

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Úloha arginasy v signálních drahách oxidu dusnatého a polyaminů v stresových odpovědích rostlin

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jakub Foldyna
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2020

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

Bc. Jakub Foldyna

Tímto děkuji svému vedoucímu, doc. Mgr. Marku Petřivalskému Dr., za odborné vedení, poskytnutí literatury a konzultací. Dále děkuji kolektivu Katedry biochemie Přírodovědecké fakulty v Olomouci za poskytnutí prostor, vybavení, chemikálií a materiálu pro vypracování této diplomové práce a za vytvoření příjemné pracovní atmosféry. Rovněž děkuji své rodině za podporu během celé doby studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jakub Foldyna
Název práce	Úloha arginasy v signálních drahách oxidu dusnatého a polyaminů v stresových odpovědích rostlin
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Arginasa je manganoenzym, který katalyzuje hydrolytický rozklad L-argininu na ornithin a močovinu. U rostlin bylo zjištěno, že hraje důležitou dvojí roli ve vývoji rostlin. První role je v průběhu klíčení rostlin, kdy se aktivita arginasy zvyšuje. Další důležitou roli hraje arginasa při dozrávání plodů. Během působení stresových faktorů dochází k indukci exprese arginasy a předpokládá se, že arginasa je zapojena do odpovědi rostlin na stres. Tato diplomová práce byla v teoretické části zaměřena na dostupné poznatky o rostlinných arginasách včetně metod stanovení aktivity. Dále byly stručně charakterizovány dostupné poznatky o lokalizaci a produkci oxidu dusnatého u rostlin a znalosti o funkcích a metabolismu polyaminů u rostlin. V experimentální části byla jako modelová rostlina použita semena hrachu setého (*Pisum sativum* cv. Abarth), ze které byla izolována mitochondriální frakce. Byl sledován vývoj aktivity arginasy v průběhu klíčení a při pěstování za různých světelných podmínek (střídání světla a tmy a tma). Dále byl sledován vliv zamražení mitochondriální frakce a následného rozmražení na aktivitu arginasy. Rovněž se sledovala teplotní stabilita při různých teplotách a dobách aktivace. Byla stanovena hodnota Michaelisovy konstanty ($66 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). V dalších experimentech byl zhodnocen vliv modifikačních činidel, ze kterých vyplývá, že se v blízkosti aktivního místa nachází cystein. V přítomnosti inhibitoru arginasy norvalinu v Hoagladově roztoku nebyly histochemicky zaznamenány změny v produkci oxidu dusnatého. Srovnáním sekvencí rostlinných arginas s genomem hrachu a provedenou nativní elektroforézou s následným barvením se lze domnívat, že u hrachu setého se nachází jediný protein s arginasovou aktivitou.

Klíčová slova	Arginasa, oxid dusnatý, polyaminy, <i>Pisum sativum</i> cv. Abarth
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Jakub Foldyna
Title	Role of arginase in signalling pathways of nitric oxide and polyamines in plant stress responses
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2020

Abstract

Arginase is a manganese-containing enzyme, which catalyzes the hydrolysis of L-arginine to ornithine and urea. In plants, arginase plays two important roles in development. The first role is during germination where the activity of arginase is increasing. Another important role of arginase was described during fruit development. During stress conditions, arginase expression is induced and it is assumed that arginase is involved in plant stress responses. This diploma thesis was in theoretical part focused on available knowledge of plant arginases including methods of activity measurement. Knowledge of localization and production of nitric oxide in plants and knowledge of functions and metabolism of plant polyamines was also characterized. In experimental part were used pea (*Pisum sativum* cv. Abarth) seeds were used as a model organism to isolate mitochondrial fraction. Changes in the specific activity of arginase were observed during germination and growth under different light conditions (alternation of light and dark and dark). Impact of freezing and thawing of mitochondrial fraction was examined and also the impact of different temperatures and time of activation. Value of Michaelis constant was determined ($66 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). In the next experiments the impact of modifying reagents on activity of the arginase was evaluated. From results it can be concluded that a cystein residue is located near the enzyme active site. Histochemical production of nitric oxide in lateral roots was not affected by the presence of arginase inhibitor norvaline. From comparing plant sequences with the pea genome and native electrophoresis with subsequent staining we can assume that pea contains one protein with arginase activity.

Keywords	Arginase, nitric oxide, polyamines, <i>Pisum sativum</i> cv. Abarth
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod.....	9
2 Současný stav řešené problematiky	10
2.1 Arginasa.....	10
2.1.1 Rostlinné arginasy	12
2.1.1.1 Struktura a vlastnosti rostlinných arginas.....	14
2.1.1.2 Úloha arginasy při vývoji rostlin	14
2.1.1.3 Úloha arginasy při stresových odpovědích rostlin	15
2.1.1.4 Studium vlivu arginasy na výnosy plodin	17
2.1.1.5 Metody studia aktivity arginasy u rostlin	17
2.2 Oxid dusnatý u rostlin	19
2.2.1 Mechanismy a lokalizace produkce NO.....	19
2.2.1.1 Neenzymová produkce oxidu dusnatého	20
2.2.1.2 Oxidační mechanismy enzymové syntézy oxidu dusnatého	21
2.2.1.3 Redukční mechanismy enzymové syntézy oxidu dusnatého	22
2.3 Rostlinné polyaminy	22
2.3.1 Základní charakteristika polyaminů	22
2.3.2 Funkce polyaminů.....	24
2.3.3 Metabolismus polyaminů	25
2.3.3.1 Biosyntéza polyaminů	25
2.3.3.2 Katabolismus polyaminů	26
3 Experimentální část.....	28
3.1 Seznam chemikálií	28
3.2 Seznam přístrojů a pomůcek.....	29
3.3 Biologický materiál.....	29
3.3.1 Zpracování materiálu pro izolaci mitochondriální frakce	29
3.3.2 Zpracování materiálu pro mikroskopické účely	29
3.4 Izolace mitochondriální frakce	30
3.5 Stanovení koncentrace proteinů.....	30
3.6 Stanovení aktivity arginasy	31
3.7 Vliv světelných podmínek během růstu na aktivitu ARG.....	32
3.8 Vliv zamražení a rozmražení na aktivitu ARG.....	32
3.9 Vliv teploty a doby aktivace aktivitu ARG	32
3.10 Stanovení Michaelisovy konstanty	32
3.11 Stanovení IC ₅₀ pro norvalin.....	33

3.12 Vliv chemických látek na aktivitu ARG	33
3.12.1 Příprava S-nitrosoglutathionu	34
3.13 Analýza sekvencí ARG v genomu hrachu.....	34
3.14 Histochemická detekce NO s využitím fluorescenční sondy	34
3.15 Detekce arginasové aktivity v polyakrylamidových gelech za nativních podmínek	35
4 Výsledky.....	37
4.1 Sledování změn aktivity arginasy během vývoje hrachu	37
4.2 Vliv světelných podmínek na aktivitu ARG	38
4.3 Vliv zamražení a rozmražení na aktivitu ARG.....	39
4.4 Vliv teploty a doby aktivace na aktivitu ARG.....	41
4.5 Stanovení Michaelisovy konstanty	42
4.6 Stanovení IC ₅₀ pro norvalin.....	42
4.7 Vliv modifikačních činidel na aktivitu ARG.....	43
4.7.1 S-nitrosoglutathion.....	43
4.7.2 Kyselina askorbová	43
4.7.3 Dithiothreitol.....	44
4.7.4 Peroxid vodíku	45
4.7.5 Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová.....	45
4.8 Identifikace genu ARG v genomu hrachu	46
4.9 Histochemická detekce NO v postranních kořenech	50
4.10 Nativní elektroforéza.....	51
5 Diskuze.....	53
6 Závěr	57
7 Literatura	58
8 Seznam zkratk	64

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické práce je zpracování literární rešerše zaměřené na:

1. Charakterizaci arginasy, její úlohu v metabolismu dusíkatých látek se zaměřením na rostlinné arginasy a metody studia aktivity arginasy
2. Současné poznatky o mechanismech a lokalizaci produkce oxidu dusnatého v rostlinách
3. Současné poznatky o metabolismu a funkcích polyaminů

Cíle experimentální práce jsou:

1. Pěstování rostlinného materiálu – hrachu setého (*Pisum sativum*)
2. Zavedení a optimalizace metody pro purifikaci a stanovení aktivity arginasy
3. Studium změny aktivity arginasy ve vzorcích hrachu vystavených stresovým podmínkám

1 ÚVOD

Oxid dusnatý (NO) a polyaminy jsou důležitými regulátory a signální sloučeniny řady fyziologických procesů jak v říši živočichů, tak v říši rostlin. Tyto látky mají společný prekurzor – aminokyselinu L-arginin. Zatímco u živočichů byl L-arginin jako prekurzor oxidu dusnatého prokázán, u rostlin se stále vedou debaty.

Jedním z možných spojníků signálních drah NO a polyaminů je enzym arginasa, který katalyzuje rozklad argininu na ornithin a močovinu. Ornithin je prekurzorem pro syntézu polyaminů. Arginasa tudíž může mít potenciální roli v regulaci dostupnosti argininu pro biosyntézu polyaminů a NO.

U polyaminů je známo, že jsou regulátory růstu a stimulují růst nádorových buněk. Mnohé vědecké studie jsou zaměřeny na nalezení potenciálních a velice účinných inhibitorů arginasy v humánní medicíně. V minulosti byla u rostlinných arginas zaměřena pozornost na úlohu ve vývoji rostlin – mobilizace dusíkových zásob po degradaci proteinů převážně při klíčení semen. V současné době je zaměřena pozornost na rostlinné arginasy, jelikož se předpokládá, že by mohly mít úlohu v obranných reakcích rostlin na mnohé stresové podněty.

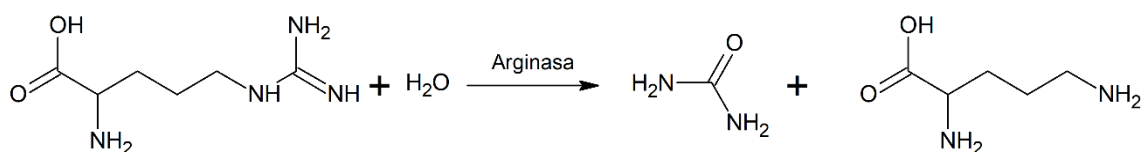
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Arginasa

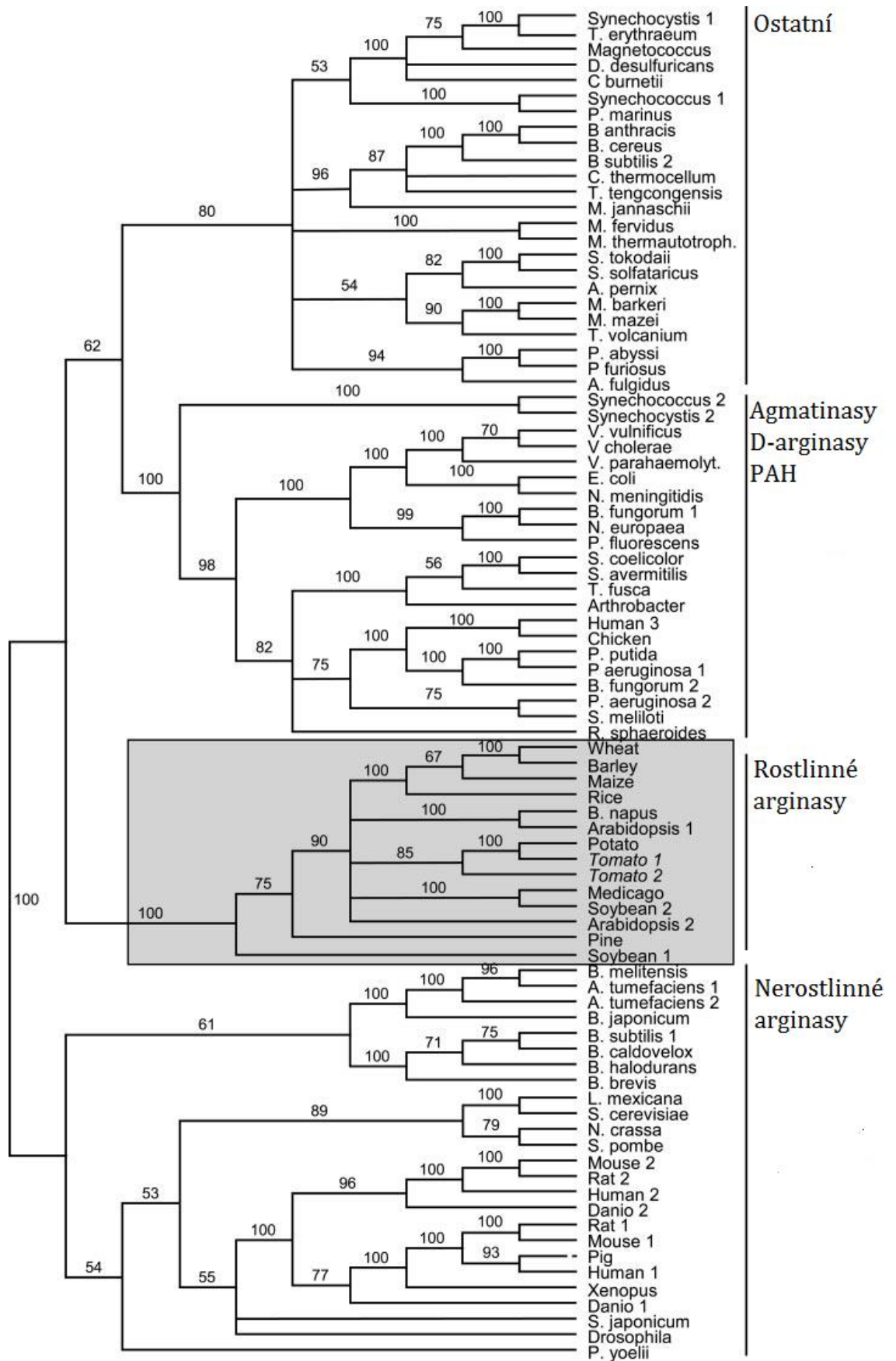
Enzym arginasa (ARG, EC 3.5.3.1) katalyzuje reakci hydrolytického rozkladu proteinogenní aminokyseliny L-argininu na neproteinogenní aminokyselinu ornithin a močovinu (Obr. 1). Jedná se o metaloenzym, jenž ke své aktivitě potřebuje manganaté ionty. ARG byla nalezena u bakterií, kvasinek, rostlin, bezobratlých a obratlovců.

Srovnáním aminokyselinových sekvencí 85 amidinohydrolas z různých organismů byl sestaven fylogenetický strom pro superrodinu ARG (Obr. 2) a bylo zjištěno, že je rozdělena na 4 skupiny (Chen *et al.*, 2004):

- ARG obratlovců, hub a bakterií (taktéž nerostlinné arginasy),
- rostlinné ARG,
- agmatinasy (EC 3.5.3.11) a agmatinase podobné enzymy
- několik hypotetických ARG podobných proteinů z eubakterií a archeí



Obrázek 1: Reakce katalyzovaná arginasou



Obrázek 2: Fylogenetický strom 85 amidinohydrolas z různých organismů (přepřacováno podle Chen *et al.*, 2004). PAH - proklavaminátamidinohydrolasy

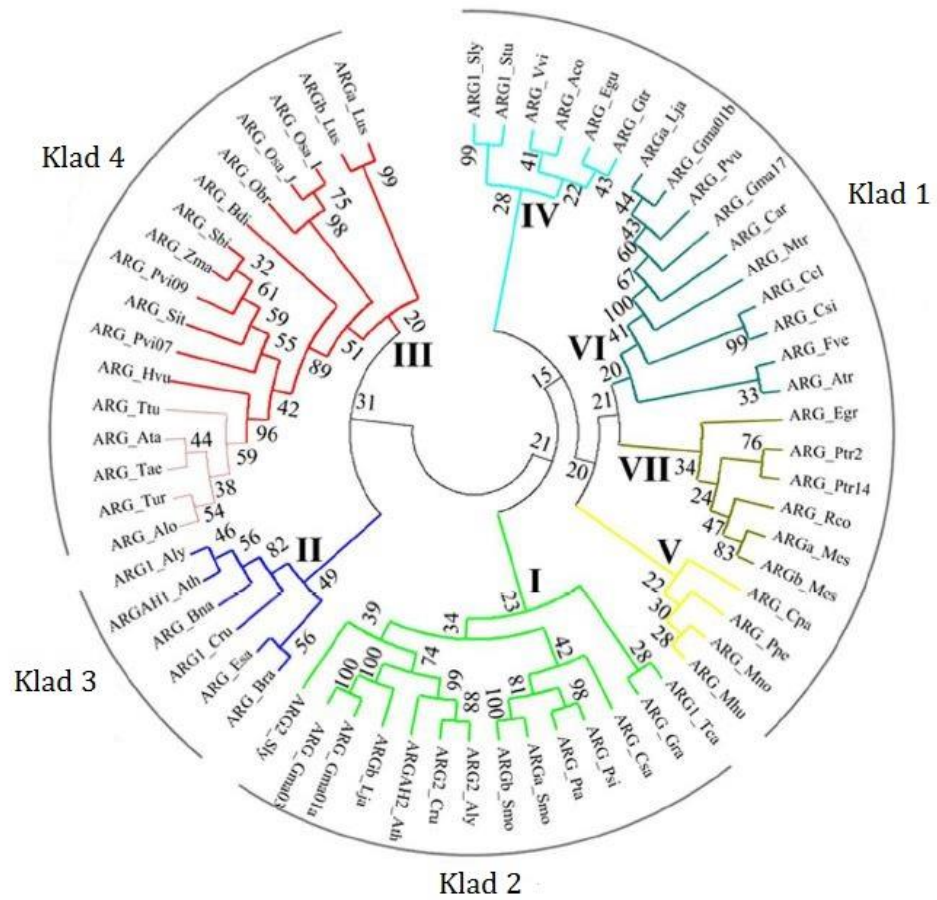
2.1.1 Rostlinné arginasy

Ačkoliv byla aktivita ARG popsána u mnoha rostlinných druhů, pouze u několika byly geny pro ARG klonovány. Např. *Arabidopsis thaliana* a rajče (*Lycopersicon esculentum*) mají ve svém genomu dva geny pro ARG: *AtARGAH1* a *AtARGAH2*; *LeARG1* a *LeARG2*. U rýže se nachází jediný gen: *OsArg*, který je konstitutivně exprimován během všech vývojových fází rýže (Chen *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2013). U sóji byla nalezena malá rodina kódující ARG proteiny (Goldraij a Polacco, 1999). U pšenice (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) byly identifikovány 3 geny pro ARG: *TaARG-2AS*, *TaARG-2BS* a *TaARG-2DS*, přičemž *TaARG-2AS* je pseudogen se stop kodonem uvnitř sekvence. V práci She *et al.*, 2017 byl vypracován fylogenetický strom rostlinných arginas (Obr. 3).

