMEP3/Pestovani_rostlin_cviceni_Obilninny/etext.czu.cz/php/skripta/kapitolaf0d5.html?titul_key=81&idkapitola=4) (25. 6. 2020)
- Achar B.S., Vaidyanathan C.S. (1967): Purification and properties of uridine hydrolase from mung-bean (*Phaseolus radiatus*) seedlings. *Archive of Biochemistry and Biophysics* **119**, 356–362.
- Beier S., Himmelbach A., Colmsee C., Zhang X.Q., Barrero R.A., Zhang Q., Li L., Bayer M., Bolser D., Taudien S., et al. (2017): Data Descriptor: Construction of a map-based reference genome sequence for barley, *Hordeum*. *Scientific Data* **4**.
- Björk G.R., Neidhart F.C. (1975): Physiological and Biochemical Studies on the Function of 5-Methyluridine in the Transfer Ribonucleic Acid of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **124**, 99–111.
- Bouché N., Fromm H. (2004): GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science* **9**, 110–115.
- Brockner C., Vasiliou M., Carpenter S., Carpenter C., Zhang Y., Wang X., Kotchoni S.O., Wood A.J., Kirch H.H., Kopečný D., Nebert D., Vasiliou V. (2013): Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: Gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* **237**, 189–210.
- Brownlee B.G., Hall R.H., Whitty C.D. (1975): 3-methyl-2-butenal: An enzymatic degradation product of the cytokinin N6-( $\Delta^2$ isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37–41.
- Campos A., Rijo-Johansen M.J., Carneiro M.F., Fevereiro P. (2005): Purification and characterisation of adenosine nucleosidase from *Coffea arabica* young leaves. *Phytochemistry* **66**, 147–151.
- Cecchini N.M., Monteoliva M.I., Alvarez M.E. (2011): Proline dehydrogenase contributes to pathogen defence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **155**, 1947–1959.
- Clément K. (2006): Genetics of human obesity. *Comptes Rendus - Biologies* **329**, 608–622.
- Cronk Q.C. (2018): Plant evolution and development in a post-genomic context. *Nature Reviews. Genetics* **2**, 607–619.
- Cui X., Wise R.P., Schnable P.S. (1996): The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science* **272**, 1334–1336.
- Čurn V. (1998): *Šlechtění zemědělských plodin*. 1. vydání, Jihočeská univerzita, České Budějovice, Česká republika, 194 stran.
- Eagri.cz: [http://eagri.cz/public/web/file/648258/Zelena\\_zprava\\_2018.pd](http://eagri.cz/public/web/file/648258/Zelena_zprava_2018.pd) (15. 6. 2020)
- Eagri.cz: [http://eagri.cz/public/web/file/654505/Zemedelstvi\\_2019\\_web.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/654505/Zemedelstvi_2019_web.pdf) (15. 6. 2020)
- Estupiñán B., Schramm V.L. (1994): Guanosine-inosine-preferring nucleoside *N*-glycohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 23068–23073.
- Fritz K.S., Petersen D.R. (2013): An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* **59**, 85–91.
- Galuszka P., Popelkova H., Werner T., Frebortova J., Pospisilova H., Mik V., Kollmer I., Schmülling T., Frebort I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255–267.
- García-Ríos M., Fujita T., LaRosa P.C., Locy R.D., Clithero J.M., Bressan R.A., Csonka L.N. (1997): Cloning of polycistronic cDNA from tomato encoding  $\gamma$ -glutamyl kinase and  $\gamma$ -glutamyl phosphate reductase. *PNAS* **94**, 8249–8254.
- Giabbai B., Degano M. (2004): Cloning, purification, crystallization and X-ray analysis of the *Escherichia coli* pyrimidine nucleoside hydrolase YeiK. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **60**, 524–527.
- Grün F., Hirose Y., Kawauchi S., Ogura T., Umesono K. (2000): Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 41210–41218.



- Guerrero F.D., Jones J.T., Mullet J.E. (1990): Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Molecular Biology* **15**, 11–26.
- Guranowski A. (1982): Purine Catabolism in Plants. *Plant Physiology* **70**, 344–349.
- Guranowski A., Schneider Z. (1977): Purification and characterization of adenosine nucleosidase from barley leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* **482**, 145–158.
- Hartley D.P., Ruth J.A., Petersen D.R. (1995): The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **316**, 197–205.
- Hou Q., Bartels D. (2014): Comparative study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in the glycophyte *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema halophytes*. *Annals of Botany* **115**, 465–479.
