

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium aminoaldehyddehydrogenasy 1b  
(ZmAMADH1b) z kukuřice (*Zea mays*)**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Jan Vilím</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. David Kopečný, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	6. 5. 2013

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

V Olomouci dne 6. května 2013

.....

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Davidu Kopečnému PhD. za odborné vedení, čas, ochotu a především trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Martině Kopečné PhD. a Mgr. Radce Končítíkové za cenné rady a jejich ochotu pomoci při práci v laboratoři.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Jan Vilím
Název práce	Studium aminoaldehyddehydrogenasy 1b (ZmAMADH1b) z kukuřice ( <i>Zea mays</i> )
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky - CRH
Vedoucí práce	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce se zabývá purifikací a charakterizací rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy 1b (AMADH1b) z kukuřice (<i>Zea mays</i>) a porovnání jejich vlastností s dalšími dvěma kukuřičnými enzymy ZmAMADH1a a ZmAMADH2. U všech tří enzymů bylo stanoveno pH optimum, teplotní optimum, substrátová specifita a kinetické parametry – <math>K_m</math>, <math>V_{lim}</math> a poměr <math>V_{lim}/K_m</math>. Kinetické parametry byly stanoveny se substráty 3-aminopropionaldehydem a betainaldehydem (BAL). Nízké hodnoty <math>K_m</math> pro BAL byly pozorovány s oběma ZmAMADH1a a ZmAMADH1b, nicméně několikanásobně vyšší aktivitu s BAL vykazovala pouze ZmAMADH1a. Z analýzy krystalové struktury a všech tří sekvencí vyplývá, že za změnu je zodpovědná přítomnost cysteinu na pozici 446 u ZmAMADH1a, jež umožňuje rozšíření substrátového kanálu pro objemnou trimethylamoniovou skupinu betainaldehydu.</p>
Klíčová slova	kukuřice, aminoaldehyddehydrogenasa, betainaldehyd, 3-aminopropionaldehyd
Počet stran	44
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Jan Vilím
Title	Study on aminoaldehyde dehydrogenase 1b (ZmAMADH1b) from maize ( <i>Zea mays</i> )
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of protein biochemistry and proteomics - CRH
Supervisor	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>This bachelor thesis is focused on purification and characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase ZmAMADH1b from maize (<i>Zea mays</i>) and its comparison to other two maize enzymes ZmAMADH1a and ZmAMADH2. Optimal pH, thermo-stability, substrate specificity and kinetic parameters – <math>K_m</math>, <math>V_{lim}</math> and <math>V_{lim}/K_m</math> ratio - were measured for all of three purified maize enzymes. Kinetic parameters were determined for 3-aminopropion aldehyde and betaine aldehyde (BAL) as substrates. The low <math>K_m</math> values for BAL were observed with both ZmAMADH1a and ZmAMADH1b, nevertheless only ZmAMADH1a exhibited several times higher activity with BAL. Considering the crystal structure and all three aminoacid sequences, it becomes evident that a cysteine at position 446 in ZmAMADH1a is responsible for such a change and allows widening of the substrate channel for bulky trimethylammonium group of betaine aldehyde.</p>
Keywords	maize, aminoaldehyde dehydrogenase, betaine aldehyde, 3-aminopropionaldehyde
Number of pages	44
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

1 Cíle práce .....	7
2 Teoretická část .....	8
2.1 Aldehyddehydrogenasy .....	8
2.1.1 Klasifikace rostlinných aldehyddehydrogenas .....	8
2.1.2 Nomenklatura .....	9
2.1.2 Rodina ALDH10 - Aminoaldehyddehydrogenasy .....	9
2.1.2.1 Reakční mechanismus .....	11
2.1.2.2 Stavba aminoaldehyddehydrogenas.....	12
2.1.2.2.1 Kationt vázající doména.....	13
2.1.2.2.2 Vazba koenzymu .....	13
2.1.2.2.3 Aktivní místo .....	14
2.1.2.3 Substrátová specificita.....	15
2.1.2.4 Využití ALDH10 enzymů pro produkci transgenních rostlin.....	18
2.1.2.5 Vliv ztráty AMADH aktivity na aroma rýže ( <i>Oryza sativa</i> ).....	19
2.2 Metabolismus aminoaldehydů .....	21
2.2.1 Metabolismus $\omega$ -aminoaldehydů.....	21
2.2.1.1 Polyaminy.....	21
2.2.1.2 Syntéza polyaminů .....	22
2.2.1.3 Katabolismus polyaminů.....	22
2.2.2 Betainaldehyd .....	23
2.2.2.1 Syntéza glycin betainu.....	23
2.2.2.2 Význam glycin betainu.....	23
3 Praktická část .....	25
3.1 Materiál a chemikálie.....	25
3.1.1 Biologický materiál a další.....	25
3.1.2 Použité chemikálie .....	25
3.2 Přístrojové vybavení.....	26
3.3 Metody .....	26

3.3.1	Exprese rekombinantních ZmAMADH v <i>E. coli</i> .....	26
3.3.2	Extrakce ZmAMADH .....	27
3.3.3	Purifikace ZmAMADH .....	27
3.3.4	Kontrola purifikace pomocí SDS-PAGE .....	27
3.3.5	Stanovení obsahu proteinů .....	28
3.3.6	Měření aktivity ZmAMADH .....	29
3.3.6.1	Stanovení pH optima a teplotní stability .....	29
3.3.6.2	Stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů ZmAMADH .....	29
4	Výsledky .....	31
4.1	Kontrola exprese pomocí SDS-PAGE .....	31
4.2	Stanovení obsahu ZmAMADH proteinů .....	31
4.3	Stanovení pH optima .....	33
4.4	Stanovení teplotní stability .....	33
4.5	Stanovení substrátové specifity .....	34
4.6	Stanovení kinetických parametrů ZmAMADH .....	35
5	Diskuze .....	38
6	Závěr .....	41
7	Použitá literatura .....	42

# 1 Cíle práce

- Teoretická část – Vypracování literární rešerše zahrnující:
  - Klasifikaci aldehyddehydrogenas (ALDH), substrátovou specificitu rostlinných aminoaldehyddehydrogenas (AMADH, ALDH10)
  - Metabolismus spojený s biosyntézou a degradací aminoaldehydů v rostlinách s důrazem na betainaldehyd
- Praktická část
  - Exprese, extrakce a purifikace enzymů ZmAMADH 1a, 1b a 2
  - Zjištění pH optima a substrátové specificity ZmAMADH 1b a jeho porovnání s ZmAMADH 1a a 2
  - Porovnání aktivity ZmAMADH1b a ZmAMADH1a vůči betainaldehydu, a aminopropionaldehydu

## 2 Teoretická část

### 2.1 Aldehyddehydrogenasy

Nadrodina aldehyddehydrogenas (ALDH) se skládá z velkého počtu enzymů účastnících se metabolismu aldehydů. ALDH enzymy používají při reakci jako kofaktor buď  $\text{NAD}^+$  či  $\text{NADP}^+$ . Produktem reakce jsou příslušné aminokyseliny a redukovaná forma přítomného kofaktoru. Sloučeniny s aldehydickými skupinami jsou vytvářeny jako důležité meziproducty mnoha metabolických drah (Brocker et al., 2013). Za nestresujících podmínek se ALDH podílejí na základním metabolismu rostlin a udržují koncentraci aldehydů na netoxické úrovni. Když dojde k narušení metabolismu abiotickým stresem, ALDH se starají o detoxifikaci odbouráním stresem vzniklých aldehydů a zároveň pomáhají udržet úroveň zásobního redukčního potenciálu. Expres *ALDH* genů jakožto odpovědi na stres je obvyklou reakcí mezi mnoha druhy rostlin. Rodiny ALDH, které se podílejí na odbourávání stresem indukovaných aldehydů jsou rodiny ALDH7, 10, 11 a 12 (Kirch et al., 2004). Jednou z funkcí ALDH jakožto ochranného mechanismu je oxidace aldehydů vzniklých degradací lipidových membrán při oxidativním stresu – tzv. peroxidace lipidů. Produkty tohoto děje, např. 4-hydroxyneanal či 4-oxoneanal, jsou silné elektrofilny a rychle vytvářejí adukty s fyziologicky důležitými nukleofily - aminokyselinami a proteiny. Tyto adukty mohou způsobovat mutace a významně narušovat homeostázu.

#### 2.1.1 Klasifikace rostlinných aldehyddehydrogenas

Nadrodina rostlinných aldehyddehydrogenas se dělí do třinácti rodin. Jsou to rodiny ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH 11, ALDH12, ALDH18, ALDH21, ALDH22, ALDH23 a ALDH24. Rodiny ALDH10, ALDH12, ALDH 21, ALDH22, ALDH 23 a ALDH 24 se vyskytují pouze u rostlin, kdežto rodiny ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7 a ALDH18 mají i savčí orthology. Vysoká exprese těchto enzymů a jejich široké využití rostlinou jen podtrhuje jejich důležitost. V rostlinách je obvyklé větší množství genů kódujících ALDH. To může velmi zvyšovat šanci na přežití organismu (Brocker et al., 2013).



## 2.1.2 Nomenklatura

Názvosloví pro členy ALDH nadrodiny (živočišné i rostliné) bylo ustanoveno v roce 1999 (Vasiliou et al., 1999). Systém byl vyvinut podle specifikací Humane Gene Nomenclature Comitee (Komise pro názvosloví lidského genomu). Použití názvosloví platí pro všechny druhy, nejen pro člověka. Každý gen dostal jakožto kořen názvu písmena "ALDH", po kterých následuje arabské číslo rodiny. Označení rodiny je následováno písmenem označující podrodinu a číslem identifikující daný gen v podrodině. Zařazení do systému je určováno podle shodnosti aminokyselinové sekvence. Proteiny, které sdílejí okolo 40 % své sekvence, jsou zařazeny do stejné rodiny. Ty, které mají shodnost sekvence okolo 60 %, jsou spojeny do podrodin. Rodiny jsou označovány chronologicky podle své identifikace. Geny jsou psány velkými písmeny a kurzívou, kdežto proteiny pouze velkými písmeny (Brocker et al., 2013). Doposud byly plně charakterizovány a pojmenovány ALDH z několika rostlinných zemědělsky a vědecky významných druhů – kukuřice (*Zea mays*) (Jimenez-Lopez et al., 2010), rýže (*Oryza sativa*) (Gao a Han, 2009), huseníček (*Arabidopsis thaliana*) (Kirch et al., 2004)

### 2.1.2 Rodina ALDH10 - Aminoaldehyddehydrogenasy

Členové rodiny ALDH10 jsou známi také jako aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH, EC 1.2.1.19), ale také jako 4-aminobutyraldehyddehydrogenasy (ABALDH, EC 1.2.1.19), 4-guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (GBALDH, EC 1.2.1.54), 4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (TMABALDH, EC 1.2.1.47) a beatinaldehyddehydrogenasy (BADH, EC 1.2.1.8). Tato velká variabilita oxidovatelných substrátů ukazuje, že současný systém jejich klasifikace je nevhodný. Výše zmíněné enzymy mají totiž často vyšší afinitu k 3-aminopropionaldehydu (APAL) či 4-aminobutyraldehydu (ABAL), a i když se specifita mezi druhy může lišit, měly by proto být klasifikovány jako AMADH (Tylichová et al., 2010; Trossat et al., 1997). Nicméně existuje několik členů rodiny ALDH10, kupříkladu z mangrovníku (*Avicennia marina*), špenátu (*Spinacia oleracea*) či laskavce (*Amaranthus hypochondriacus*), kteří vykazují vysokou aktivitu s betinaldehydem a proto jsou označovány jako BADH (Hibino et al., 2001; Incharoensakdi et al., 2000; Valenzuela-Soto a Munoz-Clares 1993) . Z tohoto pohledu je proto možné rozdělit ALDH10 do dvou podskupin: v jedné budou enzymy s nízkou BADH aktivitou a ve druhé ty, které mají vysokou BADH aktivitu.

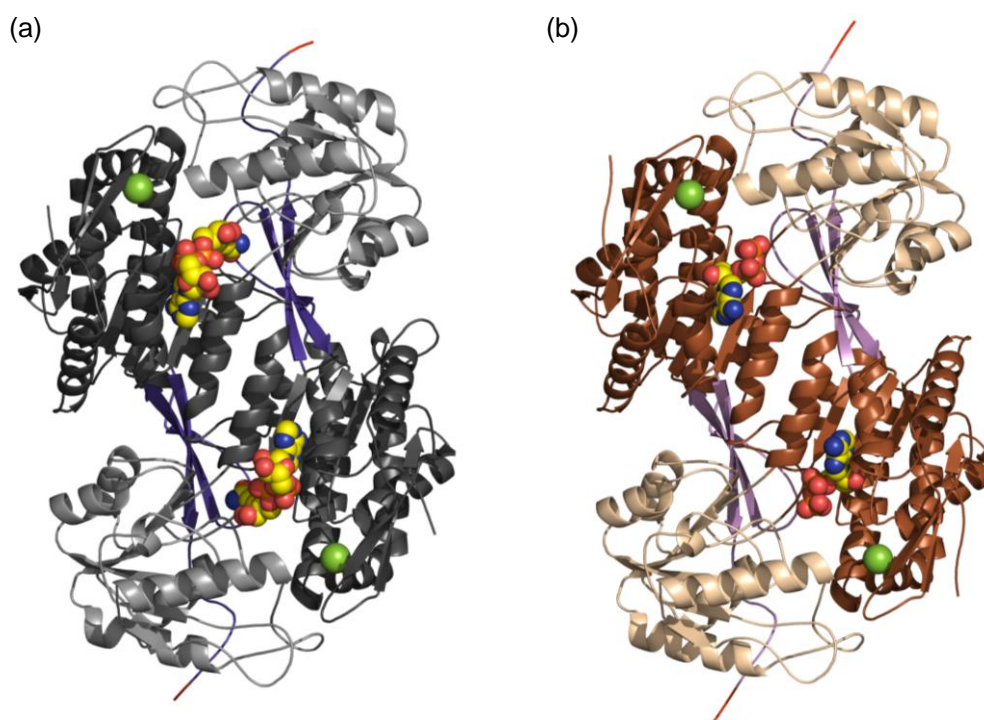
*ALDH10* geny, které byly identifikovány ve většině rostlinných druhů, spolu sdílejí velkou míru podobnosti sekvence, proto spadají do podrodiny *ALDH10A* (Brocker et al., 2013). V kukuřici (*Zea mays*) bylo nalezeno dvacet čtyři *ALDH* genů, z toho tři

*ALDH10* geny : *ZmALDH10A5*, *ZmALDH10A8* a *ZmALDH10A9*. Funkční umístění ALDH v kukuřici se různí (Tab. 1), ALDH10 jsou jako jediné lokalizovány v peroxisomech, ostatní členové ALDH nadrodiny se vyskytují obvykle v mitochondriích (ALDH2, ALDH5, ALDH6 a ALDH12) cytosolu (ALDH2, ALDH7, ALDH11 a ALDH18), chloroplastech (ALDH3), endoplazmatickém retikulu (ALDH3) nebo jsou součástí membrán (ALDH22) (Jimenez-Lopez et al., 2010).

