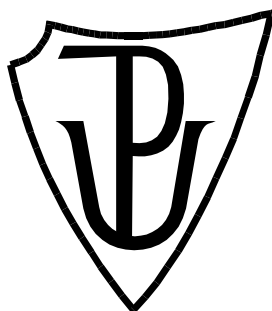


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Identifikace isoenzymů aldehyddehydrogenas pomocí
interakcí s různými koenzymy a substráty**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Eliška Veverková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok:	2016

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

V Olomouci dne 6. 5. 2016.

Poděkování

Děkuji panu profesoru Marku Šebelovi za vstřícný přístup, poskytnuté cenné rady a v neposlední řadě i za čas, který mi věnoval. Mé poděkování patří také všem pracovníkům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Eliška Veverková
Název práce	Identifikace isoenzymů aldehyddehydrogenas pomocí interakcí s různými koenzymy a substráty
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	Aminoaldehyddehydrogenasy patří do rodiny ALDH10 nadrodiny aldehyddehydrogenas, které katalyzují oxidaci ω-aminoaldehydů na odpovídající ω-aminokyseliny. Tyto enzymy jsou NAD(P)⁺ dependentní, jako koenzym může sloužit i synteticky připravený koenzym thioNAD⁺. Aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu obsahují dva isoenzymy, kdy díky rozdílným interakcím s NAD⁺ a thioNAD⁺ lze detegovat aktivitu jednotlivých isoenzymů. V této bakalářské práci byla změřena aktivita z vypěstovaných semenáčků hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>) v několika kombinacích substrátů a koenzymů. Aktivita enzymu byla změřena spektrofotometricky a po provedení nativní elektroforézy a isoelektrické fokusace detegována v gelu. Přítomnost enzymu byla potvrzena měřením hmotnostních spekter.
Klíčová slova	Aminoaldehyddehydrogenasa, thioNAD ⁺ , <i>Pisum sativum</i> , enzymová aktivita, isoenzymy
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Eliška Veverková
Title	Identification of aldehyde dehydrogenases isoenzymes through interactions with various coenzymes and substrates
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2016
Abstract	Aminoaldehyde dehydrogenases belong to the family of enzymes ALDH 10, which catalyze the oxidation of ω - aminoaldehydes to corresponding ω-aminoacids. These enzymes are NAD(P)^+ dependent, synthetically prepared thioNAD^+ can also be used as the coenzyme. Aminoaldehyde dehydrogenase from pea contains two isoenzymes. Due to different interaction between NAD^+ and thioNAD^+ could be detected the enzyme activity for isoenzymes. In this bachelor thesis was measured the enzyme activity from pea (<i>Pisum sativum</i>) in several combination of substrates and coenzymes. The activity was measured spectrophotometrically and after native electrophoresis and isoelectric focusation was in gel detected. The presence of the enzyme was confirmed by mass spectrum.
Keywords	Aminoaldehyde dehydrogenase, thio NAD^+ , <i>Pisum sativum</i> , enzyme activity, isoenzymes
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Nadrodina aldehyddehydrogenas	2
2.2	Aminoaldehyddehydrogenasy	2
2.2.1	AMADH – účast v metabolismu	3
2.2.2	AMADH – struktura enzymů	4
2.2.3	PsAMADH	5
2.2.3.1	Lokalizace, pH a teplotní optimum	6
2.2.3.2	Kinetické parametry	6
2.2.4	ZmAMADH	8
2.2.5	Betainaldehyddehydrogenasy	9
2.3	Substráty	9
2.3.1	Přírodní substráty	10
2.3.2	Substráty – syntetické	11
2.3.2.1	<i>N</i> -acylové deriváty	12
2.4	Koenzymy	12
2.5	Fyziologická role AMADH	13
2.5.1	Osmoprotektanty	13
2.5.2	Reakce na stres – mechanické poškození	14
2.5.3	Reakce na stres – vysoká salinita	15
2.6	Polyaminy	15
2.7	Fyziologická role polyaminů	16
2.7.1	Metabolismus polyaminů	16
2.7.1.1	Biosyntéza polyaminů	16
2.7.1.2	Katabolismus polyaminů	17
3	Experimentální část	20
3.1	Materiál a metody	20
3.1.1	Biologický materiál	20
3.1.2	Chemikálie	20
3.1.3	Přístroje	21
3.1.4	Použité metody	22
3.1.4.1	Příprava rostlinného materiálu	22
3.1.4.2	Zpracování rostlinného materiálu	22
3.1.4.3	Měření aktivity	22
3.1.4.4	Metoda Bradforda	23
3.1.4.5	BCA metoda	23

3.1.4.6	Nativní elektroforéza (PAGE)	23
3.1.4.7	Isoelektrická fokusace	24
3.1.4.8	Štěpení proteinů v gelu	25
3.1.4.9	Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie peptidů, identifikace proteinů v gelu	26
4	Výsledky a diskuze	28
4.1	Koncentrace proteinů	28
4.2	Spektrofotometrické stanovení aktivity AMADH	29
4.3	Detekce aktivity PsAMADH v gelech	35
4.4	Srovnání spektrofotometricky naměřené aktivity a aktivity detegované v gelech	44
5	Závěr	45
6	Literatura	46
7	Seznam použitých zkratk	50

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracování literární rešerše zaměřené na popis nadrodiny enzymů aldehyddehydrogenas a rodiny aminoaldehyddehydrogenas
- Charakteristika aminoaldehyddehydrogenas z hrachu setého (*Pisum sativum*)
- Popis přírodních i synteticky připravených substrátů tohoto enzymu
- Fyziologická role těchto enzymů

Experimentální část:

- Pěstování rostlin pro analýzu
- Stanovení specifické aktivity aminoaldehyddehydrogenasy
- Nativní elektroforéza a izoelektrická fokusace
- Identifikace isoenzymů aminoaldehyddehydrogenasy v hrachu setém pomocí hmotnostní spektrometrie

1 ÚVOD

Polyaminy jsou látky, které se v rostlinách uplatňují při stabilizaci makromolekul a dále plní funkci regulačních molekul, kdy kromě kontroly buněčného dělení hrají důležitou roli v odpovědi na biotický a abiotický stres (Alcázar *et al.*, 2009; Takahashi a Kakehi, 2010). Polyaminy a diaminy jsou degradovány procesy oxidace a oxidační deaminace za účasti enzymů polyaminoxidas nebo diaminoxidas (Šebela *et al.*, 2000). Touto reakcí vznikají odpovídající aminoaldehydy, které představují substráty pro aldehyddehydrogenasy.

Aldehyddehydrogenasy jsou enzymy vyskytující se v mikroorganismech, rostlinách i živočiších. Tato nadrodina se dělí do několika rodin a podrodin. Rostlinné aminoaldehyddehydrogenasy patří do rodiny ALDH 10. Katalyzují oxidaci ω - aminoaldehydů na jejich odpovídající ω - aminokyseliny nebo karboxylové kyseliny v přítomnosti koenzymu NAD(P)⁺ (Šebela a Duchoslav, 2009).

AMADH se objevuje v několika metabolických drahách, kromě katabolismu polyaminů se jedná o produkci osmoprotektantů a biosyntézu karnitinu (Kopečný *et al.*, 2013). AMADH existují v aktivní formě u rostlin jako homodimery (Tylichová *et al.*, 2010).

Z rodiny AMADH je nejlépe prostudovaný enzym z hrachu setého (*Pisum sativum*), PsAMADH, který se vyskytuje ve dvou isoformách PsAMADH1 a PsAMADH2. (Tylichová *et al.*, 2010). Obě isoformy se skládají z 503 aminokyselin a shodují se v sekvencích z 80% (Šebela *et al.*, 2000; Brauner *et al.*, 2003). Mezi nejlepší substráty patří např. 3-aminopropanal, 4-aminobutanal a 4-guanidinobutylaldehyd, ale nedokáže oxidovat betainaldehydy (Šebela *et al.*, 2000). Obě formy PsAMADH projevují podobné reakční rychlosti a afinitu k NAD⁺, v případě synteticky připraveného koenzymu thioNAD⁺ vykazují velmi rozdílné preference (Tylichová *et al.*, 2010). Díky tomu by bylo možné experimenty s thioNAD⁺ a substráty 3-aminopropanalem a 4-aminobutanalem rozlišit výskyt obou isoenzymů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

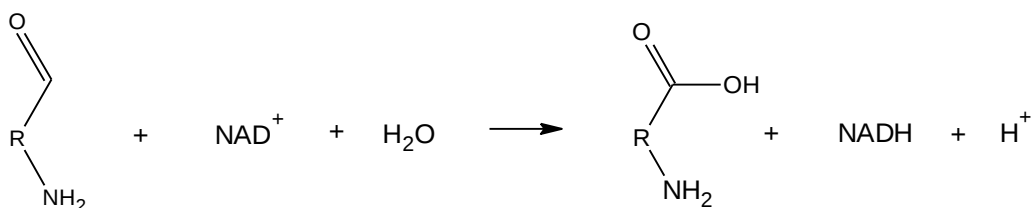
2.1 Nadrodina aldehyddehydrogenas

Aldehyddehydrogenasy (ALDH) jsou enzymy, které tvoří nadrodinu oxidoredukčních enzymů. Tato nadrodina má několik podrodin. Do rodiny ALDH10 patří mimo jiné i rostlinné aldehyddehydrogenasy, které nazýváme aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) s odkazem na jejich lepší substráty (Frömmel *et al.*, 2015). Nadrodina ALDH je rozdělena do genových rodin a podrodin na základě procenta identity každého proteinu ve srovnání s ostatními proteiny. ALDH protein z jedné rodiny je definován jako takový, který je méně než z 40% podobný proteinu z kterékoliv jiné rodiny (Sophops *et al.*, 2001). Proteiny, které si jsou podobné více, pak tvoří rodinu.

ALDH nadrodina zahrnuje skupinu NAD(P)^+ -dependentních enzymů, které metabolizují širokou škálu endogenních a exogenních alifatických a aromatických aldehydových molekul jejich oxidací na odpovídající karboxylové kyseliny (Lindahl, 1992). ALDH jsou známy ve formě dimeru nebo tetrameru, ovšem jako minimální funkční oligomer byl identifikován dimer, protože disociace na podjednotky se zdá být neslučitelná s katalytickou funkcí. Aktivní místo se tvoří na rozhraní podjednotek, zde u PsAMADH substrát reaguje s aminokyselinovým zbytkem C294, který se nachází mezi místem navázání koenzymu NAD^+ a místem pro navázání substrátu. Další residua zapojená v katalytické reakci, konkrétně se jedná o Asn162 a Glu260, se vyskytují na dně substrátového tunelu (Tylichová *et al.*, 2010).

2.2 Aminoaldehyddehydrogenasy

Aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH) je NAD^+ dependentní enzym, ačkoli bylo prokázáno, že některé AMADH mohou akceptovat i NADP^+ , nicméně reakce následně běží pomaleji. Enzym katalyzuje oxidaci různých ω -aminoaldehydů a některých dalších aldehydových substrátů za vzniku odpovídající ω -aminokyseliny nebo karboxylové kyseliny - schéma reakce znázorňuje obr. 1 (Šebela a Duchoslav, 2009).



Obr. 1 Reakce aminoaldehyddehydrogenas. Symbol R znázorňuje alkylový řetězec v délce 2-6 uhlíkových atomů (převzato z Šebela a Duchoslav, 2009).

Aminoaldehydy vznikají např. při oxidační deaminaci diaminů či monoaminů, nebo oxidací polyaminů (Šebela *et al.*, 2000). Reakce AMADH zahrnuje nukleofilní atak katalytickým cysteinem na aldehydový substrát, následuje thioesterová forma a přesun hydridu na koenzym. (Wymore *et al.*, 2004). Takže při oxidaci aminoaldehydů současně dochází k redukci koenzymu NAD^+ .

2.2.1 AMADH – účast v metabolismu

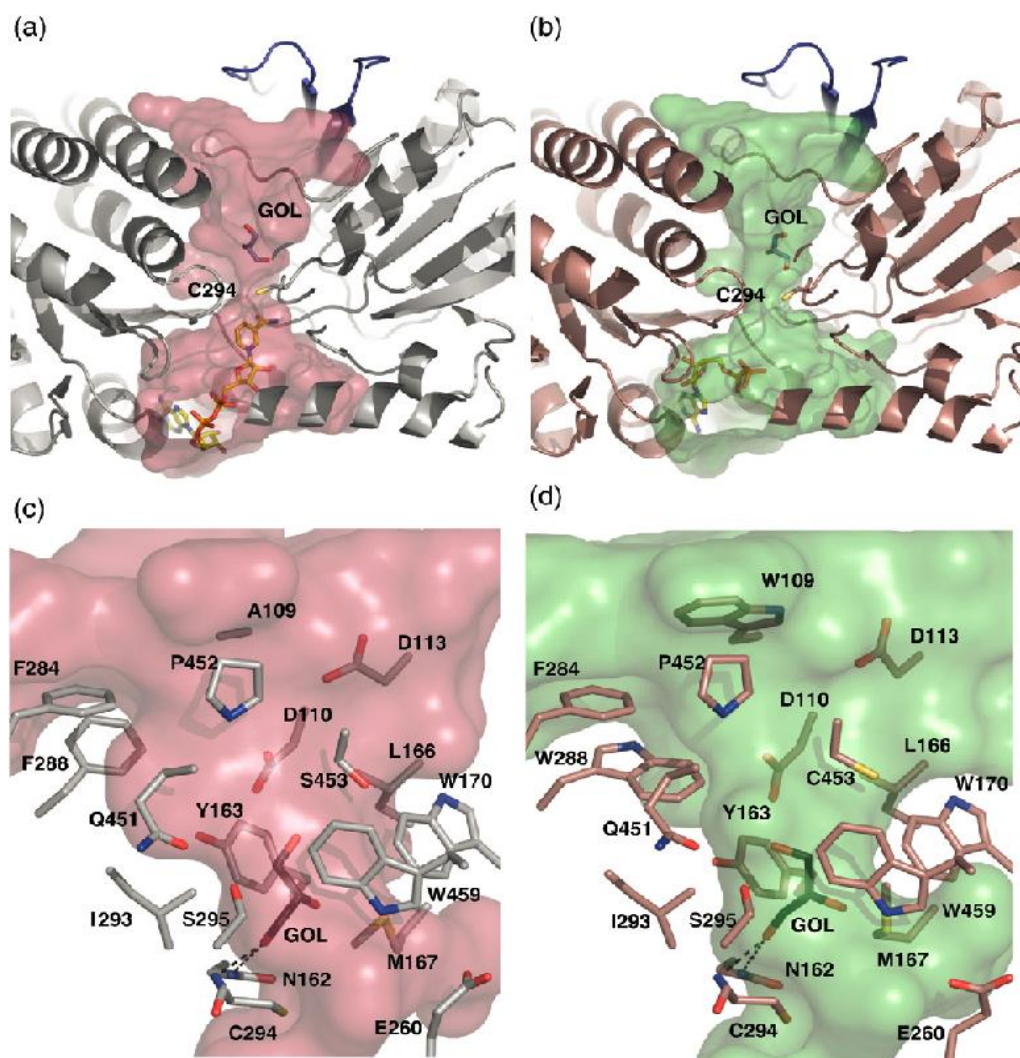
AMADH se objevuje v několika metabolických drahách, jsou jimi katabolismus polyaminů, produkce osmoprotektantů a biosyntéza karnitinu (Kopečný *et al.*, 2013). ALDH 10 tak spojuje tři nepříbuzné metabolické dráhy: metabolismus polyaminů, cholinu a lysinu. Klasifikace jednotlivých členů je tedy vztažena na substrátovou specifickou, na základě které ji rozdělujeme na:

- a) 4 – aminobutyraldehyddehydrogenasy (ABALDH, EC 1.2.1.19)
 - b) 4- guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (GBALDH, EC 1.2.1.54)
 - c) betainaldehyddehydrogenasy (BADH, EC 1.2.1.8)
 - d) 4 – trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (TMABALDH, EC 1.2.1.47)
- (Tylichová *et al.*, 2010).