- Hu C. A., Lin W. W., Obie C., Valle D. (1999): Molecular enzymology of mammalian Delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase. Alternative splice donor utilization generates isoforms with different sensitivity to ornithine inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 6754–6762.
- Huang W., Ma X., Wang Q., Gao Y., Xue Y., Niu X., Yu G., Liu Y. (2008): Significant improvement of stress tolerance in tobacco plants by overexpressing a stress-responsive aldehyde dehydrogenase gene from maize (*Zea mays*). *Plant Molecular Biology* **68**, 451–463.
- Charrier A., Rippa S., Yu A., Nguyen P.J., Renou J.P., Perrin Y. (2012): The effect of carnitine on *Arabidopsis* development and recovery in salt stress conditions. *Planta* **235**, 123–135.
- Chen C.M., Kristopeit S.M. (1981): Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiology* **68**, 1020–1023.
- Chen M., Thelen J.J. (2011): Plastid uridine salvage activity is required for photoassimilate allocation and partitioning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 2991–3006.
- Chen X., Zeng Q., Wood A.J. (2009): The stress-responsive *Tortula ruralis* gene *ALDH21A1* describes a novel eukaryotic aldehyde dehydrogenase protein family. *Journal of Plant Physiology* **159**, 677–684.
- Jackman J.E., Alfonzo J.D. (2013): Transfer RNA modifications: Nature's combinatorial chemistry playground. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 35–48.
- Jung B., Florchinger M., Kunz H.H., Traub M., Wartenberg R., Jeblick W., Neuhaus H.E., Mohlmann T. (2009): Uridine-ribohydrolase is a key regulator in the uridine degradation pathway of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 876–891.
- Jung B., Hoffmann C., Möhlmann T. (2011): *Arabidopsis* nucleoside hydrolases involved in intracellular and extracellular degradation of purines. *Plant Journal* **65**, 703–711.
- Kakimoto T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* **116**, 233–239.
- Kirch H.H., Bartels D., Wei Y., Schnable P.S., Wood A.J. (2004): The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **9**, 371–377.
- Kirch H.H., Nair A., Bartels D. (2001): Novel ABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **28**, 544–554.
- 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* **57**, 315–332.
- Končítíková R., Vigouroux A., Kopečná M., Andree T., Bartoš J., Šebela M., Moréra S., Kopečný D. (2015): Role and structural characterization of plant aldehyde dehydrogenases from family 2 and 7. *Biochemical Journal* **468**, 109–123.
- Končítíková R., Vigouroux A., Kopečná M., Šebela M., Moréra S., Kopečný D. (2019): Kinetic and structural analysis of human ALDH9A1. *Bioscience Reports* **39**.
- Kopečná M., Blaschke H., Kopečný D., Vigouroux A., Končítíková R., Novák O., Kotland O., Strnad M., Moréra S., von Schwartzberg K. (2013): Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine, and cytokinin ribosides. *Plant Physiology* **163**, 1568–1583.
- Kopečná M., Vigouroux A., Vilím J., Končítíková R., Briozzo P., Hájková E., Jašková L., von Schwartzberg K., Šebela M., Moréra S., Kopečný D. (2017): The ALDH21 gene found in

- lower plants and some vascular plants codes for a NADP<sup>+</sup>-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase. *Plant Journal* **92**, 229–243.
- Kopečný D., Končítíková 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.
- Kopečný D., Tylichová M., Snegaroff J., Popelková H., Šebela M. (2011): Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of  $\omega$ -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *FEBS Journal*. **278**, 3130–3139.
- Korasick D.A., Končítíková 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.
- Krokan H.E., Drabløs F., Slupphaug G. (2002): Uracil in DNA - Occurrence, consequences and repair. *Oncogene* **21**, 8935–8948.
- Laser K.D., Lersten N.R. (1972): Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *The Botanical Review* **38**, 425–454.
- Laskar A.A., Younus H. (2019): Aldehyde toxicity and metabolism: the role of aldehyde dehydrogenases in detoxification, drug resistance and carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews* **51**, 42–64.
- Lassen N., Bateman J.B., Estey T., Kuszak J.R., Nees D.W., Piatigorsky J., Duester G., Day B.J., Huang J., Hines L.M., Vasiliou V. (2007): Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in *Aldh3a1*(-/-)/*Aldh1a1*(-/-) knock-out mice. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 25668–25676.
- Li D., Zhao H., Gelernter J. (2012): Strong protective effect of the aldehyde dehydrogenase gene (*ALDH2*) 504lys (\*2) allele against alcoholism and alcohol-induced medical diseases in Asians. *Human Genetics* **131**, 725–737.