**Tab. 1 - Seznam a umístění proteinů ALDH nadrodiny v kukuřici** - převzato z Jimenez-Lopez et al., 2010

ALDH rodina	Název	Přístupové číslo	Funkce	Umístění v buňce
Rodina 2	ZmALDH2B1	AC189099.3	Aldehyddehydrogenasa	Mitochondrie
	ZmALDH2B2	AC191038.4	Aldehyddehydrogenasa/RF2A	Mitochondrie
	ZmALDH2B3	AC182825.4	Aldehyddehydrogenasa/RF2B	Mitochondrie
	ZmALDH2C1	AC203907.3	Aldehyddehydrogenasa/RF2C	Cytosol
	ZmALDH2C2	AC212213.3	Aldehyddehydrogenasa/RF2D	Cytosol
	ZmALDH2C3	AC200510.3	Aldehyddehydrogenasa	Cytosol
Rodina 3	ZmALDH3E1	AC194279.3	Aldehyddehydrogenasa	Chloroplast
	ZmALDH3E2	AC206699.3	Aldehyddehydrogenasa	Chloroplast
	ZmALDH3H1	AC196114.2	Aldehyddehydrogenasa[NAD(P)+]	Chloroplast
	ZmALDH3H2	AC204269.3	Aldehyddehydrogenasa[NAD(P)+]	Chloroplast
	ZmALDH3H3	AC177866.2	Aldehyddehydrogenasa[NAD(P)+]	E. retikulum
Rodina 5	ZmALDH5F1	AC191786.3	Sukcinátsemialdehyddehydrogenasa	Mitochondrie
	ZmALDH5F2	AC196023.3	Sukcinátsemialdehyddehydrogenasa	Mitochondrie
Rodina 6	ZmALDH6B1	AC191354.3	Methylmalonátsemialdehyddehydrogenasa	Mitochondrie
Rodina 7	ZmALDH7B6	AC196479.3	Antiquitin	Cytosol
Rodina 10	ZmALDH10A5	AC203433.3	Betainaldehyddehydrogenasa	Peroxisom
	ZmALDH10A8	AC193454.3	Betainaldehyddehydrogenasa	Peroxisom
	ZmALDH10A9	AC205791.3	Betainaldehyddehydrogenasa	Peroxisom
Rodina 11	ZmALDH11A3	AC219083.3	NADH dependentní glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa	Cytosol
Rodina 12	ZmALDH12A1	AC211544.3	Delta-1-pyrroline-5-karboxyldehydrogenasa	Mitochondrie
Rodina 18	ZmALDH8B1	AC231617.2	Delta-1-pyrroline-5-karboxylsynthetasa	Cytosol
	ZmALDH8B2	AC208465.3	Delta-1-pyrroline-5-karboxylsynthetasa	Cytosol
	ZmALDH8B3	AC203754.4	Delta-1-pyrroline-5-karboxylsynthetasa	Cytosol
Rodina 22	ZmALDH22A1	AC212124.5	Aldehyddehydrogenasa	Vylučovací dráha/ součást endomembrány

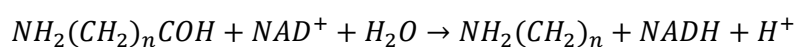
Doposud bylo charakterizováno několik enzymů ALDH10 nadrodiny. Byly charakterizovány a AMADH z hrachu (*Pisum sativum*) (Tylichová et al., 2010), špenátu (*Spinacea oleracea*) (Díaz-Sánchez et al., 2012), rajčete (*Solanum lycopersicum*) (Kopečný et al., 2013). U těchto AMADH byly získány také krystalové struktury, zde jsou pro ilustraci uvedené struktury hrachových AMADH – PsAMADH1 a PsAMADH2 (Obr. 1). Dále byly charakterizovány enzymy ALDH10 nadrodiny v rýži (*Oryza sativa*) (Bradbury et al., 2010) a v ječmeni (*Hordeum vulgare*) (Fujiwara et al., 2008), u těchto enzymů ovšem nejsou známy krystalové struktury.



**Obr. 1 – Struktura PsAMADH1 (a) a PsAMADH2 (b)** – (a) Katalytická doména je znázorněna šedě, koenzym vázající doména černě a oligomerizační doména modře. Atomy  $NAD^+$  (v barvách jednotlivých prvků) a iontu sodíku (zelený) jsou znázorněny pomocí kuliček. (b) Katalytická doména je znázorněna béžově, koenzym vázající doména hnědě a oligomerizační doména fialově. Atomy  $NAD^+$  (v barvách jednotlivých prvků) a iont sodíku (zelený) jsou znázorněny pomocí kuliček (převzato z Tylichová et al., 2010).

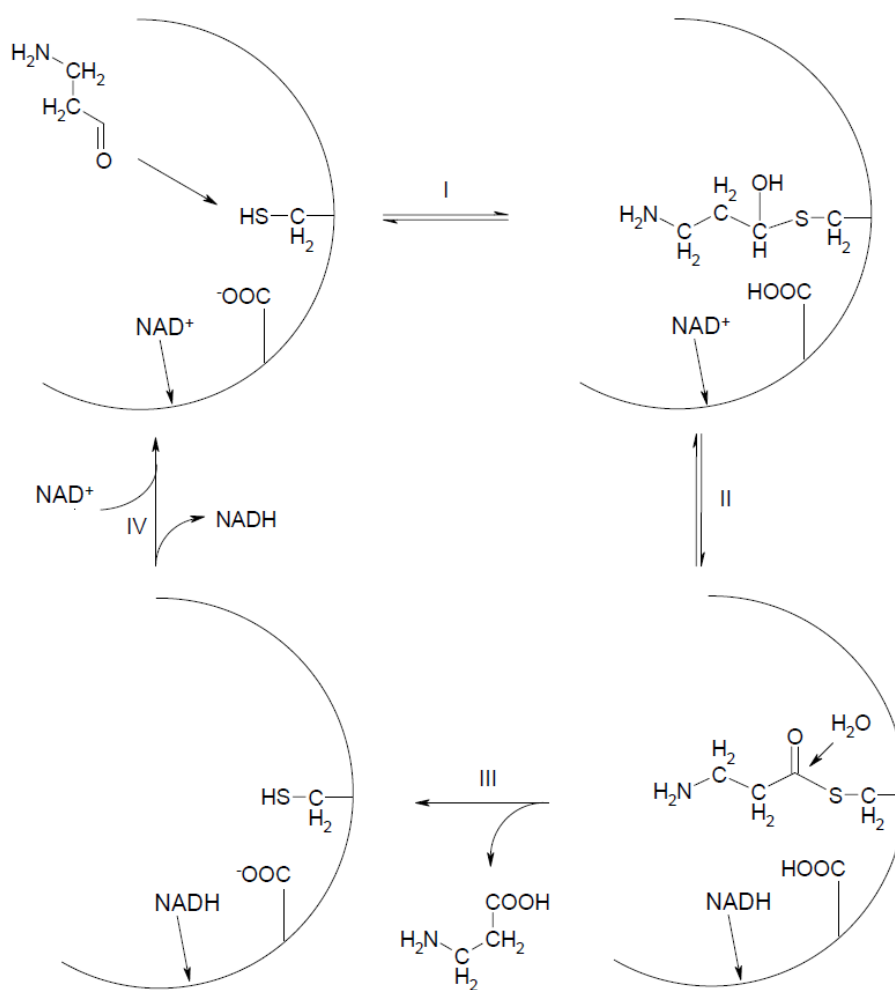
### 2.1.2.1 Reakční mechanismus

Reakcí substrátu s enzymem dochází ke vzniku příslušné aminokyseliny.



Při přeměně aldehydu na aminokyselinu vytváří ALDH kovalentní meziproducty. Prvním krokem je nukleofilní atak katalytického cysteinu v aktivním

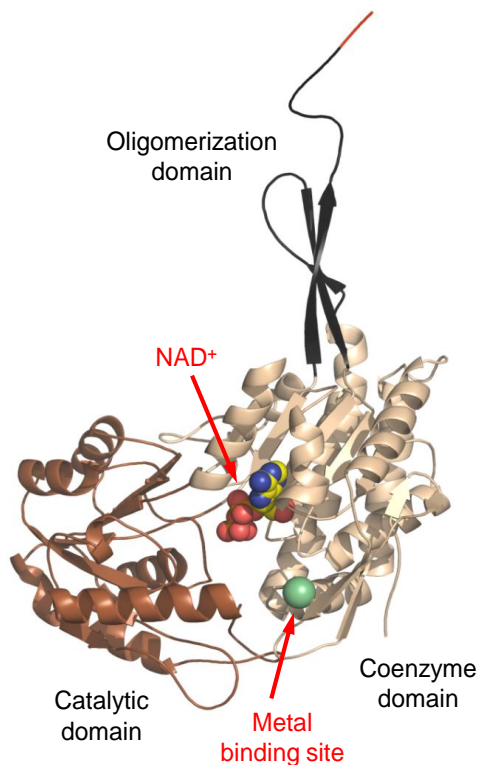
místě enzymu. Dochází k vytvoření kovalentně vázaného alkoholového meziprojektu (thiohemiacetalu) a následné oxidaci tohoto meziprojektu  $\text{NAD}^+$  na thioesterový meziprojekt (Johansson et al., 1998). Vzniklý produkt je uvolněn z aktivního místa molekulou vody, která po svém aktivování glutamátovým residuem rozštěpí vazbu mezi atomy uhlíku a síry a dojde k uvolnění produktu (aminokyseliny) (Obr. 2). Vzniklý NADH neoddisociovává z enzymu dokud nedojde k uvolnění produktu, což může být z nutnosti izomerizace do hydrolytické pozice, která je potřeba pro dokončení reakce. (Perez-Miller a Hurley, 2003).



Obr. 2 – Reakční mechanismus aminoaldehyddehydrogenas - převzato z Lakomá,2010

### 2.1.2.2 Stavba aminoaldehyddehydrogenas

Rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy se skládají ze dvou podjednotek, jsou to tedy dimery. Každá jednotka se skládá ze tří domén – koenzym vázající domény, katalytické domény a oligomerizační domény (Obr. 3).



**Obr. 3 – Obecná struktura rostlinných AMADH** – Katalytická doména je znázorněna hnědě, koenzym vázající doména béžově a oligomerizační doména tmavě šedě. Atomy  $\text{NAD}^+$  (v barvách jednotlivých prvků) a iont sodíku (zelený) jsou znázorněny pomocí kuliček (převzato z Tylichová et al., 2010).

#### 2.1.2.2.1 Kationt vázající doména

U AMADH z hrachu setého (*Pisum sativum*), PsAMADH1 a PsAMADH2, se vyskytuje pouze jeden kationt vázaný v kavitě, která je blízko  $\text{NAD}^+$  vazebného místa. Vazebné místo pro kationt je společné všem ALDH (Tylichová et al., 2010). I když role monovalentního iontu u ALDH není ještě úplně jasná, mohl by mít vliv na stabilizaci místa vázajícího  $\text{NAD}^+$ , tím že by elektrostatickou interakcí přispíval k udržení ideální konformace potřebné pro vazbu kofaktoru (Perez-Miller a Hurley, 2003). U hrachových aminoaldehyddehydrogenas byla totiž pozorována částečná ztráta aktivity vlivem dialýzy enzymu při jeho purifikaci, kdy mohlo dojít ke ztrátě kationtu doprovázené rozvolněním struktury (Tylichová et al., 2010).

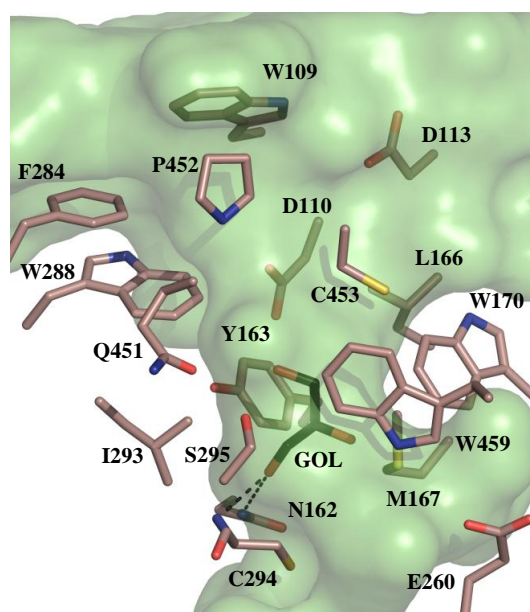
#### 2.1.2.2.2 Vazba koenzymu

$\text{NAD}^+$  vstupuje do dutiny koenzym-vazebného místa a interakcí s aminokyselinovými rezidui se váže na enzym.  $\text{NAD}^+$  může zaujmout dvě rozdílné konformace – hydrolytickou a hydridtransferovou. Naměřená data ukazují, že hydridtransferovou konformaci zaujímá pouze oxidovaná forma koenzymu, zatímco hydrolytickou formu zaujímá pouze redukováná forma koenzymu ( $\text{NADH}$ ). Rozdílná konformace oxidované a redukové formy kofaktoru může být tedy jedním z hlavních

motorů reakce (Perez-Miller a Hurley, 2003) Bylo zjištěno, že AMADH fungují i s jinými kofaktory než jenom  $\text{NAD}^+$ . Jako nejlepší zkoumaný alternativní kofktor se jeví hypoxantinový derivát NAD, který místo adeninu obsahuje hypoxantin. Naproti tomu  $\text{NADP}^+$  se jeví jako velmi špatný akceptor elektronů, kvůli své 2'-fosfátové skupině, která zabraňuje jednoduchému vstupu do vazebného místa kofaktoru kvůli interakci s glutamátovým residuem - Glu188 podle PsAMADH2 číslování (Tylichová et al., 2010).