Další důležitou funkcí je degradace reaktivních aldehydů vzniklých při poškození lipidů v buněčných membránách. Mnoho takto vzniklých aldehydů může kovalentně vázat makromolekuly zahrnující DNA, proteiny a lipidy (Esterbauer *et al.*, 1991). Tímto způsobem mohou inaktivovat enzymy a degradovat chromozomální DNA. ALDH zde představují jeden ze způsobů buněčné ochrany (Brocker *et al.*, 2011).

2.2.2 AMADH – struktura enzymů

AMADH existují v aktivní formě u rostlin jako homodimery, které obsahují podjednotky, jež jsou pro enzymy z ALDH nadrodiny typické. Každá podjednotka se skládá z katalytické domény, domény vázající koenzym a oligomerizační domény. Aktivní místo rostlinných AMADH, jenž je lokalizováno mezi koenzymovou doménou a katalytickou doménou je dostupné přes nálevkovitý průchod o šířce 5-8 Å a hloubce 15 Å, dovolující proniknout strukturně rozmanitým aldehydům ke katalytickému cysteinu a navázat se tak na toto místo pro umožnění katalytické přeměny. Substrátový tunel obou isoenzymů z hrachu (PsAMADH1 a PsAMADH2) se liší pouze ve třech aminokyselinových zbytcích, proto je jejich substrátová specifita podobná (obr. 2) (Tylichová *et al.*, 2010).

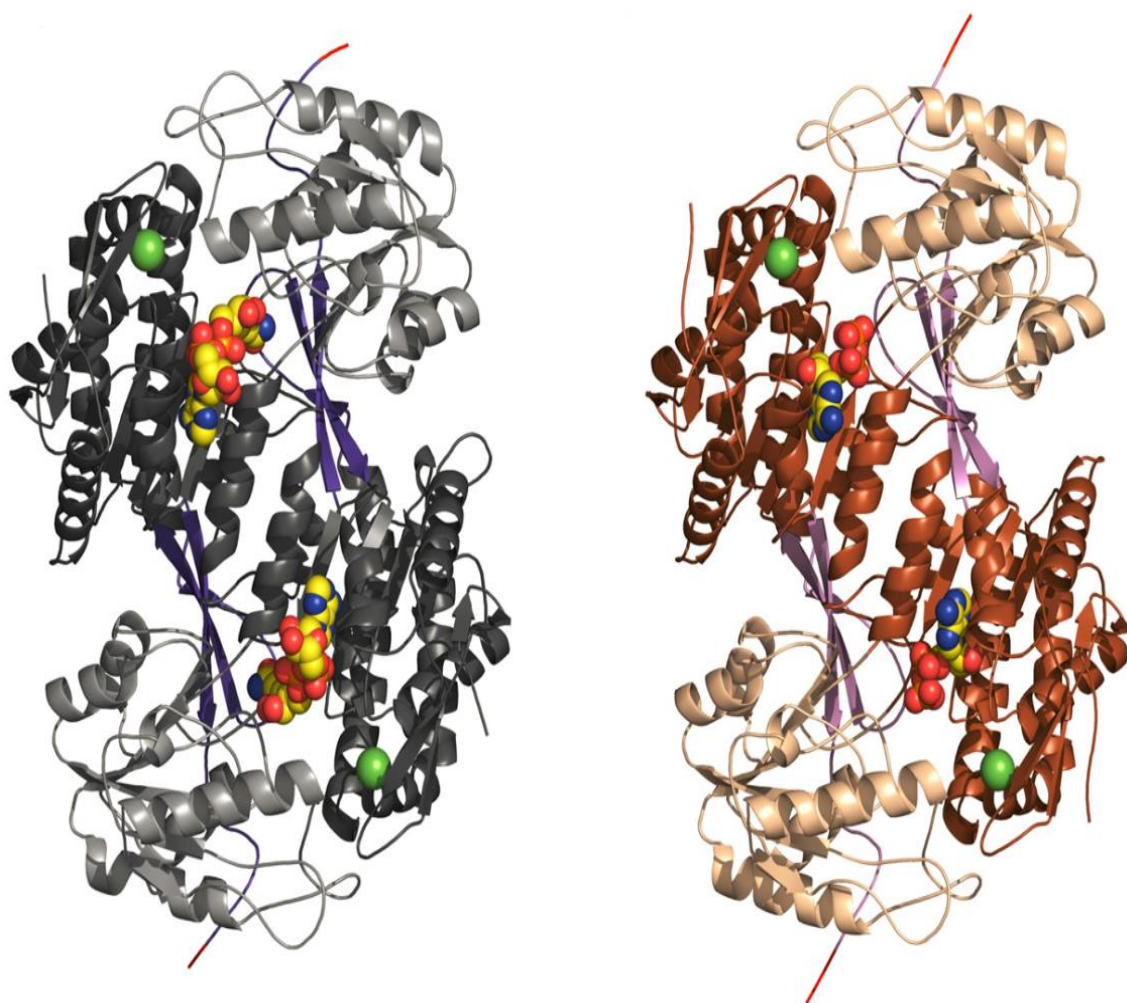


Obr. 2 Substrátové tunely obou isoenzymů. Růžová a zelená barva zobrazují celkovou plochu dutin v substrátovém tunelu (u PsAMADH1 - růžová barva, u PsAMADH2 – zelená barva). Řetězec PsAMADH1 je znázorněn šedou barvou, pro PsAMADH2 hnědou. U obrázků c) a d) je vodíková vazba mezi glycerolem (GOL) a enzymem znázorněna přerušovanou vazbou (převzato z Tylichová *et al.*, 2010).

2.2.3 PsAMADH

Z rodiny AMADH je nejlépe prostudovaným enzymem PsAMADH, který vykazuje širokou substrátovou specifičnost (Tylichová *et al.*, 2010). Enzym izolovaný z hrachu (*Pisum sativum*) se vyskytuje ve dvou isoformách: PsAMADH1 a PsAMADH2, obě isoformy se skládají z 503 aminokyselin a shodují se v sekvencích z 80% (Šebela *et al.*, 2000; Brauner *et al.*, 2003).

PsAMADH je ze strukturního hlediska podobná lidským mitochondriálním ALDH (Tylichová *et al.*, 2010), prostorové struktury PsAMADH1 a 2 jsou znázorněny na obr. 3.



Obr. 3 Struktura PsAMADH 1 (vlevo) a PsAMADH2 (vpravo) (převzato z Tylichová *et al.*, 2010).

Nativní hrachová AMADH1 byla analyzována gelovou chromatografií jako tetramer 230 kDa, molekulová hmotnost jedné podjednotky byla stanovena v hodnotě 57 kDa (Šebela *et al.*, 2000). Rekombinantní AMADH1 produkovaná v *E. coli* existuje jako dimer 120 kDa. Enzym byl potvrzen jako kyselý protein s *pI* 5,4, což odpovídá predikci z aminokyselinové sekvence (Šebela *et al.*, 2001).

Aktivní místo enzymu tvoří aminokyselinové zbytky Cys294, Asn162 a Glu260. Při cílené mutagenezi PsAMADH2 byl záměnou za alanin při vstupu do katalytického tunelu objeven vliv aromatické kyseliny Trp288 na substrátovou specifitost. V tomto místě interagují π elektrony tryptofanu s elektrofilní protonovanou aminoskupinou vstupujícího aminoaldehydu. Díky této záměně významně klesla afinita PsAMADH2 k substrátům APAL a ABAL. PsAMADH1 obsahuje místo Trp288 na stejné pozici Phe288. Ukázalo se, že přítomnost Phe288 mírně rozšiřuje substrátový tunel, což zvýšilo hodnotu K_m u substrátů APAL a ABAL (Kopečný *et al.*, 2011).

AMADH z hrachu může být inhibován sulfhydrylovými činidly, několika jednoduchými aldehydy nebo komplexotvornými látkami (Šebela *et al.*, 2000).

2.2.3.1 Lokalizace, pH a teplotní optimum

Z hlediska lokalizace se u AMADH jedná o nitrobuněčný enzym. Oba isoenzymy AMADH mají C-koncovou peroxisomální sekvenci, přesto jejich přesná lokalizace uvnitř buňky není dosud známa (Tylichová *et al.*, 2010).

Stabilita enzymu byla určena v rozmezí pH 6 - 9,5. Maximální aktivitu enzym vykazoval při pH 8,5. Teplotní optimum AMADH z hrachu bylo stanoveno na 45°C, nad 50°C se aktivita enzymu snižovala (Šebela *et al.*, 2000).

2.2.3.2 Kinetické parametry

Mezi substráty PsAMADH patří 3-aminopropanal (APAL), 4-aminobutanal (ABAL) či 4-guanidinobutyraldehyd (GBAL). Ačkoli u hrachové AMADH byla prokázána příbuznost s rostlinnými betainaldehyddehydrogenasami (BADH), AMADH z hrachu nedokáže oxidovat betainaldehydy (Šebela *et al.*, 2000). Preference jednotlivých isoenzymů k přírodním substrátům je popsána v tab. 1. Pro isoenzym PsAMADH1 je nejlepším substrátem TMABAL, dále GBAL, APAL a ABAL. U druhého isoenzymu PsAMADH2 se jedná o substráty APAL, pak GBAL, TMABAL a ABAL (Tylichová *et al.*, 2010).

Tab. 1 Kinetické parametry PsAMADH pro přírodní substráty a koenzym NAD⁺ (převzato z Tylichová *et al.*, 2010).

ligand	PsAMADH1			PsAMADH2		
	K_m (μM)	V ($\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V/K_m	K_m (μM)	V ($\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V/K_m
TMABAL	10	87	1	21	140	0,35
GBAL	11	68	0,71	7	78	0,59
APAL	75	57	0,09	10	190	1
ABAL	170	50	0,03	29	57	0,10
NAD ⁺	40	-		55	-	

Obě formy PsAMADH projevují podobné reakční rychlosti a afinitu k NAD⁺ ($K_m = 40 \mu\text{M}$ pro PsAMADH1 a $K_m = 55 \mu\text{M}$ pro PsAMADH2) (Tylichová *et al.*, 2010). Mezi přirozené koenzymy AMADH patří kromě NAD⁺ i NADP⁺, byly také připraveny deriváty NAD⁺, ku příkladu thioNAD⁺. Koenzym NADP⁺ je ve srovnání s NAD⁺ méně efektivní, podobně i synteticky připravený koenzym thioNAD - srovnání tab. 2 (Tylichová *et al.*, 2010). Díky velmi rozdílné preferenci u PsAMADH1 a PsAMADH2 by bylo možné experimenty s thioNAD⁺ (zvýrazněno v tab. 2) a substráty APALem a ABALem rozlišit výskyt obou isoenzymů.

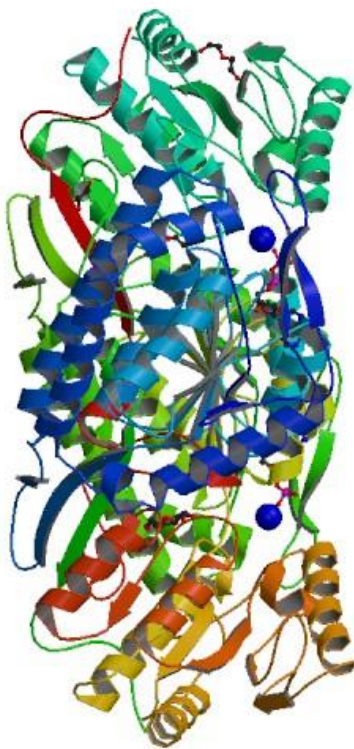
Tab. 2 Preference koenzymů a rozdíl v přeměně přirozených substrátů u isoenzymů hrachové AMADH (převzato z Tylichová *et al.*, 2010).

ligand	relativní rychlost reakce (%)	
	PsAMADH1	PsAMADH2
koenzym		
NAD ⁺	100	100
NADP ⁺	14	15
thioNAD ⁺	4,5	21
deamino NAD ⁺	152	172
substrát		
APAL	100	100
ABAL	82	36

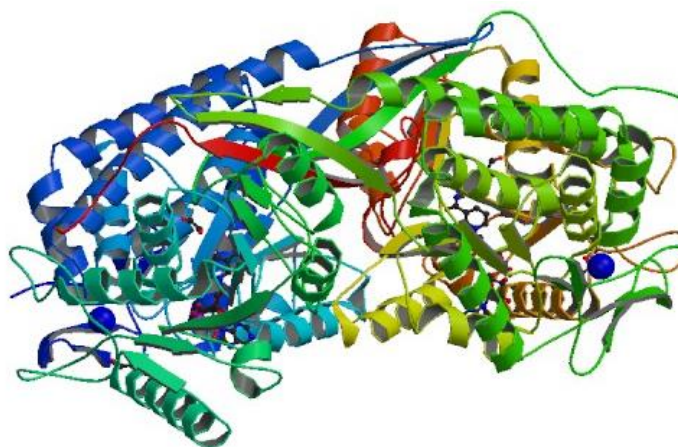
2.2.4 ZmAMADH

AMADH izolovaná z kukuřice (*Zea mays*) se vyskytuje ve třech isoformách ZmAMADH1a (obr. 5), ZmAMADH1b a ZmAMADH2. Enzym izolovaný z rajčete (*Solanum lycopersicum*) je tvořen dvěma isoenzymy SlAMADH1 (obr. 4) a SlAMADH2. Sekvence obou isoenzymů rajčete jsou z 80% shodné.

Sekvence ZmAMADH1a a ZmAMADH1b se ve svých aminokyselinových sekvencích shodují z 97% (liší se pouze ve 13ti aminokyselinách). ZmAMADH2 je při srovnání sekvencí s oběma isoenzymy ZmAMADH1a a ZmAMADH1b identická ze 75 %. Stavba substrátového tunelu i aktivního místa je u všech tří isoenzymů podobná jako u PsAMADH (srovnání tab. 3). V substrátovém tunelu je uspořádání aminokyselinových zbytků velmi podobné jako u PsAMADH2. Na rozdíl od PsAMADH a ostatních isoform ZmAMADH, dokáže ZmAMADH1 oxidovat betainaldehyd, což je způsobeno přítomností cysteinu namísto isoleucinu (Kopečný *et al.*, 2013).



Obr. 4 Struktura SlAMADH1 (převzato z RCSB-Protein Data Bank, DOI: 10.2210/pdb4i9b/pdb).



Obr. 5 Struktura ZmAMADH1a (převzato z převzato z RCSB-Protein Data Bank, DOI: 10.2210/pdb4i8p/pdb).

Tab. 3 Srovnání aminokyselinové sekvence aktivního místa u PsAMADH, ZmAMADH a SIAMADH (převzato a upraveno z Kopečný *et al.*, 2013).

	W109	D110	D113	N162	Y163	L166	M167	W170	E260	F284	W288	I293	C294	S295	I444	Q451	P452	C453	W459	C-konec
PsAMADH1	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	I	Q	P	C	W	AKL
PsAMADH2	A	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	F	I	C	S	I	Q	P	S	W	SKL
SIAMADH1	A	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	A	V	C	S	I	Q	P	T	W	SKN
SIAMADH2	S	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	I	Q	P	C	W	SKL
ZmAMADH1a	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	C	Q	P	C	W	SKL
ZmAMADH1b	W	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	W	I	C	S	I	Q	P	C	W	SKL
ZmAMADH2	G	D	D	N	Y	L	M	W	E	F	A	V	C	S	I	Q	P	C	W	SKL

2.2.5 Betainaldehyddehydrogenasy

Betainaldehyddehydrogenasy (BADH, EC 1.2.1.8) patří do nadrodiny ALDH. Tyto enzymy jsou schopny ireverzibilní oxidace betainaldehydu na glycinbetain. BADH byly lokalizovány v řadě organismů. U rostlin se jednalo o špenát (*Spinacia oleracea* L.) (Pan, 1988), ječmen (Nakamura *et al.*, 2001) a oves (*Avena sativa*) (Livingstone *et al.*, 2003). Hrách je znám jako druh, který neakumuluje betain. Navíc bylo zjištěno, že žádné isoenzymy BADH nemohou být detegovány v extraktech z hrachových listů (Weretilnyk a Hanson, 1990).