Rostlinné ARG jsou fylogeneticky bližší agmatinasam než nerostlinným ARG, přesto mají vysokou specifitu pro L-arginin. Rovněž zůstávají zachována rezidua interagující s Mn^{2+} ionty (6 neměnných histidinových a aspartátových residuí) a guanidinovou skupinou L-argininu, naproti tomu aminokyselinové zbytky interagující s α -amino a α -karboxylovou skupinou L-argininu se liší. V porovnání s ARG z *Bacillus caldovelox*, u něž rezidua Asp-126, His-139, Thr-240 a Glu-270 tvoří vodíkové můstky s guanidinovou skupinou substrátu, je u rostlinných ARG Thr-240 nahrazen serinem (u rajčete konkrétně Ser-279). Rezidua interagující s α -amino skupinou (Glu-181 a Asp-178) a α -karboxylovou skupinou (Asn-128, Ser-135 a Asn-137) jsou zachována u nerostlinných ARG ne však u rostlinných ARG. Pokusy s inhibitorem nerostlinných ARG – N_{ω} -hydroxy-argininem (NOHA), jakožto intermediátem reakce katalyzované NO syntasou (NOS, EC 1.14.13.39) poukázaly na vyšší citlivost rostlinných ARG na NOHA a poskytly nepřímý důkaz o zachování struktury aktivního místa u rostlinných i nerostlinných ARG (Perozich *et al.*, 1998; Sekowska *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004). Pokusy s činidly 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoátem a *p*-chlormerkuribenzoátem poukázaly na přítomnost cysteinu v aktivním místě rostlinných ARG, kdežto u nerostlinných ARG je katalyticky aktivní aminokyselinou histidin (Daghigh *et al.*, 1996, Hwang *et al.*, 2001).

Rostlinné ARG ve svých sekvencích vykazují vysokou sekvenční identitu (70-87 %), přičemž největší diverzita ve složení se nachází v N-terminální oblasti bohaté na bazické a hydroxylované aminokyseliny, které vykazují známky signálního peptidu lokalizujícího ARG do mitochondrií (Chen *et al.*, 2004). Tato skutečnost byla potvrzena imunolokalizací u *A. thaliana* v práci Flores *et al.*, 2008. Co se týče aminokyselinového

složení, tak polární aminokyseliny tvoří přes 38 % složení a nepolární aminokyseliny (alanin, leucin a valin) zaujímají 27 % z celkového složení (She *et al.*, 2017).



Obrázek 3: Fylogenetický strom - kladogram rostlinných ARG. Třípísmenné zkratky za ARG označují zkratku z latinského názvu, čísla u uzlů označují míru shody pro hlavní větve (přepracováno podle She *et al.*, 2017).

2.1.1.1 Struktura a vlastnosti rostlinných arginas

Rostlinné ARG jsou strukturně velmi rozmanité proteiny a jejich struktura se nedá generalizovat. V této části je popsán výčet dosud izolovaných ARG a jejich strukturních a kinetických vlastností.

Jedním z prvních článků o charakterizaci ARG u rostlin (Wright, 1981) se zabýval izolací, purifikací a charakterizací ARG ze slunečnice topinambur (*Helianthus tuberosus*). Molekulová hmotnost enzymu je 140 kDa a hodnota pI 5,3. Michaelisova konstanta purifikovaného enzymu pro L-Arg byla stanovena na $145 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kompetitivní inhibitory enzymu jsou citrulin a ornithin.

V práci Boutin, 1982 byla izolována ARG z cibulek kosatce holandského (*Iris hollandica*). Bylo popsáno, že molekulová hmotnost ARG v nativním stavu je 191 kDa a jedna podjednotka má 36,5 kDa, z čehož lze vydedukovat hexamerní strukturu. V nepřítomnosti manganatých iontů disociuje na oligomery (dimery, tetramery), které lze zpětně aktivovat. Byl rovněž stanoven izoelektrický bod ARG, který činí 5,6 a pH optimum ARG reakce je 9,0.

Charakterizací sójové ARG se zabývali v roce 1990 Kang a Cho. U ARG ze sóji je předpokládána tetramerní struktura – nativní enzym má M_R 240 kDa a monomer má 60 kDa. Optimální pH pro reakci je 9,5. Hodnota K_M je $83 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. ARG je i teplotně stabilní. Při 4°C je ARG stabilní nejméně měsíc, inkubace 10 min při 37°C neměla vliv na aktivitu, inkubace 10 min při 70°C vedla ke ztrátě 50% aktivity. K inaktivaci došlo, když byl enzym inkubován 10 min při 80°C.

Práce Hwang, 2001 byla zaměřena na charakterizaci ARG z kořenů ženšene (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Předpokládaná struktura ženšenové ARG je dekamer – M_R v nativním stavu je 352 kDa a monomer má M_R 34,5 kDa. Hodnota K_M činí $82,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Optimální pH pro reakci je 9,5.

V práci Chen *et al.*, 2004 byly připraveny rekombinantní ARG z rajčete – LeARG1 a LeARG2, které byly exprimovány v *Escherichia coli* a purifikovány afinitní chromatografií. Dle sekvence cDNA byla predikována molekulová hmotnost 37 048 Da pro LeARG1 a 36 851 Da pro LeARG2, experimentálně stanovena molekulová hmotnost pro oba rekombinantní proteiny byla 37 kDa. Oba isoenzymy měly pH optimum 9,5.

2.1.1.2 Úloha arginasy při vývoji rostlin

Mnohé studie z přelomu tisíciletí byly zaměřeny na studium změn aktivity ARG v post-germinálním vývoji rostlin. Vzrůstající aktivita ARG po vyklíčení byla popsána

u dýně, bobu, sóji, *A. thaliana* a borovice kadidlové (Splittstoesser, 1969; Kollöffel a Van Dijke, 1975; Kang a Cho, 1990; Zonia *et al.*, 1995; King a Gifford, 1997). U rajčat byla pozorována nejvyšší míra exprese v rozmnožovacích pletivech, z čehož autoři vyvodili hypotézu, že u rajčat hraje ARG roli v tvorbě polyaminů podílející se na vývoji plodů (Chen *et al.*, 2004). Produkty ARG reakce jsou následně dále využity – ornithin v dalších metabolických drahách a močovina je hydrolyzována za katalýzy ureasy (EC 3.5.1.5). Koordinovaná činnost ARG a ureasy u rostlin je považována za mechanismus recyklace močovinového dusíku v rychle rostoucích pletivech (Zonia *et al.*, 1995).

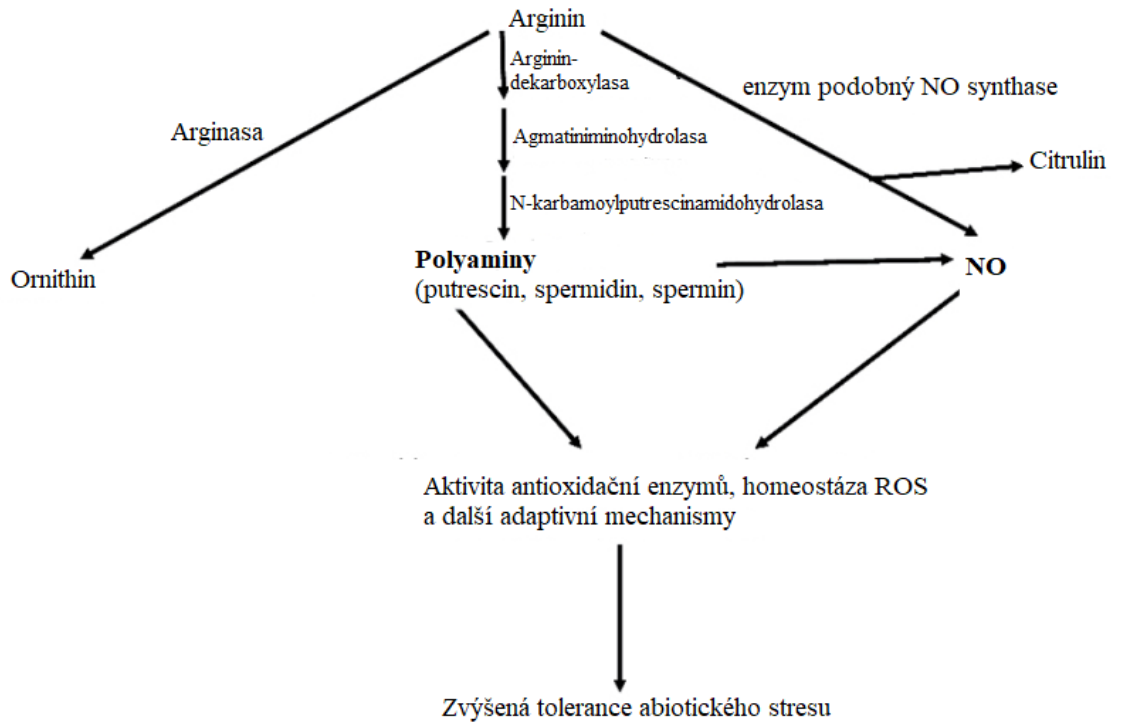
U borovice kadidlové (*Pinus taeda*) bylo zjištěno, že ve zralých i nezralých embryích je nízká úroveň transkriptů ARG a po vyklíčení semen se exprese zvyšuje (Todd *et al.*, 2001). U rajčat jsou geny pro ARG nejvíce exprimovány ve zralých neotevřených květech, slabě exprimována v otevřených květech a zralých plodech a ve zdravých listech a stoncích není exprimována vůbec. Gen *LeARG1* je exprimován v kořeni, kdežto exprese *LeARG2* je indukována poraněním, methylesterem kyseliny jasmonové nebo fytotoxinem koronatinem (Chen *et al.*, 2004). U rýže dochází k nejvyšší expresi *OsARG* u vyvíjejících se paníklů (Ma *et al.*, 2013). U pšenice je nejvyšší exprese ARG u nadzemních částí při vývoji květenství a při plnění zrn (She *et al.*, 2017).

2.1.1.3 Úloha arginasy při stresových odpovědích rostlin

L-Arginin má všestranné metabolické využití. Kromě zabudování do proteinů slouží i jako prekurzor pro biosyntézu oxidu dusnatého (NO) a polyaminů (PA) – o těchto biosyntézách budou pojednávat následující kapitoly. Další sloučeninou, pro níž je L-Arg prekurzor, je prolin, který se akumuluje při působení mnoha stresových faktorů, buďto jako kompatibilní osmolyt nebo jako prekurzor k syntéze proteinů bohatých na (hydroxy) prolin (Jenkinson *et al.*, 1996).

Studie v posledních letech se zabývaly možným zapojením ARG do obranných mechanismů vůči abiotickému stresu na modelových rostlinách rajčete a *A. thaliana*. V práci Shi *et al.*, 2013 byl u *A. thaliana* sledován vliv změn exprese ARG, přičemž u transgenních linií nadexprimující geny pro ARG bylo pozorováno snížení tolerance vůči stresovým faktorům, které bylo spojeno se sníženou akumulací NO, polyaminů a zvýšenou akumulací reaktivních forem kyslíku. Naopak u transgenních linií s knock-outem genu pro ARG byla pozorována zvýšená tolerance vůči stresovým faktorům spojená s vyššími koncentracemi NO a polyaminů. V této práci byl rovněž vytvořen hypotetický model (Obr. 4), jak může být *ArARGAH* zapojena do odpovědi

rostlin na abiotický stres U rajčat byl studován vliv látek zvyšující expresi ARG (methyl-jasmonát, arginin) a inhibitoru ARG (*N*ω-hydroxy-nor-L-arginin). U plodů rajčat ošetřených efektem ARG bylo pozorováno zlepšení tolerance stresových faktorů – zejména vyšší aktivitou ARG, vyšší expresí genů pro ARG, zvýšenou akumulací prolinu a polyaminů (Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016).



Obrázek 4: Model představující zapojení arginasy u *A. thaliana* do odpovědi na abiotický stres. Arginin slouží jako substrát pro arginasu, arginindekarboxylasu a enzym podobný NO synthase. Manipulací exprese *AtARGAH* dochází k modulaci hladiny argininu pro enzymy arginindekarboxylasu a enzym podobný NO synthase, které regulují hladiny polyaminů a NO. Zvýšená hladina NO a polyaminů následně moduluje akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS) skrze aktivitu antioxidantních enzymů a dalších adaptivních mechanismů, které vedou ke zvýšení tolerance abiotických stresových faktorů (přepřacováno podle Shi *et al.*, 2013).

Velice důležitou úlohu zaujímá ARG ve stresových odpovědích na biotický stres. Požer rostliny herbivorním hmyzem silně indukuje expresi arginasy v rostlinných pletivech, která prochází trávicím traktem hmyzu a je odolná vůči proteolýze a ve střevech rozkládá L-arginin, který je pro hmyz esenciální aminokyselinou (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.* 2007). V práci Chen *et al.*, 2005 byly připraveny transgenní rostliny rajčat, které nadexprimovaly ARG a vykazovaly vyšší rezistenci vůči larvám motýlů lišaje tabákového (*Manduca sexta*). V práci Brauc *et al.*, 2012 byl studován vliv manipulace exprese genu *AtARGAH2* na aktivitu ARG při infekci plísni šedou (*Botrytis cinerea*). Ve wild-type (WT) rostlinách docházelo k vyšší expresi *AtARGAH2* s maximem relativní exprese při 12 hodinách po infikování. Tato skutečnost může indikovat možnou roli *AtARGAH2* při raných stresových odpovědích u *A. thaliana*. Transgenní linie s nadexpresí *AtARGAH2* vykazovaly sníženou citlivost na *B. cinerea*. Transgenní linie s umlčeným genem pro *AtARGAH2* vykazovaly stejnou náchylnost k infekci *B. cinerea* jako WT rostliny.

2.1.1.4 Studium vlivu arginasy na výnosy plodin

V současnosti byly provedeny tři studie zabývající se možnou úlohou genů kódujících ARG pro šlechtění rostlin. Výsledky těchto studií dávají perspektivu a možný potenciál ve šlechtění rostlin s vyššími výnosy, přičemž u transgenních rostlin dochází k nadexpresi genu kódující ARG.

V práci Ma *et al.*, 2013 byl izolován mutant rýže *nglf-1* se sníženou výškou rostliny, menšími panikly a sníženou velikostí zrn. Mapovým klonováním bylo zjištěno, že fenotyp rostliny je způsoben ztrátou funkce genu *OsARG*, kódující ARG. Nadexpresí tohoto genu docházelo k produkci většího množství zrn při podmínkách s omezeným množstvím dusíku.

Práce Meng *et al.*, 2015 využila poznatky této studie. V této práci byly připraveny transgenní linie rostlin bavlny (*Gossypium hirsutum* L.) s nadexpresí *OsARG*, u kterých byla délka vláken v průměru o 2 mm delší.

Práce Di *et al.*, 2016 se zabývala ARG z kukuřice (*Zea mays*). V této studii byly připraveny transgenní rostliny kukuřice nadexprimující *ZmARG*, u kterých byla zaznamenána větší hmotnost klasů a semen.

2.1.1.5 Metody studia aktivity arginasy u rostlin

Byla vyvinuta řada metod pro studium aktivity arginasy, jedná se o metody gazometrické, radiometrické a zejména spektrofotometrické. Metody jsou obecně založeny na detekci

produktů reakce katalyzované ARG, ornithinu a močoviny. Tato podkapitola přináší souhrn metod, které byly využity pro studium aktivity v rostlinných vzorcích.