### 2.1.2.2.3 Aktivní místo

Aktivní místo leží na opačné straně než NAD-vazebné místo. Mezi těmito dvěma kavitami leží kalaytický cystein a spolu s dalšími dvěma residui, přesněji N162 a E260 a spolu tvoří aktivní místo v základně substrátového kanálu. Cystein (C294 podle PsAMADH číslování) je natočen k vazebnému místu pro substrát (Tylichová et al., 2010). Aktivní místo AMADH má trychtýřovitý tvar (Obr. 4), jeho velikost je ovlivněna aminokyselinovými residui, kterými je aktivní místo tvořeno. Jednotlivá residua mají vliv na substrátovou specifitu. Pro průběh reakce je nezbytný již zmíněný cystein, který váže molekulu substrátu výše popsaným způsobem. Residuum N162 je důležitý hlavně pro vazbu kyslíku substrátu během katalýzy. Uvnitř aktivního místa jsou umístěny residua Y163, W170 a W459 (do jisté míry to platí i pro L166 a M167), která jsou zodpovědná za udržení optimálního tvaru a průměru aktivního místa, které umožňuje vhodnou orientaci substrátu vůči C294, což umožňuje efektivní oxidaci (Kopečný et al., 2011).

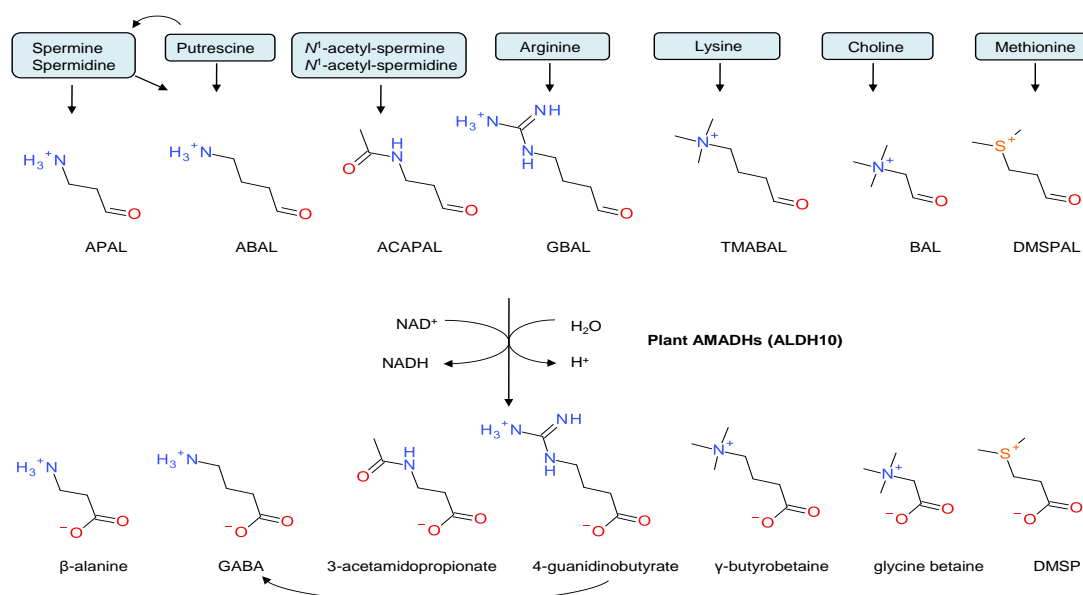


**Obr. 4 – Substrátový kanál PsAMADH2** – Pohled zblízka na substrátový kánál PsAMADH2, do aktivního místa byla navázána molekula glycerolu, vodíková vazba mezi glycerolem a enzymem je znázorněna přerušovanou čarou (převzato z Tylichová et al., 2010).

### 2.1.2.3 Substrátová specifická

Aldehyddehydrogenasy oxidují široké spektrum substrátů. Nejdůležitějšími substráty AMADH jsou aminoaldehydy vznikající rozkladem polyaminů a to 3-aminopropionaldehyd (APAL) a 4-aminobutyraldehyd (ABAL), dále 3-acetamidopropionaldehyd (ACAPAL) vznikající z N<sup>1</sup>-acetyl-spermidinu a N<sup>1</sup>-acetyl-sperminu, 4-guanidinobutyraldehyd (GBAL) vzniklý přeměnou argininu, N,N,N-trimethyl-4-aminobutyrylaldehyd (TMABAL) vzniklý přeměnou argininu, betainaldehyd (BAL) vznikající z cholinu. Je možná i oxidace dimethylsulfopropionaldehydu (DMSP), který vzniká z methioninu (Kopečný et al., 2013). Všechny výše uvedené substráty jsou oxidovány na příslušné aminokyseliny (Obr. 5).

Aminoaldehyddehydrogenasy mohou oxidovat i aldehydy odvozené od látek obsahující dusíkaté heterocykly – pyridinu, purinu, 7-deazapurinu a pyrimidinu. Jejich hodnoty Michealisových konstant jsou ve většině případů velmi malé, jen málo sloučenin tohoto typu se dá považovat za vhodné substráty i přesto že jsou za vysokých koncentrací velmi efektivně odbourávány (Frömmel et al., 2011). Rostlinné AMADH vykazují velkou míru homologie sekvence aktivního místa (Tab. 2).



Obr. 5 – Schéma přeměny aminoaldehydů na příslušné aminokyseliny, převzato z Kopečný et al., 2013

Tab. 2 – Sekvence aktivních míst enzymů ALDH10 z různých rostlin, převzato z Kopečný et al., 2013

	W109	D110	D113	N162	Y163	L166	M167	W170	E260	F284	W288	I293	C294	S295	I444	Q451	P452	C453	W459	C-term
PsAMADH2	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	H	C	S	H	Q	P	C	W	AKL
PsAMADH1	A	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	F	H	C	S	H	Q	P	S	W	SKL
SlAMADH1	A	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	A	V	C	S	H	Q	P	T	W	SKN
SlAMADH2	S	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	H	C	S	H	Q	P	C	W	SKL
ZmAMADH1a <sup>†</sup>	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	H	C	S	H	Q	P	C	W	SKL
ZmAMADH1b	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	H	C	S	H	Q	P	C	W	SKL
ZmAMADH2	G	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	A	V	C	S	H	Q	P	C	W	SKL
*OsAMADH1	G	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	A	V	C	S	H	Q	P	C	W	SKL
*OsAMADH2 <sup>†</sup>	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	H	C	S	H	Q	P	C	W	SKL
*HvAMADH1	A	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	F	V	C	S	H	Q	P	T	W	SKL
*HvAMADH2 <sup>†</sup>	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	H	C	S	H	Q	P	C	W	AN-

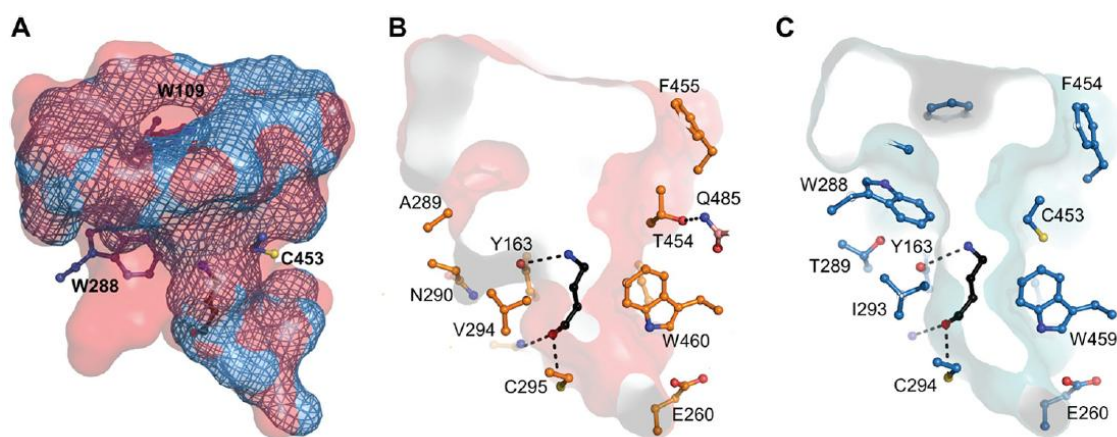
Povrchové elektrostatické potenciály substrátového kanálu jsou velmi rozdílné u AMADH a u ostatní enzymů ALDH nadrodiny. U rodin, které váží aldehydy nesoucí negativní náboj, se vyskytuje povětšinou kladný povrchový potenciál, což kontrastuje s negativním povrchovým nábojem aminoaldehyddehydrogenas (Riveros-Rosas et al., 2013).

Substrátová specificita je ovlivněna přítomnými aminokyselinovými residui. Residua D110 a D113 (dle PsAMADH2 číslování) jsou nezbytná pro vysokou afinitu AMADH k  $\omega$ -aminoaldehydům. Při jejich nahrazení alaninem došlo k výraznému snížení afinity k testovaným substrátům. Nahrazením residua W288 alaninem došlo ke dvojnásobnému zvýšení aktivity s GBAL a TMABAL. W288 váže atom dusíku substrátu a jeho odstraněním dochází k rozšíření substrátového kanálu a nejspíše zeslabení  $\pi$ -elektronové interakce s elektrofilní aminoskupinou. Vysoce konzervovaná aromatická residua Y163 a W170 hrají důležitou roli v PsAMADH2 – kotví svými postranními řetězci molekuly substrátu pomocí van der Waalsových interakcí. Při nahrazení Y163 alaninem došlo k významnému poklesu aktivity s APAL a nárůstu  $K_m$ , což ukazuje na důležitost vodíkové vazby vytvářené mezi aminoskupinou substrátu a hydroxylovou skupinou Y163. Naproti tomu při nahrazení W170 alaninem došlo k rapidnímu snížení aktivity s ABAL. Při nahrazení těchto residuí (Y163 a W170) dochází tedy k rozšíření substrátového kanálu. Dopad mutace Y163 na aktivitu byl menší, jelikož jeho funkci může substituovat D110 lokalizovaný nad ním. Naproti tomu poblíž W170 není žádné residuum, které by mohlo alterovat jeho funkci. (Kopečný et al., 2011). Residua Y163, W170, W288 a W459 jsou u betainaldehyddehydrogenasy ze špenátu zeleného - *Spinacia oleracea* (SoBADH) zodpovědné za vysokou afinitu tohoto enzymu k betainaldehydu. To je způsobeno čtyřmi aromatickými residui, jejichž  $\pi$ -elektrony interagují s kladným nábojem na glycin betainu (Diaz-Sanchez et al., 2013)

Z hlediska substrátové specificity je zajímavá AMADH1 z lilku rajče (*Solanum lycopersicum*) - SlAMADH1. Jeho substrátová specificita je poměrně široká a tímto se liší od jiných zkoumaných AMADH. Také vykazuje nejvyšší limitní rychlost s ABAL,



oproti jiným AMADH, které zpravidla mají nejvyšší limitní rychlost s APAL. Je unikátní také tím, že mezi studovanými enzymy má na pozici 454 threonin místo obvyklého cyteinu (C453 u PsAMADH2). To má za následek změnu v objemu substrátového kanálu (Obr. 6). Porovnání SIAMADH1 a známých struktur rostlinných AMADH odhalilo jiné umístění čtyř aminokyselinových zbytků (od T454 po D457). Díky odlišné poloze těchto zbytků dochází k otevření substrátového kanálu SIAMADH1. T454 je nejvíce ovlivněn, dochází k jeho posunutí o 1,8 Å od aktivního místa, což dovoluje jeho postrannímu řetězci vytvořit vodíkovou vazbu s Q485 – atomem oligomerizační domény druhé podlejnotky (Obr. 6). Tato změna pozice T454 postranního řetězce vede k většímu a méně polárnímu substrátovému kanálu, což má za následek vyšší míru oxidace alifatických a aromatických aldehydů. U PsAMADH je na této pozici C453, jehož postranní řetězec míří dovnitř a činí tak substrátový kanál menší a polárnější. Lze zde pozorovat rozdíl i na pozici 289 (288 u PSAMADH2), kdy u SIAMADH1 je přítomen alanin, kdežto u PsAMADH2 je přítomen tryptofan. Alanin ještě zvětšuje substrátový kanál a lze říci, že kombinace těchto dvou změněných reziduí u SIAMADH1 (A289 a T454) způsobuje širokou substrátovou specifitu tohoto enzymu (Kopečný et al., 2013).



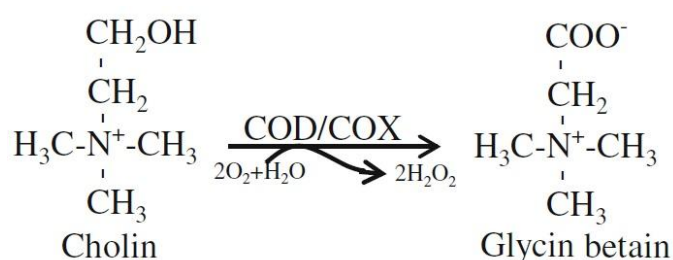
**Obr. 6 – Substrátové kanály SIAMADH1 a PsAMADH2** – A) Porovnání objemu substrátových kanálů SIAMADH1 (červená) a PsAMADH2 (modré síťování) B) a C) Zobrazují objem substrátových kanálů SIAMADH1 (B – červená) a PsAMADH2 (C – modrá) v příčném řezu.

#### 2.1.2.4 Využití ALDH10 enzymů pro produkci transgenních rostlin

Transgenní rostliny získávají v poslední době na oblibě. Jejich úprava je zatím spíše ve zvýšení tolerance vůči herbicidům, nebo ve zvýšení odolnosti vůči biotickým stresovým podmínkám. Všechny transgenní rostliny sice mohou být pěstovány na všech druzích půdy, nemají ovšem schopnost odolávat abiotickému stresu. Proto bylo provedeno několik experimentů, kdy byly vytvořeny transgenní linie rostlin, které patří mezi rostliny neakumulující glycin betain (Ahmad et al., 2013)

Při vytvoření transgenních linií batátů (*Ipomoea batatas*), kdy byly pomocí *Agrobacteria tumefaciens* vytvořeny rostliny nesoucí gen pro tvorbu špenátové betinaldehydrogenasy. Batáty sice patří mezi GB akumulující rostliny, ale zvýšením exprese GB pomocí vloženého genu došlo ke zvýšení odolnosti vůči abiotickému stresu – zde byl sledován salinitní stres, oxidativní stres a teplotní stres, přesněji řečeno snášení nízkých teplot (Fan et al., 2012).