- Liu F., Schnable P.S. (2002): Functional specialization of maize mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Plant Physiology* **130**, 1657–1674.
- Liu F., Cui X., Horner H.T., Weiner H., Schnable P.S. (2001): Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell* **13**, 1063–1078.
- Lutwak-Mann C. (1939): Adenine derivatives and their biological functions. *Biological Reviews* **14**, 399–419.
- Marchitti S.A., Brocker C., Stagos D., Vasiliou V. (2008): Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: The aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* **4**, 697–720.
- Marchitti S.A., Orlicky D.J., Vasiliou V. (2007): Expression and initial characterization of human ALDH3B1. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **356**, 792–798.
- Mascher M., Gundlach H., Himmelbach A., Beier S., Twardziok S.O., Wicker T., Radchuk V., Dockter C., Hedley P.E., Russell J., et al. (2017): A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* **544**, 427–433.
- McCartney D.H., Block H.C., Dubeski P.L., Ohama A.J. (2006): Review: The composition and availability of straw and chaff from small grain cereals for beef cattle in western Canada. *Canadian Journal of Animal Science* **86**, 443–455.
- Missihoun T.D., Schmitz J., Klug R., Kirch H.H., Bartels D. (2011): Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta* **233**, 369–382.
- Mitsuya S., Yokota Y., Fujiwara T., Mori N., Takabe T. (2009): OsBADH1 is possibly involved in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes. *FEBS Letters* **583**, 3625–3629.

- Moffatt B., Ashihara H. (2002): Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*, 2nd Edition, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD. Online publikace. DOI/10.1199/tab.0018 <http://aspb.org/publications/Arabidopsis/>
- Moffatt B., Somerville C. (1988) Positive selection for male-sterile mutants of *Arabidopsis* lacking adenine phosphoribosyl transferase activity. *Plant Physiology* **86**, 1150–1154.
- Mok D.W., Mok M. C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89–118.
- Moschou P.N., Sanmartin M., Andriopoulou A.H., Rojo E., SanchezSerrano J.J., Roubelakis-Angelakis K.A. (2008): Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism. A novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**, 1845–1857.
- Navarro-Aviño J.P., Prasad R., Miralles V.J., Benito R.M., Serrano R. (1999): A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible *ALD2* and *ALD3* genes. *Yeast* **15**, 829–84.
- Nair R.B., Bastress K.L., Ruegger M.O., Denault J.W., Chapple C. (2004): The *Arabidopsis thaliana* reduced epidermal fluorescence1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell* **16**, 544–554.
- Nakazono M., Tsuji H., Li Y., Saisho D., Arimura S.I., Tsutsumi N., Hirai A. (2000): Expression of a gene encoding mitochondrial aldehyde dehydrogenase in rice increases under submerged conditions. *Plant Physiology* **124**, 587–598.
- Novoradovsky A., Tsai S.L., Goldfarb L., Peterson R., Long J.C., Goldman D. (1995): Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Polymorphism in Asian and American Indian Populations: Detection of New ALDH2 Alleles. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **19**, 1105–1110.
- Novorudsky A., Goldman D. (1995): Population genetics of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) in American Indian and Asian populations. *The American Journal of Human Genetics* **55**, A966.
- O'Brien P.J., Diraki A.G., Shangari N. (2005): Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Critical Reviews of Toxicology* **35**, 609–662.
- Palareti G., Legnani C., Cosmi B., Antonucci E., Erba N., Poli D., Testa S., Tassetto A. (2016): Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology* **38**, 42–49.
- Panwar B., Raghava G.P.S. (2014): Prediction of uridine modifications in tRNA sequences. *BMC Bioinformatics* **15**, 326.
- Pappa A., Chen C., Koutalos Y., Townsend A.J., Vasilio V. (2003): Aldh3A1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine* **34**, 1178–1189.
- Parkin D.W. (1996): Purine-specific Nucleoside N-Ribohydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 21713–21719.
- Parkin D.W., Horenstein B.A., Abdulah D.R., Estupinan B., Schramm V.L. (1991): *Journal of Biological Chemistry* **266**, 20658–20665.
- Pérignon J.L., Bories D.M., Houllier A.M., Thuillier L., Cartier P.H. (1987): Metabolism of pyrimidine bases and nucleosides by pyrimidine-nucleoside phosphorylases in cultured human lymphoid cells. *BBA - Molecular Cell Research* **928**, 130–136.