2.3 Substráty

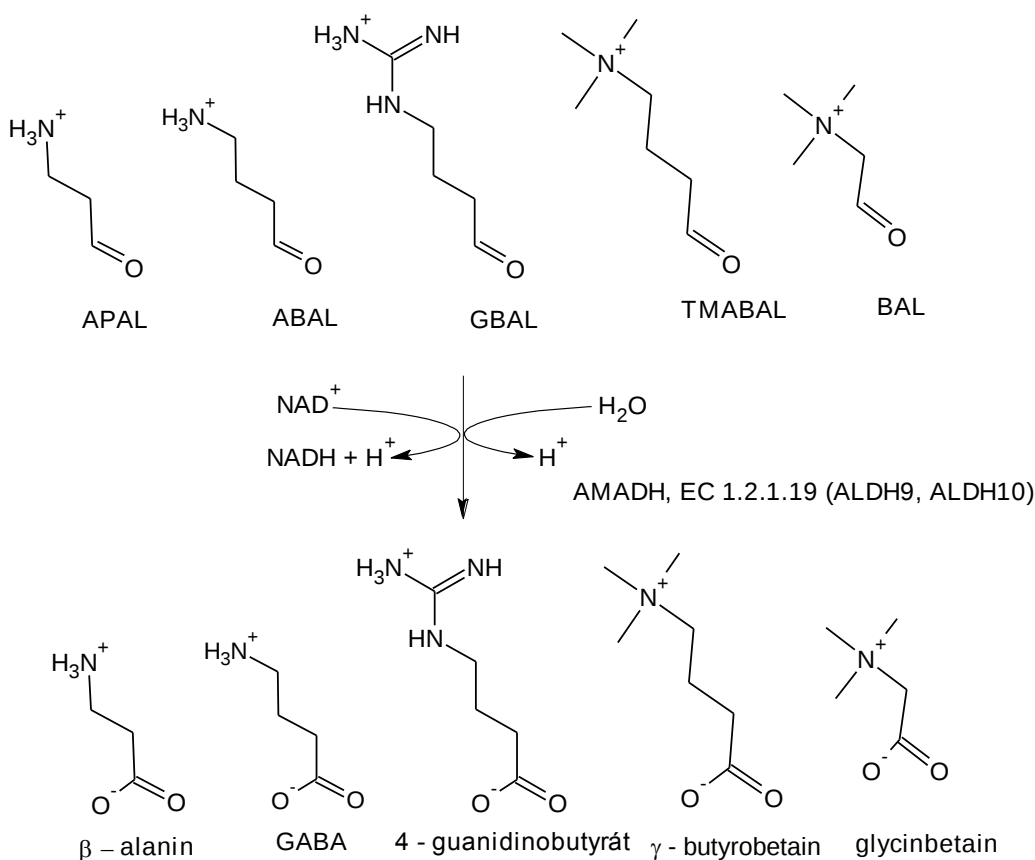
Během posledních padesáti let byly AMADH charakterizovány v mikroorganismech, rostlinách a živočiších. Oxidují širokou škálu přírodních i některých synteticky připravených aminoaldehydů (Šebela *et al.*, 2000).

2.3.1 Přírodní substráty

Přednostně se oxidují různé primární ω -aminoaldehydy, které vznikají jako produkty degradace polyaminů a oxidují se na odpovídající ω -aminokyseliny – schéma reakce obr. 6. AMADH vykazuje širokou substrátovou specifickou a využívají různé aminoaldehydy (C3-C6) jako substráty (Šebela *et al.*, 2000).

Rostlinné AMADH vážou různé aminoaldehydy s vysokou afinitou. Podle této charakteristiky se AMADH rodina odlišuje od jiných ALDH rodin, jako jsou např. ALDH2 a ALDH3, jejichž zástupci jsou schopni oxidovat široké spektrum alifatických a aromatických aldehydů (Kopečný *et al.*, 2011).

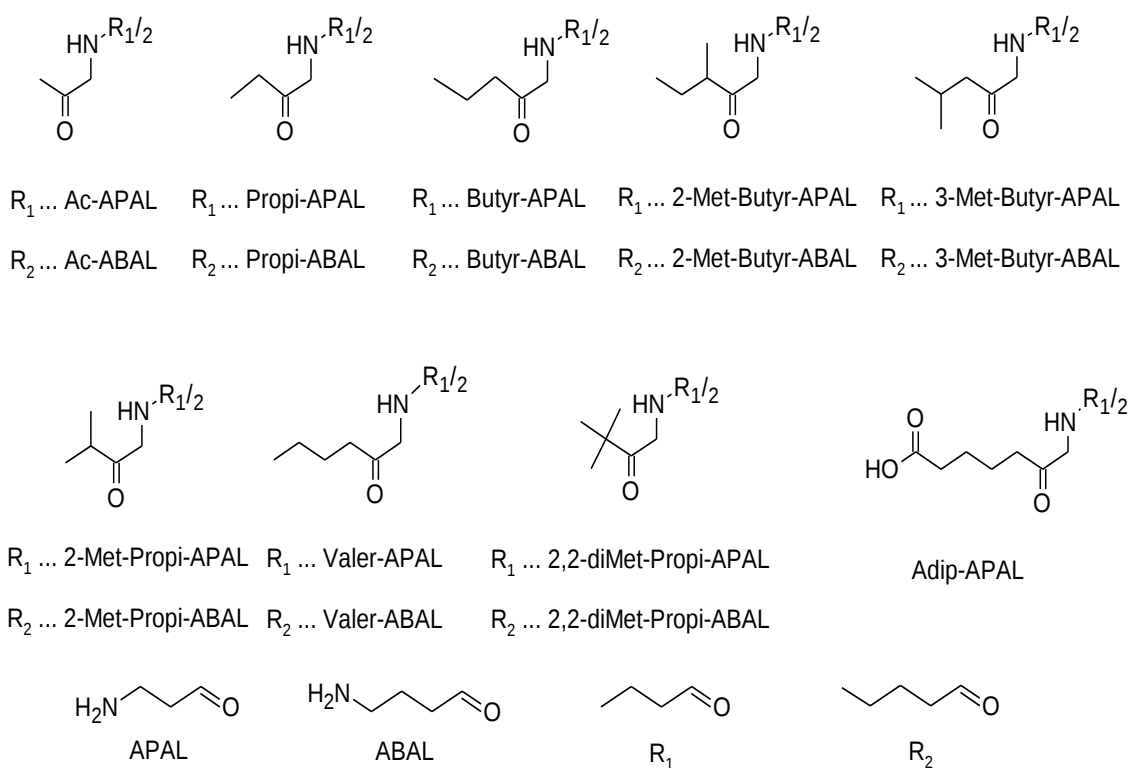
Předpokladem ke studiu syntetických sloučenin s heterocykly obsahujícími atom dusíku a aldehydovou skupinu (připojenou přímo na heterocyklus, případně nacházející se v postranním řetězci) jako potenciálních substrátů jsou rozměry substrátového tunelu, který umožňuje prostupnost aldehydů této velikosti až na katalytický cystein (Tylichová *et al.*, 2010).



Obr. 6 Přírodní substráty AMADH: APAL je přeměněn na β -alanin, ABAL na GABA, GBAL na 4-guanidinomáselnou kyselinu, *N,N,N*-trimethyl-4-aminobutyraldehyd (TMABAL) na γ -butyrobetain a betainaldehyd (BAL) na glycinebetain (převzato z Kopečný *et al.*, 2011).

2.3.2 Substráty – syntetické

Rostlinné AMADH oxidují mimo svoje přirozené aminoaldehydové substráty i řadu syntetických aldehydů. Může se jednat o deriváty přirozených substrátů, jako jsou například APAL nebo ABAL – jejich strukturní vzorce jsou na obr. 7 – a dalších substrátů, které ve své molekule obsahují například benzenové jádro, pyridinový, pyrimidinový nebo purinový kruh. Vlastnosti aldehydů obsahující aromatický kruh jsou ovlivněny pozicí substituentu, kdy jeho větší vzdálenost od aldehydové skupiny je výhodnější pro substrátové vlastnosti (Frömmel *et al.*, 2012).



Obr. 7 Strukturní vzorce syntetických substrátů připravených z přirozených substrátů APAL a ABAL, konkrétně *N*-acyl-aminoaldehydů (převzato z Frömmel *et al.*, 2015).

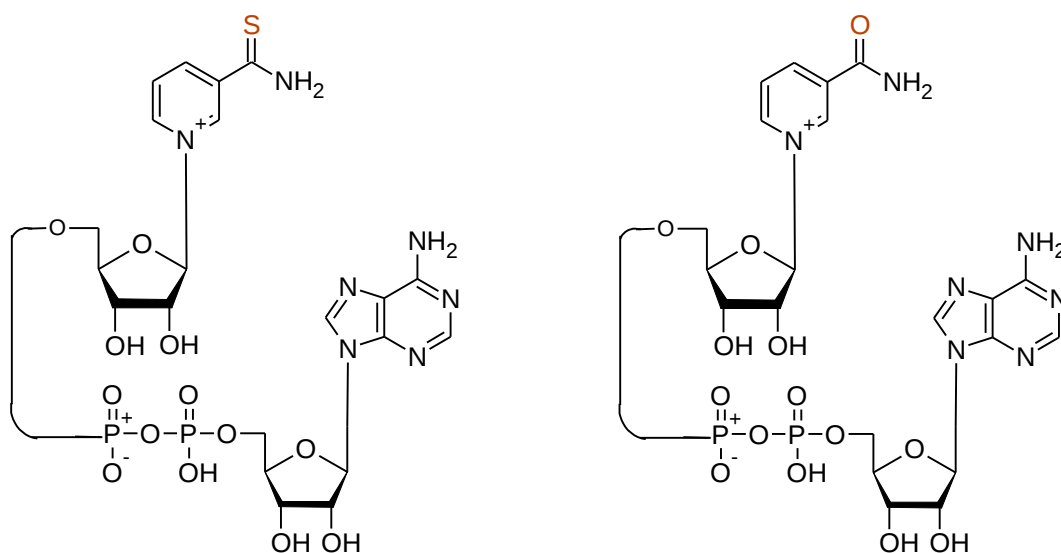
2.3.2.1 N-acylové deriváty

U N-acylových derivátů APALu a ABALu jsou kinetické parametry oxidace mnohem více ovlivněny počtem atomů uhlíku v jádře ω -aminoaldehydového řetězce, než velikostí a strukturní izomerií acylového řetězce navázaného na aminoskupinu. Při porovnání derivátů APALu a ABALu, jsou deriváty APALu lepšími substráty, než odpovídající deriváty ABALu (Frömmel *et al.*, 2015).

2.4 Koenzymy

Mezi přirozené koenzymy AMADH patří NAD^+ i NADP^+ . V minulosti bylo pracováno s deriváty těchto koenzymů, konkrétně thio NAD^+ (obr. 8) a thio NADP^+ .

Pro srovnání kinetických parametrů byl thio NAD^+ využit i dříve. Při měření s glutamátdehydrogenasou (GDH) (EC 1.4.1.3) byla prokázána stejná afinita a maximálně 40% rychlost přeměny při srovnání s NAD(P)^+ (srovnání konkrétních hodnot v tab. 4). Reakce s thio NAD(P)H byly měřeny při absorpčním maximu redukované formy této látky, tedy při vlnové délce 400 nm. Při vlnové délce 340 nm (používaná pro koenzymy NAD(P)^+), nebyla redukovaná forma detegována (Alex a Bell, 1980).



Obr. 8 Vlevo strukturní vzorec thio NAD^+ , vpravo NAD^+ .

Tab. 4 Kinetické a inhibiční konstanty pro měření s různými koenzymy (převzato z Alex a Bell, 1980).

koenzym	V (μmol/min na mg enzymu)	K_m (μM)	K_i (μM)
NAD ⁺	91,3 (±3%)	6 (±4%), 70 (±3%)	11 (±5%)
thioNAD ⁺	36,5 (±4%)	12 (±4%), 200 (±3%)	41 (±5%)
NADP ⁺	35,5 (±4%)	9 (±4%), 42 (±4%)	11,5 (±5%)
thioNADP ⁺	13,5 (±4%)	27 (±4%), 310 (±3%)	29 (±5%)

Dále byly měřeny s thioNAD⁺ kinetické parametry dihydrolipoamiddehydrogenasy z *Mycobacterium tuberculosis*, kdy zjištěná hodnota K_m byla pro thioNAD⁺ ve srovnání s NAD⁺ asi třikrát menší (Argyrou a Blanchard, 2001).

2.5 Fyziologická role AMADH

Stresové situace v životním prostředí jako jsou sucho a vysoká salinita indukují rychlou tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), které následně způsobují nadměrnou akumulaci aldehydů v rostlinných buňkách. Aldehydy jsou také meziprodukty v řadě metabolických drah, ale nadměrné množství aldehydů zasahuje do fungování metabolismu a některé aldehydy se mohou objevit i v toxické úrovni (Jakoby a Ziegler, 1990).

Studium AMADH má i ekonomické důvody. Genová mutace AMADH vede k acetylaci volného ABALu (případně jeho cyklické formy) a akumulaci 2 – acetyl - Δ1 - pyrolinu, látky, která je principem vůně několika druhů aromatické rýže (jasmínová, basmati) nebo sóji (u nezralých semen) (Bradbury *et al.*, 2008; Arikrit *et al.*, 2011).

ALDH přispívají k homeostázi aldehydů a jsou považovány za prostředníky eliminace toxických aldehydů (Sunkar *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2006).

2.5.1 Osmoprotektanty

Tyto sloučeniny vznikají v organismech v reakci na osmotický stres. Vyskytují se v rostlinách, bakteriích a dalších organismech. Konkrétně se jedná o cukerné alkoholy, aminokyselinu prolin, kvarterní nebo terciární amoniové sloučeniny. Ani ve vysokých koncentracích se nechovají jako inhibitory enzymů, ale chrání je i membrány proti škodlivým efektům způsobených destabilizujícími ionty jako jsou Na⁺ a Cl⁻ (Yancey *et al.*, 1982). Osmoprotektanty také chrání organismus před velmi nízkými i vysokými teplotami tím, že sníží osmotický potenciál cytoplasmy a tím zvětší rozdíl vodního

potenciálu proti vnějšímu prostředí. Při stabilizaci proteinů jsou osmoprotektanty uspořádány tak, že mezi proteinem a jím se nachází vrstva vody. To vytváří situaci, ve které struktury nativního proteinu jsou termodynamicky výhodné, protože představují nejméně možnou plochu povrchu na vodu, čímž se stabilizuje jeho struktura. V rostlinných buňkách se osmoprotektanty nacházejí v cytoplazmě (obsahující organely) a téměř nejsou přítomny ve vakuolách (McNeil *et al.*, 1999).

V mnoha rostlinách se vyskytují kvarterní amoniové sloučeniny, např. se jedná o glycinbetain, prolinbetain, β -alaninbetain (Rhodes a Hanson, 1993). Některé vyšší rostliny hromadí betain (glycinbetain) jako odpověď na stres z důvodu vyšší salinity nebo na stres z nedostatku vody (Šebela *et al.*, 2000). Glycinbetain je syntetizován oxidací cholinu přes betainaldehyd. Cholin hraje důležitou roli jako prekursor fosfatidylcholinu, hlavní složky membránových fosfolipidů u eukaryot (Rathinasabapathi, 2000).