Rýže (*Oryza sativa*) je snadno ovlivněna různými abiotickými stresy a neakumuluje GB. Byla proto vytvořena její transgenní varianta, do které byl vložen *codA* gen z *Agrobacterium globiformis* kódující cholin oxidasu pro produkci GB. Transgenní rostliny lépe udržovaly míru aktivity fotosyntézy a lépe se vyrovnávaly se stresujícími podmínkami (odstraňování reaktivních forem kyslíku). Cholin oxidasa vytváří glycin betain v jednom kroku, za současného vzniku peroxidu vodíku (Obr. 7). Ten svým vznikem aktivoval další geny produkující enzymy sloužící ke zmírnění stresu (Kathuria et al., 2009).



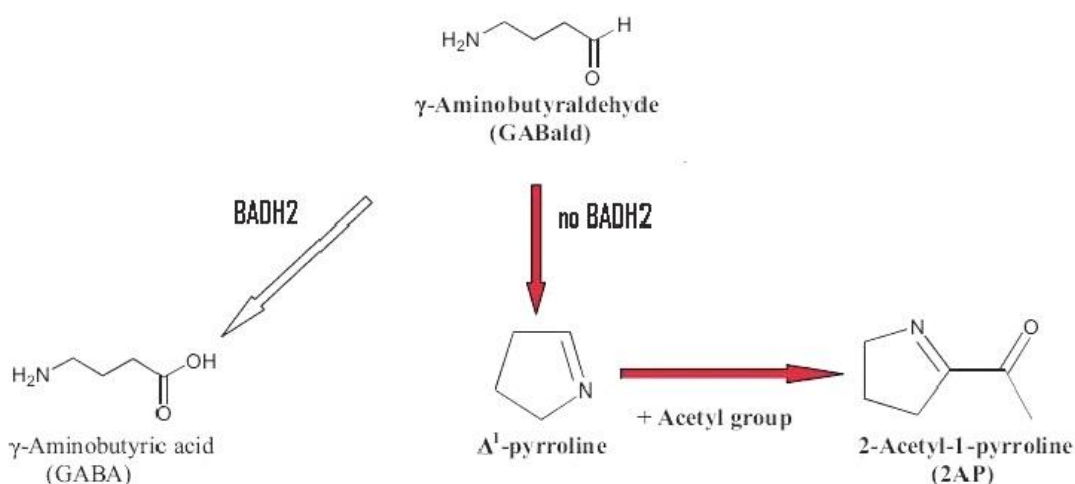
Obrázek 7 – Přeměna cholinu na glycin betain cholin oxidasou – upraveno podle Ahmad et al., 2013

Lze tedy vidět, že zvýšení produkce GB v rostlinách vede ke zvýšené toleranci vůči abiotickému stresu. Za zvážení stojí také kombinace několika genů a využití jejich synergie pro dosažení optimálního výsledku (Ahmad et al., 2013). Například simultánní zavedení genů pro cholinoxidasu, superoxiddismutasu a askorbát peroxidásu do brambor vedlo ke zlepšení chování rostlin ve stresových podmínkách zahrnujících vysokou salinitu, oxidativní stres a sucho (Ahmad et al., 2010). Nebo kombinace dvou

linií kukuřice obsahující cholinoxidasu z *E. coli* (*betA*) a gen pro produkci vakuolové protonové pumpy - V-H<sup>+</sup>-PPasa z *Thellungiella halophila* (*TsVP*) vedlo ke zvýšení tolerance vůči suchu v linii, která obsahovala oba geny (Wei et al., 2011) Využití takových rostlin v zemědělství v nehostinných podmínkách Afriky, Indie, Pakistánu a Číny k vyprodukování dostatečného množství potravy pro tamní populaci je více než žádoucí. Dokonce by těchto genetických manipulací mohlo být využito k vylepšení stresové tolerance stromů aby lépe snášely nepříznivé podmínky a pomocí takto upravených rostlin bojovat proti rozšiřování pouští. Jedinou nevýhodou je absence studií, které by hodnotily výnos takto upravených plodin přímo v terénu (Ahmed et al., 2013).

### 2.1.2.5 Vliv ztráty AMADH aktivity na aroma rýže (*Oryza sativa*)

K aromatu v rýži přispívá nespočet sloučenin. Bylo zjištěno, že primární příčinou charakteristického aroma jasmínové a basmati rýže je sloučenina 2-acetyl-1-pyrrolin (2AP). K aromatu u rýže přispívá mnoho genů, ukázalo se však, že příčinou akumulace 2AP je jediný recesivní gen – *fgr*, který kóduje nefunkční alelu rýžové BADH2 (Fitzgerald et al., 2009). Za normálních podmínek vytváří BADH (AMADH) enzymy z 4-aminobutyraldehydu (ABAL)  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu (GABA). Pokud ale chybí funkční enzym, který by odbourával ABAL, dochází k jeho akumulaci a spontánní cyklizaci a reakci s acetylovou funkční skupinou, což poté vede k vytvoření 2AP (Obr. 8) (Bradbury et al., 2008).



**Obr. 8 – Schéma přeměny 4-aminobutyraldehydu na 2-acetyl-1-pyrrolin** – Přeměna ABAL za přítomnosti aktivní AMADH - bílá šipka a vznik 2AP přes  $\Delta^1$ -pyrrolin při neaktivitě AMADH - červená šipka (upraveno podle Baradbury et al., 2008).

Identifikace způsobu přerušení jedné z drah vedoucí k syntéze GABA, který zároveň vede k otázce, zda toto přerušení GABA syntézy vede ke zhoršení výnosu rostlin, protože hladina GABA se v rýži zvyšuje při salinitním stresu. AMADH v rýži se podílí na toleranci vůči stresům, a protože rýže patří k rostlinám, které neakumulují glycin betain, proto je zde jejich hlavním substrátem ABAL. Bylo dokázáno, že GABA gradient hraje důležitou roli při vývoji pylových tyčinek. AMADH v rýži tedy mohou za stresových podmínek napomáhat k udržení GABA gradientu, a narušení tohoto procesu v rámci zvýšení produkce 2AP by mohlo inhibovat růst a výnos z rostlin (Bradbury et al., 2008).

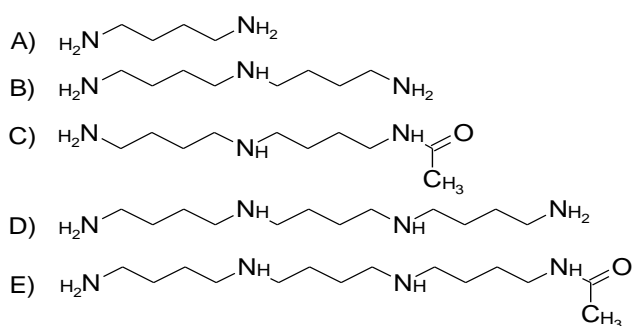
## 2.2 Metabolismus aminoaldehydů

### 2.2.1 Metabolismus $\omega$ -aminoaldehydů

$\omega$ -aminoaldehydy (APAL, ABAL, AcAPAL) vznikají odbouráváním polyaminů (spermin, spermidin, putrescin, *N*-acetylspermin a *N*-acetylspermidin) (Obr. 9) aminoxidasami (Buchanan et al., 2000).

#### 2.2.1.1 Polyaminy

Polyaminy se nacházejí ve všech živých organismech, avšak jejich význam v rostlinách byl objeven teprve nedávno. Jsou nezbytné pro růst a vývoj jak prokaryotických, tak eukaryotických buněk. Jejich koncentrace korelují s frekvencí dělení buněk a polyaminy stimulují mnoho reakcí, které se podílejí na syntéze DNA, RNA a proteinů. Kvůli jejich polykationtové povaze mají polyaminy vysokou afinitu k aniontovým sloučeninám, jako jsou DNA, RNA, fosfolipidy, či záporně nabitě skupiny v membránách a buněčných stěnách. V rostlinách polyaminy vyvolávají rozmanité fyziologické pochody jako dělení buněk, embryogenezi, růst květů, zrání plodů a vytváření hlíz. Jejich hladina je mnohem vyšší než kupříkladu cytokininů, pro indukci biologické odpovědi jsou potřeba řádově milimoly. Zdá se, že polyaminy v rostlinách nevystupují přímo jako hormony, ale spíše, jako u savců, se spíše, ať už přímo či nepřímo, účastní několika důležitých metabolických drah, které jsou důležité pro efektivní fungování na buněčné úrovni. Nejčastěji se vyskytující polyaminy jsou spermin, spermidin a putrescin (Buchanan et al., 2000).



**Obrázek 9 – Struktury vybraných polyaminů** – A) putrescin, B) spermidin, C) *N*-acetylspermidin, D) spermin, E) *N*-acetylspermin

### 2.2.1.2 Syntéza polyaminů

V rostlinách probíhá syntéza polyaminů stejně jako v ostatních organismech z argininu, ovšem na rozdíl od buněk savců a hub, mají rostliny, stejně jako mnoho mikroorganismů, dvě metabolické dráhy, které vedou ke vzniku putrescinu. V první z nich je arginin napřed dekarboxylován arginindekarboxylasou a poté je vzniklý agmatin hydrolyzován agmatinasou (agmatinamidinohydrolasa) na putrescin za vzniku močoviny. V rostlinách existuje ještě navíc možnost vzniku putrescinu z agmatinu přes *N*-karbamoylputrescin, kdy po reakci agmatinu a agmatiniminohydrolasy vzniká amoniak a *N*-karbamoylputrescin, který je následně hydrolyzován *N*-karbamoylhydrolasou za vzniku amoniaku, oxidu uhličitého a putrescinu.

Druhou drahou vedoucí k putrescinu je odštěpení močoviny z argininu arginasou a následná dekarboxylace vzniklého ornithinu ornithindekarboxylasou.

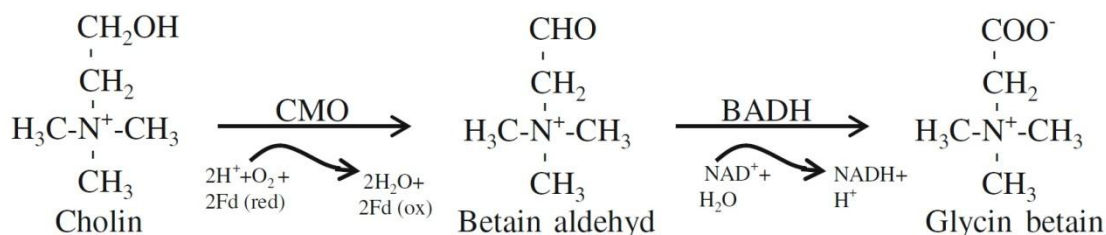
Spermidin vzniká z putrescinu přidáním aminopropylové skupiny, která je získána z dekarboxylovaného *S*-adenosylmethioninu. Tento krok je katalyzován aminopropyltransferasou (spermidinsynthasou). Spermin vzniká obdobně, tzn. přidáním aminopropylové skupiny z dekarboxylovaného *S*-adenosylmethioninu k spermidinu. Syntéza sperminu a spermidinu je limitována přítomností donoru aminopropylové skupiny, tedy *S*-adenosylmethioninu. Jako klíčové enzymy regulující syntézu polyaminů se jeví ornithindekarboxylasa a *S*-adenosylmethionindekarboxylasa. Jejich aktivita je ovlivňována dostupností příslušného substrátu (Morgan, 1999).

### 2.2.1.3 Katabolismus polyaminů

Polyaminy jsou v rostlinách rozkládány dvěma typy aminoxidas – diaminoxidasami a polyaminoxidasami. Diaminoxidasy (obsahující topachinonový koenzym) produkují aminoaldehydy z putrescinu, kadaverinu a spermidinu za současného vzniku amoniaku a peroxidu vodíku. Polyaminoxidasy (obsahující FAD koenzym) katabolizují přeměnu pouze sperminu a spermidinu a jejich acetylovaných derivátů (Buchanan et al., 2000). Acetylované deriváty sperminu a spermidinu vznikají reakcí s acetylkoenzymem A katalyzovanou spermidin<sup>N</sup><sup>1</sup>-acetyltransferasou, kdy je na dusík navázán acetylový zbytek. Tyto deriváty (*N*-acetylspermin a *N*-acetylspermidin) jsou poté rozkládány na 3-acetamidopropionaldehyd a další produkty. Vzniklé aminoaldehydy jsou odbourávány pomocí enzymů ALDH10 rodiny (Seiler, 2004).

## 2.2.2 Betainaldehyd

Betainaldehyd (BAL), který slouží jako prekurzor glycin betainu (GB) vzniká oxidací cholinu cholinmonooxygenasou (Obr. 10). GB je rostlinami hojně využívaný osmoprotektor, stejně jako jiné betainy ( $\beta$ -alanin betain, prolin betain) (Buchanan et al., 2000).



Obr. 10 – Schéma syntézy glycin betainu z cholinu – upraveno podle Ahmad et al., 2013

### 2.2.2.1 Syntéza glycin betainu

Prekurzor betain aldehydu, cholin, je syntetizován dvěma různými způsoby, podle druhu rostliny. Ve špenátu a cukrové řepě je syntetizován z fosfoethanolaminu, který je methylován na fosfocholin a ten je poté přímo hydrolyzován na cholin. Naproti tomu v ječmeni je pro syntézu glycin betainu využit cholin, který vzniká z membránového lipidu fosfatidylcholinu (Buchanan et al., 2000). Cholin je na BAL oxidován cholinmonooxygenasou, což je monomerní, ferredoxin dependentní stromatální enzym (Rathinasabapathi et al., 1997). Glycin betain je z BAL syntetizován betainaldehyddehydrogenasou, což je  $\text{NAD}^+$  dependentní enzym (Buchanan et al., 2000). Jak již bylo uvedeno výše, betainaldehyddehydrogenasy patří k aminoaldehyddehydrogenasám, tedy do rodiny ALDH10.

