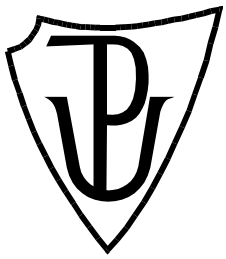
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Substrátová specifičnost a imobilizace rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor:	**Mgr. Jan Frömmel**
Studijní program:	P1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.**
Termín odevzdání práce:	

Prohlášení

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

V Olomouci dne 9. října 2014 podpis

Poděkování

Děkuji panu profesoru Marku Šebelovi, svému školiteli, za odborné vedení a cenné rady poskytnuté v průběhu celého studia. Dále děkuji členům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biologický a zemědělský výzkum PřF UP a Katedry biochemie PřF UP, docentu Mirku Souralovi z Katedry organické chemie PřF UP, doktoru Gabrielu Demovi z Masarykovy univerzity v Brně za jejich spolupráci, rady a podporu, profesoru Fabiu Vianellovi a jeho týmu z Univerzity v Padově za spolupráci a přátelské prostředí na zahraniční stáži, své rodině a svým přátelům za podporu a pochopení.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Mgr.Jan Frömmel
Název práce	Substrátová specifičnost a imobilizace rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	Rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) katalyzují oxidaci ω-aminoaldehydů na aminokyseliny s redukcí koenzymu NAD^+. V rámci aldehyddehydrogenas (ALDH) se řadí do rodiny ALDH10 spolu s bakteriálními avšak mimo živočišné AMADH, které tvoří rodinu ALDH9. Díky široké substrátové specifičnosti se rostlinné AMADH podílí na řadě metabolických drah, kam patří degradace polyaminů, tvorba osmoprotektantů, popř. syntéza karnitinu z lysinu. Jde o homodimerní či homotetramerní proteiny s aktivním místem tvořeným Cys, Asn a Glu. Nejobvyklejším substrátem je 3-aminopropanal (APAL), ovšem oxidují i další přirozené aminoaldehydy: 4-aminobutanal (ABAL), 4-(trimethylamino)butanal, 4-guanidinobutanal, 4-(3-aminopropylamino)-butanal či betainaldehyd. V disertační práci byla studována substrátová specifičnost isoenzymů z hrachu (PsAMADH1 a 2) a rajčete (SlAMADH1 a 2). Vzhledem k heterocyklickým aldehydům vykazuje nejširší substrátovou specifičnost SlAMADH1. Pyridinkarbaldehydy jsou slabšími substráty než pyridinylpropanaly. Oxidace halogenderivátů 4-pyridinkarbaldehydu a benzaldehydu probíhá pouze tam, kde se substituce nenachází ve vicinální poloze vzhledem k aldehydové skupině. ω-(Pyridinylmethylamino)butanaly jsou výrazně lepšími substráty než ω-(pyridinylmethylamino)propanaly. Acylaminoaldehydy jsou substráty obou PsAMADH, přičemž deriváty APALu jsou lepší než příslušné deriváty ABALu. Aldehydy vyskytující se v lihovinách se předpokládaly jako substráty SlAMADH1. Enzym byl imobilizován na nanočástice z maghemitu. Takto upravené nanočástice byly vloženy do mikroelektrochemické cely s elektrodami z platiny, Ag/AgCl a uhlíkové pasty s obsahem maghemitových nanočástic, kde byly fixovány pomocí externího magnetu. Po přídavku vzorku lihoviny do elektrochemické cely a reakci byla měřena koncentrace vzniklého NADH lineární voltametrií. Biosenzor lze použít ke stanovení obsahu aldehydů v lihovinách, ale nelze s jeho pomocí určit přesné zastoupení jednotlivých aldehydů.
Klíčová slova	Aminoaldehydy, Aminoaldehyddehydrogensa, substrátová specifičnost, imobilizace enzymu
Počet stran	93 + 52
Počet příloh	3
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Mgr. Jan Frömmel
Title	Substrate specificity and immobilization of plant aminoaldehyde dehydrogenase
Type of thesis	Disertation
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2014
Abstract	Plant aminoaldehyde dehydrogenases (AMADH) catalyze the oxidation of ω-aminoaldehydes to amino acids using NAD^+ as a coenzyme. Within the aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily, they belong to the ALDH10 family together with bacterial AMADHs but separately from mammalian enzymes forming the ALDH9 family. Their substrate specificity is very broad. AMADH participate in many metabolic pathways such as polyamine degradation, production of osmoprotectants or synthesis of carnitine. Plant AMADHs are homodimeric or homotetrameric proteins. The active site is formed by Cys, Asn and Glu. The most common natural substrate is 3-aminopropanal (APAL) but other natural aminoaldehydes are accepted as as well. This thesis has been devoted to the substrate specificity of AMADH isoenzymes from pea (PsAMADH1 and 2) and tomato (SlAMADH1 and 2). SlAMADH1 has the broadest specificity towards heterocyclic aldehydes. Pyridine carbaldehydes are weaker substrates than pyridinyl propanals. Only halogenderivates of 4-pyridinylcarbaldehyde or benzaldehyde, which do not contain the substitution at the vicinal position to the aldehyde group, are oxidized. ω-(Pyridinylmethylamino)butanals are better substrates than ω-(pyridinylmethylamino)propanals. *N*-acyl-ω-aminoaldehydes are subtrates of both PsAMADHs. APAL derivates are better substrates than the respective ABAL derivates. Aldehydes occuring in spirits were expected as substrates of SlAMADH1. In order to construct a biosensor, SlAMADH1 was immobilized on maghemite nanoparticles. Immobilized enzyme was placed into a microelectrochemical cell and fixed by an external magnet. The cell contained three electrodes produced from platinum, Ag/AgCl or carbon paste containing maghemite nanoparticles. After adding a sample of spirit and reaction, the concentration of NADH was meassured by linear sweep voltametry. The biosensor is usable to determaine the total concentration of aldehydes in spirits, but i tis not able to provide an information on the quantity of any single adehyde.
Keywords	Aminoaldehydes, aminoaldehyde dehydrogenase, substrate specificity, enzyme immobilization
Number of pages	93 + 52
Number of appendices	3
Language	Czech

Obsah

Cíle práce 6

ÚVODNÍ ČÁST PRÁCE 7

1 Aminoaldehyddehydrogeasy a jejich metabolický význam 7

1.1 Význam aminoaldehyddehydrogenasy v metabolismu 8

1.1.1 Degradace polyaminů 9

1.1.2 Tvorba osmoprotektantů 14

1.1.3 Biosyntéza karnitinu 17

1.2 Vlastnosti rostlinných AMADH 19

1.2.1 Reakční mechanismus a katalytické vlastnosti 19

1.2.2 Struktura AMADH 21

1.2.3 Residua klíčová pro substrátovou specifičnost AMADH 25

2 Aldehydy v lihovinách a jejich detekce využitím 2,4-dinitrofenylhydrazinu 27

2.1 Aldehydy přítomné v lihovinách 27

2.2 Detekce aldehydů derivatizací 2,4-dinitrofenylhydrazinem 29

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST PRÁCE 32

3 Materiál a metody 32

3.1 Syntéza aldehydů 32

3.2 Produkce rekombinantního enzymu a měření aktivity 33

3.3 Molekulové modelování – dokování substrátů do aktivního místa enzymu 35

3.4 Imobilizace SlAMADH1 a tvorba biosenzoru 36

3.5 Analýza obsahu aldehydů použitím HPLC 37

4 Výsledky a diskuse 39

4.1 Substrátová specifičnost a kinetická měření 39

4.1.1 Heterocyklické a aromatické aldehydy 39

4.1.2 N-acylované ω-aminoaldehydy 47

4.1.3 Molekulové modelování 52

4.2 Imobilizace aminoaldehyddehydrogenasy a její využití k detekci aldehydů v lihovinách 57
4.2.1 Měření s volným enzymem 57
4.2.2 Imobilizace enzymu a tvorba biosenzoru 59
4.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – srovnávací měření 61

5 Závěr 64

Použitá literatura 66

Použité zkratky 87

Profesní životopis 89

Přílohy – publikované práce 92

Cíle práce

1. Studium substrátové specifičnosti rostlinných aminoaldehyddehydrogenas vzhledem k heterocyklickým aldehydům obsahujícím dusík.

2. Studium substrátové specifičnosti rostlinných aminoaldehyddehydrogenas vzhledem k *N*-acylovaným ω-aminoaldehydům odvozeným od přirozených substrátů 3-aminopropanalu a 4-aminobutanalu.

3. Imobilizace aminoaldehydehydrogenasy za účelem jejího potenciálního využití k detekci aldehydů v nápojích.

ÚVODNÍ ČÁST PRÁCE

1 Aminoaldehyddehydrogeasy a jejich metabolický význam

Aldehydy jsou vysoce reaktivní a toxické sloučeniny (Li et al., 2003, Smiesko & Benfenati, 2004), které jsou v organismech detoxifikovány oxidací na příslušné karboxylové kyseliny za katalýzy aldehyddehydrogenasami (ALDH), aldehydoxidasami či xantinoxidasami (Bernheim, 1928, Booth, 1938, Racker, 1949, Panoutsopoulos et al., 2004). ALDH využívají při oxidaci aldehydů jakožto akceptoru elektronů koenzym NAD^+ či $NADP^+$. ALDH vytváří velmi širokou skupinu enzymů, jež lze přibližně rozdělit do dvou částí, pro něž lze použít označení „skupina 1/2" a „skupina 3." První skupina pokrývá především nespecifické cytosolární (rodina ALDH1) a mitochondriální (rodina ALDH2) enzymy klasifikované jako EC 1.2.1.3. Druhá skupina je tvořena řadou enzymů s výraznější substrátovou specifičností, mezi něž patří například benzaldehyddehydrogenasa využívající koenzym $NADP^+$ (EC 1.2.1.7) či NAD^+ (EC 1.2.1.28), betainaldehyddehydrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8), nefosforylující glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (EC 1.2.1.9), sukcinátsemialdehyd dehydrogenasa (EC 1.2.1.16), aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH, EC 1.2.1.19) či antikvitin (EC 1.2.1.31). V současnosti se ALDH dělí do 24 rodin, z nichž třináct obsahuje i rostlinné enzymy (Sophos & Vasiliou, 2003, Brocker et al., 2013). Zástupci jedné rodiny vykazují sekvenční shodu minimálně 40 %, při shodě přesahující 60 % pak lze hovořit o podrodině (Vasiliou et al., 1999).

AMADH zaujímají v rámci ALDH dvě rodiny. Rybí či savčí AMADH jsou řazeny mezi ALDH9, zatímco AMADH rostlin, hub, kvasinek či bakterií jsou pro svou nízkou podobnost s živočišnými enzymy zařazeny do samostatné rodiny ALDH10 (Sophos & Vasiliou, 2003, Brocker et al., 2013, Muñoz-Clares et al., 2014). Rostlinné AMADH, které jsou předmětem této práce, vykazují širokou substrátovou specifičnost (Tab. 1) a podílí se na řadě metabolických drah, například degradaci polyaminů, cholinu či aminokyselin Arg, Lys a Met, biosyntéze osmoprotektantů glycin betainu či kyseliny 3-(dimethylsulfonio)propionové nebo tvorbě karnitinu z lysinu (Pan et al., 1981, Vojtěchová et al., 1997, Tylichová et al., 2007, Rippa et al., 2012). To je rovněž příčinou, pro niž byly tyto enzymy označovány rovněž jako BADH, 4-aminobutyraldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.19), guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.54) či trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.47) (např. Pan et al., 1981, Matsuda & Suzuki, 1984, Hibino et al., 2001, Livingstone et al., 2003 a mnoho dalších).

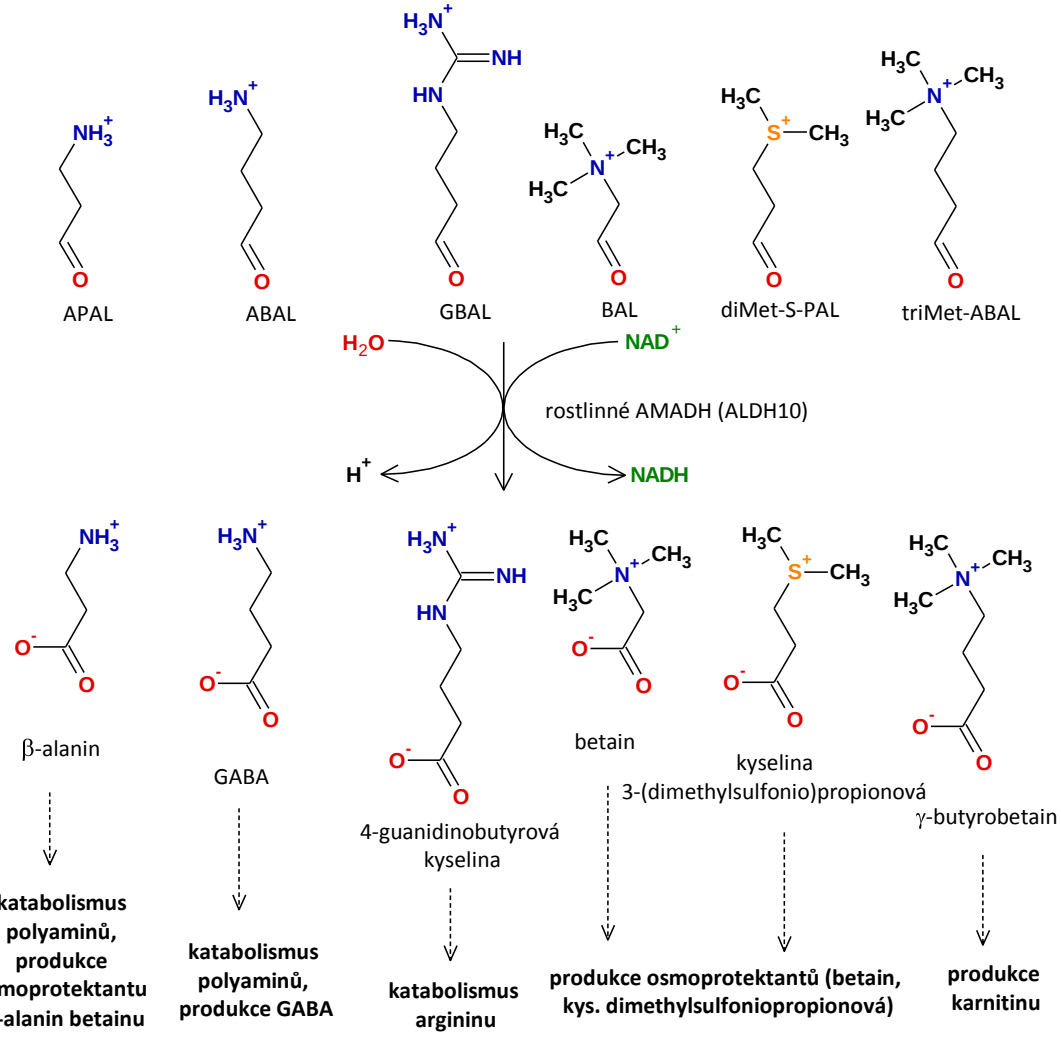
Tab. 1: Oxidace některých přirozených substrátů vybranými zástupci rostlinných ALDH10 (AMADH i BADH). Hodnoty K_m jsou uvedeny v µmol·l^{-1}, hodnoty k_{cat} pak v s^{-1}. Literatura: [1] Livingstone et al., 2002, [2] Livingstone et al., 2003, [3] Tylichová et al., 2010, [4] Kopečný et al., 2013, [5] Mitsua et al., 2001, [6] Díaz-Sánchez et al., 2012.

Zdroj	**APAL**		**ABAL**		**GBAL**		**Tri-Met-ABAL**		**BAL**	
Enzym	K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}
Oves (*Avena Sativa*) [1,2]										
AsAMADH	1,5	0,92	2,2	0,12	13	1	---	---	---	---
AsBADH	0,54	4,3	24	2,5	50	1,4	---	---	5	1,2
Hrách (*Pisum sativum*) [3]										
PsAMADH1	75	3,2	170	2,8	11	4,9	10	4,9	---	---
PsAMADH2	10	10,6	29	3,2	7	7,8	21	7,8	---	---
Rajče (*Solanum lycopersicum* syn. *Lycopersicon esculentum*) [4]										
SlAMADH1	41	6	278	5,2	85	4,5	17	3,6	2051	1
SlAMADH2	9	8,2	54	2,5	22	3,9	141	2	---	---
Kukuřice (*Zea mays*) [4]										
ZmAMADH1a	9	11,8	28	1,2	3	1,5	6	5,1	14	0,6
ZmAMADH1b	11	11,1	26	1,7	5	1,7	10	5,7	29	0,07
ZmAMADH2	98	10,3	59	1,3	11	5	16	10,8	---	---
Rýže (*Oryza sativa*) [5]										
OsBADH1	17	11,2	4,5	7,6	---	---	7,8	36,3	2600	2,4
OsBADH2	12	18,2	3,7	4	---	---	41	12,2	230	1,3
Špenát (*Spinacia oleracea*) [6]										
SoBADH	2,6	0,7	5,5	0,6	---	---	3,6	1,1	69	5

1.1 Význam aminoaldehyddehydrogenasy v metabolismu

Reakce katalyzovaná AMADH je součástí několika metabolických drah (Obr. 1). APAL a ABAL jsou produkty oxidace polyaminů (Tiburcio et al., 1997, Seiler, 2004). Při přeměně aminokyselin Arg, Lys a Met vznikají další substráty AMADH: 4-guanidinobutanal (GBAL), 4-(trimethylamino)butanal (triMet-ABAL) a 3-(dimethylsulfonio)propanal (diMet-S-PAL) (Vanderbilt et al., 1975, James et al., 1995b, Vaz & Wanders, 2002). Z cholinu pak vzniká BAL (Broquisse et al., 1989, Park et al., 2009). Karboxylové kyseliny vzniklé při oxidaci zmíněných substrátů mohou být dále katabolizovány a začleněny do obecných metabolických drah či využity k biosyntéze metabolicky významných molekul, mezi něž lze přiřadit osmoprotektant β-

alaninbetain či karnitin využívaný k transportu mastných kyselin v mitochondriích (Hulse & Henderson, 1980, Hanson et al., 1994a). Metabolický význam však nelze upřít ani kyselinám vzniklým při reakci katalyzované AMADH. Příkladem může být kyselina γ-aminomáselná (kyselina 4-aminobutanová, GABA), která zastává mnoho funkcí. Působí např. jako neurotransmitér, signální molekula u rostlin či se podílí v odpovědi na biotický i abiotický stres (Shelp et al., 1999, 2012, Bouché & Fromm, 2004, Bown et al., 2006).



Obr. 1: Oxidace vybraných přirozených substrátů rostlinných AMADH a metabolický význam oxidace jednotlivých aldehydů.

1.1.1 Degradace polyaminů

Polyaminy jsou všudypřítomné kladně nabité bazické sloučeniny, které v organismech vykonávají mnoho významných funkcí (Takeda et al., 1983, Boucherau et al., 1999). Jejich hlavními zástupci jsou putrescin (PUT, butan-1,4-diamin), spermidin (SPD, *N*-(3‘-aminopropyl)butan-1,4-diamin), spermin (SPM, *N*,*N*‘-bis-(3‘-aminopropyl)butan-1,4-diamin),

agmatin (AGM, 1-(4‘-aminobutyl)guanidin). Polyaminy se uplatňují při různých funkcích spojených s růstem včetně syntézy makromolekul či posttranslační modifikace translačního faktoru eIF-5A (Pegg et al., 1982, Park et al., 1993, Kusano et al., 2008). Rovněž fungují jako obranné molekuly při osmotickém stresu, zasolení, nedostatku minerálů, teplotním stresu, podchlazení či hypoxii (Bors et al., 1989, Erdei et al., 1996, Boucherau et al., 1999, Kusano et al., 2008, Gupta et al., 2013, Kotakis et al., 2014). V boji s vysokou koncentrací solí se u rostlin uplatňuje především SPM, význam ostatních polyaminů je výrazně nižší (Yamaguchi et al., 2006). Kromě volné formy se polyaminy vyskytují i v konjugátech s proteiny, fosfolipidy či nukleovými kyselinami (Leroy et al., 1997, Boucherau et al., 1999, Gaboriau et al., 2002, Tassoni et al., 2002, van Dam et al., 2002). Významné jsou rovněž konjugáty polyaminů s nízkomolekulárními látkami, např. s amidem kyseliny hydroxyskořicové (Bors et al., 1989, Bagni & Tassoni, 2001). Polyaminy se vyskytují téměř ve všech organismech, výjimku tvoří například dva řády archebakterii, kontrétně *Methanobakteriales* a *Halobacteriales* (Hamana &Matsuzaki, 1992).

PUT vzniká u rostlin z Arg ve dvou krocích přes ornithin (arginasa – EC 3.5.3.1 a ornithindekyrboxylasa – EC 4.1.1.17) nebo ve třech krocích přes AGM a *N*-karbamoylputrescin (arginindekarboxylasa – EC 4.1.1.19, agmatin iminohydrolasa – EC 3.5.3.12 a *N*-karbamoylputrescinamidohydrolasa – EC 3.5.1.53) (Obr. 2). Naproti tomu u živočichů, hub či bakterií je využívána jen jedna z těchto drah vzniku PUT. Zatímco živočichové a houby syntetizují PUT přes ornitin, bakterie naopak jen přes AGM (Borrell et al., 1995, Tiburcio et al., 1997, Bagni & Tassoni, 2001). Polyaminy SPD a SPM vznikají postupným připojením 3-aminopropylové skupiny na PUT (či SPD) za katalýzy spermidinsythasou (EC 2.5.1.16) a dále sperminsythasou (EC 2.5.1.22) (Tabor et al., 1958, Sindhu & Cohen, 1984, Tiburcio et al., 1997, Panicot et al., 2002) (Obr. 2). Kadaverin (CAD, pentan-1,5-diamin) je naproti tomu především katabolitem aminokyseliny Lys, z něhož vzniká dekarboxylací katalyzovanou lysindekarboxylasou (EC 4.1.1.18), a prekurzorem chinolinových alkaloidů a samotný nemá významnější funkci (Wink & Hartmann, 1982, Bouchereau et al., 1999, Bunsupa et al., 2012). Polyaminy AGM, CAD, PUT, SPD a SPM jsou oxidovány za vzniku aminoaldehydů diaminoxidasami (DAO, EC 1.4.3.22) a polyaminoxidasami (PAO, EC 1.5.3.13) (Tabor et al., 1964, Boucherau et al., 1999, Šebela et al., 2001b).

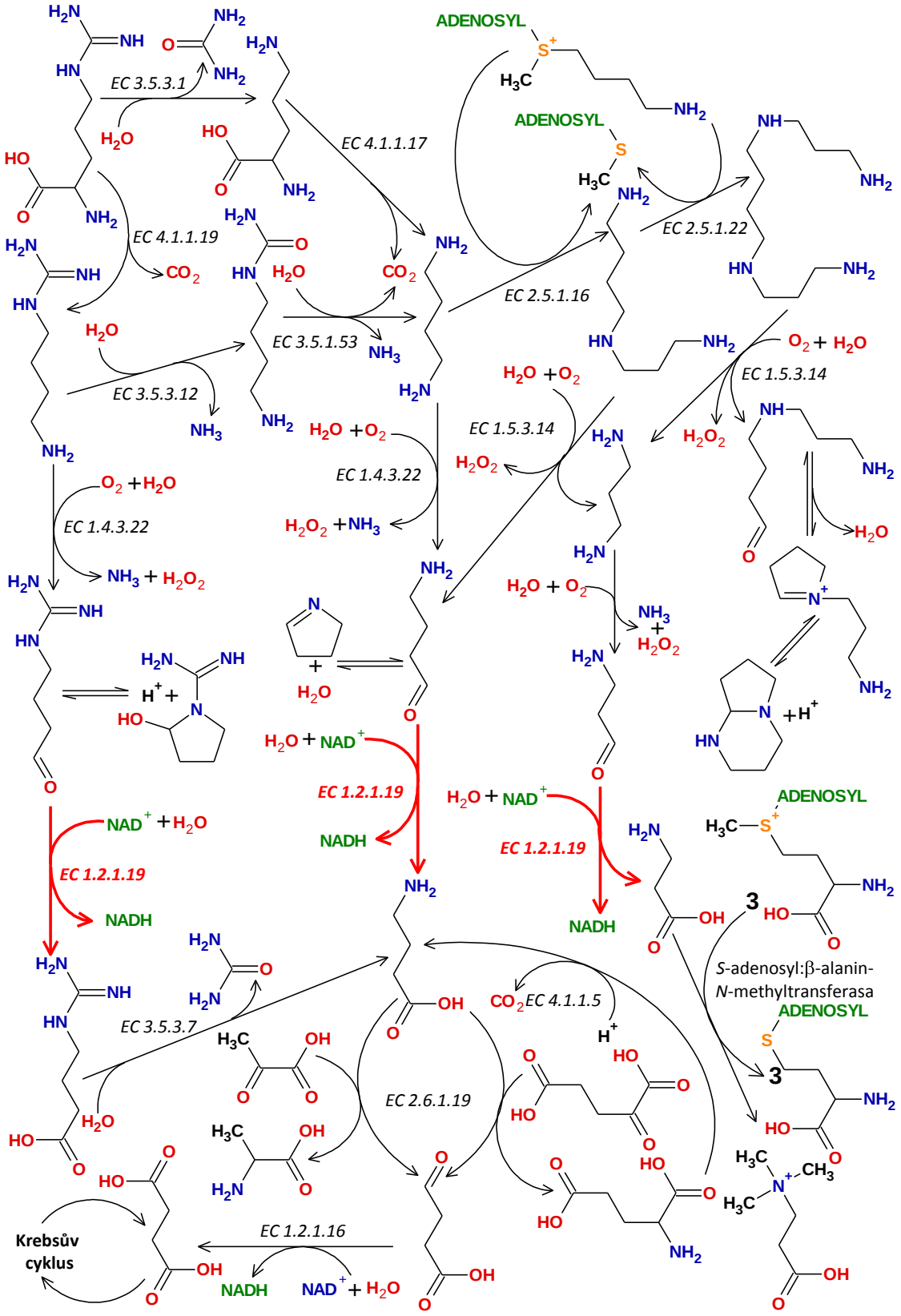
Rostlinné DAO byly dříve pro svou vysokou strukturní podobnost nejen v obsahu kofaktoru a měďnatých iontů považovány společně s primání aminoxidasami (EC 1.4.3.21) za jeden enzym nazývaný aminoxidasa (původně EC 1.4.3.6, kategorie se dnes nepoužívá) (Frébort & Adachi, 1995, Meda et al., 1995, http://www.brenda-enzymes.org duben 2014, http://enzyme.expasy.org duben 2014). DAO nejlépe přeměňují PUT a jeho analog CAD, který

je v mnoha případech (například u DAO z hrachu) lepším substrátem než PUT. S dále rostoucí délkou řetězce již rychlost oxidace klesá. Tyto enzymy katalyzují oxidaci primární aminoskupiny za vzniku odpovídajícího aminoaldehydu. Z PUT tak vzniká ABAL a z CAD pak 5-aminovaleraldehyd (AVAL, 5-aminopentanal). Vedlejšími produkty reakce jsou peroxid vodíku a amoniak (Kenten & Mann, 1952, Chaudghuri & Ghosh, 1984, Meda et al., 1995, Pietrangeli et al., 2007). Oxidace propan-1,3-diaminu (DAP, 1,3-diaminopropan) je poněkud složitější. Některé DAO, mezi něž patří DAO z tabáku (*Nicotiana tabacum*), pšenice (*Triticum aestivum*) či blínu černého (*Hyoscyamus niger*) katalyzují oxidaci DAP (Hashimoto, 1990, Suzuki, 1996, Hetim et al., 2007), ale mnohé další, mezi něž náleží DAO z hrachu (*Pisum sativum*) či čočky (*Lens esculenta*), DAP na APAL přeměňují jen zanedbatelně či se jedná o sebevražedný substrát. Například hrachová DAO ztrácí po jedné hodině inkubace s DAP 95 % své aktivity, zatímco kontrolní vzorek si zachoval 98 % aktivity (Floris et al., 1983, Awal & Hirasawa, 1995). DAO rostlin řazených do čeledi bobovité (*Fabaceae*, též motýlokvěté, *Papilinoaceae*) rovněž efektivně oxidují SPD, SPM či AGM (Matsuda & Suzuki, 1981, Medda et al., 1995, Ascenzi et al., 2002). DAO jsou zpravidla homodimerní metaloproteiny s měďnatým iontem a nekovalentně vázaným kofaktorem TOPA-chinon (2,4,5-trihydrofenylalanichinon) v aktivním místě každé podjednotky. Jejich pH optimum se pohybuje v okolí neutrální hodnoty 7,0 (Frébort & Adachi, 1995, Tiburcio et al., 1997, Cona et al., 2006).

Již z klasifikace enzymu (EC 1.5.3.14) je patrné, že PAO v kontrastu s DAO katalyzují oxidaci sekundárních aminoskupin. Rostlinné a živočišné PAO se zde liší svou specifičností účinku. Živočišné PAO katalyzují oxidaci uhlíku na vnější straně polyaminu či *N*-acetylpolyaminu za vzniku APALu a kratšího polyaminu (SPD ze SPM, PUT ze SPD, acetyl-SPD z acetyl-SPM či acetyl-Put z acetyl SPD). Naproti tomu v případě rostlinných PAO dochází k oxidaci na vnitřní straně sekundární aminoskupiny za vzniku DAP a aminoaldehydu odvozeného od kratšího polyaminu, a tak oxidací SPM vzniká 4-[(3‘-aminopropyl)amino]butanal (AP-ABAL) a oxidace SPD vede ke tvorbě ABALu. Třetím produktem je u všech PAO peroxid vodíku (Federico et al., 1996, Šebela et al., 2001b, Vujcic et al., 2002, Wu et al., 2003). Tento rozdíl ve specifičnosti účinku i rozdíly v substrátové specifičnosti vedly v nedávné době ke změně klasifikace PAO, kdy došlo ke zrušení původní kategorie EC 1.5.3.11, která byla nahrazena 5 novými kategoriemi. N^1-acetylpolyaminoxidasou (EC 1.5.3.13), polyaminoxidasou tvořící DAP (EC 1.3.5.14), N^8-acetylspermidinoxidasou tvořící DAP (EC 1.5.3.15), sperminoxidasou (EC 1.5.3.16) a nespecifickou polyaminoxidasou (EC 1.5.13.17). Rostlinné PAO tvoří zejména kategorii EC 1.5.3.14 (http://www.brenda-enzymes.org duben 2014, http://enzyme.expasy.org duben 2014). Narozdíl od PUT nemůže být DAP vzniklý při reakci rostlinné PAO přeměněn zpět na SPD či SPM. Je však prekurzorem jiných méně obvyklých polyaminů jako je například norspermidin

či norspermin (Hamana et al., 1998). Na druhou stranu byla nedávno publikována nová PAO z *Arabidopsis thaliana* s označením AtPAO3, jejíž specifičnost účinku odpovídá savčím PAO (EC 1.5.3.16) a je schopna takto oxidovat i N^1-acetylSPD a N^1-acetylSPM (Moschou et al., 2008). PAO jsou monomerní proteiny, jejichž prostatickou skupinu tvoří FAD. Protein je tvořen dvěma doménami: doménou s nekovalentní vazbou FAD a doménou, jež interaguje se substrátem. Aktivní místo se pak nachází v ohybu tunelu ve tvaru písmene U mezi zmíněnými doménami (Binda et al., 1999, Šebela et al., 2001b). Zatímco aktivita klasických rostlinných PAO je spojena s buněčnou stěnou či cytosolem, AtPAO3 byla lokalizována v peroxisomech (Angelini et al., 1995, Cona et al., 2005, Moschou et al., 2008).

Aminoaldehydy vzniklé oxidací polyaminů jsou často v rovnováze s odpovídajícími dusíkatými heterocykly (Obr. 2). Zatímco APAL pro nutné vazebné pnutí čtyřčlený cyklus nevytváří, ABAL, AVAL, GBAL či AP-ABAL jsou v rovnováze Δ^1-pyrrolinem, Δ^1-piperideinem, *N*-amidino-2-hydroxypyrrolidinem, popř. 1-(3-aminopropyl)pyrroliniem. Posledně zmíněný cyklus se pak dále přeměňuje na 1,5-diazabicyklo[4.3.0]nonan. Rovněž 6-aminohexanal (ACAL, 6-aminokapronaldehyd) jakožto produkt oxidace hexan-1,6-diaminu, syntetického substrátu DAO, cyklizuje za tvorby Δ^1-azacykloheptenu (3,4,5,6-tetrahydro-2H-azepin). Naproti tomu 10-aminodekanal cyklus nevytváří (Smith et al., 1986, Ascenzi et al., 1995, Tylichová et al., 2007). Tyto cykly jsou základem při syntéze mnoha rostlinných alkaloidů (Geisler & Gross, 1990, Eisenreichová et al, 1992). Protože je při pH odpovídajícímu pH optimu DAO rovnováha výrazně posunuta směrem k cyklickým formám zmíněných aminoaldehydů, nebyl často detekován jako produkt aminoaldehyd, ale příslušný cyklus, a tudíž byla AMADH označována jako pyrrrolindehydrogenasa (Flores & Filner, 1985). Inhibice oxidace aminoaldehydů umožňující vznik zmíněných heterocyklů může mít velký hospodářský význam. Příkladem jsou odrůdy rýže Basmati či Jasmine (tzv jasmínová rýže), kde je aktivita AMADH zanedbatelná, a tak dochází ke tvorbě 2-acetyl-1-pyrrolinu odpovědného za aroma těchto odtůd (Buttery et al., 1983, Bradbury et al., 2008). Podobným způsobem vzniká i *N*-methylpyridinium nikotinu v tabáku (Lamberts et al., 1960). Tyto aminoaldehydy jsou díky samovolné cyklizaci výrazně méně toxické než APAL, který je například příčinou apoptosy a nekrosy neuronů a gliových buněk, patrně skrze prasknutí lysozomů (Li et al., 2003, Yu et al., 2004). Jeho oxidace za vzniku β-alaninu (kyselina 3-aminopropanová) katalyzovaná AMADH je typickou detoxifikační reakcí (Kurys et al., 1989, Wood et al., 2007). β-Alanin je dále přeměněn trifunkční *S*-adenosyl-L-methionin:β-alanin *N*-methyltransferasou na kompatibilní osmolyt β-alanin betain, jehož akumulace je typická například pro statici (limonka, *Limonium*) z čeledi olověncovité (*Plumbaginaceae*) (Hanson et al., 1991, Rathinasabapathi et al., 2001).



Obr. 2: Vznik a degradadace vybraných polyaminů v rostlinách. Reakce katalyzovaná rostlinnými AMADH (EC 1.2.1.19) je vyznačena červeně.

ABAL je za katalýzy AMADH oxidován za vzniku signální molekuly GABA (Awal et al., 1997, Bouché & Fromm, 2004). Ta je dále ve dvou krocích inkorporována do Krebsova cyklu (Obr. 2). Nejprve dochází k její přeměně na sukcinátsemialdehyd (kyselina 4-oxobutanová) za katalýzy GABA-transaminasou (EC 2.6.1.19). Akceptorem aminoskupiny může být buď pyruvát (kyselina 2-oxopropanová) nebo α-ketoglutarát (kyselina 2-oxopentandiová). Druhým produktem reakce je aminokyselina Ala či Glu v závislosti na akceptoru aminoskupiny. V dalším kroku je sukcinátsemialdehyd oxidován sukcinátsemialdehyddehydrogenasou (EC 1.2.1.16) za vzniku kyseliny jantarové (kys. butandiová, sukcinát), jež je komponentou Krebsova cyklu (Narayan & Nair, 1986, Bush & Fromm, 1999, Shelp et al., 1999, Van Cauwenberghe & Shelp, 1999). Kyselina 4-guanidinobutanová vznikající oxidací GBALu je hydrolytickým odštěpením močoviny katalyzovaným guanidinobutyrasou (EC 3.5.3.7) rovněž přeměněna na GABA (Campo et al., 1992, Arakawa et al., 2003, Tylichová et al., 2007).

1.1.2 Tvorba osmoprotektantů

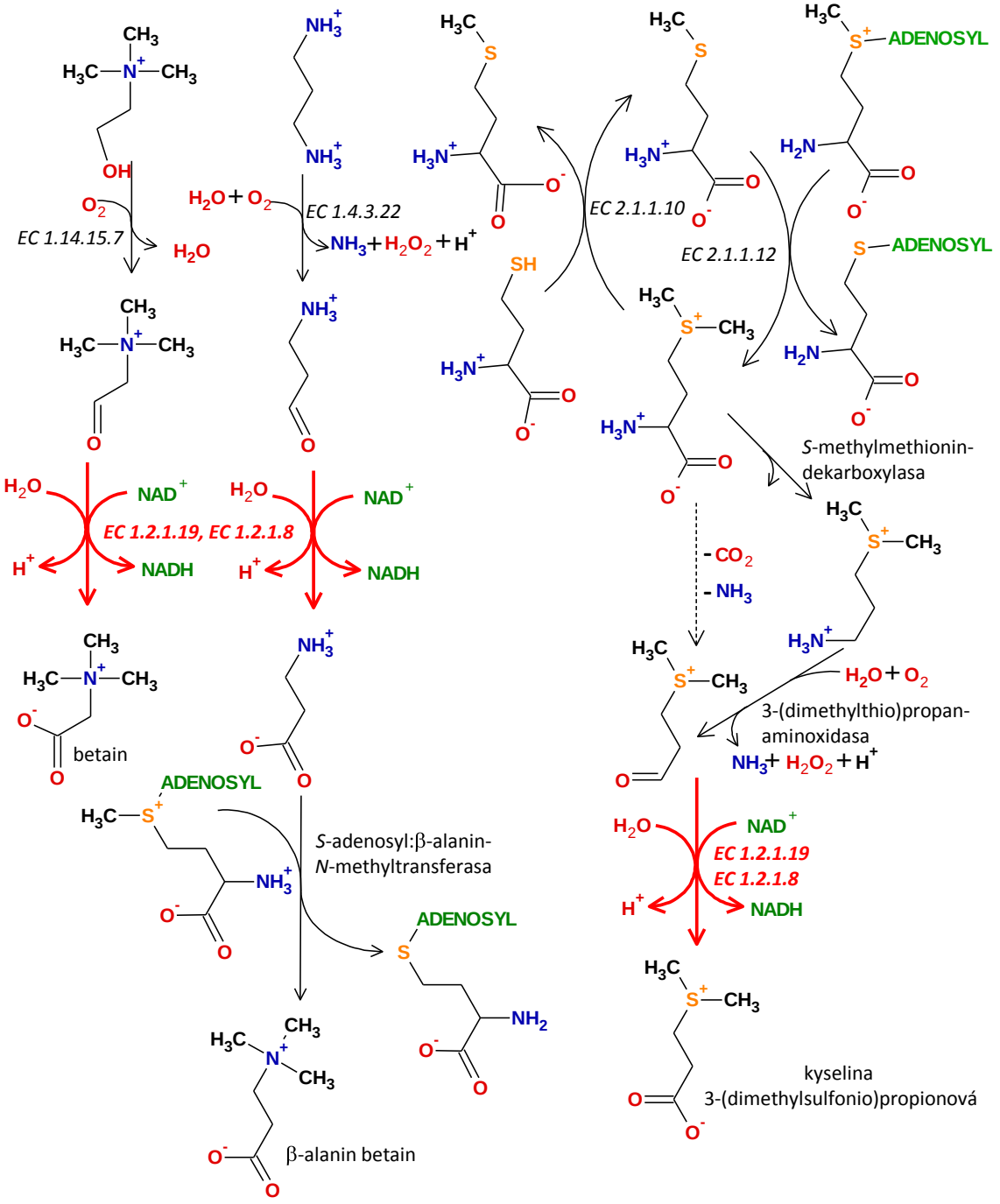
Zwitterionty obsahující kvarterní amin, popř. terciární sulfonium, a karboxylovou skupinu, zejména pak glycin betain [kyselina 2-(trimethylamino)octová], β-alanin betain [kyselina (3-trimethylamino)propanová], prolinbetain (stachydrin) či kyselina 3-(dimethylsulfonio)propionová jsou vysoce efektivními rostlinnými osmoprotektanty. Označení betain je odvozeno latinského názvu cukrové řepy (*Beta vulgaris*), kde byl poprvé identifikován glycinbetain. Od něj se pak označení betain přeneslo i na další karboxylové kyseliny obsahující kvartérní aminoskupinu. Za fyziologického pH nenesou žádný celkový náboj, navíc jsou i při vysokých koncentracích netoxické. Jejich akumulace tak zvyšuje osmotický tlak, aniž by nepříznivě ovlivňovala buněčné funkce, a tak představuje účinný prostředek obrany rostlin proti suchu, vysoké koncentraci solí, mrazu či vysokým teplotám. Rovněž stabilizují enzymy a membrány (Storey & Wyn Jones, 1977, Yancey et al., 1982, Hanson et al., 1991, Rhodes & Hanson, 1993, Hanson et al., 1994a, Chen et al., 2000).

Glycinbetain vzniká ve dvou krocích z cholinu (Obr. 3). Nejprve vzniká BAL, který je následně oxidován AMADH/BADH. Mechanismus oxidace cholinu na BAL odpovídá u rostlin reakčnímu mechanismu oxygenasy a nikoliv desaturasy, jak bylo prokázáno značením cholinu v listech deuteriem a kyslíkem ^{18}O (Lerma et al., 1988). Donorem elektronů pro kyslík je zde redukovaný ferredoxin nikoliv NADPH (Brouquisse et al., 1989). Reakce je katalyzovaná cholinmonooxygenasou (CMO, EC 1.14.15.7). Naproti tomu u živočichů a bakterií zajišťuje oxidaci cholinu buď membránový enzym cholindehydrogenasa (EC 1.1.99.1), nebo rozpustná cholinoxidasa (EC 1.1.3.17) (Tani et al., 1979, Yamada et al., 1979). Stejně jako celý proces biosyntézy glycinbetainu u rostlin je CMO lokalizována v chloroplastech, u C4 rostlin pak

v obou typech chloroplastů (Hanson et al., 1985, Weigel et al., 1986, Park et al., 2009). Zatímco aktivita BADH byla detegována ve všech orgánech cukrové řepy, přítomnost CMO byla zaznamenána především v již rozvinutých listech, slabší pak v hypokotylu a děložních lístcích. Naproti tomu v mladých a rozvíjejících se listech a kořenu se přítomnost CMO detekovat nepodařilo (Yamada et al., 2009). Vzhledem k osmoprotektivní funkci glycinbetainu není překvapením, že jak sucho, tak vysoká koncentrace soli indukuje expresi CMO (Russell et al., 1998).

CMO je oligomerní protein složený z identických podjednotek o molekulové hmotnosti přibližně 45 kDa . Její roztoky jsou červenohnědé vzhledem k obsahu komplexu železa a síry. Jedná se protein Rieskeho typu obsahující komplex [2Fe-2S] spojený se dvěma Cys a dvěma His, jež jsou uspořádány v sekvenci Cys-X-His-(15-17 aminokyselin)-Cys-X-X-His, kde X značí libovolnou aminokyselinu (Burnet et al., 1995, Rathinasabapathi et al., 1997). Jak ukázaly experimenty s mutantními enzymy, esenciálními aminokyselinami CMO jsou Cys 181 a His 278 v číslování odpovídajícím špenátovému enzymu (Hibino et al., 2002). CMO se vyskytuje jen u dvou rostlinných čeledí, merlíkovitých (*Chenopodiaceae*) a lipnicovitých (*Poaceae*). CMO čeledi merlíkovitých vykazují vzájemnou strukturní shodu přes 70 % a s čeledí lipnicovitých přes 40 % (Park et al., 2009, www.brenda-enzymes.org, duben 2014). Ostatní rostliny glycinbetain neakumulují. Modifikace těchto rostlin genem CMO z cukrové řepy či špenátu a jeho exprese vede ke zvýšení jejich odolnosti vůči suchu či osmotickému stresu vlivem akumulace glycin betainu (Hibino et al., 2002, Zhang et al., 2008b).

Kyselina 3-(dimethylsulfonio)propionová vzniká z aminokyseliny Met v několika krocích přes *S*-methylmethionin a 3-(dimethylsulfonio)propanal (Greene, 1962, James et al., 1995b) (Obr. 3). Prvním krokem je methylace Met za vzniku *S*-methylmethioninu (Hanson et al., 1994b), jež je katalyzována methionin *S*-methyltrasferasou (MMT, EC 2.1.1.12). Donorem methylu je zde *S*-adenosyl-L-methionin, který je reakcí přeměněn na *S*-adenosyl-L-homocystein (James et al., 1995a, Pimenta et al., 1998). Zároveň však v reakci katalyzované homocystein *S*-methyltranferasou (EC 2.1.1.10) je *S*-methylmethionin donorem methylové skupiny ve prospěch homocysteinu za tvorby dvou molekul Met (Ranocha et al., 2000, Lyi et al., 2007). Tyto dvě reakce tvoří *S*-methylmethioninový cyklus, který reguluje poměr mezi Met a S-adenosylmethioninem a rovněž umožňuje degradaci Met (Mudd & Datko, 1990). Zatímco ostatní methyltransferasy včetně homocystein-*S*-methyltranferasy jsou malými proteiny s velikostí molekuly či podjednotky kolem 30 kDa (Edwards & Dixon, 1991, Lyi et al., 2007), podjednotka obvykle tetramerních MMT dosahuje molekulové hmotnosti přibližně 115 kDa (James et al., 1995a, Pimenta et al., 1998).



Obr. 3: Základní kroky syntézy vybraných rostlinných osmoprotektantů. Reakce katalyzované rostlinnými ALDH10 (AMADH i BADH) jsou označeny červeně.

Druhým krokem je tvorba diMet-S-PALu, která probíhá dvěma různými způsoby. První možností, která je uplatňovaná *Wollastoria biflora* z čeledi hvězdicovitých (*Astraceae*), je současné odstranění aminoskupiny transaminací na ketokyselinu za vzniku aminokyseliny a dekarboxylace za uvolnění oxidu uhličitého (Rhodes et al., 1997) Naproti tomu v případě trávy ze slaných mokřadů (*Spartina alterniflora*, čeleď lipnicovité) dochází samostatně k dekarboxylaci a následné deaminaci. První mezikrok katalyzuje *S*-

methylmethionindekarboxylasa, druhý krok pak 3-(dimethylsulfonio)propanaminoxidasa, která vykazuje vysokou strukturní homologii s DAO, jejíž substráty jsou kompetitivními inhibitory tohoto enzymu (Kocsis & Hanson, 2000).

Poslední krok, oxidace diMet-S-PAL je katalyzován AMADH či BADH (Vojtěchová et al., 1997). Zatímco první krok probíhá v cytosolu, další přeměna *S*-methylmethioninu je katalyzována v chloroplastech. Tato lokalizace byla potvrzena jak imunodetekcí, tak schopností izolovaných chloroplastů z *Wollastoria biflora* (Trosat et al., 1996).

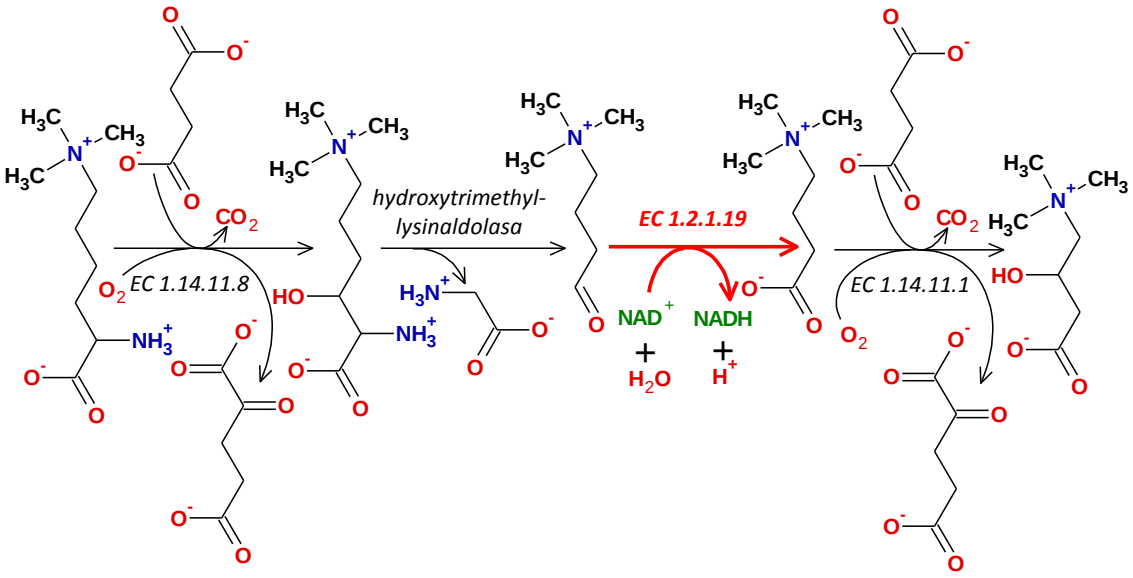
Většina zástupců čeledi olověncovitých (*Plumbaginaceae*), jež vykazuje vysokou míru tolerance vůči abiotickému stresu, akumuluje namísto glycinbetainu jeho homolog β-alaninbetain. Ten vzniká trojitou *N*-methylací β-alaninu (Hanson et al., 1994a) (Obr. 2, Obr. 3). Všechny tři kroky, methylace β-alaninu, *N*-methyl-β-alaninu a *N*,*N*-dimethyl-β-alaninu katalyzuje shodný enzym *S*-adenosyl:β-alanin-*N*-methyltransferasa, využívající jako donor methylové skupiny *S*-adenosylmethionin. Enzym byl prvně izolován z limonky (*Limonium latifolium*). Jedná se o dimerní protein s podjednotkou o velikosti 43 kDa a pH optimem 8,0 (Rathinasabapathi et al., 2001). Aminokyselinová sekvence vykazuje zejména na C konci značnou homologii vzhledem k některým *O*-methyltransferasám, zejména pak *S*-adenosylmethionin:kyselina 3,4-dihodroxyskořicová-*O*-methyltransferase (EC 2.1.1.68) a enzymům jí příbuzným. Substrátová specifičnost je úzce zaměřena na zmíněné tři substráty, jejich homology s delším či kratším řetězcem jsou methylovány jen velmi pomalu. Enzym je exprimován převážně v mladých a zralých listech. Ve starých listech, stonku, květu a kořenech je exprese výrazně slabší (Raman & Rathinasabapathi, 2003).

1.1.3 Biosyntéza karnitinu

Karnitin [kyselina 4-(trimethylamino)-3-hydroxybutanová] je významnou zwitteriontovou sloučeninou s několika významnými funkcemi pro organismus (Vaz & Wanders, 2002, Steiber et al., 2004). Předně se karnitin účastní transportu aktivovaných mastných kyselin z cytosolu do matrix mitochondrií, kde probíhá β-oxidace, a na transportu produktů cytosolární β-oxidace do matrix mitochondrií (Jakobs & Wanders, 1995, Kerner & Hoppel, 2000, Steiber et al., 2004). Dále se podílí na rovnováze mezi koenzymem A a acetylkoenzymem A, uchováním energie ve formě acetylkarnitinu či reakci na osmotický stres (Steiber et al., 2004,Cánovas et al., 2007). Karnitin je přítomen u živočichů, rostlin i mikroorganismů (Panter & Mudd, 1969, Vahouny et al., 1973, Kleber, 1997, Vaz & Wanders, 2002).

Zatímco u živočichů či hub je biosyntéza karnitinu popsána již delší dobu (Vahouny et al., 1973, Hulse & Henderson, 1980), u rostlin byla publikována až v posledních letech (Rippa et al., 2012). U savců je karnitin syntetizován z *N*,*N*,*N*-trimethyllysinu, jehož zdrojem může být nejen

lysin vznikající při degradaci proteinů, ale z velké části i v rostlinné potravě. Prvním krokem této dráhy je hydroxylace z *N*,*N*,*N*-trimethyllysinu trimethyllysindioxygenasou (EC 1.14.11.8) za vzniku 3-hydroxy-*N*,*N*,*N*-trimethyllysinu. Ten je dále rozštěpen hydroxytrimethyllysinaldolasou za vzniku triMet-ABAL a glycinu. Oxidaci triMet-ABALu katalyzuje AMADH a vzniklá kyselina 4-(trimethylamino)butanová (butyrobetain) je hydroxylována γ-butyrobetaindioxygenasou (EC 1.14.11.1) (Vaz & Wanders, 2002, Steiber et al., 2004).



Obr. 4: Základní schéma biosyntézy lysinu. Reakce katalyzovaná AMADH je vyznačena červeně.

Trimethyllysindioxygenasa, jež je označována rovněž jako trimethyllysinhydroxylasa, je svou aktivitou závislá na 2-oxoglutarátu a nehemovém železnatém iontu. Jedná se obvykle o dimerní protein s velikostí podjednotky kolem 45 kDa. Na rozdíl od ostatních enzymů biosyntézy karnitinu, jež se nacházejí volně v cytosolu, je spojena s mitochondriemi, kam ji směřuje prvních 15 aminokyselin její sekvence (Monfregola et al., 2005, Vaz et al., 2001). Hydroxytrimethyllysinaldolasa je nejméně prozkoumaný enzym z této dráhy. Zatímco u živočichů byla uvažována shoda se serinhydroxymethyltransferasou (EC 2.1.2.1), u kvasinky *Candida albicans* vykazuje enzym vysokou homologii s threoninaldolasou se stejnou funkční specifičností (EC 4.1.2.5). Pro aktivitu všech těchto tří enzymů je esenciální přítomnost pyridoxalfosfátu (Strijbis et al., 2009, Vaz & Wanders, 2002). γ-Butyrobetaindioxygenasa, poslední enzym této dráhy, vykazuje analogii k trimethyllysindioxygenase. Rovněž v tomto případě se jedná o enzym závislý na nehemovém železe a na 2-oxoglutarátu. Tento enzym má dimerní strukturu s podjednotkou o molekulové hmotnosti přibližně 42 kDA (Lindstedt & Hordin, 1984, Tars et al., 2010).

Nejen *N*,*N*,*N*-trimethyllysin, ale i meziprodukty jeho přeměny na karnitin byly detegovány i v rostlinách. Při studiu genomu *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny i geny pro enzymy

katalyzující druhý a třetí krok této dráhy. Navíc přídavek *N*,*N*,*N*-trimethyllysinu vedl k mírnému zvýšení produkce karnitinu (Rippa et al., 2012).