β -alanin je důležitý metabolický meziprodukt známý jako prekursor rostlinného osmoprotektantu β -alaninbetainu (Duhazé *et al.*, 2002). β -alanin vzniká oxidací APAL, nejlepšího substrátu pro isoenzym PsAMADH2, γ -butyrobetain (prekursor karnitinu v živočišných buňkách) je produktem oxidace substrátu TMABAL - nejlepšího substrátu pro isoenzym PsAMADH1 (Tylichová *et al.*, 2010).

Za další látku chránící rostlinu před osmotickým stresem lze považovat kyselinu γ -aminomáslenou (GABA). Bylo zjištěno, že prolinové transportéry (u rajčat a u *Arabidopsis thaliana*) také přenášejí GABA. Tyto přenašeče jsou silně indukovány při nedostatku vody nebo vyšších koncentrací solí (Rentsch *et al.*, 1996). Prolinové - GABA transportéry mohou přenášet organické osmolyty, které plní ochranné funkce. Mezi další vlastnosti kyseliny patří ochrana před oxidačním stresem, regulace cytosolického pH a obrana před hmyzem (Bouché a Fromm, 2004).

2.5.2 Reakce na stres – mechanické poškození

Reakce na stres z mechanického poškození byla studována na sedmidenních semenáčcích hrachu setého. Mechanické poškození skalpelem vedlo ke zvýšení aktivity AMADH, aminoxidas (CAO) a peroxidas (POD) během hojení. Aktivita AMADH byla histochemicky detegována v epidermálních a parenchymových buňkách, které se nacházely v místě poškození. V důsledku vyšší aktivity CAO a POD v poškozených pletivech rostla koncentrace H_2O_2 i aminoaldehydů, jež byly

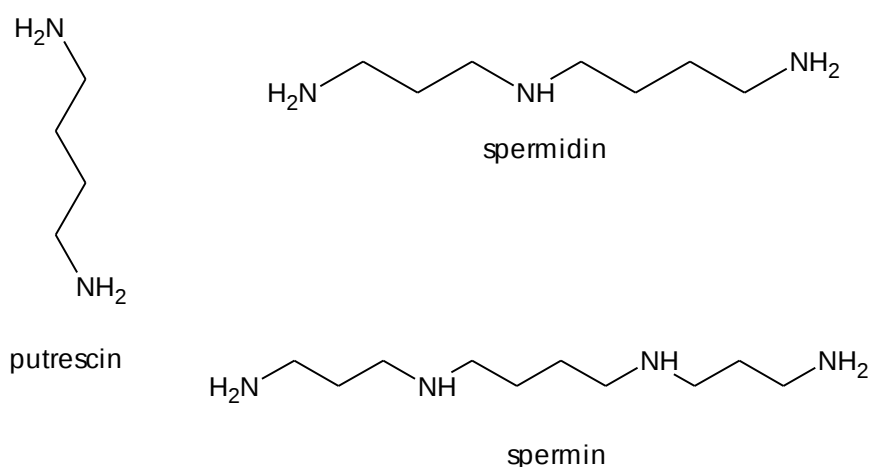
pravděpodobně produkovány v širokém měřítku. Proto by AMADH mohly sloužit jako detoxifikační enzym pro kontrolu na buněčné úrovni (Petřivalský *et al.*, 2007).

2.5.3 Reakce na stres – vysoká salinita

Při zkoumání halofilních rostlin (byly použity referenční halofilní rostliny *Eutrema salsugineum* a *Eutrema parvulum*) bylo zjištěno, že v souvislosti s genomovou organizací, počtem kopií, sub-buněčnou lokalizací a expresí genů ALDH nebyly pozorovány žádné významné rozdíly, které by mohly přispět k toleranci vyšší salinity při srovnání s *Arabidopsis thaliana*. Ovšem při vyšší salinitě byla intenzita přepisu genů u *E. salsugineum* vyšší, než u *Arabidopsis*. To může znamenat, že regulace transkripce je více přizpůsobena vysoké koncentraci soli u *E. salsugineum*, než u *Arabidopsis* (Hou a Bartels, 2015).

2.6 Polyaminy

Polyaminy jsou organické sloučeniny, jež se skládají z uhlíkatého řetězce a tří nebo více aminoskupin vyskytující se napříč všemi buňkami (tři aminoskupiny: spermidin, čtyři aminoskupiny: spermin) (Takahashi a Kakehi, 2010). V rostlinách jsou nejrozšířenější právě tyto dvě zmíněné sloučeniny a diamin putrescin – jejich strukturní vzorce znázorňuje obr. 9 (Walters, 2003). V rostlinách jsou lokalizovány v cytoplazmě i v organelách, jedná se o vakuoly, mitochondrie a chloroplasty (Kumar *et al.*, 1997).



Obr. 9 Strukturní vzorce vybraných polyaminů a diaminu (převzato a upraveno dle Walters, 2003).

2.7 Fyziologická role polyaminů

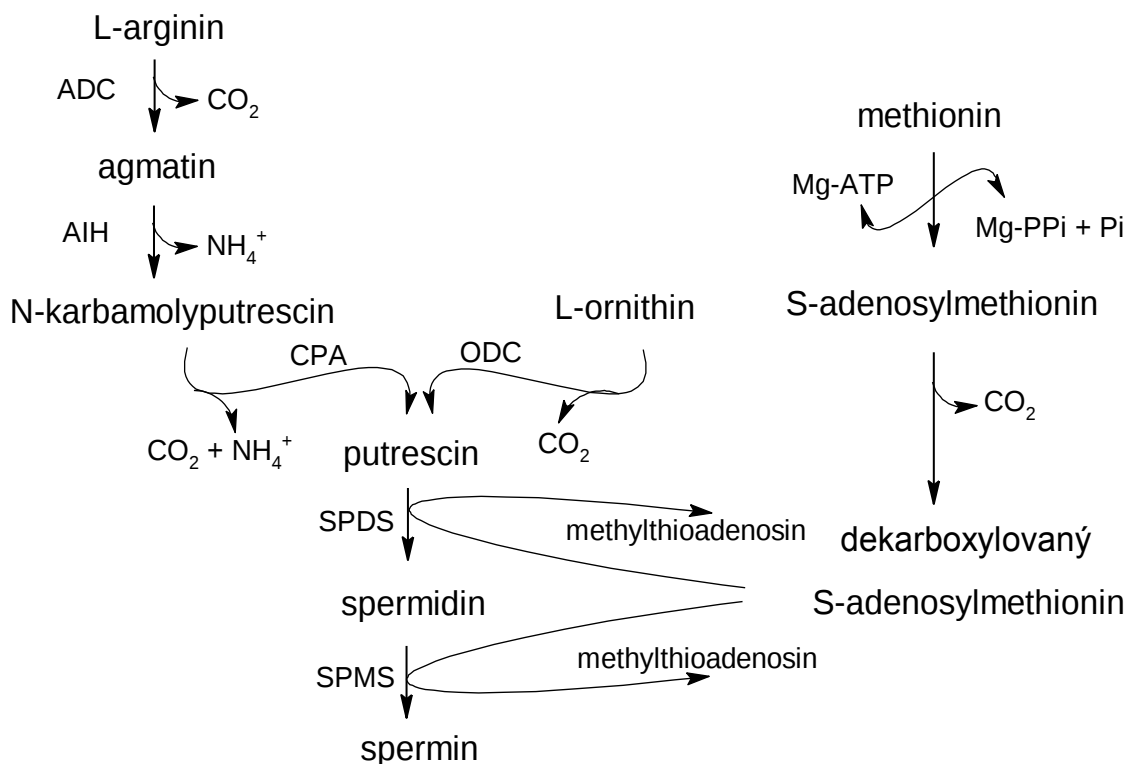
Polyaminy jsou při normálním buněčném pH protonovány, proto byla jejich biologická funkce zpočátku spojována se schopností vázat různé aniontové makromolekuly (DNA, RNA a proteiny), přičemž později bylo potvrzeno, že kromě stabilizace makromolekul polyaminy fungují i jako regulační molekuly (Alcázar *et al.*, 2009). Fyziologická role polyaminů, všudypřítomných kationových sloučenin, spočívá v účasti v reakcích, které jsou rozhodující ve fyziologických dějích jako je buněčná proliferace a diferenciace (Tiburcio *et al.*, 1997). U rostlin polyaminy hrají důležitou roli v procesech kontroly buněčného dělení, vzniku kořenů, vývoje a zrání plodů a odpovědi na biotický i abiotický stres (Takahashi a Kakehi, 2010). Předpokládá se, že rostliny získaly část polyaminové biosyntetické dráhy po předchůdcích chloroplastů, po sinicích - kyanobakteriích (Illingworth *et al.*, 2003).

2.7.1 Metabolismus polyaminů

Kromě pozitivního vlivu na rostliny mají polyaminy v případě akumulace inhibiční účinek na růst buněk a syntézu proteinů (He *et al.*, 1993).

2.7.1.1 Biosyntéza polyaminů

Biosyntéza polyaminů je iniciována tvorbou diaminu putrescinu. Jsou známy dva způsoby tvorby putrescinu, přeměnou L-argininu nebo L-ornithinu. Metabolická dráha, při které je putrescin syntetizován z L-argininu, probíhá ve třech krocích: arginin je pomocí arginindekarboxylasy (ADC, EC 4.1.1.19) přeměněn na agmatin, následuje přeměna agmatiniminohydrolasou (AIH, EC 3.5.3.12) na *N*-karbamoylputrescin a ten následně *N*-karbamolyputrescinamidohydrolasou (CPA, EC 3.5.1.53) na putrescin (Slocum *et al.*, 1984). Reakcí putrescinu se spermidinsynthasou (SPDS, EC 2.5.1.16) vzniká spermidin. Aminokupina je přenesena z dekarboxylovaného *S* - adenosylmetioninu, který je syntetizován z methioninu ve dvou na sebe navazujících reakcích methioninadenosyltransferasy (EC 2.5.1.6) a *S* - adenosylmethionindekarboxylasy (SAMDC, EC 4.1.1.50) schéma reakce obr. 10 (Kusano *et al.*, 2008).



Obr. 10 Schéma biosyntézy polyaminů (převzato a upraveno Kusano *et al.*, 2008).

2.7.1.2 Katabolismus polyaminů

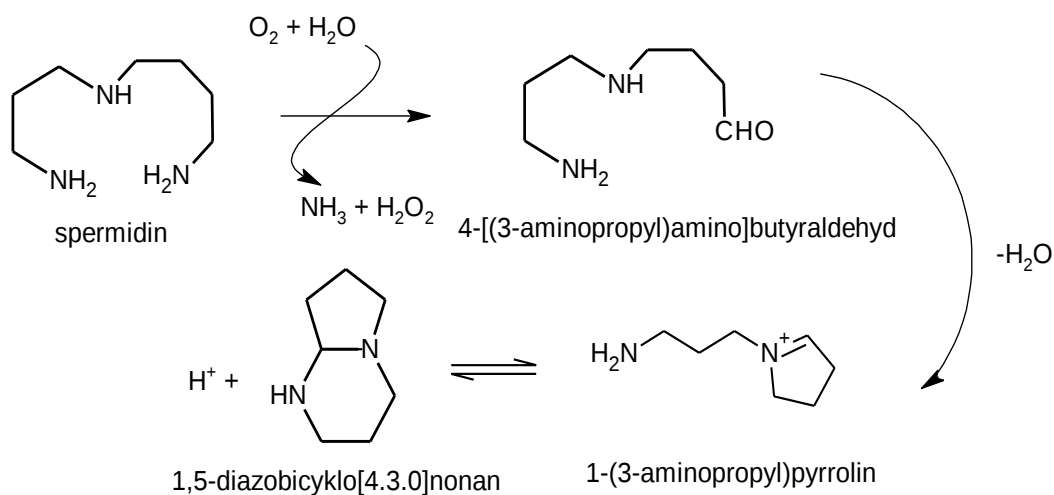
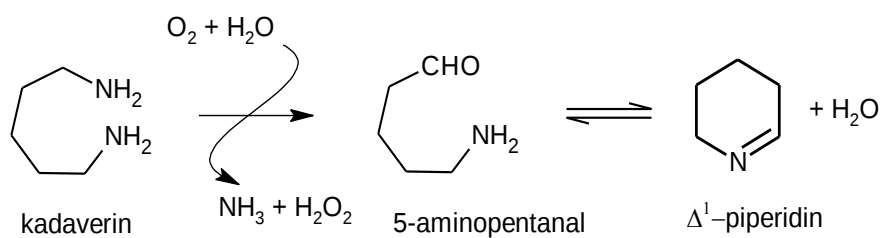
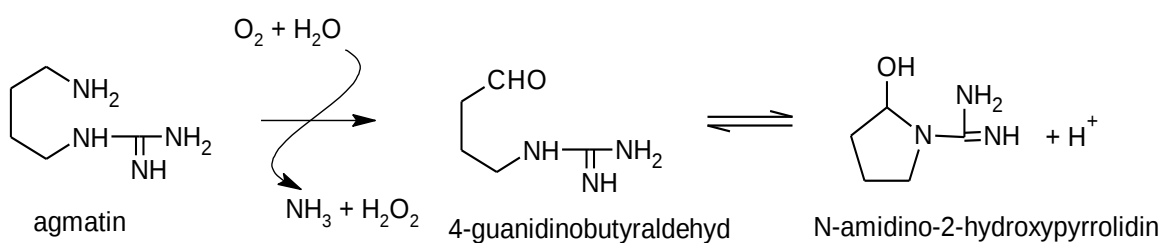
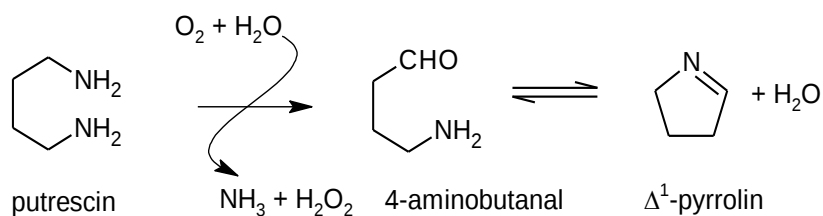
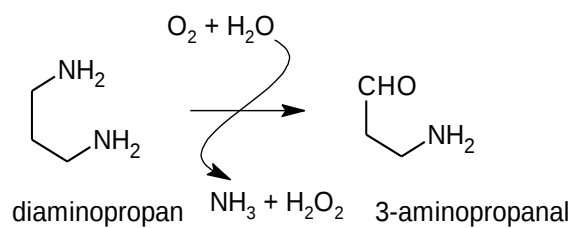
Prvním krokem přeměny jednoho polyaminu v druhý je *N*¹-acetylace (Gillyon *et al.*, 1987). Tato přeměna může regulovat vnitrobuněčný metabolismus polyaminů (De Agaizo *et al.*, 1995).

Diaminy a polyaminy jsou degradovány procesy oxidační deaminace respektive oxidace, konkrétně putrescin je deaminován pomocí diaminoxidasy obsahující měď (DAO; EC 1.4.3.22), spermidin a spermin jsou oxidovány pomocí polyaminoxidas, obsahujících flavinový koenzym (PAO; EC 1.5.3.14) (Smith, 1985; Bagni a Tassoni, 2001). DAO a PAO jsou enzymy, které nesou nekovalentně vázanou molekulu FAD (flavinadenindinukleotid) a vyskytují se ve vysokém množství v jednoděložných rostlinách (Šebela *et al.*, 2001). DAO byl purifikován a následně v něm byly identifikovány tři isoenzymy, purifikace proběhla například z listů jetele (*Trifolium subterraneum*) (Delhaize a Webb, 1987).

Oxidační deaminací substrátů DAO vznikají odpovídající aldehydy, amonné ionty a peroxid vodíku – schéma obr. 11. Tyto aldehydy pak představují substráty pro ALDH. U některých produktů reakce může docházet ke spontánní cyklizaci, putrescinu za vzniku

Δ^1 -pyrrolinu, kadaverinu za vzniku Δ^1 -piperidinu (Šebela a Duchoslav, 2009). Akumulací Δ^1 -pyrrolinu dochází k jeho acetylaci za vzniku 2-acetyl-pyrrolinu, vonné látky (Kopečný *et al.*, 2012).