### 2.2.2.2 Význam glycin betainu

GB je plně N-methyl substituovaný derivát cholinu. Je využíván rostlinami jakožto osmoprotektant. Není ovšem syntetizován všemi druhy rostlin, rostliny se podle míry jeho akumulace dělí na GB akumulující a GB neakumulující. Mezi GB akumulující rostliny patří například špenát zelený (*Spinacea oleracea*), laskavec (*Amaranthus hypochondricanus*) či některé kultivary kukuřice (*Zea mays*). Mezi GB neakumulující rostliny patří kupříkladu již zmíněná kukuřice (*Zea mays*), rýže (*Oryza sativa*), rajče (*Solanum lycopersicum*) či batáty (*Ipomoea batatas*). GB se vyskytuje v cytoplasmě rostlinných buněk, u neakumulujících rostlin jsou velmi nízké, obvykle 100 – 1000x nižší než u akumulujících rostlin (Rhodes a Hanson, 1993).

GB chrání rostliny před různými stresovými podmínkami abiotického původu. Exogenně aplikovaný GB se vstřebává listy či kořeny a poté je rozváděn do celé rostliny. Bylo prokázáno, že bývá transportován do rostoucích částí rostlin. Při exogenní aplikaci dochází ke zvýšení odolnosti rostliny vůči abiotickým stresovým podmínkám – sucho, chlad, mráz, vysoká salinita či oxidativní stres. Různé studie také prokázaly zvýšenou odolnost rostlin neakumulujících GB, když do nich byla vložena metabolická dráha pro syntézu GB (Chen a Murata, 2008). Rostliny většinou čelí více druhům abiotického stresu naráz, GB zde funguje jako chemický chaperon, kdy napomáhá udržení kvarterní a terciární struktury enzymů, či jako molekulární chaperon kdy napomáhá znovunabytí struktury proteinů a zvyšuje tak jejich teplotní stabilitu. GB hraje taky roli v ochraně proti reaktivním formám kyslíku, a není jasné zda GB reaguje přímo s reaktivními formami kyslíku, ale je jisté, že zmírnění následků oxidativního stresu pomáhá stabilizací enzymatické aktivity enzymů podílejících se na odbourávání reaktivních forem kyslíku (Ahmad et al., 2013).



## 3 Praktická část

### 3.1 Materiál a chemikálie

#### 3.1.1 Biologický materiál a další

- Expresní buňky *E. coli* T7 (NEB) nesoucí geny *ZmAMADH1a*, *ZmAMADH1b* a *ZmAMADH2* v plasmidu pCDF Duet (NEB), připravené vedoucím práce podle postupu uvedeného v Tylichová et al., 2010
- Běžné vybavení laboratoře – kádinky, pipety, špičky, etc.

#### 3.1.2 Použité chemikálie

- 3-aminopropionaldehyd diacetal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- 4-aminobutyrylaldehyd diacetal (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- B-PER (Thermoscientific, USA)
- BioSafe Boomassie (Bio-Rad, USA)
- betainaldehyd chlorid (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- dodecylsírnan sodný (Bio-Rad, USA)
- DNAsa (TopBio, CZ)
- glukosa (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- glycerol (Lachema, SRN)
- glycin (Sigma-Aldrich, SRN)
- guanidin (Fluka, SRN)
- hydroxid sodný (Lachner, CZ)
- chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- chlorid sodný (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- imidazol (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- inhibitor proteas (Thermoscientific, USA)
- kyselina chlorovodíková (Lachema, SRN)
- Laemliho vzorkovací pufr (Bio-Rad, USA)
- LB-medium (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- lysozym (E. Merck, SRN)
- močovina (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- *n*-butanol (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- nikotinamidadeninukleotid (Sigma-Aldrich, SRN)

- *N,N'*-methylen-bisakrylamid (Bio-Rad, USA)
- *N,N,N',N'*-tetramethylethylenamid (Bio-Rad, USA)
- Persteril (Overlach, CZ)
- Protein Ladder (10-250 kDa) (New England Biolabs, UK)
- RNAsa (TopBio, CZ)
- streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)

### 3.2 Přístrojové vybavení

- analytické váhy (Sartorius)
- centrifuga (Sigma)
- centrifuga (Eppendorf, SRN)
- centrikony
- digitální pH metr (Multical WTW, SRN)
- elektroforetická cela (Bio-Rad, USA)
- elektromagnetická míchačka (IKA, SRN)
- His selected cobalt affinity gel (Sigma-Aldrich, SRN)
- laminární box (Faster, IT)
- PCR thermocycler (Eppendorf, SRN)
- spektrofotometr LightWave II UV-Vis II diode array UV/Visible (Biochrom Ltd, UK)
- třepačka RCT basic (IKA, SRN)
- ultrafiltrační zařízení Amicon 30 kDa (Millipore, USA)
- vortex (Stuart, UK)

### 3.3 Metody

#### 3.3.1 Expres rekombinantních ZmAMADH v *E. coli*

Do tří Erlenmayerových baněk o objemu 50 ml bylo dáno 20 ml Lauria-Bertani (LB) média, 1 ml 20% glukosy (finální koncentrace 1%), streptomycin (finální koncentrace 50 µg/ml) a 5 µl kultury *E. coli* nesoucí gen pro produkci rekombinantního proteinu (*ZmAMADH1a*, *1b* a *2*). Prekultura byla inkubována přes noc na třepačce při 37°C a 180 rpm. Po inkubaci byly prekultury zcentrifugovány (4000 g, 5 minut, 20°C) a přeneseny do Erlenmayerových baněk o objemu 500 ml, obsahujících 200 ml LB media se streptomycinem (finální koncentrace 50 µg/ml) a inkubovány na třepačce při 30°C 0,5 – 1,5 h. Po dosažení požadovaného množství bakterií, kdy optická densita při

vlnové délce 600nm byla 0,6, bylo do kultur napipetováno 200  $\mu$ l 0,5 M IPTG (finální konc. 0,5 mM). Indukce probíhala přes noc na třepačce při 20°C a 180 rpm.

### 3.3.2 Extrakce ZmAMADH

Kultury po indukci byly přelity do 0,5 l kyvet a zcentrifugovány (4000 g, 20 minut, 4°C), supernatanty byly odstraněny a pellety byly resuspendovány ve 30 ml 0,9% NaCl a znovu centrifugovány (4000 g, 10 minut, 4°C). Pellety byly dále resuspendovány ve 3 ml extrakčního pufru obsahujícího 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ l inhibitoru proteas a vodu. Po vortexování byly přidány 3 ml B-PERu, následovalo opětovné vortexování a 10 minut stání při laboratorní teplotě. Po přidavku 50  $\mu$ l lysozymu (10 mg/mL) a vortexování se kultury nechaly stát při lab. teplotě 30 minut. Obsah flakonek byl poté doplněn vodou na konečný objem 10 ml, bylo přidáno 8  $\mu$ l RNAsy a 5  $\mu$ l DNAsy a po mírném promíchání byl inkubován 30 minut při 37°C. Po inkubaci byl přidán 1 ml 1M NaCl, 1 ml 50% glycerolu a lyzáty byly zcentrifugovány (12000 g, 30 minut, 4°C). Supernatant byl dále použit pro purifikaci.

### 3.3.3 Purifikace ZmAMADH

Purifikace byla provedena na kolonách pro afinitní chromatografii s imobilizovanými Co<sup>2+</sup> ionty (His selected cobalt gel, Sigma-Aldrich). Co<sup>2+</sup> ionty interagují s histidinovou kotvou na proteinech a zabraňují jejich vymytí z kolony. Vymývání bylo prováděno pomocí imidazolu centrifugací (300 g, 1 minuta).

Na kolony které byly promyty ekvilibračním pufrem (20mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM NaCl, 5% glycerol, 10mM imidazol) byl nanesen supernatant po extrakci a kolony byly inkubovány na rotátoru 1 hodinu při 4°C. Po inkubaci byla centrifugací (300g, 1 min) získána frakce částic které se nezachytily (tzv. flow-through frakce). Kolonky byly dále promývány ekvilibračním pufrem a poté byl dvakrát přidán eluční pufr a kolona byla inkubována na rotátoru po 30 minut při 4°C. Frakce získané promytím kolon elučním pufrem byly spojeny a zakoncentrovány pomocí centrifugační filtrací (Centricon, Millipore) na konečný objem 1-2 ml a promývány promývacím roztokem (20mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM NaCl, 5% glycerol). Přečištěný enzym byl poté zamražen a uchováván pro měření při -20°C.

### 3.3.4 Kontrola purifikace pomocí SDS-PAGE

Pro kontrolu exprese proteinu byly odebrány 1 ml kultury před a po indukci IPTG, 1 ml supernatantu po extrakci, 1 ml roztoku pelletu po extrakci rozpuštěného v 1 ml 8M močoviny, 1 ml nezachycené frakce (flow-through frakce) a 1 ml eluátu. Kultury před a po indukci byly zcentrifugovány a rozpuštěny v 50  $\mu$ l 8M močoviny.

Pro elektroforézu bylo odebráno 50 µl výše uvedených frakcí a bylo k nim přidáno 50µl vzorkovacího pufru. Vzorky byly inkubovány 10 minut při 100°C a centrifugovány na mikrocentrifuze.

Do sestavené elektroforetické aparatury byl nalit 12% dělicí gel a byl převrstven n-butanolem. Po jeho ztuhnutí byl n-butanol vylit a povrch gelu byl opláchnut deionizovanou vodou. Do aparatury byl nalit 4% zaostřovací gel a do něj byl vsazen hřebínek. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byly do jamek napipetovány vzorky (10 µl vzorku) a standard (10 µl). Aparatura byla připojena ke zdroji napětí, dokud barvivo neopustilo zaostřovací gel, bylo použito napětí 120V, po přechodu do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 180V. Po ukončení byly gely vyjmuty, opláchnuty destilovanou vodou a přes noc barveny barvivem BioSafe Comassie-Blue(Bio-Rad). Po obarvení byly gely ponořeny do odbarvovacího roztoku (40% metanol, 7% kyselina octová). Složení gelů použitých pro elektroforézu je uvedeno v Tab. 3.

**Tab. 3 – Složení gelů pro SDS-PAGE**

	Přidávaná látka v mL						
	AA (30%)/ BIS (0,8%)	Tris HCl, 1,5M, pH 8,8	Tris HCl, 1,5M, pH 6,8	H <sub>2</sub> O	SDS (10%)	APD (10%)	TEMED
Dělicí gel	4,0	2,5	—	3,2	0,1	0,05	0,015
Zaostřovací gel	0,65	—	1,25	2,95	0,1	0,05	0,015

### 3.3.5 Stanovení obsahu proteinů

Proteiny byly kvantifikovány spektrofotometricky při 280 nm. Absorbance byly měřeny proti deionizované vodě. Pro výpočet koncentrace proteinů bylo využito absorbance daného proteinu při jeho koncentraci 1 mg/ml získané z aminokyselinové sekvence pomocí nástroje ProtParam na portále Expasy.org. Po změření absorbance vhodně zředěného vzorku byla koncentrace vypočítaná pomocí vzorce:

$$C_{vzorek} \left[ \frac{mg}{ml} \right] = \frac{A_{vzorek}}{A_{ProtParam}} * \text{ředění},$$

kde  $A_{ProtParam}$  odpovídá absorbanci daného proteinu při koncentraci 1 mg/ml. Nástroj ProtParam počítá extinkční koeficienty proteinů pomocí Edelhochovy metody (Edelhoc et al., 1967), ovšem využívá extinkční koeficienty pro tryptofan a tyrosin, které byly publikovány v Pace et al., 1995.

### 3.3.6 Měření aktivity ZmAMADH

Aktivita enzymu byla měřena pomocí spektrofotometrického sledování míry přeměny koenzymu NAD<sup>+</sup> na NADH, který má absorpční maximum při vlnové délce 340 nm – tzv. Wartburgův optický test. Základní jednotkou aktivity je 1 katal (1 kat), který je definován jako přeměna 1 molu substrátu za 1 sekundu. Tato jednotka je ovšem příliš vysoká, proto se využívá jednotek menších – nanokatal nebo mikrokatal. Aktivita se počítá podle vztahu:

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

$\Delta A$  udává změnu absorbance,  $\Delta t$  udává dobu reakce v sekundách,  $V$  udává objem reakční směsi v litrech,  $\epsilon$  vyjadřuje molární absorpční koeficient (6220 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pro NADH) a  $l$  udává šířku kyvety v centimetrech.

#### 3.3.6.1 Stanovení pH optima a teplotní stability

Stanovení pH optima bylo prováděno spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm. Byl použit 150 mM glycin/NaOH pufr, o pH 8,6 – 10,4. Reakční směs obsahovala 1,55 ml pufru, 0,015 ml vhodně naředěného enzymu, 0,05 ml 20mM NAD<sup>+</sup>, 0,02 ml 100mM substrátu (APAL) a 0,365 ml vody pro doplnění reakční směsi na konečný objem 2 ml.

Teplotní stabilita byla měřena v rozmezí 30-70°C. Enzym byl inkubován na termocycleru po dobu 30 minut při zvolené teplotě a poté byl přenesen na led. Měření aktivity probíhalo spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm v 1,55 ml 150mM Tris/HCl pufru pH 9,0, reakční směs dále obsahovala 0,05 ml 20mM NAD<sup>+</sup>, 0,02 ml enzymu, 0,02 ml 100mM substrátu (APAL) a 0,36 ml vody.

#### 3.3.6.2 Stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů ZmAMADH

Substráty pro měření byly připraveny dvěma způsoby. APAL a ABAL byly připraveny z diacetalů povařením s 0,2 M HCl na 10 minut, BAL byl připraven z betainaldehyd chloridu rozpuštěním ve vodě. Substrátová specifita byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm se třemi substráty – APAL, ABAL a BAL. Reakční směs obsahovala 1,55 ml 150mM Tris/HCl pufru pH 9,0, 0,05 ml 20mM NAD<sup>+</sup>, 0,01 ml enzymu, 0,37 ml vody a 0,02 ml 10mM roztoku substrátu (finální koncentrace v kyvetě 100 μM).

Saturační křivky byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm se dvěma substráty (APAL, BAL) pro každý enzym. Reakční směs obsahovala 1,55 ml 150

mM Tris/HCl pufru pH 9,0, 0,05 ml 20 mM NAD<sup>+</sup>, enzym (množství se lišila pro každý enzym), substrát a vodu na doplnění do celkového objemu 2 ml. Výsledná koncentrace substrátu se pohybovala v rozmezí 0 – 1000 μM.