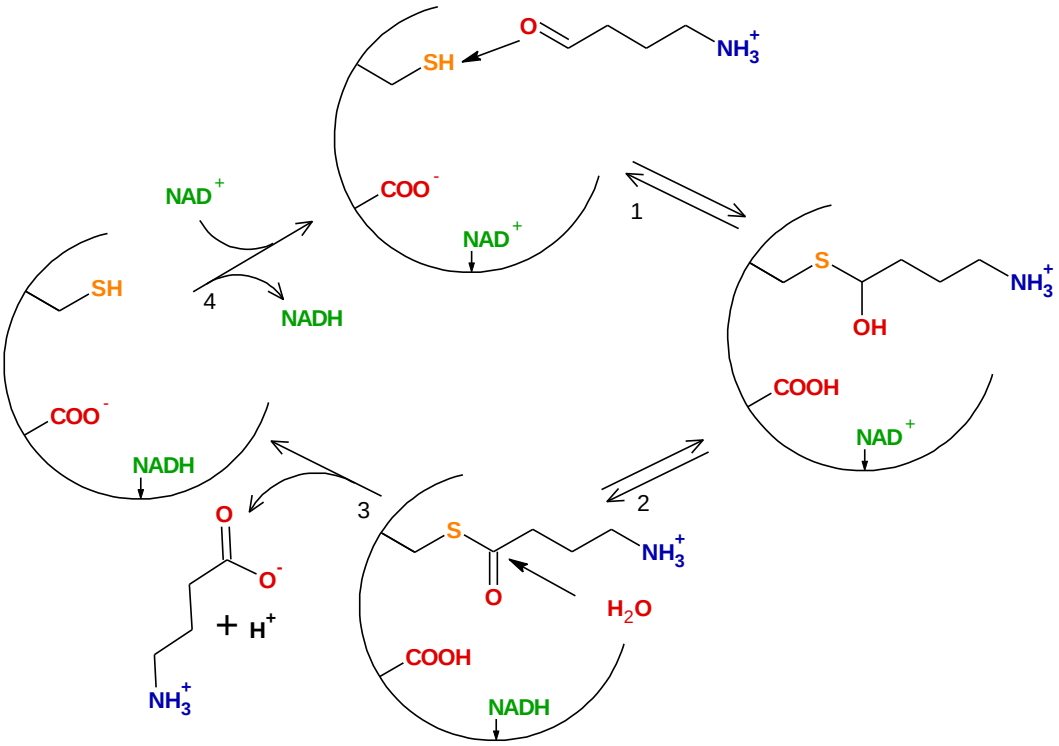
1.2 Vlastnosti rostlinných AMADH

Do dnešní doby byly AMADH purifikovány z mikroorganismů, rostlin i živočichů (Callewaert et al., 1974a,b, Tago et al., 1982, Kurys et al., 1989, Awal et al., 1997, Livingstone et al., 2002, Tanaka Dager et al., 2002). V prvních publikacích o rostlinných AMADH byly tyto enzymy lokalizovány v protoplastech (Šebela et al., 2001a). BADH podílející se primárně na syntéze glycinbetainu, se nachází především v chloroplastech (Weigel et al., 1986). V naší laboratoři byly detailně studovány AMADH z hrachu (*Pisum sativum*), rajčete (*Solanum lycopersum* syn. *Lycopersicon esculentum*) a kukuřice (*Zea mays*) (např. Tylichová et al., 2008, 2010, Kopečný et al., 2011, 2013). Většina AMADH obsahuje na C-konci tripeptid Ser-Lys-Leu, jenž je signálem pro lokalizaci v peroxisomech (PTS-1), Naproti tomu SlAMADH1 tento signál neobsahuje, sekvence jejího C-konce je Ser-Lys-Asn, a tak je patrně lokalizovaná v cytosolu (Kopečný et al., 2013).

1.2.1 Reakční mechanismus a katalytické vlastnosti

Přeměna aldehydu na příslušnou karboxylovou kyselinu za současné redukce NAD^+ na NADH katalyzovaná ALDH je typickým příkladem uspořádaného sekvenčního mechanismu (Obr. 1). Nejprve vstupuje do blízkosti aktivního místa koenzym NAD^+. Poté se aldehydová skupina váže ke katalytickému cysteinu za vzniku thiohemiacetalu, jenž je následně oxidován na thioester. Oba meziprodukty jsou stabilizovány v oxidačním otvoru tvořeném NH skupinou hlavního řetězce Cys294 a postranním dusíkem Asn162. Posléze je thioester hydrolyzován za odštěpení příslušné karboxylové kyseliny a nakonec dochází k odštěpení redukovaného koenzymu NADH (Perez-Miller & Hurley, 2003, Wymore et al., 2004, Tylichová et al., 2007).

Rostlinné AMADH se vykazují velmi širokou substrátovou specifičností. Nejlepším přirozeným substrátem rostlinných AMADH je obvykle APAL. Dalšími přirozenými substráty jsou analogické ω-aminoaldehydy ABAL a AVAL vznikající oxidací polyaminů, GBAL či triMet-ABAL. Naproti tomu BAL je jen slabým substrátem většiny rostlinných AMADH (Awal et al., 1997, Šebela et al., 2000, Livingstone et al., 2002, Tylichová et al., 2010). Na druhou stranu některé AMADH preferující APAL a ABAL katalyzují i konverzi BAL na betainaldehyd. Příkladem je kukuřičná AMADH1a (ZmAMADH1a) s hodnotou K_m přibližně 14 $\mu mol \cdot l^{-1}$. SlAMADH1 katalyzuje oxidaci BAL jen ve vysokých koncentracích (K_m = 2050 $\mu mol \cdot l^{-1}$) a v případě ostatních námi studovaných enzymů je BAL jen velmi slabým substrátem. Celkově nejširší substrátovou specifičnost z nich vykazuje SlAMADH1 (Kopečný et al., 2013).



Obr. 5: Základní kroky reakčního mechanismu AMADH demonstrované na oxidaci ABALu.

Mimo přirozené substráty oxidují AMADH i širokou škálu dalších aldehydů, mezi něž patří lineární alifatické aldehydy, GPAL a triMet-APAL - analoga GBALu a triMet-ABALu odvozená od APALu či další sloučeniny odvozené od APALu a ABALu. Slabými substráty obou PsAMADH jsou pyridinkarbaldehydy (Šebela et al., 2000, Tylichová et al., 2010), což bylo impulzem pro pozdější studium substrátové specifičnosti AMADH vzhledem k aldehydům obsahujícím aromatické cykly (Příloha 1). Rovněž *N*-acetyl-3-aminopropanal (Ac-APAL) a diMet-S-PAL jsou dobrými substráty AMADH z hrachu, rajčete či kukuřice. Aktivita všech enzymů testovaných v citované publikaci vzhledem k Ac-APALu o koncentraci 1,0 mmol·l^{-1} dosahovala alespoň 30 % aktivity v porovnání s aktivitou v případě APALu. V případě diMet-S-PALu pak enzymy dosáhly relativní aktivity alespoň 10 % za shodných podmínek (Kopečný et al., 2013). Skutečnost, že AMADH oxiduje velmi dobře Ac-APAL vede k otázce, zda jsou substráty AMADH i *N*-acetyl-4-aminobutanal (Ac-ABAL) a další *N*-acylované deriváty APALu a ABALu. V případě jejich oxidace je zajímavý vliv nejen přítomnosti, ale i délky a řetězové izomerie acylového řetězce zmíněného derivátu (Příloha 2).

Mimo substrátové specifičnosti vzhledem k rozmanité řadě aldehydů již byla testována i aktivita AMADH při substituci koenzymu NAD$^+$ koenzymem NADP$^+$ či jejich analogy. Přirozený koenzym některých dehydrogenas NADP$^+$ je v případě rostlinných AMADH slabým akceptorem elektronů, aktivita enzymu při jeho použití klesá na méně než pětinu ve srovnání s koenzymem NAD$^+$. Příčinou je kolize 2`-fosfátu s vedlejším řetězcem Lys245 v případě PsAMADH1 či Glu188

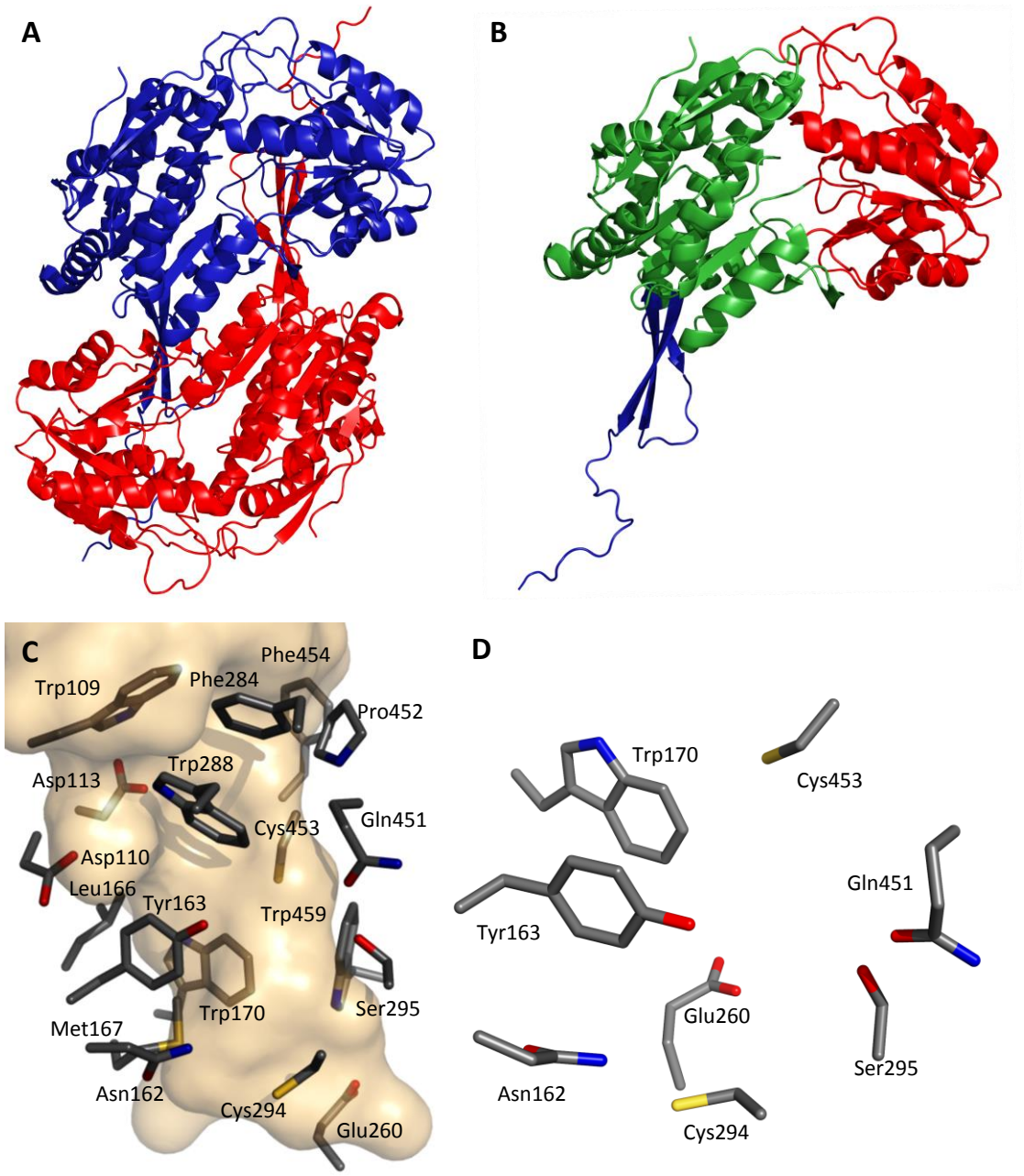
v případě PsAMADH2. Zatímco v případě BADH z bakterie *Pseudomonas auruginosa*, jež využívá jako akceptor elektronů rovnoměrně jak NAD^+ tak $NADP^+$, dochází ke změně konformace vedlejšího řetězce Glu188, u PsAMADH2 to není možné z důvodu případné kolize tohoto řetězce s vedlejšími řetězci Ile25, Ile39 a Leu217 (Gonzáles-Segura et al., 2009, Tylichová et al., 2010). Daleko lepším koenzymem než $NADP^+$ je pro rostlinné AMADH 3-acetylpyridin adenin dinukleotid zachovávající minimálně třetinu aktivity vzhledem k NAD^+, zatímco 3-pyridinaldehyd adenin dinukleotid vede k minimální či nulové aktivitě. Naproti tomu deamino-NAD^+ (nikotinamid hypoxantin dinukleotid) je spojen s aktivitou srovnatelnou či dokonce mírně vyšší než pro fyziologický koenzym NAD^+. Výjimku zde tvoří ZmAMADH2, kde použití deaminoNAD^+ vede k akivitě odpovídající jen 60 % aktivity pro NAD^+. Na druhou stranu u obou PsAMADH dojde ke zvýšení aktivity na více než 150 % vzhledem k NAD^+ (Tylichová et al., 2010, Kopečný et al., 2013).

1.2.2 Struktura AMADH

Dle isoelektrického bodu jsou rostlinné AMADH včetně BADH kyselými proteiny s hodnotou pI mezi 4,5 a 6,5 (např. Šebela et al., 2000, Livingstone et al., 2002, 2003). Obvykle se jedná o oligomerní proteiny se vzájemnou strukturní shodou mezi jednotlivými rostlinnými taxony minimálně 70 %. Podjednotky oligomerních AMADH jsou obvykle shodné (Arakawa et al., 1987, Šebela et al., 2000, Livingstone et al., 2003, Tylichová et al., 2008, 2010, Zhang et al., 2008a). Výjimku tvoří například monomerní AMADH z ovsa (Livingstone et al., 2002) či BADH z laskavce, jenž byl vystaven suchu. V tomto případě se enzym sestává ze dvou rozdílných polypetidových řetězců o molekulových hmotnostech 63 a 70 kDa (Figueroa-Soto & Valenzuela-Soto, 2001).

Prvními rostlinnými AMADH, u nichž byly publikovány krystalové struktury, jsou oba izoenzymy AMADH z hrachu (PsAMADH1 a PsAMADH2). Zatímco asymetrická jednotka krystalu PsAMADH1 se sestává ze šesti dimerů, asymetrická jednotka PsAMADH2 je tvořena jedním dimerem. Obdobně k ostatním ALDH lze i zde nalézt tři domény: katalytickou, koenzymovou a oligomerizační doménu (Obr. 6). Poslední část oligomerizační domény se vodíkovou vazbou připojuje k poslední části katalytické domény za tvorby dimeru. Tyto dimery se mohou dále spojit interakcí zády k sobě v oblasti naproti místu, kde dochází k vazbě koenzymu. Mezi podjednotkami se nachází přibližně 15 Å dlouhý substrátový tunel nálevkovitého tvaru, na jehož dně se nachází aktivní místo tvořené třemi striktně zachovanými aminokyselinami Cys294, Glu260 a Asn162, jež jsou pro aktivitu AMADH esenciální. Zatímco substrát vstupuje do aktivního místa zmíněným tunelem, koenzym přistupuje ke katalytickému cysteinu z opačné

strany. Každá podjednotka má své aktivní místo zcela nezávislé na dalším aktivním místě dimeru (Tylichová et al., 2010).



Obr. 6: Struktura PsAMADH2 (Tylichová et al., 2010). A: rekombinantní enzym je homodimerní (podjednotky označeny modře a červeně). B: každá podjednotka sestává z katalytické domény (červeně), koenzymové domény (zeleně) a oligomerizační domény (modře). C: substrátový kanálek vedoucí k aktvinímu místu. D: trojice konzerovaných residuí Cys, Asn a Glu tvořících aktivní místo a nejbližší rezidua substrátového kanálku.

Katalytická doména je jako jediná tvořena pouze jedním uceleným úsekem polypeptidového řetězce (v pořadí odpovídajícím oběma PsAMADH aminokyseliny 262-452). Oligomerizační doména se skládá ze dvou (aminokyseliny 132-151 a 430-503) a koenzymová

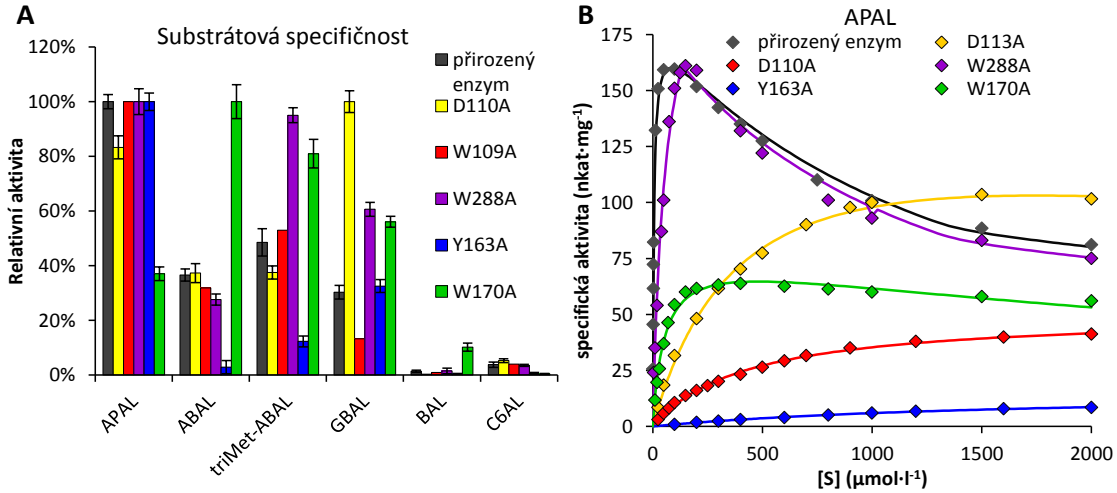
doména ze tří (aminokyseliny 1-131, 152-261, 453-479) úseků. Ústřední část katalytické i koenzymové domény je tvořena čtyřmi α-helixy a pěti řetězci β-listu. Oligomerizační doménu pak tvoří dvě dlouhá β-vlákna a jedno krátké β-vlákno. Oproti jiným ALDH je C konec polypetidového řetězce delší, jelikož obsahuje signální sekvenci typu 1 směřující protein do peroxisomů (Tylichová et al., 2010).

Substrátový kanál je ve své vstupní části tvořen v případě PsAMADH1 zbytky Ala109, Asp113, Pro452 a Ser453. Vnitřní část kanálku pak tvoří Asp110, Asn162, Tyr163, Leu166, Met167, Trp170, Phe284, Phe288, Ile293, Cys294, Ser295, Gln451 a Trp459. Substrátový kanál PsAMADH2 se liší v pouhých třech residuích: Ala/Trp109, Phe/Trp288 a Ser/Cys453 (Obr. 6). Tyto rozdíly jsou příčinou odlišností v substrátové specifičnosti obou PsAMADH (Tylichová et al., 2010). Studie mutantů PsAMADH2 ukazuje vliv jednotlivých residuí substrátového kanálu nejen na aktivitu, ale zejména na substrátovou specifičnost enzymu. Negativně nabité aminokyseliny Asp a Glu interagují s pozitivně nabitou aminoskupinou APALu. Nahrazení takové aminokyseliny alaninem (bodová mutace E106A, D110A, D113A a jejich kombinace) vede k výraznému poklesu afinity enzymu ke zmíněnému substrátu a poklesu reakční rychlosti. Naproti tomu oxidace alifatických aldehydů je touto mutací postižena daleko méně. V případě aromatických aminokyselin Trp, Phe a Tyr dochází k π-elektronové interakci vstupujícího substrátu s aromatickým cyklem. Zatímco bodová mutace vysoce konzervovaných aminokyselin ve vnitřní části substrátového kanálu (W170A, popř. Y163A) vede k výraznému poklesu rychlosti oxidace APALu, mutace variabilních aminokyselin při vstupní části kanálku (W109A či W288A) má výrazně menší vliv na aktivitu enzymu. V tomto případě dokonce došlo k rychlejší oxidaci triMet-ABALu, GBALu či pyridinkarbaldehydů (Kopečný et al., 2011) (Obr. 7).

Dvojice po sobě následujících aminokyselin Leu166 a Met167 nacházející se uvnitř substrátového kanálu je zachována u všech známých sekvencí rostlinných AMADH, zatímco živočišné enzymy obsahují v daném místě pár Gln166-Ile167. K pochopení významu byla vytvořena další verze PsAMADH2 (mutant L166Q + M167I). CD spektroskopie mutanta neodhalila rozdíly v sekundární struktuře, ovšem funkční studií byla prokázána výrazně vyšší hodnota Michaelisovy konstanty (K_m) a násobné snížení limitní rychlosti (V). Obě rezidua se patrně podílí na zachování prostorového uspořádání aktivního místa PsAMADH2. V blízkosti páru Leu166-Met167 a residua Trp170 se v substrátovém kanálu nachází Cys453. Vzhledem k jeho poloze se uvažovalo o jeho zapojení do vazby substrátu, ovšem kinetickou studií mutantu C453A byl pozorován pouze nepatrný vliv na katalytické vlastnosti enzymu (Kopečný et al., 2011).

Základními zbytky aktivního místa jsou Cys294, Asn162 a Glu260 (Obr. 6). Na thiolovou skupinu Cys294 se přímo váže substrát (Tylichová et al., 2010) (Obr. 5). Asn162 vytváří svým

postranním dusíkem společně s dusíkem hlavního řetězce Cys294 otvor, v němž jsou stabilizovány meziprodukty reakce (Steinmetz et al., 1997). To potvrzuje i přibližně 200krát nižší dehydrogenasová aktivita mutantu N162A spojená s poklesem afinity k substrátu o více než jeden řád (Kopečný et al., 2011). Vedlejší řetězec Glu260 je flexibilní. V aktivní pozici směřující k nikotinamidu se řetězec dostává do vzdálenosti 3,5 Å od síry katalytického Cys294. V klidové pozici vzroste vzdálenost od zmíněné síry na 7 až 8 Å a Glu260 interaguje s dusíkem hlavního řetězce Glu470 a kyslíkem hlavního řetězce Trp459 (Tylichová et al., 2010).



Obr. 7: Význam vybraných zbytků substrátového kanálu na aktivitu a substrátovou specifičnost PsAMADH2 demonstrovaný pomocí bodových mutací (Kopečný et al., 2011). A: Substrátová specifičnost mutantů vzhledem k substrátům při [S] = 1,0 mmol·l^{-1}. B: Saturační křivky při oxidaci APALu.

V případě vazebného místa pro koenzym NAD$^+$ je velmi dobře definována pouze poloha adenindifosfátu (ADP), zatímco poloha nikotinamidribosidu je výrazně flexibilnější. Zatímco u PsAMADH1 zaujímá ADP část koenzymu NAD$^+$ polohu, jež dosud nebyla u jiných ALDH pozorována, v případě PsAMADH2 se poloha adeninu shoduje s jeho polohou u ostatních ALDH. Adeninová báze koenzymu se obvykle nachází v hydrofobní kapse mezi helixy αD a αE, je zasunuta mezi Gly218 a vedlejším řetězcem Thr242 a nevytváří polární kontakt s enzymem. Tato část NAD$^+$ vytváří vodíkové vazby s Glu188, Thr159, Lys185 (ribosa), Thr242, Ser239 (α-fosfát) a Trp161 (β-fosfát). Poloha adeninové báze NAD$^+$ v případě PsAMADH1 je převrácena o 180° oproti obvyklé konformaci, díky čemuž je strana N3-N9 přístupná rozpouštědlu a ribosa i oba fosfáty jsou vně vazebné kapsy. Adeninová báze je umístěna mezi Gly218 a AAL223 na jedné a Thr242 a Ile246 na druhé straně. ADP pak vytváří vodíkové vazby s Lys245, Gln341 (ribosa), Thr242 a Ser239 (β-fosfát) (Tylichová et al., 2010).

1.2.3 Residua klíčová pro substrátovou specifičnost AMADH

Ačkoliv residua aktivního místa AMADH jsou plně zachována a residua substrátového kanálku jsou rovněž vysoce konzervována, vyskytují se v této klíčové části proteinu mezi jednotlivými isoenzymy jisté rozdíly (Tab. 2). Velmi široká substrátová specifičnost SlAMADH1 je patrně způsobena přítomností krátkého Ala289 nahrazujícího obvyklý Trp. Důležitá je i přítomnost Tyr na pozici 454 namísto obvyklého Ser či Cys. Skutečnost, že ZmAMADH1a akceptuje BAL jakožto substrát, je způsobena Cys446, který nahrazuje Ile přítomný na ekvivalentní pozici u ostatních enzymů. Nízká afinita SlAMADH1 k BAL je zapříčiněna Asn290, na jehož pozici se v případě dalších AMADH nachází Thr. AMADH, které postrádají na pozici 288 Trp, přijímají APAL hůře než ostatní AMADH a preferují triMet-ABAL, zato však dobře oxidují i pyridinkarbaldehydy (Díaz-Sánchez et al., 2012, Kopečný et al., 2013).

Tab. 2: Porovnání aminokyselin tvořících aktivní místo a substrátový kanál u ALDH10 z hrachu (*Pisum sativum* PsAMADH, UniProtKB:Q8VWZ1 a Q93YB2), rajčete (*Solanum lycopersum* SlAMADH, UniProtKB:B6ECN9), kukuřice (*Zea mays* ZmAMADH, UniProtKB: C0P9J6, G5DDC2 a C6KEM4), rýže (*Oryza sativa*, OsBADH, UniProtKB: O24174 a Q84LK3), ječmene (*Hordeum vulgare*, HvAMADH, UniProtKB: Q94IC0 a 94IC1) a špenátu (*Spinacia oleracea*, SoBADH, UniProtKB: P17202). Pozice jsou očíslovány dle PsAMADH2.

Zdroj	Aktivní místo			Substrátový kanál a okolí																		C-konec
Enzym	C294	N162	E260	W109	D110	D113	Y163	L166	M167	W170	F284	W288	I293	S295	I444	Q451	P452	C453	F454	T455	W459	
PsAMADH1	C	N	E	A	D	D	Y	L	M	W	F	F	I	S	I	Q	P	S	F	I	W	SKL
PsAMADH2	C	N	E	W	D	D	Y	L	M	W	F	W	I	S	I	Q	P	C	F	T	W	AKL
SlAMADH1	C	N	E	A	D	D	Y	L	M	W	F	A	V	S	I	Q	P	T	F	N	W	SKN
SlAMADH2	C	N	E	S	D	D	Y	L	M	W	F	W	I	S	I	Q	P	C	F	W	W	SKL
ZmAMADH1a	C	N	E	W	D	D	Y	L	M	W	F	W	I	S	C	Q	P	C	F	C	W	SKL
ZmAMADH1b	C	N	E	W	D	D	Y	L	M	W	F	W	I	S	I	Q	P	C	F	C	W	SKL
ZmAMADH2	C	N	E	G	D	D	Y	L	M	W	F	A	I	S	I	Q	P	C	F	V	W	SKL
OsBADH1	C	N	E	G	D	D	Y	L	M	W	F	A	I	S	I	Q	P	C	F	V	W	SKL
OsBADH2	C	N	E	W	D	D	Y	L	M	W	F	W	I	S	I	Q	P	C	F	C	W	SKL
HvAMADH1	C	N	E	A	D	D	Y	L	M	W	F	W	I	S	I	Q	P	T	L	V	W	SKL
HvAMADH2	C	N	E	W	D	D	Y	L	M	W	F	F	V	S	C	Q	P	C	F	C	W	AN-
SoBADH	C	N	E	L	D	D	Y	L	M	W	F	W	I	S	A	Q	P	C	F	V	W	KSP

Přítomnost Trp na pozici 288 (PsAMADH), jíž odpovídají v případě rajčatových a kukuřičných isozymů pozice 289 (SlAMADH), 290 či 291 (ZmAMADH), zvyšuje afinitu enzymu k APALu. Enzymy s tímto residuem (např. PsAMADH2, SlAMADH2 a ZmAMADH1a/b) (Tab. 2) vykazují

výrazně nižší hodnotu K_m (kolem 10 µmol·l^{-1}) než ostatní isozymy (kolem 50 µmol·l^{-1}). Tyto enzymy se vyznačují rovněž masivní inhibicí nadbytkem substrátu již v nižších koncentracích než enzymy, u nichž je Trp288 nahrazen Ala či Phe (Kopečný et al., 2013). To platí i pro mutanta W288A v případě PsAMADH2 (Kopečný et al., 2011). Stejný vztah byl pozorován i u dalších AMADH např. z rýže (*Oryza sativa*, OsAMADH), kde OsAMADH2 obsahující zmíněný Trp vykazuje výrazně nižší hodnotu K_m než OsAMADH1, kde je na oné pozici Ala (Bradbury et al., 2008). Vyšší preference enzymů neobsahujících Trp288 vůči tri-Met-ABALu je způsobena větším poloměrem substrátového kanálku a ztrátou π-interakce mezi aromatickým jádrem Trp a kladně nabitým kvartérním dusíkem substrátu. Enzymy s náhradou Trp288 jiným residuem rovněž vykazují vyšší stupeň aktivity vzhledem k pyridinkarbaldehydům (Kopečný et al., 2013).

SlAMADH1, jejíž substrátová specifičnost je nejširší ze všech námi testovaných izoenzymů, se liší od ostatních isoenzymů přítomností Thr454 (pozice 453 dle PsAMADH) (Tab. 2). V ostatních případech se zde nachází Ser či Cys. Oproti ostatním strukturám je v případě SlAMADH1 pozice Thr454 a tří následujících aminokyselin rozdílná. Posun Thr454 o 1,8 Å od aktivního místa ve srovnání s odpovídajícími rezidui ostatních enzymů vede k vodíkové vazbě vedlejšího řetězce Thr454 s dusíkem vedlejšího řetězce Gln485 z oligomerizační domény druhé podjednotky. Substrátový kanálek je tak širší a méně polární, díky čemuž vykazuje SlAMADH1 vyšší afinitu k alifatickým i aromatickým aldehydům (Kopečný et al., 2013).

Zatímco AMADH, jež nepřijímají BAL jako substrát, obsahují na pozici 441 až 446 dle číslování konkrétního enzymu (ekvivalent pozice 444 u PsAMADH2) Ile, ZmAMADH1a s vysokou afinitou vůči BALu obsahuje Cys446 (Tab. 2). To vede k posunu vedlejšího řetězce Trp461 o 1,6 Å směrem od Tyr165 v porovnání s odpovídajícími Trp459 a Tyr163 v případě obou PsAMADH. Striktně zachovaná residua Tyr163, Trp170, Trp288 a Trp459 totiž vytváří kation-π interakce s trimethylamoniovou skupinou BALu, který se tak zasune mezi Tyr163 a Trp459 (Kopečný et al., 2013). V případě BADH ze špenátu (SoBADH, *Spinacia olerace*) se na této pozici nachází Ala441 (Tab. 2), který je díky své menší velikosti příliš vzdálen od Tyr160 (Tyr163 u PsAMADH2). Díky tomu nedochází k van der Waalsově interakci mezi zmíněnými residui a otvírá se tak prostor pro vstup trimethylamoniové skupiny substrátu. Zatímco mutant SoBADH A441I vykazuje drastické zhoršení katalitických vlastností při oxidaci BALu (poměr V/K_m poklesne přibližně 166krát), probíhá oxidace BALu mutantem A141C za podmínek srovnatelných s přirozeným enzymem (Díaz Sanchez et al., 2012). Evolučně nejstarší aminokyselina na této pozici je pravděpodobně Ile. Z něj se pak po dvou bodových mutacích mohl vyvinout jak Ala přes Val či přes Thr, tak Cys přes Ser či přes Phe. Z mutantů BADH vykazuje obdobnou schopnost oxidace BALu nejen již zmíněný mutant A441C, ale i jeho teoretický předstupeň A441. Vcelku dobře přijímá BAL i mutant A441T. V případě mutantů za

zbývající teoretické mezistupně i za Ile dochází k dramatickému zhoršení aktivity enzymu vzhledem k BALu. Naproti tomu však mutant A441I oxiduje APAL daleko lépe než přirozený enzym, kdy při srovnatelné hodnotě K_m (cca 4 μmol·l^{-1}) vzroste hodnota k_{cat} přibližně na dvojnásobek (1,0 a 1,9 s^{-1}) (Muñoz-Clares et al., 2014).

SlAMADH1, která oxiduje BAL jen ve vysokých koncentracích, má ve své struktuře Asn290 odpovídající Thr289 v případě PsAMADH2. Zatímco Thr289 vytváří vodíkovou vazbu s vedlejším řetězcem Tyr163, Asn290 tuto vazbu nevytváří. To umožňuje Tyr163 posun směrem ke Asn290 ven ze substrátového kanálku. Je proto pravděpodobné, že funkce Asn290 je obdobná funkci Cys446 v případě ZmAMADH1a (Kopečný et al., 2013).

2 Aldehydy v lihovinách a jejich detekce využitím 2,4-dinitrofenylhydrazinu

V lihovinách se obvykle vyskytuje malé množství aldehydů (Nascimeto et al., 1997, López-Vázques et al., 2010). Tyto aldehydy jsou obvykle produkty např. tepelného rozkladu cukrů, fermentace či oxidace alkoholů přítomných v lihovinách, popř. důsledkem kontaminace v průběhu výroby či skladování (Hodge et al., 1953, Miyake & Shibamoto, 1993, Clemente-Jimenez et al., 2005, Cortés et al., 2010, Bortoletto & Alcarde, 2013). Aldehydy obsažené v lihovinách jsou toxické, přičemž v přítomnosti ethanolu je jejich toxicita výrazně vyšší. Mezi projevy intoxikace aldehydy patří např. nausea, zvracení, neklid, pocení, pokles krevního tlaku, zrychlený tep či bolesti hlavy při kocovině (Nascimento et al., 1997, Eriksson, 2001). Proto je obsah aldehydů nejen v lihovinách, ale i v dalších nápojích a potravinách sledován. Vzhledem k široké substrátové specifičnosti SlAMADH1 (Kopečný et al., 2013, Příloha 1), byl tento enzym vybrán pro tvorbu biosenzoru využitelného pro jejich detekci (Příloha 3).

2.1 Aldehydy přítomné v lihovinách

V lihovinách byla detekována široká škála aldehydů. Nejvyšší koncentrace obvykle dosahuje acetaldehyd (C_2AL). Často se vyskytují i akrolein (AkrAL), furfural (FurAL), 5-hydroxymethylfurfural (OH-Met-FurAL) či benzaldehyd (BzAL). Rovněž další alifatické aldehydy (C_nAL) včetně některých větvených izomerů, např. isovaleraldehydu (3-methylbutanal, 3-Met-BAL) a 2-methylbutanalu (2-Met-BAL) bývají v lihovinách detegovány. Přítomnost 5-methylfurfuralu (Met-FurAL) rovněž není výjimkou, ale obvykle jeho koncentrace je obvykle výrazně nižší než v případě FurALu a OH-Met-FurALu. Jednotlivé druhy lihovin se samozřejmě liší obsahem jednotlivých aldehydů (Miyake & Shibamoto, 1993, Nascimeto et al., 1997, Ledauphin et al., 2010, López-Vázques et al., 2010, Plutowska et al., 2010, Alcarde et al., 2011,

Cabaroglu & Yilmaztekin, 2011). Výrazné rozdíly jsou i mezi lihovinami podobného druhu, ale rozdílného původu. Kupříkladu grapa i orujo jsou destiláty vyráběné z pevného podílu zbylého po lisování vinných hroznů. Přesto orujo, jež se vyrábí v regionu Galicie v severozápadním Španělsku, obsahuje BzAL, který grapa ze severovýchodní Itálie neobsahuje. Navíc koncentrace FurALu v grapě je výrazně nižší než v oruju. Rozdíly byly pochopitelně i mezi jednotlivými konkrétními vzorky obou zmíněných lihovin (Cortés et al., 2011). Velký vliv na složení dané lihoviny má i způsob uskladnění surovin či produktu v době zrání. Podstaný je např. materiál nádoby, ve které je uskladněna surovina pro výrobu (Cortés et al., 2010), či druh dřeva, z nějž byl vyroben sud použitý pro zrání lihoviny (Bortoletto & Alcarde, 2013).

Acetaldehyd, který se v lihovinách obvykle vyskytuje v největších koncentracích, je vysoce těkavá bezbarvá kapalina. Vzniká fermentací pyruvátu, jako meziprodukt mléčného či alkoholového kvašení či při odbourávání Thr některými kmeny rodů *Lactobacillus* či *Streptococcus* za současného vzniku Glu. C_2AL je rovněž prvním meziproduktem při degradaci ethanolu požitého v alkoholických nápojích. C_2AL se vyskytuje nejen v lihovinách, ale i v dalších alkoholických či nealkoholických nápojích, mléku a mléčných výrobcíchpražené kávě a mnoha dalších potravinách. Jeho množství v alkoholických nápojích připravených fermentací ovoce výrazně přesahuje koncentraci v alkoholických nápojích neobsahujících ovoce. Dalším z mnoha zdrojů C_2AL je i cigaretový kouř (Semmelroch & Grosch, 1995, Chaves et al., 2003, Belluzzi et al., 2005, Paiano et al., 2014). Je prokázáno, že C_2AL způsobuje mnohé stavy vyvolané konzumací alkoholických nápojů, mezi něž patří bolesti hlavy, výrazné zhoršení orientačních a motorických schopností či změny v chování jednotlivce (Eriksson, 2001, Correa et al., 2012). Společně s ethanolem vytváří C_2AL adukty s nukleosidy vazbou na postranní aminoskupinu bazí za vzniku smíšených acetalů. Tyto adukty například zpomalují činnosti DNA a RNA polymeras či zvyšují riziko rakoviny prsu u žen (Fraenkel-Konrat & Singer, 1988, Austin et al., 1993). Díky své vazbě na proteiny způsobuje C_2AL také nepravidelnosti srdečního rytmu či apoptotickou buněčnou smrt. Obojí však lze zmírnit podáním vitamínu B1, nikoliv však vitamínu B6 či B12 (Aberle et al., 2004). Rovněž bylo prokázáno, že deficit mitochondriální ALDH2 oxidující C_2AL na kyselinu octovou vede k oxidativnímu stresu a vyššímu riziku Alzheimerovy choroby (Ohta et al., 2004). V současnosti je považován za karcinogen 2. kategorie (bezpečnostní list – verze 2010, revize 2014, http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/a/bezplist_383.pdf, duben 2014).

FurAL, Met-FurAL a OH-Met-FurAL, které se vyskytují v mnoha potravinách a nápojích, vznikají především tepelným rozkladem sacharidů či kyseliny askorbové. Zejména OH-Met-FurAL je produktem jak Maillardovy reakce, která způsobuje hnědnutí potravin při tepelné úpravě, tak i karamelizace (Hodge et al., 1953, Fadel & Farouk, 2002). Pro jejich mutagenní

účinky, mezi něž patří výměna sesterských chromatid lymfocitu, se v případě FurALu a Met-FurALu jedná o potenciální karcinogeny (Khan et al., 1995). Genotoxicita OH-Met-FurALu naproti tomu pozorována nebyla, a tak jeho potenciální karcinogenita je patrně způsobena jinými mechanismy (Matsushita et al., 2012, bezpečnostní list – verze 2013, http://www.sigmaaldrich.com, duben 2014). Množství FurALu ve slivovicovém destilátu pro výrobu slivovice omezuje vyhláška Ministerstva zemědělství ČR 141/1997 sb. ve znění pozdějších novelizací na 50 mg v litru 100% ethanolu, což v případě lihoviny s obsahem ethanolu 50 % (V/V) odpovídá přibližně koncentraci 0,26 mmol·l^{-1}.

Benzaldehyd je nejjednodušší aromatický aldehyd. V semenech ovoce vzniká často štěpením glykosidu amygdalinu (Haisman & Knight, 1967), je přítomný v mandlích, kterým dodává charakteristické aroma. Rovněž je často přítomen ve víně, kde se podílí na tvorbě buketu (Delfini et al., 1991, Green et al., 2011). Obsah FurAL a BzAL ve sladkém víně je výrazně vyšší, než ve víně suchém (Genovese et al., 2007).

AkrAL vzniká například při tepelném rozkladu sacharidů, aminokyselin a tuků, při přepalování tuků nebo při metabolizaci cytosatického chemoterapeutika cyklofosfamidu (*N*,*N*-bis(2-chloroethyl)-1,3,2-oxazafosfinan-2-amin-2-oxid) a ifosfamidu (*N*,3-bis(2-chloroethyl)-1,3,2-oxazafosfinan-2-amin-2-oxid) (Paci et al., 2000). V cigaretovém kouři je AkrAL hlavním zdrojem rakoviny plic (Feng et al., 2006). Vzhledem k reaktivitě s thiolovými skupinami vede expozice AkrALu k tvorbě aduktů s vedlejším řetězcem Cys či glutathionem, navíc dochází i ke tvorbě aduktů se všemi bázemi DNA (Abraham et al., 2011). Mutagenní účinky AkrAL reprezentuje výměna sesterských chromatid lymfocytů či poškození DNA fibroplastů (bezpečnostní list – verze 2014, http://www.sigmaaldrich.com, duben 2014).

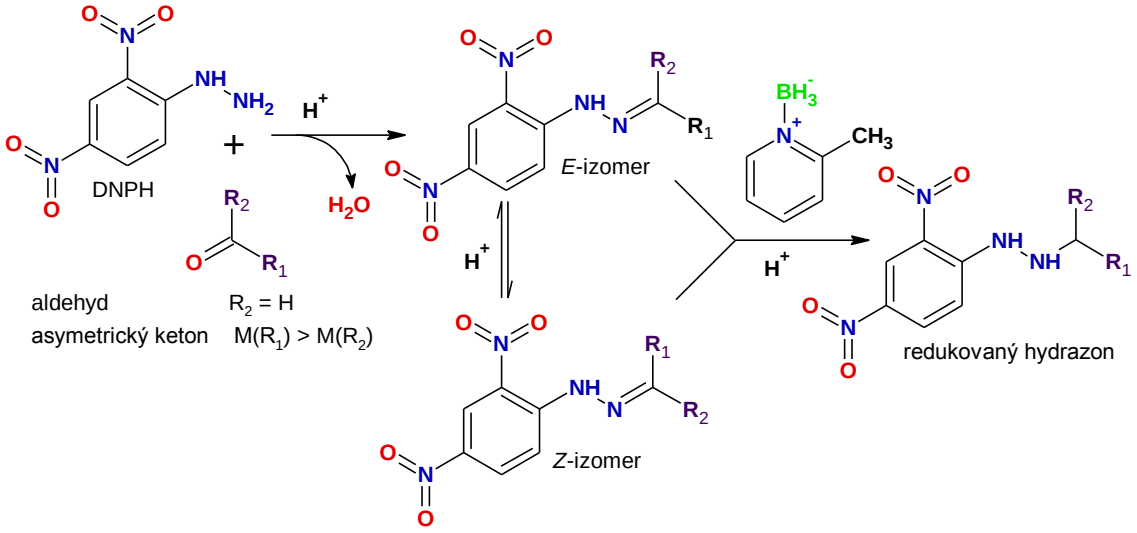
Stejně jako C_2AL je příčinou projevů otravy alkoholem, je i toxicita methanolu z velké části dána jeho metabolity C_1AL a kyselinou mravenčí. Nejznámějším projevem otravy je v tomto případě postižení zraku projevující se slzením, zánětem rohovky či dokonce oslepnutím (Cooper & Marchezi, 1959, Tephly, 1991). Expirace C_2AL dále vede k respiračním problémům, rakovině (karcinogen 3. kategorie), poškození jater a ledvin či vyššímu riziku leukémie (Hauptman et al., 2004, Sandicki et al., 2009, Zhang et al., 2009).

2.2 Detekce aldehydů derivatizací 2,4-dinitrofenylhydrazinem

Pro detekci aldehydů v různých matricích byla vytvořena řada metod. Ze zkumavkových reakcí se nejčastěji využívá reakce se Schiffovým činidlem (kyselina fuchsinsulfoniová) (Barka & Ornstein, 1960). Při instrumentální analýze využívající HPLC separaci se využívá tvorba hydrazonů, nejčastěji reakcí s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH) (Obr. 8). Dalším činidlem použitelným k derivatizaci vzorků karbonylových sloučenin pro HPLC separaci je 4-(*N*,*N*-

dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazol, který umožňuje následnou fluorescenční detekci (Nakashima et al., 1994).

Základy detekce karbonylových sloučenin s využitím DNPH byly položeny v období mezi oběma světovými válkami (Allen, 1930). Samotná derivatizace aldehydů DNPH probíhá v kyselém prostředí. Allen použil koncentrovanou HCl, jenž je zahrnuta i v mnoha současných protokolech derivatizace (např. Cordis et al., 1993, Deng et al., 1998, Stafiej et al., 2006), nicméně se pro tuto reakci se využívají i jiné kyseliny, například H_2SO_4 či $HClO_4$ (Lo Coco et al., 1995, Nascimento et al., 1997). Vytvoří se tak žluté, oranžové či červené krystalky příslušného hydrazonu, které jsou dobře rozpustné v acetonitrilu, v omezenější míře pak v ethanolu či methanolu. V počátečním období pochopitelně sloužil jako důkaz přítomnosti aldehydů či ketonů ve vzorku samotný vznik krystalů (Allen, 1930).



Obr. 8: Schéma derivatizace karbonylových sloučenin pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu v kyselém prostředí. Vzniklý *E*-izomer je v krystalech a v neutrálním prostředí stabilní, ale v kyselém prostředí dochází k částečné izomeraci. Proto některé protokoly zahrnují i následnou redukci katalyzovanou např. pikolanem.

Byla publikována řada protokolů HPLC analýzy využívající derivatizaci pomocí DNPH k detekci a stanovení aldehydů ve velmi rozličných vzorcích mezi jiným i v ovzduší, vodě, potravinách, nápojích, krvi či moči (Lo Coco et al., 1995, Lo Coco et al., 1996, Kim et al., 1999, Pilz et al., 2000, Fjällström et al., 2002, Zwiener et al., 2002). V těchto postupech se obvykle využívá k separaci chromatografie na obrácené fázi. Nejčastěji využívanou mobilní fází je v tomto případ soustava voda – acetonitril (Lo Coco et al., 1995, Koivusalmi et al., 1999, Fjällström et al., 2002). Často se využívá i soustava voda – methanol (Esterbauer et al., 1982, Kim et al., 1999, Stafiej et al., 2006). Existují však i publikace využívající tyto mobilní fáze s pH upraveným kyselinou octovou, fosforečnanovým pufrem či aminoacetátem (Cordis et al., 1993,

Deng et al., 1998, Zwiener et al., 2002). V této práci bylo využito soustavy voda – methanol, která byla již dříve publikována pro vzorky podobného charakteru – lihoviny vyráběné z cukrové třtiny (Nascimento et al., 1997).

Nedílnou součástí HPLC analýzy je pochopitelně i detekce eluátu. V tomto případě lze velmi dobře využít spektrofotometrický detektor pro absorpci světla o vlnové délce 350-400 nm. V této oblasti se nachází absorpční maximum jednotlivých derivátů (Lo Coco et al., 1995, Kim et al., 1999, Koivuslami et al., 1999, Uchiyama et al., 2011). Popsána byla i MS či MS-MS detekce se záchytem molekulového iontu. Ionizace vzorku při výstupu z kolony se v případě těchto derivátů obvykle provádí v negativním módu (Kölliker et al., 1998, Zwiener et al., 2002, Chi et al., 2007). Z iontu $[M-H]^-$ lze po odštěpení NO získat ion $[M-H\ -30]^-$ a z něj pak odštěpením nitrilu příslušného aldehydu vzniká ion o m/z = 152. Druhým možným způsobem štěpení je vznik iontu o m/z = 163, který vzniká odštěpením nitroalkanu s řetězcem o jeden uhlík kratší než řetězec derivatizovaného aldehydu. Tento ion vykazuje vysokou intenzitu v případě alifatických, α-nenasycených i aromatických aldehydů, ale u ketonů nebyl pozorován (Kölliker et al., 1998).

Hydrazony DNPH a aldehydů vytváří ve vazbě C=N diastereomery *E*, které jsou v krystalech či v neutrálním prostředí stabilní. V kyselém prostředí či za působení UV záření dochází k tvorbě izomeru *Z* (Uchiyama et al., 2003). V případě C_2AL, kde vzniká *Z* izomer v nejvyšší koncentraci, dochází k přeměně přibližně čtvrtiny veškerého hydrazonu. U ostatních lineárních aldehydů pak dojde k izomerizaci maximálně 14 % příslušného hydrazonu, přičemž α-nenasycené aldehydy vykazují izomerizaci o řád nižší než odpovídající nasycené aldehydy. Tyto izomery se ve svých vlastnostech mírně liší. Z hlediska analýzy je nejvýznamnější rozdíl v absorbčním maximu, které mají *Z*-izomery o 2-10 nm nižší, a v mírném rozdílu v retenci na koloně, kde *Z*-izomer je eluován dříve, a tak má chromatografický záznam podobu zdvojeného píku. V mnoha analýzách to není na závadu, ale při vysokém obsahu různých aldehydů a zejména při delší prodlevě mezi derivatizací a nástřikem to může znamenat komplikaci. Té se lze vyhnout reduktivní aminací dvojné vazby C=N za vniku vazby jednoduché. Použité činidlo musí být striktně selektivní a redukovat pouze dvojnou vazbu C=N v hydrazinové části molekuly (Uchiyama et al., 2011). K této selektivní redukci se využívá řada činidel, patrně nejvhodnějším je 2-pikolinboran (Uchiyama et al., 2009).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST PRÁCE

3 Materiál a metody

3.1 Syntéza aldehydů

Alifatické aldehydy včetně izomerů pentanalu, benzaldehyd a jeho bromderiváty, pyridinkarbaldehydy včetně halogenderivátů, furfural, 5-methylfurfural, 5-hydroxymethylfurfural a diethylacetaly APALu, ABALu a 2-aminoacetaldehydu (AAAL) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Německo). 3-Pyridinylpropanaly byly připraveny Swernovou oxidací příslušných alkoholů (Omura & Swern, 1978). *N*-pyridinylmethyl deriváty aminoaldehydů byly připraveny ve formě příslušných diethlacetalů redukční alkylací diethylacetalů příslušných aminoaldehydů s využitím pyridinkarbaldehydů. *N*-purin-6-yl, *N*-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4yl a *N*-pyrimidin-2-yl deriváty ω-aminoaldehydů byly připraveny ve formě diethylacetalů nukleofilní substitucí diethylacetalu APALu, ABALu či AAALu příslušným aryl chloridem. Pro přípravu diethylacetalů *N*-acylderivátů APALu a ABALu bylo použito *N*-acylace diethylacetalu APALu či ABALu příslušným acylchloridem za heterogenní katalýzy KF-celitem (Ando & Yamawaki, 1979). Diethylacetaly byly převedeny na příslušné aldehydy těsně před měřením kyselou hydrolýzou v prostředí kyseliny chlorovodíkové.

Swernova oxidace probíhala v bezvodém prostředí při teplotě -65 °C. K 11 mmol oxalylchloridu rozpuštěnému ve 25 ml dichlormethanu bylo za stálého míchání postupně přidáno 22 mmol dimethylsulfoxidu rozpuštěného v 5 ml dichlormethanu. Po čtvrt hodině byl ke směsi postupně přidán roztok 10 mmol příslušného alkoholu v 10 ml dichlormethanu a po dalším čtvrt hodině státní bylo přidáno 50 mmol triethylaminu. Po proběhnutí reakce a zahřátí na laboratorní teplotu byla reakční směs extrahována vodou (30 ml) a vodná fáze zpětně extrahována 20 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze byly vysušeny síranem sodným, po jehož odstranění filtrací byl dichlormethan odpařen na rotační vakuové odparce (Omura & Swern, 1978).

Při syntéze diethylacetalů ω-(pyridinylmethylamino)aldehydů bylo 25 mmol diethylacetalu aminoaldehydu a 26,3 mmol pyridinkarbaldehydu rozsuspendováno ve 25 ml ethanolu a po dobu 3 h zahříváno pod zpětným chladičem. Po ochlazení směsi na laboratorní teplotu bylo postupně přidáno 1,6 g KBH_4 a směs byla míchána 16 h. Poté bylo přidáno 30 ml destilované vody. Produkt byl z reakční směsi vyextrahován dichlormethanem (3 extrakce po 50 ml), organické fáze byly spojeny, vysušeny přidáním 1 g Na_2SO_4 a žlutý kapalný produkt byl vyizolován odpařením rozpouštědla na rotační vakuové odparce.

Pro přípravu diethylacetalů purin-6-yl, 7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4yl a pyrimidin-2-yl derivátů ω-aminoaldehydů bylo v 5 ml ethanolu (popř. 3 ml *n*-butanolu) rozpuštěno 1,5 mmol 6-chlor-9H-purinu, 4-chloro7H-pyrrolo[2.3-d]pyrimidinu resp. 2-chlorpyrimidinu. Po přidání 3 mmol diethylacetalu příslušného ω-aminoaldehydu byla reakční směs refluxována (1-4 hod při použití butanolu a až 6 dní při použití ethanolu) a následně odpařena do sucha. Purin-6-yl deriváty byly přečištěny vysrážením ve vychlazené destilované vodě s filtrací a vysušením sraženiny. Ostatní deriváty byly přečištěny sloupcovou chromatografií (DAVISIL LC60A, 40-60 µm) s mobilní fází toluen:acetonitril:methanol 5:2:1.

Pro přípravu katalyzátoru použitého při syntéze *N*-acyl-ω-aminoaldehydů bylo smíseno 40 g celitu 545 s 1 l roztoku fluoridu draselného o koncentraci 40 $g \cdot l^{-1}$. Po 15 min míchání byla ze suspenze odstraněna voda odpařováním na rotační vakuové odparce při teplotě 55 °C. Získaný KF-celit byl rozsuspendován ve 100 ml acetonitrilu, zfiltrován, promyt acetonitrilem a vysušen v exsikátoru při laboratorní teplotě. Při samotné *N*-alkylaci bylo 5 g katalyzátoru rozsuspendováno v 50 ml acetonitrilu. Do směsi bylo přidáno 6 mmol diethylacetalu APALu či ABALu a posléze bylo po kapkách v průběhu přibližně 20 min přidáno ke směsi za stálého míchání 6 mmol příslušného acylchloridu. Reakční směs byla ponechána 30 min při laboratorní teplotě, zfiltrována a z filtrátu odstraněno rozpouštědlo odpařením na rotační vakuové odparce (Ando & Yamawaki, 1979).

Z diethylacetalu byl příslušný aldehyd hydrolyzován kyselinou chlorovodíkovou těšně před samotným měřením. Při měření s heterocyklickými alidehydy byl roztok příslušného acetalu o koncentraci 0,1 $mol \cdot l^{-1}$ v HCl (0,4 $mol \cdot l^{-1}$) inkubován přibližně 15 min při teplotě 100 °C. Naproti tomu při měření s *N*-acylovanými ω-aminoaldehydy bylo přibližně 25 µl diethylacetalu rozpuštěno v takovém množství HCl o koncetraci 3,0 $mol \cdot l^{-1}$, aby jeho výsledná koncentrace byla 700 $mmol \cdot l^{-1}$. Vzorek byl 15 min ínkubován při teplotě 100 °C a po ochlazení zředěn na zásobní koncentraci 40 $mmol \cdot l^{-1}$. Vzorky aldehydů byly po dobu měření uchovávány v ledové lázni.

3.2 Produkce rekombinantního enzymu a měření aktivity

Celková mRNA byla izolována z šestidenních klíčků hrachu setého (*Pisum sativum*) a z listů a apikálního meristému sedmidenních semenáčků rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* syn. *Lycopersicon esculentum*) pomocí soupravy Midi spin columns kit (Macherey-Nagel, Düren, SRN). Otevřený čtecí rámec (ORF) PsAMADH1 byl vložen do vektoru pET28b umožňujícího vnesení histidinové kotvy do následně produkovaného proteinu, zatímco ostatní čtecí rámce byly klonovány do vektorupCDFDuet s obdobnou možností (Tab. 3). Vytvořený konstrukt byl vložen do bakteriálních buněk *Escherichia coli* metodou tepelného šoku.