První metodou je spektrofotometrické stanovení močoviny, při kterém močovina reaguje v kyselém prostředí s α -isonitrosopropiofenonem za vzniku růžového produktu, který má maximum absorpance při 540 nm (Archibald, 1945). Tato metoda byla mnohokrát modifikována především přípravou extraktu (aktivací, dobou reakce):

- Kollöffel a Dijke (1975) u bobu obecného (*Vicia faba*) aktivovali extrakt inkubací s roztokem MnCl_2 (finální koncentrace $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) 5 min při laboratorní teplotě. Reakční směs obsahovala $225 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ L-arginin a $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MnCl_2 . Reakce probíhala po dobu 30 minut a poté byla zastavena přidávkem 8% (v/v) HClO_4 . Vysrážené proteiny byly odstraněny centrifugací. Stanovení močoviny proběhlo podle Schimke, 1970, kdy stanovení močoviny probíhalo s 3% (w/v) α -isonitrosopropiofenonem v absolutním ethanolu po dobu 30 min za varu. Po ochlazení byla změřena absorpance při 540 nm.
- Labudda *et al.*, 2016 využil modifikovanou Schimkeho metodu (Dzik *et al.*, 2004). Extrakt byl aktivován inkubací s $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem MnCl_2 10 min při 56°C . Následně proběhla ARG reakce inkubací s $250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ L-argininem (pH 9,6) při 37°C po dobu 1 h. Reakce byla následně zastavena přidáním směsi $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O}$ v poměru 1:3:7 (v/v). Poté byl přidán 9% (w/v) α -isonitrosopropiofenon a směs byla zahřívána 45 min při 95°C . Vzorky byly poté inkubovány 10 min ve tmě a byla změřena absorpance při 550 nm.
- Zhang *et al.*, 2016 extrahovali rostlinný materiál v poměru 1:5 a homogenát byl centrifugován 15 minut při 12 000 g. Následně byl supernatant aktivován inkubací s $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem MnCl_2 15 min při 37°C . Reakční směs obsahovala $120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycin-NaOH pufr (pH 9,6), $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ L-arginin a $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MnCl_2 . Reakce probíhala 20 min při 37°C a následně byla zastavena 15% (v/v) kyselinou chloristou. Močovina byla stanovena reakcí s 3% (w/v) α -isonitrosopropiofenonem v 95% (v/v) ethanolu v kyselém prostředí, které zajišťovala 27% (v/v) H_2SO_4 a 9% (v/v) H_3PO_4 . Směs byla inkubována 1 h ve vařící lázni ve tmě. Poté byla reakční směs ochlazená a byla stanovena absorpance při 540 nm.

Další metoda se opírá o reakci močoviny s diacetylmonoximem s thiosemikarbazidem v kyselém prostředí za vzniku červeně zbarveného komplexu s maximem absorpance při 530 nm (Geyer a Dabich, 1971).

Ve studii Meng *et al.*, 2015 byla aktivita arginasy u rostlinných vzorků měřena pomocí komerčního kitu Quanticrom™ Arginase Assay Kit (Bioassay Systems, USA, Cat. No. DARG-200), při kterém je stanovována močovina jakožto produkt reakce se specifickým chromogenem (směs kyseliny sírové a borité) s absorpčním maximem při 430 nm.

V práci Gravot *et al.*, 2012 byla aktivita ARG měřena pomocí stanovení koncentrace ornithinu. Po extrakci proteinů, centrifugaci a následném odebrání supernatantu byl extrakt aktivován – inkubace 10 minut s $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem MnCl_2 při 4°C . Následně proběhla ARG reakce přidáním aktivovaného extraktu k $250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku L-Arg. Reakce probíhala 20 min při 37°C a byla zastavena zahřátím reakční směsi na 95°C . Následně byl spektrofotometricky stanoven ornithin následujícím způsobem: k zahřáté reakční směsi byl přidán $125 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufr a 1% (w/v) ornithin v 60% (v/v) kyselině octové. Reakční směs pro stanovení ornithinu byla zahřívána při 95°C po dobu 20 minut a poté byla stanovena absorbance při 515 nm.

2.2 Oxid dusnatý u rostlin

Oxid dusnatý (NO) je bezbarvá plynná molekula, která má ve své valenční vrstvě jeden nepárový elektron, který způsobuje jeho vysokou reaktivitu, díky níž NO reaguje s biomakromolekulami, jako jsou proteiny, DNA a mastné kyseliny. Tyto interakce mohou následně vést ke změně struktury a funkce daných molekul, přeprogramování exprese genů nebo k aktivaci signálních drah.

U rostlin je NO zapojen do mnoha fyziologických a vývojových procesů, jakými jsou např. regulace růstu pylové láčky, regulace otevírání průduchů, regulace doby kvetení, gravitropismus, dozrávání plodů, světlem zprostředkované zelenání, dormance semen, maturace a senescence, klíčení semen, vývoj kořenů (primární kořeny, kořenové vlášení, postranní kořeny), tvorba symbiotických nodulů (Alemayehu *et al.*, 2015; Arc *et al.*, 2013, Corpas *et al.*, 2015, He *et al.*, 2004, Hu *et al.*, 2005, Chaki *et al.*, 2015, Puppo *et al.*, 2013, Shi *et al.*, 2015a, Shi *et al.*, 2015b, Šírová *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2015). NO je rovněž zapojen do obranných mechanismů vůči patogenům (Trapet *et al.*, 2015). Úloha NO v odpovědi rostlin na mnohé abiotické stresové faktory je shrnuta v přehledném článku Fancy *et al.*, 2017.

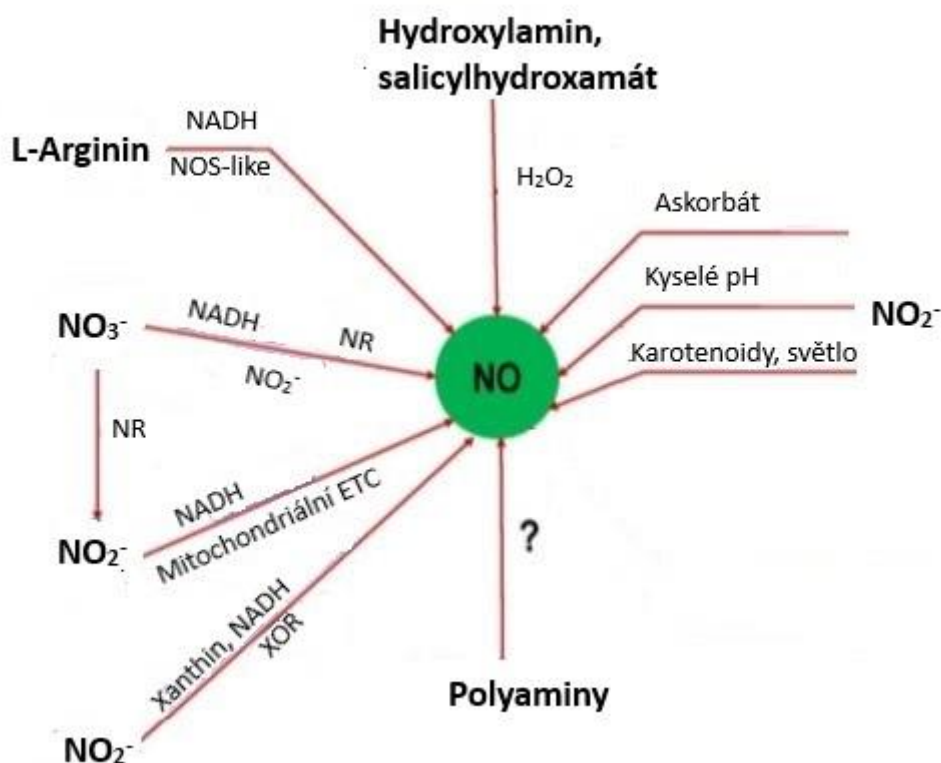
2.2.1 Mechanismy a lokalizace produkce NO

V současnosti je předmětem zájmu mnoha rostlinných biochemiků porozumět produkci NO u rostlin. NO může být produkován enzymově i neenzymově, rovněž

redukčně i oxidačně. Tato kapitola přináší stručný přehled doposud známých cest produkce NO u rostlin (stručně zobrazeno na Obr. 5).

2.2.1.1 Neenzymová produkce oxidu dusnatého

Neenzymově může NO vzniknout vlivem nízkého pH v apoplastu, při kterém dochází k dismutaci dusitanu na dusičnan a NO (Stöhr a Ullrich, 2002). Dále může být dusitan také redukován za chemické katalýzy kyselinou askorbovou nebo světlem zprostředkovanou katalýzu karotenoidy v membránách chloroplastů (Cooney *et al.*, 1994, Yamasaki, 2000).



Obrázek 5: Možné dráhy biosyntézy NO u rostlin. NO může být produkován enzymaticky – nitrátreduktasou nebo enzymem podobný NO synthase, tato skutečnost je však předmětem diskuzí. Neenzymově může být NO produkován redukcí dusitanu - buďto chemická katalýza karotenoidy za světla, při kyselém pH nebo v reakci s askorbátem (přepřacováno podle Hasanuzzaman *et al.*, 2018). Vysvětlivky: ETC – elektrontransportní řetězec, NOS-like – enzym podobný NO synthase, NR – nitrátreduktasa, XOR – xanthinoxidoreduktasa.

2.2.1.2 Oxidační mechanismy enzymové syntézy oxidu dusnatého

Reakce vzniku NO u živočichů je katalyzovaná enzymem NO synthasou (NOS, EC 1.14.13.39), při níž dochází k oxidaci L-argininu na L-citrulin a NO. Kofaktory NOS jsou NADPH (donor elektronů), kyslík (kosubstrát), tetrahydrobiopterin, FAD, FMN, vápenaté ionty a kalmodulin (Förstermann a Sessa, 2012).

U rostlin je přítomnost NOS předmětem diskusí. U rostlin byla detekována aktivita podobná NOS. Důkazy o přítomnosti aktivity podobné NOS poskytuje např. snížená syntéza NO v přítomnosti inhibitorů živočišné NOS nebo detekce proteinů s využitím protilátek proti živočišným NOS (Barroso *et al.*, 2004, Corpas *et al.*, 2006). *In silico* studie transkriptomu více než tisíce fotosyntetických organismů vyvrátily přítomnost homologních genů NOS s výjimkou řas *Ostreococcus tauri*, *Bathycoccus prasinus* a *Ostreococcus lucimarinus*, u kterých byla charakterizována přítomnost NOS (Foresi *et al.*, 2010, Kumar *et al.*, 2015, Jeandroz *et al.*, 2016).

U *A. thaliana* byl objeven protein AtNOS1 lokalizovaný v chloroplastech a mitochondriích, který byl považován za konstitutivní formu rostlinné NOS. U AtNOS1 byla předpokládána úloha v ochraně buněk před oxidačním poškozením (Guo a Crawford, 2005, Flores-Peréz *et al.*, 2008). NOS aktivita však nikdy u něj prokázána nebyla a protein byl přejmenován na AtNOA1 (Nitric oxide associated, Crawford *et al.*, 2006).

Další enzym, který umožňuje katalýzu biosyntézy NO u rostlin i živočichů je xanthinoxidoreduktasa (XOR), který existuje ve dvou vzájemně přeměnitelných isoformách. První formou je xanthinoxidasa (XOD, EC 1.1.3.22) a druhou formou je xanthindehydrogenasa (XDH, EC 1.17.1.4). XOR je homodimerní protein, u nějž každá podjednotka obsahuje 4 redoxní centra skládající se z FAD, dva Fe-S klastry a molybdenový kofaktor. Substrátem XOR je xanthin a NADH (Gupta *et al.*, 2011). XOR může v mitochondriích katalyzovat buďto tvorbu superoxidového radikálu nebo NO v závislosti na pH a množství kyslíku (Corpas *et al.*, 2001).

Biosyntéza NO u rostlin oxidační cestou může být spojena i s polyaminy (spermin a spermidin) a hydroxylaminem. Při exogenní aplikaci sperminu a spermidinu došlo k vyšší akumulaci NO. V případě hydroxylaminu byla pozorována tvorba NO ve spojení se zvýšenou koncentrací peroxidu vodíku. Mechanismy produkce NO spojené se zapojením polyaminů a hydroxylaminů jsou stále předmětem diskuzí (Tun *et al.*, 2006; Rümer *et al.*, 2009).

2.2.1.3 Redukční mechanismy enzymové syntézy oxidu dusnatého

Jedním z nejvíce probádaných enzymů podílející se na produkci NO u rostlin je nitrátreduktasa (NR, EC 1.7.1.1). NR je cytosolární homodimerní protein katalyzující redukci dusičnanu na dusitan, přičemž elektrony čerpá z NAD(P)H (Weiner a Kaiser, 2001).

Kromě redukce dusičnanu na dusitan, může NR rovněž redukovat dusitan na NO – tzv. nitritreduktasová aktivita NR (Ni-NR), která představuje za normálních podmínek přibližně 1% celkové aktivity NR. Ovšem za podmínek kyselého pH, zvýšené koncentrace dusitanů nebo anoxie může být Ni-NR aktivita zvýšená (Rockel *et al.*, 2002, Meyer *et al.*, 2005). Navzdory specifickým podmínkám byla prokázána důležitost produkce NO pomocí NR. U mutantních linií *A. thaliana* s narušenou funkcí NR (mutantní linie *nia1*, *nia2* nebo *nia1/nia2*) byla prokázána kritická role NR dependentní produkce NO v uzavírání průduchů, odpovědi na hormony, reakci na abiotický stres nebo při vývoji květů a kořenů (Desikan *et al.*, 2002, Kolbert a Erdei, 2008, Seligman *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2009, Hao *et al.*, 2010, Kolbert *et al.*, 2010, Méndez-Bravo *et al.*, 2010, Lombardo a Lamattina 2012, Xie *et al.*, 2013).

Kromě cytosolární NR může být do produkce NO zapojena i membránově vázaná nitritreduktasa (Ni:NOR, EC 1.7.2.1), u níž je předpokládána přítomnost v kořenech, kde využívá NAD(P)H jakožto donor elektronů. Aktivita Ni:NOR je závislá na nízkém tlaku kyslíku a aktivitě membránově vázané NR (Stöhr a Ullrich, 2002; Stöhr a Stremlau, 2006).

2.3 Rostlinné polyaminy

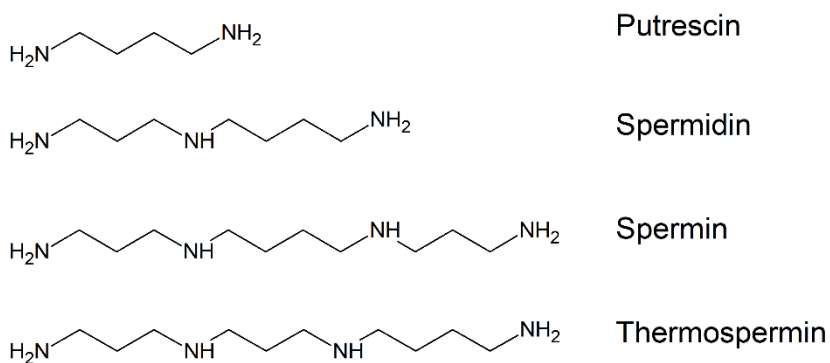
2.3.1 Základní charakteristika polyaminů

Polyaminy (PA) jsou nízkomolekulární alifatické polykationtové sloučeniny obsahující dvě a více aminoskupin. PA se nacházejí u prokaryotních i eukaryotních buněk. Nejznámějšími zástupci rostlinných PA (Obr. 6) jsou:

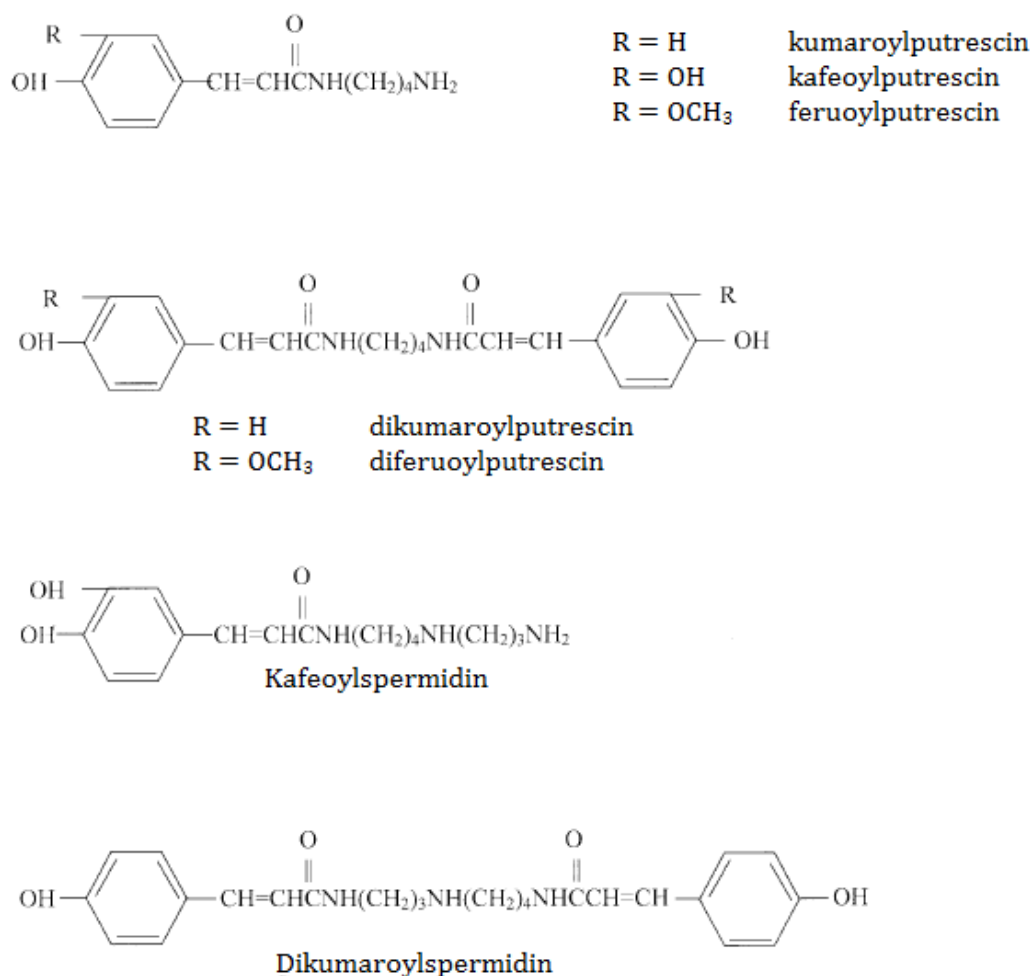
- putrescin (PUT, butan-1,4-diamin),
- spermidin (SPD, N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin)),
- spermin (SPM, N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin),
- thermospermin (tSPM, N'-[3-(3-aminopropylamino)propyl]butan-1,4-diamin).