O APALu je známo, že působí cytotoxicky, což může způsobit prasknutí lysozomů a kovalentní modifikaci proteinů. Jedná se o reaktivní sloučeninu (Šebela a Duchoslav, 2009). APAL může nevratně reagovat se sulfhydrylovou skupinou a vratně s aminoskupinami v proteinech, to vede k akumulaci *in vivo* ve volné i ve vázané formě (Ivanova *et al.*, 2002).



Obr. 11 Produkce aminoaldehydů rostlinnými oxidasami a jejich spontánní cyklizace (převzato a upraveno dle Šebela a Duchoslav 2009).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Biologický materiál

V této práci byly použity semena hrachu setého (*Pisum sativum*).

3.1.2 Chemikálie

- 2-merkптоethanol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- 2-jodoacetamid (IAA) (Sigma- Aldrich Chemie, USA)
- 4-aminobutyraldehyd diethylacetal (Sigma-Aldrich Chemie, USA)
- 3-aminopropionaldehyd diethylacetal (Sigma-Aldrich Chemie, USA)
- 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) (Sigma-Aldrich Chemie, USA)
- acetonitril (Merck, Německo)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- amfolyt Bio-Lyte 3/10 (Bio-Rad, USA)
- bichinoninová kyselina (Sigma-Aldrich Chemie, USA)
- coomassie brilliant blue G-250 (Merck, Německo)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- DL-dithiothreitol (Sigma- Aldrich Chemie, USA)
- glycerol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- glycin (Sigma- Aldrich Chemie, USA)
- hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma- Aldrich Chemie, USA)
- hydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich Chemie, Španělsko)
- hydrogenuhlíčitan amonný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- hydroxid sodný (Mach chemikálie s.r.o., ČR)
- chlorid vápenatý (Sigma-Aldrich Chemie, Japonsko)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- kyselina chlorovodíková (Lach-ner, ČR)
- kyselina octová (Lach-ner, ČR)
- n- butanol (Merck, Německo)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Merck, Německo)

- N,N'-methylenbisakrylamid (Invitrogen, VB)
- nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) (Sigma- Aldrich Chemie, USA)
- peroxodisíran amonný (APS) (Sigma- Aldrich Chemie, USA)
- phenazin methosulfát (PMS) (Sigma- Aldrich Chemie, Izrael)
- sacharosa (Sigma-Fluka, Švýcarsko)
- síran měďnatý (Sigma- Aldrich Chemie, USA)
- thionikotinamidadenindinukleotid (thioNAD⁺) (Sigma- Aldrich Chemie, USA)
- trisaminomethan (MP Biomedicals, Francie)
- trypsin (MP Biomedicals, Francie)

3.1.3 Přístroje

- analytické váhy (Radwag, Polsko)
- centrifuga Ministar (Eppendorf, Německo)
- centrifuga CL31R Multispeed (Thermo electron industries, Francie)
- digitální pH metr (XS instruments, Čína)
- digitální váha (Vibra, Japonsko)
- elektromagnetická míchačka (IKA LAB, Německo)
- hmotnostní spektrometr amaZon speed ETD (Bruker Daltonik, Německo)
- kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 RSLC nano (Thermo Fisher Scientific, Německo)
- homogenizátor Basic Ultra T-25 (IKA Werke, Německo)
- magnetická míchačka (IKA Werke, Německo)
- spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, Velká Británie)
- termostat (Major Science, USA)
- termostat Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)
- třepačka 130 control (IKA Werke, Německo)
- vakuová centrifuga Concentrator plus (Eppendorf, Německo)
- vortex (Chromservis, PRC)
- vývěva (KIF LAB, Francie)
- zařízení pro elektroforézu Mini protean (Bio-Rad, USA)
- zdroj pro elektroforézu EPS 600 (Amersham Pharmacia Biotech, Švédsko)

Běžné laboratorní vybavení: kádinky, automatické pipety a špičky k nim (Eppendorf), odměrné válce, špachtle, lžička, zkumavky, stojan na zkumavky, Petriho misky, kyvety do centrifugy (50 ml) křemenné a plastové kyvety do spektrofotometru, odsávací baňka, stříčka s destilovanou vodou, nádoba s ledovou tříští.

3.1.4 Použité metody

3.1.4.1 Příprava rostlinného materiálu

Nejprve se semena hrachu setého nechala jeden den nabobtnat ve vodě, další den byla vyseta do agropertilu a pěstována 14 dní ve fytotronu ve tmě. Každý den se odebírala nadzemní část a kořeny naklíčených semenáčků. Odebrané vzorky byly ihned zamrazeny a dále použity pro další analýzu.

3.1.4.2 Zpracování rostlinného materiálu

Pro extrakci proteinu byly zmrazené vzorky částí semenáčků hrachu setého (různá množství 0,5-5g) rozdrobeny pomocí homogenizátoru Basic Ultra T-25 ve zkumavce (50 ml) v dvojnásobném objemovém množství 0,1 mol·l⁻¹ draselno-fosfátového pufru (pH 7) obsahujícím 15 mmol·l⁻¹ 2-merkapt ethanol, 1 mmol·l⁻¹ EDTA a 10% sacharosu (Šebela *et al.*, 2000). Suspenze byla následně 10 minut centrifugována při 8000 g a teplotě 4 °C. Supernatant (proteinový extrakt) byl slit do zkumavek a zmrazen.

3.1.4.3 Měření aktivity

Rychlost enzymové přeměny byla monitorována vznikem redukované formy koenzymu v průběhu reakce. Měření probíhalo spektrofotometricky při vlnové délce světla 340 nm (pro koenzym NADH) a při 400 nm (pro koenzym thioNADH). Reakční směs o celkovém objemu 2 ml obsahovala 1,6 ml 0,125 mol·l⁻¹ Tris-HCl pufru o pH 9, 50 µl 20 mmol·l⁻¹ roztoku koenzymu NAD⁺ nebo 50 µl 40 mmol·l⁻¹ roztoku koenzymu thioNAD⁺, 50 µl 100 mmol·l⁻¹ roztoku substrátu APAL nebo ABAL, extraktu a do celkového objemu se doplnilo destilovanou vodou. Extraktu bylo dávkováno 200 případně 300 µl. Měření probíhalo v křemenných kyvetách na spektrofotometru Lightwave II za stálého míchání na elektromagnetické míchačce po dobu 3 minut. Každý vzorek byl změřen ve čtyřech kombinacích substrátů a koenzymů, tzn. APAL + NAD⁺, ABAL + NAD⁺,

APAL + thioNAD⁺ a ABAL + thioNAD⁺. Pro každou kombinaci byl každý vzorek změřen třikrát. Reakce byla vždy startována přidáním substrátu.

3.1.4.4 Metoda Bradforda

Tato metoda je založena na adsorpční vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu za vzniku modrého zbarvení. Pro měření byl použit kit od firmy Bio-Rad:

- standard: roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 2 mg/ml
- činidlo: roztok barviva obsahující methanol a kyselinu fosforečnou

Nejprve byla připravena řada kalibračních standardů podle návodu ke kitu (125 až 2000 µg/ml). 70 µl standardu nebo 20 µl extraktu bylo vždy smícháno s 1 ml činidla a inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při 595 nm proti slepému vzorku (činidlo).

3.1.4.5 BCA metoda

Spektrofotometrická metoda s kyselinou bicinchoninovou (BCA) je založena na tvorbě měďného iontu tvořeného reakcí peptidové vazby s měďnatým iontem v alkalickém prostředí. Měďný iont je následně chelátován kyselinou bicinchoninovou za vzniku fialového zbarvení.

Nejprve se připravil pracovní roztok smícháním roztoku BCA (1% disodná sůl BCA, 2% Na₂CO₃, 0,16% vínan disodný, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO₃) s 4% s roztokem CuSO₄ v poměru 50:1. Poté byla připravena kalibrační řada BSA (5 až 50 µg). 2 ml pracovního roztoku bylo smícháno se standardy (5 až 50 µl) a se vzorky (5 µl). Směs se nechala inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě, následně byla změřena absorbance při 562 nm proti slepému vzorku (činidlo).

3.1.4.6 Nativní elektroforéza (PAGE)

Elektroforéza probíhala v 1 mm silných deskových polyakrylamidových gelech v diskontinuálním uspořádání. Separační i zaostřovací gel byl připraven dle tabulky (tab. 5): 10% separační a 4% zaostřovací. Před zahájením polymerace gelu byly všechny složky kromě APS a TEMED 10 minut odvzdušňovány v odsávací baňce pomocí vývěvy.

Tab. 5: Objemy roztoků na separační a zaostřovací gely.

Složka	Separační gel (10%)	Zaostřovací gel (4%)
AA + BIS (30% T, 3,3% C)	3,4 ml	0,65 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	1,25 ml
Destilovaná voda	3,9 ml	3,05 ml
TEMED	0,015 μ l	0,015 μ l
APS (10%)	0,05 μ l	0,06 μ l

Vzorky extraktu hrachových klíčků byly nejprve upraveny naředěním tak, aby ve všech byla stejná koncentrace proteinů (u vzorků stonku 5,1 mg/ml, u vzorků kořene 5,23 mg/ml), potom se 20 μ l extraktu smíchalo s 10 μ l roztoku glycerolu s barvivem (1 ml 50% glycerolu obsahujícího bromfenolovou modř v množství na špičku špachtle, ca 1 mg). Takto připravené vzorky byly po 15 μ l napipetovány do jamek gelu.

Jako elektrodový pufr byl použit Tris-glycin ($0,025 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris, $0,192 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ glycin), pH 8,3 (Laemmli, 1970). Elektroforéza probíhala při napětí 120 V v chladícím boxu dokud nedoputovala bromfenolová modř na úroveň spodního okraje skla.

Po proběhnutí elektroforézy byly získané gely barveny na aktivitu AMADH.

Barvicí směs: $150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufr, pH 8,5

20 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NAD⁺

5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ APAL

18 mg/ml MTT

1 mg PMS

5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ APAL byl připraven smícháním diethylacetalu APALu s $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl a následným 10 minutovým povařením. Gely byly inkubovány v Petriho miskách při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 30 min.

3.1.4.7 Isoelektrická fokusace

Jedná se o elektromigrační metodu, která se provádí v prostředí pH gradientu s rostoucím pH od anody ke katodě. Principem této metody je dělení proteinů podle hodnoty isoelektrického bodu (pI). Putující protein se zastaví v bodě, kde pH odpovídá hodnotě jeho isoelektrického bodu, což je hodnota pH, při které je molekula proteinu navenek neutrální, takže se v elektrickém poli nepohybuje.

Isoelektrická fokusace probíhala v deskových gelech (koncentrace 7,5 %) silných 1 mm. Před zahájením polymerace gelu byly všechny složky kromě APS a TEMED 10 minut odvzdušňovány v odsávací baňce pomocí vývěvy. Gel byl připraven podle tab. 6.

Tab. 6: Objemy roztoků pro přípravu gelu.

Složka	gel (7,5%)
AA + BIS (30% T, 3,3% C)	4,5 ml
Destilovaná voda	9 ml
glycerol (50%)	3,6 ml
amfolyt	0,9 ml
TEMED	40 μ l
APS (10%)	150 μ l

Vzorek byl připraven smícháním 25 μ l extraktu, 25 μ l glycerolu (50%) a 5 μ l amfolytu Bio-Lyte 3/10. Do jamek byly vzorky nepipetovány po 25 μ l.

Isoelektrická fokusace probíhala se dvěma elektrodovými roztoky o různém pH. V anodovém prostoru se nacházel anodový roztok (25 mmol·l⁻¹ NaOH), v katodovém naopak katodový roztok (20 mmol·l⁻¹ kyselina octová).

Fokusace byla spuštěna první půl hodinu při 100 V, další půl hodinu na 150 V, druhou hodinu při 200 V a poslední půl hodinu při 400 V. Získané gely byly barveny na aktivitu AMADH stejně jako v předchozím případě u nativní elektroforézy.

3.1.4.8 Štěpení proteinů v gelu

Vybrané pásy obarvené na aktivitu AMADH byly z PAGE gelu vyříznuty skalpelem. Vyříznuté kousky byly vloženy do mikrozkušavek, kde byly nakrájeny na malé kousky, ca 1 mm³. Nejprve se ke kouskům gelu přidalo 180 μ l acetonitrilu. Po 15ti minutách se acetonitril odebral a přidalo se 100 μ l DTT (7,7 mg/5ml 0,1 mol·l⁻¹ NH₄HCO₃) a zkumavky se nechaly v termostatu inkubovat 30 min při 60 °C a 800 rpm. Po inkubaci se roztok odebral, přidal se acetonitril, se kterým se obsah zkumavek protřepal a po chvíli opět odpipetoval. Následně se ke gelům přidalo IAA (50 mg/5ml 0,1 mol·l⁻¹ NH₄HCO₃) a zkumavky nechaly inkubovat 20 min ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl roztok IAA odpipetován a přidalo se 180 μ l 0,1 mol·l⁻¹ NH₄CO₃ na 15 minut. Poté se uhličitán odpipetoval a přidal se acetonitril.

K dehydratovanému gelu se přidal pufr obsahující 50 mmol·l⁻¹ NH₄HCO₃, 5 mmol·l⁻¹ CaCl₂ a 1,5 μ mol·l⁻¹ trypsin, následovala třicetiminutová inkubace na ledu.

Poté byl odebrán supernatant a přidal se stejný pufr, ale bez trypsinu. Následovala inkubace přes noc při 37 °C.

3.1.4.9 Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie peptidů, identifikace proteinů v gelu

Peptidy z trypsinových digestů byly přečištěny odsolením na pipetových špičkách s obrácenou fází ZipTip C₁₈ (Merck-Millipore) podle návodu výrobce a po konečném rozpuštění v 10 µl 0,1% (v/v) trifluoroctové kyseliny usnadněným ultrazvukem podrobeny chromatografické separaci. Systém pro kapalinovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií a tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS a MS/MS) sestával z kapalinového chromatografu Dionex UltiMate 3000 RSLC nano a prostřednictvím 20-µm i. d. kapiláry připojeného hmotnostního spektrometru amaZon speed ETD s iontovou pastí jako hmotnostním analyzátozem.

Vzorky peptidů v 0,1% TFA byly v chromatografu dávkovány v množství 5 µl cestou autosampleru. Nejdříve byly peptidy nanášeny na předkolonu (Acclaim PepMap 100 Nano Trap Column, 100 µm i.d. x 20 mm, NanoViper, C18 5 µm, 100 Å; Thermo Fisher Scientific) a promyty při průtoku nanášecího solventu 10 µl/min po dobu 7 min. Peptidy zachycené na předkoloně byly vymyty a separovány v gradientu na analytické koloně (Acclaim PepMap RSLC, 75 µm i.d. x 150 mm, NanoViper, C18 2 µm, 100 Å; Thermo Fisher Scientific) při průtoku 300 nl/min. Složení mobilních fází bylo následující:

- 1) nanášecí solvent: 2% (v/v) mravenčí kyselina (FA)
- 2) mobilní fáze A: 0,4% (v/v) FA
- 3) mobilní fáze B: 0,4% (v/v) FA v 90% (v/v) acetonitrilu.

Gradient pro separaci na analytické koloně byl připraven mísením mobilních fází A a B následujícím způsobem: 0 min, 4% B; 7 min, 4% B; 48 min, 60% B; 51 min, 96% B; 56 min, 96% B; 59 min, 4% B; 70 min, 4% B. Pro měření na hmotnostním spektrometru během separace bylo využito metody dodané výrobcem s názvem „proteo_automsn1.m”; zpracování dat do souboru ve formátu mgf pro databázové vyhledávání se uskutečnilo s využitím metody „proteomics-complex-mix-xml+mgf.m”. Kapalinový chromatograf byl ovládán s použitím software Chromeleon Xpress (Thermo Fisher Scientific) a HyStar 3.2, pro hmotnostní spektrometrii byl využit software Trap Control 7.1 a Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonik).