Tab. 3: Primery a restrikční enzymy použité při klonování jednotlivých enzymů.

Enzym	Kód v Gen Bank (Velikost ORF)	Použité primery	Restrikční enzym
PsAMADH1	AJ315852 (1510 bp)	5‘-GCTG**CATATG**GCAATCACAGTATCAAGT-3‘	*Nde*I
		5‘-CGT**CTCGAG**TATCACAGCTTTGAAGGTGG-3‘	*Xho*I
PsAMADH2	AJ315853 (1512 bp)	5′-CA**GGATCC**AGATATTCCGATCCCAACTCGT-3′	*BamH*I
		5′-CG**CTCGAG**TTACAGTTTTGCAGGAGGCT-3′	*Xho*I
SlAMADH1	AY796114 (1515 bp)	5’-CA**GGGATCC**GGCAAATCGTAATGTACCA-3’	*BamH*I
		5’-CGT**CTCGAG**CTAATTCTTTGAAGGTGACTTAT-3’	*Xho*I
SlAMADH2	FJ228482 (1518 bp)	5’-CAT**GAATTC**GGCGATTCCTAATATACGGAT-3’	*EcoR*I
		5’-AGT**GGTACC**TTACAGCTTTGAAGGAGACT-3’	*Kpn*I

Bakteriální buňky *Escherichia coli* obsahující vektor s příslušným ORF byly prekultivovány ve 20 ml Luria-Bertaniho (LB) media o koncentraci 25 $g \cdot l^{-1}$obsahujícího 1% glukosu a příslušné antibiotikum. Při použití vektoru pET28b bylo jako antibiotika použito kanamycinu o koncentraci 30 $\mu g \cdot ml^{-1}$, zatímco při použití vektoru pCDFDuet bylo přidáno antibiotikum ve výsledné koncentraci 50 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Sterilní Erlenmayerova baňka se sterilním médiem byla po inokulaci příslušnými bakteriemi umístěna do inkubační třepačky, kde byla za mírného třepání inkubována při teplotě 37 °C přes noc.

Bakteriální buňky byly z prekultury odstraněny centrifugací při 4000 g po dobu 5 min a rozsuspendovány ve 300 ml sterilního LB média s příslušným antibiotikem. Kultura byla inkubována za mírného třepání při 30 °C do dosažení OD600 (“optical density“) přibližně 0,6. Poté došlo k indukci exprese přídavkem isopropyl β-D-1-thiogalatopyranosidu (IPTG) o výsledné koncentraci 0,1 $mmol \cdot l^{-1}$. Samotná exprese proteinu probíhala přes noc při 20 °C za mírného třepání. Po ukončení exprese byly bakteriální buňky odstraněny z média centrifugací při 4000 g po dobu 15 min a ze získaného sedimentu byl dále extrahován rekombinantní enzym.

K bakteriálnímu sedimentu bylo přidáno 1,25 ml Tris-HCl pufru (400 $mmol \cdot l^{-1}$, pH 8,0), 0,25 ml $MgCl_2$ o koncentrace 400 $mmol \cdot l^{-1}$, 0,1 ml inhibitoru proteas a 1,0 ml vody. Po rozsuspendování bylo přidáno extrakční činidlo B-PER a po deseti minutách 100 µl lysozymu (10 $mg \cdot ml^{-1}$). Po zgelovatění směsi (přibližně 1 h za laboratorní teploty) bylo ke vzniklému lyzátu přidáno 10 µl DNAsy (10 $U \cdot \mu l^{-1}$), 20 µl RNAsy (10 $\mu g \cdot ml^{-1}$) a 5 ml vody. Po inkubaci při 37 °C po dobu 30 min bylo ke směsi přidáno 1,25 ml NaCl (1 $mol \cdot l^{-1}$) a 1,37 ml 50% glycerolu.

Pevné zbytky bakteriálních buněk včetně inkluzních tělísek byly odstraněny cetrifugací po dobu minimáně 30 min při 10 °C a 12000 *g*. Enzym byl ze supernatantu purifikován nízkotlakou chelatační chromatografií na koloně, kde stacionární fázi tvořila IDA-Co(II)-Sepharosa. Mobilní fázi pak tvořil Tris-HCl pufr (20 mmol·l^{-1}, pH 8,0) obsahující NaCl (100 mmol·l^{-1}) a 5% glycerol. Pro ekvilibraci kolony před nanesením vzorku a promytí kolony po nanesení vzorku bylo použito zmíněného pufru s obsahem imidazolu o koncetraci 10 mmol·l^{-1}, zatímco při eluci byla koncentrace imidazolu skokově zvýšena na 250 mmol·l^{-1}. Eluovaná frakce obsahující izolovanou AMADH byla přes noc dialyzována proti Tris-HCl pufru (20 mmol·l^{-1}, pH 8,0), který obsahoval 5% glycerol.

Měření aktivity AMADH založené na Warburgově optickém testu spočívá v detekci redukovaného koenzymu NADH vznikajícího při reakci měřením absorbance světla o vlnové délce 340 nm (ε = 6220 mol^{-1} l cm^{-1}) (Warburg & Christian, 1943). Pro měření byl použit UV/Vis spektrofotometr Beckman DU7500 (Beckmann Coulter Inc., Brea, CA, USA) v případě heterocyklických aldehydů a UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) v případě *N*-acyl-ω-aminoaldehydů a měření souvisejícího s detekcí aldehydů v lihovinách. Reakční směs v kyvetě o celkovém objemu 2 ml obsahovala pufr Tris-HCl (115 mmol·l^{-1}, pH 9,0), koenzym NAD^+ (0,5 mmol·l^{-1}), 5 až 20 µl roztoku příslušné AMADH a roztok substrátu, jehož přidáním byla reakce po vynulování přístroje startována. Pro určení substrátové specifičnosti byla použita koncentrace substrátu 1,0 mmol·l^{-1}, zatímco pro určení základních kinetických parametrů enzymové reakce bylo použito rozmezí minimálné deseti koncentrací určené dle kinetických parametrů reakce (obvykle mezi 20 a 2000 mmol·l^{-1}). Kinetické parametry enzymových reakcí byly vyhodnoceny pomocí softwaru GraphPad Prism 5.0 s využitím rovnice $v = V \cdot [S] / (K_m + [S])$ pro reakce bez inhibice nadbytkem substrátu a rovnice $v = V \cdot [S] / (K_m + [S] \cdot (1 + [S] / K_{ss}))$ pro reakce, u nichž se projevila inhibice nadbytkem substrátu. V případě měření se vzorky slivovice byla reakce startována přidáním 50 µl nezakoncentrované lihoviny, popř. 20 µl lihoviny, která byla nejprve zakoncentrována odpařením na rotačním vakuovém koncentrátoru na padesátinu původního objemu.

3.3 Molekulové modelování – dokování substrátů do aktivního místa enzymu

Vybrané substráty byly dokovány do aktivního místa PsAMADH2 (přístupový kód v PDB databázi 3IWJ). Stuktury ligandů byly vytvořeny pomocí PRODRG serveru (Schüttelkopf & van Aalten, 2004, http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg). Pro optimalizaci geometrie struktur ligandů byla použita Hartree-Fockova metoda implementovaná v programu Gaussian 03 (Frish et al., 2004). Výpočet nábojů a příprava vstupních souborů pro dokování proběhla

v programu Antechamber ze sady AMBER (Case et al., 2005, Pearleman et al., 1995). K přípravě průběhu a analýze simulací bylo použito grafického rozhraní softwaru Triton (Prokop et al., 2008). Samotné dokování proběhlo s využitím porgramu Autodock 3.0 (Morris et al., 1998) za použití semiflexibilního protokolu s rigidní molekulou PsAMADH2 flexibilními ligandy. Gridovací box o rozměrech 45 x 45 x 45 Å byl centrován do substrátového kanálu. K výpočtům bylo použito Lamarckianova genetického algoritmu. Pro každý ligand bylo určeno 200 konformací. Nejpravděpodobnější pozice aldehydů v aktivním místě PsAMADH2 byly zobrazeny pomocí softwaru PyMOL, verze 1.3 (Schrödinger LLC, USA, http://www.pymol.org).

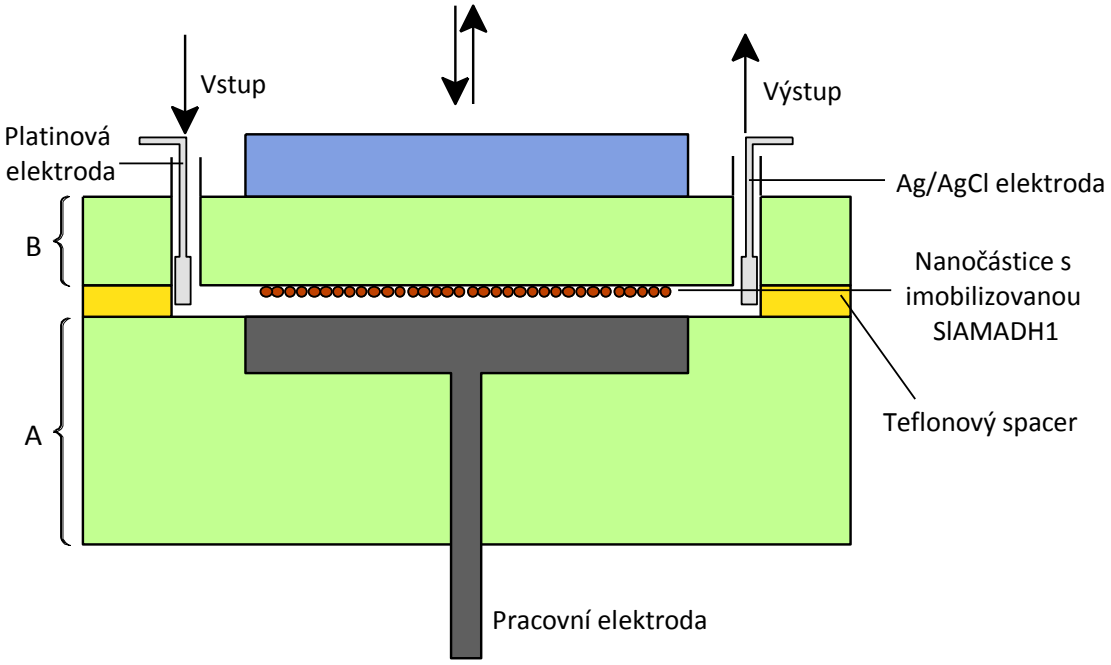
3.4 Imobilizace SlAMADH1 a tvorba biosenzoru

Superparamagnetické nanočástice z maghemitu (γ-Fe_2O_3) o velikosti 20 až 40 nm, které byly připraveny borohydridovou redukcí chloridu železitého (Magro et al., 2012), je možné povrchově modifikovat prostou inkubací suspenze nanočástic v příslušném vodném roztoku. V našem případě byly nanočástice (výsledná koncentrace 0,5 mg·ml^{-1}) rozsuspendovány v Tris-HCl (100 mmol·l^{-1}, pH 8,0) s obsahem KCl o koncentraci 100 mmol·l^{-1}. K suspenzi byla přidána SlAMADH1 (výsledná koncentrace 13,6 µmol·l^{-1}) a směs byla za mírného třepání inkubována přes noc při teplotě 4 °C. Nanočástice byly po inkubaci separovány z roztoku pomocí silného externího magnetu a promyty pufrem používaným pro imobilizaci SlAMADH1.

Měření aktivity imobilizované SlAMADH1 probíhalo podobně jako v případě volného enzymu. Základní rozdíl byl v použití suspenza nanočástic, kterou bylo nutno před odečtením absorbance odseparovat pomocí magnetu na dno kyvety. V důsledku toho došlo k proudloužení intervalu mezi jednotlivými měřeními absorbance na minimálně 1 min. Při měření kinetických parametrů byl pro všechny koncentrace substrátu použit stejný díl nanočástic. Ty byly mezi jednotlivými měřeními pomocí silného magnetu sedimentovány na dně kyvety a po odstranění staré reakční směsi promyty pufrem používaným při měření.

Elektroda z uhlíkové pasty (70 % grafitový prášek a 30 % silikonový tuk, popř. 55 % grafitový, 30 % silikon a 15 % nanočástice z Fe_2O_3) byla připravena vtlačením pasty do sklenéné kapiláry o vnitřním průměry 1,35 mm. Z opačné strany byl do kapiláry vložen měděný drát tvořící vodivé spojení s potenciostatem. Samotná elektrochemická cela sestává ze dvou skleněných částí, mezi nimiž je vytvořen pomocí teflonových spacerů kanálek o šířce 0,1 mm definující objem cely na 1 µl. Jedna část (A) obsahuje pracovní elektrodu a druhá část (B) vstupní i výstupní kanálek a lze k ní připojit magnet imobilizující nanočástice modifikované SlAMADH1, které jsou umístěny uvnitř cely. Ve vstupním, popř. výstupním kanálku byla umístěna platinová, resp. Ag/AgCl elektroda využitá jako měrná, resp. referenční elektroda (Obr. 9). K měření obsahu aldehydů ve vzorku bylo využito lineární voltametrie. Po přídavku

APALu (kalibrace) či vzorku zředěného na pětinu původní koncentrace a proběhnutí reakce byly nanočástice fixovány magnetem na stěnu cely. Pro dekci vzniklého NADH byl mezi pracovní a Ag/AgCl elektrodou byl aplikován postupný nárust potenciálu z 0 na +1,2 V při rychlosti 2 $mV \cdot s^{-1}$.



Obr. 9: Schéma biosenzoru použitého k detekci aldehydů v lihovinách.

3.5 Analýza obsahu aldehydů použitím HPLC

Pro potřeby HPLC byly standardy aldehydů derivatizovány pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH). Standard aldehydu (2 mmol) byl rozpuštěn ve 20 ml absolutního ethanolu. 0,8 g DNPH (přibližně 4 mmol) bylo rozpuštěno v 6 ml destilované vody a 4 ml koncentrované kyseliny sírové a takto připravené derivatizační činidlo bylo přidáno k roztoku aldehydu. Reakční směs byla za stálého míchání ponechána 1 hodinu při laboratorní teplotě a vzniklé krystalky byly z roztoku odstraněny odsátím na Büchnerově nálevce, promyty ethanolem a rozpuštěny v acetonitrilu na koncentraci 1,0 $g \cdot l^{-1}$. K dalšímu ředění standartů byl použit 45% roztok ethanolu ve vodě. Čistota byla ověřene tenkovrstevnou chromatografií na silufolových destičkách s využitím dichlormethanu jakožto mobilní fáze (Nascimento et al., 1997).

Vzorky lihovin pro HPLC analýzu byly derivatizovány těsně před nástřikem na kolonu. K 1 ml derivatizačního činidla (4% DNPH v acetonitrilu) bylo přidáno 250 µl vzorku a 12,5 µl 1,0-M $HClO_4$. Směs byla ponechána za mírného třepání 1 hodinu při laboratorní teplotě a poté zfiltrována přes mikrospinový filtru (Nascimento et al., 1997).

Pro analýzu bylo na kolonu Kinetex 2,6 u C18 100A (150 x 4,6 mm) naneseno 10 µl vzorku bez prekoncentrace. Jako mobilní fáze byly použity voda (A) a methanol (B), průtoková rychlost byla 0,5 $ml \cdot min^{-1}$ a teplota 40 °C. Pro nanášení vzorku a počátek eluce byl použit obsah methanolu ve směsi 65% (v/v) následovaný sekvencí lineárních gradientů a izokratické eluce (Tab. 4). Měření probíhalo na chromatografickém systému Knauer Smartline HPLC (Wisseschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer, GmBH, Berlín, SRN) sestávajícího z dávkovacího zařízení SmartlineAutosampler 3950, řídící jednotky Smartline Manager 5050, pumpy Smartline Pump 1000 a detektoru Smartline UV/VIS Detector 2550.

Tab. 4: Podmínky, za kterých byla prováděna HPLC separace aldehydů po derivatizaci DNPH.

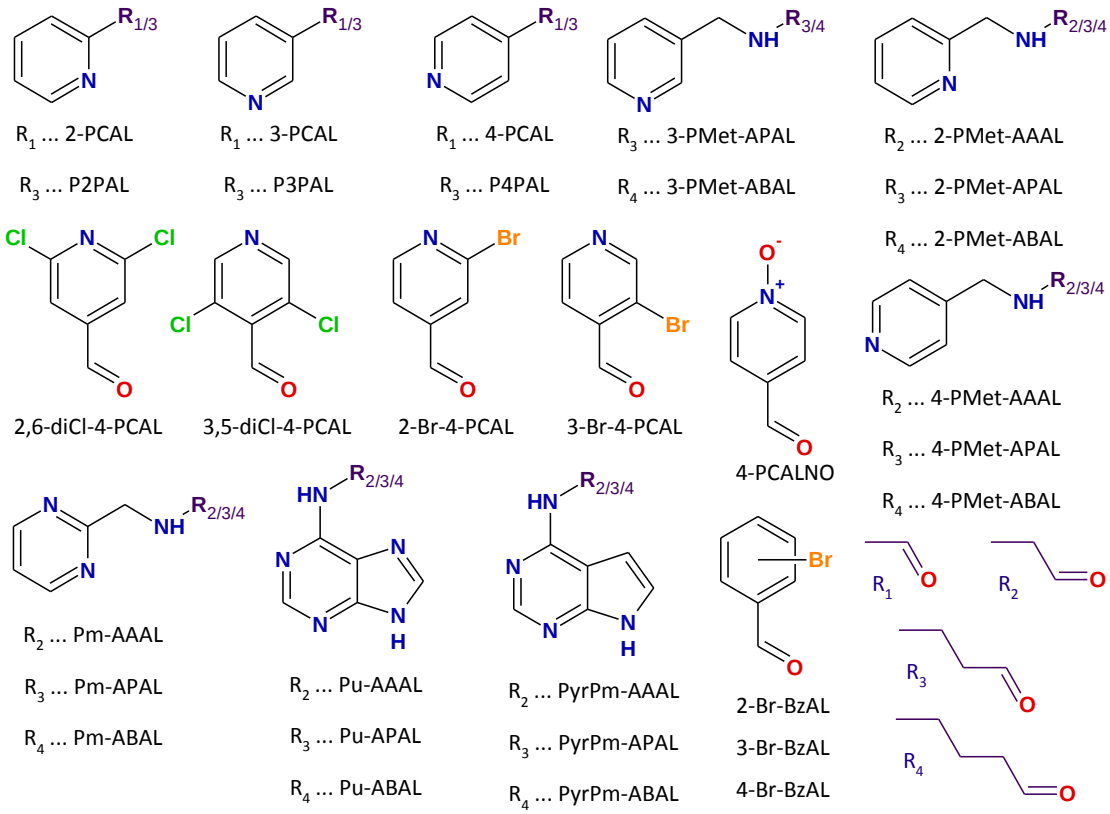
Parametr	**Průběh analýzy**											
Čas (min)	**0**	**5**	**12**	**13**	**19**	**20**	**20,5**	**22**	**29**	**32**	**34**	**40**
Mobilní fáze (% B)	65	70	70	75	65	65	90	95	100	100	65	65
Průtok ($ml \cdot min^{-1}$)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Teplota (°C)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40

4 Výsledky a diskuse

4.1 Substrátová specifičnost a kinetická měření

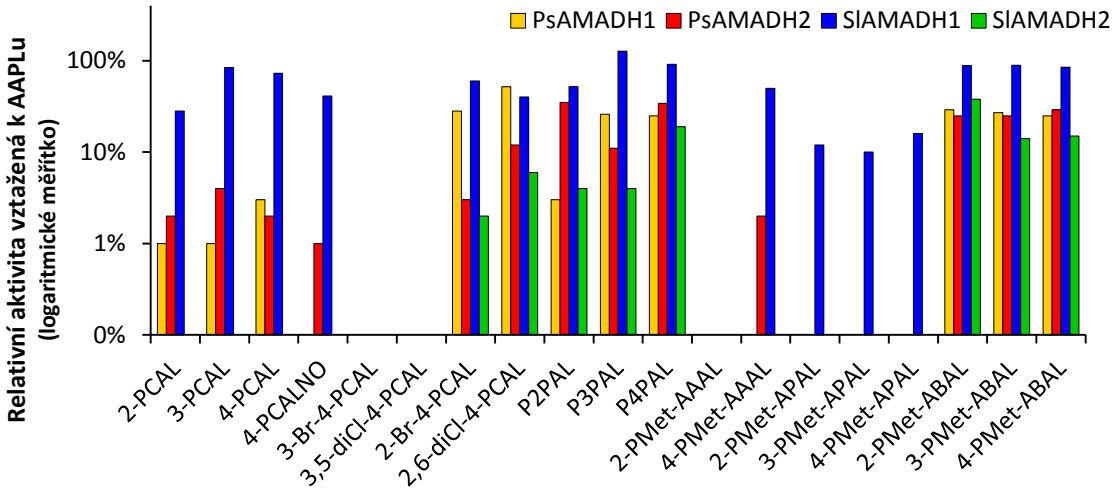
4.1.1 Heterocyklické a aromatické aldehydy

V rámci výzkumu substrátové specifičnosti hrachových a rajčatových AMADH byla testována řada heterocyklických aldehydů odvozených zejména od pyridinu, pyrimidinu, purinu a 7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidinu (deazapurin) a bromderiváty BzALu (Obr. 10). Nejširší substrátová specifičnost ze studovaných enzymů byla pozorována u SlAMADH1. Oba hrachové izoenzymy se v substrátové specifičnosti příliš nelišily a překonaly SlAMADH2. Zjištěná široká substrátová specifičnost SlAMADH1 je v plném souladu s výsledky studie role klíčových residuí v substrátovém kanálku rostlinných AMADH (Kopečný et al., 2013). Mnoho testovaných aldehydů bylo shledáno dobrými substráty jednotlivých AMADH, ale jiné byly oxidovány jen velmi pomalu, popř. nebyly oxidovány vůbec (Obr. 11). Kinetické parametry pak byly měřeny pouze s těmi aldehydy, které byly shledány dobrými substráty při koncentraci 1,0 mmol·l^{-1}.



Obr. 10: Vzorce heterocyklických a aromatických aldehydů, které byly testovány jako substráty rostlinných AMADH.

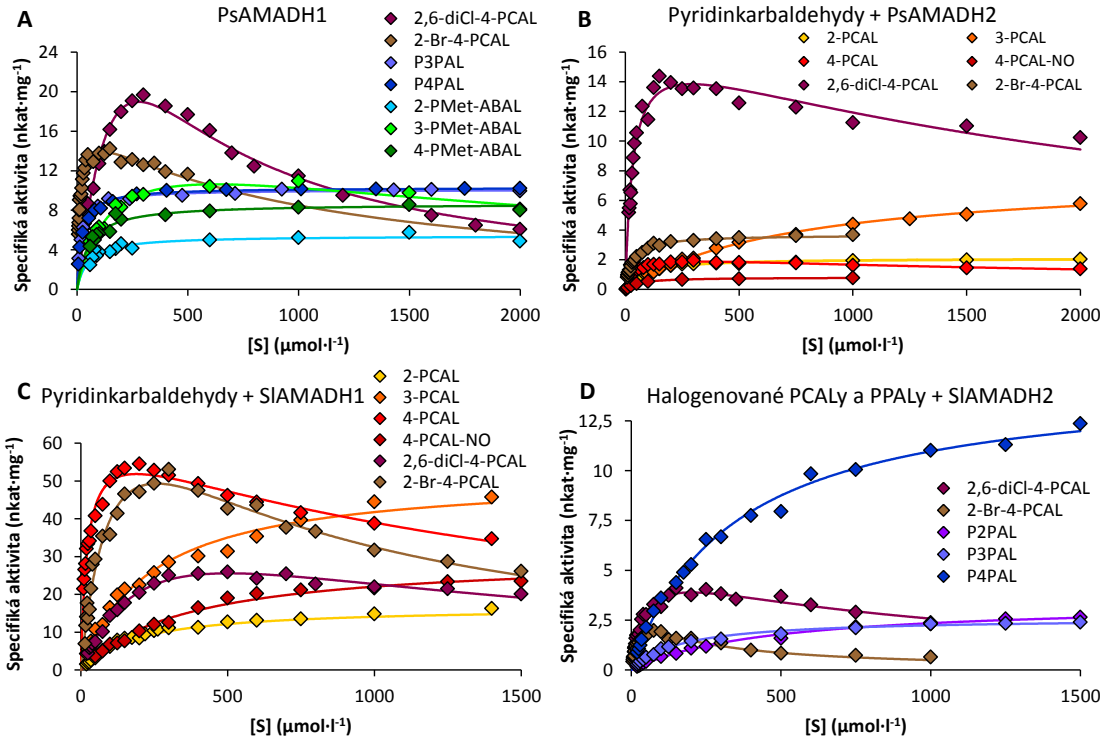
Pyridinylkarbaldehydy jsou dobrými substráty jen v případě oxidace SlAMADH1. Oba hrachové isozymy je oxidují jen velmi pomalu s relativní reakční rychlostí vztaženou k APALu nižší než 5 %. Rychlost oxidace katalyzovaná SlAMADH2 byla pod mezí detekce. Krom samotných karbaldehydů byly testovány i deriváty 4-PCALu. *N*-oxid pyridin-4-ylkarbaldehydu (4-PCALNO) je oxidován rychlostí přibližně odpovídající oxidací samotných PCALů. Dichlor- a bromderiváty 4-PCALu se ve svých substrátových vlastnostech výrazně odlišují od nesubstituovaného aldehydu. Substrátové vlastnosti halogenderivátů jsou mnohem více ovlivněny pozicí substituce než konkrétním halovým prvkem, jež je substituentem pyridinového kruhu. Zatímco oxidace 3,5-diCl-4-PCAL a 3-Br-4-PCAL, kde se nachází substituce v přímém sousedství karbaldehydu, nebyla prokázána, 2-Br-4-PCAL a 2,6-diCl-4-PCAL, které obsahují substituci ve vzdálenější poloze, jsou dobrými substráty všech čtyř AMADH. S výjimkou SlAMADH1 se dokonce jedná o lepší substráty než 4-PCAL (Obr. 11).



Obr. 11: Substrátová specifičnost rostlinných AMADH vzhledem aldehydům obsahujícím pyridinový heterocyklus. Měření probíhalo pro [S] = 1,0 mmol·l^{-1} při saturační koncentraci koenzymu NAD$^+$ 0,5 mmol·l^{-1}. Specifická aktivita pro oxidaci přirozeného substrátu (APAL) byla 39, 102, 53 a 58 nkat·mg^{-1} pro PsAMADH1, PsAMADH2, SlAMADH1 a SlAMADH2.

Kinetické parametry pro všech šest pyridinkarbaldehydů (včetně derivátů) byly stanoveny jen v případě PsAMADH2 a SlAMADH1 (Obr. 12, Tab. 5, Tab. 7). Hodnoty K_m se v případě PsAMADH2 pohybovaly obvykle pod 100 µmol·l^{-1} a byly nižší než u SlAMADH1, kde byly obvyklé hodnoty K_m mezi 50 a 400 µmol·l^{-1}. Výjimku tvoří 3-PCAL, ke kterému PsAMADH2 vykazuje nízkou afinitu (K_m = 754 µmol·l^{-1}), a 4-PCAL s vysokou afinitou SlAMADH1 k tomuto substrátu (K_m = 19,2 µmol·l^{-1}), díky čemuž se poměr V/K_m vyšplhal na 37,2 % hodnoty pro APAL. Pro oba halogenderiváty 4-PCALu byla stanovena hodnota K_m a V i při jejich oxidaci pomoc

PsAMADH1 a SlAMADH2. Nejnižší hodnota K_m z této skupiny (K_m = 12,9 µmol·l^{-1}) byla pozorována v případě oxidace 2-Br-4-PCAlu pomocí PsAMADH1. Z hlediska poměru V/K_m se v relativním srovnání s APALem (0,819) dokonce jednalo o nejlepší substrát ze všech testovaných heterocyklických aldehydů. Naproti tomu afinita PsAMADH1 k 2,6-diCl-4-PCAlu byla velmi nízká s hodnotou K_m přibližně třicetkrát vyšší než pro oxidaci 2-Br-4-PCALu. Hodnoty K_m dosažené při oxidaci obou halogenderivátů za katalýzy PsAMADH2 byly velmi podobné, ovšem díky výrazně vyšší limitní rychlosti je 2,6-diCl-4-PCAL považován za výrazně lepší substrát než 2-Br-4-PCAL. Naproti tomu v případě SlAMADH1 je díky přibližně dvojnásobné afinitě k enzymu a dvojnásobné limitní rychlosti 2-Br-4-PCAL hodnocen jako lepší substrát než 2,6-diCl-4-PCAL (relativní hodnoty V/K_m 0,027 pro 2,6-diCl-4-PCAL a 0,113 pro 2-Br-4-PCAL). SlAMADH2 dosahuje hodnot K_m a V přibližně jedenapůlkrát vyyšších pro 2,6-diCl-4-PCAL než pro 2-Br-4-PCAL.



Obr. 12: Saturační křivky oxidace vybraných aldehydů – derivátů pyridinu měřené při koncentraci koenzymu NAD^+ 0,5 mmol·l^{-1}. A: Oxidace halogenderivátů 4-PCALu, 3-pyridinylpropanalů a 4-pyridinylmethylaminoaldehydů za katalýzy PsAMADH1. B: Oxidace pyridinkarbaldehydů včetně derivátů katalyzovaná PsAMADH2. C: Oxidace pyridinkarbaldehydů včetně derivátů katalyzovaná SlAMADH1. D: Oxidace halogenderivátů 4-PCALu a 3-pyridinylpropanalů za katalýzy SlAMADH2.

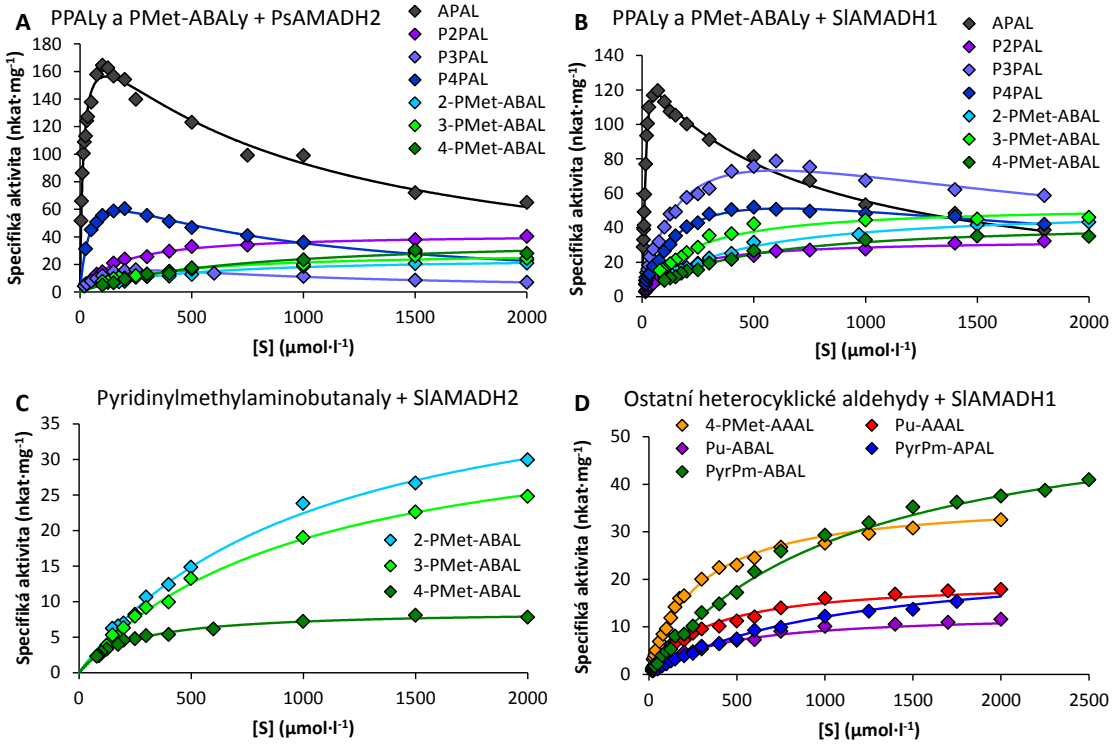
Zatímco 2-PCAL, 3-PCAL a 4-PCAL-NO nezpůsobovaly ve vyšších koncentracích inhibici žádného enzymu, v případě 4-PCAL byla pozorována inhibice PsAMADH2 i SlAMADH1

nadbytkem substrátu. Rovněž oba halogenderiváty 4-PCALu způsobovaly inhibici všech studovaných enzymů nabytkem substrátu (Obr. 12). Jedinou výjimkou byla oxidace 2,6-diCl-4-PCALu katalyzovaná PsAMADH2, kde byl pozorován klasický průběh dle Michaelise a Mentenové. V ostatních případech se často jednalo o masivní inhibici. V případě dvojice 2,6-diCl-4-PCAL a PsAMADH1 je dokonce inhibiční konstanta K_{ss} (204 µmol·l^{-1}) nižší než Michaelisova konstanta K_m (379 µmol·l^{-1}) (Obr. 12, Obr. 13, Tab. 6).

Tab. 5: Kinetické parametry oxidace halogenderivátů 4-PCALu, 3-pyridinylpropanalů a 4-pyridinylmethylaminobutanalů. Měřeno při koncetraci koenzymu NAD^+ 0,5 mmol·l^{-1}. N D – pro pomalou oxidaci při [S] = 1,0 mmol·l^{-1} nebyly kinetické parametry měřeny.

Aldehyd	**PsAMADH1**			**PsAMADH2**		
	***K*$_m$ (µmol·l^{-1})**	***V* (nkat·mg^{-1})**	***V*/*K*$_m$**	***K*$_m$ (µmol·l^{-1})**	***V* (nkat·mg^{-1})**	***V*/*K*$_m$**
APAL	45,5 ± 6,25	72,8 ± 3,19	1	12,4 ± 1,2	179 ± 5,1	1
2,6-diCl-4-PCAL	379 ± 90,0	70,7 ± 13,11	0,117	28,2 ± 0,53	14,8 ± 0,47	0,036
2-Br-4-PCAL	12,9 ± 0,85	16,9 ± 0,44	0,819	31,8 ± 1,72	3,58 ± 1,717	0,008
P2PAL	N D	N D	N D	171 ± 10,9	42,3 ± 0,86	0,017
P3PAL	19,3 ± 0,98	10,1 ± 0,09	0,327	87,3 ± 7,97	21,9 ± 0,82	0,017
P4PAL	21,4 ± 1,10	10,3 ± 0,10	0,301	29,2 ± 2,07	69,6 ± 1,34	0,165
2-PMet-ABAL	49,5 ± 8,60	5,43 ± 0,209	0,069	401 ± 38,9	25,3 ± 1,01	0,004
3-PMet-ABAL	155 ± 25,9	15,9 ± 1,37	0,064	289 ± 16,4	26,9 ± 0,64	0,006
4-PMet-ABAL	51,6 ± 6,10	8,67 ± 0,227	0,105	679 ± 6	40,1 ± 2,83	0,004
Aldehyd	**SlAMADH1**			**SlAMADH2**		
	***K*$_m$ (µmol·l^{-1})**	***V* (nkat·mg^{-1})**	***V*/*K*$_m$**	***K*$_m$ (µmol·l^{-1})**	***V* (nkat·mg^{-1})**	***V*/*K*$_m$**
APAL	20,2 ± 3,32	167 ± 12,2	1	17,9 ± 1,18	134 ±3,6	1
2,6-diCl-4-PCAL	162 ± 14,8	36,3 ± 1,43	0,027	47,2 ± 5,03	5,72 ± 0,307	0,016
2-Br-4-PCAL	69,0 ± 7,13	65,1 ± 2,74	0,113	33,6 ± 6,40	3,51 ± 0,403	0,014
P2PAL	161 ± 12,2	33,1 ± 0,78	0,025	452 ± 39,5	3,41 ± 0,118	0,001
P3PAL	129 ± 7,1	94,2 ± 2,04	0,088	165 ± 10,7	2,61 ± 0,052	0,002
P4PAL	146 ± 9,2	67,8 ± 1,79	0,053	340 ± 20,5	14,7 ± 0,35	0,006
2-PMet-ABAL	390 ± 30,4	51,8 ± 1,73	0,016	1040 ± 74	45,8 ± 1,69	0,006
3-PMet-ABAL	294 ± 16,2	75,3 ± 1,59	0,032	988 ± 66,7	37,4 ± 1,30	0,005
4-PMet-ABAL	385 ± 28,9	43,8 ± 1,31	0,014	216 ± 14,3	8,67 ± 0,200	0,005

3-Pyridinylpropanaly jsou velmi dobrými substráty SlAMADH1, kde bylo v případě P3PAL dokonce relativní aktivity vyšší než u APALu. Ostatní enzymy dosáhly nižších u všech třech substrátů výrazně nižší relativní aktivity než SlAMADH1. V případě PsAMADH2 však všechny aldehydy byly oxidovány s relativní aktivitou vyšší než 10 %. Relativní aktivita překonala 10 % i při oxidaci P3PALu a P4PALu katalyzované PsAMADH1 a při oxidaci P4PALu katalyzované SlAMADH2 (Obr. 11).



Obr. 13: Saturační křivky oxidace vybraných heterocyklických aldehydů měřené při koncentraci koenzymu NAD^+ 0,5 mmol·l^{-1}. A: Oxidace 3-pyridinylpropanalů a 4-pyridinylmethylaminobutanalů katalyzovaná PsAMADH2. B: Oxidace 3-pyridinylpropanalů a 4-pyridinylmethylaminobutanalů za katalýzy SlAMADH1. C: Oxidace 4-pyridinylmethylaminobutanalů působením SlAMADH2. D: Oxidace 4-PMet-AAAL a aldehydových derivátů purinu a pyrrolopyrimidinu za katalýzy SlAMADH1.

Afinita PsAMADH1 k P3PALu i P4PALu je mnohem vyšší než je to v případě PsAMADH2. V případě PsAMADH1 se hodnoty K_m pohybovaly kolem 20 µmol·l^{-1}, zatímco pro PsAMADH2 byly tyto hodnoty minimálně dvojnásobné a s rostoucí vzdáleností propanalového řetězce od heterocyklického dusíku pyridinu postupně klesaly (K_m 171, 87,3 a 29,2 µmol·l^{-1}, pro P2PAL, P3PAL a P4PAL). Afinita SlAMADH1 k pyridinylpropanalům byla poměrně vyrovnaná s hodnotami *K*m od 125 do 175 µmol·l^{-1}. Naproti tomu hodnoty K_m pro katalýzu SlAMADH2 se navzájem velmi lišily. U P2PAL (K_m = 452 µmol·l^{-1}) a P4PAL (K_m = 340 µmol·l^{-1}) byla afinita SlAMADH2 výrazně nižší než v případě SlAMADH1. V kontrastu k izomerům pak působí afinita

P3PALu k SlAMADH2 (K_m = 165 µmol·l^{-1}), která je srovnatelná s afinitou k SlAMADH1 (Tab. 5). Zatímco u P2PALu byl vždy pozorován klasický průběh závislosti reakční rychlosti na počáteční koncentraci substrátu, P3PAL a P4PAL vykazovaly inhibici PsAMADH2 a SlAMADH1 nadbytkem substrátu. PsAMADH1 ani SlAMADH2 nebyly nadbytkem zmíněných aldehydů inhibovány (Obr. 12, Obr. 13, Tab. 7).

Zatímco *N*-pyridinylmethyl deriváty APALu nebyly studovanými AMADH oxidovány, nebo se jednalo jen o slabší substráty s relativní aktivitou v rozmezí 10 až 16 % vzhledem k APALu (SlAMADH1), odpovídající deriváty ABALu byly oxidovány mnohem lépe. Z derivátů AAALu byly testovány jen 2-PMet-AAAL a 4-PMet-AAAL. Zatímco první uvedený nebyl oxidován žádným ze studovaných enzymů, 4-PMet-AAAL se ukázal jako dobrý substrát SlAMADH1 s relativní aktivitou cca 50 % a slabý substrát PsAMADH2 (relativní aktivita 2 %). Zbývající dva enzymy oxidaci 4-PMet-AAALu nekatalyzují (Obr. 11).

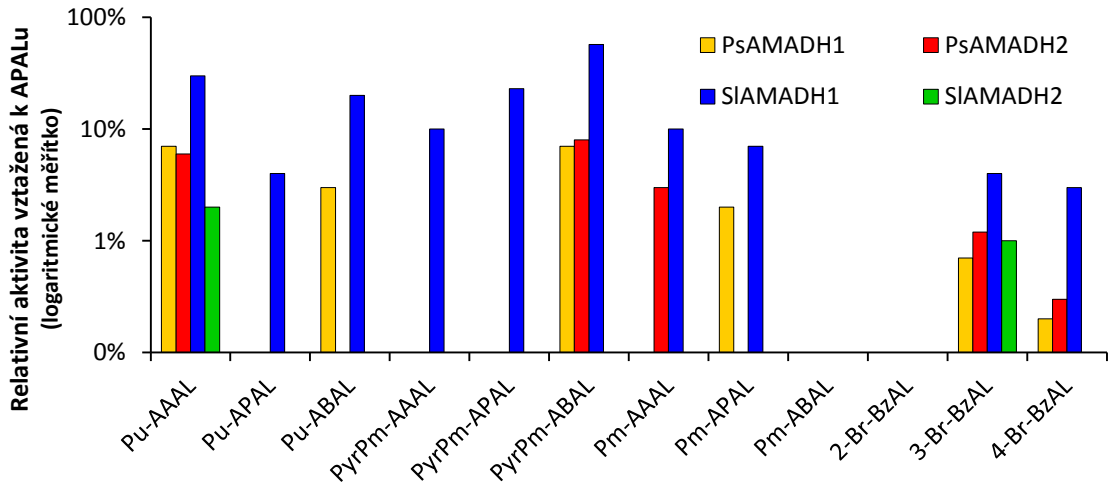
Tab. 6: Inbibiční konstanta (K_{ss}) při inhibici nadbytkem substrátu. Tato inhibice byla pozorována jen u některých substrátů.

Aldehyd	K_{ss} (µmol·l^{-1})			
	PsAMADH1	**PsAMADH2**	**SlAMADH1**	**SlAMADH2**
4-PCAL	X	2870 ± 280	1620 ± 182	X
2,6-diCl-4-PCAL	204 ± 48,3	2550 ± 410	948 ± 149,9	856 ± 134,3
2-Br-4-PCAL	1070 ± 141	N. D.	542 ± 109,1	166 ± 45,6
P-3-PAL	N. D.	599 ± 108,9	2010 ± 372	N. D.
P-4-PAL	N. D.	691 ± 54,6	2170 ± 292	N. D.
3-PMet-ABAL	2520 ± 662	N. D.	N. D.	N. D.

Afinita rostlinných AMADH vůči *N*-pyridinylmethyl-ω-aminoaldehydům je obvykle nízká (Obr. 13). S výjimkou PsAMADH1, kde je afinita zmíněných aldehydů k enzymu výrazně vyšší, se hodnoty K_m pohybují nad 200 µmol·l^{-1}. V případě katalýzy PsAMADH1 byla hodnota K_m pro 2-PMet-ABAL a 4-PMet-ABAL kolem 50 µmol·l^{-1} a výrazně vyšší (155 µmol·l^{-1}) pro 3-PMet-ABAL. Nízká hodnota K_m ve srovnání s ostatními studovanými AMADH způsobila i vysoké relativní hodnoty V/K_m. V případě 4-PMet-ABALu byl tento parametr dokonce vyšší než 0,1. Velmi vysokými hodnotami K_m se naproti tomu vyznačovala SlAMADH2 při oxidaci 2-PMet-ABALu a 3-PMet-ABALu, kde bylo dosaženo obdobných hodnot přibližně 1,0 mmol·l^{-1}. Velmi nízká byla i afinita PsAMADH2 k 4-PMet-ABALu (K_m = 679 µmol·l^{-1}). V ostatních případech byla hodnota

K_m pod 500 µmol·l^{-1} (Tab. 5). Inhibice nadbytkem substrátu byla pozorována pouze v jednom pžípadě – při oxidaci 3-PMet-ABALu pomocí PsAMADH1 (Obr. 12, Tab. 6).

Purin-6-yl, pyrimidin-2-yl a 7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4yl deriváty AAALu, APALu a ABALu byly dobře oxidovány pouze SlAMADH1 (Obr. 14). V případě ostatních enzymů se buď nejednalo o substráty, nebo byly tyto látky jen slabými substráty zmíněných enzymů s relativní rychlostí nižší než 10 %. Vzhledem k nízké relativní aktivitě byly u těchto substrátů měřeny kinetické parametry téměř výhradně jen u SlAMADH1 (Obr. 13), kde však byla pozorována relativně nízká afinita enzymu (Tab. 7). Deriváty purin-6-ylu se vázaly do aktivního místa SlAMADH1 (hodnoty K_m kolem 400 µmol·l^{-1}) lépe než deriváty 7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4ylu , u kterých hodnota K_m přesáhla 1000 µmol·l^{-1}). PsAMADH2 měla nízkou aktivitu i vůči Pu-AAALu (K_m = 755 µmol·l^{-1}). Žádný z těchto aldehydů nezpůsoboval inhibici nadbytkem substrátu.



Obr. 14: Substrátová specifičnost rostlinných AMADH vůči dalším heterocyklickým či aromatickým aldehydům. Měření probíhalo pro [S] = 1,0 mmol·l^{-1} při saturační koncentraci koenzymu NAD$^+$ 0,5 mmol·l^{-1}. Specifická aktivita pro oxidaci přirozeného substrátu (APAL) byla 39, 102, 53 a 58 nkat·mg^{-1} pro PsAMADH1, PsAMADH2, SlAMADH1 a SlAMADH2.

V případě oxidace brombenzaldehydů byla pozorována obdobná závislost mezi reakční rychlostí a pozicí substituce jako v případě halogenderivátů 4-PCALu (Obr. 14). Zatímco 2-Br-BzAL nebyl substrátem studovaných PsAMADH, 3-Br-BzAL a 4-Br-BzAL byly slabými substráty všech čtyř AMADH. Hodnoty K_m pro oxidaci obou bromderivátů BzALu byly nízké – pod 70 µmol·l^{-1} (Tab. 7). V případě SlAMADH1 byla dokonce u 4-Br-BzAL K_m výrazně nižší (3,19 µmol·l^{-1}) než pro fyziologický substrát APAL. Tato hodnota K_m je nejnižší naměřená hodnota v celém souboru všech aldehydů, se kterými bylo v rámci této práce prováděno měření. Velmi nízká limitní rychlost (1,27 nkat·mg^{-1}) však výrazně snižuje poměr V/K_m až na

pouhé 4,9 % hodnoty dosažené pro APAL. Závislost počáteční reakční rychlosti na koncentraci substrátu vykazovala v případě obou těchto bromderivátů BzALu klasickou křivku ve tvaru hyperboly dle Michaelise a Mentenové bez jakékoli inhibice nadbytkem substrátu.

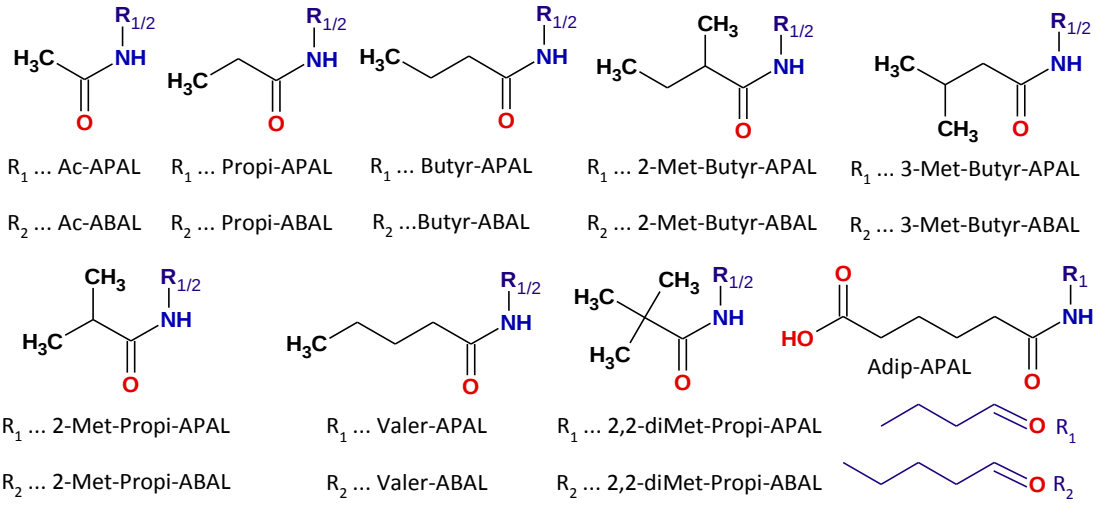
Tab. 7: Kinetické parametry oxidace pyridinkarbaldehydů, purinylaminoaldehydů, pyrrolopyrimidinylaminoaldehydů a brombenzaldehydů. Měření bylo provedeno při koncetraci koenzymu NAD^+ 0,5 mmol·l^{-1}. N D – pro pomalou oxidaci při [S] = 1,0 mmol·l^{-1} nebyly kinetické parametry měřeny.

Aldehyd	PsAMADH2			SlAMADH1		
	K_m (µmol·l^{-1})	V (nkat·mg^{-1})	V/K_m	K_m (µmol·l^{-1})	V (nkat·mg^{-1})	V/K_m
APAL	12,4 ± 0,87	179 ± 3,7	1	20,2 ± 3,22	167 ± 12,1	1
2-PCAL	76,7 ± 5,21	2,10 ± 0,032	0,002	187 ± 11,2	17,6 ± 0,38	0,011
3-PCAL	754 ± 32,4	7,75 ± 0,131	0,001	238 ± 21,6	51,9 ± 1,73	0,026
4-PCAL	33,2 ± 2,26	2,13 ± 0,041	0,004	19,2 ± 1,32	59,1 ± 1,24	0,372
4-PCAL-NO	54,8 ± 2,66	0,81 ± 0,012	0,001	356 ± 29,1	29,9 ± 0,91	0,010
4-PMet-AAAL	761 ± 59,4	3,36 ± 0,096	0,0003	238 ± 9,7	34,0 ± 0,51	0,017
Pu-AAAL	755 ± 55,2	9,63 ± 0,406	0,001	379 ± 22,8	21,1 ± 0,47	0,007
Pu-ABAL	N. D.	N. D.	N. D.	482 ± 25,2	14,2 ±0,30	0,004
PyrPm-APAL	N. D.	N. D.	N. D.	1020 ± 69	23,8 ±0,85	0,003
PyrPm-ABAL	N. D.	N. D.	N. D.	1250 ± 92	64,7 ± 2,87	0,006
3-Br-BzAL	12,9 ± 0,86	1,16 ± 0,020	0,006	68,7 ± 6,34	2,33 ± 0,073	0,004
4-Br-BzAL	N. D.	N. D.	N. D.	3,19 ± 0,175	1,27 ± 0,042	0,048

V případě oxidace aromatických aldehydů obsahujících další substituci aromatického jádra je výrazná závislost substrátových vlastností na pozici substice jev vcelku typický pro různé ALDH. Například u lidské jaterní ALDH2 jsou *o*-methylbenzaldehyd, *o*-methoxybenzaldehyd či *o*-nitrobenzaldehyd horšími substráty než jejich *m*- a *p*- izomety (Klyosov, 1996). Podobně ALDH z bakterie *Sphingomonas* sp. 14DN61 oxiduje lépe *m*- a *p*- izomery methylbenzaldehydu, methoxybenzaldehydu, nitrobenzaldehydu či chlorobenzaldehydu než příslušné *o*-deriváty. Není však bez zajímavosti, že stejný enzym naopak preferuje *o*-flourbenzaldehyd a *o*-hydroxybenzaldehyd před *m*- a *p*- izomery (Peng et al., 2005).

4.1.2 *N*-acylované ω-aminoaldehydy

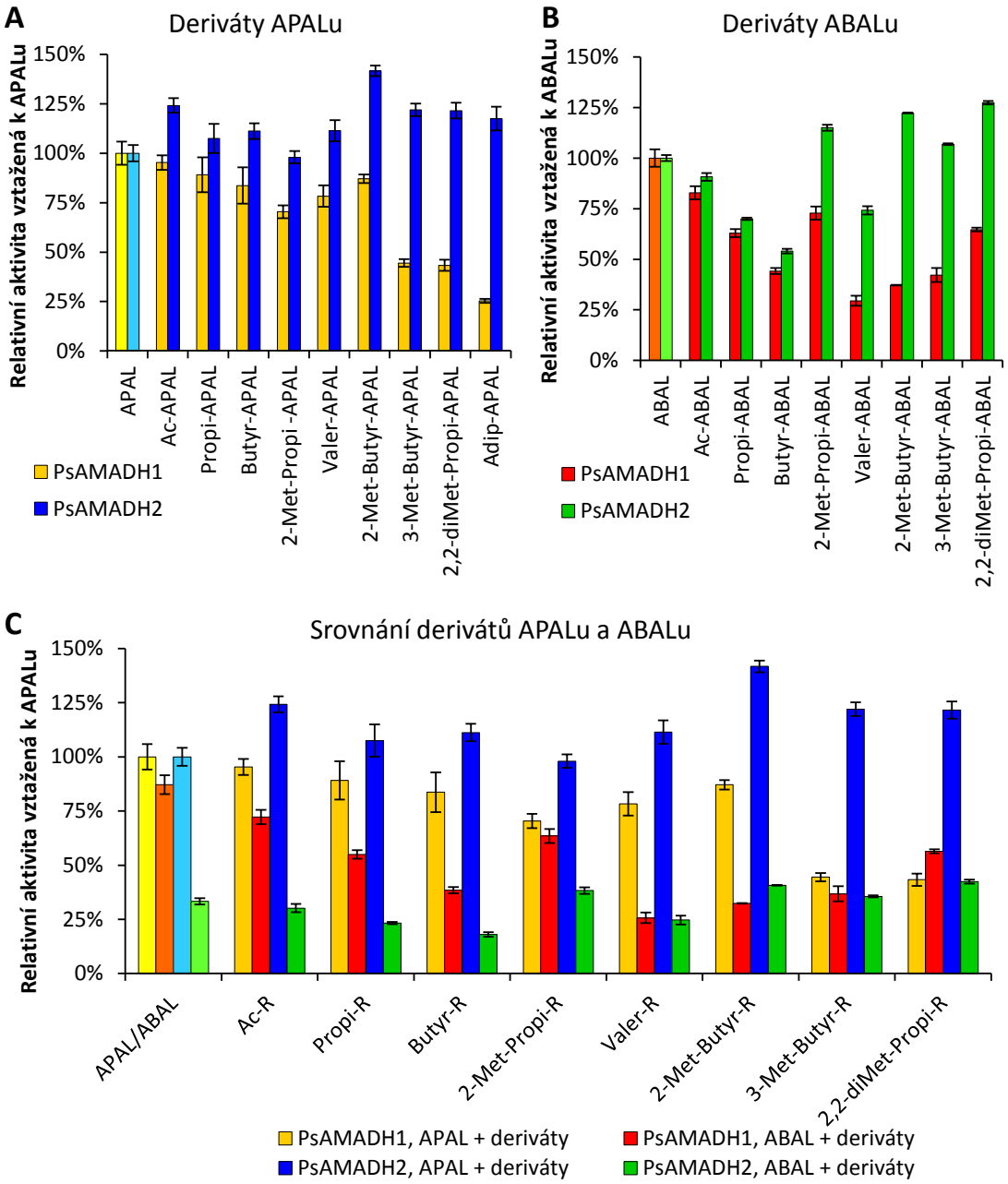
Všech sedmnáct studovaných *N*-acylovaných ω-aminoaldehydů (Obr. 15) včetně *N*-adipoyl-APALu (Adip-APAL) bylo shledáno substráty obou PsAMADH. Deriváty APALu byly obecně lepšími substráty než odpovídající deriváty ABALu. Relativní aktivita PsAMADH1 vztažená k APALu se v případě derivátů APALu pohybovala od 40 do 95 % a v případě derivátů ABALu od 23 do 73 %. Hodnoty relativní aktivity PsAMADH2 pro deriváty APALu se pohybovaly mezi 95 a 145 % a s jedinou výjimkou, jíž byl 2-Met-Propi-APAL, byly při koncenttraci substrátu 1,0 mmol·l^{-1} oxidovány rychleji než APAL. Deriváty ABALu byly oxidovány výrazně pomaleji s hodnotami relativní aktivity mezi 18 a 45 %. U substrátů s lineárním acylovým řetězcem se relativní aktivita s rostoucí délkou acylového řetězce snižuje (Obr. 16).