- Raman S.B., Rathinasabapathi B. (2003):  $\beta$ -Alanine N-methyltransferase of *Limonium latifolium*. cDNA cloning and functional expression of a novel N-methyltransferase implicated in the synthesis of the osmoprotectant  $\beta$ -alanine betaine. *Plant Physiology* **132**, 1642–1651.
- Rappold G.A., Stubbs L., Labeit S., Crkvenjakov R.B., Lehrach H. (1987): Identification of a testis-specific gene from the mouse t-complex next to a CpG-rich island. *The EMBO Journal* **6**, 1975–1980.
- Riegler H., Geserick C., Zrenner R. (2011): *Arabidopsis thaliana* nucleosidase mutants provide new insights into nucleoside degradation. *New Phytology* **191**, 349–359.

- Rodrigues S.M., Andrade M.O., Gomes A.P.S., DaMatta F.M., Baracat-Pereira M.C., Fontes E.P.B. (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.
- Romero C.C.T., Vels A., Niks R.E. (2018): Identification of a large-effect QTL associated with kernel discoloration in barley. *Journal of Cereal Science* **84**, 62-70.
- Sakthivel K., Sundaram R.M., Shobha Rani N., Balachandran S.M., Neeraja C.N. (2009): Genetic and molecular basis of fragrance in rice. *Biotechnology Advances* **27**, 468-473.
- Seitz H.K., Becker P. (2007): Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Research and Health* **30**, 38-47.
- Shapiro B., Wertheimer E. (1943): Phosphorolysis and synthesis of glycogen in animal tissues. *Biochemical Journal* **37**, 397-403.
- Shin J.H., Kim S.R., An G. (2009): Rice aldehyde dehydrogenase7 is needed for seed maturation and viability. *Plant Physiology* **149**, 905-915.
- Schmid M., Davison T.S., Henz S.R., Pape U.J., Demar M., Vingron M., Weigel D. (2005): A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* **37**, 501-506.
- Schmülling T. (2004): Cytokinin. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Lennarz W., Lane M. D.), Academic Press, Londýn, Velká Británie, 562-567.
- Skibbe D.S., Liu F., Wen T.J., Yandeau 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.
- Sophos N.A., Vasiliou V. (2003): Aldehyde dehydrogenase gene superfamily. The 2002 update. *Chemico-Biological Interactions* **143**, 5-22.
- Sreenivasulu N., Graner A., Wobus U. (2008): Barley genomics: An overview. *International Journal of Plant Genomics* **2008**, 1-13.
- Steele M. I., Lorenz D., Hatter K., Park A., Sokatch J. R. (1992): *Journal of Biological Chemistry* **267**, 13585-13592.
- Stewart M.J., Malek K., Xiao Q., Dipple K.M., Crabb D.W. (1995): The novel aldehyde dehydrpgenase gene, ALDH5, encodes an active aldehyde dehydrogenase enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **211**, 144-151.
- Szuwart M., Starzynska E., Pietrowska-Borek M., Guranowski A. (2006): Calcium-stimulated guanosine-inosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Phytochemistry* **67**, 1476-1485.
- Stiti N., Missihoun T.D., Kotchoni S.O., Kirch H.H., Bartels D. (2011): Aldehyde dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: Biochemical requirements, metabolic pathways, and functional analysis. *Frontiers in Plant Science* **2**.
- Stockler S., Plecko B., Gospe S.M., Coulter-Mackie M., Connolly M., van Karnebeek C., Mercimek-Mahmutoglu S., Hartmann H., Scharer G., Struijs E., et al. (2011): Pyridoxine dependent epilepsy and antiquitin deficiency. Clinical and molecular characteristics and recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Molecular Genetics and Metabolism* **104**, 48-60.
- Strable J., Scanlon M.J. (2009): Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harbor Protocols* **4**.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.
- Stroeher V.L., Boothe J.G., Good A.G. (1995): Molecular cloning and expression of a turgor-responsive gene in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **27**, 541-551.
- Sunkar R., Bartels D., Kirch H.H. (2003): Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant Journal* **35**, 452-464.
- Tsuji H., Meguro N., Suzuki Y., Tsutsumi N., Hirai A., Nakazono M. (2003): Induction of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by submergence facilitates oxidation of acetaldehyde during re-aeration in rice. *FEBS Letters* **546**, 369-373.
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010): Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenases from *Pisum*

- sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *Journal of Molecular Biology* **396**, 870–882.