Hmotnostní spektrometr osazený nanoelektrosprejovým iontovým zdrojem Captive Spray (Bruker Daltonik) pracoval v módu pro pozitivní ionty a měl následující parametry

nastavení: Dry gas: 3 l/min; Dry temperature: 150 °C; Capillary: 1300V; End plate offset: 0 V; Scan: 400 to 1400 m/z ; Max accutime: 50 ms; Scan mode: enhancedresolution; Auto ms^2 , 4 precursor ions. Kolizním plynem pro fragmentaci bylo helium. Kalibrace přístroje byla provedena předem s použitím standardu ESI Tuning Mix (Bruker Daltonik) jeho přímou aplikací pomocí dávkovací pumpy s mikrostřikačkou.

Získané datové soubory ve formátu mgf byly prohledávány proti databázi aminokyselinových sekvencí proteinů Swiss-Prot (Swiss Institute of Bioinformatics; verze z března 2016) pomocí software Mascot instalovaného lokálně (Mascot Server 2.4; Matrix Science, Velká Británie). Parametry pro vyhledávání byly následující:

- 1) taxonomie: všechny organismy
- 2) enzym použitý pro štěpení: trypsin
- 3) maximální počet opomenutých štěpných míst: 4
- 4) fixní modifikace: karbamidomethylace cysteinu
- 5) variabilní modifikace: oxidace metioninu
- 6) chybové tolerance: v MS módu 100 ppm, v MS/MS módu 0,5 Da
- 7) náboj peptidů: 2⁺, 3⁺, 4⁺.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci této práce byla sledována aktivita enzymu AMADH z hrachu (*Pisum sativum*) v nadzemní části a v kořenech naklíčených semenáčků. Vzorky byly postupně odebírány druhý až čtrnáctý den klíčení. Díky rozdílné preferenci isoenzymů PsAMADH1 a PsAMADH2 vůči koenzymu thioNAD⁺ (Tylichová *et al.*, 2010), byly provedeny experimenty, pomocí kterých bylo možné sledovat, v jak staré rostlině a v které její části byla nejvyšší aktivita daného isoenzymu.

4.1 Koncentrace proteinů

Pomocí spektrofotometrických metod dle Bradforda a s kyselinou bicinchoninovou byla změřena koncentrace proteinů ve vzorcích extraktů hrachových semenáčků. Pro další zpracování dat (výpočet hodnot specifické aktivity) byly použity hodnoty z měření metody s kyselinou bicinchoninovou, důvodem bylo získání kvalitnější kalibrace při srovnání s druhou metodou (graf 1 vyjadřuje kalibrační křivku, ze které byly odečítány koncentrační hodnoty). Odečtené hodnoty koncentrací jsou vyjádřeny v tab 7, kde písmeno S označuje nadzemní část, K kořen.

Graf 1 Kalibrační křivka pro měření koncentrace proteinů metodou s kyselinou bicinchoninovou (hodnoty absorbance pro každý standard byly spočteny ze tří měření).



Tab. 7 Vypočtené hodnoty koncentrací proteinů.

	koncentrace mg/ml	vzorky	koncentrace mg/ml
2S	5,9	2K	8,4
3S	8,6	3K	9,7
4S	9,6	4K	10,0
5S	6,8	5K	5,5
6S	7,6	6K	6,1
7S	9,0	7K	5,7
8S	5,1	8K	7,1
9S	7,8	9K	5,2
10S	6,9	10K	5,6
11S	10,8	11K	8,5
12S	10,4	12K	7,1
13S	12,4	13K	8,0
14S	9,9	14K	6,8

4.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity AMADH

Dále byla dříve popsanou metodou spektrofotometricky stanovena aktivita enzymu. Měření se prováděla se substráty APAL a ABAL a koenzymy NAD^+ a thioNAD^+ . Ze získaných hodnot naměřené absorpance (pro NADH při 340 nm a pro thioNADH při 400 nm) a koncentrace byla spočítána aktivita (1) a specifická aktivita enzymu v jednotkách nkat/mg (2):

$$a = \frac{A \cdot V}{t \cdot \varepsilon \cdot l} \text{ (kat)} \quad (1)$$

$$a_{\text{specif}} = \frac{a \left(\frac{\text{nkat}}{\text{ml}} \right)}{m \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)} \quad (2)$$

Aktivita byla nejprve vztažena na objem vyjádřený v ml, protože při kinetickém měření se přidávalo různé množství extraktu (hodnoty aktivity jsou uvedeny v tab. 8).

Tab. 8 Hodnoty aktivit pro jednotlivá měření a kombinace (hodnoty byly spočítány ze tří měření u kombinací s koenzymem NAD^+ a dvou kombinací s koenzymem thio NAD^+).

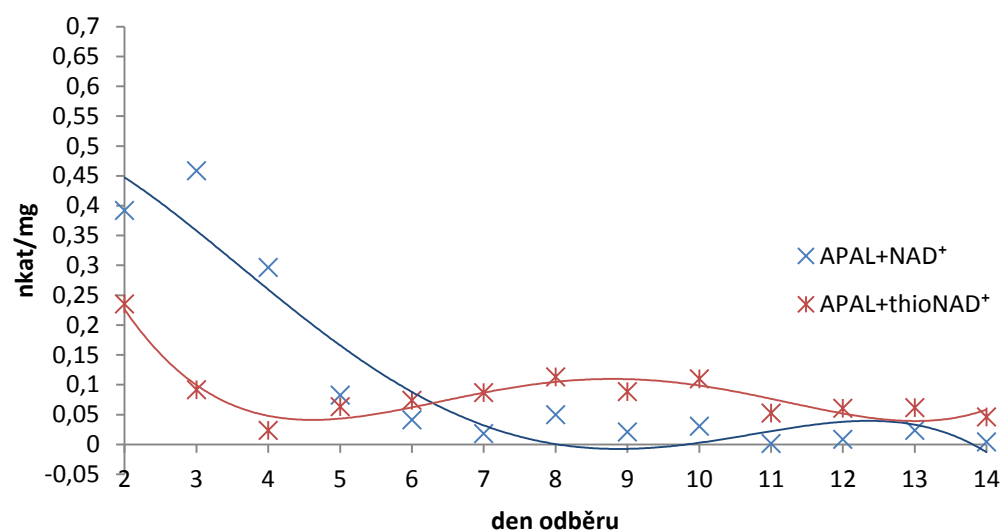
	aktivita (nkat/ml)			
	APAL + NAD^+	APAL + thio NAD^+	ABAL + NAD^+	ABAL + thio NAD^+
2S	2,52	1,51	0,92	4,20
3S	4,20	0,84	1,26	3,27
4S	2,85	0,22	1,23	0,42
5S	0,57	0,43	0,31	0,65
6S	0,31	0,56	0,03	0,40
7S	0,16	0,78	0,18	0,55
8S	0,25	0,58	0,10	0,34
9S	0,16	0,69	0,03	0,61
10S	0,21	0,76	0,15	0,55
11S	0,02	0,57	0,04	0,46
12S	0,09	0,63	0,07	0,63
13S	0,29	0,76	0,05	0,54
14S	0,04	0,46	0,11	0,63
2K	3,41	0,62	1,09	2,52
3K	3,36	0,84	1,06	1,26
4K	2,97	0,17	1,01	0,28
5K	0,37	0,20	0,03	0,53
6K	0,30	0,58	0,37	0,52
7K	0,11	0,53	0,22	0,63
8K	0,14	0,88	0,03	0,60
9K	0,14	0,70	0,09	0,41
10K	0,01	0,21	0,10	0,36
11K	0,04	0,07	0,10	0,11
12K	0,01	0,10	0,03	0,10
13K	0,23	0,11	0,08	0,19
14K	0,13	0,06	0,07	0,11

Z vypočtených hodnot specifických aktivit (tab 9) byly vytvořeny grafy, kde na ose y jsou vyneseny hodnoty specifické aktivity a na ose x den odběru rostlinného materiálu. (graf 2). V prvním grafu je vynesena závislost u vzorků nadzemní části, aktivita zde byla měřena v reakční směsi obsahující kombinaci substrátů a koenzymů APAL+ NAD^+ a APAL + thio NAD^+ , v dalším grafu se jedná opět o nadzemní část a kombinaci substrátů a koenzymů ABAL + NAD^+ a ABAL + thio NAD^+ . Následující dva grafy obsahují data změřená pro kořeny rostlin, v prvním případě opět reakční směs obsahovala kombinaci APAL + NAD^+ , APAL + thio NAD^+ , v druhém případě ABAL+ NAD^+ a ABAL + thio NAD^+ .

Tab. 9 Specifické aktivity proteinů.

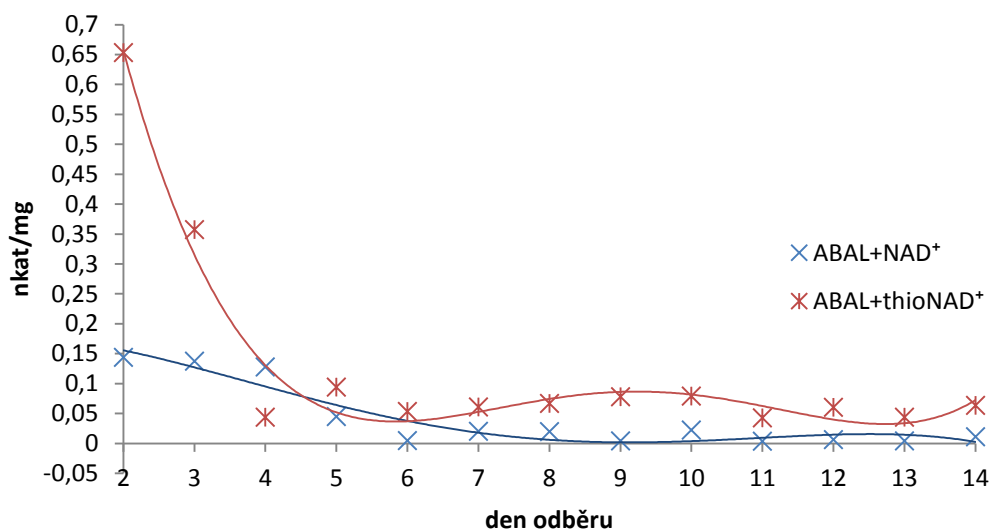
	APAL+NAD+	APAL+thioNAD+	ABAL+NAD+	ABAL+thioNAD+
vzorky	nkat/mg	nkat/mg	nkat/mg	nkat/mg
2S	0,392	0,235	0,144	0,653
3S	0,458	0,092	0,137	0,357
4S	0,297	0,023	0,128	0,044
5S	0,082	0,063	0,045	0,094
6S	0,041	0,074	0,004	0,053
7S	0,018	0,087	0,020	0,061
8S	0,050	0,113	0,020	0,067
9S	0,021	0,088	0,004	0,078
10S	0,031	0,110	0,022	0,079
11S	0,002	0,052	0,004	0,043
12S	0,009	0,061	0,006	0,060
13S	0,023	0,062	0,004	0,044
14S	0,004	0,046	0,001	0,063
2K	0,408	0,074	0,131	0,301
3K	0,346	0,087	0,110	0,130
4K	0,296	0,017	0,101	0,028
5K	0,066	0,036	0,005	0,096
6K	0,049	0,095	0,060	0,085
7K	0,018	0,093	0,039	0,109
8K	0,020	0,125	0,005	0,085
9K	0,027	0,134	0,017	0,078
10K	0,001	0,038	0,019	0,064
11K	0,005	0,009	0,012	0,013
12K	0,002	0,014	0,004	0,014
13K	0,029	0,014	0,010	0,024
14K	0,018	0,009	0,011	0,016

APAL+NAD⁺ , APAL+thioNAD⁺

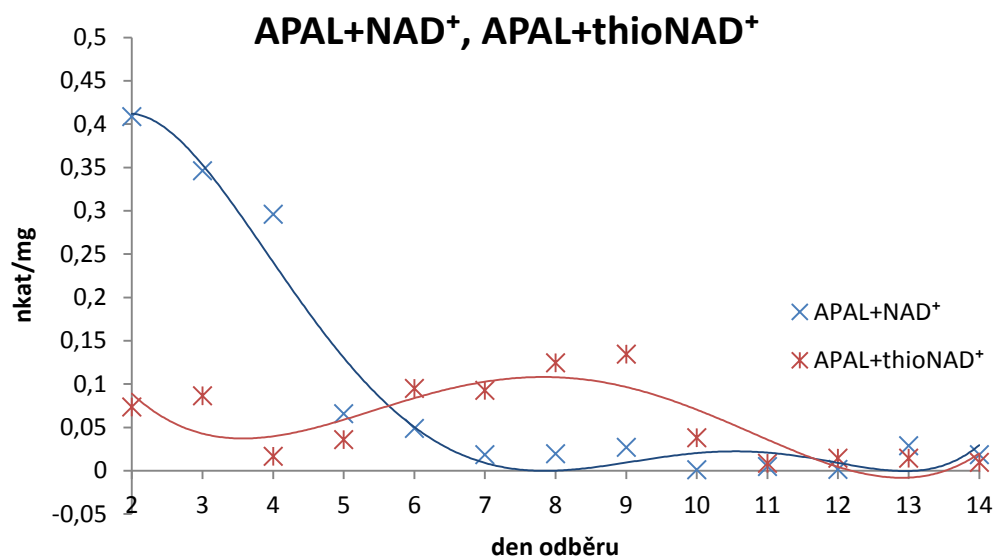


Graf 2 Závislost specifické aktivity AMADH na dnu odběru vzorku u nadzemní části rostliny.

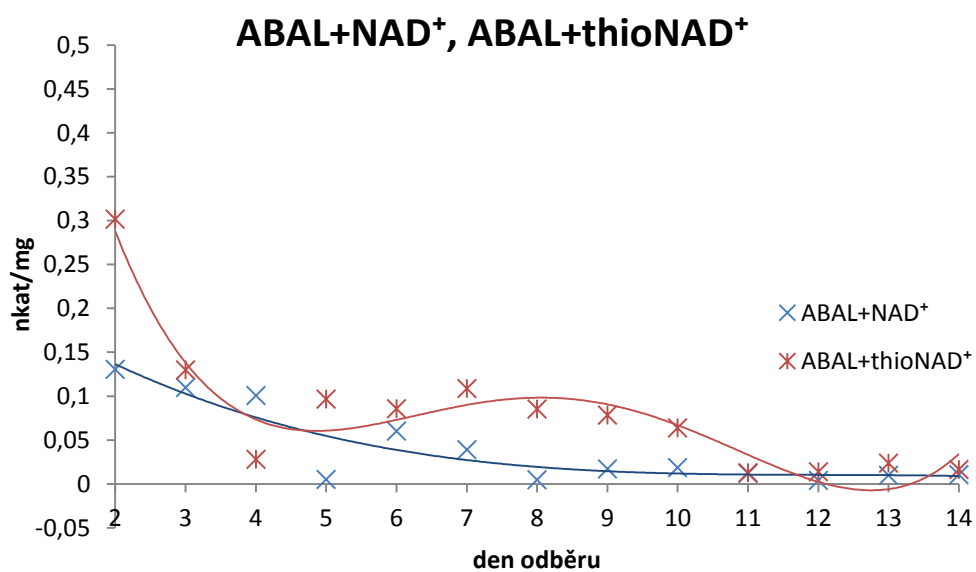
ABAL+NAD⁺, ABAL+thioNAD⁺



Graf 3 Závislost specifické aktivity AMADH na dnu odběru vzorku u nadzemní části rostliny.



Graf 4 Závislost specifické aktivity AMADH na dnu odběru vzorku kořene rostliny.



Graf 5 Závislost specifické aktivity AMADH na dnu odběru vzorku kořene rostliny.