Obr. 15: *N*-acylované ω-aminoaldehydy, které byly testovány jakožto substráty obou PsAMADH.

Hodnoty K_m se obvykle pohybovaly mezi 100 a 800 µmol·l^{-1} v případě katalýzy PsAMADH1 (Tab. 8) a při oxidaci PsAMADH2 mezi 80 až 600 µmol·l^{-1} (Tab. 9). Výjimku ze zmíněného intervalu tvoří oxidace 2,2-diMet-Propi-ABALu katalyzovaná PsAMADH1 (K_m = 1420 µmol·l^{-1}) a dále oxidace Propi-APALu a Adip-APALu za katylýzy PsAMADH2, kde byly hodnoty K_m výrazně nižší (65,1 resp. 39,2 µmol·l^{-1}). Ve většině případů byly hodnoty K_m pro deriváty APALu nižší než pro odpovídající deriváty ABALu (Obr. 17, Obr. 18). Opačně tomu bylo pouze dvakrát – při oxidací obou propionylderivátů PsAMADH1 a při oxidaci obou 2-methylbutyrylderivátů PsAMADH2. Isoenzym 2 většinou vykazoval větší afinitu k těmto substrátům než k PsAMADH1. Zde se však objevilo více výjimek (Valer-APAL, 2-Met-Propi-APAL, 2,2-diMet-Propi-APAL a 3-Met-Butyr-ABAL). Nejvýraznější rozdíl v afinitě byl pozorován v případě Adip-APALu, kde se hodnoty K_m lišily o jeden řád. Zatímco v případě PsAMADH1 se jednalo o druhou nejvyšší K_m hodnotu ze všech derivátů APALu (431 µmol·l^{-1}) (Tab. 8), v případě PsAMADH2 to byla hodnota

bezkonkurenčně nejnižší (K_m = 39,2 µmol·l^{-1}) (Tab. 9). Butyrylderiváty rovněž vykázaly vyšší hodnoty K_m než příslušné izomery – 2-methylpropionylderiváty.



Obr. 16: Substrátová specifičnost rostlinných AMADH vzhledem *N*-acyl-ω-aminoaldehydům. Přirozené substráty jsou zobrazeny světlejším odstínem téže barvy. Měření probíhalo pro [S] = 1,0 mmol·l^{-1} při saturační koncentraci koenzymu NAD^+ 0,5 mmol·l^{-1}. Specifická aktivita pro oxidaci přirozeného substrátu pro PsAMADH1 a PsAMADH2 byla 39 a 102 nkat·mg^{-1} (APAL), popř. 34 a 34 nkat·mg^{-1} (ABAL). A: Porovnání derivátů APALu. Relativní aktivita PsAMADH1 je nižší než relativní aktivita PsAMADH2. B: Porovnání derivátů ABALu. Relativní aktivita PsAMADH1 je nižší než relativní aktivita PsAMADH2. C: Vzájemné porovnání derivátů APALu a

ABALu. Deriváty APALu jsou oxidovány rychleji než deriváty ABALu – podobně jako v případě samotných přirozených substrátů.

Tab. 8: Kinetické parametry oxidace *N*-acylovaných-ω-aminoaldehydů za katalýzy PsAMADH1. Měřeno při koncetraci koenzymu NAD^+ 0,5 mmol·l^{-1}. Poměr V/K_m je uveden jako relativní hodnota vztažena jak k výsledku pro APAL, tak k výsledku pro ABAL. N. D. – inhibice nadbytkem substrátu nebyla pozorována.

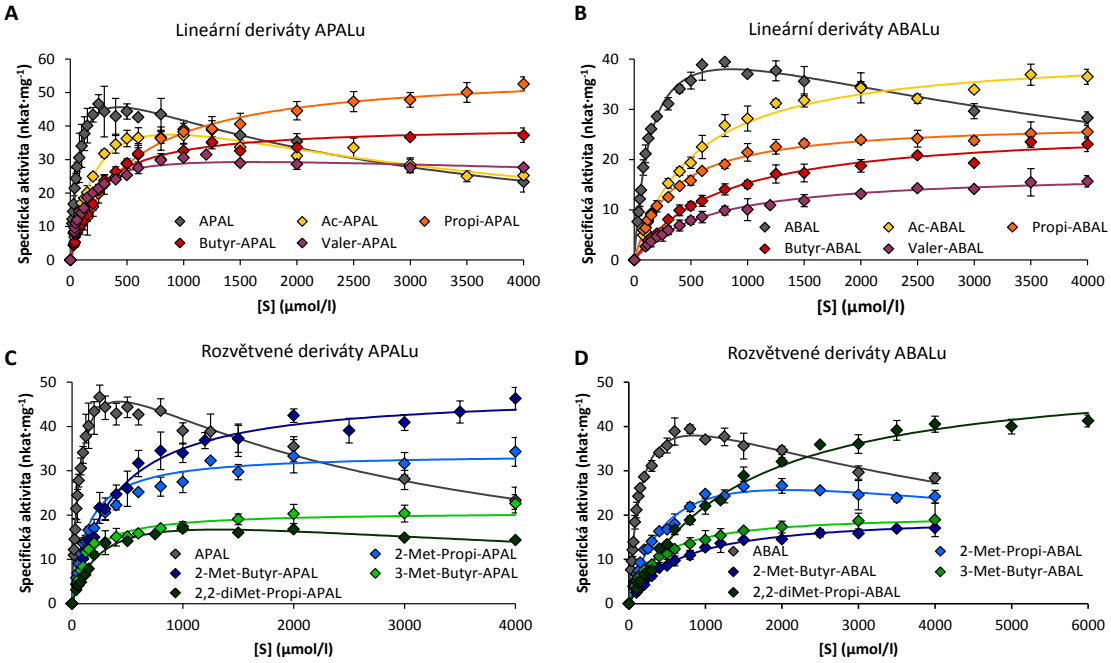
Aldehyd	**PsAMADH1**				
	K_m (µmol·l^{-1})	V (nkat·mg^{-1})	V/K_m		K_{ss} (µmol·l^{-1})
Přirozené substráty ke srovnání					
APAL	71,8 ± 5,75	60,9 ± 2,04	**1,000**	2,482	2560 ± 308
ABAL	153 ± 15,4	51,6 ± 2,52	0,403	**1,000**	4750 ± 1074
Syntetické substráty					
Ac-APAL	268 ± 31,3	60,2 ± 3,79	0,268	0,666	2910 ± 485
Propi-APAL	492 ± 23,3	56,6 ± 0,82	0,137	0,341	N. D.
Butyr -APAL	227 ± 32,1	40,1 ± 1,20	0,211	0,524	N. D.
2-Met- Propi -APAL	183 ± 18,0	33,9 ± 1,01	0,221	0,549	N. D.
Valer-APAL	120 ± 11,2	33,6 ± 1,16	0,335	0,830	21700 ± 8200
2-Met-Butyr-APAL	366 ± 40,6	47,8 ± 1,53	0,156	0,387	N. D.
3-Met-Butyr-APAL	137 ± 19,9	20,7 ± 0,77	0,353	0,877	N. D.
2,2-diMet-Propi-APAL	266 ± 31,7	23,5 ± 1,42	0,106	0,262	6510 ± 1448
Adip-APAL	431 ± 39,3	17,2 ± 0,89	0,047	0,118	3450 ± 441
Ac-ABAL	516 ± 41,0	41,5 ± 1,16	0,096	0,238	N. D.
Propi-ABAL	327 ± 14,0	27,5 ± 0,32	0,100	0,249	N. D.
Butyr-ABAL	738 ± 60,0	26,6 ± 0,75	0,043	0,107	N. D.
2-Met-Propi-ABAL	525 ± 65,3	38,7 ± 2,65	0,088	0,219	8140 ± 2032
Valer-ABAL	629 ± 35,1	17,5 ± 0,33	0,033	0,082	N. D.
2-Met-Butyr-ABAL	638 ± 24,8	20,0 ± 0,26	0,037	0,093	N. D.
3-Met-Butyr-ABAL	361 ± 18,1	20,3 ± 0,33	0,059	0,146	N. D.
2,2-diMet-Propi-ABAL	1420 ± 94	53,3 ± 1,39	0,045	0,111	N. D.

Poměr hodnot V/K_m byl u derivátů ABALu vždy nižší než v případě APALu (Tab. 8, Tab. 9). Pouze ve třech případech byl tento poměr vyšší než pro oxidaci přirozeného substrátu ABALu. Jedná se o oxidaci Ac-APALu, Propi-APALu a zejména Adip-APALu, u kterých byl tento parametr v případě katalýzy PsAMADH2 přibližně třikrát vyšší. Oxidace 2-Met-Propi-APALu a 3-Met-Butyr-APALu pomocí PsAMADH2 vykazuje hodnotu V/K_m srovnatelnou s oxidací ABALu. Ve

všech ostatních případech se jedná o substrát horší než APAL i ABAL. U derivátu APALu byl parametr V/K_m vždy lepší než u příslušného derivátu ABALu. Lineární deriváty jsou z hlediska tohoto parametru zpravidla horšími substráty než jejich rozvětvené izomery. V případě rozvětvených izomerů derivátů s pětiuhlíkatým acylem je dvakrát rozvětvený 2,2-dimethylpropionylderivát horším subtrátem než odpovídající jedenkrát rozvětvený 3-methylbutyrylderivát.

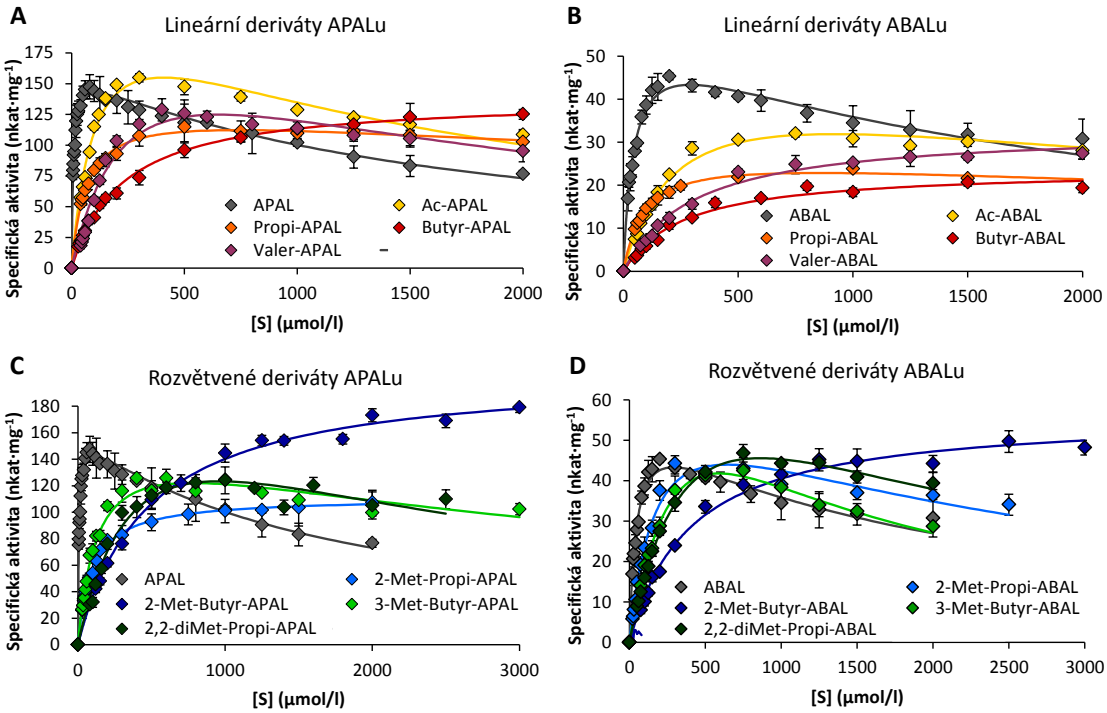
Tab. 9: Kinetické parametry oxidace *N*-acylovaných-ω-aminoaldehydů za katalýzy PsAMADH2. Měřeno při koncetraci koenzymu NAD^+ 0,5 mmol·l^{-1}. Poměr V/K_m je uveden jako relativní hodnota vztažena jak k výsledku pro APAL, tak k výsledku pro ABAL. N. D. – inhibice nadbytkem substrátu nebyla pozorována.

Aldehyd	**PsAMADH2**				
	K_m (µmol·l^{-1})	V (nkat·mg^{-1})	V/K_m		K_{ss} (µmol·l^{-1})
Přirozené substráty ke srovnání					
APAL	7,27 ± 0,46	161 ± 2,5	**1,000**	17,833	1670 ± 115
ABAL	45,9 ± 6,86	57,0 ± 3,25	0,056	**1,000**	1840 ± 339
Syntetické substráty					
Ac-APAL	109 ± 21,7	238 ± 22,9	0,099	1,758	1520 ± 321
Propi-APAL	65,1 ± 3,77	132 ± 2,9	0,092	1,633	8400 ± 1425
Butyr -APAL	226 ± 9,5	139 ± 1,9	0,028	0,495	N. D.
2-Met- Propi -APAL	93,5 ± 2,66	111 ± 0,9	0,054	0,956	N. D.
Valer-APAL	271 ± 66,8	188 ± 26,6	0,031	0,559	1720 ± 511
2-Met-Butyr-APAL	469 ± 33,1	206 ± 4,7	0,020	0,354	N. D.
3-Met-Butyr-APAL	130 ± 17,0	163 ± 9,3	0,057	1,010	4620 ± 989
2,2-diMet-Propi-APAL	477 ± 130,0	246 ± 42,3	0,023	0,415	1930 ± 692
Adip-APAL	39,2 ± 3,99	150 ± 5,22	0,178	3,081	4630 ± 936
Ac-ABAL	242 ± 33,4	48,6 ± 3,58	0,009	0,162	3510 ± 742
Propi-ABAL	92,7 ± 7,69	27,8 ±1,02	0,013	0,230	7870 ± 1293
Butyr-ABAL	264 ± 34,7	23,8 ± 0,96	0,004	0,073	N. D.
2-Met-Propi-ABAL	189 ± 33,9	69,7 ± 6,79	0,017	0,297	2210 ± 541
Valer-ABAL	304 ± 39,0	33,0 ± 1,20	0,005	0,087	N. D.
2-Met-Butyr-ABAL	397 ± 43,3	56,6 ± 2,19	0,006	0,115	N. D.
3-Met-Butyr-ABAL	531 ± 113,7	117 ± 18,6	0,010	0,177	657 ± 157
2,2-diMet-Propi-ABAL	506 ± 73,7	99,1 ± 10,17	0,009	0,158	1470 ± 298



Obr. 17: Saturační křivky oxidace *N*-acyl-ω-aminoaldehydů pomocí PsAMADH1 měřené při koncentraci koenzymu NAD^+ 0,5 mmol·l^{-1}.

Pouze u šesti testovaných substrátů (Butyr-APAL, 2-Met-Propi-APAL, 2-Met-Butyr-APAL, Butyr-ABAL, Valer-ABAL a 2-Met-Butyr-ABAL) nebyla pozorována inhibice substrátem ani u jednoho enzymu. Naproti tomu pět substrátů, jměnovitě Ac-APAL, Valer-APAL, 2,2-diMet-Propi-APAL, 2-Met-Propi-ABAL a Adip-APAL, inhibovalo ve vysokých koncentracích oba enzymy. Zbývajících šest substrátů (Propi-APAL, 3-Met-Butyr-APAL, Ac-ABAL, Propi-ABAL, 3-Met-Butyr-ABAL a 2,2-diMet-Propi-ABAL) inhibovalo ve vyšších koncentracích pouze PsAMADH2. Inhibice nadbytkem substrátu účinná jen vůči PsAMADH1 nebyla pozorována (Obr. 17, Obr. 18, Tab. 8, Tab. 9).



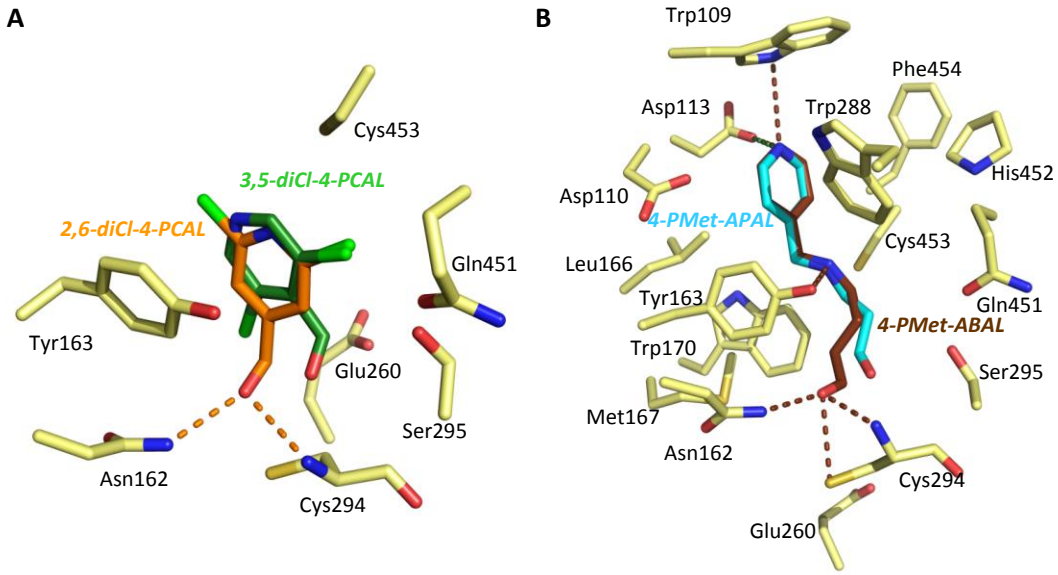
Obr. 18: Saturační křivky oxidace *N*-acyl-ω-aminoaldehydů pomocí PsAMADH2 měřené při koncentraci koenzymu NAD^+ 0,5 mmol·l^{-1}.

4.1.3 Molekulové modelování

Pro lepší pochopení aktivity AMADH vůči jednotlivým aldehydům a závislostí efektivity substrátu na struktuře v jednotlivých skupinách aldehydů bylo provedeno dokování vybraných aldehydů do aktivního místa PsAMADH2. Její krystalová struktura je již delší dobu známá (Tylichová et al., 2010) a dostupná v proteinové databázi (PDB kód 3IWJ). K prvním počítačovým experimentům byly zvoleny 2,6-diCl-4-PCAL a 3,5-diCl-4-PCAL jakožto reprezentanti halogenderivátů aromatických aldehydů, kde je patrná závislost mezi pozicí substituce halogenem a schopností enzymu katalyzovat oxidaci daného aldehydu. Dalšími dokovanými aldehydy byly 2-PMet-ABAL, 2-PMet-APAL, 4-PMet-ABAL a 4-PMet-APAL, u kterých byl z hlediska jejich oxidace AMADH prokázán větší význam délky alifatického řetězce aminoaldehydu než pozice substituce pyridinového kruhu (Obr. 19). Poslední skupinu ligandů tvořily *N*-acyl-ω-aminoaldehydy Ac-APAL, Ac-ABAL, Propi-ABAL, Propi-ABAL, Butyr-APAL, Butyr-ABAL, Valer-APAL, Valer-ABAL, 3-Met-APAL, 3-Met-ABAL, 2,2-diMet-APAL a 2,2-diMet-ABAL. U této skupiny byl rovněž potvrzen velký význam délky aminoaldehydu. Naproti tomu délka a větvení acylového řetězce ovlivňovalo schopnost obou PsAMADH katalyzovat zmíněné aldehydy daleko méně.

Pyridinový kruh obou dichlorderivátů 4-PCALu se v aktivním místě nacházel ve stejné pozici. Jediným rozdílem byla jeho orientace, kdy oba pyridinové kruhy byly navzájem

pootočeny o přibližně 45° (Obr. 19). Taková orientace by umožnila v případě 2,6-diCl-4-PCALu interakci aldehydového kyslíku nejen s katalytickým Cys294, ale i s Asn162. Naproti tomu vzdálenost mezi kyslíkem 3,5-diCl-4-PCALu a oběma zmíněnými residui byly příliš velká, a tak by nemělo dojít ke zmíněné interakci, jež je nutná pro oxidaci aldehydu na příslušnou karboxylovou kyselinu. To bylo ostatně potvrzeno i experimentálně.



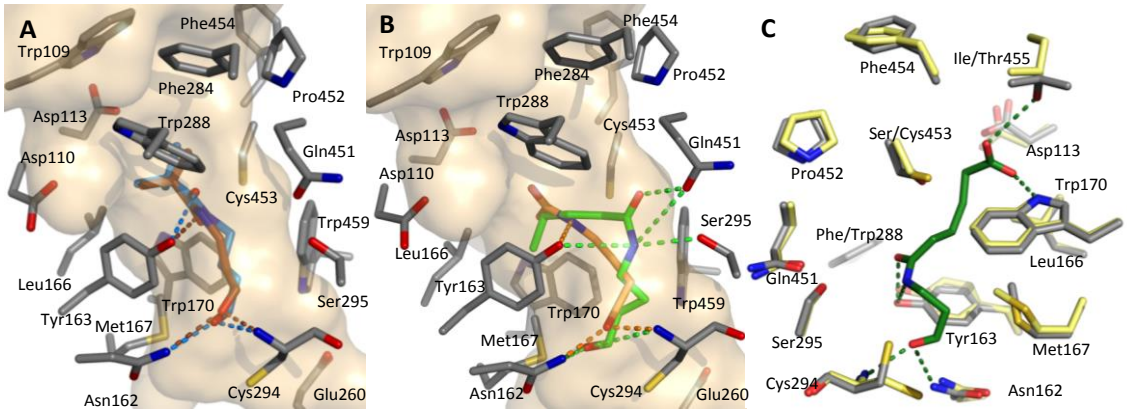
Obr. 19: Počítačový model interakce vybraných heterocyklických aldehydů s aktivním místem a substrátovým kanálkem PsAMADH2. A: Pyridinové cykly 2,6-diCl-4-PCALu a 3,5-diCl-4-PCALu se sice nachází v téměř shodné poloze, ale vzhledem k jejich rozdílné orientaci v aktivním místě se karbonylová skupina 3,5-diCl-4-PCALu nachází příliš daleko od aktivního Cys294. B: Poloha pyridinových cyklů i dusíku aminoskupiny je v případě 4-PMet-ABALu a 4-PMet-APALu shodná. Díky delšímu uhlíkatému řetězci penetruje dostatečně hluboko jen 4-PMet-ABAL.

V případě všech čtyř ω-pyridinylmethylaminoaldehydů byla pozice pyridinového kruhu téměř shodná (Obr. 19). Cyklus se nachází v dutině substrátového kanálku mezi vedlejšími řetězci Trp109, Asp110, Asp113, Leu166, Trp288, Cys453 a Phe454. Rovina cyklu je přibližně kolmá na roviny aromatických cyklů Trp109 a Phe454. Uhlík, ze kterého alifatický řetězec ω-methylaminoaldehydu směřuje dále do nitra substrátového kanálku k aktivnímu místu, se ve všech čtyřech případech nachází na shodné pozici. Pyridinový dusík 2-PMet-APALu i 2-PMet-ABALu se nachází na polorovině směřující k Cys453, nikoliv na polorovině směřující k Asp110. V případě 4-PMet-ABALu i 4-PMet-APALu se dusík pyrimidinového cyklu dostává dostatečně blízko k Trp109 a Asp113. Rovněž pozice dusíku sekundární aminoskupiny byla u jednotlivých ligandů v podstatě shodná. Tento dusík vytváří iontovou vazbu s kyslíkem postranního řetězce Tyr163. Zatímco oba deriváty APALu neproniknou se svou aldehydovou skupinou do dostatečné blízkosti katalytického Cys294 a Asn162, deriváty ABALu, jejichž řetězec je o jeden

uhlík delší, penetrují do substrátového kanálku dostatečně hluboko, a tak je jejich interakce se zmíněnými katalytickými residui mnohem snažší.

Tab. 10: Pravděpodobná interakce amidového dusíku a kyslíku *N*-acylovaných substrátů (příp. dusíku aminoskupiny u referenčních substrátů APALu a ABALu) s postranními řetězci aminokyselin v blízkosti aktivního místa dle počítačového modelu včetně volné a dokovací energie. [1)] Interakce přes amidový dusík/kyslík substrátu. [2)] APAL a ABAL neobsahují amidový kyslík, jen aminoskupinu, a tak interagují jen přes dusík.

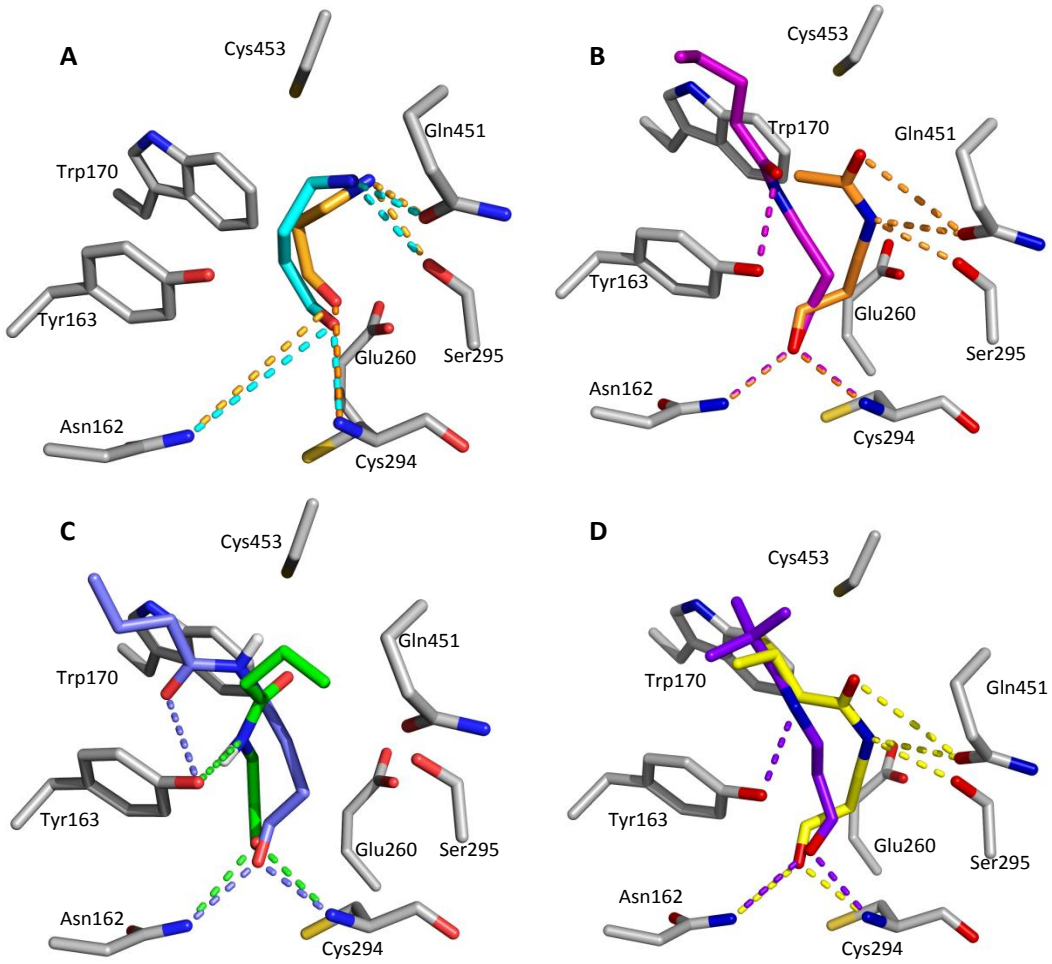
Aldehyd	**Energie**		**Pravděpodobná interakce substrátu s residui v blízkosti aktivního místa**					
	E_{dock}	**E_{free}**	**s Tyr163 OH**		**se Ser295 OG**		**s Gln451 OE1**	
	(kcal·mol^{-1})	**(kcal·mol^{-1})**	**přes N[1)]**	**přes O[1)]**	**přes N[1)]**	**přes O[1)]**	**přes N[1)]**	**přes O[1)]**
APAL	-4,30	-3,62	-	-[2)]	+	-[2)]	+	-[2)]
ABAL	-5,24	-4,20	-	-[2)]	+	-[2)]	+	-[2)]
Ac-APAL	-5,60	-4,23	-	-	+	-	+	+
Propi-APAL	-5,43	-3,99	+	-	-	-	-	-
Butyr-APAL	-5,75	-3,83	+	-	-	-	-	-
Valer-APAL	-6,98	-4,60	-	+	-	-	-	-
3-Met-Butyr-APAL	-7,21	-5,15	-	-	+	-	+	+
2,2-diMet-Propi-APAL	-6,38	-4,74	+	-	-	-	-	-
Adip-APAL	-7,73	-4,72	+	+	-	-	-	-
Ac-ABAL	-5,58	-3,93	+	-	-	-	-	-
Propi-ABAL	-6,03	-4,07	-	-	-	-	-	-
Butyr-ABAL	-7,10	-4,80	-	+	-	-	-	-
Valer-ABAL	-7,52	-5,08	+	-	+	-	+	+
3-Met-Butyr-ABAL	-7,56	-5,13	-	-	-	-	-	-
2,2-diMet-Propi-ABAL	-7,19	-5,20	-	+	-	-	-	-



Obr. 20: Počítačový model interakce vybraných *N*-acyl-ω-aminoaldehydů s vedlejšími řetězci aktivního místa a substrátového kanálku PsAMADH2. A: Oba testované (*N*-2,2-dimethylpropionyl)aminoaldehydy interagují s kyslíkovým atomem Tyr163. 2,2-diMet-APAL (hnědě) vytváří vazbu přes svůj dusíkový atom a 2,2-diMet-Propi-ABAL přes amidový kyslík. B: Zatímco Ac-ABAL (oranžově) interaguje jen s Tyr163, u Valer-ABALu je možná interakce s Tyr163, Ser295 i Gln451. C: Adip-APAL může interagovat s Tyr163 OH jak přes dusík, tak přes kyslík. Karboxylová skupina Adip-APALu může interagovat s Trp170 i Thr455. Ten je v případě PsAMADH1 (residua v superpozici světle žlutě) nahrazen Ile455, který nemůže vodíkovou vazbu poskytnout.

U všech *N*-acyl-*ω*-aminoaldehydů, které byly dokovány do aktivního místa PsAMADH2, byla pozorována možná interakce aldehydové skupiny s katalytickými zbytky Cys294 a Asn162 (Obr. 20, Obr. 21). Amidová skupina substrátu pak interagovala přes atom dusíku či kyslíku se třemi dalšími zbytky substrátového kanálku - Tyr163, Ser295 či Gln451. Interakce s hydroxylovým kyslíkem Tyr163 byla častější než se zbývajícími dvěma zbytky (Tab. 10). Přes amidový dusík byla pozorována iontová interakce OH skupiny Tyr163 s Propi-APALem, Butyr-APALem, 2,2-diMet-Propi-APALem, Ac-ABALem a Valer-ABALem, zatímco kyslík amidové skupiny vytvářel interakci s Tyr163OH v případě Valer-APALu, Butyr-APALu a 2,2-diMet-Butyr-ABALu. V případě Adip-APALu byla pozorována možnost této interakce jak přes kyslík, tak přes dusík amidové skupiny. S postranním kyslíkem Ser295 a amidovým kyslíkem Gln451 byla pozorována interakce jen u tří nově syntetizovaných derivátů - Ac-APALu, 3-Met-Butyr-APALu a Valer-ABALu. Všechny tyto aminoaldehydy interagují se Ser295OG přes amidový dusík, zatímco s Gln451OE1 je možná interakce přes dusík i přes kyslík amidové skupiny. Oba fyziologické substráty byly rovněž podrobeny dokovacímu experimentu a jejich koncový dusík vytváří vazby se Ser295OG a s Gln451OE1. Karboxylové kyslíky Adip-APALu interagují s indolovým atomem dusíku Trp170 a hydroxylovým atomem kyslíku Thr455. Ten je v případě PsAMADH1 nahrazen Ile455, který iontovou interakci s karboxylovým kyslíkem vytvářet nemůže (Obr. 21). To je

pravděpodobnou příčinou velkého rozdílu v afinitě Adip-APALu k oběma isoenzymům, kdy při katalýze PsAMADH1 se jednalo o nejslabší substrát z derivátů APALu a čtvrtý nejslabší substrát ze všech testovaných acylderivátů dle poměru V/K_m, zatímco při katalýze PsAMADH2 je Adip-APAL bezkonkurenčně nejlepším substrátem z celé testované skupiny a v parametru V/K_m dokonce výrazně předčí i ABAL.



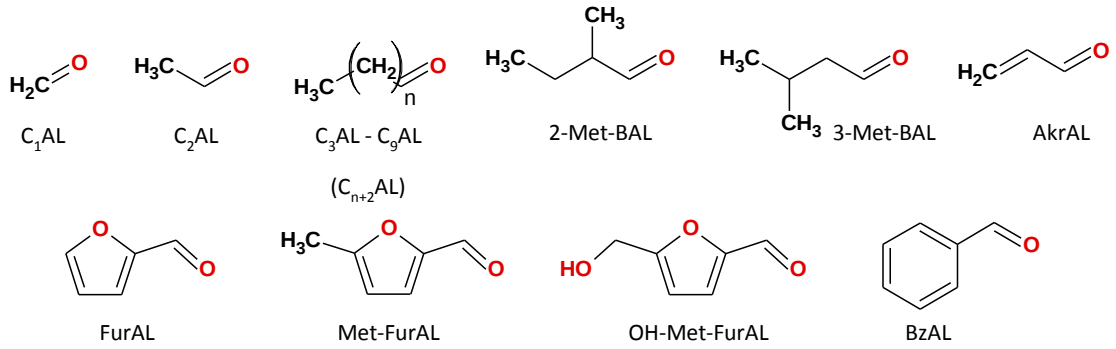
Obr. 21: Počítačový model interakce vybraných *N*-acyl-ω-aminoaldehydů s vedlejšími řetězci aktivního místa a substrátového kanálku PsAMADH2. Aldehydový kyslík všech dokovaných látek interaguje s amidovým dusíkem Asn162 a postranním dusíkem katalytického Cys294. A: Aminoskupina obou přirozených substrátů APALu (oranžově) a ABALu (modře) interaguje jak se Ser295, tak s Gln451. B: Ac-APAL (oranžově) pravděpodobně interaguje s Gln451, zatímco Valer-APAL interaguje s Tyr163 a Ser295. C: Oba ω-butyrylaminoaldehydy interagují s Tyr163 – Butyr-APAL (modře) přes svůj amidový kyslík a Butyr-ABAL (zeleně) přes dusík. D: Zatímco 2,2-diMet-Propi-APAL (fialově) interaguje s Tyr163, jeho izomer 3-Met-Butyr-APAL (žlutě) interaguje s Gln451 a Ser295.

4.2 Imobilizace aminoaldehyddehydrogenasy a její využití k detekci aldehydů v lihovinách

Pro tvorbu biosenzoru byla využita SlAMADH1, která vykazuje nejširší substrátovou specifičnost ze studovaných enzymů. S tímto enzymem byla změřena substrátová specifičnost vzhledem k aldehydům vyskytujícím se v lihovinách. Jako substráty byly testovány i samotné vzorky lihovin. SlAMADH1 byla následně imobilizovaná na superparamagnetické nanočástice z maghemitu a tyto nanočástice byly využity pro tvorbu biosenzoru použitelného k detekci aldehydů v lihovinách. K verifikaci výsledků získaných při měření bylo použito vysoce účinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s předchozí derivatizací vzorků 2,4-dinitrofenylhydrazinem.

4.2.1 Měření s volným enzymem

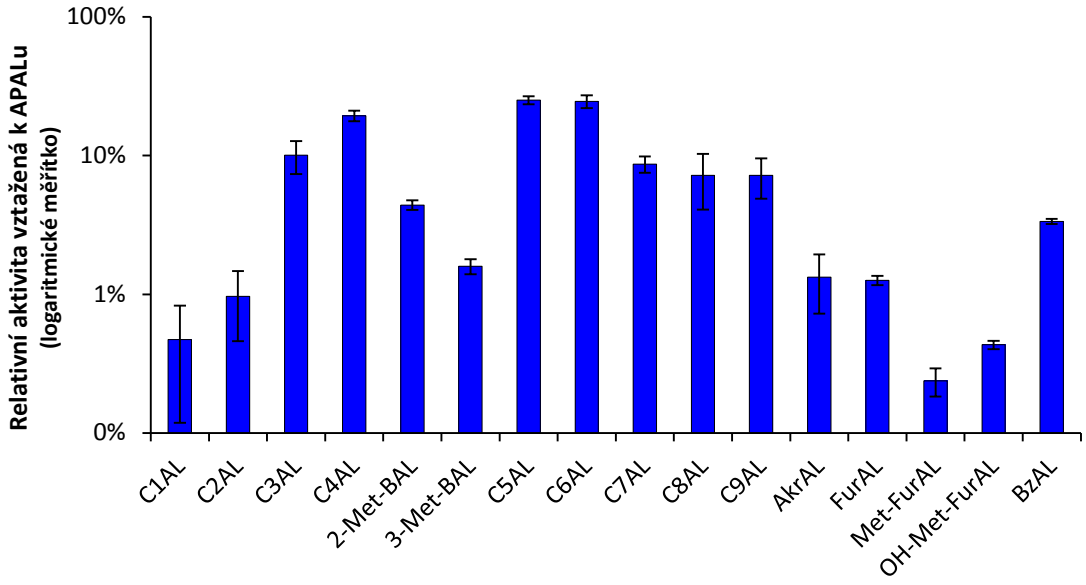
V lihovinách se nejčastěji vyskytuje acetaldedhyd, který dosahuje i milimolárních koncentrací. Rovněž další alifatické aldehydy, FurAL a jeho deriváty, BzAL či AkrAL se objevují v různých druzích lihovin (Nascimeto et al., 1997, Plutowska et al., 2010, Cortés et al., 2011 a další) (Obr. 22). Proto byla změřena substrátová specifičnost SlAMADH1 vůči těmto aldehydům.



Obr. 22: Aldehydy, jejichž přítomnost v lihovinách byla publikována nejčastěji.

Z lineárních alifatických aldehydů je nejlepším substrátem SlAMADH1 C_5AL, kde aktivita SlAMADH1 pro oxidaci substrátu o koncetraci 1,0 mmol·l^{-1} dosahuje 25 % aktivity při oxidaci APALu o stejné koncentraci. Téměř shodná relativní aktivita byla získána pro C_6AL (Obr. 23). V případě aldehydů s kratším alifatickým řetězcem realtivní aktivita při poklesu počtu uhlíků prudce klesá. Zatímco C_4AL je oxidován rychlostí odpovídající 19 % rychlosti oxidace APALu, C_3AL dosahuje reakční rychlosti odpovídající 10 %, C_2AL 1 % a C_1AL pouze 0,5 % rychlosti oxidace APALu. V případě aldehydů s delším řetězcem rovněž dochází k velkému poklesu oproti C_5ALu a C_6ALu, ale rozdíl mezi jednotlivými následujícími aldehydy (C_7AL, C_8AL a C_9AL) není až tak výrazný – relativní aktivita se pohybuje kolem 8 %. Větvené izomery C_5ALu jsou z hlediska

relativní aktivity horšími substráty než linární aldehyd, přičemž 2-Met-BAL (4,4 %) je lepším substrátem než 3-Met-BAL (1,6 %).



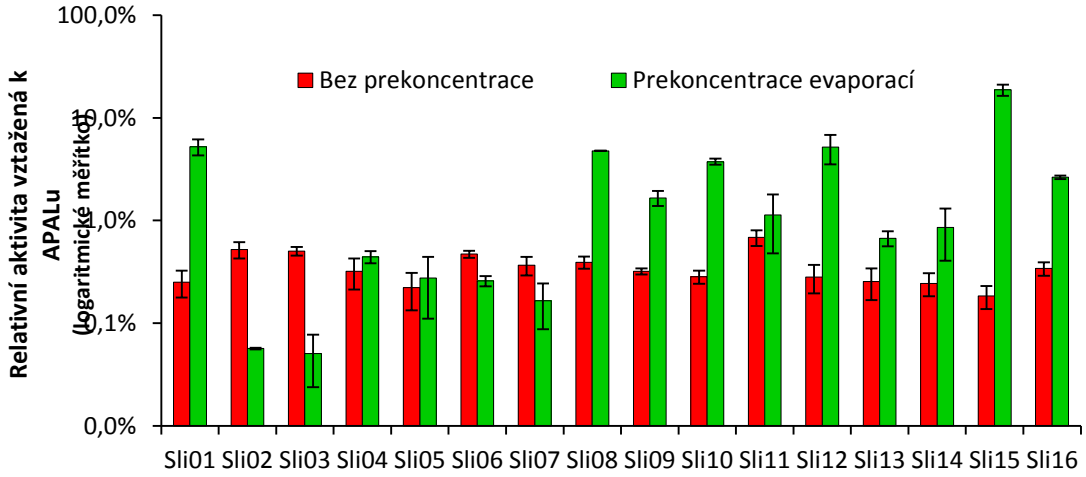
Obr. 23: Aldehydy vyskytující se dle literatury v lihovinách byly testovány jako substráty SlAMADH1 při [S] = 1.0 mmol·l^{-1} a saturační koncentraci koenzymu NAD^{+} 0,5 mmol·l^{-1}.

Mimo nasycené alifatické aldehydy byl testován i AkrAL a čtyři aromatické aldehydy – BzAL, FurAL a jeho deriváty Met-FurAL a OH-Met-FurAL. Rovněž tyto aldehydy jsou substráty SlAMADH1. Nejvyšší relativní aktivita byla pozorována v případě BzAL (3,4 %). Z heterocyklických aldehydů obsahujících jako heteroatom kyslík je nejlepším substrátem FurAL (1,3 %). Oba jeho deriváty jsou výrazně horšími substráty, přičemž OH-Met-FurAL hodnotou relativní rychlosti převyšuje Met-FurAL. Rovněž AkrAL je vcelku slabým substrátem SlAMADH1 s relativní aktivitou odpovídající přibližně 1,3 % aktivity oxidace APALu (Obr. 23).

Pro měření s reálnými vzorky bylo získáno šestnáct domácích slivovic z různých zdrojů. Tyto vzorky byly testovány jako substráty SlAMADH1 při přídavku 50 µl do reakční směsi (celkový objem 2 ml). Díky své široké substrátové specifičnosti je SlAMADH1 schopna oxidovat za zmíněných podmíneé komponenty všech testovaných vzorků lihovin. Relativní aktivita SlAMADH1 při oxidaci jednotlivých vzorků však je velmi malá, dosahuje jen 0,1 až 0,8 % aktivity při oxidaci 1mM APALu (Obr. 24). Vzhledem k nízké relativní aktivitě SlAMADH1 při oxidaci C_2ALu (Obr. 23) je tento výsledek očekávatelný.

Protože relativní aktivita SlAMADH1 při oxidaci aldehydů obsažených v jednotlivích vzorcích lihovin byla nízká, byl objem jednotlivých lihovin snížen na přibližně dvě procenta původního objemu odpařením na vakuovém koncentrátoru. Takto odpařené vzorky, kde lze očekávat vyšší koncentraci aldehydů, byly opětovně testovány jako substráty SlAMADH1 při

přídavku 20 µl do reakční směsi. Výsledky se mezi jednotlivými vzorky lišily daleko více než v případě nezakoncentorvaných lihovin (Obr. 24). Zatímco v případě vzorků č. 1, 8, 9, 10 a 12 až 16 je aktivita SlAMADH1 při jejich oxidaci několikanásobně vyšší, vzorky č. 2, 3, 6 a 7 jsou po zakoncentrování oxidovány výrazně pomaleji. Rozdíl v rychlosti oxidace nezakoncentrovaných a koncentrovaných vzorků č. 4, 5 a 11 nebyl signifikantní. Největší nárůst relativní reakční rychlosti byl zaznamenán u vzorku č. 15, kde byla reakční rychlost vyšší přibližně o dva řády. Naproti tomu největší pokles relativní reakční rychlosti nastal v případě vzorků č. 2 a 3, kde došlo k oxidaci zakoncentrovaného vzorku rychlostí odpovídající přibližně desetině rychlosti oxidace původního vzorku. Tyto rozdíly jsou pochopitelně dány složením aldehydů.



Obr. 24: Vzorky lihovin byly testovány jako substráty SlAMADH1 při saturační koncentraci koenzymu NAD^+ 0,5 mmol·l^{-1}. Do reakční směsi o celkovém objemu 2 ml bylo přidáno 50µl vzorku lihoviny bez jakékoliv prekoncentrace (červeně) nebo 20 µl vzorku, jehož objem byl evaporací ve vakuu snížen na 2 % původního objemu.

4.2.2 Imobilizace enzymu a tvorba biosenzoru

Při imobilizaci SlAMADH1 na povrchovově aktivní nanočástice z maghemitu (Magro et al., 2012) bylo zachyceno přibližně 32,5 µg enzymu na 1 mg nanočástic, což odpovída navázání čtyř molekul na jednu nanočástici. Navázáním enzymu na nanočástice poklesla jeho specifická aktivita měřená vzhledem k APALu o počáteční koncentraci 1,0 mmol·l^{-1} z 59 nkat·mg^{-1} na přibližně 5,7 nkat·mg^{-1}.

Rovněž oba základní kinetické parametry imobilizovaného enzymu jsou horší než v případě enzymu volného. Afinita imobilizované SlAMADH1 vzhledem k APALu je tedy výrazně nižší než afinita volného enzymu. Hodnota K_m vzrostla ze 41 µmol·l^{-1} pro volný enzym na 180 µmol·l^{-1} v případě imobilizovaného enzymu. Současně je limitní rychlost imobilizovaného enzymu daleko nižší než v případě volného enzymu. Katalytická konstanta poklesla z 4,57 s^{-1}

pro volný enzym na 0,5 s^{-1} u imobilizované SlAMADH1. Poměr k_{cat}/K_m tudíž poklesl na přibližně 1/40 hodnoty volného enzymu (Tab. 11). Na druhou stranu je takto imobilizovaný enzym stabilní a při promývání jeho aktivita neklesá. Podobně je možné jej skladovat ve zmíněném pufru (Tris-HCl, pH 8,5 s přídavkem KCl) minimálně 6 měsíců bez vlivu na aktivitu SlAMADH1.

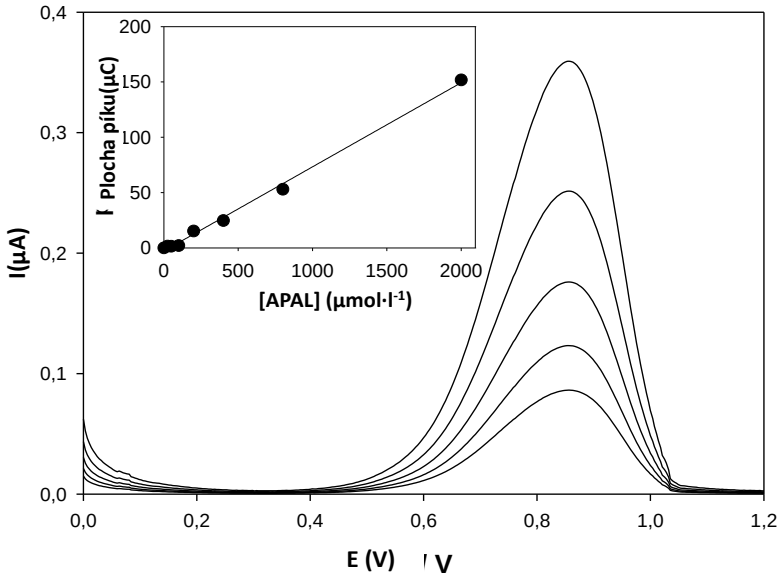
Tab. 11: Porovnání kinetických parametrů SlAMADH1 v případě práce s enzymem, který se nachází volně v roztoku, a s enzymem imobilizovaným na nanočástice z maghemitu. Měřeno při saturační koncentraci koenzymu NAD^+ 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$.

	K_m ($\mu mol \cdot l^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mmol^{-1} \cdot l$)
Volný enzym	41,1	4,57	111,2
Imobilizovaný enzym	180	0,500	2,78

Biosenzor sestavený dle schématu uvedeného v části 3.4 (Obr. 9)byl využit a kalibrován pro měření lineární voltametrií. Po přídavku APALu do cely obsahující modifikované nanočástice a proběhnutí reakce byl aplikován lineární nárust potenciálu mezi pracovní a Ag/AgCl elektrodou z 0 na +1,2 V při rychlosti 2 $mV \cdot s^{-1}$. NADH vzniklý enzymovou reakcí byl coulometricky detekován a jeho koncentrace stanovena v závislosti na ploše vzniklého píku (vrchol přibližně při 800 mV). Detekční limit byl stanoven na 25 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a citlivost měření na 0,075 ± 0,0017 $\mu C \cdot \mu mol^{-1} \cdot l$. Při měření reprodukovatelnosti pro koncentraci 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ byla při třech samostatných měřeních dosažena relativní odchylka hluboko pod 10 % (Obr. 25).

Po kalibraci bylo přistoupeno k měření koncentrace aldehydů ve vzorcích slivovic. Průměrná koncentrace aldehydů ve slivovicích byla stanovena na 1,4 $mmol \cdot l^{-1}$. Vzhledem k charakteru biosenzoru, který je založen na široce specifickém enzymu, je možné s jeho pomocí stanovit pouze celkovou koncentraci aldehydů a nikoliv podíl jednotlivých aldehydů v měřených vzorcích.

Sestrojený biosenzor nevyžaduje žádnou předúpravu vzorku, a tak zde nejsou zvýšené nároky na odbornost obsluhy. Imobilizace na nanočástice v suspenzi vytváří velký povrch aktivních mist, a tak je garantován průběh reakce v difúzním režimu. Ve srovnání s dalšími metodami instrumentální analýzy je tento biosenzor nejen uživatelsky, ale i cenově nenáročný, jelikož nevyžaduje vysoký stupeň instrumentace.



Obr. 25: Voltametrická kalibrace biosenzoru (Obr. 9) měřená po přídavku APALu do elektrochemické cely a proběhnutí chemické reakce.

4.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – srovnávací měření

Podkapitola 4.2.3 (str. 61-64) bude zveřejněna v průběhu září 2015.

Podkapitola 4.2.3 (str. 61-64) bude zveřejněna v průběhu září 2015.

Podkapitola 4.2.3 (str. 61-64) bude zveřejněna v průběhu září 2015.

Podkapitola 4.2.3 (str. 61-64) bude zveřejněna v průběhu září 2015.

5 Závěr

Rostlinné AMADH se vyznačují velmi širokou substrátovou specifičností. Mezi jejich substráty patří i heterocyklické aldehydy s obsahem dusíku, benzaldehyd a jeho bromderiváty, *N*-acylované aminoaldehydy, alifatické aldehydy či furfural a jeho deriváty. V lihovinách se velmi často nachází právě alifatické aldehydy a deriváty furfuralu, a tak je možné využít AMADH k jejich detekci. Imobilizovaná SlAMADH1 byla použita k tvorbě biosenzoru s potřebou jen malého množství vzorku pro detekci aldehydů.

Všechny čtyři studované isoenzymy AMADH oxidují řadu aromatických heterocyklických aldehydů, jejichž heteroatomem je dusík. Nejširší substrátovou specifičnost z těchto enzymů vykazuje SlAMADH1. Zatímco PsAMADH1 a 2 jsou z hlediska substrátové specifičnosti vyrovnané, SlAMADH2 oxiduje nejmeší díl ze studovaných heterocyklických aldehydů. Pyridinkarbaldehydy jsou dobrými substráty SlAMADH1, slabými substráty obou PsAMADH a nejsou substráty SlAMADH2. V případě halogenderivátů 4-pyridinkarbaldehydu a benzaldehydu je schopnost enzymu přijmout daný aldehyd za svůj substrát ovlivněna mnohem více pozicí substituce než konkrétním halovým atomem. Substituce ve vicinální poloze vzhledem ke karbaldehydové skupině vyřazuje daný aldehyd ze seznamu substrátů **AMADH.**

Pyridinylpropanaly jsou vesměs dobrými substráty všech AMADH. Oxidace pyridinylmethylaminoaldehydů závisí v mnohem větší míře na délce aminoaldehydu než na pozici napojení řetězce na pyridinový kruh. Zatímco PMet-ABALy jsou dobrými substráty všech čtyř AMADH, PMet-APALy jsou substráty jen SlAMADH1, která je oxiduje pomaleji než odpovídající deriváty ABALu. Pyrimidin-6-ylaminoaldehydy, 9*H*-puriny-6-ylaminoaldehydy a 7*H*-pyrrolo[2.3-d]pyrimidin-4-ylaminoaldehydy byl oxidovány vesměs jen SlAMADH1.

Oba hrachové isoenzymy AMADH katalyzují oxidaci všech testovaných *N*-acylovaných-*ω*-aminoaldehydů. Kvalita substrátu je daleko více ovlivněna délkou základního uhlíkového řetězce aminoaldehydu než délkou či větvením acylového řetězce navázaného na dusík základního aminoaldehydu. Deriváty APALu jsou daleko lepším substrátem obou PsAMADH než příslušné deriváty ABALu. Deriváty s větveným acylovým řetězcem jsou většinou lepšími substráty než jejich lineární izomery. Skutečnost, že PsAMADH2 katalyzuje velmi dobře oxidaci Adip-APALu, naznačuje schopnost AMADH katalyzovat i oxidaci aldehydů, které na svém řetězci nesou záporný náboj. Jedná se o první experiment ukazující schopnost rostlinných AMADH katalyzovat oxidaci aldehydů nesoucích na svém řetězci záporný náboj. Vytváří se tak příslib zajímavých výsledku v nedaleké budoucnosti.