Byly stanoveny kinetické parametry konstanta Michaelis-Mentenové ( $K_m$ ) a limitní rychlost ( $V_{lim}$ ), pokud byla pozorována inhibice substrátem, byla stanovena inhibiční konstanta ( $K_i$ ). Kinetické konstanty byly vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism 6, kde byly naměřenými hodnotami proloženy křivky pomocí nelineární regrese podle následujících rovnic:

$$1. \quad v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

$$2. \quad v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S] * \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)}$$

$$3. \quad v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m * \left(\frac{1}{1 + \beta * \frac{[S]}{K_i}}\right) + [S] * \left(\frac{\frac{1 + [S]}{K_i}}{\frac{1}{1 + \beta * \frac{[S]}{K_i}}}\right)}$$

kde [S] udává koncentraci substrátu a  $\beta$  je faktor, který popisuje vliv inhibice substrátem na limitní rychlost. Rovnice (1) byla použita, když nedocházelo k inhibici substrátem, rovnice (2) a (3) zahrnují inhibici substrátem.

## 4 Výsledky

### 4.1 Kontrola exprese pomocí SDS-PAGE

Expres zkoumaných tří kukuřičných AMADH byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézou (Obr. 11). Enzymy mají molekulovou hmotnost ~55 kDa. Na obrázcích lze vidět přítomnost enzymů po indukci. Exprimované proteiny jsou přítomny jak v rozpustné fázi, tak v inkluzních tělískách. Po purifikaci afinitní chromatografií na kolonkách s imobilizovanými  $\text{Co}^{2+}$  ionty (eluát), lze vidět přítomnost jediného bandu odpovídajícího puřifikované AMADH izoformě.

### 4.2 Stanovení obsahu ZmAMADH proteinů

Obsah proteinů byl stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Získaná vlnová délka byla dosazena do vzorce

$$c_{\text{vzorek}} [\text{mg/ml}] = \frac{A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{získaná z ProtParam}}} * \text{ředění}$$

Poté byla spočítána koncentrace enzymu v zásobním roztoku (Tab. 4) a byl stanoven výtěžek (Tab. 5). Výtěžek byl stanoven na 200 ml kultury podle vzorce.

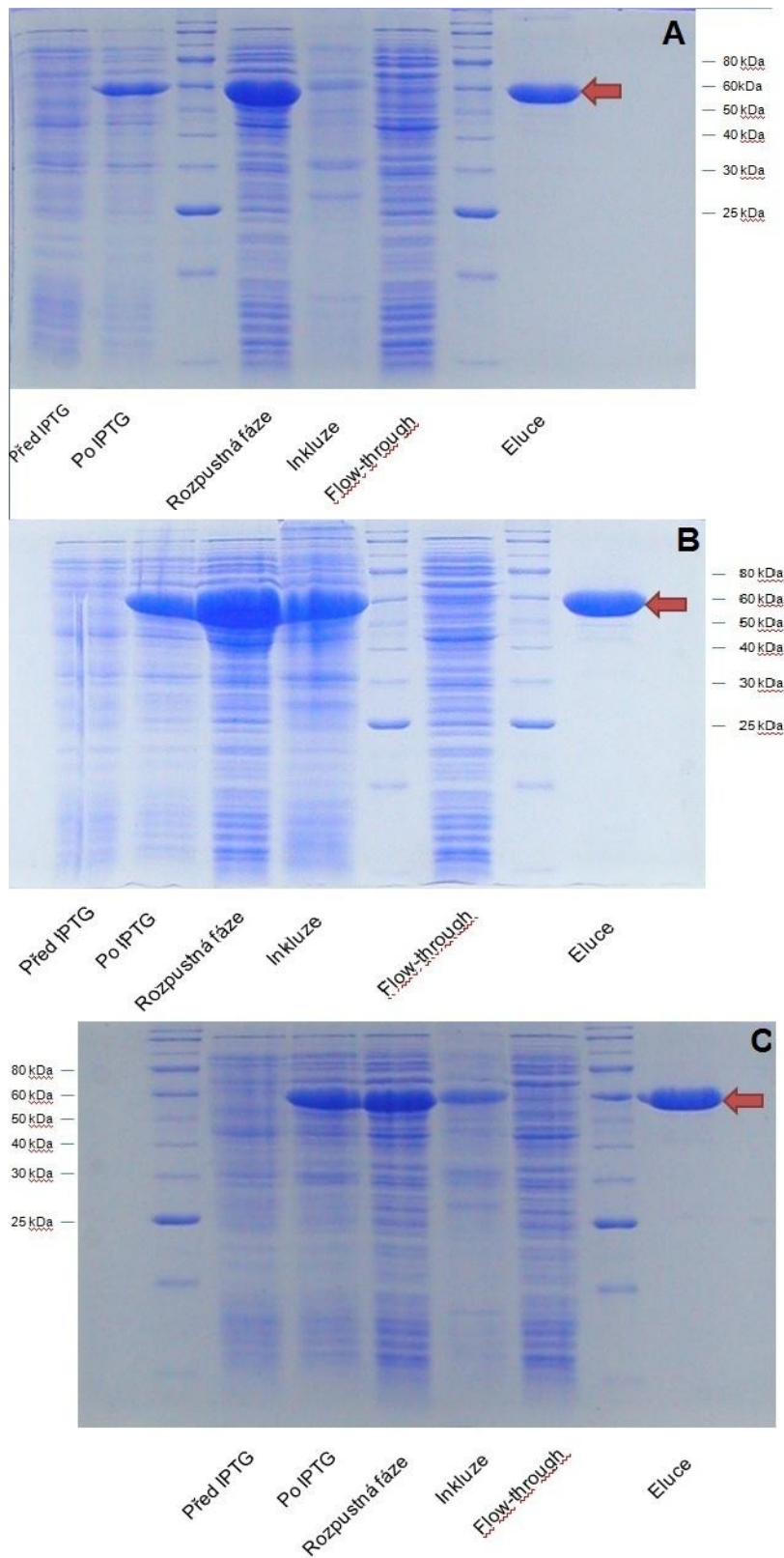
$$x \left( \frac{\text{mg}}{200\text{ml}} \right) = c_{\text{vzorek}} * V_{\text{vzorek}} * \frac{200}{V_{\text{kultura}}}$$

**Tab. 4 – Stanovení obsahu proteinů** – Absorbance získaná nástrojem ProtParam byla pro ZmAMADH1a – 1,546; pro ZmAMADH1b – 1,542 a pro ZmAMADH2 – 1,475

	$A_{\text{vzorek}}$	ředění	$C_{\text{vzorek}}$ ( $\text{mg ml}^{-1}$ )
ZmAMADH1a	0,17983	50	5,81
ZmAMADH1b	0,40023	50	12,98
ZmAMADH2	0,26271	50	8,91

**Tab. 5 – Stanovení výtěžku na 200ml kultury**

	$C_{\text{vzorek}}$ ( $\text{mg ml}^{-1}$ )	$V_{\text{vzorek}}$ (ml)	$V_{\text{kultura}}$ (ml)	Výtěžek ( $\text{mg}/200\text{ml}$ )
ZmAMADH1a	5,81	1,1	400	3,20
ZmAMADH1b	12,98	2	300	17,31
ZmAMADH2	8,91	1,2	400	5,35

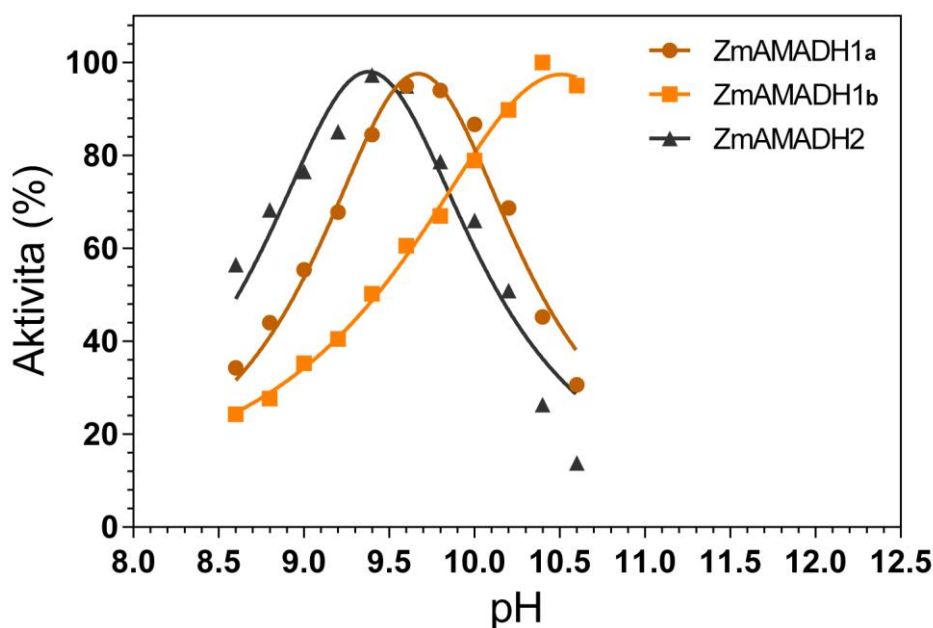


**Obr. 11 - SDS-PAGE ZmAMADH1a (A), ZmAMADH1b (B) a ZmAMADH2 (C)-** Použitý standard 10 – 250 kDa protein ladder, do každé jamky bylo napipetováno 10  $\mu$ l vzorku, šipkou je označen získaný protein. V jednotlivých jamkách je ukázán výskyt proteinu ve sledovaných okamžicích – před a po indukci IPTG, jeho zastoupení v lyzátu buněk *E. coli* a v inkluzních tělískách a dále ve Flow-through podílu získaném chromatografickým přečištěním. Je vidět že získaný enzym je velmi čistý (Eluce).



### 4.3 Stanovení pH optima

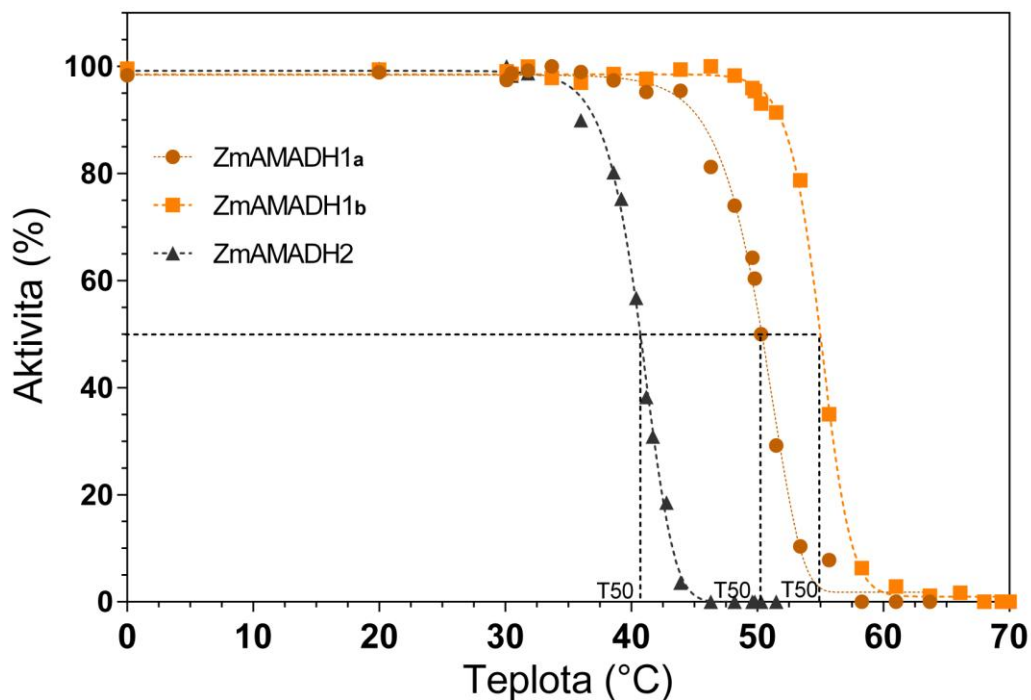
pH optimum jednotlivých AMADH bylo změřeno v 150 mM glycin/NaOH pufru o rozmezí pH 8,6 – 10,6 (Obr. 12). Hodnoty pH optima pro měřené enzymy byly následující – 9,7 pro ZmAMADH1a; 10,4 pro ZmAMADH1b a 9,4 pro ZmAMADH2. Z uvedených pH optim lze vidět, že všechny tři enzymy mají pH optima v zásadité oblasti mezi pH 9,0 – 10,5. ZmAMADH1b má nejvyšší aktivitu ve výrazně zásaditějším prostředí než další dva izoenzymy.



Obr. 12 - pH optimum zkoumaných aminoaldehyddehydrogenas - Měření bylo uskutečněno v prostředí 150 mM glycin/NaOH pH 8,6 – 10,6; 0,5 mM  $\text{NAD}^+$  a 1 mM substrát 3-aminopropionaldehyd(APAL).

### 4.4 Stanovení teplotní stability

Byla změřena teplotní stabilita všech tří kukuřičných AMADH izoenzymů (Obr. 13). Měření bylo provedeno v rozmezí teplot 0 – 70°C. Z výsledků je vidět, že ZmAMADH2 má nižší teplotní stabilitu než dvě zbylé izoformy. Hodnota  $T_{50}$  (což je teplota, při které je zachováno 50% aktivity po 30 minutové inkubaci při dané teplotě) pro jednotlivé enzymy je 50,4 °C pro ZmAMADH1a; 55 °C pro ZmAMADH1b a 40,7 °C pro ZmAMADH2.