PA se mohou vyskytovat ve volné (VPA), kovaletně konjugované (KKPA) nebo nekovalentně konjugované (NKKPA) formě. KKPA se dělí dle rozpustnosti v kyselině

chloristé na rozpustné a nerozpustné (Chen *et al.*, 2019). VPA se nejčastěji konjugují s fenolickými sloučeninami jako jsou kyselina hydroxyskořicová, ferulová, kávová nebo kumarová (Obr. 7). KKPA jsou nejvíce zastoupenou formou PA u rostlin (Bassard *et al.*, 2010; Martin-Tanguy, 1997).



Obrázek 6: Základní polyaminy u rostlin (přepřacováno podle Chen *et al.*, 2019).



Obrázek 7: Příklady konjugovaných PA (převzato z Bagni a Tassoni, 2001).

2.3.2 Funkce polyaminů

Za fyziologického pH jsou PA plně protonovány a mohou elektrostaticky interagovat se záporně nabitými makromolekulami jako jsou proteiny, membránové fosfolipidy, ATP a nukleové kyseliny. PA jsou rovněž zapojeny do řady biochemických procesů jako jsou regulace proteinů, regulace chemiosmózy, fotochrana v chloroplastech, syntéza ATP, fluidita membrán a otevírání iontových kanálků (Ioannidis *et al.*, 2006, Paschalidis *et al.*, 2010, Moschou *et al.*, 2012, Pottosin *et al.*, 2014, Ioannidis *et al.*, 2016, Dorighetto Cogo *et al.*, 2018, Sayas *et al.*, 2019).

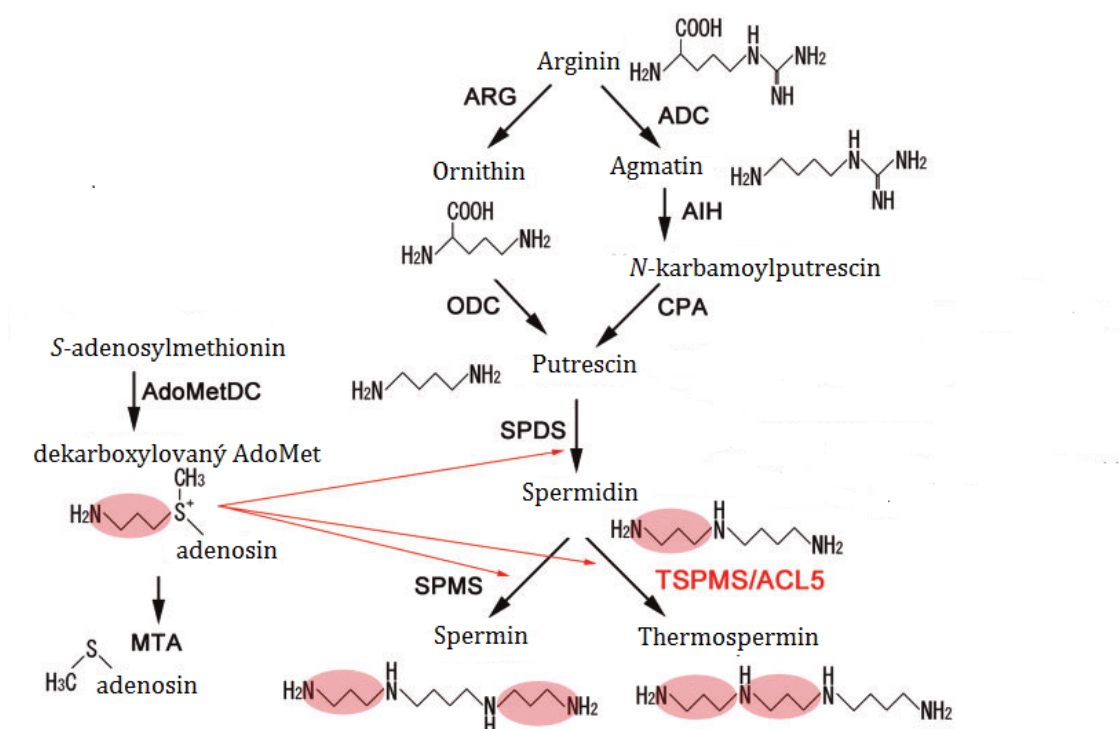
PA se v rostlinách rovněž zapojují do mnoha vývojových procesů v rostlině, jako jsou kupříkladu vývoj a senescence listů, vývoj a dozrávání plodů a kvetení (Sobieszczuk-Nowicka *et al.*, 2015, Tsaniklidis *et al.*, 2016, Ahmed *et al.*, 2017, Sobieszczuk-Nowicka,

2017). PA jsou nedílnou součástí odpovědi rostlin na mnohé abiotické a biotické stresové faktory (přehledně shrnuto v review Chen *et al.*, 2019).

2.3.3 Metabolismus polyaminů

2.3.3.1 Biosyntéza polyaminů

Biosyntéza polyaminů (Obr. 8) začíná tvorbou diaminu PUT. U živočichů je putrescin syntetizován dekarboxylací ornithinu za katalýzy ornithindekarboxylasy (ODC, EC 4.1.1.17). U rostlin se vyvinula i alternativní cesta, jelikož u *A. thaliana* nebyla detekována žádná ODC aktivita (Hanfrey *et al.*, 2001). Tato alternativní dráha vychází z dekarboxylace argininu katalyzována enzymem arginindekarboxylasou (ADC, EC 4.1.1.19) za vzniku agmatinu. Agmatin je následně přeměněn za katalýzy agmatiniminohydrolasy (AIH, EC 3.5.3.12) za vzniku *N*-karbamoyl-PUT, ze kterého vzniká diamin PUT reakcí katalyzovanou *N*-karbamoylputrescinamidohydrolasou (CPA, EC 3.5.1.53). Biosyntéza dalších PA spočívá v přidání aminopropylové skupiny z *S*-adenosylmethioninu. SPD vzniká z putrescinu za katalýzy enzymem spermidinsynthasou (SPDS, EC 2.5.1.16). Ze SPD mohou vzniknout dva izomery – SPM za katalýzy sperminsynthasy (SPMS, EC 2.5.1.22) a tSPM v reakci katalyzované enzymem thermosperminsynthasou (TSPMS, EC 2.5.1.79) (přehledně shrnuto v Alcazár *et al.*, 2010).



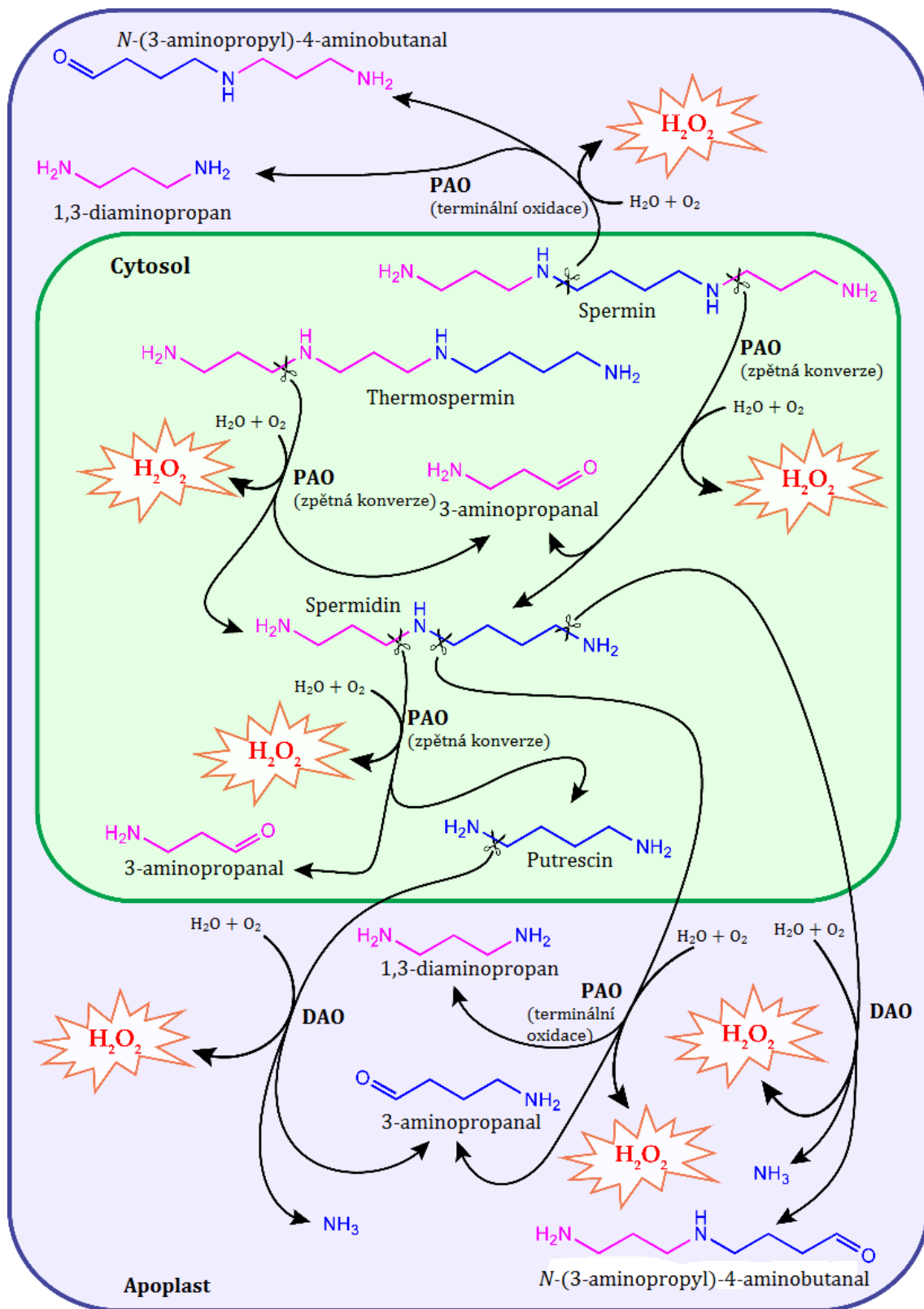
Obrázek 8: Metabolismus polyaminů (přepřacováno podle Takano *et al.*, 2012). Vysvětlivky: TSPMS/ACL5 – Acaulis5 (označení rostlinného genu pro thermosperminsintázu), ADC - arginindekarboxyláza, AIH - agmatiniminohydroláza, AdoMetDC - S-adenosylmethionindekarboxyláza, CPA – N-karbamoylputrescinaminohydroláza, MTA – methylthioadenosin, ODC - ornithindekarboxyláza, SPDS - spermidinsintáza, SPMS – sperminsintáza, TPSMS – thermosperminsintáza,

2.3.3.2 Katabolismus polyaminů

Na katabolismu polyaminů (Obr. 9) se podílí aminoroxidázy – konkrétně Cu-diaminooxidázy (DAO, EC 1.4.3.2) s iontem mědi v aktivním místě a flavoproteinové polyaminoxidázy (PAO, EC 1.5.3.17) (Cona *et al.*, 2006).

Cu-DAO katalyzuje oxidaci Put za vzniku 4-aminobutanalu, peroxidu vodíku a amoniaku. Rovněž se mohou účastnit přeměny dalších PA, ale primárně jsou zaměřeny na Put (Moschou *et al.*, 2012). DAO se ve vyšší míře nachází u dvouděložných rostlin, konkrétně u bobovitých rostlin jako je hrách, cizrna, čočka a sója (Cona *et al.*, 2006).

Oproti DAO jsou PAO ve vyšší míře zastoupeny u jednoděložných rostlin a mají vyšší afinitu pro Spm, Spd a jejich deriváty (Alcazar *et al.*, 2010). Rostlinné PAO jsou rozděleny na dvě třídy podle jejich možné funkce v katabolismu PA. Do první třídy se řadí PAO, které terminálně oxidují vyšší PA za vzniku 1,3-diaminopropanu, peroxidu vodíku a příslušného aminoaldehydu. Druhá třída PAO je zodpovědná za zpětnou konverzi jednotlivých PA, kdy je SPM přeměněn zpět na SPD a SPD zpět na PUT.



Obrázek 9: Schematické znázornění katabolismu polyaminů. Nůžky naznačují místa štěpení (přpracováno podle Ghuge *et al.*, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam chemikálií

- Aceton (Sigma-Aldrich, Německo)
- Akrylamid/bisakrylamid (AA/BIS, Sigma Aldrich Německo)
- N,N,N',N'-tetramethyldiamin (TEMED; Sigma Aldrich, Německo)
- Bromfenolová modř (Sigma Aldrich, Německo)
- Commassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich, Německo)
- Diethylether (Honeywell, Rumunsko)
- Dithiothreitol (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- D-mannitol (Penta, Česká republika)
- Dusitan sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Glutamátdehydrogenasa (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glutathion (Roth, Německo)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hovězí sérový albumin, heat shock frakce (Sigma-Aldrich, Německo)
- Chlorid manganatý (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina 2-oxoglutarová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina 5-5'-dithiobis-nitrobenzoová (DTNB, Serva, Německo)
- Kyselina fosforečná (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina chloristá (Lachema, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina L-askorbová (Duchefa Biochie, Nizozemsko)
- Kyselina morpholinoethansulfonová, hydrát (Roth, Německo)
- Kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika)
- L-Arginin (Acros Organics, USA)
- L-norvalin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Methanol (Lach-Ner, Česká republika)
- n-butanol (Sigma Aldrich, Německo)
- Nikotinamidadeninukleotid (NADH, Sigma-Aldrich, Německo)
- Perlit (Perlit s.r.o., Česká republika)

- Peroxid vodíku (Lach-Ner, Česká republika)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, Sigma Aldrich, Německo)
- Triton X-100 (Acros Organics, USA)
- Ureasa (Sigma-Aldrich, Německo)
- α -isonitrosopropiofenon (Sigma-Aldrich, Německo)

3.2 Seznam přístrojů a pomůcek

- Analytické váhy Denver Summit (Denver Instrument, USA)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga chlazená Rotanta 460R (Hettich zentrifugen, Německo)
- Dokumentační zařízení Gel-Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)
- Elektroforetický systém Mini PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad, USA)
- Mikrodestičkový spektrofotometr PowerWaveXS (Biotek Instruments, USA)
- Mikrodestičky Testplate 96F (TPP, Švýcarsko)
- Mikroskop Olympus BX 50 (Olympus, Japonsko)
- pH metr (XS Instruments, Itálie)
- Zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA)

3.3 Biologický materiál

- Hrách setý (*Pisum sativum* cv. Abarth)

3.3.1 Zpracování materiálu pro izolaci mitochondriální frakce

Semena hrachu byla nejdříve nabobtnána ponecháním v kohoutkové vodě po dobu 24 h. Poté byla voda slita a semena byla dána klíčit mezi dvě vrstvy navlhčeného filtračního papíru ve tmě.

3.3.2 Zpracování materiálu pro mikroskopické účely

Semena hrachu byla dána nabobtnat po dobu 24 h do kohoutkové vody. Následně byla umístěna mezi dvě vrstvy vlhčeného filtračního papíru na tácek ve tmě. Po dvou dnech klíčení byla naklíčená semínka vysazena do perlitu a zalita Hoaglandovým roztokem připraveného dle Tab. 1., kde byla ponechána růst další 3 dny.

Tab. 1: Seznam chemikálií k přípravě Hoaglandova roztoku.* Pipetované objemy značí objemy potřebné k přípravě 1 l roztoku, ** Chemikálie byly připraveny do společného zásobního roztoku.

Chemikálie	Koncentrace zásobního roztoku ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Pipetovaný objem* (ml)	Výsledná koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
KNO_3	1000	1,5	1500
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1000	1	1000
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1000	0,5	500
$\text{MgSO}_4\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1000	0,25	250
KCl**	50		50
$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ **	2		2
$\text{ZnSO}_4\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ **	2	1	2
$\text{CuSO}_4\cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ **	0,5		0,5
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ **	0,5		0,5
H_3BO_3	25	0,5	12,5
FeEDTA	20	1	20

3.4 Izolace mitochondriální frakce

Izolace mitochondriální frakce byla provedena dle Kollöffel a Dijke (1975) s drobnými modifikacemi. Po dvou dnech klíčení byla semena hrachu zbavena slupky a zárodku klíčku primárního kořene a rozdělena na dva kotyledony. Následně byly kotyledony homogenizovány v chlazené třecí misce s mořským pískem a extrakčním pufrům v poměru 1:2. Extrakční pufr obsahoval $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MES (pH 7,4) a $400 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mannitol. Těsně před extrakcí byl do extrakčního pufru přidán hovězí sérový albumin (BSA) ve výsledné koncentraci 0,25 % (w/v). Homogenát byl přecezen přes nylonovou tkaninu a centrifugován 5 min při 2 500 g. Supernatant byl odebrán a následně centrifugován 25 min při 17 740 g. Po centrifugaci byl supernatant odlit a pelet byl rozsuspendován v extrakčním pufru a centrifugován 25 min při 17 740 g. Supernatant byl slit a pelet obsahující mitochondriální frakci byl rozsuspendován v extrakčním pufru.

3.5 Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů v extraktech byla vybrána metoda dle Bradforda, která využívá vazby barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteiny v kyselém prostředí za vzniku modrého zbarvení, které je přímo úměrné množství proteinů ve vzorku (Bradford, 1976).