Alifatické aldehydy, Fur-AL a jeho deriváty, BzAL a AkrAL jakožto nejčastější zástupci aldehydů nacházející se v lihovinách jsou substráty SlAMADH1, která má ze studovaných enzymů nejširší substrátovou specifičnost. To umožňuje využití zmíněného enzymu k tvorbě biosenzoru určeného pro detekci aldehydů v lihovinách. Komponenty analyzovaných vzorků lihovin byly shledány substráty SlAMADH1. Při imobilizaci SlAMADH1 na nanočástice z maghemitu byla aktivita enzymu zachována v dostatečné míře pro použití při tvorbě biosenzoru. Při přípravě jeho elektrochemické cely bylo s úspěchem využito elektrody z uhlíkové pasty obsahující nemodifikované nanočástice z maghemitu. Koloidní suspenze nanočástic s imobilizovanou SlAMADH1 v elektrochemické cele katalyzovala kompletní oxidaci obsažených aldehydů za vzniku odpovídajícího množství NADH, které bylo daném prostředí coulometricky detekováno s využitím zmíněné elektrody. Výsledky dosažené při stanovení celkové koncentrace aldehydů v jednotlivých vzorcích pomocí biosenzoru i referenční metody (HPLC na reverzní fázi s předchozí derivatizací DNPH) jsou ve vzájemném souladu. Je však nutno zmínit, že biosenzor může poskytnout informaci jen o celkové koncentraci aldehydů ve vzorku a nikoliv o koncetraci jednotlivých aldehydů.

Použitá literatura

Aberle N. S., Burd L., Zhao B. H., Ren J. (2004) Acetaldehyde-induced cardiac contractile dysfunction may be alleviated by vitamin B1 but not by vitamins B6 or B12. *Alcohol &Alcoholism* **39**, 450-454, DOI: 0.1093/alcalc/agh085

Abraham K., Andres S., Palavinskas R, Berg K, Appel K. E. (2011) Toxicology and risk assessment of acrolein in food. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 1277–1290, DOI: 10.1002/mnfr.201100481

Alcarde A. R., de Souza P. A., de Souza Belluco A. E. (2011) Chemical profile of sugarcane spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **31**, 355-360, DOI: 10.1590/S0101-20612011000200012

Alen C. F. H. (1930) The identification of carbonyl compounds by use of 2,4-dinitrophenykhydrazine. *J. Am. Chem. Soc.* **52**, 2955-2959, DOI: 10.1021/ja01370a058

Ando T., Yamawaki J. (1979) Pottasium fluoride on celite. A versatitle reagent for C-, N-, O- and S- alkylations. *Chem Lett.* **1**, 45-46, DOI: 10.1246/cl.1979.45

Angelini R., Federico R., Bonfante P. (1995) Maize polyamine oxidase: antibody production and ultrastructural localization. *J. Plant. Physiol.* **145**, 686-692 DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81282-4

Arakawa K., Takabe T., Sugiyama T., Akazawa T. (1987) Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J. Biochem.* **101**, 1485-1488

Arakawa N., Igarashi M., Kazuoka T., Oikawa T., Soda T. (2003) D-Arginase of *Arthrobacter* sp. KUJ8602: characterization and its identity with Zn^{2+}-guanidinobutyrase. *J. Biochem.* **133**, 33-42, DOI: 10.1093/jb/mvg016

Ascenzi P., Fasano P., Marino M., Venturini G., Federico R. (2002) Agmatine oxidation by copper amine oxidase: Biosynthesis and biochemical characterization of N-amidino-2-hydroxypyrrolidine. *Eur. J. Biochem.* **269**, 884-892, DOI: 10.1046/j.0014-2956.2002.02718.x

Austin J., Dosanjh M. K., Fraenkel-Conrat H. (1993) Further studies of the mixed acetals of nucleosides. *Biochimie* **75**, 511-515, DOI: 10.1016/0300-9084(93)90055-W

Awal H. M. A., Hirasawa E. (1995) 1,3-diaminopropane is a suicide substrate for pea diamine oxidase. *Phytochemistry* **39**, 489-490, DOI: 10.1016/0031-9422(95)00003-P

Awal H. M. A., Kinoshita T., Yoshida I., Doe M., Hirasawa E. (1997) Aminoaldehyde dehydrogenase of pea epicotyls. *Phytochemistry.* **44**, 997-1000, DOI: 10.1016/S0031-9422(96)00678-4

Bagni N., Tassoni A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**, 301-317, DOI: 10.1007/s007260170046

Barka T., Ornstein L. (1960) Some observations of the reaction of schiff reagent with aldehydes. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 208-213, DOI: 10.1177/8.3.208

Belluzi J. D., Wang R., Leslie F. M. (2005) Acetaldehyde enhances acquisition of nicotine self-administration in adolescent rats. *Neuropsychopharmacol.* **30**, 705-712, DOI: 10.1038/sj.npp.1300586

Bernheim F. (1928) The aldehyde oxidase of the potato. *Biochem J.* **22**, 344-352

Binda C., Coda A., Angelini R., Federico R., Ascenzi P., Mattevi A. (1999) A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Struct. Fold. Des.* **7**, 265-276, DOI: 10.1016/S0969-2126(99)80037-9

Booth V. H. (1938) The xanthin oxidase – aldehyde systém. *Biochem. J.* **32**, 503-507

Borrell A., Culiaííez-Macia F. A., Altabella T., Besford R. T., FloresD., Tiburcio A. F. (1995) Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiol.* **109**, 771-776, DOI: 10.1104/pp.109.3.771

Bors W., Langebarteis C., Michel C., Sandermann H. (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry* **28**, 1589–1595, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)97805-1

Bortoletto A. M., Alcarde A. R. (2013) Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. *Food Chem.* **139**, 695-701, DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.12.053

Bouché N. Fromm H. (2004) GABA in palnts: just a metobolite? *Trends Plant Sci.* **9**, 110-115, DOI: 10.1016/ j.tplants.2004.01.006

Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and enviromental chalenges: recent development. *Plant Sci.* **140**, 103-125, DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00218-0

Bown A. W., MacGregor K. B., Shelp B. J. (2006) Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests? *Trends Plant Sci.* **11**, 424-427, DOI: 10.1016/j.tplants.2006.07.002

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 fragnance in rice. *Plant Mol. Biol.* **68**, 439-449, DOI: 10.1007/s11103-008-9381-x

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 superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* **237**, 189-210, DOI: 10.1007/s00425-012-1749-0

Brouquisse R., Weigel P., Rhodes D., Youcum C. F., Hanson A. D. (1989) Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiol.* **90**, 322-329, DOI: 10.1104/pp.90.1.322

Bunsupaa S., Katayamaa, K. Ikeuraa E., Oikawab A., Toyookab K, Saitoa K., Yamazakia M. (2012) Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in *Leguminosae*. *Plant Cell*. **24**, 1202-1216, DOI: 10.1105/tpc.112.095885

Burnet M., Lafontaine P. J., Hanson A. D. (1995) Assay, purifixation, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant Physiol.* **108**, 581-588, DOI: 10.1104/pp.108.2.581

Busch K. B., Fromm H. (1999) Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant Physiol.* **121**, 589-597, DOI: 10.1104/pp.121.2.589

Buttery R. G., Ling L. C., Juliano B. O., Turnbaugh J. G. (1983) Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline*. J. Agric. Food. Chem.* **31**:, 823–826. DOI: 10.1021/jf00118a036Cabaroglu T., Yilmaztekin M. (2011) Methanol and major volatile compounds of Turkish raki and effect of distillate source. *J. Inst. Brew.* **117**, 98-105, DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00449.x

Cánovas M., Bernal V., Sevilla A., Iborra J. L. (2007) Salt stress effects on the central and carnitine metabolisms of Escherichia coli. *Biotechnol. Bioeng.* **96**, 722-737, DOI: 10.1002/bit.21128

Callewaert D. M., Rosemblatt M. S., Tchen T. T. (1974a) Purification and properties of 3-aminopropanal dehydrogenase from a *Pseudomonas* species. *Biochem.* **13**, 4181-4184, DOI: 10.102/bi0717a018

Callewaert D. M., Rosemblatt M. S., Tchen T. T. (1974b) Purification and properties of 4-aminobutanal dehydrogenase from *Pseudomonas* species. *J. Biol. Chem.* **249**, 1737-1741

Campo M. L., Fuentes J. M., Soler G. (1992) An arginine regulated gamma-guanidobutyrate ureahydrolase from tench liver (*Tinca tinca* L.). *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* **100**, 55-60, DOI: 10.3109/13813459209035259

Case D. A., Cheatham T. E., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K. M., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R. J. (2005) The amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668–1688, DOI: 10.1002/jcc.20290

Chaudhuri M. M., Ghosh B. (1984) Purification and characterization of diamine oxidase from rice embryos. *Phytochemistry* **23**, 241-243, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80310-6

Chaves A. C. S. D., Ruas-Madiedo P., Starrenburg M., Hugenholtz J., Lerayer A. L. S. (2003) Impact of engineered *Streptococcus thermophilus* trains overexpressing gly a gene on folic acid and acetaldehyde production in fermented milk. *Braz. J. Microbiol.* **34**, 114-117, DOI: 10.1590/S1517-83822003000500039

Chen W. P., Li T. H., Chen P. H. H. (2000) Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environ.* **23**, 609-618, DOI: 10.1046/j.1365-3040.2000.00570.x

Chi Y., Feng Y., Wen S., Lü H., Yu Z., Zhang W., Sheng G., Fu. (2007) Determination of carbonyl compounds in the atmosphere by DNPH derivatization and LC–ESI-MS/MS detection. *Talanta* **72**, 539-545, DOI: 10.1016/j.talanta.2006.11.018

Clemente-Jimenez J. M., Mingorance-Cazorla L., Martı´nez-Rodrı´guez S., Las Heras-Vázquez F. J., Rodríguez-Vico F. (2005) Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **98**, 301-308, DOI: 10.1016/j.ijfoodchem.2004.06.007

Cona A., Moreno S., Cenci F., Federico R., Angelini R. (2005) Cellular re-distribution of flavin-containing polyamine oxidase in differentiating root and mesocotyl of *Zea mays* L. seedlings. *Planta* **221**, 265-276, DOI: 10.1007/s00425-004-1435-y

Cooper J. R., Marchezi V. T. (1959) The possible biochemical lesion in blindness due to methanol poisoning. *Biochem. Pharmacol.* **2**, 313-315, DOI: 10.1016/0006-2952(59)90046-2

Cordis G. A., Manlik N., Bagchi D., Engelman R. M., Das D. K. (1993) Estimation of the extent of lipid peroxidation in the ischemic and reperfused heart by monitoring lipid metabolic products

with the aid of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **632**, 97-103, DOI: 10.1016/0021-9673(93)80031-3

Correa M., Salamone J. D., Segovia K. N., Pardo M., Longoni R., Spina L., Peana A. T., Vinci S., Acquas E. (2012) Piecing together the puzzle of acetaldehyde as a neuroactive agent. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **36**, 404-430, DOI: 10.1016/j.neurobiorev.2011.07.009

Cortés S., Saldago J. M., Rodrígues R., Domínguez J. M. (2010) The storage of grape marc: Limiting factor in the quality of the distillate. *Food Cont.* **21**, 1545-1549, DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.04.029

Cortés S., Rodrígues R., Saldago J. M., Domínguez J. M. (2011) Comparative study between Italian and Spanish grape marc spirits in terms of major volatile compounds. *Food Cont.* **22**, 673-680, DOI: 10.1016/j.foodcont.23010.09.006

Delfini C., Gaia P., Bardi L., Mariscalco G., Contiero M., Pagliara A. (1991) Production of benzaldehyde, benzyl alcohol and benzoic acid by yeasts and *Botrytis cinerea* isolated from grape musts and wines. *Vitis* **30**, 253-263

Deng Y., Boomsma F., Yu P. H. (1998) Deamination of methylamine and aminoacetone increases aldehydes and oxidative stress in rats. *Life Sci.* **63**, 2049-2058, DOI: 10.1016/S0024-3205(99)80001-0

Díaz-Sánchez A. G., González-Segura L., Mújica-Jiménez C., Rudiño-Piñera E., Montiel C., Martínez-Castilla L. P., Muñoz-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, DOI: 10.1104/pp.112.194514

Edwards R., Dixon R. A. (1991) Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: Caffeic acid 3-O-methyltransferase from suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **287**, 372-379, DOI: 10.1016/0003-9861(91)90492-2

Eisenreichová E., Haladová M., Bučková A., Tomko J., Uhrína D., Ubik K. (1992) A pyrroline-pyrrolidine alkaloid from lilium candidum bulbs. *Phytochemistry* **31**, 1084-1085, DOI: 10.1016/0031-9422(92)80088-V

Erdei L., Szegletes Z., Barabas K., Pestenacz A. (1996) Response in polyamine titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings, *J. Plant Physiol.* **147**, 599-603, DOI: 10.1016/S0176-1617(96)80052-6

Eriksson C. J. P. (2001) The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (Update 2000). *Alcohol.: Clin. Exp. Res.* **25**, 15S-32S, DOI: 10.1111/j.1530-0277.2001.tb02369.x

Esterbauer H., Cheeseman K. H., Dianzani M. U., Polis G., Slater T. F. (1982) Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe2+ in rat liver microsomes. *Biochem. J.* **208**, 129-140

Fadel H. H. M., Farouk A., (2002) Caramelization of maltose solution in presence of alanine. *Amino Acids* **22**, 199-213, DOI: 10.1007/s007260200008

Federico R., Ercolini R., Laurenzi M., Angelini R. (1996) Oxidation of acetylpolyamines by maize polyamine oxidase. *Phytochemistry* **43**, 339-341, DOI: 10.1016/0031-9422(96)00316-0

Feng Z., Hu W., Hu Y., Tang M. (2006) Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 15404-15409, DOI: 10.1073/pnas.0607031103

Figueroa-Soto C. G., Valenzuela-Soto E. M. (2001) Purification of a heterodimeric betaine aldehyde dehydrogenase from wild amaranth plants subjected to water deficit. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* **285**, 1052-1058, DOI: 10.1006/bbrc.2001.5286

Fjällström P., Andersson B., Nilsson C., Andersson K. (2002) Drying of linseed oil paints: a laboratory study of aldehyde emissions. *Industr. Crops Products* **16**, 173-184, DOI: 10.1016/S0926-6690(02)00035-3

Flores H. E., Filner P. (1985) Polyamine catabolism in higher plants: Characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Reg.* **3**, 277-291, DOI: 10.1007/BF00117586

Floris G., Giartosio A., Rinaldi A. (1983) Diamine oxidase from Lens esculenta seedlings: purification and properties. *Phytochemistry* **22**, 1871-1874, DOI: 10.1016/0031-9422(83)80004-1

Fraenkel-Conrat H., Singre B. (1988) Nucleoside adducts are formed by cooperative reaction of acetaldehyde and alcohols: possible mechanism for the role of ethanol in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3758-3761, DOI: 10.1073/pnas.85.11.3758

Frébort I., Adachi O. (1995) Copper/quinone-containing amine oxidases, an exciting class of ubiquitous enzymes. *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 625-632, DOI: 10.1016/0922-338X(96)87746-4

Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery J. A. Jr., Vreven T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A, Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M.W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A. (2004) Gaussian 03, Revision C.02. Gaussian Inc, Wallingford

Geisler J. G., Gross G. G. (1990) The biosynthesis of piperine in *Piper nigrum*. *Phytochemistry* **29**, 489-492, DOI: 10.1016/0031-9422(90)85102-L Genovese A., Gambuti A., Piombino P., Molo L. (2007) Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chem.* **103**, 1228-1236, DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.10.027

González-Segura L., Rudiño-Piñera E., Muñoz-Clares R. A., Horjales E. (2009). The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2′-phosphate of $NADP^+$ and a novel cation binding site. *J. Mol. Biol.* **385**, 542–557, DOI: 10.1016/j.jmb.2008.10.082

Green J.A., Parr W. V., Breimeyer J., Valentin D., Sherlock R. (2011) Sensory and chemical characterisation of Sauvignon blanc wine: Influence of source of origin. *Food Res. Intern.* **44**, 2788-2797, DOI: 10.1016/j.foodres.2011.06.005

Greene R. C. (1962) Biosynthesis of dimethyl-β-propiothetin. *J. Biol. Chem.* **237**, 2251-2254

Gupta K., Dey A., Gupta B. (2013) Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiol. Plant.* **35**, 2015-2036, DOI: 10.1007/s11738-013-1239-4

Haisman D. R., Knight D. J. (1967), The enzymic hydrolysis of amygdalin. *Biochem. J.* **108**, 528-534

Hamana K., Matsuzaki S. (1992) Polyamines as a chemotaxonomic marker in bacterial systematice. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 261-283, DOI: 10.3109/10408419209113518

Hamana K., Niitsu M., Samejima K. (1998) Unusual polyamines in aquatic plants: the occurrence of homospermidine, norspermidine, thermospermine, norspermine, aminopropylhomospermidine, bis(aminopropyl)ethanediamine, and methylspermidine. *Can. J. Bot.* **76**: 130-133, DOI: 10.1139/b97-175

Hanson A. D., May A. M., Grumet R., Bode J., Jamieson G. C., Rhodes D. (1985) Betaine synthesis in chenopods: Localization in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3678-3682, DOI: 10.1073/pnas.82.11.3678

Hanson A. D., Rathinatasabapathi B., Chamberlin B., Gage D. A. (1991) Comparative physiological evidence that β-alanine betaine and choline-O-sulfate act as compatible osmolytes in halophytic *Limonium* species. *Plant Physiol.* **97**, 1199-1205, DOI: 10.1104/pp.97.3.1199

Hanson A. D., Rathinatasabapathi B., Rivoal J., Burnet M., Dillon M. O., Gages D. A. (1994a) Osmoprotective compounds in the *Plumbaginaceae*: A natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 306-310, DOI: 10.1073/pnas.91.1.306

Hanson A. D., Rivoal J., Paquet L., Cage D. A. (1994b) Biosynthesis of 3-dimethylsulfoniopropionate in *Wollastonia biflora* (L) DC. Evidence that S-methylmethionine is an intermediate. *Plant Physiol.* **105**, 103-110, DOI: 10.1104/pp.105.1.103

Hashimoto T., Mitani A., Yamada Y (1990) Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger* – Its function in tropane alkaloid biosynthesis. *Plant Physiol.* **93**, 216-221, DOI: 10.1104/pp.93.1.216

Hauptmann M., Lubin J. H., Stewart P. A., Hayes R. B., Blair A. (2004) mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries. *AM. J. Epidem.* **159**, 1117-1130, DOI: 10.1093/aje/kwh174

Heim W. G., Sykes K. A., Hildreth S. B., Sun J., Lu R.-L, Jelesko J. G (2007) Cloning and characterization of a Nicotiana tabacum methylputrescine oxidase transcript. *Phytochemistry* **68**, 454-463, DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.11.003

Hibino T., Meng Y.-L., Kawamitsu Y., Uehara N., Matsuda N., Tanaka Y., Ishikawa H., Baba S., Takabe T., Wada K., Ishii T., Takabe 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, DOI: 10.1023/A:1006497113323

Hibino T., Waditeeš R., Araki E., Ishikawa H., Aoki K., Tanaka Y., Takabe T. (2002) Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **44**, 41352-41360, DOI: 10.1074/jbc.M205965200

Hodge J. E. (1953) Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1**, 928–943, DOI: 10.1021/jf60015a004

Hulse J. D., Henderson L. V. M. (1980) Carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **255**, 1146-1151

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.* **267**, 7015-7023, DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01797.x

Jakobs B. S., Wanders R. J., (1995) Fatty acid β-oxidation in peroxisomes andmitochondria : the first, unequivocal evidence for the involvement of carnitine inshuttling propionyl-CoA from peroxisomes to mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 1035-1041, DOI: 10.1006/bbrc.1995.2232

James F., Nolte K. D., Hanson A. D. (1995a) Purification and properties of *S*-adenosyl-L-methionine:L-methionine *S*-methyltransferase from *Wollastonia biflora* leaves. *J. Biol. Chem.* **270**, 22344-22350, DOI: 10.1074/jbc.270.38.22344

James F. Paquet L., Sparace S. A., Cage D. A., Hanson A. D. (1995b) Evidence implicating dimethylsulfoniopropionaldehyde as an intermediate in dimethylsufopropionate biosynthesis. *Plant Physiol.* **108**, 1439-1448, DOI: 10.1104/pp.108.4.1439

Kenten R. H., Mann P. J. G. (1952) The oxidation of amines by extracts of pea seedlings. *Biochem. J.* **50**, 360-369

Kerner J., Hoppel C. (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell. Biol. Lipids* **1**, 1-17, DOI… 10.1016/S1388-1981(00)00044-5

Khan Q. A., Shamsi F. A., Hadi S. M. (1995) Mutagenicity of furfural in plasmid DNA. *Cancer Lett.* **89**, 95-99, DOI: 10.1016/0304-3835(95)90163-9

Kim S.-S., Galaher D. D., Csalany A. S. (1999) Lipophilic aldehydes and related carbonyl compounds in rat and human urine. *Lipids* **34**, 489-496, DOI: 10.1007/s11745-999-0389-1

Kleber H. P. (1997) Bacterial carnitine metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* **1**, 1-9

Klyosov A. A. (1996) Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenase toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. *Biochemistry* **35,** 4457-4467, DOI: 10.1021/bi9521102

Kocsis M. G., Hanson A. D. (2000) Biochemical evidence of two novel enzymes in the biosynthesis of 3-dimethylsulfoniopropionate in *Spartina alterniflora*. *Plant Physiol.* **123**, 1153-1161, DOI: 10.1104/pp.123.3.1153

Koivuslami E., Haatainen E., Root A. (1999) Quantitative RP-HPLC determination of some aldehydes and hydroxyaldehydes as their 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives. *Anal. Chem.* **71**, 86-91, DOI: 10.1021/ac980699f

Kölliker S., Oehme M., Dye C. (1998) Structure elucidation of 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives of carbonyl compounds in ambient air by HPLC/MS and multiple MS/MS using atmospheric chemical ionization in the negative ion mode. *Anal. Chem.* **70**, 1979-1985, DOI: 10.1021/ac9709458

Kopečný D., Tylichová M., Snégaroff J., Popelková H., Šebela M. (2011) Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω-aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *FEBS Journal* **278**, 3130-3139, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08239x

Kopečný D., Končitíková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Soural M., Šebela M., Moréra S. (2013) Plant ALDH10 family: identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *J. Biol. Chem.* **288**, 9491-9507, DOI: 10.1074/jbc.M112.443952

Kotakis C., Theodoropoulou E., Tassis K., Oustamanolakis C., Ioannidis N. E., Kotzabasis K. (2014) Putrescine, a fast-acting switch for tolerance against osmotic stress. *J. Plant. Physiol* **171**, 48-51, DOI: 10.1016/j.jplph.2013.09.015

Kurys G., Ambroziak W., Pietruszko R. (1989) Human aldehyde dehydrogenase - purification and characterization of a 3rd isozyme with low K_m for γ-aminobutyraldehyde. *J. Biol. Chem.* **264**, 4715-4721

Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**, 367-381, DOI 10.1007/s00425-008-0772-7

Lamberts B. L. Dewey L. J. Byerrum R. U. (1959) Ornithine as a precursor for the pyrrolidine ring of nicotine. *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 22-6. DOI: 10.1016/0006-3002(59)90492-5

Ledauphin J., Le Milbeau C., Barillier D., Henequin D. (2010) Differences in the volatile compositions of French labeled brandies (armagnac, calvados, cognac, and mirabelle) using GC-MS and PLS-DA. *J. Agric. Food. Chem.* **58**, 7782-7793, DOI: 10.1021/jf9045667

Lerma C., Hanson A. D., Rhodes D. (1988) Oxygen-18 and deuterium labeling studies of choline oxidation by spinach and sugar beet. *Plant Physiol.* **88**, 695-702, DOI: 10.1104/pp.88.3.695

Leroy D., Heriche J. K., Filhol O., Chambaz E. M., Cochet C. (1997) Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme - A proposed role for the kinase stimulation. *J. Biol. Chem.* **272**, 20820-20828, DOI: 10.1074/jbc.272.33.20820

Li W., Yuan X.-M., Ivanova S., Tracey K. J., Eaton J. W., Brunk U. T. (2003) 3-Aminopropanal, formed during cerebral ischemia, is a potent lysomotropic neurotoxin. *Biochem. J.* **371**, 429-436, DOI: 10.1042/BJ20021520

Lindstedt S., Nordin I. (1984) Multiple forms of y-butyrobetaine hydroxylase (EC 1.14.11.1). *Biochem J.* **223**, 119-127

Livingstone J. R., Yoshida I., Tarui Y., Hirooka K., Yamamoto Y., Tsutui N., Hirasawa E (2002) Purification and properties of aminoaldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *J. Plant Res.* **115**, 339-400, DOI: 10.1007/s10265-002-0051-9

Livingstone J. R., Maruo T., Yoshida I., Tarui Y., Hirooka K., Yamamoto Y., Tsutui N., Hirasawa E. (2003) Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *J. Plant Res.* **116**, 133-140, DOI: 10.1007/s10265-003-0077-7

Liy S. M., Zhou X., Kochian L. V., Li L. (2007) Biochemical and molecular characterization of homocystene methyltransferase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Phytochemistry* **68**, 1112-1119, DOI: 10.1016/phytochem.2007.02.007

Lo Coco F., Valentini C., Novelli V., Ceccon L. (1995) Liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. *Anal. Chim. Acta* **306**, 57-74, DOI: 10.1016/0003-2670(94)00675-C

Lo Coco F., Valentini C., Novelli V., Ceccon L. (1996) High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in honey. *J. Cromatogr. A* **749**, 95-102, DOI: 10.1016/0021-9673(96)00392-5

López-Vázques C., Bollaín M. H., Moser S., Orriols I. (2010) Characterization and differentiation of monovarietal grape pomace distillate from native varieties of Galicia. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9657-9665, DOI:10.1021/jf101480m

Magro M., Sinigaglia G., Nodari L., Tuček J., Poláková K., Marušák Z., Carillo Z., Salviulo G., Russo U., Stevanato R., Zbořil R., Vianello F. (2012) Charge binding of rhodamine derivative to OH^- stabilized nanomaghemite: Universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. *Acta Biomaterialia* **8**, 2068-2076, DOI: 10.1016/j.actbio.2012.02.005

Matsuda H., Suzuki Y. (1981) Purification and properties of the diamine oxidase from Vicia faba leaves. *Plant Cell Physiol.* **22**, 737-746

Matsuda H., Suzuki Y. (1984) γ-Guanidinobutyraldehyde dehydrogenase of *Vicia faba* leaves. *Plant Physiol*. **76**, 654-657, DOI: 10.1104/pp.76.3.654

Meda R., Padiglia A., Floris G. (1995) Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* **39**, 1-9, DOI: 10.1016/0031-9422(94)00756-J

Mitsuya S., Yokota Y., Fujiwara T., Mori N., Takabe T. (2009) OsBADH1 is possibly involved in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes. *FEBS Lett.* **583**, 3625-3629, DOI: 10.1016/j.febslet.2009.10.039

Miyake T., Shibamoto T. (1993) Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1968-1970, DOI: 10.1021/jf00035a028

Monfregola J., Cevenini A., Terracciano A., van Vlies N., Arbucci S., Wanders R.J., DUrso M., Vaz F.M., Ursini M.V. (2005) Functional analysis of TMLH variants and definition of domains required for catalytic activity and mitochondrial targeting *J. Cell. Physiol.* **204**, 839-847, DOI: 10.1002/jcp.20332

Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **19**, 1639-1662, DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B

Moschou N. P. Sanmarin M., Andripoilou A. H., Rojo E., Sanchez-Serano J. J., Roubelakis-Angelakis K. A. (2008) Bridging the gap between palnt and mamalian polyamine catabolism: A novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in arabidopsis. *Plant Physiol*. **147**, 1845-1857, DOI: 10.1104/pp.108.123802

Mudd S. H., Datko A. H. (1990) The S-methylmethionine cycle in Lemna paucicostata*. Plant Physiol.* **93**, 623-630, DOI: 10.1104/pp.93.2.623

Muñoz-Clares R. A., Riveros-Rosas H., Garza-Ramos G., González-Segura L., Mújica-Jiménez C., Julián-Sánchez A. (2014) Exploring the evolutionary route of the acquisition of betaine aldehyde dehydrogenase activity by plant ALDH10 enzymes: implications for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *BMC Plant Biol.* **14**, 146, DOI: 10.1186/1471-2229-14-149

Nakashima K., Hidaka Y., Yoshida T., Kurda N. (1994) High-performance liquid chromatographic determination of short-chain aliphatic aldehydes using 4-(*N*,*N*-dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescence reagent. *J. Chromatogr. B* **661**, 205-210, DOI: 10.1016/0378-4347(94)00359-9

Narayan S. V., Nair P. M. (1986) The 4-aminobutyrate shunt in *solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **25**, 997-1001, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)81543-5

Nascimetno R. F., Marques J. C., Lima Neto B. S., De Keukeleire D., Franco D. W. (1997) Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. *J. Chromatogr. A* **728**, 13-23, DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00425-1

Ohta S., Ohsawa I., Kamino K., Ando F., Shimokata H. (2004) Mitochondrial ALDH2 deficiency as an oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1011**, 36-44, DOI: 10.1196/annals.1293.004

Omura K., Swern D. (1978) Oxidation of alcohols by „activated“ dimethylsulf-oxide. A preparative, steric and mechanistic study. *Tetrahedron* **34**, 1651-1660, DOI: 10.1016/0040-4020(78)80197-5

Paci A., Rieutord A. Guillaume D., Traore F., Ropenga J., Husson H.-P. Brion F. (2000) Quantitative high-performance liquid chromatographic determination of acrolein in plasma after derivatization with Luminarin® 3. *J. Chromatogr. B.* **739**, 239-246, DOI: 10.1016/S0378-4347(99)00485-5

Paiano V., Bianchi G., Davoli E., Negri E., Fanelli R., Fattore E. (2014) Risk assessment for the Italian population of acetaldehyde in alcoholic and non-alcoholic beverages. *Food Chem.* **154**, 26-31, DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.098

Pan S.-M., Moreau R. A., Yu C., Huang A. H. C. (1981) Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase in spinach leaves. *Plant Physiol.* **67**, 1105-1108, DOI: 10.1104/pp.67.6.1105

Panicot M., Minguet E. G., Ferrando A., Alcázar R., Blázquez M. A., Carbonell J., Altabella T., Koncz C., Tiburcio A. F. (2002) A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 2539-2551, DOI: 10.1105/tpc.004077

Panoutsopoulos G. I., Kouretas D., Beedham C. (2004) Contribution of aldehyde oxidase, xanthine oxidase and aldehyde dehydrogenase on the oxidation of aromatic aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1368-1378, DOI: 10.1021/tx030059u

Panter r. A., Mudd J. B. (1969) Carnitine levels in some higher plants. *FEBS Lett.* **5**, 169-170, DOI: 10.1016/0014-5793(69)80322-4

Park J., Okita T. W., Edwards G. E. (2009) Salt tolerant mechanisms in single-cell C_4 species *Bienertia sinuspersici* and *Suaeda aralocaspica* (*Chenopodiaceae*). *Plant Sci.* **176**, 616-626, DOI: 10.1016/j.plannt.sci.2009.01.14

Park, M. H., Wolff, E. C., Folk, J. E. (1993). Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? *Trends Biochem. Sci.* **18**, 475-479, DOI: 10.1016/0968-0004(93)90010-K

Pearlman D. A., Case D. A., Caldwell J. W., Ross W. S., Cheatham T. E., Debolt S., Ferguson D., Seibel G., Kollman P. (1995) Amber, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comput. Phys. Commun.* **91**, 1-41, DOI: 10.1016/0010-4655(95)00041-D

Pegg A. E., McCann P. P. (1982) Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* **243**, C212-C221

Peng X., Shindo K., Kanoh K., Inomata Y., Choi S. K., Misawa N. (2005) Characterization of *Sphingomonas* aldehyde dehydrogenase catalyzing the conversion of various aromatic aldehydes to their carboxylic acids *Appli. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 141-150, DOI: 10.1007/s00253-005-1962-x

Perez-Miller S. J., Hurley T. D. (2003) Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **42**, 7100-7109, DOI: 10.1021/bi034182w

Pietrangeli P., Federico R., Mondovi B., Morpurgo L. (2007) Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *J. Inorg. Biochem.* **101**, 997-1004, DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2007.03.014

Pilz J., Meineke I., Gleiter C. H. (2000) Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J. Chromatogr. B* **742**, 315-325, DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00174-2

Pimenta M. J., Kaneta T., Larondelle Y., Dohmae N., Kamiya Y. (1998) *S*-Adenosyl-*L*-methionine:*L*-methionine *S*-methyltransferase from germinating barley: Purification and localization. *Plant Physiol.* **118**, 431-438, DOI: 10.1104/pp.118.2.431

Plutowska B., Biernacka P., Wardencki W. (2010) Identification of volatile compounds in raw spirits of different organoleptic quality. *J. Inst. Brew.* **116**, 433–439, DOI: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00794.x

Prokop M., Adam J., Kříž Z., Wimmerová M., Koča J. (2008) TRITON: a graphical tool for ligand-binding protein engineering. *Bioinformatics* **24**, 1955-1956, DOI**:** 10.1093/bioinformatics/btn344

Racker E. (1949) Aldehyde dehydrogenase, a diphosphopyridine nucletide-linked enzyme. *J. Biol. Chem.* **177**, 883-892

Raman S. B., Rathinasabapathi B. (2003) β-Alanine N-Methyltransferase of *Limonium latifolium*. cDNA Cloning and Functional Expression of a Novel *N*-Methyltransferase Implicated in the Synthesis of the Osmoprotectant β-Alanine Betaine. *Plant Physiol.* **132**, 1642-1651, DOI: 10.1104/pp.103.020453

Ranocha P., Bourgis F., Ziemak M. J., Rhodes D., Gage D. A., Hanson A. D. (2000) Characterization and functional expression of cDNAs encoding methionine-sensitive and -insensitive homocysteine S-methyltransferases from *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **275**, 15962-15968, DOI: 10.1074/jbc.M001116200

Rathinasabapathi B., Burnet M., Russell B. L., Gage D. A., Liao P.-C., Nye G. J., Scott P., Golbeck J. H., Hanson A. D. (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing

the first step of glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3454-3458, DOI: 10.1073/pnas.94.7.3454

Rathinasabapathi B., Fouad W. M., Sigua C. A. (2001) β-Alanine-betaine synthesis in *Plumbaginaceae*. purification and characterization of a trifunctial, S-adenosyl-L-methionine-dependent *N*-methyltransferase from *Limonium latifolium* leaves. *Plant Physiol.* **126**, 1241-1249, DOI: 10.1104/pp.126.3.1241

Rhodes D., Hanson A. D. (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Plant Physiol.* **44**, 357-384, DOI: 10.1146/annurev.pp.44.060193.002041

Rhodes D., Gage A. D., Cooper A. J. L., Hanson A. D. (1997) S-methylmethionine conversion to dimethylsulfoniopropionate: Evidence for an unusual transamination reaction. *Plant Physiol.* **115**, 1541-1548, DOI: 10.1104/pp.115.4.1541

Rippa S., Zhao Y., Merlier F., Charrier A., Perrin Y. (2012) The carnitine biosynthetic pathway in Arabidopsis thaliana shares similar features with the pathway of mammals and fungi. *Plant Physiol. Biochem.* **60**, 109-114, DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.08.001

Russell B. L., Rathinasanapathi B., Hanson A. D. (1998) Osmotic Stress Induces Expression of Choline Monooxygenase in Sugar Beet and Amaranth. *Plant Physiol.* **116**, 859-865 DOI: 10.1104/pp.116.2.859

Sandikci M., Seyrek K., Aksit H., Kose H. (2009) Inhalation of formaldehyde and xylene induces apoptotic cell death in the lung tissue. *Toxicol. Industr. Health* **25**, 455-461, DOI: 10.1177/0748233709106824

Schüttelkopf A. W., van Aalten D. M. F. (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr.* **D60**, 1355–1363, DOI: 10.1107/S0907444904011679

Seiler N. (2004) Catabolism of polyamines. *Amino acids* **26**, 217-233, DOI: 10.1007/s00726-004-0070-z

Semmelroch P., Grosch W. (1995) Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 310-313, DOI:10.1016/S0023-6438(95)94411-7

Shelp B. J., Bown A. W., McLean M. D. (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant. Sci-* **4**, 446-452, DOI: 10.1016/S1360-1385(99)01486-7

Shelp B. J., Bozzo G. G., Trobacher C. P., Zarei A., Deyman K. L., Brikis C. J. (2012) Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Sci*. **193**, 130-135, DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.06.001

Sindhu R. K., Cohen S. S. (1984) Propylamine transferases in chinese cabbage leaves. *Plant physiol.* **74**, 345-349, DOI: 10.1104/pp.74.3.645

Smiesko M., Benfenati E. (2004) Predictive Models for Aquatic Toxicity of Aldehydes Designed for Various Model Chemistries. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **44**, 976-984, DOI: 10.3109/10409239209082565

Sophos N. A., Vasiliou V. (2003) Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem. Biol. Intract.* **237**, 189-210, DOI: 10.1016/S0009-2797(02)00163-1

Stafiej A., Pyrzinska K., Ranz A., Lankmayr E. (2006) Screening and optimization of derivatization in heating block for the determination of aliphatic aldehydes by HPLC. *J. Biochem. Biophys. Methods* **69**, 15-24, DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.02.009

Steiber A., Kerner J., Hoppel C. (2004). Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Mol. Aspects Med.* **25**, 455–473, DOI: 10.1016/j.mam.2004.06.006

Steinmetz C. G., Xie P., Weiner H., Hurley T. D. (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**, 701–711, DOI: 10.1016/S0969-2126(97)00224-4

Storey R., Wyn Jones R. G. (1977) Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance. *Phytochemistry* **16**, 447-453, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)94326-7

Strijbis K., van Roermund C. W. T. Hardy G. P., van den Burg J., Bloem K., de Haan J., van Vlies N., Wanders R. J. A., Vaz F. M., Distel B. (2009) Identification and characterization of a complete carnitine biosynthesis pathway in *Candida albicans*. *FASEB J.* **23**, 2349-2359, DOI: 10.1096/fj.08-127985

Suzuki Y. (1996) Purification and characterization of diamine oxidase from *Triticum aestivum* shoots. *Phytochemistry* **42**, 291-293, DOI: 10.1016/0031-9422(95)00980-9

Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000) Characterisation of a homogenous plant aminoaldehyde dehydrogenase from pea. *Biochem. Biophys Acta* **1480**, 329-341, DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00086-8

Šebela M., Luhová l., Brauner F., Galuszka P., Radová A., Peč P. (2001a) Light microscopic localisation of aminoaldehyde dehydrogenase activity in plant tissues using nitroblue tetrazolium-based staining method. *Plant Physiol. Biochem.* **39**, 831-839, DOI: 10.1016/S0981-9428(01)01304-3

Šebela M., Radová A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001b) FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Sci.* **160**, 197-207, DOI: 10.1016/S0168-9452(00)00380-0

Tabor C. W., Tabor H., Bachrach U. (1964) Identification of aminoaldehydes produced by oxidation of spermine + spermidine with purified plasma amine oxidase. *J. Biol. Chem.* **239**, 2194-2203

Tabor H., Rosenthal S. M., Tabor C. W. (1958) The biosynthesis of spermidine and spermine from putrescine and methionine *J. Biol. Chem.* **233**, 907-914

Tago K., Kurioka S., Matsuda M., (1982) 4-Aminobutyraldehyde dehydrogenase activity in rat brain. *J. Neurochem.* **39**, 803-809, DOI: 10.1111/j.1471-4159.1982.tb07963.x

Takeda Y., Samejina K., Nagano K., Watanabe M., Sugeta H., Kyogoku Y. (1983) Determination of protonation sites in thermospermine and in some other polyamines by ^{15}N and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **130**, 383-386

Tanaka Dagger K., Nakai R., Sen K., Shimizu E., Karasawa D., Yorifuji T. (2002) Purification and characterization of aminobutyraldehyde dehydrogenase from *Arthrobacter* Sp. TMP-1. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* **6**, 171-175, DOI:10.1080/1025814021000000916

Tani Y., Mori N., Oghata K., Yamada H. (1979) Production and purification of choline oxidase from *Cylindrocarpon didymum* M-1. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 815-820

Tars K., Rumnieks J., Zeltins A., Kazaks A., Kotelovica S. (2010) Crystal structure of human gamma-butyrobetaine hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **398**, 634-639, DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.121

Tephly T. R. (1991) The toxicity of methanol. *Life Sci.* **48**, 1031-1041, DOI: 10.1016/0024-3205(91)90504-5

Tiburcio A. F., Altabella T., Borrell A., Masgrau C. (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant.* **100**, 664-667, DOI: 10.1034/j.1399-3054.1997.1000330.x

Trossat C., Nolte K. D., Hanson A. D. (1996) Evidence that the pathway of dimethylsulfoniopropionate biosynthesis begins in the cytosol and ends in the chloroplasts. *Plant Physiol.* **111**, 965-973, DOI: 10.1104/pp.111.4.965

Tylichová M., Kopečný D., Snégarof J., Šebela M. (2007) Aminoaldehyde dehydrogenases: has the time now for new interesting discoveries? *Curr. To., Plant Biol.* **8**, 45-70

Tylichová M., Briozzo P., Kopečný D., Ferrero J., Moréra S., Joly N., Snéariff J., Šebela M. (2008) Purification, cystalization and preliminary crystalografic study of a recombinant plant aminoaldehyde dehydrogenace from *Pisum sativum*. *Acta cryst.* **F64**, 88-90, DOI: 10.1107/S1744309107068522

Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010) Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *J. Mol. Biol.* **396**, 870-882, DOI: 10.1016/j.jmb.2009.12.015

Uchiyama S., Ando M., Aoyagi S. (2003) Isomerization of aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives and validation of high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A* **996**, 95-102, DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00542-9

Uchiyama S., Inaba Y., Matsumoto M. (2009) Reductive amination of aldehyde 2,4-dinitorophenylhydrazones using 2-picoline borane and high-performance liquid chromatographic analysis. *Anal. Chem.* **81**, 485-489, DOI: 10.1021/ac802163y

Uchiyama S., Inaba Y., Kunugita N. (2011) Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **879**, 1282-1289, DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.09.028

Vahouny G. V., D'Amato P. H., Rodis S. L. (1973) Acetyl carnitine formation in rat heart. *LIpids* **8**, 446-452, DOI: 10.1007/BF02531762

Van Cauwenberghe O. R., Shelp B. J. (1999) Biochemical characterization of partially purifed GABA:pyruvate transaminase from *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **52**, 575-581, DOI: 10.1016/S0031-9422(99)00301-5

van Dam L., Korolev N., Nordenskiöld L. (2002) Polyamine-nucleic acid interactions and the effects on structure in oriented DNA fibers. *Nucleic Acid Res.* **30**, 419-428, DOI: 10.1093/nar/30.2.419

Vanderbilt A. S., Gaby N. S., Rodwell V W. (1975) Intermediates and enzymes between α-ketoarginine and γ-guanidinobutyrate in the L-arginine catabolic pathway of *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* **250**, 5322-5329

Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K. E., Nebert D. W. (1999) Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms and recomended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* **9**, 421-434, DOI: 10.1097/00008571-199910000-00004

Vaz F. M., Ofman R., Westinga K., Back J. W., Wanders R. J. (2001) Molecular and biochemical characterization of rat ε-*N*-trimethyllysine hydroxylase, the first enzyme of carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 33512-33517, DOI: 10.1074/jbc.M105929200

Vaz F. M., Wanders R. J. A. (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* **361**, 417-429, DOI: 10.1042/0264-6021:3610417

Vojtěchová M., Hanson A. D., Muñoz-Clares R. A. (1997) Betaine-aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 81-88, DOI: 10.1006/abbi.1996.9731

Vujcic S., Diegelman P., Bacchi C. J., Kramer D. L., Proter C. W. (2002) Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem. J.* **367**, 665-675, DOI: 10.1042/BJ20020720

Warburg O., Christian W. (1943) *Biochem. Z.* **314**, 149-176

Weigel P., Weretilnyk E. A., Hanson A. D. (1986) Betaine Aldehyde Oxidation by Spinach Chloroplasts. *Plant Phys.* **82**, 753-759, DOI: 10.1104/pp.82.3.753

Wink M., Hartmann T. (1982) Localization of the enzymes of quinolizidine akaloid bisynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphylus*. *Plant physiol.* **70**, 74-77, DOI: 10.1104/pp.70.1.74

Wood P. L., Khan M. A., Moskal J. R. (2007) The concept of “aldehyde load” in neurodegenerative mechanisms: Cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line. *Brain Res.* **1145**, 150-156, DOI: 10.1016/j.brainres.2006.10.004

Wymore T., Hempel J., Cho S. S., MacKerell A. D. Jr., Nicholas H. B. Jr., Deerfield D. W. (2004) Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenase and mechanism of nucleophile activation. *Proteins* **57**, 758-771, DOI: 10.1002/prot.20256

Yamada H., Mori N., Tani Y. (1979) Properities of Choline Oxidase of *Cylindrocarpon didymum* M-1. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 2173-2177

Yamada N., Promden W., Yamane K., Tamagake H., Hibino T., Tanaka Y., Takabe T. (2009) Preferential accumultion of betaine uncoupled nto choline monooxygenase in young leaves of sugar beet – Importance of long-distance translocation of betaine under normal and salt sressed conditions. *J. Plant. Phys.* **166**, 2058-2070, 10.1016/j.plph.2009.06.016

Yamaguchi K., Takahashi Y., Berbich T., Akihiko I., Miyazaki A., Takahashi T., Michael A., Kusano T. (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **580**, 6783-6788, DOI: 10.1016/j.febslet.2006.10.078

Yancey P. H., Clark M. E., Hand S. C, Bowlus R. D., Somero G. N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **24**, 1214-1222, DOI: 10.1126/science.7112124

Yu Z., Li W., Hillman J., Brunk U. T. (2004) Human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells are highly sensitive to the lysosomotropic aldehyde 3-aminopropanal. *Brain Res.* **1016**, 163-169, DOI: 10.1016/j.brainres.2004.04.075

Zhang F.-L., Niu B., Wang Y.-C., Chen F., Wang S.-H., Xu Y., Jiang L.-D., Gao S., Wu J., Tang L., Jia Y.-R. (2008a) A novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Jatropha curcas*, encoding an enzyme implicated in adaptation to environmental stress. *Plant Sci.* **174**, 510-518, DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.01.018

Zhang J., Tan W., Yang X.-H., Zhang H.-X. (2008b) Plastid-expressed choline monooxygenase gene improves salt tolerance and drought tolerance through accumulation of glycine betaine in tobacco. *Plant Cell Rep.* **27**, 1113-1124, DOI: 10.1007/s00299-008-0549-2

Zhang L., Steinmaus C., Eastmond D. A., Xin X. K., Smith M. T. (2009) Formaldehyde exposure and leukemia: A new meta-analysis and potential mechanisms. *Mutat. Res.* **681**, 150-169, DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.07.002

Zwiener C., Glauner T., Frimmel F. H. (2002) Method optimization for the determination of carbonyl compounds in disinfected water by DNPH derivatization and LC–ESI–MS–MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **372**, 615-621, DOI: 10.1007/s00216-002-1233-y

Použité zkratky

AAAL	aminoethanal (aminoacetaldehyd)
ABAL	4-aminobutanal (4-aminobutyraldehyd)
Ac-APAL	*N*-acetyl-3-aminopropanal
ADP	adenindifosfát
AGM	1-aminobutylguanidin (agmatin)
AkrAL	akrolein
ALDH	aldehyddehydrogenasa
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
AP-ABAL	4-[(3‘-aminopropyl)amino]butanal
APAL	3-aminopropanal (3-aminopropionaldehyd)
AVAL	5-aminopentanal (5-aminovaleraldehyd)
BADH	betainaldehyddehydrogenasa
BAL	betainaldehyd
BzAL	benzaldehyd
C_nAL	lineární alifatický aldehyd; n označuje délku řetězce (C_1AL – formaldehyd atd.)
DAO	diaminoxidasa
DAP	propan-1,3-diamin (1,3-diaminopropan)
diMet-S-PAL	3-(dimethylsulfonio)propanal
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
FurAL	furfural (furaldehyd)
GABA	kyselina γ-aminomáselná (kyselina 4-aminobutanová)
GBAL	4-guanidinobutanal
GPAL	3-guanidinopropanal
K_m	Michaelisova konstanta
2-Met-BAL	2-methylbutanal
3-Met-BAL	isovaleraldehyd (3-methylbutanal)
Met-FurAL	5-methylfurfural
MMT	methionin S-methyltransferasa (EC 2.1.1.12)
OH-Met-FurAL	5-hydroxymethylfurfural
PAO	polyaminoxidasa
PUT	butan-1,4-diamin (putrescin)
SPD	*N*-(3‘-aminopropyl)butan-1,4-diamin (spermidin)

SPM	*N*,*N*‘-bis-(3’aminopropyl)butan-1,4-diamin (spermin)
triMet-ABAL	4-(trimethylamino)butanal
triMet-APAL	3-(trimethylamino)propanal
V	limitní rychlost

Zkratky a vzorce aldehydů testovaných jako substráty aminoaldehyddehydrogenas jsou uvedeny na obrázcích v části výsledky (Obr. 10, Obr. 15, Obr. 22).

Profesní životopis

Osobní údaje:

Jméno:	Mgr. Jan Frömmel
Datum narození:	27. červenec 1985
Místo narození:	Ostrava
Bydliště:	Rabasova 1154/2, 708 00 Ostrava
E-mail:	jan.frommel@centrum.cz

Dosažené vzdělání:

2010 - dosud:	doktorské studium, PřF UP v Olomouci, studijní program biochemie, obor biochemie
2008 - 2010:	navazující magisterské studium, PřF UP v Olomouci, studijní program biochemie, obor biochemie
2005 - 2008:	bakalářské studium, PřF UP v Olomouci, studijní program biochemie, obor biochemie
2001 - 2005:	středoškolské studium, Gymnázium Olgy Havlové v Ostravě

Zaměstnání:

září 2010 - březen 2014:	vědecký pracovník - doktorand, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum PřF UP
duben 2014 - dosud:	vědeckopedagogický pracovník - doktorand, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum PřF UP

Výuka:

letní semestr 2011:	KBC/BCHC - Laboratorní cvičení z biochemie - 2 skupiny (10 h týdně)
letní semestr 2012:	KBC/BCHC - Laboratorní cvičení z biochemie - 1 skupina (5 h týdně)
letní semestr 2013:	KBC/BCHC - Laboratorní cvičení z biochemie - 2 skupiny (10 h týdně)

Publikační činnost:

1. **Frömmel J.**, Soural M., Tylichová M., Kopečný D., Demo G., Wimmerová M., Šebela M. (2012) Plant aminoaldehyde dehydrogenase oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydees. *Amino Acids* **43**, 1189-1202, DOI:10.1007/s00726-011-1174-x

2. **Frömmel J.**, Šebela M., Demo G., Soural M., Pospíšil T., Kopečný D. *N*-acyl-ω-aminoaldehydes are efficient substrates of plant aminoaldehyde dehydrogenases. Přijato do tisku, časopis Amino Acids

3. **Frömmel J.**, Soural M., Kopečná M., Kopečný D., Tarkowski P., Vianello F., Šebela M. Aminoaldehyddehydrogenasa 1 z rajčete a její možné využití k detekci aldehydů v lihovinách. XLIII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, 27.-29. 5. 2013, hotel Skalský dvůr u Bystřice nad Pernštejnem, poster P7 (Jan Frömmel); krátké sdělení ve Sborníku příspěvků, str. 141-144 (Vydala Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, počet stran: 196).

4. Baratella D., Magro M., Cozza G., Bonaiuto E., Miotto G., **Frömmel J.**, Šebela M., Kopečná M., Zoppellaro G., Zbořil R., Vianello F. (2014) Tertiary structure analysis as a key for predicting formation and stability of protein corona on metal oxide nanoparticles. v recenzním řízeni, časopis Journal of Physical Chemistry

Účast na konferencích:

1. Kopečný D., Tylichová M., Andree T., **Frömmel J.** and Šebela M.: Biochemical characterization of a recombinant plant aldehyde dehydrogenase 7 from *Pisum sativum* (PsALDH7). 9th Discussion in Structural Molecular Biochemistry, March 24-26, 2011, Nové Hrady , Czech Republic (Poster)

2. **Frömmel J.**, Soural M., Tylichová M., Kopečný D., Demo G., Wimmerová M., Šebela M.: Plant aminoaldehyde dehydrogenases oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydes. 5th Central and Eastern European Proteomic Conference, September 19-22, 2011, Conference Centre U Hájků, Prague, Czech Republic. (Poster)

3. Končitíková R., Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Vigouroux A., **Frömmel J.**, Šebela M.: Maize aldehyde dehydrogenase from the family 7 and 10. 10th Discussion in Structural Molecular Biochemistry, March 22-24, 2012, Nové Hrady, Czech Republic. (Poster)

4. Tylichová M., Končitíková R., Kopečný D., Morera S., Vigouroux A., **Frömmel J.**, Šebela M.: Newly charcterized aldehyde dehydrogenase from maize. 16th International Meeting - Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, July 10-15, 2012, Plön, Germany. (Poster, **vítěz ceny pro nejlepší poster konference - Henry Weiner Prize for the best poster**)

5. **Frömmel J.**, Kopečná M., Kopečný D., Soural M., Končitíková R., Vinello F., Šebela M.: Aminoaldehyde dehydrogenase 1from tomato - enzyme structure and possible using as a tool to analyze aldehydes in beverages. 11th Discussion in Structural Molecular Biology, March 14-16, 2013, Nové Hrady, Czech Republic (Přednáška)

6. Končitíková R., Kopečná M., Kopečný D., Moréra S., Vigouroux A., **Frömmel J.**, Šebela M.: Structural characterization of two maize aldehyde dehydrogenases from family 2. 11th Discussion in Structural Molecular Biology, March 14-16, 2013, Nové Hrady, Czech Republic (Poster)

7. **Frömmel J.**, Soural M., Kopečná M., Kopečný D., Tarkowski P., Vianello F., Šebela M. Aminoaldehyddehydrogenasa 1 z rajčete a její možné využití k detekci aldehydů v lihovinách. XLIII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, 27.-29. 5. 2013, hotel Skalský dvůr u Bystřice nad Pernštejnem, ČR (Poster)

8. **Frömmel J.**, Kopečný D., Lenobel R., Soural M., Demo G., Šebela M.: Aminoaldehyde dehydrogenase isoenzymes from *Pisum sativum* oxidize *N*-acetylated aminoaldehydes. 12th Discussion in Structural Molecular Biology, March 13-15, 2014, Nové Hrady, Czech Republic (Poster)

Práce na projektech:

2011 - 2013: GAČR PP501/11/1591: Structure-functional characterization of several plant aldehyde dehydrogenase families, člen řešitelského týmu

2011 - 2013: OpVaVpI CZ.1.05.2.1.00/01.0007: Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum (zaměstnanec)

2011: OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost, Investice do rozvoje vzdělávání, projekt CZ.1.07/1.1.00/14.0016: Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů - Techniky používané v chemických laboratořích (popularizační činoost - příprava a vedení laboratorního cvičení pro studenty některých gymnázií v Olomouci a okolí)

2011: OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost, Investice do rozvoje vzdělávání: Přírodní vědy moderně a interaktivně – Biochemie - Techniky používané v chemických laboratořích (popularizační činnost - příprava a vedení laboratorního cvičení pro studenty Gymnázia Hranice)

Přílohy – publikované práce

1. **Frömmel J.**, Soural M., Tylichová M., Kopečný D., Demo G., Wimmerová M., Šebela M. (2012) Plant aminoaldehyde dehydrogenase oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydees. *Amino Acids* **43**, 1189-1202, DOI:10.1007/s00726-011-1174-x

2. **Frömmel J.**, Šebela M., Demo G., Soural M., Pospíšil T., Kopečný D. *N*-acyl-ω-aminoaldehydes are efficient substrates of plant aminoaldehyde dehydrogenases. Přijato do tisku, časopis Amino Acids

3. **Frömmel J.**, Soural M., Kopečná M., Kopečný D., Tarkowski P., Vianello F., Šebela M. Aminoaldehyddehydrogenasa 1 z rajčete a její možné využití k detekci aldehydů v lihovinách. XLIII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, 27.-29. 5. 2013, hotel Skalský dvůr u Bystřice nad Pernštejnem, poster P7 (Jan Frömmel); krátké sdělení ve Sborníku příspěvků, str. 141-144 (Vydala Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, počet stran: 196).