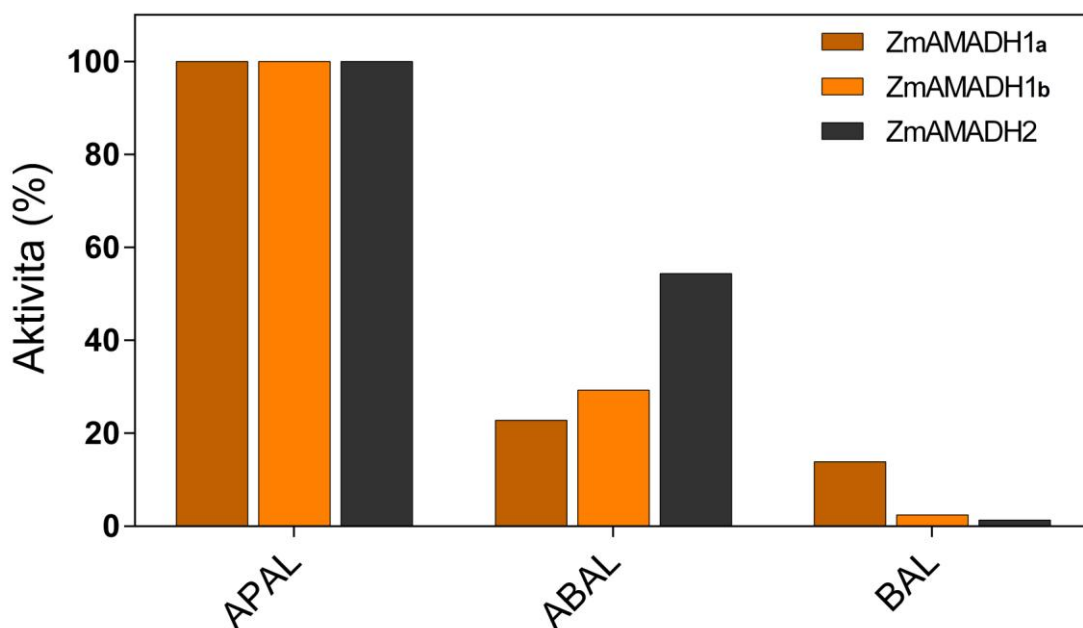


**Obr. 13 – Teplotní stabilita zkoumaných aminoaldehyddehydrogenas** – Měření bylo uskutečněno v prostředí 150 mM Tris/HCl pH 9,0; 0,5 mM NAD<sup>+</sup> a 1 mM 3-aminopropionaldehyd (APAL).

#### 4.5 Stanovení substrátové specifity

Substrátová specifita byla změřena se třemi substráty – 3-aminopropionaldehydem (APAL), 4-aminobutyraldehydem (ABAL) a betinaldehydem (BAL) při 100  $\mu$ M koncentraci (Obr. 14). Největší aktivitu vykazovaly všechny tři enzymy se substrátem APAL, ta byla poté pro jednotlivé enzymy vzata jako 100%. S ABAL vykazovala nejvyšší aktivitu ZmAMADH2 (54 %), ZmAMADH1a a ZmAMADH1b měly afinitu podobnou a přibližně poloviční - 23% pro ZmAMADH1a a 29% pro ZmAMADH1b.

Aktivita s BALu byla u všech tří enzymů relativně nízká. Nicméně ZmAMADH1a oxiduje BAL ve vyšší míře a změřená afinita měla hodnotu 14 %. Oproti tomu, ZmAMADH1b, která je sekvenčně podobná ZmAMADH1a, vykazuje s BAL jen nepatrnou aktivitu (2,4 %) podobně jako ZmAMADH2 (1,3 %)



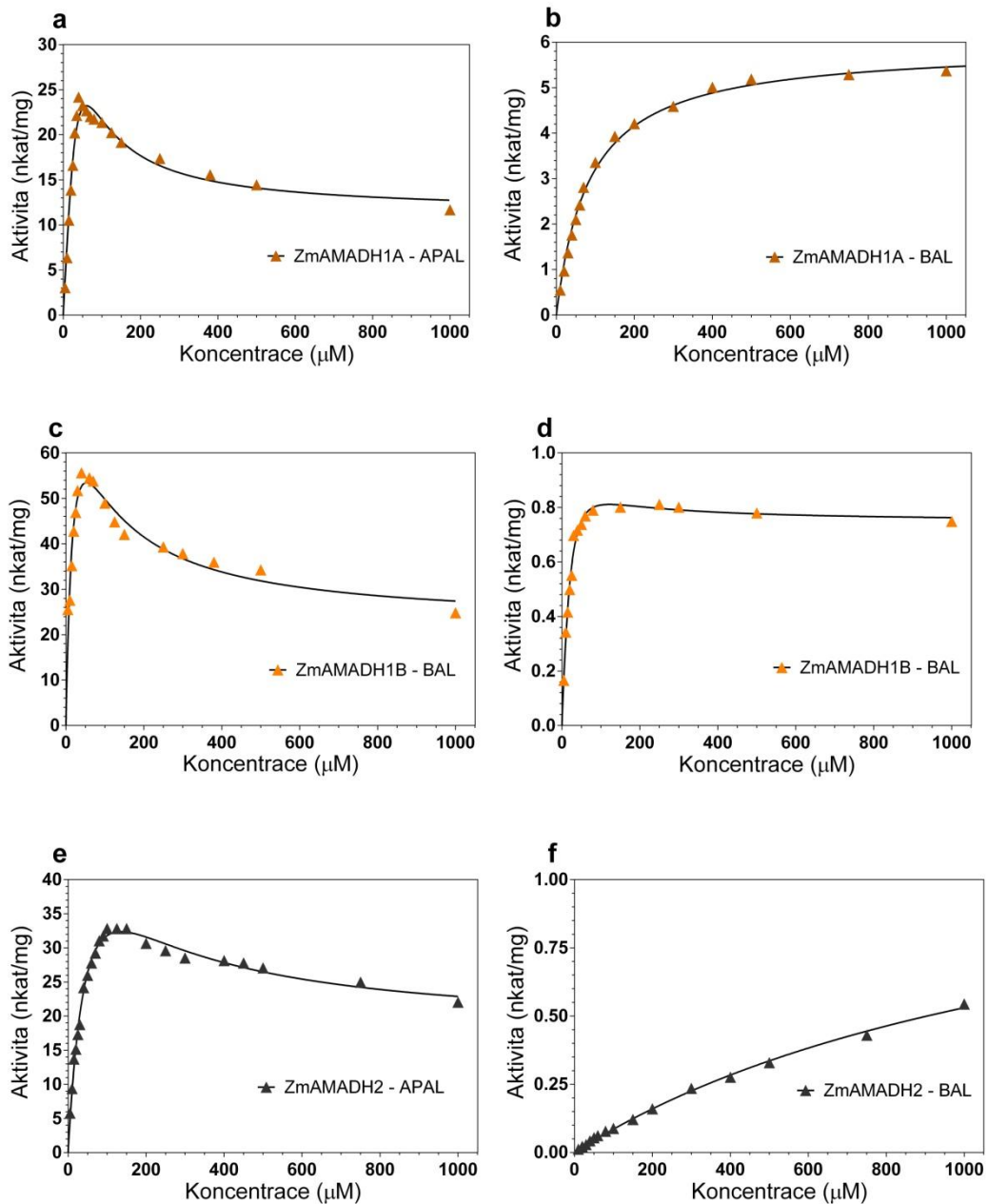
**Obr. 14 – Substrátová specifická zkoumaných aminoaldehyddehydrogenas** - Měření bylo uskutečněno v prostředí 150 mM Tris/HCl pH 9,0; 0,5 mM NAD<sup>+</sup> a substráty 3-aminopropanal (APAL), 4-aminobutanal (ABAL) a betainaldehyd (BAL) o koncentraci 0,1 mM. Aktivita ZmAMADH1a byla 21,4 nkat/mg; ZmAMADH1b 49 nkat/mg a ZmAMADH2 32,8 nkat/mg

#### 4.6 Stanovení kinetických parametrů ZmAMADH

Pro všechny tři kukuřičné izoformy byly změřeny saturační křivky (Obr. 15) a stanoveny kinetické parametry  $K_m$  a  $V_{lim}$  (Tab. 6) se dvěma substráty APAL a BAL. APAL byl použit proto, že je pro většinu AMADH nejlepším substrátem. Naproti tomu BAL je přeměňován jen některými AMADH a je prekurzorem glycin betainu, který je velmi účinným osmoprotektantem. Měření bylo provedeno s oběma substráty v rozmezí 0 – 1000  $\mu$ M v prostředí 150 mM

Tris/HCl pH 9,0 a 0,5 mM NAD<sup>+</sup>. U měření, která vykazovala inhibici nadbytkem substrátu, byla stanovena také inhibiční konstanta ( $K_i$ ). Inhibice s nadbytkem APAL byla pozorována se všemi třemi izoformami, inhibice s nadbytkem BAL byla pozorována jen u ZmAMADH1B.

Hodnoty  $K_m$  byly pro APAL u ZmAMADH1a a ZmAMADH1b velmi blízké (28,2 $\pm$ 8,9  $\mu$ M a 25,3 $\pm$ 8,4  $\mu$ M), pro ZmAMADH2 byl hodnota  $K_m$  více než dvojnásobná (58,9 $\pm$ 8,4  $\mu$ M). Při měření dosáhla nejvyšší specifické aktivity a nejvyšší limitní rychlosti s APAL ZmAMADH1b. Pro BAL byly zjištěny nízké hodnoty  $K_m$  pro obě ZmAMADH1a a ZmAMADH1b. Nicméně, ZmAMADH1a vykazovala vyšší hodnotu  $V_{lim}$  než ZmAMADH1b. Naproti tomu ZmAMADH2 vykazovala jak vysokou hodnotu  $K_m$ , tak i nízkou limitní rychlost.



**Obr. 15 – Saturační křivky zkoumaných AMADH se substráty (APAL, BAL) – a) ZmAMADH1a - APAL; b) ZmAMADH1a - BAL; c) ZmAMADH1b - APAL; d) ZmAMADH1b - BAL; e) ZmAMADH2 - APAL; f) ZmAMADH2 – BAL**

**Tab. 6 – Kinetické parametry ZmAMADH1a (A) ZmAMADH1b (B) a ZmAMADH2 (C)–**  $K_m$  – Michaelisova konstanta,  $V_{lim}$  – limitní rychlost,  $K_i$  – inhibiční konstanta,  $\beta$  – faktor popisující efekt inhibice na  $V_{lim}$  a  $V_{lim}/K_m$  udává relativní poměr limitní rychlosti a Michaelisovy konstanty

A)					
ZmAMADH1a					
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{lim}$ ( $\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$\beta$	$V_{lim}/K_m$ (relativní)
APAL	28,2±8,9	37,1±5,5	283,4±95,8	—	1,00
BAL	84,6±4,1	5,9±0,1	—	—	0,053

B)					
ZmAMADH1b					
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{lim}$ ( $\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$\beta$	$V_{lim}/K_m$ (relativní)
APAL	25,3±9,5	107,6±24,2	62,2±35,0	0,04	1,00
BAL	33,4±8,5	1,26±0,08	35,8±24,5	0,59	0,009

C)					
ZmAMADH2					
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{lim}$ ( $\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$\beta$	$V_{lim}/K_m$ (relativní)
APAL	58,9±8,4	60,4±5,2	141,6±43,0	0,02	1,00
BAL	1380±131	1,26±0,08	—	—	0,001

## 5 Diskuze

Zjištěná pH optima pro tři zkoumané kukuřičné enzymy jsou v rozmezí 9,4 až 10,4; přesněji 9,7 pro ZmAMADH1a, 10,4 pro ZmAMADH1b a 9,4 pro ZmAMADH2. Je vidět, že všechny tři izoenzymy mají pH optimum v zásadité oblasti, nejvyšší hodnoty pH má ZmAMADH1b. Tyto naměřené hodnoty potvrzují již sledované pH optima jiných enzymů ALDH10 rodiny. Enzymy z hrachu setého (*Pisum sativum*), rýže seté (*Oryza sativa*) a z lilku rajče (*Solanum lycopersicum*) vykazují pH optima taktéž v zásadité oblasti – pH 9,5 – 9,8 pro PsAMADH1, OsAMADH1 a SIAMADH2 a pH 10 – 10,2 pro PsAMADH2, OsAMADH2 a SIAMADH1. U uvedených rostlin se vždy vyskytovaly dvě izoformy, s mírně odlišnými hodnotami pH optim. Přítomnost izoform s rozdílným pH optimem byla tedy potvrzena i u kukuřice (*Zea mays*). Zásaditost pH optim je spojena s přítomností zásaditého prostředí v peroxisomech, kde je většina AMADH lokalizována.

Pro měření kinetických parametrů a substrátové specifity kukuřičných AMADH byly použity tři různé substráty – APAL, ABAL a BAL. APAL a ABAL byly použity proto, že jsou posledním meziproduktem odbourávání polyaminů – sperminu a spermidinu. Jejich oxidací pomocí AMADH vznikají netoxické produkty  $\beta$ -alanin a  $\gamma$ -aminomáselná kyselina. Z BAL vzniká dehydrogenací glycin betain, který je rostlinami produkován jakožto osmoprotektant.

Při měření substrátové specifity vykazovaly všechny tři kukuřičné AMADH nejvyšší aktivitu s APAL. Druhý aminoaldehyd - ABAL - byl nejlépe přeměňován ZmAMADH2 při zhruba 50% rychlosti vůči APAL. Aktivita ZmAMADH1a a ZmAMADH1b s ABAL byla nižší a dosahovala 23 a 29%. Aktivita s BAL byla nejvyšší u ZmAMADH1a (13% aktivity s APAL), pro ZmAMADH1b a ZmAMADH2 byly aktivity s BAL na úrovni 2,4 a 1,3% procent.

Všechny tři isoformy vykazují velmi nízké hodnoty  $K_m$  pro APAL ( $28,2 \pm 8,9 \mu\text{M}$  – ZmAMADH1a;  $25,3 \pm 9,5 \mu\text{M}$  – ZmAMADH1b a  $58,9 \pm 8,4 \mu\text{M}$  – ZmAMADH2). U všech tří izoformem byla pozorována inhibice nadbytkem substrátu APAL. Pro BAL byla nízká hodnota  $K_m$  zjištěna u ZmAMADH1b ( $33,4 \pm 8,5 \mu\text{M}$ ) a též u ZmAMADH1a ( $84,6 \pm 4,1 \mu\text{M}$ ). Naopak, vysoká hodnota byla pozorována u ZmAMADH2 ( $1380 \pm 131 \mu\text{M}$ ). Porovnáním relativních poměrů  $V_{im}/K_m$  pro BAL vyplývá, že BAL je mnohem lepším substrátem pro ZmAMADH1a ( $V_{im}/K_m$  zde byl 0,053), než pro ZmAMADH1b a ZmAMADH2 ( $V_{im}/K_m$  byl 0,009; respektive 0,001).