Zásobní roztok Bradfordova byl připraven rozpuštěním 50 mg barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 v 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Roztok byl

následně doplněn do 100 ml deionizovanou vodou. Rovněž byla připravena kalibrační řada standardu hovězího sérového albuminu o koncentracích 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8 a 1 mg·ml⁻¹.

Koncentrace proteinů v extraktech byla stanovena spektrofotometricky na mikrodestičkovém readru. Do jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno 45 μl deionizované vody, 5 μl standardu, vhodně zředěného vzorku nebo deionizované vody (blank) a 200 μl pracovního Bradfordova činidla, které bylo připraveno ze zásobního roztoku ředěním v poměru 1:4. Reakční směs v mikrotitrační destičce byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě a následně byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm.

3.6 Stanovení aktivity arginasy

Pro stanovení aktivity byla vybrána metoda popsána v článku Kollöfel a Dijke, 1975, který je založená na detekci močoviny, která reaguje s α-isonitrosopropiofenonem v kyselém prostředí za vzniku růžového aduktu s maximem absorbance při 540 nm.

V mitochondriální frakci byla nejprve provedena aktivace ARG inkubací s mangantými ionty. V plastové mikrozkušavce bylo smícháno 90 μl extraktu s 10 μl 20 mmol·l⁻¹ MnCl₂ a 5 μl 1,5% (v/v) Tritonu X-100 a směs byla inkubována v termobloku při 37°C po dobu 10 min.

Reakční směs obsahovala 400 μl 250 mmol·l⁻¹ L-argininu (pH 9,5), 50 μl 20 mmol·l⁻¹ MnCl₂. Reakce byla zahájena připipetováním 50 μl aktivovaného extraktu a následně probíhala při teplotě 37°C po dobu 30 min. Reakce byla poté zastavena 500 μl 15% (v/v) kyseliny chloristé. Obsah mikrozkušavek byl následně centrifugován 10 minut při 15 000 g. Jako negativní kontrola (blank) byla použita reakční směs, kde místo extraktu bylo pipetováno stejné množství extrakčního pufu.

Po centrifugaci byl supernatant odpipetován do čisté mikrozkušavky, bylo odebráno 100 μl a bylo přidáno 1,5 ml činidla A obsahujícího 9% (v/v) H₃PO₄ a 27% (v/v) H₂SO₄ a 50 μl činidla B, které obsahovalo 3% (w/v) α-isonitrosopropiofenon v 96% (v/v) ethanolu. Směs byla promíchána na vortexu a byla inkubována v termobloku při 90°C po dobu 1 h. Následně byly mikrozkušavky ochlazeny a do mikrotitrační destičky bylo pipetováno v technickém triplikátu 300 μl roztoku. Poté byla změřena absorbance při 540 nm.

Pro výpočet aktivity ARG byla sestavena kalibrační křivka sestavená ze standardů močoviny o koncentracích 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 3,5; 5; 7,5 a 10 mmol·l⁻¹. Aktivita byla vyjádřena v pikomol vytvořené močoviny za sekundu (pkatal).

3.7 Vliv světelných podmínek během růstu na aktivitu ARG

Semena hrachu byla ponechána na 24 h nabobtnat v kohoutkové vodě. Poté byla umístěna mezi 2 vrstvy navlhčeného filtračního papíru, kde byla ponechána klíčit po dobu 2 dní. Poté byla semena umístěna do dvou pěstebních nádob s perlitem. Jedna nádoba byla umístěna do skříně simulující podmínky stálé tmy. Naklíčená semena hrachu v druhé nádobě byla pěstována za fotoperiody 16 h světlo (25°C), 8 h tma (18°C). Perlit byl pravidelně vlhčen Hoaglandovým roztokem

Od pátého dne byly poté každý den sbírány rostliny hrachu. Byl vytvořen směsný vzorek 10 rostlin. Z každé části (kotyledon, nadzemní část, kořenová část) byl vytvořen extrakt třením za stálého chlazení dané části s extrakčním pufrem (MES pH 7,4 obsahující 400 mmol·l⁻¹ mannitol a 0,25% (w/v) BSA). Homogenáty byly následně přecezeny skrz nylonovou tkaninu a rozděleny do mikrozkušavek. Následně byly homogenáty centrifugovány 5 min při 2 500g. Po centrifugaci byly supernatanty převedeny do čistých mikrozkušavek a posloužily ke stanovení aktivity ARG a ke stanovení koncentrace proteinů dle kapitol 3.6 respektive 3.5.

3.8 Vliv zamražení a rozmražení na aktivitu ARG

Pro stanovení vlivu zamražení na aktivitu ARG v mitochondriální frakci byla stanovena aktivita nejprve z čerstvě izolovaného materiálu a poté byla mitochondriální frakce zamrazena při -28°C a následně po dvou týdnech rozmrazena. Při stanovení aktivity se postupovalo se stejně jako v kapitole 3.6.

3.9 Vliv teploty a doby aktivace aktivitu ARG

Pro stanovení vlivu teplotní stability extraktu byly vybrány časové intervaly 10 a 30 minut při teplotách 60°C, 70°C a 80°C. Jako kontrolní vzorek byl vzorek inkubován 10 min při 37°C. Pro tyto účely byl použit extrakt, který byl smísen s 20 mmol·l⁻¹ roztokem MnCl₂ a 1,5% (v/v) roztokem Tritonu X-100. Postup byl shodný jako v kapitole 3.6

3.10 Stanovení Michaelisovy konstanty

Stanovení aktivity ARG bylo provedeno postupem podle kapitoly 3.6. Byly použity následující koncentrace L-argininu v reakčním směsi: 8; 12; 20; 40; 80; 120; 160; 200

a $240 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po vyhodnocení aktivit bylo provedeno dvojnásobně reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka.

3.11 Stanovení IC_{50} pro norvalin

Stanovení aktivity arginasy bylo provedeno postupem podle kapitoly 3.6. Po aktivaci extraktu byl aktivovaný extrakt smísen s různými koncentracemi norvalinu, tak aby výsledné koncentrace v reakční směsi byly 0,3; 0,75; 1,5; 3; 6; 7,5 a $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro vyhodnocení by využit nástroj IC_{50} Calculator na portále AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>, 10. 5. 2020).

3.12 Vliv chemických látek na aktivitu ARG

Nejprve proběhla aktivace extraktu dle kapitoly 3.6. Aktivovaný extrakt byl smísen s roztoky chemický látek v poměru 1:1, tak aby výsledné koncentrace v reakční směsi byly (Tab 2.) a následně inkubovány 10 min při 37°C . Stanovení aktivity ARG probíhalo standardně dle kapitoly 3.6. Jako kontrolní vzorek byla použita směs extraktu s příslušným rozpouštědlem v poměru 1:1.

Tab. 2: Seznam modifikačních činidel, jejich rozpouštědel a výsledných koncentrací v reakční směsi.

Činidlo	Rozpouštědlo	Výsledné koncentrace v reakční směsi ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)
S-nitrosoglutathion	Deionizovaná voda	0,01; 0,1; 1; 10
Kyselina askorbová	Deionizovaná voda	0,025; 0,25; 2,5; 25
Dithiothreitol	Deionizovaná voda	0,01; 0,1; 1; 10
Peroxid vodíku	Deionizovaná voda	0,01; 0,1; 1; 10
DTNB	96% (v/v) ethanol	0,01; 0,1; 1;

3.12.1 Příprava S-nitrosoglutathionu

Pevný preparát S-nitrosoglutathionu (GSNO) byl připraven metodou podle Moore a Mani (2002). Navážka 614 mg glutathionu byla za chlazení rozpuštěna ve 3 ml $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl. Za stálého míchání byla k roztoku přidána navážka 138 mg NaNO_2 . Reakční směs byla ponechána 40 minut na ledové lázni za vzniku červené sraženiny. Následně byla sraženina odsáta přes filtrační papír na Büchnerově nálevce. Poté byla sraženina promyta 2x 10 ml vychlazené destilované vody, 2x 10 ml ledově vychlazeného acetonu a 2x ledově vychlazeného diethyletheru. Sraženina byla následně seškrábána z filtračního papíru na hliníkovou fólii a byla přes noc vysušena v exsikátoru. Dále byl tento preparát uchován v plastové mikrozkuřavce obalené hliníkovou fólií při -28°C .

3.13 Analýza sekvencí ARG v genomu hrachu

Pro vyhledání a srovnání sekvence genu hrachové ARG byly využity nástroje Unité de Recherche Génomique INRA ve Francii (URGI*) a nástroj Blastp suite portálu National Center of Biotechnology International (NCBI**). Pro vyhledávání genu arginasy byla použit referenční genom hrachu dostupný v databázi URGI (Kreplak *et al.*, 2019). Pro odhad molekulové hmotnosti proteinu a hodnoty pI byl použit nástroj bioinformatického portálu Expasy***.

*<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Pisum/Pea-Genome-project>

**<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>

***https://web.expasy.org/compute_pi/

3.14 Histochemická detekce NO s využitím fluorescenční sondy

Napěstované rostliny hrachu byly umístěny do Hoglandova roztoku obsahující buďto $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-arginin nebo $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-norvalin. Kontrolní skupina rostlin byla umístěna do čistého Hoaglandova roztoku. Rostliny byly v roztocích ponechány po dobu 2 h. Poté byly rostlinám uříznuty postranní kořeny, z nichž polovina byla na 30 min umístěna do $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku fluorescenční sondy 4,5-diaminofluoresceindiacetátu (DAF-2-DA) rozpuštěného v $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HEPES pufru (pH 7,5) ve tmě a druhá polovina do $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HEPES pufru (pH 7,5). Po ukončení doby inkubace byly postranní kořeny 3x opláchnuty v $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HEPES pufru (pH 7,5) a následně byly umístěny na podložní sklíčko. Kořínky byly zakápnuty 50% (v/v) glycerolem a přikryty krycím sklem a pozorovány pod mikroskopem při celkovém zvětšení 40x s využitím vhodných fluorescenčních filtrů.

3.15 Detekce arginasové aktivity v polyakrylamidových gelech za nativních podmínek

Elektroforetické dělení bylo realizováno v polyakrylamidových gelech o tloušťce 1,5 mm v diskontinuálním uspořádání. Do připravené aparatury pro nalévání gelů byly pipetovány gely byly připraveny podle Tab. 3.

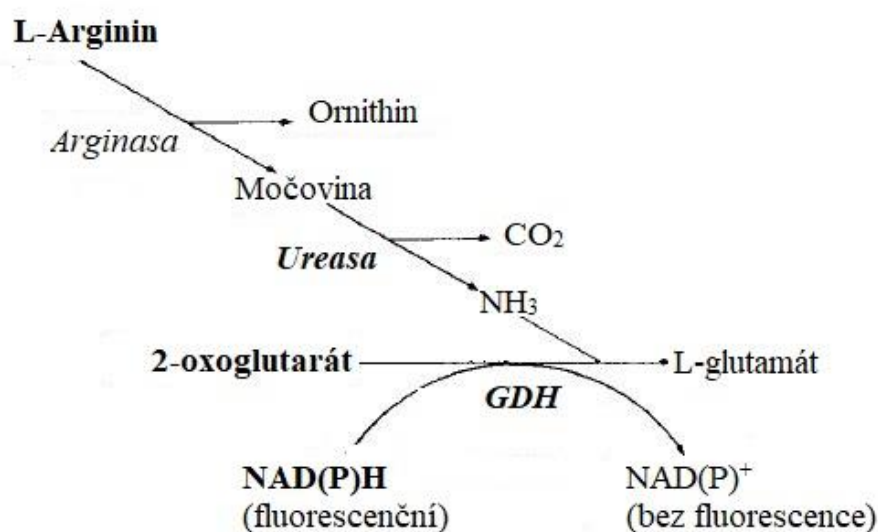
Po zatuhnutí gelů byla skla vložena do elektroforetické komůrky. Hřebínky byly vytaženy a do elektroforetické komůrky byl nalit elektrodový pufr obsahující 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,3) a 192 mmol·l⁻¹ glycin. Byly použity vzorky mitochondriální frakce izolované dle kapitoly 3.5. Do krajních jamek bylo pipetováno 10 μl roztoku bromfenolové modři smísené s 60% (v/v) glycerolem v poměru 3:1 (v/v) a do ostatních jamek bylo pipetováno 20 μl vzorku rovněž smísených s 60% (v/v) glycerolem v poměru 3:1. poté byla elektroforetická komůrka uzavřena.

Elektroforetické dělení probíhalo nejprve za napětí 100 V. Po doputování zóny bromfenolové modři na rozhraní gelů bylo napětí zvýšeno na 180 V a elektroforéza následně probíhala ještě 3 h. Poté byl gel umístěn do Tris-HCl pufru (pH 7,6) obsahující 1 mmol·l⁻¹ MnCl₂, případně také ještě 1 mmol·l⁻¹ L-norvalin a byl umístěn do inkubátoru nastaveného na 37°C na 10 min.

Tab. 3: Složení gelů pro nativní elektroforézu.

Typ gelu	AA/BIS (T 30%, C 2,67%)	0,5 mol·l ⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8	1,5 mol·l ⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8	H ₂ O	TEMED	10% (w/v) APS (start)
10% dělicí	6,6	-	5	8,1	0,01	0,2
5% zaostřovací	1,7	1,25	-	6,9	0,01	0,1

Poté byl gel nabarven podle Nelson *et al.*, 1977. Schéma detekce je zobrazeno na Obr. 10. Nejdříve byl na gel položen filtrační papír navlhčený roztokem 10 mg NADH rozpuštěného v 5 ml 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pufru (pH 7,6). Gel v krabici s filtračním papírem byl umístěn na 10 min do inkubátoru natemperovaného na 37°C. Poté byl na gel aplikován filtrační papír s chemikáliemi uvedenými v tab. 4 a umístěn do inkubátoru při 37°C po dobu 30 min. Následně byl gel zdokumentován pomocí přístroje Gel Doc (Bio-Rad, USA) v programu Image Lab.



Obrázek 10: Barvicí systém pro detekci ARG aktivity (přepřacováno podle Nelson *et al.*, 1977). Tučně jsou zvýrazněny použité chemikálie, kurzívou jsou označeny enzymy. GDH – glutamátdehydrogenasa.

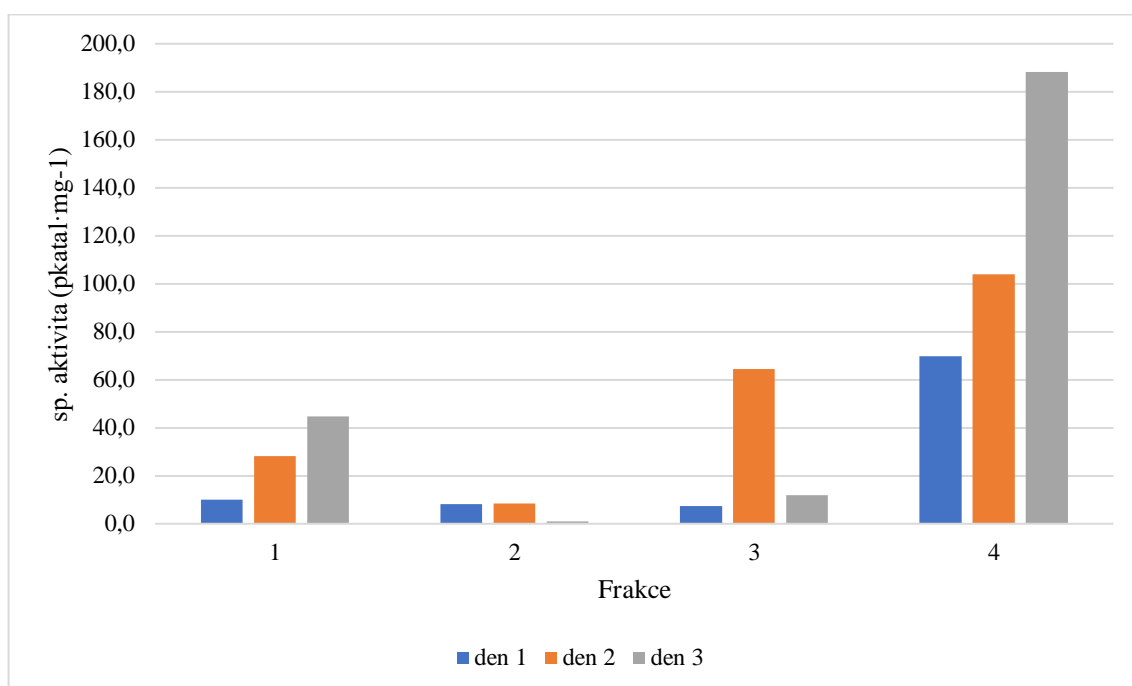
Tab. 4: Chemikálie použité na detekci ARG po nativní elektroforéze.

Chemikálie	Množství
0,1 mol·l ⁻¹ Tris-HCl pufr (pH 7,6)	5 ml
1 mol·l ⁻¹ L-Arginin, pH 7,6	1 ml
Ureasa (aktivita 54 U·mg ⁻¹)	0,37 mg
2-oxoglutarát	25 mg
Glutamátdehydrogenasa (aktivita 10 U·mg ⁻¹)	2,5 mg

4 VÝSLEDKY

4.1 Sledování změn aktivity arginasy během vývoje hrachu

Prvním z dílčích úkolů diplomové práce bylo stanovit vývoj specifické aktivity v kotyledonech hrachu v průběhu času ve dnech od namočení hrachu. Jedná se o ověření údajů známých již z publikované literatury. Z výsledků (Obr. 11) je patrné, že aktivita ARG je nejvyšší v mitochondriální frakci (frakce 4), kdežto v ostatních frakcích je aktivita ARG velice nízká. Přičemž v mitochondriální frakci dochází v průběhu klíčení hrachu k růstu aktivity.