Amino Acids
DOI 10.1007/s00726-011-1174-x

ORIGINAL ARTICLE

Plant aminoaldehyde dehydrogenases oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydes

Jan Frömmel · Miroslav Soural · Martina Tylichová · David Kopečný · Gabriel Demo · Michaela Wimmerová · Marek Šebela

Received: 2 September 2011 / Accepted: 21 November 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The metabolic degradation of aldehydes is catalyzed by oxidoreductases from which aldehyde dehydrogenases (EC 1.2.1) comprise nonspecific or substrate-specific enzymes. The latter subset is represented, e.g., by NAD^+-dependent aminoaldehyde dehydrogenases (AMADHs; EC 1.2.1.19) oxidizing a group of naturally occurring ω-aminoaldehydes including polyamine oxidation products. Recombinant isoenzymes from pea (PsAMADH1 and 2) and tomato (LeAMADH1 and 2) were subjected to kinetic measurements with synthetic aldehydes containing a nitrogenous heterocycle such as pyridinecarbaldehydes and their halogenated derivatives, (pyridinylmethylamino)-aldehydes, pyridinyl propanals and aldehydes derived from purine, 7-deazapurine and pyrimidine to characterize their substrate specificity and significance of the resulting data for in vivo reactions. The enzymatic production of the corresponding carboxylic acids was analyzed by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. Although the studied AMADHs are largely homologous and supposed to have a very similar active site architecture, significant differences were observed. LeAMADH1 displayed the broadest specificity oxidizing almost all compounds followed by PsAMADH2 and 1. In contrast, LeAMADH2 accepted only a few compounds as substrates. Pyridinyl propanals were converted by all isoenzymes, usually better than pyridinecarbaldehydes and aldehydes with fused rings. The K_m values for the best substrates were in the range of 10^{-5}–10^{-4} M. Nevertheless, the catalytic efficiency values (V_{max}/K_m) reached only a very small fraction of that with 3-aminopropanal (except for LeAMADH1 activity with two pyridine-derived compounds). Docking experiments using the crystal structure of PsAMADH2 were involved to discuss differences in results with position isomers or alkyl chain homologs.

Keywords Aldehyde · Aminoaldehyde dehydrogenase · 7-Deazapurine · Pyridine · Pyrimidine · Purine

Abbreviations

AMADH	Aminoaldehyde dehydrogenase
AEAL	2-Aminoethanal
ABAL	4-Aminobutanal
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
APAL	3-Aminopropanal
BADH	Betaine aldehyde dehydrogenase
LeAMADH	Tomato (*Lycopersicon esculentum*) aminoaldehyde dehydrogenase

Chemical names of all synthetic aldehyde compounds are abbreviated by acronyms (elucidated directly in the text) ending with a suffix AL.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00726-011-1174-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Frömmel · M. Tylichová · D. Kopečný · M. Šebela (✉)
Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic
e-mail: marek.sebela@upol.cz

M. Soural (✉)
Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic
e-mail: souralm@seznam.cz

G. Demo · M. Wimmerová
Central European Institute of Technology and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

Published online: 13 December 2011

LC–MS	Liquid chromatography coupled to mass spectrometry
PsAMADH	Pea (*Pisum sativum*) aminoaldehyde dehydrogenase

Introduction

Aldehydes are highly reactive organic compounds. There are three groups of enzymes that catalyze their metabolic oxidation to the corresponding carboxylic acids: aldehyde dehydrogenases (ALDHs), aldehyde oxidases and xanthine oxidases (Panoutsopoulos et al. 2004; Marchitti et al. 2009). Currently, the protein superfamily of ALDHs consists of 24 families, from which for example plant enzymes are represented in 12 families (Kirch et al. 2004; Wood and Duff 2009). As expected, ALDH genes are found in virtually all genomes analyzed to date, indicating the biological significance of these enzymes (Vasiliou and Nebert 2005). Members of the ALDH superfamily catalyze the oxidation of numerous aldehyde substrates (Sophos and Vasiliou 2003) and use NAD^+ or $NADP^+$ as electron acceptors. ALDHs were originally shown to cluster into two main trunks of the phylogenetic tree (Perozich et al. 1999). The "class 1/2" trunk covers mostly nonspecific ALDHs including those from ALDH1 (cytosolic) and ALDH2 (mitochondrial) families classified under EC number 1.2.1.3. The second trunk ("class 3") contains substrate-specific ALDHs such as benzaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.7), betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8), nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.9), aminoaldehyde dehydrogenase (AMADH, EC 1.2.1.19) and antiquitin (turgor-responsive ALDH, EC 1.2.1.31) (Perozich et al. 1999).

Nonspecific ALDHs (EC 1.2.1.3) convert aliphatic, alicyclic and aromatic aldehydes (Hill and Dickinson 1988; Klyosov 1996). Human mitochondrial ALDH2 is involved in the second step of ethanol metabolism (Farrés et al. 1994). Accordingly, ethanal and propanal represent its efficient substrates. On the other hand, ethanal can hardly function as the natural substrate for human cytosolic ALDH1, since its K_m far exceeds physiological concentrations (Klyosov 1996). An increase in aliphatic aldehyde chain length (up to C10) substantially decreases the K_m values of human ALDH2 and ALDH1 (Klyosov 1996). Interestingly, a recombinant ALDH2 from the plant *Craterostigma plantagineum* showed highest activity with nonanal (Kirch et al. 2001). Aromatic aldehydes (benzaldehydes, cinnamaldehydes, etc.) and fused polycyclic aldehydes, as well as derivatives of coumarin, quinoline, indole, and pyridine were recognized as tight-binding slow-turnover substrates for human ALDH2. Surprisingly, many of these aromatic compounds weakly inhibit ALDH1 (Klyosov 1996).

Benzaldehyde is also oxidized by a human member of the cytosolic ALDH3 family (Marchitti et al. 2007). It has been postulated that ALDH7 gene products are involved in adaptive metabolic pathways (Kirch et al. 2004). The human enzyme of this family is expressed in multiple cellular compartments, where it seems to mediate a protective role by generating osmolytes (Brocker et al. 2010). In this way, glycine betaine is formed from betaine aldehyde, which is otherwise known as a typical substrate of BADHs from the ALDH9 family (Chern and Pietruszko 1995). The ability to synthesize and/or accumulate glycine betaine is a ubiquitous adaptation to osmotic stress (Kirch et al. 2004). In mammals, ALDH7 is known to play a primary role in the pipecolic acid pathway of lysine catabolism catalyzing the oxidative conversion of aminoadipate semialdehyde to α-aminoadipic acid. Interestingly, human ALDH7 is able to oxidize benzaldehyde with a catalytic efficiency of 15% when compared with that for aminoadipate semialdehyde (Brocker et al. 2010).

Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase isoenzymes 1 and 2 (PsAMADH1 and 2), which belong to the ALDH9 family (according to the novel system by Kirch et al. 2004, the plant enzymes of this group should be classified within the ALDH10 family as well as BADHs), have been shown to oxidize pyridinecarbaldehydes (PCALs) as less efficient but still good substrates (Tylichová et al. 2010). Nevertheless, the isoenzymes prefer 3-aminopropanal (APAL), 4-aminobutanal (ABAL) and some other ω-aminoaldehydes as the best substrates indicating a relationship with polyamine metabolism (Šebela et al. 2000; Tylichová et al. 2010). In this work, PsAMADH1 and PsAMADH2 together with their counterparts from tomato (LeAMADH1 and 2) were subjected to an extensive study with synthetic nitrogenous heterocyclic aldehydes including derivatives of pyridine, purine, 7-deazapurine, pyrimidine plus several other compounds. Significant substrate specificity differences were observed among the studied enzymes. With the exception of LeAMADH2 that accepts only a few aromatic aldehydes as substrates, PsAMADH1 and 2 demonstrated much broader specificity. LeAMADH1 was found to be efficient with the heterocyclic aldehydes.

Materials and methods

Enzymes

Recombinant PsAMADH1 and PsAMADH2 were prepared as described previously (Tylichová et al. 2008, 2010). To obtain recombinant AMADH isoenzymes from tomato, the

total RNA from apical meristems and leaves of 7-day-old tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* cv. Amateur) was extracted using a Midi spin columns kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Then the corresponding cDNA was synthesized using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). *LeAMADH1* ORF (1,515 bp; EMBL/GenBank accession no. AY796114) was amplified with synthetic oligonucleotides containing restriction sites—highlighted in bold—for BamHI (5′-CA G**GGATCC**GGCAAATCGTAATGTACCA-3′; sense primer) and XhoI (5′-CGT**CTCGAG**CTAATTCTTTGAAG GTGACTTAT-3′; antisense primer). *LeAMADH2* ORF (1,518 bp; EMBL/GenBank accession no. FJ228482) was amplified using another set of oligonucleotides containing either EcoRI restriction site (5′-CAT**GAATTC**GGCGA TTCCTAATATACGGAT-3′; sense primer), or KpnI restriction site (5′-AGT**GGTACC**TTACAGCTTTGAAG GAGACT-3′; antisense primer). Expression, cell lysis and enzyme purification were performed as described for PsAMADH1 (Tylichová et al. 2008). According to the actual needs, there was an additional purification step involving ion-exchange chromatography on a Resource Q column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) (Tylichová et al. 2010). Protein identification was done by peptide mass fingerprinting on a Microflex LRF20 MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) after SDS-PAGE and tryptic in-gel digestion (Šebela et al. 2006).

Commercial chemicals

Common chemicals and solvents were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany) as well as starting compounds for chemical syntheses, 3-(methylthio)propanal (Met-S-PAL), 3-(methylthio)butanal and 3-(5-methyl-2-furyl)butanal. The same company provided 2-, 3-and 4-bromobenzaldehyde (2-, 3-, 4-Br-BzAL); 2-, 3- and 4-pyridinecarbaldehyde (2-, 3-, 4-PCAL); 4-pyridinecarbaldehyde N-oxide (4-PCALNO); 2,6-dichloro-4-pyridinecarbaldehyde (2,6-diCl-4-PCAL); 3,5-dichloro-4-pyridinecarbaldehyde (3,5-diCl-4-PCAL); 2-bromo-4-pyridinecarbaldehyde (2-Br-4-PCAL) and 3-bromo-4-pyridinecarbaldehyde (3-Br-4-PCAL). (2-Pyridinylmethylamino)ethanal diethylacetal (2-PMet-AEAL diethylacetal), cat. no. S414859, and (4-pyridinylmethylamino)ethanal diethylacetal (4-PMet-AEAL diethylacetal), cat. no. S364746, were from Sigma-Aldrich Rare Chemical Library.

Preparation of synthetic compounds

Analytical data to all of the following synthetic compounds are provided in Supplementary material.

3-(Pyridinyl)-propanals

3-Pyridin-2-yl-propanal (P2PAL), 3-pyridin-3-yl-propanal (P3PAL) and 3-pyridin-4-yl-propanal (P4PAL) were synthesized according to a published procedure (Mancuso et al. 1978).

N-(2,2-dimethoxyethyl)-9H-purin-6-amine (Pu-AEAL dimethylacetal), N-(3,3-diethoxypropyl)-9H-purin-6-amine (Pu-APAL diethylacetal) and N-(4,4-diethoxybutyl)-9H-purin-6-amine (Pu-ABAL diethylacetal)

These compounds represent acetals of (9*H*-purin-6-ylamino)-aldehydes, i.e., purine derivatives of 2-aminoethanal (AEAL), APAL and ABAL. 6-Chloro-9*H*-purine (229 mg, 1.49 mmol) was dissolved in *n*-butanol (3 ml) and the corresponding dialkoxy-*n*-alkane-amine (3.0 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed for 1 h (Pu-AEAL dimethylacetal), 4 h (Pu-APAL diethylacetal) or 9 h (Pu-ABAL diethylacetal), then evaporated to dryness and ice-cold water (10 ml) was added. The precipitated material was collected by suction, washed with ice-cold water and dried.

N-(2,2-dimethoxyethyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (PyrPm-AEAL dimethylacetal), N-(3,3-diethoxypropyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (PyrPm-APAL diethylacetal) and N-(4,4-diethoxybutyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (PyrPm-ABAL diethylacetal)

These compounds represent acetals of (7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-aldehydes, i.e., 7-deazapurine derivatives of AEAL, APAL and ABAL. 4-Chloro-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (114 mg, 0.75 mmol) was dissolved in ethanol (3 ml) and the corresponding dialkoxy-*n*-alkane-amine (1.5 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed for 6 days (PyrPm-AEAL dimethylacetal) or 2 days (PyrPm-APAL and PyrPm-ABAL diethylacetals), then evaporated to dryness and the resulting residue was purified using column chromatography (DAVISIL LC60A 40–60 µm, toluene:acetonitrile:methanol 5:2:1).

N-(2,2-dimethoxyethyl)pyrimidin-2-amine (Pm-AEAL dimethylacetal), N-(3,3-diethoxypropyl)pyrimidin-2-amine (Pm-APAL diethylacetal) and N-(4,4-diethoxybutyl)pyrimidin-2-amine (Pm-ABAL diethylacetal)

These compounds represent acetals of (pyrimidin-2-ylamino)-aldehydes—pyrimidine derivatives of AEAL, APAL and ABAL. 2-Chloropyrimidine (114 mg, 1 mmol) was dissolved in *n*-butanol (2 ml) and the corresponding dialkoxy-*n*-alkane-amine (2.0 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed for 3 h (Pm-AEAL

dimethylacetal) or 2 h (Pm-APAL and Pm-ABAL diethylacetals), then evaporated to dryness and the resulting residue was purified using column chromatography (DAVISIL LC60A 40–60 μm, toluene:acetonitrile 5:2).

Acetals of (pyridinylmethylamino)-aldehydes

The synthesis utilized a route adapted from the literature (Sánchez-Sandoval et al. 2003). For example, diethylacetal of 3-[(pyridin-2-ylmethyl)amino]propanal (2-PMet-APAL diethylacetal) was synthesized as follows: 3,3-diethoxypropane-1-amine (25 mmol) was dissolved in ethanol (25 ml). 2-Pyridinecarbaldehyde (26.5 mmol) was added dropwise to the solution and the resulting mixture was refluxed for 3 h. After cooling to laboratory temperature, $NaBH_4$ (35 mmol) was slowly added in small portions and then the mixture was stirred for 16 h. Then distilled water (50 ml) was added and the resulting solution was extracted with CH_2Cl_2 (3 × 50 ml). The combined organic layers were dried (Na_2SO_4). A yellow liquid product was obtained after evaporation of the solvent under reduced pressure in a yield of 88%. Acetals of the other (pyridinylmethylamino)-aldehydes were prepared by analogous procedures using the corresponding dialkoxy-*n*-alkane-amines and pyridinecarbaldehydes as starting compounds.

Instrumental analyses

LC–MS analyses of synthetic aldehyde compounds and reaction mixtures (after enzymatic oxidation of selected substrates) were carried out on a UHPLC chromatograph Accela equipped with a photodiode array detector and connected to a triple quadrupole mass spectrometer TSQ Quantum Access (both Thermo Scientific, CA, USA). A Nucleodur® C18 Gravity column (1.8 μm, 2.1 × 50 mm) was used at a flow rate of 0.8 ml min^{-1} and thermostated at 30°C (Macherey-Nagel). Mobile phases were as follows: (A) 10 mM ammonium acetate in water; (B) acetonitrile. There was a linear gradient from 10 to 80% B in 2.5 min, and then an isocratic run for 1.5 min. The column was re-equilibrated with 10% of B for 1 min. The APCI source operated at a discharge current of 5 μA, a vaporizer temperature of 400°C and a capillary temperature of 200°C. ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra were obtained on a Varian Unity*Plus* (299.89 MHz, ^{1}H) instrument. Measurements were performed at 21°C in DMSO-d_6 or chloroform-*d* solutions and referenced to the resonance signal of dimethylsulfoxide or chloroform.

Activity assay, kinetic measurements, protein assay

Enzyme activity was measured spectrophotometrically by monitoring the formation of NADH (ε_{340} = 6,620 M^{-1} cm^{-1}) at 23°C (Tylichová et al. 2010). The reaction mixture in a cuvette contained 0.15 M Tris–HCl buffer, pH 9.0, 0.5 mM NAD^+ and an appropriate amount of AMADH. For measurements of relative oxidation rate, the enzyme reaction was initiated by the addition of APAL (or another aldehyde) at a final concentration of 1 mM (Tylichová et al. 2010); for K_m and V_{max} determinations, substrate concentration varied according to needs. Acetals were converted to aldehydes by adding calculated amount of 0.4 M HCl just prior to measurements. Absorbance values were averaged from three independent experiments. Kinetic data were evaluated using GraphPad Prism 5.0 software. Proteins were determined by Bradford method (Bradford 1976) and, for the purified enzymes, using the following extinction coefficients calculated from the respective monomer amino acid sequences by ProtParam tool (http://www.expasy.org/tools/protparam.html): PsAMADH1 (ε_{280} = 82,390 M^{-1} cm^{-1}), PsAMADH2 (ε_{280} = 90,410 M^{-1} cm^{-1}), LeAMADH1 (ε_{280} = 75,860 M^{-1} cm^{-1}) and LeAMADH2 (ε_{280} = 94,880 M^{-1} cm^{-1}).

Docking experiments

The AutoDock 3.0 suite (Morris et al. 1998) was used as a molecular-docking tool. Semi-flexible protocols were followed, in which the target protein (PsAMADH2; PDB code: 3IWJ) was kept rigid. In contrast, aldehyde ligands being docked were kept flexible. The graphical user interface software Triton (Prokop et al. 2008) was employed to prepare, run, and analyze the docking simulations. Hydrogen atoms were added by WHAT IF (Vriend 1990). For partial atoms charges in the enzyme, the Kollman united atom charges were used (Weiner et al. 1984).

All ligands were built in Avogadro 1.0.0 (http://avogadro.openmolecules.net/). The geometries of the ligand structures were optimized using the Hartree–Fock method with a 6−31G(d) basis set as implemented in the Gaussian 03 program (Frisch et al. 2004). The electro-static potential fitting (ESP) charges were calculated, and the RESP procedure of the Antechamber program from the AMBER suite was used to generate input files for docking programs (Case et al. 2005; Pearlman et al. 1995). The rigid roots of each ligand were picked manually, in all cases the heterocyclic nitrogen atom was set as a rigid center. To get more useful results, the aldehyde bond in halogenated PCALs was made nonrotatable. All rotatable dihedrals in other ligands were allowed to rotate freely.

Grid maps were calculated by AutoGrid 3.0. from the AutoDock 3.0 suite. The grid box (60 × 60 × 60 Å) was centered to the substrate channel; grid point spacing was 0.375 Å. Docking calculations were carried out using Lamarckian genetic algorithm and a maximum of 100 conformers was considered for each compound. The population size was set to 50 and the individuals were

initialized randomly. The maximum number of energy evaluations was 5×10^6 and the maximum number of generations was 27,000. One top individual was allowed to survive the next generation and the mutation and crossover rates were set to 0.02 and 0.8, respectively. Step sizes were 2 Å for translations, 50° for quaternions and 50° for torsions. Cluster tolerance was 0.5 Å, external grid energy 1,000.0 and max initial energy 0.0.

Results and discussion

Motivation to this study

This work deals with design, preparation and testing of new synthetic substrates of plant AMADHs. The enzymes belong to the superfamily of ALDHs where individual dimeric or tetrameric proteins share a common overall folding pattern: each monomeric unit of 50–60 kDa comprises a substrate-binding (catalytic) domain, a coenzyme-binding domain and an oligomerization domain (Gruez et al. 2004; Tylichová et al. 2010). The active site of plant AMADHs, which is located between the coenzyme-binding and catalytic domains, is accessible via a wide (5–8 Å) and deep (15 Å) funnel passage allowing structurally diverse aldehydes to penetrate down to the catalytic cysteine and bind at this place for the possible catalytic conversion (Tylichová et al. 2010). That is why an idea came to mind to study synthetic compounds with heterocyclic nitrogen atom(s) and an aldehyde group, attached directly at the heterocycle or situated in a side chain, as potential substrates. The original motivation stemmed from the observation that PCALs are oxidized by PsAMADHs (Tylichová et al. 2010). It is worth mentioning that PCALs display a structural motif where the nitrogen atom is positioned toward the aldehyde group at a distance resembling that in natural ω-aminoaldehyde substrates. The oxidation of 2-, 3- and 4-PCAL by AMADH results in picolinic, nicotinic and isonicotinic acid, respectively. These are known as building blocks of more complex structures, for example tobacco alkaloids, compatible osmolytes and others (Kaiser et al. 1996; Rhodes and Hanson 1993). It has been also shown that exogenous 3-PCAL is metabolized to NAD^+ in mouse (Kaplan et al. 1957). Thus, through the action on nitrogenous heterocyclic aldehydes, AMADHs might participate in various biosynthetic routes.

Experimental setup

Based on their structural features, the studied synthetic compounds can be divided into a few groups. A majority of them include a pyridine ring: pyridinecarbaldehydes, 3-(pyridinyl)propanals, (pyridinylmethylamino)-aldehydes, and halogenderivates of pyridinecarbaldehydes. The other aldehyde compounds were derivatives of purine, 7-deazapurine or pyrimidine. Finally we also tested several aldehydes without heterocyclic nitrogen—methylthioaldehydes and a methylfurylaldehyde, which formally resemble natural ω-aminoaldehyde substrates of plant AMADHs. Chemical formulas of selected substances and the corresponding abbreviations are shown in Figs. 1 and 2.

3-(Pyridinyl)propanals were synthesized from 3-(pyridinyl)propanols using the Swern reaction with oxalyl chloride, dimethyl sulfoxide and triethylamine (Mancuso et al. 1978). Acetals of purine-, 7-deazapurine- and pyrimidine-derived aldehydes were obtained by a standard nucleophilic substitution: 6-chloropurine, 6-chloro-7-deazapurine, and 2-chloropyrimidine, respectively, were reacted with dialkoxy-*n*-alkane-amines (acetals of C2–C4 ω-aminoaldehydes) of desired length. Finally, acetals of (pyridinylmethylamino)-aldehydes were synthesized by a reductive amination from pyridinecarbaldehydes and acetals of C2–C4 ω-aminoaldehydes. All synthetic compounds were checked for purity (Supplementary material) by instrumental analysis prior to their testing in enzymatic reactions. The experimental set of plant AMADHs consisted of pea isoenzymes (PsAMADH1 and 2) and tomato isoenzymes (LeAMADH1 and 2). Biochemical properties

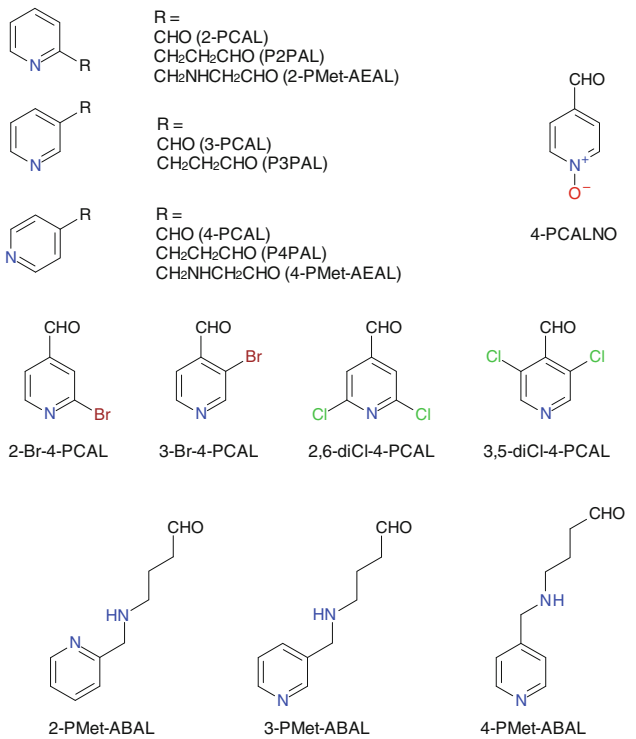


Fig. 1 Nitrogeneous heterocyclic aldehydes I. Chemical formulas of the studied pyridine-derived aldehydes were drawn using Accelrys Draw 4.0

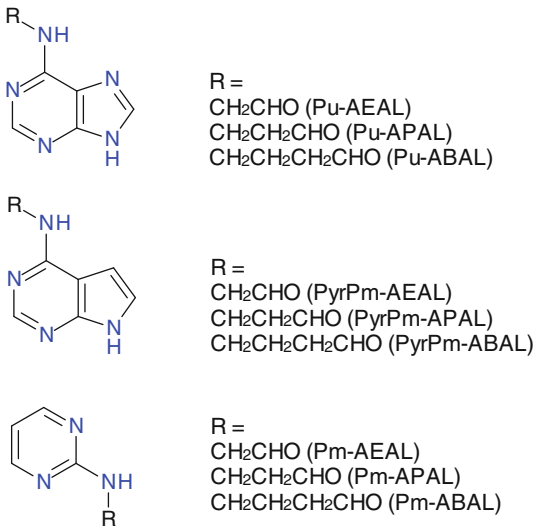


Fig. 2 Nitrogenous heterocyclic aldehydes II. Chemical formulas of the studied purine-, 7-deazapurine- and pyrimidine-derived aldehydes were drawn using Accelrys Draw 4.0

of pea AMADHs have already been reported in detail (Tylichová et al. 2010). LeAMADH1 and 2 were obtained by recombinant expression in a parallel project (details on their biochemical characterization will be published elsewhere). Kinetic analysis of the tomato enzymes with natural substrates indicated a significant difference in substrate specificity, when LeAMADH2, contrary to LeAMADH1, preferred markedly APAL to ABAL as the best substrate (Kopečný et al. unpublished results).

Evaluation of substrate properties of the synthetic compounds

First attempts to demonstrate substrate properties of the synthetic compounds relied on measurements of relative reaction rates at an expected saturating concentration of 1 mM in the reaction mixture. PCALs and PCALNO were oxidized by PsAMADHs only moderately and no consumption of the compounds was observed with LeAMADH2. On the other hand, they were found as very good substrates of LeAMADH1 with relative rate values between 28 and 84% of that with APAL as the best natural substrate (Table 1). 4-PCAL derivatives with 2- and 2,6-halogen substitution served as good substrates, while 4-PCAL derivatives with 3- or 3,5-halogen substituents were not oxidized at all. The measured relative rates were higher for the conversion by PsAMADH1 and LeAMADH1 than for the reactions of PsAMADH2 and LeAMADH2. All three3-(pyridinyl)propanals, higher homologs of PCALs resembling natural ω-aminoaldehydes by their

Table 1 Substrate specificity of PsAMADHs and LeAMADHs toward pyridine-derived aldehydes

Substrate	Relative reaction rate (%)			
	PsAMADH1	PsAMADH2	LeAMADH1	LeAMADH2
Pyridinecarbaldehydes				
2-PCAL	1	2	28	–
3-PCAL	1	4	84	–
4-PCAL	3	2	73	–
4-PCALNO	–	1	41	–
3-Br-4-PCAL	–	–	–	–
3,5-diCl-4-PCAL	–	–	–	–
2-Br-4-PCAL	28	3	60	2
2,6-diCl-4-PCAL	52	12	40	6
3-(Pyridinyl)propanals[a]				
P2PAL	3	35	52	4
P3PAL	26	11	127	4
P4PAL	25	34	91	19
(Pyridinylmethylamino)-aldehydes				
2-PMet-AEAL	–	–	–	–
4-PMet-AEAL	–	2	50	–
2-PMet-APAL	–	–	12	–
3-PMet-APAL	–	–	10	–
4-PMet-APAL	–	–	16	–
2-PMet-ABAL	29	25	88	38
3-PMet-ABAL	27	25	89	14
4-PMet-ABAL	25	29	85	15

Activities with substrates at 1 mM final concentration were measured in 0.15 M Tris–HCl buffer, pH 9.0, at 23°C. NAD^+ concentration in the reaction mixture was 0.5 mM. The rate of APAL oxidation was arbitrarily taken as 100%. The symbol "–" indicates no substrate properties

The relative reaction rates toward APAL conversion appear in the range of 1–3%

[a] Propanal itself represents a weak substrate of PsAMADHs (Tylichová et al. 2010) and LeAMADHs

aliphatic chain and the presence of positively charged nitrogen atom, were found very good substrates. The highest relative rates of their oxidation were observed with LeAMADH1. Using this enzyme, the relative reaction rate with P3PAL was surprisingly higher than with APAL itself.

2-PMet-AEAL was not oxidized at all, but its isomer 4-PMet-AEAL was converted by PsAMADH2 and particularly by LeAMADH1. All three position isomers of PMet-ABAL were oxidized well by all involved isoenzymes whereas PMet-APALs were converted only by LeAMADH1 at relative rates of 10–20% toward APAL oxidation (Table 1).

(9*H*-Purin-6-ylamino)-aldehydes (Pu-AEAL, Pu-APAL and Pu-ABAL) as well as (7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ylamino)-aldehydes (PyrPm-AEAL, PyrPm-APAL and PyrPm-ABAL) exhibited diverse substrate properties (Table 2). LeAMADH2 did not accept the bicyclic compounds as substrates with the exception of a weak oxidation of Pu-AEAL. In contrast, LeAMADH1 oxidized all purinyl and deazapurinyl aminoaldehydes as effective substrates, only the relative reaction rate for the oxidation of Pu-APAL was below 10% when compared with the oxidation of the natural substrate APAL (Table 2). PsAMADH1 and 2 showed only restricted substrate preferences toward the purine and deazapurine derivatives. They slowly oxidized Pu-AEAL and PyrPm-ABAL, PsAMADH1 additionally converted Pu-ABAL. LeAMADH1 oxidized two of the analyzed (pyrimidin-2-ylamino)-aldehydes, i.e., Pm-AEAL and Pm-APAL. PsAMADH1 and PsAMADH2 showed activity only in exceptional cases (Table 2). Interestingly, Pm-ABAL was not a substrate of the studied enzymes.

To get further clues to understanding differences in substrate specificity of plant AMADHs, we also evaluated substrate properties of aldehydes containing a thioether group or a heterocyclic oxygen atom as well as the possible conversion of bromobenzaldehydes (structural analogs of the halogenated pyridinecarbaldehydes). 3-(Methylthio)propanal, a sulfur-containing analog of the natural aminoaldehyde substrates, was found the best substrate from this miscellaneous collection. The highest relative rate (77%) was observed with LeAMADH1, the other isoenzymes provided relative reaction rate values between 10 and 26%. 3-(Methylthio)butanal was oxidized only negligibly by PsAMADH1 and LeAMADH1, 4-(5-methylfur-2-yl)butanal was not a substrate. From the three

Table 2 Substrate specificity of PsAMADHs and LeAMADHs toward aldehydes derived from purine, 7-deazapurine and pyrimidine and some other compounds

Substrate	Relative reaction rate (%)			
	PsAMADH1	PsAMADH2	LeAMADH1	LeAMADH2
(9*H*-Purin-6-ylamino)-aldehydes				
Pu-AEAL	7	6	30	2
Pu-APAL	–	–	4	–
Pu-ABAL	3	–	20	–
(7*H*-Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ylamino)-aldehydes				
PyrPm-AEAL	–	–	10	–
PyrPm-APAL	–	–	23	–
PyrPm-ABAL	7	8	57	–
(Pyrimidin-2-ylamino)-aldehydes				
Pm-AEAL	–	3	10	–
Pm-APAL	2	–	7	–
Pm-ABAL	–	–	–	–
Bromobenzaldehydes[a]				
2-Br-BzAL	–	–	–	–
3-Br-BzAL	0.7	1.2	4	1
4-Br-BzAL	0.2	0.3	3	–
Methylthioaldehydes				
Met-S-PAL	26	19	77	10
Met-S-BAL	1	–	2	–

Activities with substrates at 1 mM final concentration were measured in 0.15 M Tris–HCl buffer, pH 9.0, at 23°C. NAD^+ concentration in the reaction mixture was 0.5 mM. The rate of APAL oxidation was arbitrarily taken as 100%. The symbol "–"indicates no substrate properties

[a] Benzaldehyde itself is not oxidized at all by PsAMADH isoenzymes (Tylichová et al. 2010). In the case of LeAMADH2, zero activity was measured as well. Only LeAMADH1 accepts benzaldehyde as a weak substrate (the relative reaction rate toward APAL conversion is 3.4%)

isomers of bromobenzaldehyde, 3-Br-BzAL and 4-Br-BzaL were only moderately oxidized by LeAMADH1 (Table 2).

Determination of kinetic parameters K_m and V_{max}

For those substrates which were oxidized with relative rates reaching several per cents of that with APAL as a natural reference substrate, the fundamental kinetic parameters K_m and V_{max} were determined. As LeAMADH2 oxidized only a limited amount of the studied compounds and PsAMADH1 resembled the observed substrate preference of PsAMADH2 in a majority of reactions, the kinetic parameters were determined especially with PsAMADH2 and LeAMADH1 (only some supplementary K_m and V_{max} data were measured with PsAMADH1 and LeAMADH2). In the case of LeAMADH1, the measured V_{max} values reached from 10 to 60% of that with APAL as a reference substrate with the exception of Br-BzALs (around 1%); for PsAMADH2 it was from 5 to 40% except for 3-Br-BzAL, a majority of PCALs and 4-PMet-AEAL (all around 1%); see Table 3.

As regards to pyridine-derived aldehydes, the observed K_m values of PsAMADH2 (usually <100 μM) were mostly lower than their counterparts measured with LeAMADH1, or comparable (Table 3). Interestingly, in the case of 3-PCAL, 4-PMet-AEAL and 4-PMet-ABAL, the measured K_m values were of about 0.7 Mm, i.e., higher than those of LeAMADH1 (0.2–0.4 mM). On the other hand, the K_m values of LeAMADH1 generally appeared on the level of 0.1 mM except for those referring to the oxidation of 4-PCAL (19 μM) and 2-Br-4-PCAL (69 μM). In the first case, the K_m value was lower than the corresponding result with PsAMADH2 (Table 4).

In the case of PsAMADH1, we obtained relatively low K_m values of about 20 μM for both 3-PCAL and 4-PCAL. The K_m and V_{max} values (in parentheses) of PsAMADH1 for 2,6-diCl-4-PCAL and 2-Br-4-PCAL were 87 μM (24 nmol s^{-1} mg^{-1}) and 12 μM (17 nmol s^{-1} mg^{-1}), respectively. It is worth mentioning that the ratio V_{max}/K_m for 2-Br-4-PCAL and PsAMADH1 resembled that for the natural substrate APAL. The K_m values of LeAMADH2 for PCALs were between 150 and 350 μM. For 2,6-diCl-4-PCAL and 2-Br-4-PCAL, lower values of 38 and 25 μM, respectively, were measured. The binding of the position isomers of PMet-ABAL to LeAMADH1 and PsAMADH2 was reflected in relatively high K_m values of 0.2–0.8 mM. A very low K_m value of 3.2 μM of LeAMADH1 was determined for the oxidation of 4-Br-BzAL (Table 4). In the case of the oxidation of bicyclic aldehydes by

Table 3 Kinetic parameters of PsAMADH2 and LeAMADH1 for the oxidation of pyridine-derived aldehydes

Substrate	PsAMADH2			LeAMADH1		
	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
Reference substrate						
APAL	12 ± 1.2	179 ± 5.1	1	20 ± 3.3	167 ± 12.2	1
Pyridinecarbaldehydes						
2-PCAL	77 ± 5.2	2.1 ± 0.03	0.002	187 ± 11.2	18 ± 0.4	0.012
3-PCAL	754 ± 32.4	7.8 ± 0.13	0.001	238 ± 21.6	52 ± 1.7	0.026
4-PCAL	33 ± 2.3	2.1 ± 0.04	0.004	19 ± 1.3	59 ± 1.2	0.372
4-PCALNO	55 ± 3.1	0.8 ± 0.01	0.001	356 ± 29.1	30 ± 0.9	0.010
2,6-diCl-4-PCAL	28 ± 0.5	15 ± 0.5	0.036	162 ± 14.8	36 ± 1.4	0.027
2-Br-4-PCAL	32 ± 1.7	3.6 ± 1.72	0.008	69 ± 7.1	65 ± 2.7	0.113
3-(Pyridinyl)propanals						
P2PAL	171 ± 10.9	42 ± 0.9	0.016	161 ± 12.2	33 ± 0.8	0.025
P3PAL	87 ± 8.0	22 ± 0.8	0.017	129 ± 7.1	94 ± 2.0	0.087
P4PAL	29 ± 2.1	70 ± 1.3	0.162	146 ± 9.2	68 ± 1.8	0.056
(Pyridinylmethylamino)-aldehydes						
4-PMet-AEAL	761 ± 59.4	3.4 ± 0.10	0.0003	238 ± 9.7	34 ± 0.5	0.017
2-PMet-ABAL	401 ± 38.9	25 ± 1.0	0.004	390 ± 30.4	52 ± 1.7	0.016
3-PMet-ABAL	289 ± 16.4	27 ± 0.6	0.006	294 ± 16.2	75 ± 1.6	0.031
4-PMet-ABAL	679 ± 69.3	40 ± 2.8	0.004	385 ± 28.9	44 ± 1.3	0.014

Activities were measured in 0.15 M Tris–HCl buffer, pH 9.0, at 23°C. A saturating NAD^+ concentration of 0.5 mM was used. K_m and V_{max} values (shown in μM and nmol s^{-1} mg^{-1}, respectively) were calculated from the Lineweaver–Burk and Eadie–Scatchard plots of initial rates as arithmetic means of values from both plots. V_{max}/K_m ratios are provided as relative values toward that for APAL, which was set arbitrarily equal to 1

Table 4 Kinetic parameters of PsAMADH2 and LeAMADH1 for the oxidation of some other substrates

Substrate	PsAMADH2			LeAMADH1		
	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
Reference substrate						
APAL	12 ± 1.2	179 ± 5.1	1	20 ± 3.3	167 ± 12.2	1
Bromobenzaldehydes						
3-Br-BzAL	13 ± 0.9	1.16 ± 0.020	0.006	69 ± 6.3	2.3 ± 0.07	0.004
4-Br-BzAL	ND	ND	ND	3.2 ± 0.18	1.3 ± 0.04	0.049
Purine- and 7-deazapurine-derived aldehydes						
Pu-AEAL	755 ± 55.2	9.6 ± 0.4	0.0009	379 ± 22.8	21 ± 0.5	0.007
Pu-ABAL	ND	ND	ND	482 ± 25.2	14 ± 0.3	0.004
PyrPm-APAL	ND	ND	ND	1,023 ± 68.9	24 ± 0.8	0.003
PyrPm-ABAL	ND	ND	ND	1,245 ± 92.1	65 ± 2.9	0.006
Methylthioaldehydes						
Met-S-PAL	44 ± 3.4	21 ± 0.4	0.032	29 ± 1.2	43 ± 0.4	0.178

Activities were measured in 0.15 M Tris–HCl buffer, pH 9.0, at 23°C. A saturating NAD^+ concentration of 0.5 mM was used. K_m and V_{max} values (shown in μM and nmol s^{-1} mg^{-1}, respectively) were calculated from the Lineweaver–Burk and Eadie–Scatchard plots of initial rates as arithmetic means of values from both plots. V_{max}/K_m ratios are provided as relative values toward that for APAL, which was set arbitrarily equal to 1. The abbreviation ND stands for "not determined" and refers to those cases, where activity was too low to measure the kinetic parameters

LeAMADH1, the K_m values were around 400 μM for purine-derived aldehydes and over 1 mM for 7-deazapurine-derived aldehydes. PsAMADH1 oxidized PyrPm-ABAL with a K_m value of 280 μM and PsAMADH2 oxidized Pu-AEAL providing a K_m value of 755 μM. 3-Methylthiopropanal was oxidized by all four studied AMADH isoenzymes providing K_m values between 10 and 50 μM. The highest value of 44 μM was determined for its oxidation by PsAMADH2, for LeAMADH1 the K_m value was 29 μM (Table 4). The V_{max}/K_m ratios presented in Tables 3 and 4 clearly show that only some pyridine-derived aldehydes can be considered good substrates of pea and tomato AMADHs. The other oxidized compounds should be referred to as weak substrates. Examples of V_{max} and K_m determination from the measured data are provided in Fig. 3.

Analysis of the reaction mixture by LC–MS

During oxidation of an ω-aminoaldehyde substrate in AMADH reaction, the release of the corresponding ω-amino acid is accompanied by the formation of NADH. There are two ways for analyzing the possible substrate properties of an aldehyde compound toward AMADH. In the above text, the described kinetic parameters were measured by monitoring the changes in NADH absorption at 340 nm (the well-known optical test for NAD^+-dependent dehydrogenases by Warburg and Christian 1943). The second possibility is based on a direct measurement of carboxylic acid in the reaction mixture, which appears as a product along with NADH. Due to its unparalleled speed, sensitivity, specificity and ease of use, mass spectrometry has emerged as a powerful tool for identifying organic compounds (Crews et al. 2010). Solutions of the studied aldehydes made in a mass-spectrometry compatible buffer (ammonium bicarbonate) were incubated with the enzyme and then subjected to ultrafiltration (10-kDa-cutoff Microcon centrifugation cartridges by Millipore, Bedford, MA, USA) for obtaining a protein-free filtrate. The filtrate was then separated by LC–MS (see "Materials and methods" for details). Pyridinecarboxylates were previously demonstrated as products in the individual reaction mixtures of PsAMADH2 and the three position isomers of pyridinecarbaldehydes. In that case, however, no separation was involved and the samples were directly introduced into the mass spectrometer (Tylichová et al. 2010). Figure 4 shows the LC–MS analysis of the reaction mixture of LeAMADH1 and Pu-ABAL. 4-(*9H*-Purin-6-ylamino)-butyric acid was eluted at 0.98 min (*m/z* 222 and *m/z* 204—neutral loss of water; $[M+H]^+$) in contrast to the aldehyde at 2.23 min (*m/z* 206, not shown; $[M+H]^+$). (Pyridinylmethyl)-aminobutyric acids (*m/z* 195 and *m/z* 177—neutral loss of water; $[M+H]^+$) were demonstrated as products of the enzymatic oxidation of PMet-ABALs. 2,6-diCl-4-PCAL was oxidized to 2,6-dichloroisonicotinic acid (*m/z* 193; $[M+H]^+$). Similarly, the expected oxidation products of Met-S-PAL, P3PAL, Pu-AEAL and PyrPm-ABAL were detected by peaks with *m/z* 121, 152, 194 and 221, respectively.

Docking of substrates into the active site of PsAMADH2

As there is the crystal structure of PsAMADH2 available (Tylichová et al. 2010), docking experiments were

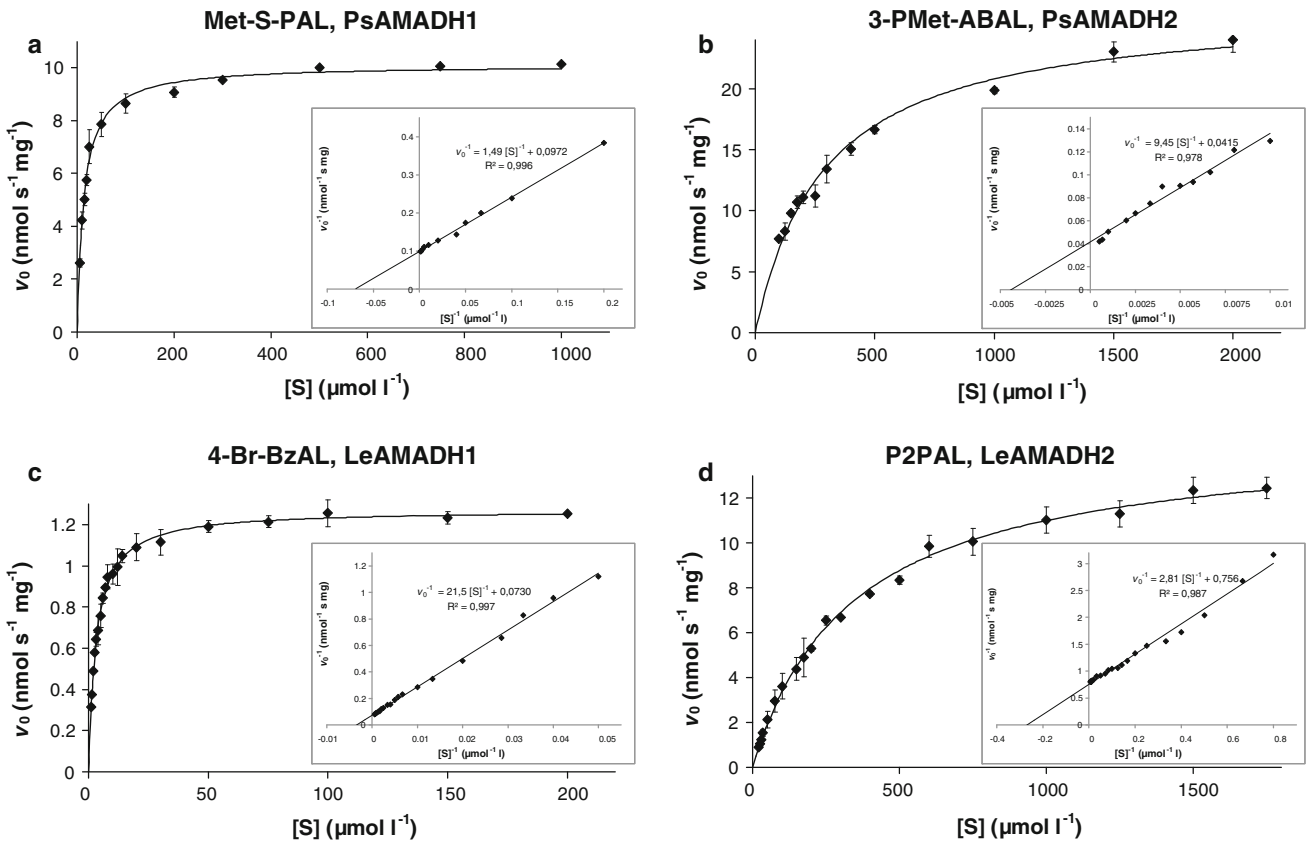


Fig. 3 Substrate properties of the studied compounds. There are selected saturation curves from kinetic measurements shown with the corresponding Lineveaver–Burk plots (in the *insets*); symbols on axes: v_o, initial velocity; [S], substrate concentration. Enzyme activity was assayed spectrophotometrically by monitoring the formation of NADH at 23°C. The reaction proceeded in 0.15 M Tris–HCl buffer, pH 9.0: **a** oxidation of 3-(methylthio)propanal (Met-S-PAL) by PsAMADH1; **b** oxidation of 4-[(pyridin-3-ylmethyl)amino]butanal (3-PMet-ABAL) by PsAMADH2; **c** oxidation of 4-bromobenzaldehyde (4-Br-BzAL) by LeAMADH1; **d** oxidation of 3-pyridin-2-yl-propanal (P2PAL) by LeAMADH2

involved to look closer at the interactions of PsAMADH2 and halogenated 4-pyridinecarbaldehydes or (pyridinylmethylamino)-aldehydes. The kinetic results obtained with these compounds revealed significant differences related to the position of the halogen substituent and the length and position of the aldehyde side chain, respectively, at the pyridine ring. Only 2- or 2,6-halogen derivatives of 4-PCAL were found substrates of the studied enzymes, whereas the corresponding 3- or 3,5-halogen derivatives were not oxidized at all. Figure 5 shows the docking results for 2,6-diCl-4-PCAL and 3,5-diCl-4-PCAL. The simulated binding provided a rotated position of the pyridine ring in 3,5-diCl-4-PCAL toward that of 2,6-diCl-4-PCAL. In consequence, the distance between the carbon atom in the ligand carbonyl group and Cys 294 sulfur increased from 3.6 Å in the case of 2,6-diCl-4-PCAL to 4.9 Å in the case of 3,5-diCl-4-PCAL. A comparison of the docking results for 4-PMet-ABAL, 2-PMet-ABAL, 4-PMet-APAL and 2-PMet-APAL indicated a similar binding simulation with the carbonyl group guided to the catalytic Cys294 of PsAMADH2 (Fig. 6). The distance between the carbon atom in the ligand carbonyl group and Cys 294 sulfur increased from 3.8 Å in the case of both PMet-ABALs to 5.0 and 5.1 Å in the case of 2-PMet-APAL and 4-PMet-APAL, respectively. The docking studies demonstrated that despite binding of a pyridine-derived aldehyde compound at the active site, substituents on the heterocycle and the length of the attached aliphatic chain carrying the aldehyde group may result in a binding mode which obstructs the productive interaction with the catalytic thiol.

Structural clues to substrate specificity of plant AMADHs have recently been investigated using site-directed mutagenesis (Kopečný et al. 2011). The enzymes possess a substrate channel with acidic amino acid residues at the entrance and aromatic amino acid residues in the interior (Tylichová et al. 2010). The acidic residues are essential for both the activity and affinity of the enzymes to ω-aminoaldehydes: PsAMADH2 turns into a nonspecific aldehyde dehydrogenase with capronaldehyde as the best substrate upon triple mutation E106A+D110A+D113A. The aromatic residues (Y163, W170 and W288 in PsAMADH2) contribute to an appropriate orientation of the

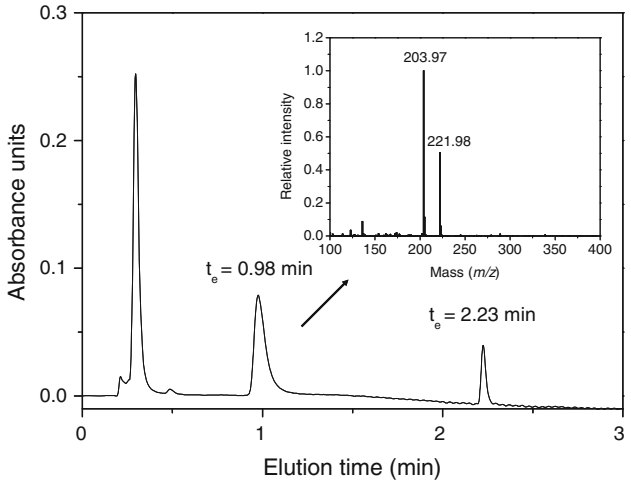


Fig. 4 LC–MS of the reaction mixture containing LeAMADH1 and 4-(9*H*-purin-6-ylamino)butanal (Pu-ABAL). The reaction mixture in a total volume of 2 ml contained 100 mM NH_4HCO_3, 1.5 mM NAD^+, 1 mM substrate and 100 µg of recombinant LeAMADH1. On mixing the components, it was incubated overnight at 23°C. *Main panel* liquid chromatographic separation of the reaction mixture on a Nucleodur® C18 Gravity column. *Inset* a mass spectrum of the fraction eluted in the retention time interval 0.95–1.07 min with two dominants peaks—*m/z* 222 refers to a pseudomolecular ion $[M+H]^+$ of 4-(9*H*-purin-6-ylamino)butyric acid, *m/z* 204 then indicates a neutral loss of water from the compound. The fraction eluted in the retention time interval 2.21–2.27 min provided a mass spectrum consistent with unreacted 4-(9*H*-purin-6-ylamino)butanal, i.e., Pu-ABAL (a pseudomolecular ion with *m/z* 206; not shown)

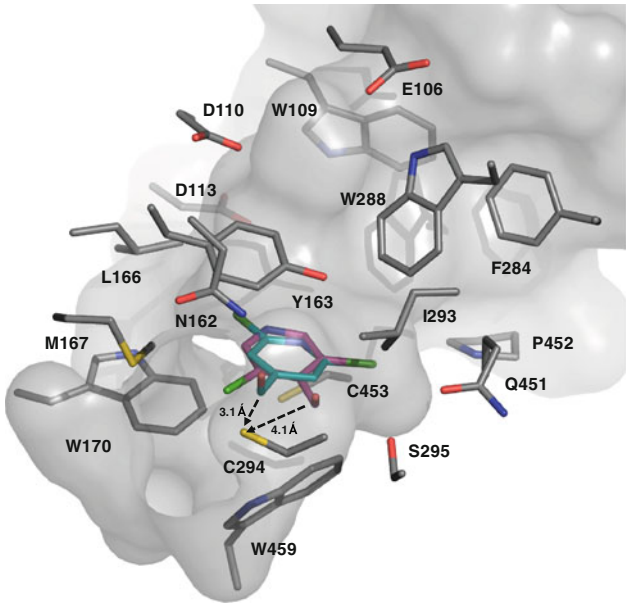


Fig. 5 Docking of dichloro-pyridinecarbaldehydes into the active site of PsAMADH2. The docked molecules of 2,6-dichloropyridine-4-pyridinecarbaldehyde (2,6-diCl-4-PCAL) and 3,5-dichloro-4-pyridinecarbaldehyde (3,5-diCl-4-PCAL) are superposed for comparison. Carbon atoms of 2,6-diCl-4-PCAL and 3,5-diCl-4-PCAL are colored in *turquoise blue* and *magenta*, respectively, oxygen atoms are in *red*, nitrogen atoms in *blue* and chlorine atoms in *green*. Active-site residues of PsAMADH2 (PDB: 3IWJ) are labeled and depicted in *atom-coded colors*. *Black arrows* indicate the calculated distance between the carbon atom in the ligand carbonyl group and sulfur atom of the catalytic C294, which is 3.6 and 4.9 Å for 2,6-diCl-4-PCAL and 3,5-diCl-4-PCAL, respectively. Substrate channel surface was calculated using Hollow (Ho and Gruswitz 2008). Docking was performed using Autodock 3.0 (Morris et al. 1998); structures were drawn by PyMOL 1.2 (DeLano 2002) (color figure online)

substrate toward the catalytic cysteine (Kopečný et al. 2011). The residue W109 in PsAMADH2, which divides the upper funnel-shaped domain of the substrate channel into two halves (Tylichová et al. 2010), is replaced by alanine in PsAMADH1 and LeAMADH1 and serine in LeAMADH2. Such a substitution does not influence kinetic properties as demonstrated by measurements with W109A mutant of PsAMADH2 (Kopečný et al. 2011). However, when it is accompanied by an additional substitution of W288 to A288 like in the case of LeAMADH1, the substrate channel becomes larger and thus more accessible for bulkier substrates (e.g., purine- and 7-deazapurine-derived aldehydes described in this study). The presence of F288 instead of W288 in PsAMADH1 increases the cavity diameter to a smaller extent. In consequence, the difference in substrate specificity between PsAMADH1 and PsAMADH2 is less pronounced than that between PsAMADH2 and LeAMADH1.