Reakce PsAMADH1 s thioNAD⁺ je výrazně pomalejší, než reakce PsAMADH2 se stejným analogem. Jak bylo publikováno, reakce PsAMADH2 s thioNAD⁺ má relativní rychlost 21% vůči stejné reakci s NAD⁺, u PsAMADH1 je to jen 4,5%. Vůči přeměně APAL by ABAL měl být daleko lepším substrátem pro PsAMADH1, než pro PsAMADH2 (Tylichová *et al.*, 2010). Naměřená data tyto předpoklady splňují. Vzhledem k rozdílné aktivitě s thioNAD⁺ vůči NAD⁺ je možné sledovat vyšší aktivitu s thioNAD⁺ a nižší s NAD⁺ ve dnech, kdy pravděpodobně převažoval isoenzym PsAMADH2, naopak nižší aktivitu s thioNAD⁺ a zároveň vyšší s NAD⁺ ve dnech, kdy pravděpodobně převažoval isoenzym PsAMADH1.

V grafu 2 (nadzemní část rostliny) lze vidět, že zpočátku aktivita s APAL a NAD⁺ výrazně klesá, zhruba od pátého dne se ustaluje. Jiný trend pozorujeme při měření s APAL a thioNAD⁺. Zpočátku je aktivita vyšší, poté mírně klesne, ale od pátého dne se zvyšuje a zůstává vyšší, než v případě měření s koenzymem NAD⁺. Z toho lze vyvodit, že se mění isoenzymové složení, přičemž od pátého dne by mohlo růst poměrné zastoupení isoenzymu PsAMADH2 ve směsi. Nárůst poměrného zastoupení isoenzymu PsAMADH2 s dobou pěstování by potvrzoval i graf 3 (nadzemní část rostliny), který ukazuje v přítomnosti thioNAD⁺ počáteční pokles aktivity s ABAL, který je lepším substrátem pro PsAMADH1 než pro PsAMADH2 (Tylichová *et al.*, 2010). V dalších dnech, kde by z grafu 3 vyplývalo větší poměrné zastoupení PsAMADH2, už se hladina aktivity nezvětšuje, jak tomu bylo v případě reakce s APAL.

Při srovnání hodnot pro kořen v grafu 4 je vidět, že při měření kombinace APAL + NAD⁺ byla zpočátku aktivita vysoká, pátý den došlo k prudkému poklesu a dále se aktivita držela v jistých mezích bez výrazných výkyvů. U měření s kombinací APAL + thioNAD⁺ aktivita zpočátku mírně klesala a od pátého dne stoupala, na maximum se dostala devátý den, pak klesla na nižší konstantní hladinu. U kombinace ABAL + thioNAD⁺ (graf 5) je aktivita ze začátku vyšší, což potvrzuje předpoklad, že ABAL je lepším substrátem pro PsAMADH1 než pro PsAMADH2, pak rychle klesne, ale od pátého dne klesá pozvolněji. Tyto výsledky by naznačovaly vyšší poměrné zastoupení isoenzymu PsAMADH2 od pátého dne.

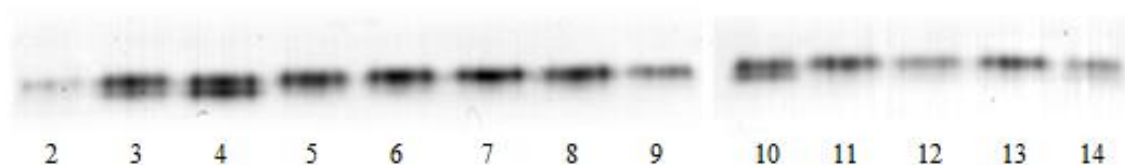
Z naměřených hodnot lze konstatovat, že v kořenu i nadzemní části rostliny se zásadně mění isoenzymové složení pátý den po výsevu. Při srovnání aktivit s NAD⁺ a thioNAD⁺ ve vzorcích od pátého dne pro kořen je rozdíl hodnot aktivit větší, než při stejném srovnání hodnot aktivit získaných z měření pro nadzemní část rostliny. Z toho se dá předpokládat, že v kořenu by mohl být poměrně více zastoupen isoenzym

PsAMADH2 než PsAMADH1, zatímco v nadzemní části je rozdíl v zastoupení isoenzymů menší.

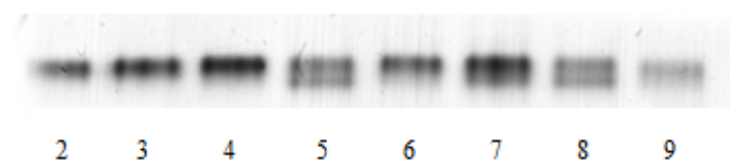
4.3 Detekce aktivity PsAMADH v gelech

Po proběhnutí elektroforézy za nativních podmínek byly gely barveny na aktivitu AMADH, kdy barvicí směs obsahovala koenzym NAD^+ , APAL jako substrát, pufr, fenazinmethosulfát a tetrazoliovou sůl MTT. Bylo provedeno i barvení gelů, kdy barvicí směs obsahovala koenzym thio NAD^+ . V tomto případě barvení nefungovalo i přes to, že redoxní potenciál NAD^+ a thio NAD^+ se významně neliší, -0,320 V pro NAD^+ , - 0,285 V pro thio NAD^+ (Cook a Cleland, Enzyme kinetics and mechanism). Důvodem by mohl být méně účinný přenos elektronů mezi koenzymem, fenazinmethosulfátem a tetrazoliovou solí, takže ve zvoleném časovém intervalu nedocházelo k redukci thiazolylové modři na modrofialový formazan. Dalším z důvodů by mohla být nízká aktivita enzymu při reakci s thio NAD^+ .

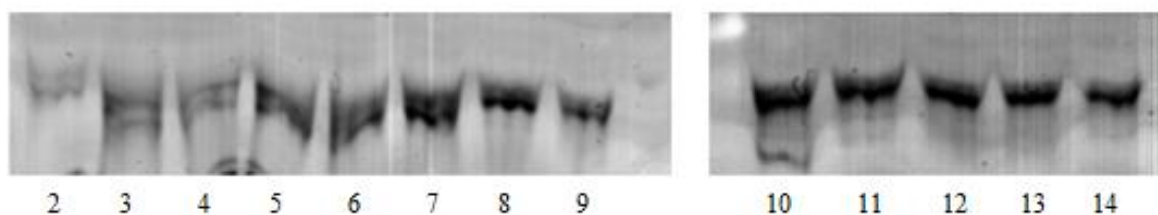
Na gelu došlo v přítomnosti NAD^+ a substrátu APAL téměř vždy k vytvoření dvou viditelných barevných pásů, které dokazují výskyt předpokládaných isoenzymů (PsAMADH1 a 2) (obr. 12-15). U vzorků kořene díky nízké aktivitě enzymu u vzorků z 10. - 14. dne k obarvení na aktivitu nedošlo.



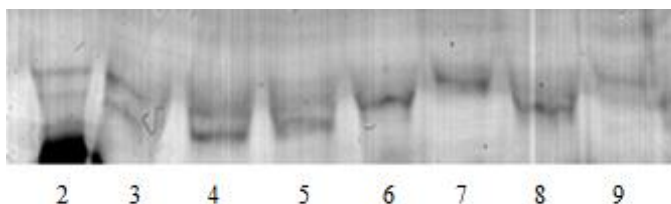
Obr. 12 Nativní elektroforéza: vzorky z nadzemní části semenáčků (2.-14. den).



Obr. 13 Nativní elektroforéza: vzorky z kořenů semenáčků (2.-9. den).



Obr. 14 Isoelektrická fokusace: vzorky z nadzemní části semenáčků.



Obr. 15 Isoelektrická fokusace: vzorky z kořenů semenáčků.

Vzhledem k velmi blízkým hodnotám molekulových hmotností a isoelektrických bodů obou isoenzymů (tab. 10) nedošlo u metody nativní elektroforézy k dokonalému rozdělení, při provedení isoelektrické fokusace však ano.

Tab. 10 Isoelektrické body a molekulová hmotnost isoenzymů (převzato z programu Protein Cutter, <http://www.biochemie.upol.cz/software/proteincutter/>).

	pI	Průměrná molekulová hmotnost (kDa)
PsAMADH1	5,13	54,8
PsAMADH2	5,02	54,5

Hodnota pI druhého isoenzymu je nižší, je proto kyselější. První pás by měl tedy představovat PsAMADH1 a druhý pás PsAMADH2. Pro potvrzení tohoto předpokladu byly vybrané pásy vyřezány skalpelem z gelu a proteiny z těchto pásů podrobeny proteolytickému štěpení trypsinem. Vzniklé peptidy byly separovány kapalinovou chromatografií na obrácené fázi v nanoprůtokovém uspořádání a následně detegovány měřením hmotnostních a tandemových hmotnostních spekter na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí jako hmotnostním analyzátozem. Měření na hmotnostním spektrometru proběhlo ve spolupráci se školitelem.

Na základě experimentálních dat bylo provedeno vyhledávání v databázi aminokyselinových sekvencí proteinů Swiss-Prot a došlo k přiřazení fragmentačních vzorů MS/MS spekter k určitým proteinům (tab. 11-19).

Tab. 11 Vzorek I1

Přístupový kód	Skóre	Molekulová hmotnost	Počet shod	Počet významných shod	Počet sekvencí	Počet významných sekvencí	Popis
BADH1_ARATH	88	55081	2	2	1	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH10A8 PE=2 SV=1
BADH_HORVU	86	54882	2	2	1	1	Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1

Tab. 12 Vzorek I2

Přístupový kód	Skóre	Molekulová hmotnost	Počet shod	Počet významných shod	Počet sekvencí	Počet významných sekvencí	Popis
BADH1_ARATH	100	55081	2	2	1	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH10A8 PE=2 SV=1
BADH_HORVU	81	54882	3	2	2	1	Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1
BADH2_ORYSI	61	55446	3	2	1	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 2 OS=Oryza sativa subsp. indica GN=BADH2 PE=2 SV=1

Tab. 13 Vzorek II1

Přístupový kód	Skóre	Molekulová hmotnost	Počet shod	Počet významných shod	Počet sekvencí	Počet významných sekvencí	Popis
BADH1_ARATH	86	55081	3	2	2	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH10A8 PE=2 SV=1
BADH_HORVU	72	54882	2	2	1	1	Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1
BADH2_ORYSI	67	55446	3	2	2	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 2 OS=Oryza sativa subsp. indica GN=BADH2 PE=2 SV=1

Tab. 14 Vzorek III1

Přístupový kód	Skóre	Molekulová hmotnost	Počet shod	Počet významných shod	Počet sekvencí	Počet významných sekvencí	Popis
BADH_HORVU	79	54882	3	2	2	1	Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1
BADH1_ARATH	74	55081	2	2	1	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH10A8 PE=2 SV=1

Tab. 15 Vzorek IV1

Přístupový kód	Skóre	Molekulová hmotnost	Počet shod	Počet významných shod	Počet sekvencí	Počet významných sekvencí	Popis
BADH_HORVU	37	54882	1	1	1	1	Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1
BADH1_ARATH	25	55081	3	1	2	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH10A8 PE=2 SV=1

Tab. 16 Vzorek IV2

Přístupový kód	Skóre	Molekulová hmotnost	Počet shod	Počet významných shod	Počet sekvencí	Počet významných sekvencí	Popis
BADH1_ARATH	34	55081	2	1	1	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH10A8 PE=2 SV=1

Tab. 17 Vzorek V1

Přístupový kód	Skóre	Molekulová hmotnost	Počet shod	Počet významných shod	Počet sekvencí	Počet významných sekvencí	Popis
BADH1_ARATH	84	55081	2	2	1	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH10A8 PE=2 SV=1
BADH_HORVU	65	54882	2	2	1	1	Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1

Tab. 18 Vzorek V2

Přístupový kód	Skóre	Molekulová hmotnost	Počet shod	Počet významných shod	Počet sekvencí	Počet významných sekvencí	Popis
BADH1_ARATH	69	55081	3	2	2	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH10A8 PE=2 SV=1

Tab. 19 Vzorek VI1

Přístupový kód	Skóre	Molekulová hmotnost	Počet shod	Počet významných shod	Počet sekvencí	Počet významných sekvencí	Popis
BADH1_ARATH	72	55081	3	2	2	1	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=ALDH10A8 PE=2 SV=1
BADH_HORVU	57	54882	3	2	2	1	Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1

Mezi přiřazenými proteiny byly i betainaldehyddehydrogenasy (BADH) z huseníčku, ječmene nebo rýže, které jsou homologní s isoenzymy hrachové AMADH. Na základě potvrzené přítomnosti charakteristických peptidů ve vzorku po štěpení byla dokázána hrachová AMADH. Některé z potvrzených peptidů pak přímo umožňovaly jednoznačně dokázat příslušný isoenzym (obr. 16).

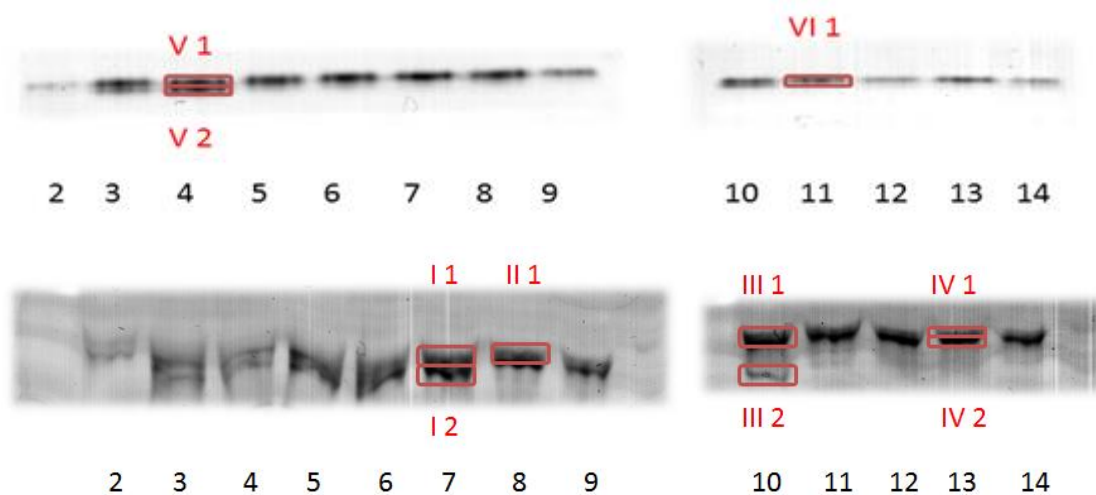
Obr. 16 Aminokyselinové sekvence PsAMADH1 (nahore) a PsAMADH2 (dole). Zeleně označená sekvence ELGEWGLENYLSVK potvrzuje enzym AMADH (je stejná pro oba isoenzymy). Oranžově označená sekvence QLFIDGEWR charakterizuje isoenzym PsAMADH1, fialově označená sekvence LGPVVSEGQYEK isoenzym PsAMADH2 (převzato z RCSB-Protein Data Bank, PsAMADH1 DOI: 10.2210/pdb3iww/pdb; PsAMADH2 DOI: 10.2210/pdb3iww/pdb).

```
MAITVSSRQLFIDGEWRVPILNKRIPNINPSTENIIGDIPAATKEDVDLAVDAAKRAISRKNRDSAAAS
GSLRARYLRAIAAKIKEKKDELGKLESIDCGKPLEEALADLDDVVACFEYYAGLAEELDSKQKAPISLPM
DTFKSYILKEPIGVVALITPWNYPFLMATWKIAPALAAGCAAAILKPSELASVTCLELGEICKEVGLPRGV
LNIVTGLGHEAGASLASHPDVDKISFTGSSATGSKIMTTAAQLVKPVSLELGGKSPIVVVFEDVDLDKVAE
WTVFGCFFTNQICSATSRLIVHESIAVEFVDKLVKWAENIKISDPLEEGCRLGPVISEAQYKKVLNCIS
SAKSEGATILTGGRRPEHLKKGYFVEPTIITDVTTSMQIWRREEVFGPVLAVKTFSTEEEAINLANDTHYG
LGSVMSNDLERCERLSKALQAGIVWINCAQPSFIQAPWGGIKRSGFGRLEGEWGLENYLSVKQVTRYTS
DEPWGWYQPPSKL
```

```
MDIPIPTRQLFINGDWKAPVLNKRIPVINPATQNIIGDIPAATKEDVDVAVAAAKTALTRNKGADWATAS
GAVRARYLRAIAAKVTEKKPELAKLESIDCGKPLDEAAWDIDDVAGCFEYYADLAEKLDARQKAPVSLPM
DTFKSHVLRPIGVVGLITPWNYPMLMATWKVAPALAAGCAAAILKPSELASLTCLLELGEICKEVGLPPGV
LNILTGLGPEAGAPLATHPDVDKVAFTGSSATGSKIMTAAQVLVKPVSLELGGKSPLVVVFEDVDLDKAAE
WAIFGCFWTNQICSATSRLILHESIATEFLNRIVKWIKNIKISDPLEEGCRLGPVVSEGQYEKILKFVS
NAKSEGATILTGGSRPEHLKKGFFIEPTIITDVTTNMQIWRREEVFGPVLVVKTFSTEEEAIDLANDTVYG
LGAAVISNDLERCERVTKAFKAGIVWVNCSQPCFTQAPWGGVKRSGFGRLEGEWGLDNYLSVKQVTQYIS
EEPWGWYQPPAKL
```