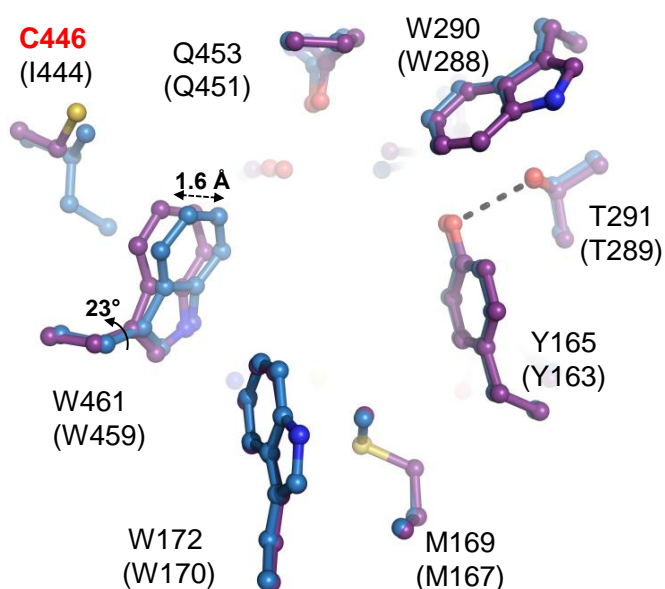
I když kukuřičné AMADH sdílejí velkou míru homologie sekvence jak celého proteinu (Obr. 17), tak aktivního místa, přece jenom se liší v několika aminokyselinách

(Tab. 7). Naměřené výsledky mohou být interpretovány pomocí těchto záměn, přesněji pomocí záměny na pozici I444 (dle PsAMADH2 číslování). Zatímco u ZmAMADH1a je na tomto místě cystein, ZmAMADH1b a ZmAMADH2 nesou isoleucin. Naopak rozdíl v aktivitách s BAL mezi ZmAMADH1a s 1b versus ZmAMADH2 lze vysvětlit přítomností residua W288, které zvyšuje afinitu enzymu k BAL – u ZmAMADH2 totiž W288 není přítomen a  $K_m$  nabývá velmi vysokých hodnot.

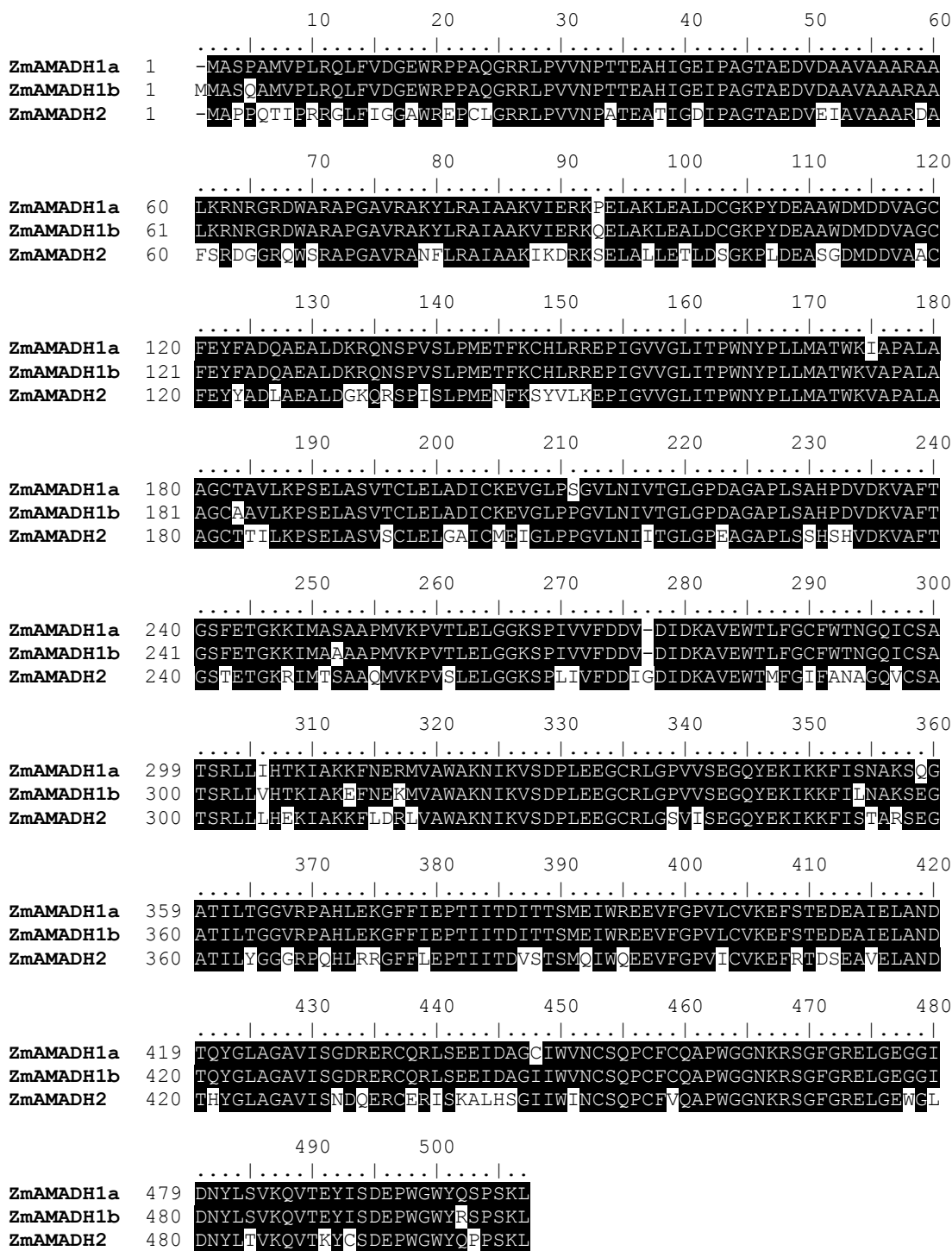
**Tabulka 7 – Rozdíly v aminokyselinové sekvenci aktivního místa kukuřičných AMADH – pozice residuů číslovány podle PsAMADH2, červeně jsou označeny změny v sekvenci aktivního místa**

	Y163	M167	W170	W288	I444	W459
ZmAMADH1a	Y	M	W	W	C	W
ZmAMADH1b	Y	M	W	W	I	W
ZmAMADH2	Y	M	W	A	I	W

Dá se tedy říci, že záměna cysteinu za isoleucin na pozici 444 (dle číslování PsAMADH2) snižuje rychlost přeměny BAL. Přítomnost cysteinu totiž dovoluje částečnou rotaci vedlejšího tryptofanu (W461) a zvětšuje tak průměr substrátového kanálu vedoucího k aktivnímu místu. To umožňuje trimethylamoniové skupině BAL projít skrz mnohem snáze než v přítomnosti isoleucinu (I444) (Obr. 16).



**Obrázek 16 – Rozdíl pozice W461 při přítomnosti C446 a I444 – převzato z Kopečný et al., 2013**



Obr. 17 – Alignment a porovnání aminokyselinových sekvencí ZmAMADH1a, ZmAMADH1b a ZmAMADH2 – vytvořeno v programu BioEdit



## 6 Závěr

- Byla vypracována literární rešerše zahrnující klasifikaci rostlinných AMADH v rámci nadrodiny rostlinných ALDH, stavbu, substrátovou specifitu, významu rostlinných rostlinných AMADH a metabolismus nejdůležitějších látek odbourávaných AMADH (APAL, ABAL, BAL)
- V experimentální části byly v expresních buňkách *E. coli* T7 vyprodukovány a poté vyperifikovány tři kukuřičné AMADH – ZmAMADH1a, ZmAMADH1b a ZmAMADH2.
- Vyperifikované enzymy byly poté charakterizovány – bylo změřeno pH optimum, teplotní stabilita substrátová specifita a byly stanoveny jejich kinetické parametry se dvěma substráty – APAL a BAL. Největší afinitu k BAL vykazala ZmAMADH1a.
- Bylo potvrzeno, že záměna isoleucinu na pozici 444 (I44 - dle PsAMADH číslování) v aminokyselinové sekvenci aktivního místa za cystein vede ke zvýšení afinity ZmAMADH1a k BAL.

## 7 Použitá literatura

- Ahmad R., Lim C.J., Kwon S.Y. (2013) Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. *Plant Biotechnol Rep* **7**, 49-57.
- Ahmad R., Kim Y.H., Kim M.D., Kwon S.Y., Cho K., Lee H.S., Kwak S.S. (2010) Simultaneous expression of choline oxidase, superoxid dismutase and ascorbate peroxidase in potato chloroplasts provides synergistically enhanced protection against various abiotic stresses. *Physiol Plantarum* **138**, 520-533.
- Bradbury L.M.T., Gillies S.A., Brushett D.J., Waters D.L.E., Henry R.J. (2008) Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant Mol Biol* **68**, 439-449.
- Brocker C., Vasiliou M., Carpenter S., Carpenter C., Zhang Y., Wang X., Kotchoni S.O., Wood A.J., Kirch H.H., Kopečný D., Nebert D.W., Vasiliou V. (2013) Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* **237**, 189-210.
- Buchanan B.B., Gruissem W., Russel J.L. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants, pp. 911-914 a 1165-1168, American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, USA.
- Chen T.T.H., Murata N. (2008) Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends Plant Sci* **13**, 499-505.
- Diaz-Sanchez A.G., Gonzalez-Segura L., Mujica-Jimenez C., Rudino-Pinera E., Montiel C., Martinez-Catilla L.P., Munoz-Clares R.A. (2012) Amino acid residues critical for the specificity for betaine aldehyde of the plant ALDH10 isoenzyme involved in the synthesis of glycine betaine. *Plant Physiol* **158**, 1570-1582.
- Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948-1954.
- Fan W., Zhang M., Zhang H., Zhang P. (2012) Improved tolerance to various abiotic stresses in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*) expressing spinach betaine aldehyde dehydrogenase. *Plos One* **7**, e37344.
- Fitzgerald T.K., Waters D.L.E., Henry R.J. (2009) Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biology* **11**, 119-130.
- Frömmel J., Soral M., Tylichová M., Kopečný D., Demo G., Wimmerová M., Šebela M. (2011) Plant aminoaldehyde dehydrogenases oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydes. *Amino Acids* **43**, 1189-1202.

- Fujiwara T., Hori K., Ozaki K., Yokota Y., Mitsuya S., Ichianagi T., Hattori T., Takabe T. (2008) Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley. *Physiol Plant* **134**, 22-30.
- Gao C., Han B. (2009) Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene* **431**, 86-94.
- Hibino T., Meng Y.L., Kawamitsu Y., Uehara N., Matsuda N., Tanaka Y., Ishikawa H., Baba S., Takaba T., Wada K., Ishii T (2001) Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine-aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Plant Mol Biol* **45**, 353-363.
- Incharoensakdi A., Matsuda N., Hibino T., Meng Y.L., Ishikawa H., Hara A., Funaguma T., Takabe T. (2000) Overproduction of spinach betaine aldehyde dehydrogenase in *Escherichia coli*. Structural and functional properties of wild-type, mutants and E. coli enzymes. *Eur J Biochem/FEBS* **267**, 7015–7023.
- Johansson K., El-Ahmad M., Ramasawamy S., Hjelmqvist L., Jörnvall H., Eklund H. (1999) Structure of betain aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci* **7**, 2106-2117.
- Kathuria H., Giri J., Nataraja K.N., Murata N., Udayakumar M., Tyagi A.K. (2009) Glycinbetaine-induced water-stress tolerance in *codA*-expressing transgenic *indica* rice is associated with up-regulation of several stress responsive genes. *Plant Biotechnol J* **7**, 512-526.
- Kirch H.H., Bartels D., Wei Y., Schnable P.S., Wood A.J., (2004) The ALDH gene superfamily of arabidopsis. *Trends Plant Sci* **9**, 371-377.
- Kopečný D., Tylichová M., Snegaroff J., Popelková H., Šebela M. (2011) Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high affinity bonding of  $\omega$ -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *Febs J* **278**, 3130-3139.
- Kopečný D., Končítíková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Soral M., Šebela M., Moréra S. (2013) Identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemical intermediate. *J Biol Chem* **288**, 9491-9507.
- Lakomá P. (2010) Charakterizace aminoaldehyddehydrogenasy z kukučice seté. Diplomová práce, PŘF Univerzita Palackého.
- Jimenez-Lopez J.C., Gachomo E.W., Seufferheld M.J., Kotochoni S.O. (2010) The maize ALDH protein superfamily: linking structural features to functional specificities. *BMC Struct Biol* **10**, 43.
- Morgan D.M.L. (1999) Polyamines – An overview. *Mol Biotechnol* **11**, 299-250.

- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **11**, 2411-2423.
- Pere-Miller S.J., Hurley T.D. (2003) Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **42**, 7100-7109.
- Rathinasabapathi B, Burnet M, Russell BL, Gage DA, Liao PC, Nye GJ, Scott P, Golbeck JH, Hanson AD (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning, *Plant Biology* **94**, 3454-3458.
- Rhodes D., Hanson A.D. (1993) Quarternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 357-384.
- Riveros-Rosas H., González-Segura L., Julian-Sánchez A., Díaz-Sánchez A.G., Munoz-Clares R.A. (2013) Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chem-Biol Interact* **202**, 51-61.
- Seiler N. (2004) Catabolism of polyamines. *Amino Acids* **26**, 217-233.
- Tylichová M, Kopečný D, Moréra S, Briozzo P, Lenobel R, Snégaroff J, Sebela M (2010) Structural and functional characterization of plantaminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *J Mol Biol* **396**, 870-882.
- Trossat C., Rathinasabapathi B., Hanson A.D. (1997) Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfolpropionaldehyde and  $\omega$ -aminoaldehydes. *Plant Physiol.* **113**, 1457-1461.
- Valenzuela-Soto E.M, Munoz-Clares R.A. (1993) Betaine-aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypocondriacus* L. exhibits an iso ordered bi bi steady-state mechanism. *J Biol Chem* **268**, 23818-23823.
- Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K.F., Nebert D.W. (1999) Eucaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphism, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* **9**, 421-434.
- Wei A., He C., Li B., Li N. Zhang J. (2011) The pyramid of transgenes *TsVP* and *BetA* effectively enhances the drought tolerance of maize plants. *Plant Biotechnol J* **9**, 216-299.