Conclusions

AMADHs have long been known as enzymes that oxidize ω-aminoaldehydes. However, recently published studies have shown that they appear to have rather broad substrate specificity including also aldehydes with *n*-alkyl chains as well as certain nitrogenous heterocyclic aldehydes (Gruez et al. 2004; Tylichová et al. 2010). We provide further evidence to support the knowledge of less-specific character of the enzymes. There are four main findings that result from the present study. Firstly, plant AMADHs are able to oxidize aldehydes derived from pyridine, purine, 7-deazapurine and pyrimidine. In addition, some halogenderivatives of pyridinecarbaldehydes are also converted. When compared with the conversion of aromatic and aromatic heterocyclic aldehydes by human mitochondrial ALDH2 (Klyosov 1996), their binding at the active site is much weaker as documented by the results of experimental determination of Michaelis constants. For example, the affinity of human ALDH2 to 3-PCAL is characterized by a K_m value of 2 µM, whereas PsAMADH2 and LeAMADH1 shows K_m values higher by one or two orders of magnitude. Based on the determined catalytic efficiency values, only a very few compounds from the studied collection can be considered good substrates. Secondly, due to their relatively high K_m values (in comparison with the

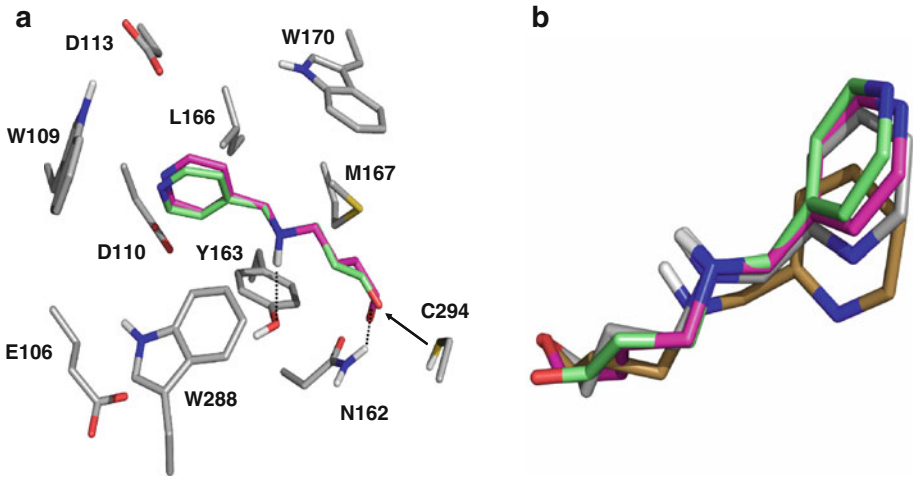


Fig. 6 Docking of (pyridinylmethylamino)-aldehydes into the active site of PsAMADH2. **a** Superposition of 4-[(pyridin-4-ylmethyl) amino]butanal (4-PMet-ABAL) and 3-[(pyridin-4-ylmethyl) amino]propanal (4-PMet-APAL) docked into the active site of PsAMADH2 (PDB: 3IWJ). Carbon atoms of 4-PMet-ABAL and 4-PMet-APAL are colored in *magenta* and *green*, respectively, oxygens are in *red*, nitrogens in *blue* and hydrogens in *light gray*. Active-site residues of PsAMADH2 are labeled and depicted in *atom-coded colors*. *Dashed lines* indicate possible hydrogen bonding interactions. The calculated distance between the carbon atom in the ligand carbonyl group and sulfur atom of the catalytic C294 (*black arrow*) is 3.8 and 5.1 Å for 4-PMet-ABAL and 4-PMet-APAL, respectively. **b** A superposition of the docked molecules (see from the top to the bottom with respect to the pyridine ring): 4-PMet-APAL (*green*), 4-PMet-ABAL (*magenta*), 2-PMet-ABAL (*gray*) and 2-PMet-APAL (*light brown*). Docking was performed using Autodock 3.0 (Morris et al. 1998); structures were drawn by PyMOL 1.2 (DeLano 2002) (color figure online)

physiological substrate APAL), nitrogenous heterocyclic compounds probably cannot represent substrates under in vivo conditions, nevertheless they might be efficiently converted at high concentration levels contributing in this way to the detoxifying role of AMADHs in the cell. Thirdly, substrate properties toward plant AMADHs of nitrogenous heterocyclic aldehydes are significantly dependent on the ring substitution pattern or the length of the aldehyde side chain. It has been described that *o*-benzaldehydes and 2-substituted naphthaldehydes are worse substrates of human ALDH2 than their isomers with a substitution at more distant positions toward the aldehyde group (Klyosov 1996). Similar observations were made also in this work, e.g., for 4-PCAL derivatives with halogen atom substitutions. Finally, we demonstrated that plant AMADH isoenzymes may show a big divergence with respect to their substrate specificity. This is not surprising for an interspecific comparison of AMADHs like in the case of pea and tomato but surprises at the level of a single species (e.g., LeAMADH1 vs. LeAMADH2). Such diversity might be helpful for selecting proper isoenzyme candidates applicable to organic synthesis or as a biorecognition element in analytical devices (e.g., biosensors for the determination of aminoaldehydes and aldehydes in food, drinks and other biological samples). In plant biotechnology, transgenic plants overexpressing aldehyde dehydrogenase genes are studied with the aim of improving stress tolerance by metabolizing toxic aldehydes (Sunkar et al. 2003).

Acknowledgments This work was supported by OP RD&I grant no. ED0007/01/01 (Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research) and grant no. MSM0021622413 from the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic, plus grant no. 522/08/0555 from the Czech Science Foundation. We would also like to thank Hana Moskalíková, a former student of the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, for her valuable contribution to initial experiments.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brocker C, Lassen N, Estey T, Pappa A, Cantore M, Orlova VV, Chavakis T, Kavanagh KL, Oppermann U, Vasiliou V (2010) Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. J Biol Chem 285:18452–18463. doi:10.1074/jbc.M109.077925

Case DA, Cheatham TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, Onufriev A, Simmerling C, Wang B, Woods RJ (2005) The amber biomolecular simulation programs. J Comput Chem 26:1668–1688. doi:10.1002/jcc.20290

Chern MK, Pietruszko R (1995) Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. Biochem Biophys Res Commun 213:561–568. doi:10.1006/bbrc.1995.2168

Crews P, Rodríguez J, Jaspars M (2010) Organic structure analysis, 2nd edn. Oxford University Press, New York, p 273

DeLano W (2002) The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific, Palo Alto. http://www.pymol.org

Farrés J, Wang X, Takahashi K, Cunningham SJ, Wang TT, Weiner H (1994) Effects of changing glutamate 487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. A model to study human (oriental type) class 2 aldehyde dehydrogenase. J Biol Chem 269:13854–13860

Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JA Jr, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA (2004) Gaussian 03, Revision C.02. Gaussian Inc., Wallingford

Gruez A, Roig-Zamboni V, Grisel S, Salomoni A, Valencia C, Campanacci V, Tegoni M, Cambillau C (2004) Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase. J Mol Biol 343:29–41. doi:10.1016/j.jmb.2004.08.030

Hill JP, Dickinson FM (1988) Pre-steady-state kinetics of aldehyde oxidation by pig liver cytosolic aldehyde dehydrogenase. Biochem Soc Trans 16:856–857

Ho BK, Gruswitz F (2008) HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures. BMC Struct Biol 8:49. doi:10.1186/1472-6807-8-49

Kaiser JP, Feng Y, Bollag JM (1996) Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. Microbiol Rev 60:483–498

Kaplan NO, Goldin A, Humphreys SR, Stolzenbach FE (1957) Pyridine precursors of mouse liver diphosphopyridine nucleotide. J Biol Chem 226:365–371

Kirch HH, Nair A, Bartels D (2001) Novel ABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. Plant J 28:555–567. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01176.x

Kirch HH, Bartels D, Wei Y, Schnable PS, Wood AJ (2004) The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*. Trends Plant Sci 9:371–377. doi:10.1007/s11103-004-7796-6

Klyosov AA (1996) Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenase toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. Biochemistry 35:4457–4467. doi:10.1021/bi9521102

Kopečný D, Tylichová M, Snégaroff J, Popelková H, Šebela M (2011) Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω-aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. FEBS J 278:3130–3139. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08239.x

Mancuso AJ, Huang SL, Swern D (1978) Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide "activated" by oxalyl chloride. J Org Chem 43:2480–2482. doi:10.1021/jo00406a041

Marchitti SA, Orlicky DJ, Vasiliou V (2007) Expression and initial characterization of human ALDH3B1. Biochem Biophys Res Commun 356:792–798. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.046

Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V (2009) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. Expert Opin Drug Metab Toxicol 4:697–720. doi:10.1517/17425250802102627

Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J Comput Chem 19:1639–1662. doi:10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639:AID-JCC10>3.0.CO;2-B

Panoutsopoulos GI, Kouretas D, Beedham C (2004) Contribution of aldehyde oxidase, xanthine oxidase, and aldehyde dehydrogenase on the oxidation of aromatic aldehydes. Chem Res Toxicol 2004:1368–1376. doi:10.1021/tx030059u

Pearlman DA, Case DA, Caldwell JW, Ross WS, Cheatham TE, Debolt S, Ferguson D, Seibel G, Kollman P (1995) Amber, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. Comput Phys Commun 91:1–41. doi:10.1016/0010-4655(95)00041-D

Perozich J, Nicholas H, Wang BC, Lindahl R, Hempel J (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. Protein Sci 8:137–146. doi:10.1110/ps.8.1.137

Prokop M, Adam J, Kříž Z, Wimmerová M, Koča J (2008) TRITON: a graphical tool for ligand-binding protein engineering. Bioinformatics 24:1955–1956. doi:10.1093/bioinformatics/btn344

Rhodes D, Hanson AD (1993) Quarternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 44:357–384. doi:10.1146/annurev.pp.44.060193.002041

Sánchez-Sandoval A, Alvarez-Toledano C, Gutiérrez-Pérez Y, Reyes-Ortega Y (2003) A modified procedure for the preparation of linear polyamines. Synth Commun 33:481–492. doi:10.1081/SCC-120015780

Šebela M, Brauner F, Radová A, Jacobsen S, Havliš J, Galuszka P, Peč P (2000) Characterization of a homogenous plant aminoaldehyde dehydrogenase. Biochim Biophys Acta 1480:329–341. doi:10.1016/S0167-4838(00)00086-8

Šebela M, Štosová T, Havliš J, Wielsch N, Thomas H, Zdráhal Z, Shevchenko A (2006) Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. Proteomics 6:2959–2963. doi:10.1002/pmic.200500576

Sophos NA, Vasiliou V (2003) Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. Chem Biol Interact 143–144:5–22. doi:10.1016/S0009-2797(02)00163-1

Sunkar R, Bartels D, Kirch HH (2003) Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. Plant J 35:452–464. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01819.x

Tylichová M, Briozzo P, Kopečný D, Ferrero J, Moréra S, Joly N, Snégaroff J, Šebela M (2008) Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64:88–90. doi:10.1107/S1744309107068522

Tylichová M, Kopečný D, Moréra S, Briozzo P, Lenobel R, Snégaroff J, Šebela M (2010) Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. J Mol Biol 396:870–882. doi:10.1016/j.jmb.2009.12.015

Vasiliou V, Nebert DW (2005) Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. Hum Genomics 2:138–143

Vriend G (1990) WHAT IF—a molecular modeling and drug design program. J Mol Graph 8:52–56

Warburg O, Christian W (1943) Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Zymohexase. Biochem Z 314:149–176 (in German)

Weiner SJ, Kollman PA, Case DA, Singh UC, Ghio C, Alagona G, Profeta S, Weiner P (1984) A new force-field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. J Am Chem Soc 106:765–784. doi:10.1021/ja00315a051

Wood AJ, Duff RJ (2009) The aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily of the moss *Physcomitrella patens* and the algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Ostreococcus tauri*. Bryologist 112:1–11. doi:10.1639/0007-2745-112.1.1

N-acyl-ω-aminoaldehydes are efficient substrates of plant aminoaldehyde dehydrogenases

Jan Frömmel[1], Marek Šebela[1,*], Gabriel Demo[2,3], René Lenobel[1], Tomáš Pospíšil[4], Miroslav Soural[5,6] and David Kopečný[1,*]

[1]Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic; [2]Central European Institute of Technology and [3]National Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, CZ-625 00, Brno, Czech Republic; [4]Department of Chemical Biology, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic; [5]Department of Organic Chemistry, Faculty of Science and [6]Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

*Corresponding authors: marek.sebela@upol.cz, kopecny_david@yahoo.co.uk
Tel.: +420 585634927 (M.S.), +420 585634840 (D.K.)

Keywords

N-acylation; aminoaldehyde dehydrogenase; isoenzyme; KF-celite; NAD^+; substrate docking

Abbreviations

Ac-ABAL, 4-acetamidobutanal; Ac-APAL, 3-acetamidopropanal; ALDH, aldehyde dehydrogenase; AMADH, aminoaldehyde dehydrogenase; APAL, 3-aminopropanal; ABAL, 4-aminobutanal; BAL, betaine aldehyde; BADH, betaine aldehyde dehydrogenase; GABA, 4-aminobutyric acid; GBAL, 4-guanidinobutanal; PsAMADH, aminoaldehyde dehydrogenase from pea (*Pisum sativum*); TMABAL, 4-trimethylaminobutanal

Abbreviations for names of all new synthetic *N*-acyl-ω-aminoaldehydes (15 compounds) are completely elucidated in the Supplementary file 1 (Met stands for methyl, Propi for propionyl, Butyr for butyryl, Valer for valeryl and Adip for adipoyl).

Abstract

Plant aminoaldehyde dehydrogenases (AMADHs, EC 1.2.1.19) belong to the family 10 of aldehyde dehydrogenases and participate in the metabolism of compounds related to amino acids such as polyamines or osmoprotectants. Their broad specificity covers ω-aminoaldehydes, aliphatic and aromatic aldehydes as well as nitrogen-containing heterocyclic aldehydes. The substrate preference of plant AMADHs is determined by the presence of aspartic acid and aromatic residues in the substrate channel. In this work, 15 new *N*-acyl derivates of 3-aminopropanal (APAL) and 4-aminobutanal (ABAL) were synthesized and confirmed as substrates of two pea AMADH isoenzymes (PsAMADH 1 and 2). The compounds were designed considering the previously demonstrated conversion of *N*-acetyl derivatives as well as substrate channel dimensions (5-8 Å x 14 Å). The acyl chain length and its branching were found less significant for substrate properties than the length of the initial natural substrate. In general, APAL derivatives were found more efficient than the corresponding ABAL derivatives because of the prevailing higher conversion rates and lower K_m values. Differences in enzymatic performance between the two isoenzymes corresponded in part to their preferences to APAL to ABAL. The higher PsAMADH2 affinity to substrates correlated with more frequent occurrence of an excess substrate inhibition. Molecular docking indicated the possible auxiliary role of Tyr163, Ser295 and Gln451 in binding of the new substrates. The only derivative carrying a free carboxyl group (*N*-adipoyl APAL) was surprisingly better substrate than ABAL in PsAMADH2 reaction indicating that also negatively charged aldehydes might be good substrates for ALDH10 family.

Introduction

Aldehyde dehydrogenases (ALDHs) constitute a superfamily of oxidoreductive enzymes. ALDH10 family members in plants are aminoaldehyde dehydrogenases (AMADHs) and oxidize ω-aminoaldehydes to the corresponding amino acids using $NAD(P)^+$ as a coenzyme (Brocker et al., 2013). Because of their broad substrate specificity, the enzymes used to be named 4-aminobutyraldehyde dehydrogenases (ABALDHs, EC 1.2.1.19), 4-guanidinobutyraldehyde dehydrogenases (GBALDHs, EC 1.2.1.54) and betaine aldehyde dehydrogenases (BADHs, EC 1.2.1.8). There are several crystal structures of plant ALDH10 enzymes available (Tylichová et al., 2010; Díaz-Sánchez et al., 2012; Kopečný et al., 2013). The enzymes exist as homodimers with a typical ALDH subunit fold comprising a catalytic domain, a coenzyme-binding domain and an oligomerization domain. There is also a 14-Å-long substrate channel in each monomer. The active site contains three strictly conserved residues (Asn, Glu and Cys) that are essential for the catalysis. Usually, there are two isoforms in plants with different substrate specificity. PsAMADH1 and PsAMADH2 in pea (*Pisum sativum*) differ in a few substrate-channel residues: Ala109/Trp109, Phe288/Trp288 and Ser453/Cys453, respectively (Tylichová et al. 2010). ALDHs of the family 10 participate in several metabolic pathways: polyamine catabolism, production of osmoprotectants and carnithine biosynthesis (Díaz-Sánchez et al., 2012; Kopečný et al., 2013).

Natural substrates of plant AMADHs include for example 3-aminopropanal (APAL) (Awal et al., 1995), 4-aminobutanal (ABAL), 4-guanidinobutanal (GBAL) (Matsuda and Suzuki, 1984), 4-trimethylaminobutanal (TMABAL) (Fujiwara et al., 2008) or betaine aldehyde (BAL) (Weigel et al., 1986). Polyamine-derived APAL is reactive and cytoxic. Thus its oxidation to β-alanine represents a detoxification process (Li et al., 2003). ABAL arises from putrescine oxidation by diamine oxidase (EC 1.4.3.22) and spontaneously cyclizes to non-toxic 1-pyrroline (Smith et al., 1986). ABAL or 1-pyrroline oxidation provides 4-aminobutyric acid (GABA) (Shelp et al., 2012). On the other hand, a lack of ABAL oxidation leads to the production of 2-acetyl-1-pyrroline in aromatic rice varieties (Bradbury et al.,

2008). GBAL originates from arginine degradation (Matsuda and Suzuki, 1984) and its oxidation produces 4-guanidinobutyric acid.

BAL is produced by choline oxidation and finally converted by ALDH10 enzymes specific for this compound (frequently referred to as BADHs) to glycine betaine (betaine), a compatible osmolyte protecting against drought and salinity (Rhodes et al., 1989). The acetylated polyamines N^1-acetylspermine and N^1-acetylspermidine are oxidized by N^1-acetylpolyamine oxidase (EC 1.5.3.13) to spermidine and putrescine (Tavladoraki et al., 2006), respectively, and 3-acetamidopropanal (Ac-APAL), which is another natural substrate of plant AMADHs (Kopečný et al., 2013). Aliphatic aldehydes are only weak substrates (Tylichová et al., 2010).

Plant AMADHs also oxidize a wide range of synthetic aromatic aldehydes containing benzene, pyridine, pyrimidine or purine ring (Frömmel et al., 2012). These compounds are typically metabolized by other members of the ALDH superfamily such as nonspecific ALDHs (EC 1.2.1.3) (Peng et al., 2005), benzaldehyde dehydrogenase (1.2.1.28) (Gaid et al., 2009, Long et al., 2009) or *p*-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.64) (Chakraborty et al., 2009). Substrate properties of aromatic aldehydes are influenced by the position of a possible substituent, when a higher distance from the aldehyde group is more favorable (Frömmel et al., 2012).

The carboxylic acids produced by AMADH reaction in plants can be further metabolized. For example, β-alanine can be methylated to yield the osmoprotectant β-alanine betaine (Hanson et al., 1994). GABA is incorporated into the citric acid cycle after its transamination and oxidation to succinic acid (Shelp et al., 1999). The oxidation of TMABAL (derived from lysine) in plants probably represents a step in the biosynthesis of carnitine (Rippa et al., 2012), which is used for fatty acid transportation in the mitochondrion, as it is well known in mammals (Vaz and Wanders, 2002). Glycine betaine is not further metabolized as has been demonstrated in sugar beet and its wild progenitor (Hanson and Wyse, 1982). No radioactive metabolites of [^{14}C] glycine betaine were detected in these plants upon feeding experiments.

Based on the fact that Ac-APAL is an efficient substrate of plant ALDH10 enzymes (Kopečný et al., 2013) and also 4-acetamidobutanal (Ac-ABAL) is well oxidized by certain representatives of this group (Bradbury et al., 2008), it was challenging to evaluate substrate properties of a series of *N*-acyl-ω-aminoaldehydes with a different length and branching of the acyl chain. A total of 15 new compounds were synthesized and subjected to oxidation by PsAMADH1 and PsAMADH2. They were all found substrates.

Materials and methods

Chemicals

Diethylacetals of APAL and ABAL as well as NAD^+ were from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany). The following acyl chlorides were purchased from the same vendor: acetyl chloride, butyryl chloride, isobutyryl chloride, isovaleryl chloride, methyl adipoyl chloride, 2-methyl butyryl chloride, propionyl chloride, valeryl chloride and trimethylacetyl chloride. All other chemicals were of analytical purity grade.

Preparation of enzymes

PsAMADH1 and PsAMADH2 were used as recombinant proteins. The procedure of cloning, expression and purification of both enzymes was described earlier (Tylichová et al., 2008, 2010). Protein concentration was assayed by a colorimetric method with bicinchoninic acid (Smith et al., 1985) or by a direct measurement at 280 nm on a BioSpec-nano micro-volume spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) using calculated extinction coefficients (Tylichová et al., 2010).

Synthesis of N-acyl-ω-aminoaldehydes

Diethylacetals of APAL and ABAL were subjected to *N*-acylation with acyl chlorides using KF-celite as a heterogeneous catalyst (Ando and Yamawaki, 1979). KF-celite (5 g) was suspended in acetonitrile (50 ml; dried by sodium sulfate) containing APAL or ABAL diethylacetal (6 mmol) and the mixture was

kept at laboratory temperature under continuous stirring on a magnetic stirrer. After 15 min of stirring, an acylchloride (6 mmol) was added dropwise over a period of 30 min. Then the resulting solution was set aside for another 30 min. Later on, KF-celite was filtered out and acetonitrile removed from the filtrate in a rotary vacuum evaporator. Acetyl derivatives of APAL and ABAL were prepared according to previous protocols (Wood et al., 2007; Kopečný et al., 2013).

Routine NMR spectra for purity evaluation of the synthesized compounds were acquired on a JEOL JNM-ECA 500 (JEOL, Tokyo, Japan; ^{1}H - 500 MHz, ^{13}C - 125 MHz) spectrometer equipped with a 5 mm JEOL Royal probe. Data analysis was performed in DELTA NMR software (JEOL). ^{1}H NMR and ^{13}C NMR chemical shifts (δ) were calibrated using tetramethylsilane (TMS, ^{1}H δ = 0 ppm) or solvents: $CDCl_3$ (^{1}H δ = 7.25 ppm, ^{13}C δ = 77.16 ppm) or DMSO-d_6 (^{1}H δ = 2.46 ppm, ^{13}C δ = 40.00 ppm). The deuterated solvents were from Sigma-Aldrich Chemie.

Prior to activity assay, the synthesized acetals were converted to free aldehydes by 0.1 M hydrochloric acid after heating at 100 °C (Trossat et al., 1997). During such a treatment, diethylacetal of methyl-esterified *N*-adipoyl derivative of APAL was converted to a free *N*-adipoyl APAL because of the concomitant hydrolysis of the ester group.

Activity assay

AMADH activity was assayed by monitoring the production of NADH during oxidation of a substrate (ε_{340} = 6,620 l mol$^{-1\cdot}$ cm^{-1}) as decribed (Tylichová et al., 2010). All measurements were performed on an Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at 30 °C. The reaction mixture in a total volume of 2.0 ml contained 0.1 mol l^{-1} Tris-HCl, pH 9.0, 0.5 mmol l^{-1} NAD^+ and a proper amount of the enzyme (at the level of micrograms). The reaction was initiated by adding substrate: final concentrations of 1 mmol l^{-1} were chosen for evaluation of relative reaction rates. In experiments designed to obtain the steady-state kinetic parameters (K_m and V_{max}), the final concentration of substrate usually varied between 0.05 - 4 mmol l^{-1} and 0.02 - 2 mmol l^{-1} for PsAMADH1 and PsAMADH2 reaction, respectively. All kinetic measurements were carried out in

triplicates. Data analysis was performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The nonlinear regression used was based either on the Michaelis-Menten equation $v = V_{max} \cdot [S] / (K_m + [S])$ for common substrates or on a modified equation $v = V_{max} \cdot [S] / (K_m + [S] \cdot (1 + [S]/K_{ss}))$ for substrates showing excess substrate inhibition. In these equations, K_m denotes Michaelis constant, K_{ss} substrate inhibition constant, V_{max} maximum velocity, v initial velocity and [S] substrate concentration.

Detection of reaction products

In order to identify *N*-acylated amino acid products generated from the synthesized compounds, AMADH reaction mixtures were subjected to mass spectrometric analysis. At the beginning, PsAMADH2 (2.9 mg ml^{-1}) was dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0, at 4 °C overnight. Then the reaction mixture in a total volume of 4 ml contained 3.72 ml of 0.1 M ammonium bicarbonate, pH 8.0, 150 µl of 40 mM NAD^+, *N*-acyl-ω-aminoaldehyde in a final concentration of 1.0 mM and 30 µl of the dialyzed enzyme solution. The reaction was started by substrate addition and proceeded on a magnetic stirrer at laboratory temperature overnight. The enzyme was removed by ultrafiltration using centrifugal filter units Amicon Ultra-0.5 with a cut-off of 10 kDa (Sigma-Aldrich Chemie). The ultrafiltrates were analyzed using a UHR-Q-TOF mass spectrometer maXis (Bruker Daltonik, Bremen. Germany) in the positive mode. Prior to analysis, the filtrate was diluted 10 times with water (MS quality, Sigma-Aldrich) and introduced by a syringe via syringe pump (Harward Apparatus, USA) into the ESI ion source at a flow rate of 3 µl min^{-1}. The MS parameter settings were as follows: capillary source - 4500 V, dry gas - 4 l min^{-1}, desolvatation gas - 0.6 bar, dry temperature - 180 °C. Tune page settings were optimized for an acquisition of a low-molecular-weight compound. MS spectra were recorded in the mass range of *m/z* 50 - 500 with a frequency of 1 Hz.

Substrate docking into the crystal structures

To better understand their interaction with PsAMADHs, the synthesized acylaminoaldehydes as well as two physiological substrates APAL and ABAL were docked into the active site of PsAMADH2 (PDB code 3IWJ). The procedures of working with the protein structure were done in the same way as described for docking of dichloropyridinecarbaldehydes and pyridinylmethylaminoaldehydes into the active site of PsAMADH2 (Frömmel et al., 2012). All ligand structures were built by PRODRG server (Schüttelkopf and van Aalten, 2004; http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg). The geometries of the ligand structures were optimized using the Hartree–Fock method with a 6-31G* basis set as implemented in the Gaussian 03 program (Frisch et al., 2004). The electro-static potential fitting (ESP) charges were calculated, and the RESP procedure of the Antechamber program from the AMBER suite was used to generate input files for docking programs (Case et al., 2005; Pearlman et al., 1995). The graphical user interface software Triton (Prokop et al., 2008) was employed to prepare, run, and analyze the docking simulations. Autodock 3.0 was used as a molecular docking tool (Morris et al., 1998) following the semi-flexible docking protocol with rigid target PsAMADH2 protein and flexible ligands (all rotatable dihedrals with exception of the aldehyde were allowed to rotate freely). Grid maps calculation was performed by AutoGrid 3.0 using the grid box (45 x 45 x 45 Å) centered to the substrate channel. Lamarckian genetic algorithm was used to accomplish docking calculations and a maximum of 200 conformers was considered for each compound. The population size was set to 50 and the individuals were initialized randomly. The maximum number of energy evaluations was 5×10^6 with the cluster tolerance 0.5 Å. Images of the most probable aldehyde position at the active site of PsAMADH2 were drawn by the PyMOL molecular graphic system, version 1.3 (Schrödinger LLC, USA; http://www.pymol.org).

Results and discussion

In this work, a series of new derivatives of two natural substrates of plant AMADHs, namely APAL and ABAL, was synthesized using *N*-acylation reactions with carboxylic acid chlorides as modifiers of

the ω-amino group. The compounds were designed based on the shape of the substrate channel of the enzymes, which is 14 Å long and 5-8 Å wide (Tylichová et al., 2010). The middle-section diameter size of the channel is related to substrate specificity (Kopečný et al., 2013). It was therefore expected that the presence of short acyl chains (up to five carbon atoms) at the amino group of a natural aminoaldehyde substrate would not prevent from its oxidation. On the other hand, a certain degree of variability in substrate efficiency resulting from the length and branching of the acyl group was assumed. Chemical syntheses involved diethylacetals of APAL and ABAL as starting compounds and Celite coated with potassium fluoride (KF-Celite) as a heterogeneous catalyst (Ando and Yamawaki, 1979). All products were worked-up by removing the solvent on a rotary vacuum evaporator and obtained in a high yield (above 80%). Chemical formulas of newly synthesized compounds as well as those of the respective acetyl derivatives are shown in Fig. 1. Purity of the products was checked and confirmed by NMR spectrometry. ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectral data are available as Supplementary file 1, where also abbreviations for names of the compounds are elucidated.

Substrate properties of all synthetic compounds were studied by kinetic measurements with two pea isoenzymes PsAMADH1 and PsAMADH2. Enzyme activity was analyzed on a spectrophotometer by monitoring the reduction of the coenzyme NAD^+ at 340 nm. The relative reaction rates at a substrate concentration of 1.0 mmol l^{-1} were in the range of 25 - 95 % for PsAMADH1 and 18 - 141 % for PsAMADH2 when compared with that of APAL oxidation (arbitrarily taken as 100 %). A similar comparison with respect to the ABAL oxidation rate showed the following values: 29 - 108 % and 55 - 433 %, respectively (Supplementary file 2). These data allowed setting up further experiments and recognizing certain rules with respect to the contribution of the acyl chain length and the presence of C3 or C4 core aminoaldehyde on substrate efficiency. The concentration of substrates used (1 mmol l^{-1}) is much higher than the K_m values for APAL and ABAL (~10^{-5} mol l^{-1}; Tylichová et al., 2010) and hence it can be expected that the enzymes would perform optimally in the cell at such a level of physiological or exogenous substrates. Generally, both isoenzymes oxidized *N*-acylated APAL derivatives more readily than the corresponding ABAL derivatives according to this rough evaluation

(with an exception of 2,2-diMet-Propi-ABAL versus 2,2-diMet-Propi-APAL in the reaction of PsAMADH1). The relative reaction rates for the oxidation of ABAL derivatives calculated towards the ABAL conversion rate were similar to the relative reaction rates for APAL derivatives carrying the same acyl chain calculated towards the APAL conversion rate. Thus the proportional factor for the same type of derivative appeared to be more or less constant. In the case of substrate conversion by PsAMADH1, APAL or ABAL derivatives with an unbranched acyl chain were converted at rates decreasing with the length of the chain. Interestingly, the same substrates did not fully display such a feature when oxidized by PsAMADH2.

It has been shown for ALDHs from the family 3 in Arabidopsis thaliana that the NAD^+ or $NADP^+$ coenzyme saturation concentrations vary depending on the aldehyde substrate. For example, in the case of ALDH3H1, the K_m value for NAD^+ was 3.5 times higher in the presence of hexanal than using nonenal as a substrate (Stiti et al., 2011). As regards to PsAMADH, such a behavior has not been reported. The K_m values of PsAMADH1 and PsAMADH2 for NAD^+ determined in the presence of APAL as a substrate are 40 and 55 µmol l^{-1}, respectively (Tylichová et al., 2010). Using ABAL as a substrate, both values appear around 50 µmol l^{-1} (Frömmel, unpublished results). The affinity of PsAMADH1 and 2 to the coenzyme NAD^+ did not change markedly in the presence of the synthetic substrates. The kinetic data obtained with variable NAD^+ concentrations and representative branched or unbranched N-acyl-ω-aminoaldehydes (at a fixed concentration of 1 mmol l^{-1}) are shown in Supplementary file 3. In all cases, the Km value for NAD^+ of 10-70 µM was determined.

Figs. 2 and 3 provide an overview of saturation curves obtained from kinetic experiments at different substrate concentrations. The values of Michaelis constant of PsAMADH1 and PsAMADH2 for the synthetic substrates were in the range of 120 - 1420 and 39 - 531 µmol l^{-1}, respectively, when subtracted from nonlinear regression of the corresponding curves (Table 1). The K_m values of PsAMADH1 for the *N*-acyl-ω-aminoaldehydes were at least two times higher than those for the natural substrates APAL and ABAL. Surprisingly, PsAMADH2 showed in some cases much higher differences such as 10 fold or even 60 fold. With only a few exceptions (Valer-APAL, 2-Met-Butyr-

APAL and 3-Met-Butyr-ABAL), PsAMADH2 showed higher affinity to the newly synthesized compounds than PsAMADH1. Although the K_m value of PsAMADH2 for 3-Met-Butyr-APAL was almost the same as that for PsAMADH1, it increased (up to 160 μmol l^{-1}) after omitting data obtained for high substrate concentrations (where an excess substrate inhibition was observed - see further). The K_m values for Butyr-APAL conversion by both isoenzymes were found the same based on the nonlinear regression (Table 1). In most cases, the K_m values for APAL derivatives were found lower than those for the corresponding ABAL derivates. There were only two exceptions: Propi-APAL/Propi-ABAL in PsAMADH1 reaction and 2-Met-Butyr-APAL/2-Met-Butyr-ABAL in PsAMADH2 reaction. For PsAMADH2, the Michaelis constant rather increased with the length of the acyl chain of C3-C5 unbranched substrates. This was not the case for PsAMADH1 and APAL derivatives: here the K_m value for Propi-APAL was higher than those for Butyr-APAL and Valer-APAL. Nevertheless, in three of four possibilities, the K_m values for Propi-APAL or Propi-ABAL were the lowest among all substrates comprising an unbranched C3-C5 acyl chain at the amino group. The K_m value of PsAMADH1 for Adip-APAL was higher than those for other APAL derivatives except for Propi-APAL. Interestingly, in the case of PsAMADH2 reaction, the K_m value for Adip-APAL was the lowest one from all synthetic compounds.

The effect of branching of the acyl chain was as follows: 1) the K_m values for Val-APAL and Val-ABAL were lower than those for the corresponding *N*-(2-methylbutyryl)aminoaldehydes; 2) the K_m values for 3-Met-Butyr-APAL and 3-Met-Butyr-ABAL were usually lower than those for the corresponding *N*-(2,2-dimethylpropionyl)aminoaldehydes; 3) the K_m values for Butyr-APAL and Butyr-ABAL were higher than those for the corresponding *N*-(2-methylpropionyl)aminoaldehydes; 4) the aminoaldehydes with 2-methylpropionyl chain were accepted by both isoenzymes with higher affinity than those with 2-methylbutyryl chain; 5) although the affinity of PsAMADH2 to *N*-(2-methylpropionyl)aminoaldehydes was higher than to *N*-(3-methylbutyryl)aminoaldehydes, an inverted result was achieved for PsAMADH1.

The V_{max} values determined for the synthetic derivatives reflected enzyme activities measured with the original compounds APAL and ABAL. When mutually compared, in most cases they were higher for APAL derivatives than for the corresponding ABAL derivatives and the differences were much more pronounced for PsAMADH2 (not shown). Table 1 contains a list of k_{cat} values calculated from the respective V_{max} values when taking the dimeric character of the isoenzymes into consideration. All catalytic constants appeared between 1.0-3.6 s^{-1} for PsAMADH1 and 1.4-13.9 s^{-1} for PsAMADH2. Interestingly, in the case of PsAMADH2, all APAL derivatives were converted with k_{cat} values similar (> 70%) or even higher (five compounds) than those for reference substrate APAL. This was not observed for PsAMADH1 and probably represents a reflection of the more pronounced preference to APAL over ABAL of PsAMADH2 (Tylichová et al., 2010).

The catalytic efficiency values (k_{cat}/K_m) of PsAMADH1 and PsAMADH2 were calculated to sort the synthesized compounds objectively according to their substrate properties. They were at the level of $10^3 – 10^5$ mol^{-1} l s^{-1} (Table 2). To obtain relative numbers for an easier comparison, the catalytic efficiency for APAL conversion was arbitrarily set at a value of 1.000 and the other values were recalculated accordingly. Then the relative catalytic efficiency values of PsAMADH1 and PsAMADH2 with *N*-acyl-ω-aminoaldehydes appeared in the range of 0.033 - 0.330 and 0.003 - 0.172, respectively (Table 2). In the given order, Valer-APAL, Ac-APAL and 2-Met-Propi-APAL were found the best three substrates of PsAMADH1 from the group of APAL derivatives, whereas Propi-ABAL, Ac-ABAL and 2-Met-Propi-ABAL were the best ones from the group of ABAL derivatives. In the case of PsAMADH2, such winners were Adip-APAL, Ac-APAL and Propi-APAL plus 2-Met-Propi-ABAL, Propi-ABAL and 3-Met-Butyr-ABAL, respectively. The k_{cat}/K_m value for Adip-APAL was almost two times higher than those for the second and third best substrates of PsAMADH2. Interestingly, Adip-APAL was three times better substrate of PsAMADH2 than ABAL (Table 2). No strict correlation was found between the catalytic efficiency values and the acyl chain length of the substrate. As regards to unbranched derivatives, acetyl and propionyl compounds were in most cases better substrates than butyryl and valeryl compounds (with an exception of APAL derivatives oxidized by PsAMADH1). Butyr-APAL and

Butyr-ABAL were weaker substrates than the corresponding branched 2-Met-Propi derivatives. Similarly, Valer-APAL and Valer-ABAL were rather weaker substrates than their counterpart 3-Met-Butyr derivatives but they were better or at the same level of substrate properties like the 2-Met-Butyr derivatives (Table 2).

An excess substrate inhibition was observed roughly in one half of the measured saturation curves. The determined inhibition constants K_{ss} were between 0.65 and 21.7 mmol l^{-1} (Table 3). Five synthetic substrates, namely Ac-APAL, Valer-APAL, 2,2-diMet-Propi-APAL, 2-Met-Propi-ABAL and Adip-APAL inhibited both isoenzymes in excess concentrations. The respective substrate inhibition constants (K_{ss}) values were usually lower for PsAMADH2, which thus appears more prone to this mode of inhibition for the given set of compounds. In agreement with this finding, six other compounds (Propi-APAL, 3-Met-Butyr-APAL, Ac-ABAL, Propi-ABAL, 3-Met-Butyr-ABAL and 2,2-diMet-Propi-ABAL) inhibited in excess concentrations PsAMADH2 only. There was no substrate which would exclusively inhibit PsAMADH1 in this way. A stronger substrate inhibition (measured with natural substrates) was observed previously also for maize and tomato isoforms carrying Trp residue at the position equivalent to Trp288 in PsAMADH2 (Kopečný et al. 2013).

In order to confirm the formation of carboxylic acids as products of enzymatic conversion, selected *N*-acyl-ω-aminoaldehydes were subjected to reactions with PsAMADH1 (Valer-APAL and Propi-ABAL) or PsAMADH2 (2,2-diMet-Propi-APAL and 3-Met-Butyr-ABAL) in the presence of NAD^+. After a prolonged incubation, the reaction mixtures in a volatile buffer were diluted and analyzed by mass spectrometry for the presence of peaks with *m/z* values corresponding to the expected product acids. As an illustration, Fig. 4 shows a result obtained with Valer-APAL. In this case, the *N*-acyl aminoaldehyde was oxidized to 3-(valerylamino)propionic acid, which provided a signal with *m/z* 174.1 in the mass spectrum.

The kinetic results reported here demonstrate that plant ALDH10 enzymes oxidize various *N*-acyl-ω-aminoaldehydes including branched-chain structures. So far, no aldehyde compound with a branched carbon chain in the molecule has been studied in this regard. Substrate properties were

much more affected by the number of carbon atoms of the core ω-aminoaldehyde chain than by the size and structural isomerism of the acyl substituent. It seems that plant ALDHs of this group could oxidize also other *N*-substituted derivatives of APAL and ABAL or aldehydes (including natural compounds) with structural features permitting similar orientation in the substrate channel and binding at the active site. It is worth of mentioning in this context that a conversion of 4-(3-aminopropylamino)butyraldehyde, which is the product of spermidine oxidation, has already been described (Šebela et al., 2000).

Docking experiments confirmed the affinity of PsAMADH2 to unbranched aliphatic *N*-acyl derivatives of APAL and ABAL as well as to 2,2-diMet-Propi- and 3-Met-Butyr- derivatives (Figs. 5 and 6). The respective values of free energy of binding and final docked energy are provided in Table 4 together with a list of interacting residues. There is no doubt that results of molecular docking of substrates into enzyme active sites have to be always interpreted carefully as this is just an approximation and obtaining crystal structures of the reacting molecules would provide data with higher confidence and biological value. The amide group of Ac-APAL was found to interact with OG atom of Ser295 and OE1 atom of Gln451; such an interaction was also demonstrated for the nitrogen atom of APAL amino group (Fig. 6). On the contrary, the amide group of longer *N*-acyl APAL derivates like Propi-APAL, Butyr-APAL and Valer-APAL did not provide any interaction with Ser295 and Gln451 but was in an H-bond distance from the side chain oxygen atom of Tyr163 (Fig. 6). Whereas Valer-APAL interacted with Tyr163 via the amide oxygen atom, both Propi-APAL, Butyr-APAL preferentially interacted via their amide nitrogen atom. ABAL was docked in a similar way like APAL. Conversely, the nitrogen atom of Ac-ABAL interacted with Tyr163 and not with Ser295 or Gln451. Butyr-ABAL was in a bond distance with Tyr163 via the acyl oxygen atom and Valer-ABAL interacted with Ser295 and Gln451 through both atoms from the amide group. Its nitrogen atom would then also interact with Tyr163. An interaction of 3-Met-Butyr-APAL with Ser295 via the substrate nitrogen atom and with Gln451 via both nitrogen and oxygen atom of the amide group was observed (Fig. 6). The two double

branched substrates were found in an interaction with Tyr163: either through the nitrogen atom (2,2-diMet-Propi-APAL) or via the acyl oxygen (2,2-diMet-Propi-ABAL); Fig. 5.

The only substrate containing a carboxylic group - Adip-APAL - was added to this study in order to evaluate the ability of AMADHs to oxidize aldehydes with a negative charge in the molecule. Adip-APAL was among the weakest substrates of PsAMADH1 considering the V_{max}/K_m ratio. Unexpectedly, it was the best synthetic substrate for PsAMADH2 and it was even better substrate than naturally occurring ABAL. Docking experiments revealed that the terminal carboxyl group of Adip-APAL establishes an H-bond interaction with NE1 atom of Trp170 and OG1 atom of Thr455 while the amide group binds to Tyr163 of PsAMADH2. On the contrary, PsAMADH1 carries nonpolar Ile455 and cannot establish an H-bond to the carboxyl of Adip-APAL (Fig. 5). This fact probably leads to the huge difference between both isoenzymes in acceptance of Adip-APAL as a substrate.

The docking experiments revealed that the substrate properties of *N*-acyl-ω-aminoaldehydes arise from their proper binding at the active site, which is facilitated by interactions with amino acid residues in the substrate channel such as Tyr163. The previously suggested importance of Tyr163 in allowing substrates to enter the active site in a proper orientation, which was deduced from mutagenesis results (Kopečný et al., 2011), has now been confirmed.

Conclusions

Both isoenzymes of PsAMADH oxidized *N*-acyl derivatives of their natural substrates APAL and ABAL. Kinetic parameters of the oxidation were much more affected by the number of carbon atoms of the core ω-aminoaldehyde chain than by the size and structural isomerism of the acyl chain bound to the amino group. Generally, APAL derivatives were better substrates than the corresponding derivatives of ABAL. None of the synthetic compounds was more efficient than the best natural substrate APAL. Nevertheless, in the case of PsAMADH2, two synthetic substrates (Adip-APAL and Propi-APAL) were superior to the other natural aminoaldehydes ABAL and Ac-APAL. The enzymatic conversion was confirmed by LC-MS analysis of reaction products. Molecular docking indicated the

possible interaction of the amide nitrogen and oxygen atoms of the synthetic substrates with three residues of PsAMADH2 substrate channel – Tyr163, Ser295 and Gln451. It becomes clear that ALDH10 enzymes may oxidize even more compounds than was expected. In addition to their known natural ω-aminoaldehyde and aldehyde substrates or the recently reported group of aromatic and heterocyclic aldehydes (Frömmel et al., 2012), the substrate specificity of plant ALDHs may also include certain acyl aldehydes or aldehydes with heteroatoms in their carbon chains (both linear or branched-chain structures) if they would bind properly at the active site, which is facilitated by interactions with substrate channel residues. This has a big implication for understanding the physiological role of plant ALDH10 enzymes, which might participate not only in polyamine metabolism and production of osmoprotectants but also in other metabolic pathways involving aldehydes (detoxification routes, secondary metabolism).

Acknowledgments

This work was supported by grant no. LO1204 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and grant no. P501/11/1591 from the Czech Science Foundation. The authors thank for the access to computing and storage facilities owned by parties and projects contributing to the National Grid Infrastructure MetaCentrum provided under the program "Projects of Large Infrastructure for Research, Development, and Innovations" (LM2010005).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Ando T, Yamawaki J (1979) Pottasium fluoride on celite. A versatitle reagent for C-, N-, O- and S-alkylations. Chem Lett 1:45-46, doi: 10.1246/cl.1979.45

Awal HMA, Yoshida I, Doe M, Hirasawa E (1995) 3-aminopropionaldehyde dehydrogenase of millet shoots. Phytochemistry 40: 393-395, doi: 10.1016/0031-9422(95)00293-G

Bradbury LMT, Gillies SA, Brushett DJ, Waters DLE, Henry RJ (2008) Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragnance in rice. Plant Mol Biol 68:439-449, doi: 10.1007/s11103-008-9381-x

Brocker C, Vasiliou M, Carpenter S, Carpenter C, Zhang Y, Wang X, Kotchoni SO, Wood AJ, Kirch HH, Kopečný D, Nebert DW, Vasiliou V (2013) Aldehyde dehydrogenase superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. Planta 237:189-210, doi: 10.1007/s00425-012-1749-0

Case DA, Cheatham TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, Onufriev A, Simmerling C, Wang B, Woods RJ (2005) The Amber biomolecular simulation programs. J Comput Chem 26:1668–1688, doi: 10.1002/jcc.20290

Chakraborty M, Karun A, Mitra A (2009) Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. J Plant Phys 166:63-71, doi: 10.1016/j.jplph.2008.02.004

Díaz-Sánchez AG, González-Segura L, Mújica-Jiménez C, Rudiño-Piñera E, Montiel C, Martínez-Castilla LP, Muñoz-Clares RA (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, doi 10.1104/pp.112.194514

Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JA Jr, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox D. J, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong M W, Gonzalez C, Pople JA (2004) Gaussian 03, Revision C.02. Gaussian Inc, Wallingford

Frömmel J, Soural M, Tylichová M, Kopečný D, Demo G, Wimmerová M, Šebela M (2012) Plant aminoaldehyde dehydrogenase oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydees. Amino Acids 43:1189-1202, doi: 10.1007/s00726-011-1174-x

Fujiwara T, Hori K, Ozaki K, Yokota Y, Mitsuya S, Ichiyanagi T, Hattori T, Takabe T (2008) Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley. Physiol Plant 134: 22-30, doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01122.x

Gaid MM, Sircar D, Beurle T, Mitra A, Beerhues L (2009) Benzaldehyde dehydrogenase from chitosan-treated *Sorbus aucuparia* cell cultures. J Plant Phys 166:1343-1349, doi: 10.1016/j.jplph.2009.03.003

Hanson AD, Rathinatasabapathi B, Rivoal J, Burnet M, Dillon MO, Gages DA (1994) Osmoprotective compounds in the *Plumbaginaceae*: A natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. Proc Natl Acad Sci USA 91:306-310, doi: 10.1073/pnas.91.1.306

Hanson AD, Wyse R (1982) Biosynthesis, translocation, and accumulation of betaine in sugar beet and its progenitors in relation to salinity. Plant Physiol 70:1191-1198, doi: 10.1104/pp.70.4.1191

Kopečný D, Končitíková R, Tylichová M, Vigouroux A, Moskalíková H, Soural M, Šebela M, Moréra S (2013) Plant ALDH10 family: identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. J Biol Chem 288:9491-9507, doi: 10.1074/jbc.M112.443952

Kopečný D, Tylichová M, Snégaroff J, Popelková H, Šebela M (2011) Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω-aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. FEBS J 278:3130-3139, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08239.x

Li W, Yuan XM, Ivanova S, Tracey KJ, Eaton JW, Brunk UT (2003) 3-Aminopropanal, formed during cerebral ischemia, is a potent lysomotropic neurotoxin. Biochem J 371:429-436, doi: 10.1042/BJ20021520

Long MC, Nagegowda D, Kaminaga Y, Ho K. K, Kish C M, Schnepp J, Sherman D, Weiner H, Rhodes D, Dudareva N (2009) Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis. Plant J 59:256-265, doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03864.x

Matsuda H, Suzuki Y (1984) γ-Guanidinobutyraldehyde dehydrogenase of Vicia faba leaves. Plant Physiol 76:654-657, doi: 10.1104/pp.76.3.654

Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J Comput Chem 19:1639-1662, doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B

Pearlman DA, Case DA, Caldwell JW, Ross WS, Cheatham TE, Debolt S, Ferguson D, Seibel G, Kollman P (1995) Amber, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. Comput Phys Commun 91:1-41, doi: 10.1016/0010-4655(95)00041-D

Peng X, Shindo K, Kanoh K, Inomata Y, Choi SK, Misawa N (2005) Characterization of *Sphingomonas* aldehyde dehydrogenase catalyzing the conversion of various aromatic aldehydes to their carboxylic acids. Appl Microbiol Biotechnol 69:141-150, doi: 10.1007/s00253-005-1962-x

Prokop M, Adam J, Kříž Z, Wimmerová M, Koča J (2008) TRITON: a graphical tool for ligand-binding protein engineering. Bioinformatics 24:1955-1956, doi: 10.1093/bioinformatics/btn344

Rhodes R, Rich PJ, Brunk DG, Ju GC, Rhodes GC, Pauly MH, Hansen LA (1989) Development of two isogenic sweet corn hybrids differing for glycinebetaine content. Plant Physiol 91:1112-1121, doi: 10.1104/pp.91.3.1112

Rippa S, Zhao Y, Merlier F, Charrier A, Perrin Y (2012) The carnitine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* shares similar features with the pathway of mammals and fungi. Plant Physiol Biochem 60:109-114, doi: 10.1016/j.plaphy.2012.08.001

Schüttelkopf AW, van Aalten DMF (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. Acta Crystallogr D60:1355–1363, doi: 10.1107/S0907444904011679

Shelp BJ, Bown AW, McLean MD (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. Trends Plant Sci 4:446-452, doi: 10.1016/S1360-1385(99)01486-7

Shelp BJ, Bozzo GG, Trobacher CP, Zarei A, Deyman KL, Brikis CJ (2012) Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. Plant Sci 193:130-135, doi: 10.1016/j.plantsci.2012.06.001

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AA, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BI, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150:76-85, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7

Smith TA, Croker SJ, Loeffler RST (1986) Occurrence in higher-plants of 1-(3-aminopropyl)-pyrrolinium and pyrroline - products of polyamine oxidation. Phytochemistry 25:683-689, doi: 10.1016/0031-9422(86)88024-4

Stiti N, Adewale IO, Petersen J, Bartels D, Kirch HH (2011) Engineering the nucleotide coenzyme specificity and sulfhydryl redox sensitivity of two stress-responsive aldehyde dehydrogenase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. Biochem J 434:459-471, doi: 10.1042/BJ20101337

Tavladoraki P, Rossi MN, Saccuti G, Perez-Amador MA, Polticelli F, Angelini R, Federico R (2006) Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. Plant Physiol 141:1519-1532, doi: 10.1104/pp.106.080911

Trossat C, Rathinasabapathi B, Hanson AD (1997) Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and omega-aminoaldehydes. Plant Physiol 113:1457-1461, doi: 10.1104/pp.113.4.1457

Tylichová M, Briozzo P, Kopečný D, Ferrero J, Moréra S, Joly N, Snéariff J, Šebela M (2008) Purification, cystalization and preliminary crystalografic study of a recombinant plant aminoaldehyde dehydrogenace from *Pisum sativum*. Acta cryst F64:88-90, doi: 10.1107/S1744309107068522

Tylichová M, Kopečný D, Moréra S, Briozo P, Lenobel R, Snégaroff J, Šebela M (2010) Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. J Mol Biol 396:870-882, doi: 10.1016/j.jmb.2009.12.01

Vaz FM, Wanders RJA (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. Biochem J 361:417-429, doi: 10.1042/0264-6021:3610417

Weigel P, Weretilnyk EA, Hanson AD (1986) Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. Plant Physiol 82: 753-759, doi: 10.1104/pp.82.3.753

Wood PL, Khan MA, Moskal JR (2007) The concept of "aldehyde load" in neurodegenerative mechanisms: Cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line. Brain Res 1145:150-156, doi: 10.1016/j.brainres.2006.10.004

Table 1.

Kinetic parameters of oxidation of *N*-acyl-ω-aminoaldehydes by PsAMADH1 and PsAMADH2.

Enzyme activity with substrates at varying final concentrations was measured in 0.1 mol l^{-1} Tris-HCl buffer, pH 9.0, at 30 °C. NAD^+ concentration in the reaction mixture was 0.5 mmol l^{-1}. The GraphPad Prism 5.0 software was used to calculate K_m and V_{max} values, k_{cat} comes from V_{max} divided by concentration of enzyme active sites.

	Kinetic parameters			
	PsAMADH1		PsAMADH2	
Substrate	K_m (µmol l^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	K_m (µmol l^{-1})	k_{cat} (s^{-1})
Reference substrates				
APAL	71.8 ± 5.75	3.65 ± 0.122	7.27 ± 0.46	9.42 ± 0.146
ABAL	153 ± 15.4	3.10 ± 0.151	45.9 ± 6.86	3.02 ± 0.147
Synthetic substrates				
Ac-APAL	268 ± 31.3	3.61 ± 0.227	109 ± 21.7	13.9 ± 1.34
Propi-APAL	492 ± 23.3	3.40 ± 0.049	65.1 ± 3.77	7.72 ± 0.170
Butyr -APAL	227 ± 32.1	2.41 ± 0.072	226 ± 9.5	8.13 ± 0.111
2-Met- Propi -APAL	183 ± 18.0	2.03 ± 0.061	93.5 ± 2.66	6.49 ± 0.053
Valer-APAL	120 ± 11.2	2.02 ± 0.070	271 ± 66.8	11.0 ± 1.56
2-Met-Butyr-APAL	366 ± 40.6	2.87 ± 0.092	469 ± 33.1	12.1 ± 0.27
3-Met-Butyr-APAL	137 ± 19.9	1.24 ± 0.046	130 ± 17.0	9.54 ± 0.544
2,2-diMet-Propi-APAL	266 ± 31.7	1.41 ± 0.085	477 ± 130.0	14.4 ± 2.47
Adip-APAL	431 ± 39.3	1.03 ± 0.053	39.2 ± 3.99	8.78 ± 0.305
Ac-ABAL	516 ± 41.0	2.49 ± 0.070	242 ± 33.4	2.84 ± 0.209
Propi-ABAL	327 ± 14.0	1.65 ± 0.019	92.7 ± 7.69	1.63 ± 0.060
Butyr-ABAL	738 ± 60.0	1.60 ± 0.005	264 ± 34.7	1.39 ± 0.056
2-Met-Propi-ABAL	525 ± 65.3	2.32 ± 0.016	189 ± 33.9	4.08 ± 0.397
Valer-ABAL	629 ± 35.1	1.05 ± 0.020	304 ± 39.0	1.93 ± 0.070
2-Met-Butyr-ABAL	638 ± 24.8	1.20 ± 0.014	397 ± 43.3	1.56 ± 0.128
3-Met-Butyr-ABAL	361 ± 18.1	1.22 ± 0.020	531 ± 113.7	6.84 ± 1.088
2,2-diMet-Propi-ABAL	1420 ± 94	3.20 ± 0.083	506 ± 73.7	5.80 ± 0.595

Table 2.