- Ullrich S.E. (2011): Significance, Adaptation, Production, and Trade of Barley. In *Barley: Production, Improvement, and Uses*, (Wiley-Blackwell), Delve Publishing LLC, Kanada, 3–13.
- van der Graaf E., Hooykaas P., Lein W., Lerchl J., Kunze G., Sonnewald U., Boldt R. (2004): Molecular analysis of “de novo” purine biosynthesis in solanaceous species and in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience* **9**, 1803–1816.
- Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K.F., Nebert D.W. (1999): Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics and Genomics* **9**, 421–434.
- Versées W., Steyaert J. (2003): Catalysis by nucleoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 731–738.
- Vetter I.R., Wittinghofer A. (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299–1304.
- Wang X., Mann C.J., Bai Y., Ni L., Weiner H. (1998): Molecular cloning, characterization, and potential roles of cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **180**, 822–830.
- Wei Y., Lin M., Oliver D.J. (2009): The roles of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the PDH bypass of *Arabidopsis*. *BMC Biochemistry* **10**, 1–10.
- Wood A.J., Duff R.J. (2009): The aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily of the moss *Physcomitrella patens* and the algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Ostreococcus tauri*. *Bryologisty* **112**, 1–11.
- Yang H.L., Zhang D.Y., Li X., Li H., Zhang D., Lan H., Wood A.J. *et al* (2016): Overexpression of *ScALDH21* gene in cotton improves drought tolerance and growth in greenhouse and field conditions. *Molecular Breeding* **36**, 1–13.
- Yang H.L., Zhang D.Y., Wang J.C., Wood A.J., Zhang Y.M. (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.
- Yoshida Y., Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1997): Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiology* **38**, 1095–1102.
- Yoshida A. (1994): Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes related to alcohol sensitivity and alcoholic diseases. *Alcohol and Alcoholism* **29**, 693–696.
- Yoshida A., Hsu L.C., Yasunami M. (1991): Genetics of human alcohol-metabolizing enzymes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **40**, 255–287.
- Yoshida A., Huang I.Y., Ikawa M. (1984): Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. *PNAS* **81**, 258–261.
- Yoshida A., Rzhetsky A., Hsu L.C., Chang C. (1998): Human aldehyde dehydrogenase gene family. *European Journal of Biochemistry* **251**, 549–557.
- Zhang Y., Mao L., Wang H., Brocker C., Yin X., Vasiliou V., Fei Z., Wang X. (2012): Genome-wide identification and analysis of grape aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily. *PLoS ONE* **7**, 1–11.
- Zhao J., Missihoun T.D., Bartels D. (2017): The role of *Arabidopsis* aldehyde dehydrogenase genes in response to high temperature and stress combinations. *Journal of Experimental Botany* **68**, 4295–4308.
- Zrenner R., Stütt M., Sonnewald U., Boldt R. (2006): Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 805–836.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
AA/BIS	akrylamid/bisakrylamid
AASAL	$\alpha$ -aminoadipátsemialdehyd
ALDH	aldehyddehydrogenasa
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
APS	persíran amonný
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
B-PER	bacterial protein extraction reagens
BA	benzyladenin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (algoritmus pro porovnávání sekvencí)
<i>Bt</i> -kukuřice	geneticky upravená kukuřice obsahující s vloženým genem z bakterie <i>Bacillus thuringiensis</i>
C	cytosin
cAMP	cyklický AMP
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
CK	cytokinin
CKO/CKX	cytokininoxidasa/dehydrogenasa
Clustal	software pro mnohočetné porovnání sekvencí, či formát souboru sekvencí
CTP	cytidintrifosfát
DHU	dihydrouracil
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
DTT	dithiotreitol
FASTA	algoritmus pro porovnávání sekvencí nebo též formát souboru sekvencí
G	guanin
Gbp (Mbp)	giga páry bazí (mega páry bazí)
Glu	kyselina glutamová
GMP	guanisonmonofosfát
GSALDH	glutamát- $\gamma$ -semialdehyddehydrogenas
GTP	guanisontrifosfát
iP	N <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin

IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
$K_i$	inhibiční konstanta
$K_m$	Michaelisova konstanta
LB medium	Luria-Bertani medium
Lys	lysin
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
$NAD^+$	nikotinamidadenindinukleotid
$NADP^+$	nikotinadenindinukleotidfosfát
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRH	nukleosid-N-ribohydrolasa
PRPP	5-fosforibosyl- $\alpha$ -pyrofosfát
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SOC	Super Optimal broth with Catabolite medium
T	thymin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
U	uracil
$V_{lim}$	limitní rychlost reakce