Pokud byl nalezen peptid ELGEWGLDNYLSVK, bylo možné potvrdit AMADH bez rozlišení isoenzymu. V případě nalezení peptidu QLFIDGEWR se jednalo o první isoenzym, v případě přítomnosti peptidu LGPVVSEGQYEK o druhý isoenzym. Přítomnost AMADH byla potvrzena ve všech vzorcích až na jeden vzorek (obr. 17, vzorek III 2), pouze v některých však byly určeny i jednotlivé isoenzymy (tab. 20). V horním pásu na gelu z nativní elektroforézy u vzorku číslo 4 byla prokázána přítomnost AMADH1 (obr. 17, vzorek V1). U gelů z isoelektrické fokusace byla prokázána přítomnost obou isoenzymů v osmém vzorku (obr. 17, vzorek II2). V sedmém vzorku v druhém pásu byla prokázána přítomnost AMADH2 (obr. 17, vzorek I2).

Díky uvedeným měřením se potvrdil předpoklad, že horní z dvojice pásů na gelech barvených na aktivitu představoval isoenzym AMADH1, spodní pás potom AMADH 2.



Obr. 17 Označené pásy na gelech z nativní elektroforézy a isoelektrické fokusace pro vzorky nadzemní části použité k identifikaci proteinů. Horní část obrázku zobrazuje gely z nativní elektroforézy, spodní z isoelektrické fokusace. Arabské číslice označují úseky vyřezaných gelů, které byly dále zpracovány štěpením proteinů v gelu.

Tab. 20 Identifikace isoenzymů.

vzorek	enzym	přítomný peptid	
VI 1	BADH1_ARATH	QLFIDGEWR ELGEWGLDNYLSVK	důkaz AMADH1
II 1	BADH1_ARATH	QLFIDGEWR ELGEWGLDNYLSVK	důkaz AMADH1
I2	BADH_HORVU	ELGEWGLENYLSVK	důkaz AMADH2
	BADH2_ORYSI	LGPVVSEGQYEK	
	ADH1_ARATH	ELGEWGLDNYLSVK	
	BADH_HORVU	ELGEWGLENYLSVK	
	BADH2_ORYSI	LGPVVSEGQYEK	důkaz AMADH2

4.4 Srovnání spektrofotometricky naměřené aktivity a aktivity detegované v gelech

Provedením nativní elektroforézy, isoelektrické fokusace a následném barvení gelů na aktivitu enzymu se potvrdily výsledky ze spektrofotometrického měření s NAD^+ a thio NAD^+ . Při srovnání hodnot aktivit podle sytosti obarvených pásů na gelu u nativní elektroforézy pro nadzemní část semenáčků byla nejvyšší aktivita od třetího do devátého dne. U gelů pro vzorky kořene aktivita od osmého dne slábla natolik, že od desátého dne už se vzorky neobarvily. Je zde také patrný výraznější spodní pás, který by měl značit přítomnost PsAMADH2. Tímto by byl dokázán předpoklad, že se v kořenu vyskytuje více isoenzymu PsAMADH2 než PsAMADH1, který s NAD^+ vykazuje velmi nízkou aktivitu.

U gelů z isoelektrické fokusace výsledky korelovaly se spektrofotometrickým měřením více, než u nativní elektroforézy. Důvodem bylo lepší rozdělení isoenzymů. Podle stejné sytosti pásů na gelech se vzorky z nadzemní části semenáčků lze říci, že celková aktivita je téměř neměnná, což souhlasí se spektrofotometrickým měřením, kdy se aktivita od pátého dne výrazně neměnila. U kořene je výraznější spodní pás a to zejména od čtvrtého až pátého dne, i tento výsledek odpovídá spektrofotometricky naměřené aktivitě, která se od pátého dne zvyšovala při interakci s thio NAD^+ , což by potvrdzovalo vyšší zastoupení isoenzymu PsAMADH2. Devátý den byla celková aktivita velmi nízká, takže u dalších vzorků opět nedošlo k obarvení na aktivitu. I toto zjištění odpovídá spektrofotometrickému měření, protože celková aktivita po devátém dnu značně klesla.

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla zpracována literární rešerše na téma nadrodiny ALDH a rodiny AMADH. Dále byla charakterizována AMADH z hrachu, kukuřice a rajčete. Následně byly popsány přírodní i synteticky přirozené substráty AMADH. V další části byla popsána fyziologická role AMADH z hlediska metabolismu polyaminů, tvorby osmoprotektantů a reakcí na stres při mechanickém poškození a vysoké salinitě.

V experimentální části bylo provedeno spektrofotometrické měření aktivity AMADH v extraktech z hrachu setého v nadzemní části a v kořenech z několikadenních semenáčků. Měření proběhlo se substráty APAL a ABAL, koenzymy NAD^+ a thio NAD^+ . Podle naměřených hodnot je možné posoudit aktivitu enzymu v dané části rostliny a v konkrétním dnu klíčení, kdy do pátého dne enzym vykazoval vyšší aktivitu s koenzymem NAD^+ , od pátého dne byla vyšší aktivita při měření s thio NAD^+ . To by znamenalo, že od pátého dne převažuje isoenzym PsAMADH2 nad isoenzymem PsAMADH1 v kořenu i nadzemní části. Enzymová aktivita byla také detegována barvením v gelech. Výsledky z gelů se shodovaly s výsledky ze spektrofotometrického měření. Důkaz AMADH byl proveden měřením hmotnostních spekter peptidů.

6 LITERATURA

- Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C. Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A.F. (2010): Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* **231**, 1237-1249.
- Alex S., Bell J.E. (1980): Dual nucleotide specificity of bovine glutamate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. **191**, 299-304.
- Argyrou A., Blanchard J.S. (2001): *Mycobacterium tuberculosis* lipoamide dehydrogenase is encoded by Rv0462 and not by the *lpdA* or *lpdB* genes. *Biochemistry* **40**, 11353-11363.
- Arikiti S., Yoshihashi T., Wanchana S., Uyen T. T., Huong N. T., Wongpornachi S., Vanavichit A. (2011): Deficiency in the amino aldehyde dehydrogenase encoded by GmAMADH2, the homologue of rice Os2AP, enhances 2-acetyl-1-pyrroline biosynthesis in soybeans (*Glycine max* L.). *Plant Biotechnology Journal* **9**, 75-87.
- Bagni N., Tassoni A. (2001): Biosynthesis oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**, 301-317.
- Bradbury L.M, Gillies S. A., Brushett D.J., Waters D.L., Henry R.J. (2008): Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant Molecular Biology* **68**, 439-449.
- Brauner F., Šebela M., Snégaroff J., Peč P., Meunier J.-C. (2003): Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 1-10.
- Brocker Ch., Cantore M., Failli P., Vasiliou V. (2011): Aldehyde dehydrogenase 7A (ALDH71) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* **191**, 269-277.
- Cook P. F., Cleland W. W. (2007): Isotope Effects as a probe of chemical mechanism. In: *Enzym kinetics and mechanism*. Taylor and Francis Group, New York, USA, 416 stran.
- De Agazio M., Zacchini M., Federico R., Grego S. (1995): Putrescine accumulation in maize root treated with spermidine: evidence for spermidine to putrescine conversion. *Plant Science* **111**, 181-185.
- Duhazé C., Gouzerh G., Gagneul D., Larher F. & Bouchereau A. (2002): The conversion of spermidine to putrescine and 1,3-diaminopropane in the roots of *Limonium tataricum*. *Plant science* **163**, 639-646.
- Esetrbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4 - hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* **11**, 81-128.

- Frömmel J., Soral M., Tylichová M., Koprčný D., Demo G., Wimmerová M., Šebela M. (2012): Plant aminoaldehyde dehydrogenase oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydes. *Amino Acids* **43**: 1189-1202.
- Frömmel J., Šebela M., Demo G., Lenobel R., Pospíšil T., Soral M., Kopečný D. (2015): N - acyl- ω -aminoaldehydes are efficient substrates of plant aminoaldehyde dehydrogenases. *Amino Acids* **47**, 175-187.
- Gillyon C., Haywood G.W., Large P.J., Nellen B., Robertson A. (1987): Putrescine breakdown in the yeast *Candida bondinii*: subcellular location of some of the enzymes involved and properties of two acetoamidoaldehyde dehydrogenases. *Journal of General Microbiology* **133**, 2477-2485.
- He Y., Kashiwagi K., Fukuchi J., Teraou K., Shirahata A., Igarashi K. (1993): Correlation between the inhibition of cell growth by accumulated polyamines and decrease of magnesium and ATP. *European Journal of Biochemistry* **217**, 89-96.
- Hou Q., Bartels D. (2015): Comparative study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in the glycophyte *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema halophytes*. *Annals of Botany* **115**, 465-479.
- Ivanova S., Batliwalla F., Mocco J., Kiss S., Huang J., Mack W., Coon A., Eaton J. W., Al - Abed Y., Gregersen P. K., Shohami E., Connolly E. S., Tracey K. J. (2002): Neuroprotection in cerebral ischemia by neutralization of 3-aminopropanal. *Proceedings of the National Academy Sciences* **99**, 5579-5584.
- Illingworth C., Mayer M.J., Elliott K., Hanfrey C., Walton N.J., Michael A.J. (2003): The diverse bacterial origins of the *Arabidopsis* polyamine biosynthetic pathway. *FEBS Letters* **549**, 26-30.
- Jakoby W. B., Ziegler D. M. (1990): The enzymes of detoxication. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 20715–20719.
- Kopečný D., Končítíková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Soral M., Šebela M., Morera S. (2013): Plant ALDH10 Family: Identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 9491-9507.
- Kopečný D., Tylichová M., Snegaroff J., Popelková H., Šebela M. (2011): Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *FEBS Journal* **278**, 3130-3139.
- Kumar A., Altabella T., Taylor M., Tiburcio A.F. (1997): Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Science* **2**, 124-130.
- Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. (2008): Polyamines: Essentials factors growth and survival. *Planta* **228**, 367-381.

- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Large P. J. (1992): Enzymes and pathways of polyamine breakdown in microorganisms. *FEMS Microbiology letters* **88**: 249-262.
- Lindahl R. (1992): Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **27**: 283–335
- McNeil S.D. Nuccio M.L., Hanson A.D. (1999): Betaines and related osmoprotectants. Targest for metabolit engineering of stress resistance. *Plant Physiology* **120**, 945-949.
- Petrivalský M., Brauner F., Luhová L., Gagneul D., Šebela M. (2007): Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1410-1418.
- Rathinasabapathi B. (2000): Metabolic engineering for stress tolerance: Installing osmoprotectants synthesis pathways. *Annals of Botany* **86**: 709-716.
- Rentsch D., Hirner B., Schmelzer E., Frommer W.B (1996): Salt stress-induced proline transporters and salt stress repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell* **8**, 1437-1446.
- Rhodes D., Hanson A.D. (1993): Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 357-384.
- Rodrigues S. M., Andrade M. O., Gomes A. P.S., Damatta F. M., Barakat-Pereira M. C., Fontes E. P. B. (2006): Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1909–1918.
- Slocum R.D., Kaur-Sawhney R., Galston A.W.: (1984): The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **235**, 283-303.
- Smith T. A. (1985): Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology* **36**, 117-143.
- Sophos N. A., Pappa A., Ziegler T. L., Vasiliou V. (2001): Aldehyde dehydrogenases gene superfamily: the 2000 update. *Chemico-Biological Interactions* **130-132**: 323-327.
- Sunkar R., Bartels D., Kirch H-H. (2003): Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from Arabidopsis thaliana in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal* **35**, 452–464.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1480**, 329-341.

- Šebela M., Duchoslav M. (2009): 11. Aminoaldehydes: Reactive products of polyamine degradation. In: *Biologically active amines and related enzymes: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects.*(Toninello A.), Transworld Reasearch Network, Kerala, India, 199-223.
- Šebela M., Luhová L., Brauner F., Galuszka P., Radová A., Peč P. (2001): Light microscopic localisation of aminoaldehyde dehydrogenase activity in plant tissues using nitroblue tetrazolium-based staining method. *Plant Physiology and Biochemistry*. **39**, 831-839.
- Šebela M., Radová A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001): FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**, 197-207.
- Takahashi T., Kakehi J.-I. (2010): Polyamines: ubiquitous polycations with Unixe roles in growth and stress responses. *Annals of Botany* **105**: 1-6.
- Tiburcio A. F., Altabella T., Borrell A., Masgrau C. (1997): Polyamine metabolism and its regulativ. *Physiologia Plantarum* **100**, 664-674.
- Trossat C., Rathinasabapathi B., Hanson A.D. (1997): Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and omega-aminoaldehydes *Plant Physiology* **113**, 1457-1461.
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010): Structural and Functional Characterization of Plant Aminoaldehyde Dehydrogenase from *Pisum sativum* with a Broad Specificity for Natural and Synthetic Aminoaldehydes. *Journal of Molecular Biology* **396**, 870-882.
- Walters D. R. (2003): Polyamines and plan diseases. *Phytochemistry* **64**, 97-107.
- Weretilnyk E.A., Hanson A.D. (1990): Molecular-cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**, 2745-2749.
- Wymore T., Hempel J., Cho S. S., Mackerell A. D. Jr, Nicholas H. B. Jr & Deerfield D. W. li(2004): Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenace and mechanism of nucleophile activation. *Proteins* **57**, 758-771.
- 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* **217**: 1214-1222.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALDH	aldehyddehydrogenasa
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
ABAL	3 - aminobutanal
APAL	3 - aminopropanal
BADH	betainaldehyddehydrogenasa
BSA	hovězí sérový albumin
BAL	betainaldehyd
CAO	aminooxidasy obsahující měď
DAO	diaminoxidasa
PAO	polyaminoxidasa
POD	peroxidasa
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
GABA	γ-aminomáselná kyselina
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
PMS	phenazin methosulfát
PsAMADH1	aminoaldehyddehydrogenasa z hrachu setého, isoenzym 1
PsAMADH2	aminoaldehyddehydrogenasa z hrachu setého, isoenzym 2
SLAMADH	aminoaldehyddehydrogenasa z rajčete (<i>Solanum lycopersicum</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
thioNAD ⁺	thionikotinamidadenindinukleotid
thioNADP ⁺	thionikotinamidadenindinukleotidfosfát
ZmAMADH	aminoaldehyddehydrogenasa z kukuřice (<i>Zea Mays</i>)