Catalytic efficiency of PsAMADH1 and PsAMADH2 for *N*-acyl-ω-aminoaldehydes.

First, catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) values of PsAMADH1 and PsAMADH2 for the oxidation of the synthesized *N*-acyl-ω-aminoaldehyde compounds were calculated based on the kinetic parameters presented in Table 1. Then, for calculating relative catalytic efficiency, the k_{cat}/K_m value for the reference substrate APAL was arbitrarily set at 1.000.

Substrate	**Catalytic efficiency**			
	Absolute k_{cat}/K_m (mol^{-1} l s^{-1})		Relative $(k_{cat}/K_m)_{substrate}$ / $(k_{cat}/K_m)_{APAL}$	
	PsAMADH1	PsAMADH2	PsAMADH1	PsAMADH2
Reference substrates				
APAL	5.09×10^4	1.30×10^6	1.000	1.000
ABAL	2.02×10^4	6.58×10^4	0.397	0.051
Synthetic substrates				
Ac-APAL	1.35×10^4	1.28×10^5	0.265	0.098
Propi-APAL	6.90×10^3	1.19×10^5	0.136	0.092
Butyr-APAL	1.06×10^4	3.60×10^4	0.208	0.028
2-Met-Propi-APAL	1.11×10^4	6.94×10^4	0.218	0.053
Valer-APAL	1.68×10^4	4.06×10^4	0.330	0.031
2-Met-Butyr-APAL	7.84×10^3	2.57×10^4	0.154	0.020
3-Met-Butyr-APAL	9.07×10^3	7.33×10^4	0.178	0.056
2,2-diMet-Propi-APAL	5.30×10^3	3.02×10^4	0.104	0.023
Adip-APAL	2.39×10^3	2.24×10^5	0.047	0.172
Ac-ABAL	4.83×10^3	1.17×10^4	0.095	0.009
Propi-ABAL	5.05×10^3	1.75×10^4	0.099	0.013
Butyr-ABAL	2.16×10^3	5.27×10^3	0.042	0.004
2-Met-Propi-ABAL	4.42×10^3	2.16×10^4	0.087	0.017
Valer-ABAL	1.67×10^3	6.35×10^3	0.033	0.005
2-Met-Butyr-ABAL	1.88×10^3	3.92×10^3	0.037	0.003
3-Met-Butyr-ABAL	3.37×10^3	1.29×10^4	0.066	0.010
2,2-diMet-Propi-ABAL	2.25×10^3	1.15×10^4	0.044	0.009

Table 3.

Excess substrate inhibition observed in PsAMADH1 and PsAMADH2 reactions.

The substrate inhibition constant values (K_{ss}) were determined with the GraphPad Prism 5.0 software using the formula $v = V_{max} \cdot [S] / (K_m + [S] \cdot (1 + [S]/K_{ss}))$ for nonlinear regression.

Substrate	Substrate inhibition constants	
	PsAMADH1	PsAMADH2
	K_{ss} (µmol l^{-1})	K_{ss} (µmol l^{-1})
Reference substrates		
APAL	2560 ± 308	1670 ± 115
ABAL	4750 ± 1074	1840 ± 339
Synthetic substrates		
Ac-APAL	2910 ± 485	1520 ± 321
Propi-APAL	None	8400 ± 1425
Valer-APAL	21700 ± 8200	1720 ± 511
3-Met-Butyr-APAL	None	4620 ± 989
2,2-diMet-Propi-APAL	6510 ± 1448	1930 ± 692
Adip-APAL	3450 ± 441	4630 ± 936
Ac-ABAL	None	3510 ± 742
Propi-ABAL	None	7870 ± 1293
2-Met-Propi-ABAL	8140 ± 2032	2210 ± 541
3-Met-Butyr-ABAL	None	657 ± 157
2,2-diMet-Propi-ABAL	None	1470 ± 298

Table 4.

Possible interactions of substrate amide group atoms with substrate channel residues of PsAMADH2 and the respective docking energy values.

Aldehyde	Energy		Possible interactions of substrate amide group atoms with substrate channel residues					
	dock	free	with Tyr163 OH		with Ser295 OG		with Gln451 OE1	
	(kcal/mol)	(kcal/mol)	via N[1)]	via O[1)]	via N[1)]	via O[1)]	via N[1)]	via O[1)]
APAL	-4.30	-3.62	-	-[2)]	+	-[2)]	+	-[2)]
ABAL	-5.24	-4.20	-	-[2)]	+	-[2)]	+	-[2)]
Ac-APAL	-5.60	-4.23	-	-	+	-	+	+
Propi-APAL	-5.43	-3.99	+	-	-	-	-	-
Butyr-APAL	-5.75	-3.83	+	-	-	-	-	-
Valer-APAL	-6.98	-4.60	-	+	-	-	-	-
3-Met-Butyr-APAL	-7.21	-5.15	-	-	+	-	+	+
2,2-diMet-Propi-APAL	-6.38	-4.74	+	-	-	-	-	-
Adip-APAL	-7,73	-4,72	+	+	-	-	-	-
Ac-ABAL	-5.58	-3.93	+	-	-	-	-	-
Propi-ABAL	-6.03	-4.07	-	-	-	-	-	-
Butyr-ABAL	-7.10	-4.80	-	+	-	-	-	-
Valer-ABAL	-7.52	-5.08	+	-	+	-	+	+
3-Met-Butyr-ABAL	-7.56	-5.13	-	-	-	-	-	-
2,2-diMet-Propi-ABAL	-7.19	-5.20	-	+	-	-	-	-

Footnotes:

1) oxygen or nitrogen atom of the amide group of the substrate

2) APAL and ABAL do not have a second oxygen atom, so there is no possibility of its interaction with substrate channel residues.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

An overview of synthetic *N*-acyl-ω-aminoaldehydes.

Molecular formulas of the analyzed compounds were drawn by ChemSketch 2.0 software (Advanced Chemistry Development, Toronto, Canada).

Figure2

Saturation curves of PsAMADH1 reactions with *N*-acyl-ω-aminoaldehydes.

Black curves were chosen for the physiological substrates APAL and ABAL. Saturation curves of their linear derivatives are drawn in yellow, orange, magenta and red and those of branched derivatives in shades of blue and green. Panel A: oxidation of linear *N*-acyl derivatives of APAL by PsAMADH1; panel B: oxidation of linear *N*-acyl derivatives of ABAL by PsAMADH1; panel C: oxidation of branched *N*-acyl derivatives of APAL by PsAMADH1; panel D: oxidation of branched *N*-acyl derivatives of ABAL by PsAMADH1. See Materials and methods for experimental details.

Figure 3

Saturation curves of PsAMADH2 reactions with *N*-acyl-ω-aminoaldehydes.

Black curves were chosen for the physiological substrates APAL and ABAL. Saturation curves of their linear derivatives are drawn in yellow, orange, magenta and red and those of branched derivatives in shades of blue and green. Panel A: oxidation of linear *N*-acyl derivatives of APAL by PsAMADH2, panel B: oxidation of linear *N*-acyl derivatives of ABAL by PsAMADH2; panel C: oxidation of branched *N*-acyl derivatives of APAL by PsAMADH2; panel D: oxidation of branched *N*-acyl derivatives of ABAL by PsAMADH2. See Materials and methods for experimental details.

Figure 4

MS analysis of product acid arising from Valer-APAL oxidation by PsAMADH1.

The reaction mixture composed of 0.1 M ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0, Valer-APAL (1.0 mM), NAD^+ (1.5 mM) and PsAMADH2 (21.8 $\mu g \cdot ml^{-1}$) was kept at laboratory temperature with

stirring overnight. Then the enzyme was removed by ultrafiltration and the filtrate diluted 10 fold prior to its injection to the mass spectrometer.

Figure 5

Molecular docking of substrates into the active side of PsAMADH2, a general view.

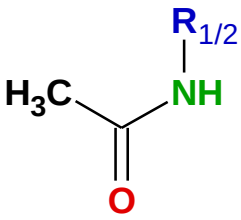
All residues lining the substrate channel and forming the active site are drawn in grey. The surface of the substrate channel is shown in brownish yellow. Panel A: both tested *N*-(2,2-dimethylpropionyl) aminoaldehydes interact with the oxygen atom of Tyr163; 2,2-diMet-Propi-APAL (brown) binds via its nitrogen atom and 2,2-diMet-Propi-ABAL (blue) via its acyl oxygen atom. Panel B: Ac-ABAL (orange) interacts only with Tyr 163 via the nitrogen atom, whereas Valer-ABAL (green) shows an interaction with three residues – Tyr163, Ser295 and Gln451. Panel C: Adip-APAL interacts with Tyr163 via both nitrogen and oxygen atoms of its amide group. The carboxyl oxygen atoms of the ligand interact with the indole nitrogen atom of Trp170 and the hydroxyl oxygen atom of Thr455. In PsAMADH1 (its superposed active-site residues are shown here in yellow), Thr455 is replaced by Ile455. The aldehyde oxygen atom of the substrate is H-bonded to the side chains of Asn162 and the catalytic Cys294.

Figure 6

Molecular docking of substrates into the active side of PsAMADH2, a detailed view.

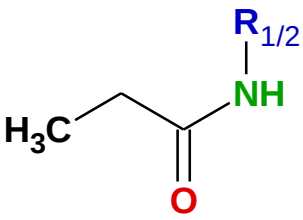
Active site residues of PsAMADH2 are drawn in grey. Panel A: the two physiological substrates APAL (light orange) and ABAL (cyan blue) interact with Ser295 and Gln451 via their amino group nitrogen atom. Panel B: while Ac-APAL (orange) probably interacts with Ser295 and Gln451, Valer-APAL (purple) interacts with Tyr163 via its acyl oxygen atom. Panel C: both *N*-butyryl-ω-aminoaldehydes interact with Tyr 163, Butyr-APAL (slate blue) via its acyl oxygen atom and Butyr-ABAL (green) via its nitrogen atom. Panel D: 3-Met-Butyr-APAL (yellow) interacts with Ser295 and Gln451; on the other hand its isomer 2,2-diMet-Propi-APAL (violet blue) interacts with Tyr163. The aldehyde oxygen atom of the substrates establishes H-bond interactions with the side chains of Asn162 and the catalytic Cys294.

Figure 1



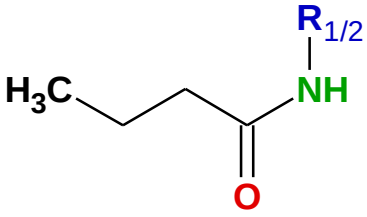
R_1 ... Ac-APAL

R_2 ... Ac-ABAL



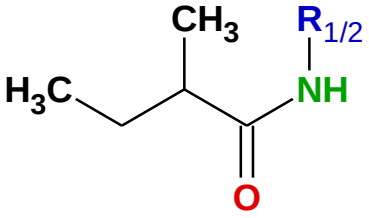
R_1 ... Propi-APAL

R_2 ... Propi-ABAL



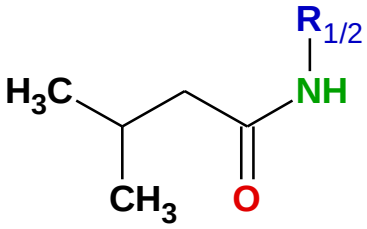
R_1 ... Butyr-APAL

R_2 ...Butyr-ABAL



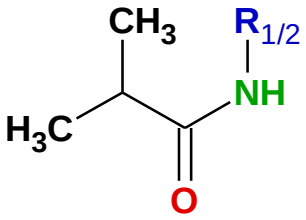
R_1 ... 2-Met-Butyr-APAL

R_2 ... 2-Met-Butyr-ABAL



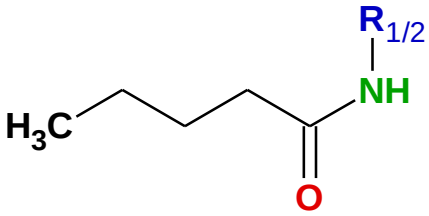
R_1 ... 3-Met-Butyr-APAL

R_2 ... 3-Met-Butyr-ABAL



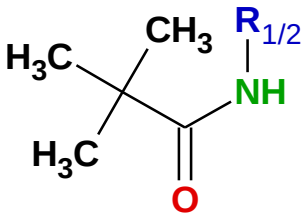
R_1 ... 2-Met-Propi-APAL

R_2 ... 2-Met-Propi-ABAL



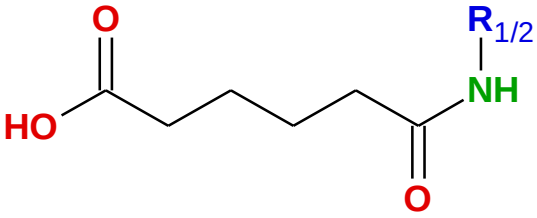
R_1 ... Valer-APAL

R_2 ... Valer-ABAL



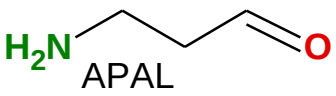
R_1 ... 2,2-diMet-Propi-APAL

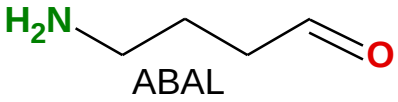
R_2 ... 2,2-diMet-Propi-ABAL

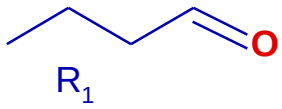


R_1 ... Adip-APAL

R_2 ... Adip-ABAL







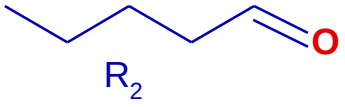


Figure 2

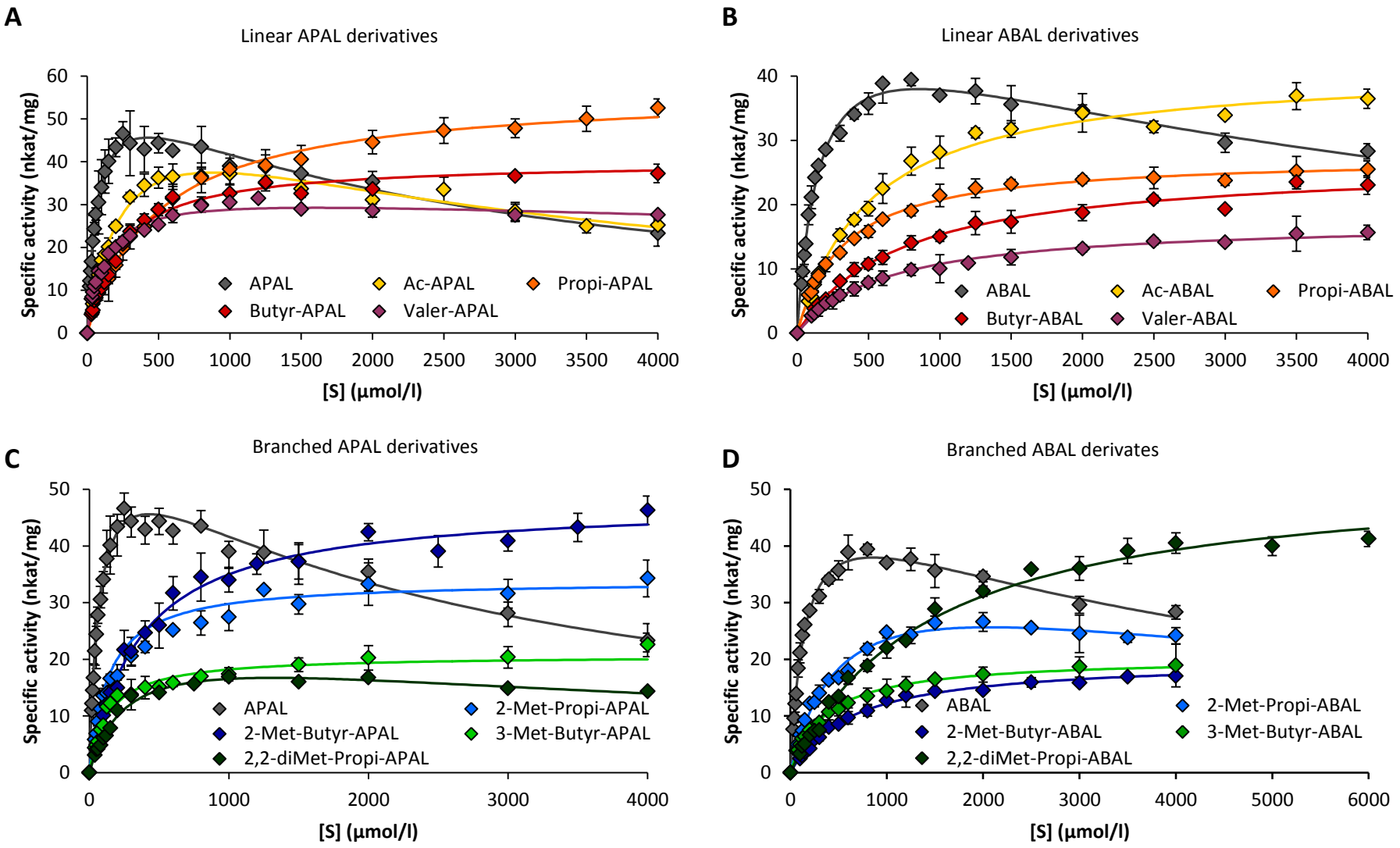

A
Linear APAL derivatives
Specific activity (nkat/mg)
[S] (µmol/l)
APAL
Ac-APAL
Propi-APAL
Butyr-APAL
Valer-APAL
B
Linear ABAL derivatives
Specific activity (nkat/mg)
[S] (µmol/l)
ABAL
Ac-ABAL
Propi-ABAL
Butyr-ABAL
Valer-ABAL
C
Branched APAL derivatives
Specific activity (nkat/mg)
[S] (µmol/l)
APAL
2-Met-Propi-APAL
2-Met-Butyr-APAL
3-Met-Butyr-APAL
2,2-diMet-Propi-APAL
D
Branched ABAL derivates
Specific activity (nkat/mg)
[S] (µmol/l)
ABAL
2-Met-Propi-ABAL
2-Met-Butyr-ABAL
3-Met-Butyr-ABAL
2,2-diMet-Propi-ABAL

Figure 3

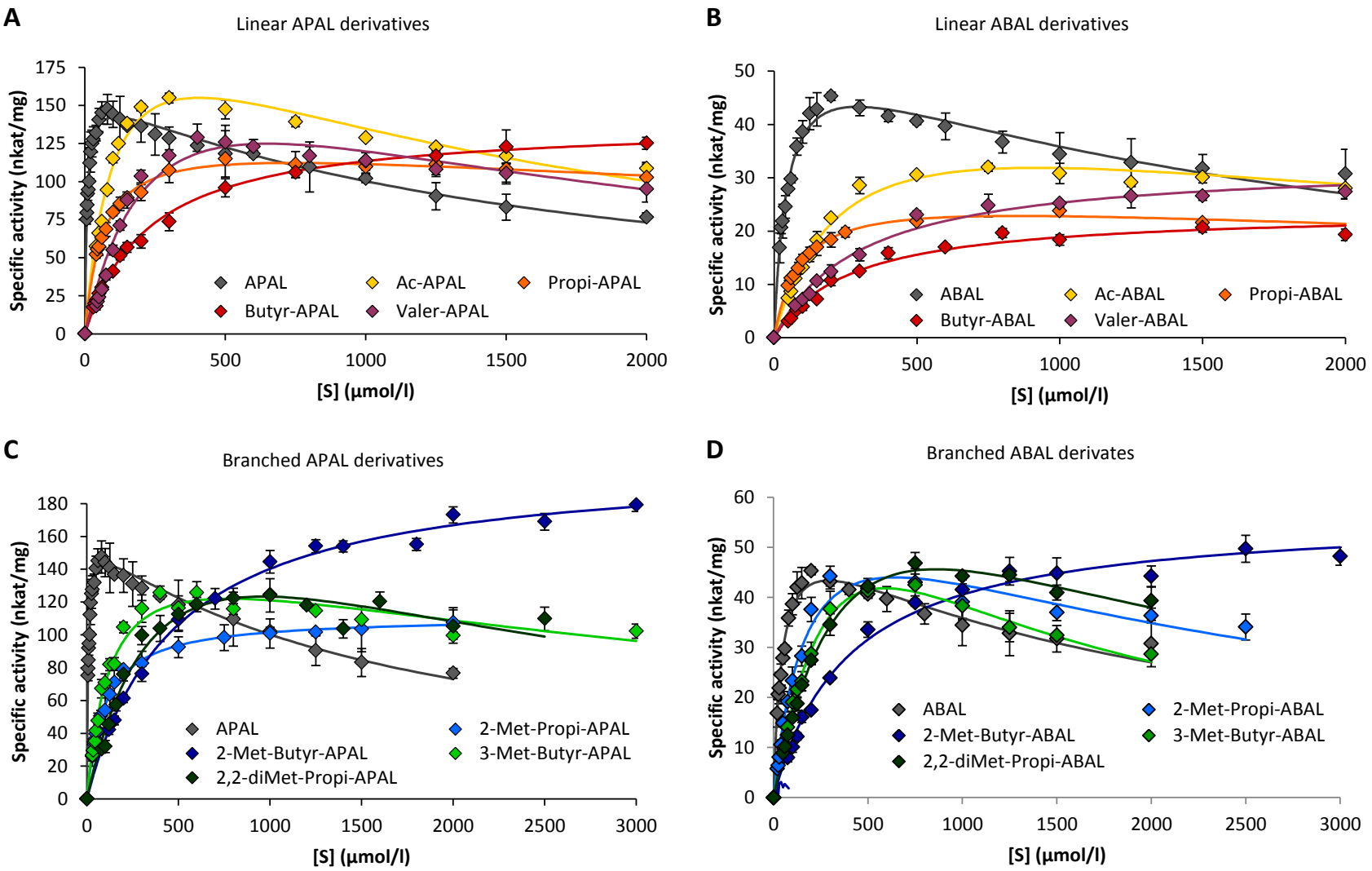

A
Linear APAL derivatives
Specific activity (nkat/mg)
[S] (µmol/l)
APAL
Ac-APAL
Propi-APAL
Butyr-APAL
Valer-APAL
B
Linear ABAL derivatives
Specific activity (nkat/mg)
[S] (µmol/l)
ABAL
Ac-ABAL
Propi-ABAL
Butyr-ABAL
Valer-ABAL
C
Branched APAL derivatives
Specific activity (nkat/mg)
[S] (µmol/l)
APAL
2-Met-Butyr-APAL
2,2-diMet-Propi-APAL
2-Met-Propi-APAL
3-Met-Butyr-APAL
D
Branched ABAL derivates
Specific activity (nkat/mg)
[S] (µmol/l)
ABAL
2-Met-Butyr-ABAL
2,2-diMet-Propi-ABAL
2-Met-Propi-ABAL
3-Met-Butyr-ABAL

Figure 4

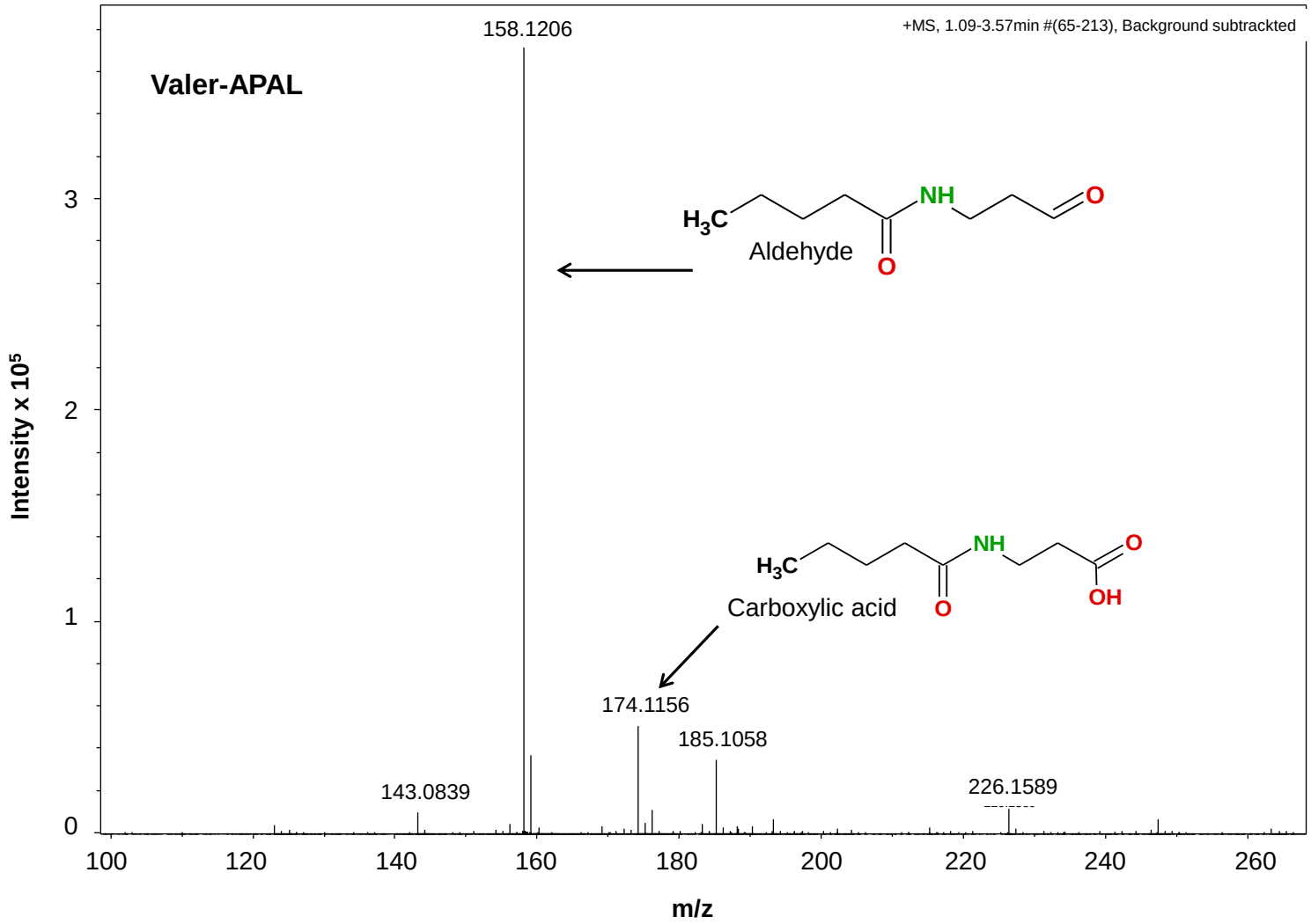

158.1206
+MS, 1.09-3.57min #(65-213), Background subtrackted
Valer-APAL
Aldehyde
Carboxylic acid
174.1156
185.1058
143.0839
226.1589
Intensity x 10⁵
m/z

Figure 5

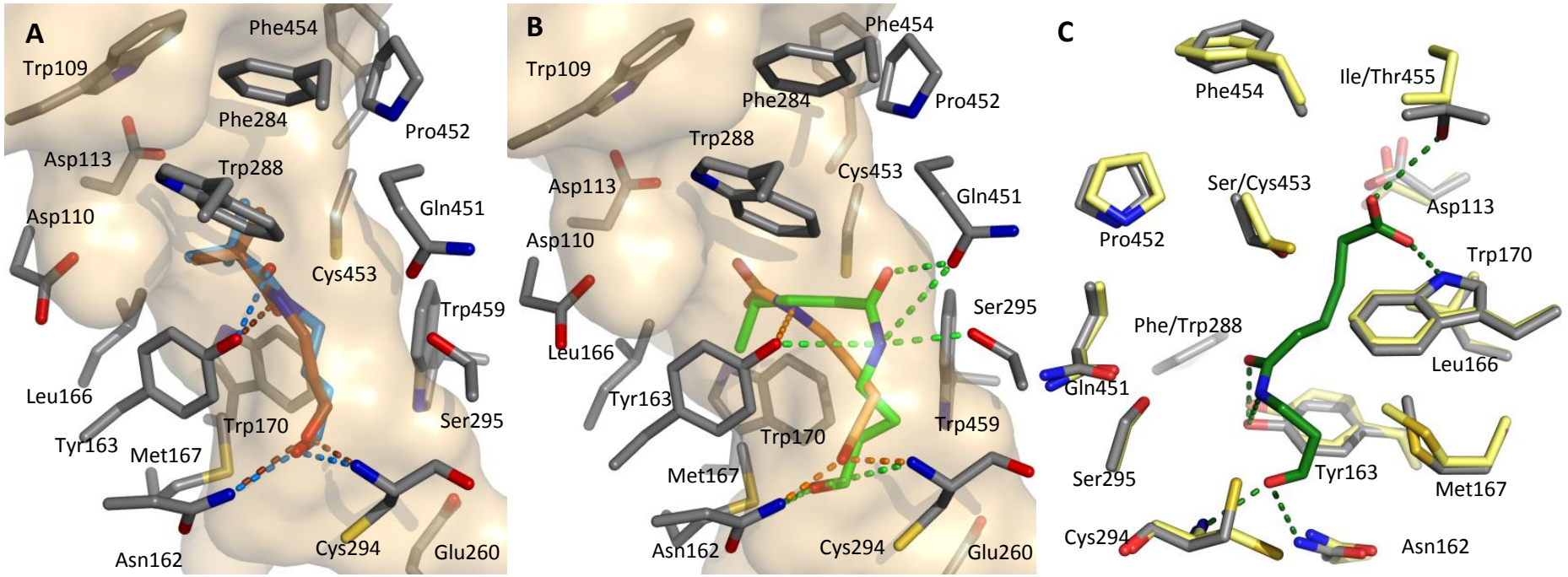
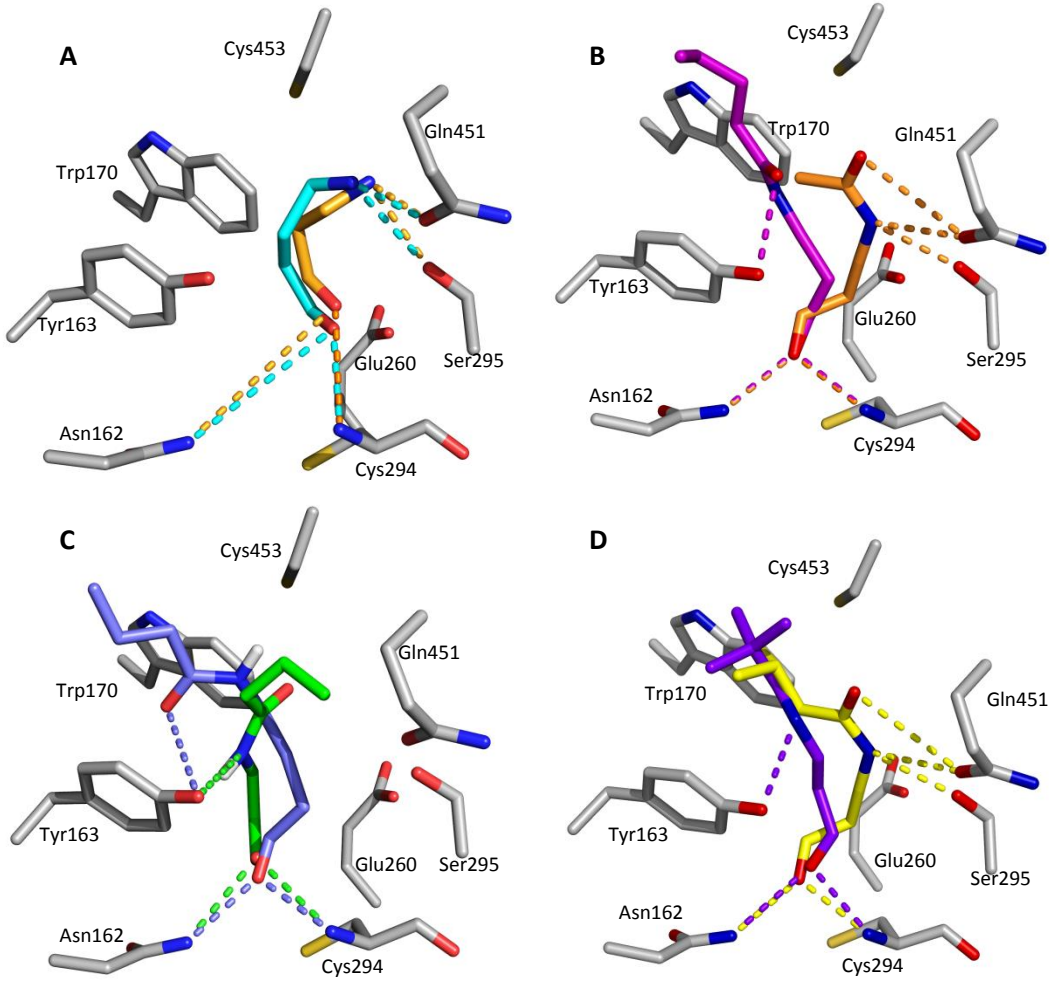

A
Trp109
Phe454
Phe284
Pro452
Asp113
Trp288
Asp110
Gln451
Cys453
Trp459
Leu166
Ser295
Tyr163
Trp170
Met167
Asn162
Cys294
Glu260
B
Trp109
Phe454
Phe284
Pro452
Trp288
Asp113
Cys453
Gln451
Asp110
Ser295
Leu166
Tyr163
Trp459
Trp170
Met167
Asn162
Cys294
Glu260
C
Phe454
Ile/Thr455
Pro452
Ser/Cys453
Asp113
Trp170
Phe/Trp288
Leu166
Gln451
Tyr163
Met167
Ser295
Cys294
Asn162

Figure 6


A
Cys453
Gln451
Trp170
Tyr163
Glu260
Ser295
Asn162
Cys294
B
Cys453
Trp170
Gln451
Tyr163
Glu260
Ser295
Asn162
Cys294
C
Cys453
Gln451
Trp170
Tyr163
Glu260
Ser295
Asn162
Cys294
D
Cys453
Trp170
Gln451
Tyr163
Glu260
Ser295
Asn162
Cys294

P 7

AMINOALDEHYDDEHYDROGENASA 1 Z RAJČETE A JEJÍ MOŽNÉ VYUŽITÍ K DETEKCI ALDEHYDŮ V LIHOVINÁCH

Frömmel J.[1], Soural M.[2], Kopečná M.[1], Kopečný D.[1], Tarkowski P.[1], Vianello F.[3], Šebela M.[1]

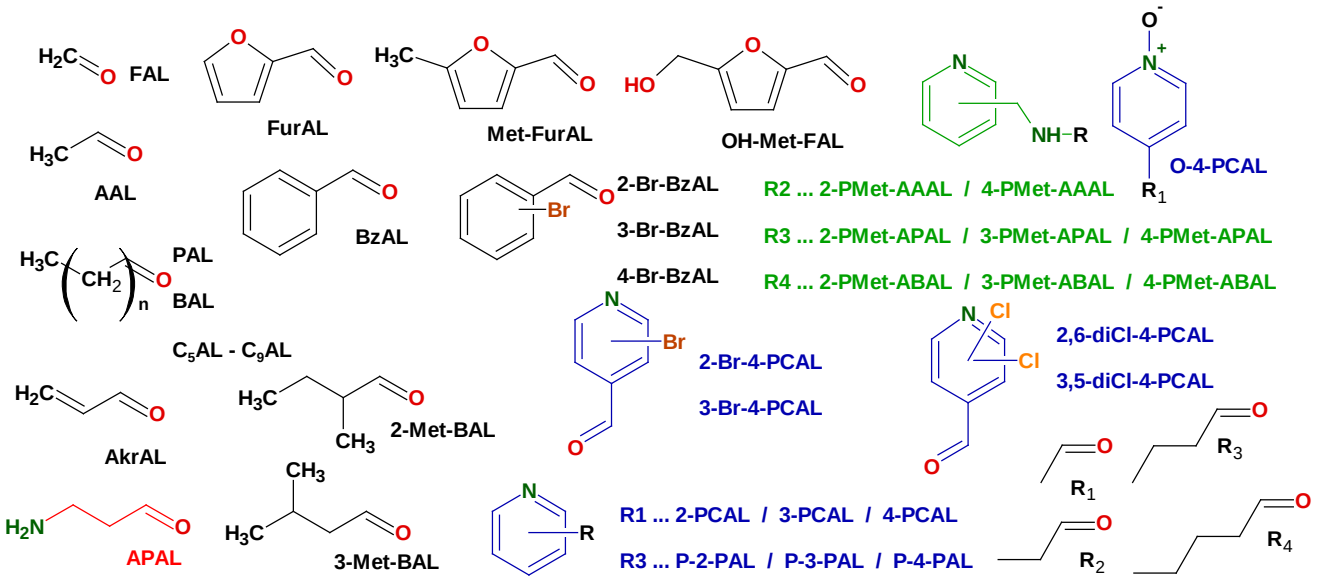
[1)] Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta UP, Šlechtitelů 586/11, 783 71 Olomouc

[2)] Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta UP, Třída 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc

[3)] Dipartmento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Universita degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16, 350 20 Legnaro (PD), Italia

Aldehyddehydrogenasy (ALDH, EC 1.2.1) přeměňují aldehydy na příslušné karboxylové kyseliny za využití koenzymu NAD^+ (případně $NADP^+$) jakožto akceptoru elektronů. Nadrodina ALDH se člení do 24 tříd, z nichž nejméně 12 obsahuje jako zástupce i rostlinné enzymy. Aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH, EC 1.2.1.19) se řadí do více tříd, rostlinné enzymy se pro svou nízkou sekvenční identitu (36 - 39 %) s ostatními AMADH řadí do třídy ALDH10 odděleně od savčích, rybích, bakteriálních či houbových AMADH (ALDH9) [1-3]. Rostlinné AMADH nekatalyzují jen výhradní přeměnu lineárních aminoaldehydů, ale oxidují i větvené alifatické aldehydy, benzaldehydy, heterocyklické aldehydy (např. rozmanité deriváty pyridinu, pyrimidinu, purinu či furanu) a mnoho dalších aldehydů. Nejširší substrátovou specifičnost z AMADH studovaných v naší laboratoři vykazuje isoenzym 1 z rajčete (*Solanum lycopersicum* syn. *Lycoperisicon esculentum*; SlAMADH1) s detailně popsanou krystalovou strukturou [4,5], jež oxiduje aldehydy, které byly detekovány v různých druzích lihovin.

Aldehydy se vyskytují téměř ve všech lihovinách ať už jako fermentační produkty či jako důsledek rozkladu cukrů při vyšších teplotách. Jejich přítomnost ve vyšších koncentracích je nežádoucí jednak pro jejich negativní vliv na senzorické vlastnosti lihovin a jednak pro jejich toxicitu. Konzumace lihovin s obsahem aldehydů je spojena s nauseou, zvracením, neklidem, pocením, poklesem krevního tlaku, zrychlením tepu či bolestmi hlavy. Například acetaldehyd v přítomnosti alkoholu reaguje s aminoskupinami nukleových kyselin za vzniku smíšených acetalů, což vede k vyššímu riziku rakoviny prsu u žen [6-8].

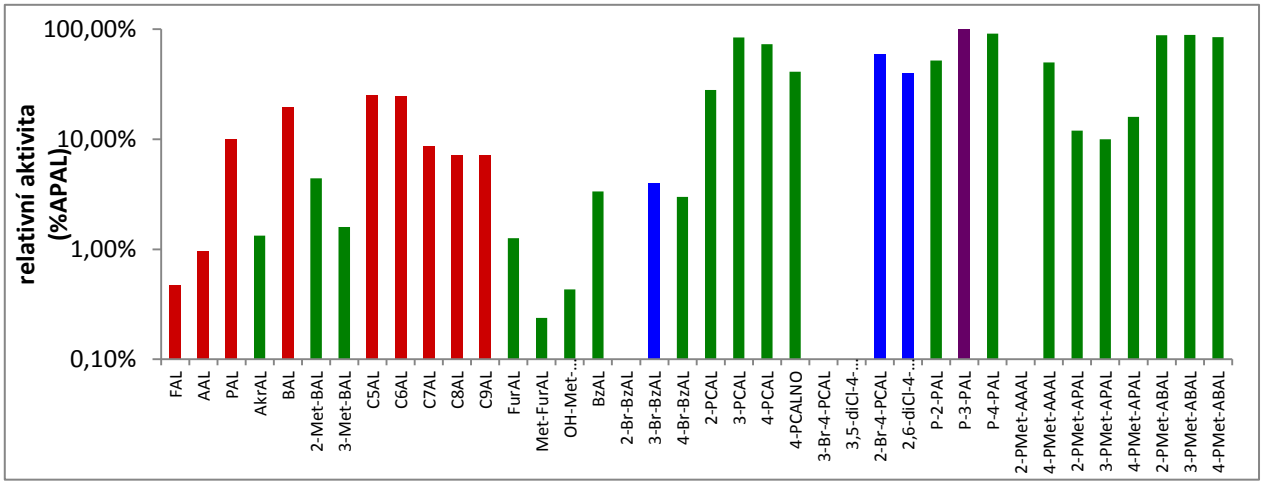


Obr. 2: Vzorce aldehydů testovaných jako substráty SlAMADH1

V našich experimentech jsme využili rekombinantní protein SlAMADH1, který byl vyprodukován v bakteriální kultuře *Escherichia coli*. Z listů a apikálních meristémů sedmidenních semenáčků rajčete jedlého byla extrahována celková RNA za použití kitu Midi Spin

(Macherey-Nagel, Germany). K syntéze příslušné cDNA bylo použito Superscript II reverzní transkriptasy (Invitrogen, USA). Genová sekvence (1515 bp) je v databázi uložena pod kódem AY796114. Pro amplifikaci genu za účelem transformace hostitelských buněk byly využity primery 5'-CAG**GGATCC**GGCAAATCGTAATGTACCA-3' (forward, restrikční místo pro enzym BamHI) a 5'-CGT**CTCGAG**CTAATTCTTTGAAGGTGACTTAT-3' (reverse, restrikční místo pro enzym XhoI) [4,5]. Kultivace proběhla ve sterilním LB mediu se streptomycinem (50 $g \cdot l^{-1}$), exprese byla indukována 0,1mM isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidem. Rozbití buněk, extrakce a purifikace proteinu s N-koncovou histidinovou kotvou byla provedena obdobně jako u hrachového izoenzymu 1 [9]. Z 250 ml kultury byly vyizolovány přibližně 2 mg čistého enzymu o specifické aktivitě 53 $nkat \cdot mg^{-1}$ naměřené s použitím 1mM 3-aminopropanalu (APAL), jakožto nejlepšího fyziologickému substrátu.

Aldehydy z široké řady zahrnující lineární alifatické aldehydy, benzaldehyd a jeho bromderiváty či heterocyklické aldehydy - deriváty furanu, pyridinu, pyrimidinu, purinu nebo pyrrolopyrimidinu - byly testovány jako substráty SlAMADH1 (Obr. 1). 3-Pyridinylpropanaly byly připraveny Swernovou oxidací odpovídajících alkoholů [10]. Diethylacetaly ω-pyridinmethylaminoaldehydu byly nukleofilní substitucí příslušného heterocyklického chloroderivátu s použitím diethylaacetalů aminoacetaldehydu, 3-aminopropanalu či 4-aminobutanalu [11]. Ostatní aldehydy byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich.



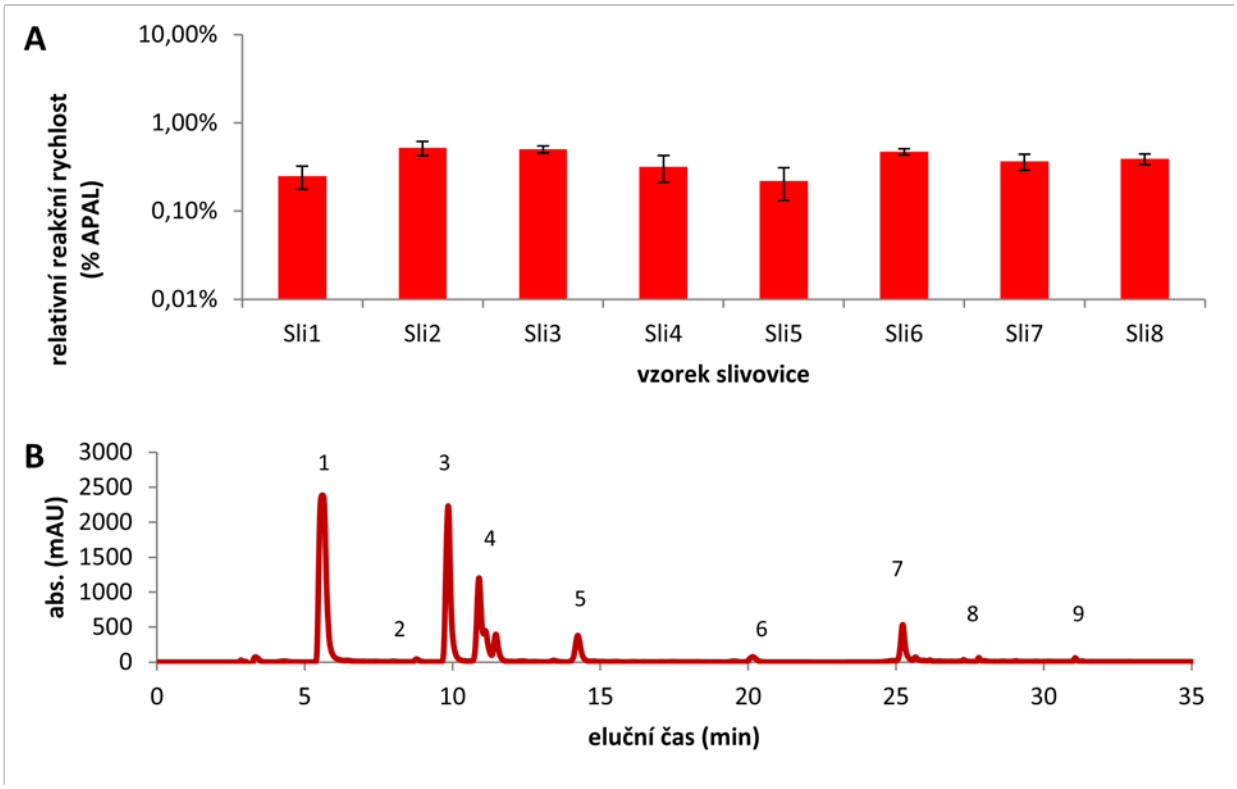
Obr. 3: Substrátová specifičnost SlAMADH1 - srovnání testovaných aldehydů se substrátem APAL ([S] = 1,0 $mmol \cdot l^{-1}$)

Studium substrátové specifičnosti bylo provedeno pomocí spektrofotometrického měření při 340 nm založeném na Warburgově optickém testu [12] s použitím testovaných aldehydů při 1mM koncentraci. Reakční směs obsahovala 1,55 ml pufru (Tris-HCl, 0,15 $mol \cdot l^{-1}$, pH 9,0), 50 µl 20mM NAD^+, roztok enzymu, 20 µl 100mM roztoku substrátu a vodu k doplnění do konečného objemu 2,0 ml. Reakce byla startována přídavkem substrátu ke zbylým složkám reakční směsi. V grafu (Obr. 2) je uvedena relativní aktivita enzymu vzhledem k rychlosti přeměny pro APAL. Téměř všechny aldehydy byly pomocí SlAMADH1 oxidovány. U halogenderivátů benzaldehydu a 4-pyridinkarbaldehydu nedochází k oxidaci v případě substituce na vicinální poloze vůči karbaldehydové skupině, u substitucí ostatních uhlíků aromatického cyklu je enzym aktivní (modře). Nejvyšší aktivita byla v případě alifatických aldehydů pozorována u přeměny pentanalu, ostatní aldehydy a jejich isomery byly oxidovány pomaleji (červeně). Více než 100 % aktivita byla pozorována jen pro 3-pyridin-3-ylpropanal (P-3-PAL, fialově), nejedná se však o lepší substrát než APAL, jelikož vyšší reakční rychlost je způsobena masivní inhibicí substrátem v případě APALu.

Pro měření obsahu aldehydů v destilátech byla získána řada slivovic z různých domácích produkcí, které byly testovány jakožto „substráty" SlAMADH1 a výsledky porovnány s fyziologickým substrátem (APAL, c = 1,0 $mmol \cdot l^{-1}$). Po přidání 50 µl vzorku do celkového

objemu 2 ml reakční směsi ve složení shodném se studiem substrátové specifičnosti se relativní reakční rychlost vzhledem k oxidaci APALu pohybovala pod 1 %..

Jako referenční metodu ke stanovení obsahu aldehydů jsme využili HPLC s UV detekcí po derivatizaci vzorků 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH) v kyselém prostředí [8, 13]. K 1 ml vzorku bylo přidáno 250 µl 0,4 % DNPH rozpuštěného v acetonitrilu a 12,5 µl 1mM $HClO_4$ a reakční směs byla za mírného třepání a laboratorní teploty inkubována 1 hodinu. Na kolonu Kinetex 2,6 u C_{18} 100A (150 x 4,6 mm) bylo naneseno 10 µl vzorku bez jakékoliv prekoncentrace. Jako mobilní fáze byla použita směs vody a methanolu při průtoku 0,5 $ml \cdot min^{-1}$. Ve všech vzorcích slivovic byly pomocí standardů detekovány rozmanité aldehydy. Ve vysoké koncentraci se ve všech vzorcích nacházel acetaldehyd (AAL) a 5-hydroxymethylfurfural (OH-Met-FurAL), v menším množství pak další lineární alifatické aldehydy, furfural, benzaldehyd, 5-methylfurfural či akrolein (Obr. 3B).



Obr. 4: Analýza obsahu aldehydů ve vzorcích slivovic. (A) Měření s volným enzymem - srovnání rychlosti oxidace slivovic a APALu. (B) HPLC analýza vzorku Sli1 - červeně chromagorafický záznam (1 - nezreagovaný DNPH, 2 - formaldehyd, 3 - 5-hydroxymethyl-furfural, 4 - acetaldehyd, 5 - furfural, 6 - benzaldehyd, 7 - 3-methylbutanal, 8 - hexanal, 9 - nonanal), zeleně obsah metanolu v mobilní fázi.

Na povrchově aktivní nanočástice připravené z maghemitu [14] byla imobilizována nejen SlAMADH1, ale i diaforasa (NADH oxidasa, EC 1.8.1.4). Oba enzymy byly imobilizovány na samostatné nanočástice. K 1 mg nanočástic rozsuspendovaných v 1 ml pufru bylo přidáno 0,1 mg SlAMDH1 a směs byla inkubována za mírného třepání při teplotě 4 °C po dobu 1,5 hodiny. Účelem imobilizace je možnost opakovaného použití enzymu, použití diaforasy pak dává možnost vizuální detekce odbarvením modrého 2,6-dichlorofenolindofenolu (DCPIP) ve spřažené reakci reoxidující koenzym NADH na NAD^+. Hodnota K_m vzrostla u SlAMADH1 po imobilizaci z 29 $\mu mol \cdot l^{-1}$ na 110 $\mu mol \cdot l^{-1}$.

Rostlinné AMADH se vyznačují širokou substrátovou specifičností vzhledem k alifatickým, aromatickým i heterocyklickým aldehydům. Zdaleka nejširší specifičnost ze studovaných enzymů vykazuje SlAMADH1, která byla v této práci využita pro tvorbu biosenzoru.

Enzym byl imobilizován na magnetické nanočástice, které byly použity pro přípravu elektrody využitelné při chronoamperometrickém či lineárně voltametrickém stanovení NADH vznikajícího při enzymové reakci SlAMADH1. Druhým použitým způsobem detekce je využití spřažené reakce SlAMADH1 a diaphorasy, kdy zpětnou oxidací NADH dochází k redukci modrého DCPIP na bezbarvou redukovanou formu.

Všechny testované vzorky slivovice vykazovaly přítomnost aldehydů nejen dle měření s enzymem, ale i při využití referenční metody HPLC. Nejčastěji detekovanými aldehydy byly acetaldehyd, furfural, hydroxymethylfurfural, formaldehyd, benzaldehyd, butanal, pentanal či hexanal. Dalším krokem v naší práci bude měření s reálnými vzorky lihovin. V následujícím období bude provedeno měření i s dalšími druhy nápojů.

Literatura:

1 Kirch H.H., Bartels D., Wei Y., Schnable P.S., Wood A.J. (2004) *Trends Plant Sci.* **9**, 371-377
2 Sophos N.A., Vasiliou V. (2003) *Chem Biol Intract.* **143-144**, 5-22
3 Vasiliou V. & Nebert D.W. (2005) *Hum. Genomics* **2**, 138-143
4 Frömmel J., Soural M., Tylichová M., Kopečný D., Demo G., Wimmerová., Šebela M. (2012) *Amino Acids* **43**,1189-1202
5 Kopečný D., Končitíková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Soural M., Šebela M., Moréra S. (2013) *J. Biol. Chem.* **288**, 9491-9507
6 Frenkel-Conrat H. & Singer B. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85,** 3758-3761
7 López-Vázques C., Bollain M.H., Moser S., Orriols I. (2010) *J Agric Food Chem.* **58,** 9657–9665
8 Nascimento R. F., Marques J. C., Neto B. S. L., De Keukeliere D., Franco D. W. (1997) *J. Chromatogr. A* **728**, 13-23
9 Tylichová M., Briozzo P., Kopečný D., Ferrero J., Moréra S., Joly N., Snégaroff J., Šebela M. (2008) *Pisum sativum*. *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 88-90
10 Omura K., Swern D. (1978) *Tetrahedron* **34**, 1651-1660
11 Sánchez-Sandoval A., Alvarez-Toledano C., Gutyérrez-Pérez Y., Reyes-Ortega Y. (2003) *Synth Commun.* **33**, 481-492
12 Warburg O., Christian W. (1943) *Biochem. Z.* **314**, 149-176
13 Uchiyama S., Inaba Y., Kunugita N. (2011) *J. Chromatogr. B* **879** 1282-1289
14 Magro. M., Sinigaglia G., Nodari L., Tuček J., Poláková K., Marušák Z., Salviulo G., Russo U., Stevanato R., Zbořil R., Vianello F. (2012) *Acta Biomateriala* **8**, 2068-2076