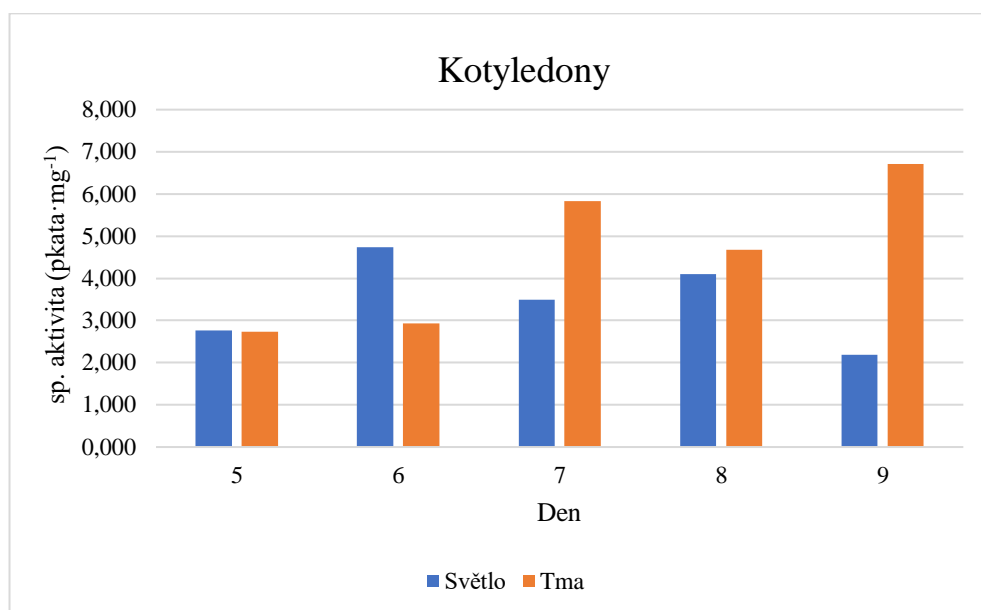
Obrázek 11: Změny specifické aktivity v jednotlivých frakcích hrachu. Frakce 1 označuje hrubý extrakt (po centrifugaci při 2 500 g). Frakce 2 je cytosolární frakce (supernatant po centrifugaci frakce 1). Frakce 3 označuje oplach mitochondrií (supernatant po centrifugaci rozsuspendovaného peletu frakce 2) a frakce 4 označuje mitochondriální frakci.

4.2 Vliv světelných podmínek na aktivitu ARG

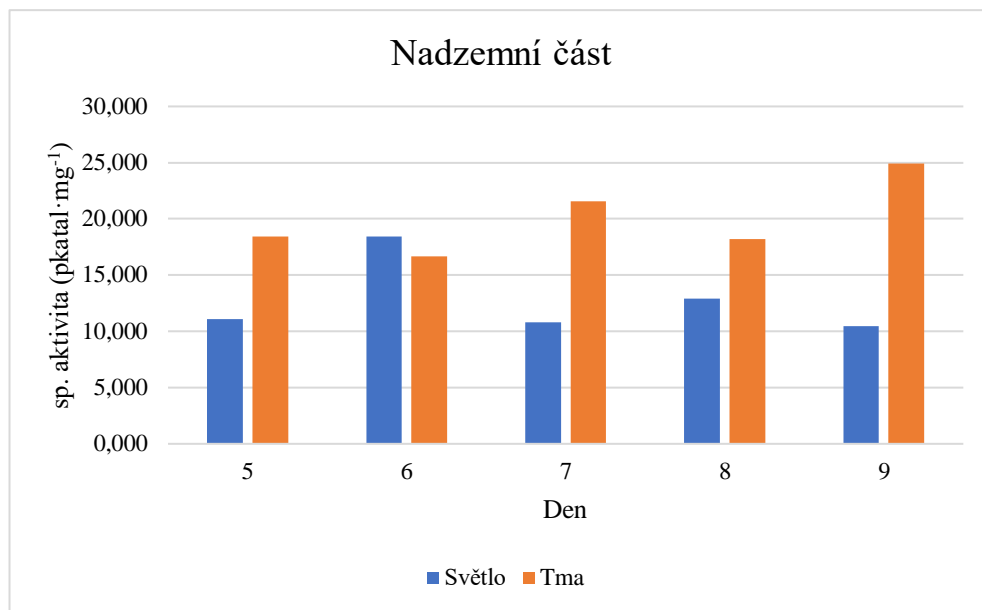
V této práci byly simulovány modelové stresové podmínky – jedna část rostlin byla pěstována za kontrolovaných světelných podmínek a druhá část byla pěstována ve tmě. Tyto výsledky jsou pouze orientační, jelikož byl tento typ experimentu realizován pouze jednou a v hrubém extraktu nikoliv v mitochondriální frakci. Výsledky naměřených specifických aktivit ARG pro kotyledony jsou uvedeny na Obr. 12. U kotyledonů hrachu nedosahovala aktivita ani v jeden den hranici $10 \text{ pkatal} \cdot \text{mg}^{-1}$. Celkově se dá shrnout, že při růstu za tmy dosahovala specifická aktivita ARG vyšších hodnot krom dne 6.

Výsledky pro nadzemní část jsou uvedeny na Obr. 13. Obdobně jako u kotyledonů specifická aktivita u rostlin pěstovaných ve tmě vyšší oproti rostlinám pěstovaných za kontrolovaných světelných podmínek. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u rostlin pěstovaných za tmy 9. den a činila necelých $25 \text{ pkatal} \cdot \text{mg}^{-1}$.

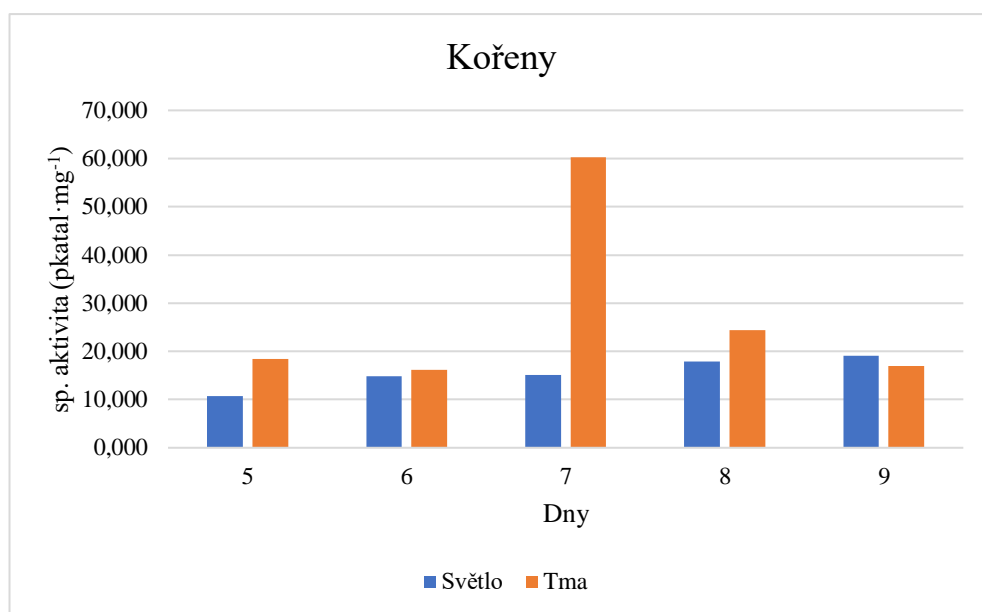
Výsledky měření specifické aktivity ARG u kořenů jsou uvedeny na Obr. 14. Opět je pozorován obdobný trend jako u ostatních orgánů. Po většinu času je specifická aktivita ARG vyšší u rostlin pěstovaných za tmy.



Obrázek 12: Vývoj specifické aktivity ARG v kotyledonech hrachu na dnech a podmínkách pěstování.



Obrázek 13: Graf závislosti vývoje specifické aktivity ARG v nadzemních částech hrachu na dnech a podmínkách pěstování.



Obrázek 14: Graf závislosti vývoje specifické aktivity ARG v kořenech hrachu na dnech a podmínkách pěstování.

4.3 Vliv zamražení a rozmražení na aktivitu ARG

Dále bylo stanoveno, zdali je možné mitochondriální frakci zamrazit. Pro tyto účely byla nejdříve stanovena specifická aktivita v čerstvě připraveném preparátu mitochondriální frakce a poté byla zamražena. Po rozmražení byla stanovena specifická aktivita po rozmražení. Z výsledků uvedených na Obr. 15 je patrné, že zamražení extraktu nemá

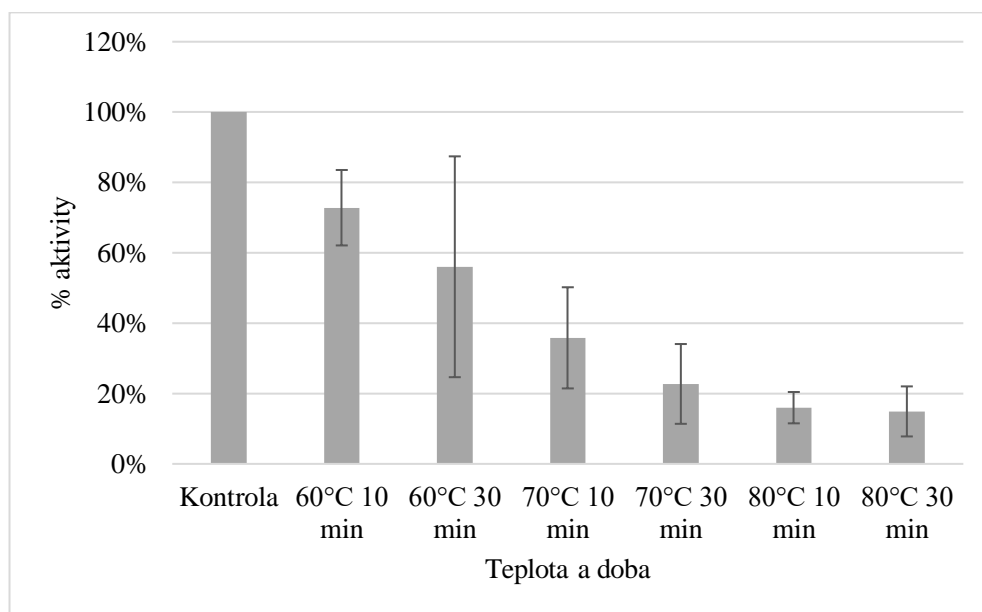
výrazný vliv na aktivitu ARG v mitochondriální frakci. V čerstvém extraktu byla specifická aktivita ARG $188,5 \pm 16,3 \text{ pkatal} \cdot \text{mg}^{-1}$, u zamraženého extraktu dosahovala specifická aktivita hodnot $200,4 \pm 25,3 \text{ pkatal} \cdot \text{mg}^{-1}$.



Obrázek 15: Porovnání specifických aktivit ARG v čerstvě izolované mitochondriální frakci a následně po rozmražení.

4.4 Vliv teploty a doby aktivace na aktivitu ARG

Dále byla testována teplotní odolnost enzymu při aktivaci při různých teplotách a dobách aktivace. Byly vybrány teploty 60°C, 70°C a 80°C a intervaly doby aktivace 10 min a 30 min. Kontrolní vzorek byl inkubován při 37°C 10 min. Z výsledků (Obr. 16) můžeme pozorovat, že s rostoucí teplotou i dobou aktivace klesá aktivita ARG. Nejvyšší pokles byl zaznamenán u obou intervalů při 80°C, kdy zůstalo zachováno přibližně 15% aktivity.



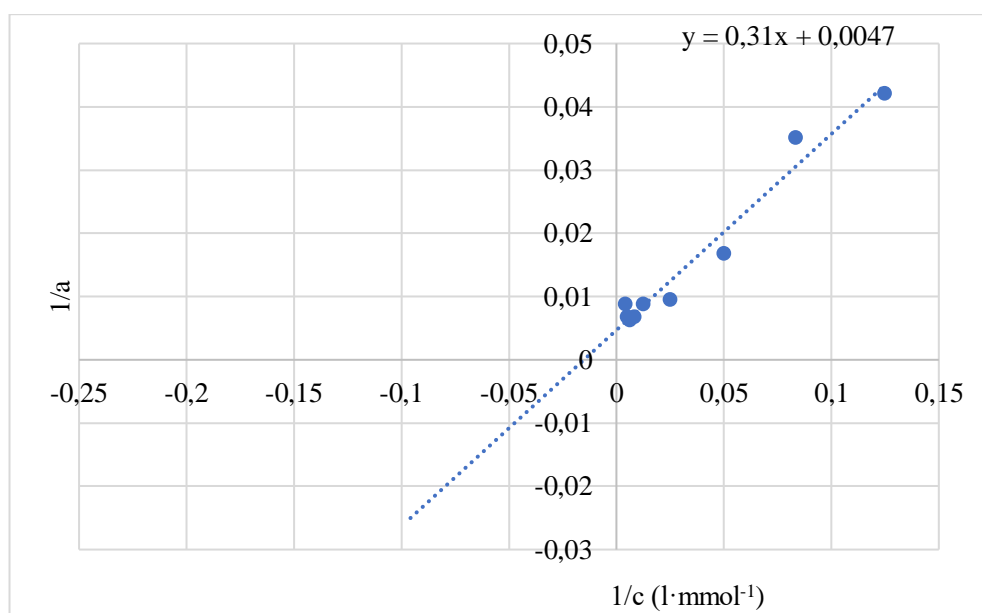
Obrázek 16: Porovnání vlivu různých teplot a doby aktivace extraktu na aktivitu ARG.

4.5 Stanovení Michaelisovy konstanty

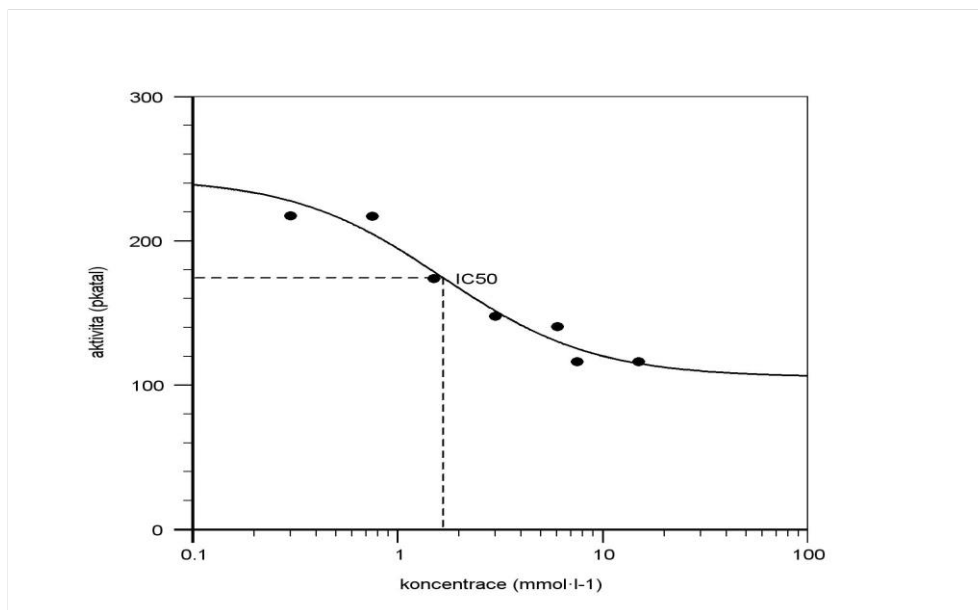
Po stanovení Michaelisovy konstanty byly hodnoty aktivity a koncentrací převráceny a vyneseny do grafu (Obr. 17). Po proložení bodů přímkou byla spočítána z rovnice hodnota K_M , která činí přibližně $66 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.6 Stanovení IC_{50} pro norvalin

Krom stanovení Michaelisovy konstanty byla stanovena i hodnota poloviční inhibice pro látku L-norvalin. Vyhodnocení (Obr. 18) proběhlo v nástroji IC_{50} Calculator na portále AAT Bioquest, který využívá čtyřparametrový nelineární regresní model. Vypočtena hodnota IC_{50} činí $1,665 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obrázek 17: Dvojnásobně reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka pro stanovení K_M pro hrachovou ARG.



Obrázek 18: Stanovení IC₅₀ pro L-norvalin.

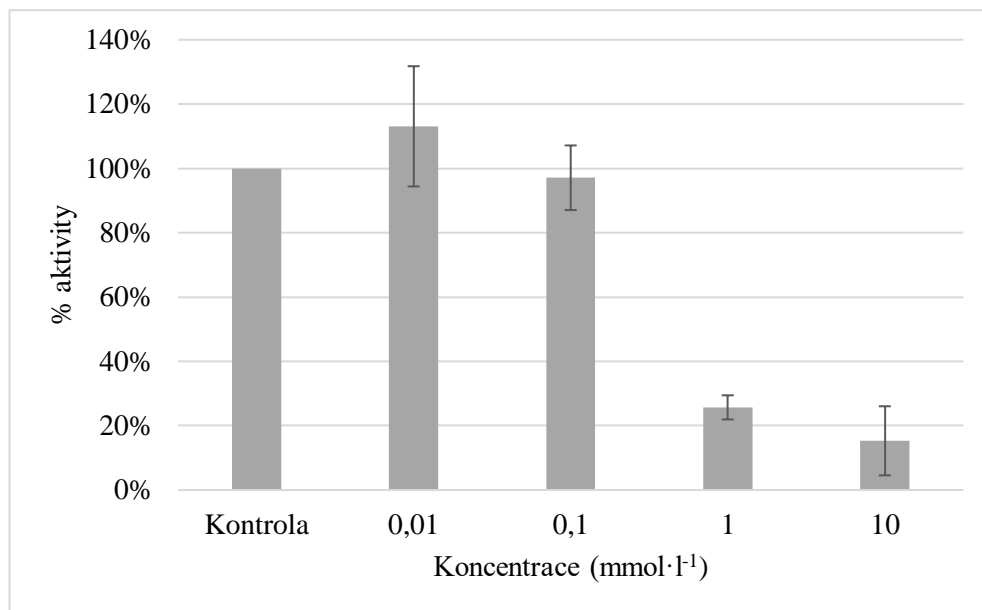
4.7 Vliv modifikačních činidel na aktivitu ARG

4.7.1 S-nitrosoglutathion

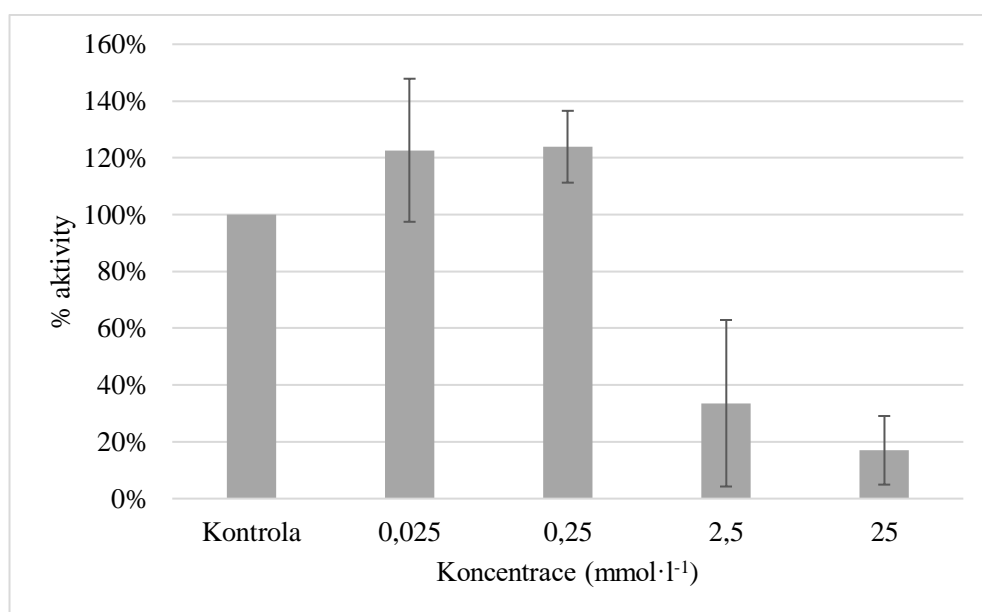
Dále byl posuzován vliv některých chemických činidel na aktivitu ARG. Jedním byl i S-nitrosoglutathion (GSNO), který je donor NO a je předpokládán vznik S-nitrosothiolů, jsou uvedeny na Obr. 19. Z výsledků je patrné, že se vzrůstající koncentrací GSNO, klesá aktivita ARG. Zatímco u koncentrace GSNO 0,01 mmol·l⁻¹ došlo ke zvýšení aktivity o 13%, u koncentrace 0,1 mmol·l⁻¹ došlo k poklesu o 3%, u koncentrací 1 a 10 mmol·l⁻¹ byl pozorován pokles o 75% resp. 85%.

4.7.2 Kyselina askorbová

Dále byl testován vliv kyseliny askorbové, jakožto činidla rozkládající S-nitrosothioly, na aktivitu ARG (Obr. 20). U koncentrací 0,025 a 0,25 mmol·l⁻¹ došlo ke zvýšení aktivity o 23% resp. 24%. U koncentrace 2,5 a 25 mmol·l⁻¹ bylo pozorováno snížení aktivity o 66%, resp. 83%.



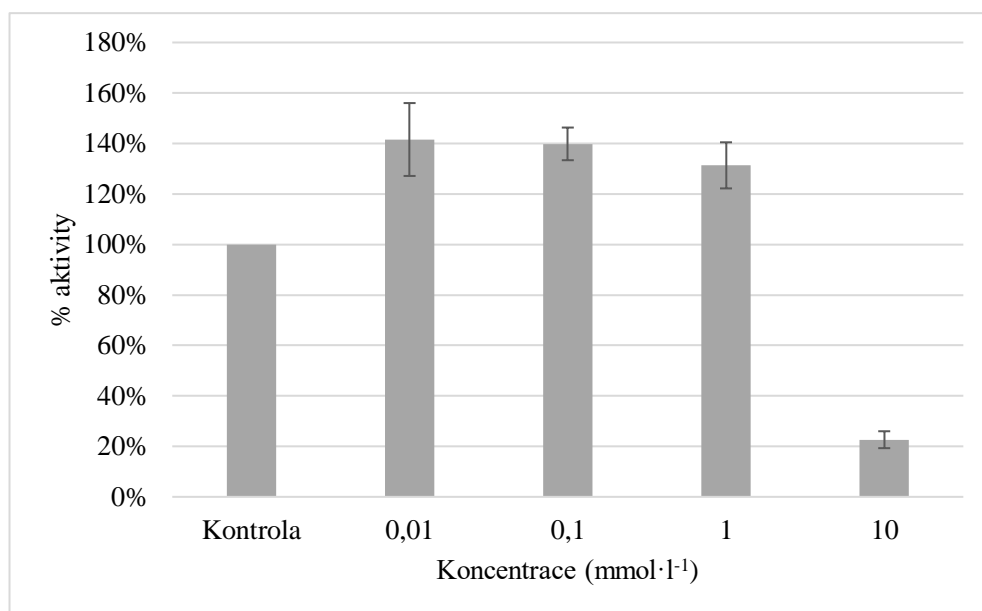
Obrázek 19: Změny aktivity ARG vlivem různých koncentrací GSNO.



Obrázek 20: Změny aktivity ARG vlivem různých koncentrací kyseliny askorbové

4.7.3 Dithiothreitol

Dále byla použita chemikálie DTT, která se používá jakožto redukční činidlo. Z výsledků (Obr. 21) bylo pozorováno zvýšení aktivity u koncentrací 0,01; 0,1 a 1 mmol·l⁻¹ o 41%, 39% a 31%. Mezi těmito koncentračními úrovněmi nebyly pozorovány výrazné rozdíly. U koncentrace 10 mmol·l⁻¹ bylo pozorováno cca 80% snížení aktivity oproti kontrolnímu vzorku.



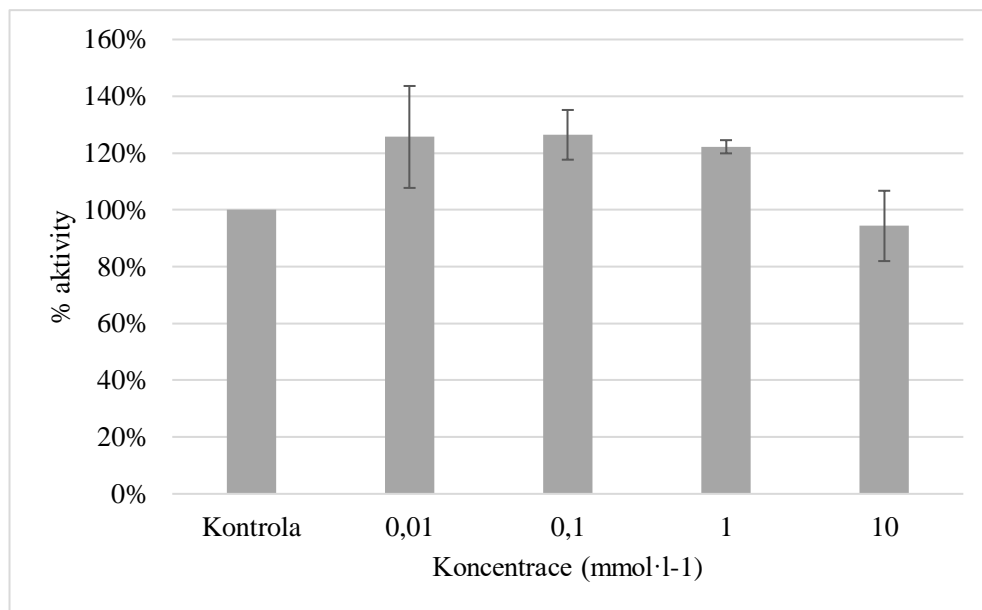
Obrázek 21: Změny aktivity ARG vlivem různých koncentrací DTT.

4.7.4 Peroxid vodíku

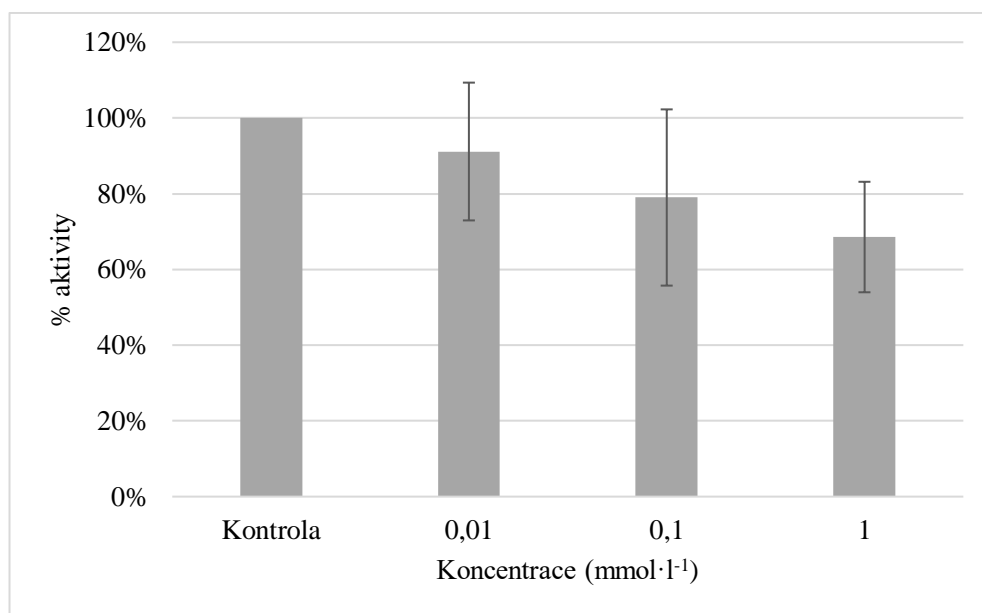
Z výsledků (Obr. 22) při ošetření extraktů peroxidem vodíku (oxidační činidlo) bylo pozorováno, že v případě koncentrací 0,01; 0,1 a 1 mmol·l⁻¹ došlo ke zvýšení aktivity o 22-26% vůči kontrolnímu vzorku, ale rozdíly mezi těmito koncentračními úrovněmi nejsou výrazné. V případě koncentrace 10 mmol·l⁻¹ došlo k mírnému poklesu aktivity o 6%.

4.7.5 Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová

Poslední použité modifikační činidlo bylo DTNB, která se používá k modifikaci thiolových skupin cysteinů. Z výsledků (Obr. 23) lze pozorovat, že s rostoucí koncentrací DTNB klesá i aktivita ARG.



Obrázek 22: Změny aktivity ARG vlivem různých koncentrací peroxidu vodíku.



Obrázek 23: Změny aktivity ARG vlivem různých koncentrací DTNB.

4.8 Identifikace genu ARG v genomu hrachu

Za využití nástroje URGI BLAST byla v genomu hrachu zkoumána přítomnost sekvencí podobným rostlinným ARG. Jako výchozí sekvence byla použita sekvence ARG z fazolu mungo (*Vigna radiata*) z databáze NCBI („arginase 1, mitochondrial“, protein XP_014516328.1, gen LOC106774034). S využitím nástroje blastp databáze URGI byla v referenčním genomu hrachu nalezena sekvence označená Psat0s3070g0160 vykazující 93% sekvenční identitu se sekvencí arginasy z *V. radiata* (identických 307 z celkem 338

aminokyselin). Další sekvence nalezené nástrojem blastp URGI v genomu hrachu vykazovaly identitu menší než 63% a nebyly dále zkoumány.

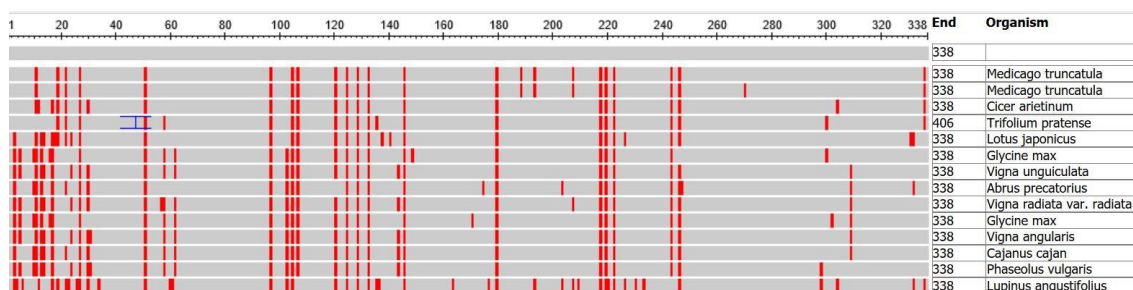
S využitím nástroje JBrowse URGI bylo zjištěno, že pro nalezenou sekvenci Psat0s3070g0160 byly detekován příslušný transkript genu v referenčním transkriptomu hrachu V2 v databázi URGI, a dále bylo zjištěno, že výsledky analýzy exprese genů metodou RNASeq ukazují na nízkou expresi v nezralých semenech hrachu a naopak vysokou expresi v klíčících semenech 5 dnů po nabobtnání (Obr. 24).



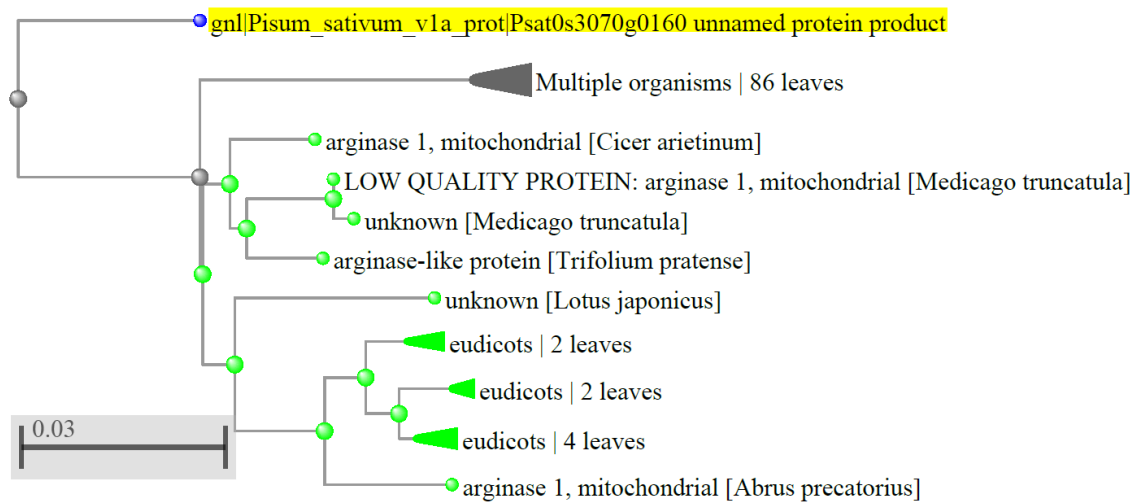
Obrázek 24: Výsledek vyhledání sekvence arginasy v referenčním genomu hrachu a hladiny transkriptů příslušného genu zobrazený v nástroji JBrowse URGI.

Nalezená proteinová sekvence Psat0s3070g0160 byla dále analyzována s využitím souboru nástrojů blastp suite NCBI. Sekvence ve FASTA formátu byla srovnána nástrojem blastp s databází neredundantních sekvencí proteinu se zadáním vymezení organismů zelené rostliny („green plants“). Výstup srovnání sekvence Psat0s3070g0160 se sekvencemi arginas vybraných zástupců rostlin v nástroji Multiple Sequence Alignment Viewer potvrzuje vysoký stupeň identity sekvencí (Obr. 25).

Výsledky srovnání evoluční příbuznosti sekvencí rostlinných arginas nástrojem TreeView ukazují, že sekvence nalezná v genomu hrachu je nejbližší sekvencím z cizrný (*Cicer arietinum*), tolíce (*Medicago truncatula*) a jetele (*Trifolium pratense*) (Obr.26).



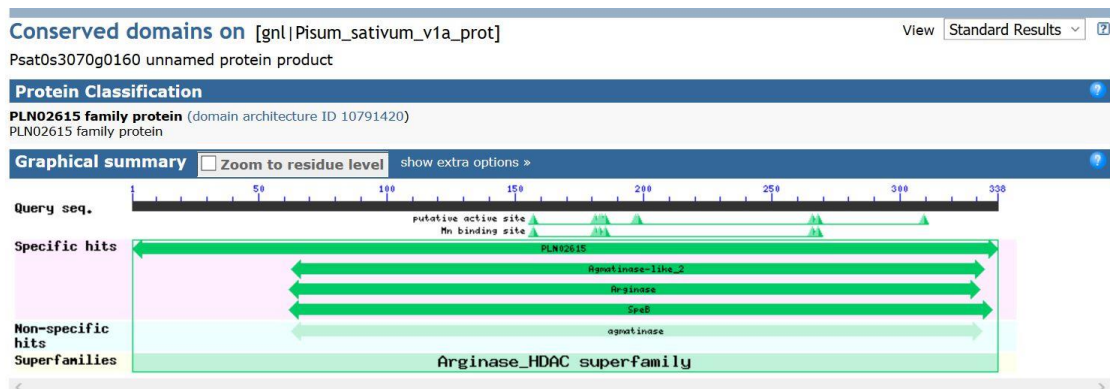
Obrázek 25: Výstup srovnání analýzy sekvencí rostlinných arginas nástrojem Multiple Sequence Alignment Viewer (červenou barvou jsou zvýrazněny odlišné aminokyseliny v sekvencích jednotlivých proteinů oproti sekvenci z genomu hrachu).



Obrázek 26: Výstup srovnání sekvencí rostlinných arginas v nástroji TreeView.

Využitím nástroje pro analýzu konzervovaných domén proteinů Conserved Domains NCBI bylo potvrzeno, že v sekvenci nalezené v genomu hrachu se nacházejí konzervované domény typické pro enzymy skupin arginas a agmatinas a že tedy nalezený protein je možno zařadit do superrodiny arginas-histondeacetylas (Obr. 27).

S využitím nástroje Expasy byla pro nalezenou sekvenci hrachové arginasy zjištěna teoretická molekulová hmotnost proteinu 36 757 Da a hodnota pI 5,89.

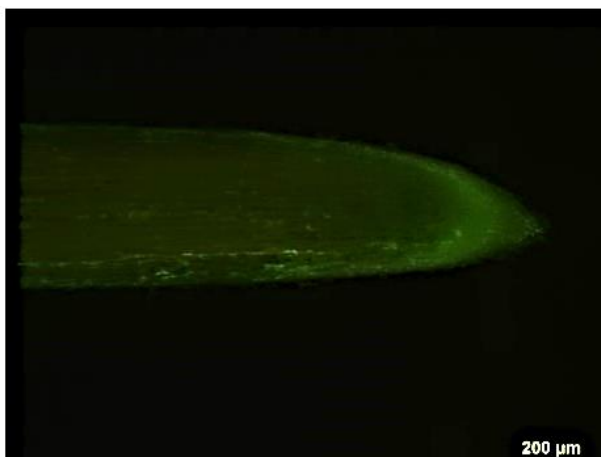


Obrázek 27: Výstup analýzy nalezené proteinové sekvence z genomu hrachu v nástroji Conserved Domains.

4.9 Histochemická detekce NO v postranních kořenech

Jedním z cílů práce také bylo studium vlivu akutního působení L-argininu a L-norvalinu na produkci NO v postranních kořenech hrachu. Byly mikroskopovány postranní kořeny hrachu šestý den po nabobtnání semen, jelikož kořenová špička hlavního kořene byla značně tlustá a pro provedení pokusů by se musely dělat řezy, které představují další zátěž. Pro detekci NO byla použita sonda DAF-2-DA. Doba expozice byla zvolena na 2 s. Byly mikroskopovány postranní kořínky kontrolních rostlin, které byly ponořeny do Hoaglandova roztoku. Dále byly rostliny hrachu umístěny do Hoaglandových roztoků obsahující buďto $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-arginin nebo L-norvalin. Byly vybrány reprezentativní mikroskopické snímky (Obr. 28). Z uvedených snímků lze vyzorovat, že k nejvyšší produkci NO dochází u kořínků, které byly inkubovány v roztoku s L-argininem. U kořínků inkubovaných s L-norvalinem byla pozorována nižší produkce NO.

Kontrola



L-Arginin



L-Norvalin

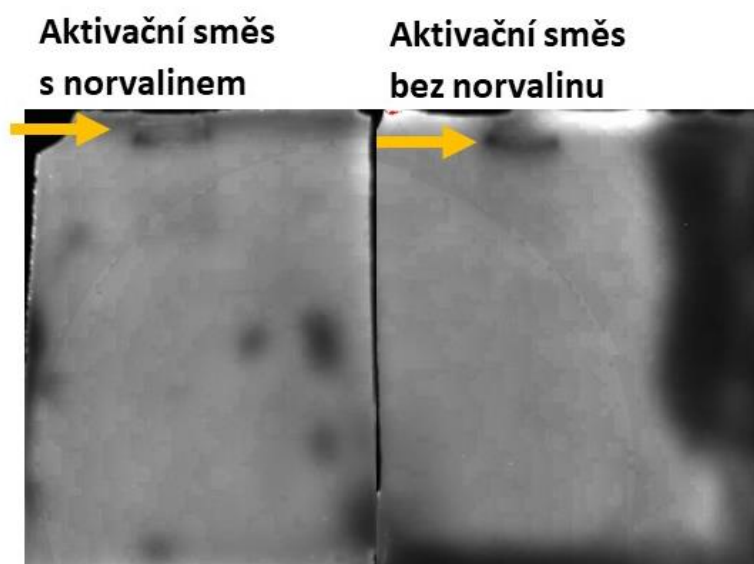


Obrázek 28: Mikroskopické snímky zobrazující NO pomocí fluoreskující sondy DAF-2-DA v postranních kořincích hrachu.

4.10 Nativní elektroforéza

Dalším dílčím cílem práce zavést a optimalizovat metodu detekce aktivity ARG v polyakrylamidových gelech za nativních podmínek. Po provedení elektroforetické separace proteinů ve vzorku byl jeden gel inkubován v aktivační směsi s L-norvalinem, jakožto inhibítorem ARG. Detekce ARG aktivity je spřažena s ureasou (EC 3.5.1.5)

a glutamátdehydrogenasou (GDH, EC 1.4.1.2). Močovina vzniklá z reakce katalyzované ARG je následně rozložena za katalýzy ureasy. Vzniklé amonné ionty vstupují do reakce s 2-oxoglutarátem za katalýzy GDH. Pokud došlo k ARG reakci dochází i k oxidaci fluoreskujícího NADH na NAD^+ , což se projeví tmavými bandy na gelu. Z uvedeného snímku (Obr. 29) gelů lze říci, že u hrachu se nachází jediný isoenzym ARG a po inkubaci gelu v aktivační směsi obsahující norvalin je band slabší.



Obrázek 29: Detekce aktivity ARG na nativních polyakrylamidových gelech. Bandy znázorňující ARG jsou označeny žlutou šipkou.

5 DISKUZE

Tato diplomová práce byla zaměřena na argininu, manganoenzym, který katalyzuje hydrolytický rozklad L-argininu na ornithin a močovinu. Dřívější studie byly zaměřeny na úlohu ARG ve vývoji rostlin, která může být dvojitá. U rajčat se předpokládá, že ARG hraje důležitou roli tvorbě polyaminů, které podporují vývoj plodů (Alabadí *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2004). U kotyledonů bobů, dýně a hrachu (*Pisum sativum* L. cv. Onyx) značně vzrůstala aktivita ARG během klíčení, kdežto u klíčících semen bavlny se aktivita zvýšila nepatrně (Splittstoesser, 1969; Kollöffel a van Dijke, 1975; Dilworth a Dure, 1978; de Ruiter a Kollöffel, 1982). Výsledky této práce (Obr. 11) korelují s těmito studiemi, kdy aktivita ARG druhý den po nabobtnání semen (den 3) byla téměř trojnásobná oproti prvnímu dni, kdy byla aktivita stanovená po nabobtnání semen.

V současné době je nezbytné nutně porozumět obranným mechanismům rostlin vůči stresu. Studie prokázaly, že při působení stresových faktorů (nedostatek vody, zasolení, mraz a patogeny) dochází k indukci exprese ARG na transkripční úrovni (Chen *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2013). Rovněž se předpokládá, že ARG je zapojená do odpovědi rostlin na stresové podmínky. V tomto směru byly uskutečněny dva typy experimentu. Jeden se opírá o manipulaci exprese ARG, kdy bylo prokázáno, že transgenní linie s knock-outem genu pro ARG vykazují lepší toleranci stresových podmínek než transgenní linie nadexprimující ARG (Shi *et al.*, 2013). Dalším typem experimentu bylo posouzení vlivu sloučenin nor-N_ω-hydroxyargininu (inhibitoru ARG), methyl-jasmonátu (rostlinný hormon, který reguluje expresi ARG) a argininu při působení stresu. Bylo prokázáno, že při působení methyl-jasmonátu a argininu dochází ke zmírnění stresových podmínek se zvýšením koncentrace polyaminů, prolinu, zvýšenou aktivitou antioxidantních enzymů, sníženou peroxidací lipidů a sníženým indexem chladového poškození. Při působení nor-NOHA byl zaznamenán pravý opak s výjimkou změn v koncentracích polyaminů (Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016. V této práci byly testován vliv světelných podmínek na aktivitu ARG v supernatantu, který vznikl centrifugací homogenátu při 2 500 g. Z prvotních orientačních výsledků (Obr. 20, 21 a 22) se dá zjednodušeně říci, že se při působení stresových podmínek (tma) zvyšuje aktivita ARG. Je nutné však tyto výsledky replikovat a analyzovat, jak se mění aktivita ARG v mitochondriální frakci, jelikož získané aktivity v supernatantu byly relativně nízké.

Dále byla v této práci studována stabilita při skladování. V práci Kang a Cho (1990) byla ARG stabilní při skladování při 4°C alespoň měsíc. U ARG izolované z *Vicia faba* bylo testováno zmražení a rozmražení pomocí tekutého dusíku, které vedlo ke zvýšení aktivity asi 1,5x (Kollöffel a van Dijke, 1975). Zde v této práci bylo testováno pouhé zamražení mitochondriální frakce a následné rozmražení, které nikterak výrazně neovlivnilo aktivitu ARG (Obr. 12).

Důležitým faktorem je rovněž i teplotní stabilita. U ARG ze sóji bylo zjištěno, že nedošlo ke ztrátě aktivity, pokud byla inkubována 10 min při 60°C. Při inkubaci 10 min při 70°C poklesla aktivita až o 50% a pokud byl enzym inkubován 10 min při 80°C, tak došlo ke kompletní inaktivaci (Kang a Cho, 1990). U ARG z kotyledonů dýně došlo k nízké ztrátě aktivity při inkubaci 5 min při 60°C (Splittstoesser, 1969). Zde v této práci (Obr. 13) byly otestovány teploty 60°C, 70°C a 80°C a intervaly 10 min a 30 min, přičemž nejnižší ztráty byly pozorovány u kombinace 60°C a 10 min. U obou intervalů inkubaci při 80°C došlo ke ztrátě až 85% aktivity. Pokud by se dále purifikovala mitochondriální frakce dalo by se uvažovat i o využití teplotní denaturaci při 60°C s délkou trvání denaturace do 10 min.

Dále byl charakterizován kinetický parametr Michaelisova konstanta. U rostlinných druhů byly charakterizovány hodnoty K_M uvedené v tab. 5. V této práci byla hodnota konstanty stanovena na 65,96 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což je řádově (desítky $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) shodné s ostatními rostlinnými druhy.

Tab. 5: Porovnání hodnot Michaelisovy konstanty u rostlinných druhů.

Rostlinný zdroj	Hodnota K_M ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Citace
Sója	83	Kang a Cho, 1990
Rajče (plody)	16	Alabadí <i>et al.</i> , 1996
Ženšen	82,7	Hwang <i>et al.</i> , 2001
LeARG1/2	32/29	Chen <i>et al.</i> , 2004

Krom charakterizace konstanty pro substrát, byla charakterizována i konstanta IC_{50} pro inhibitor norvalin, která činí $1,665 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. U ARG z topinamburu byla pozorována 50% inhibice u použití činidla *p*-chloromerkuribenzoátu v koncentraci $18 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, u L-citrulinu a L-ornithinu v koncentracích $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, resp. $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Jedním z cílů práce bylo i otestovat vliv chemických činidel na aktivitu ARG. U dvojice činidel GSNO a kyseliny askorbové bylo cílem probádat, zdali nedochází k S-nitrosaci. Vycházelo se ze článku Santhanam *et al.*, 2007, kde byly testován vliv těchto sloučenin na aktivitu lidské ARG. Při použití GSNO docházelo se vzrůstající koncentrací ke zvýšení aktivity, kdežto při použití askorbátu docházelo se vzrůstající koncentrací ke snížení aktivity. Rovněž v této studii byly nalezeny 2 možná místa S-nitrosace lidské ARG1 (Cys168 a Cys303), přičemž k S-nitrosaci dochází na Cys303, kdy dochází ke stabilizaci trimeru lidské ARG a šestinásobnému snížení hodnoty K_M . V této práci byl zaznamenán u obou látek ve dvou nižších koncentračních úrovních nárůst aktivity oproti kontrole a ve dvou vyšších koncentračních úrovních pokles oproti kontrole (Obr. 14 a 15), ovšem s tím rozdílem, že v této práci byly použity milimolární koncentrace GSNO, kdežto v článku Santhanam *et al.*, 2007, byly použity nanomolární koncentrace GSNO.

V práci Hwang *et al.*, 2001 bylo po použití činidla DTNB (Ellmanovo činidlo), vedoucího ke kovalentní modifikaci cysteinů thionitrobenzoovou kyselinou, pozorováno snížení aktivity, což vedlo k úvaze, že se v blízkosti aktivního místa rostlinných ARG nachází cysteinové residuum oproti savčím ARG, u kterých je katalyticky aktivní histidin (Daghigh *et al.*, 1996). V této práci byl rovněž pozorován pokles aktivity po použití DTNB (Obr. 18). Lze tedy předpokládat, že i u hrachové ARG se nachází cystein v blízkosti aktivního místa.

V práci Flores *et al.*, 2008 bylo u ARG deficitních mutantů pozorováno zvýšená produkce NO. V práci Gross *et al.*, 2017 byla pozorováno u dvou mutantních linií *cuao8* snížení produkce NO po elicitaci či působení chloridu sodného. Produkce však byla obnovena inhibicí ARG či dodáním L-argininu a dá se usoudit že u *A. thaliana* je CuAO8 zapojena do produkce NO tím, že ovlivňuje dostupnost argininu. Cílem histochemické detekce produkce NO bylo zjistit, zdali akutní působení L-argininu (zdroj pro oxidační syntézu NO) nebo L-norvalinu (inhibitoru ARG) ovlivní produkci NO v postranních kořenech. Z fotek na Obr. 23 je zjevné že dochází ke změnám v produkci NO, avšak nejsou výrazné.

Posledním cílem práce bylo prozkoumat, zdali se u hrachu nachází více isoenzymů ARG. U rajčete a *A. thaliana* se nachází dva geny, rýže ve svém genomu má jediný gen kódující protein s ARG aktivitou, u sóji je předpokládána přítomnost rodiny ARG proteinů a u pšenice byly nalezeny 3 geny pro ARG, ovšem jeden z nich má stop kodon uvnitř čtecího rámce. (Goldraj a Pollaco, 1999; Chen *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2013, Shi *et al.*, 2017). Byla provedena nativní elektroforéza a následné barvení, které indikuje přítomnost jediného proteinu s ARG aktivitou (Obr. 24). Je nutné, ale metodu pro nativní elektroforézu a následné barvení v budoucnu zoptimalizovat, jelikož zaostření bandů není dostačující. Navíc neexistují přímé metody detekce aktivity ARG v PAGE gelech za nativních podmínek a je nutné využít metod se spřaženými enzymy.

V referenčním genomu hrachu byla nalezena proteinová sekvence vykazující vysoký stupeň identity se sekvencemi dříve popsaných rostlinných ARG. Výchozí bioinformatická analýza ukazuje na přítomnost transkriptu příslušného genu v referenčním transkriptomu hrachu a v souladu s očekáváním dále na zvýšenou expresi genu v klíčících semenech hrachu. Analýza evoluční příbuznosti sekvencí prokázala blízkost sekvencí hrachu se sekvencemi ARG z blízkce příbuzných zástupců čeledi *Fabaceae* cizrny, tolice a jetele.

U nalezené sekvence předpokládané hrachové ARG byla predikována molekulová hmotnost 36 757 Da, což je v souladu s hodnotami publikovanými pro isoenzymy ARG rajčete LeARG1 a LeARG2, které mají molekulovou hmotnost 37 048 Da, resp. 36 851 Da (Chen *et al.*, 2004). U ostatních rostlinných druhů byla molekulová hmotnost nad 100 kDa. Predikovaná hodnota pI hrachového proteinu činí 5,89, která je o 0,3 vyšší než u hodnota pI arginasy z kosatce a o 0,6 vyšší než u slunečnice topinambur (Wright, 1981; Boutin, 1982).

6 ZÁVĚR

V teoretické části byla zpracována literární rešerše zahrnující následující témata:

- Charakterizace dostupných znalostí o rostlinných ARG
- Shrnutí dosavadních znalostí o mechanismech produkce NO u rostlin
- Shrnutí znalostí o funkcích a metabolismu polyaminů u rostlin

Z výsledků experimentální části lze vyvodit následující závěry:

- Byla zavedena metoda pro stanovení aktivity ARG u hrachu setého.
- Během klíčení po nabobtnání semen se v průběhu času zvyšovala aktivita ARG
- Při pěstování rostlin ve tmě je vyšší aktivita ARG než u rostlin pěstovaných se střídáním světla a tmy.
- Zamrazení připravené mitochondriální frakce nemělo výrazný vliv na aktivitu ARG.
- Inkubace při vyšších teplotách vedla ke ztrátě aktivity ARG
- Po provedení pokusů s modifikačními činidly lze předpokládat, že se u hrachové ARG nachází cystein v blízkosti aktivního místa.
- Hodnota K_M činí $66 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a hodnota IC_{50} pro norvalin činí $1,665 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.
- Při akutním působení L-argininu byly pozorovány vyšší hladiny produkce NO než při působení L-norvalinu.
- U hrachu se nachází jediný gen ARG.

7 LITERATURA

- AAT Bioquest: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> (10. 5. 2020).
- Ahmed, S., Ariyaratne, M., Patel, J., Howard, A. E., Kalinoski, A., Phuntumart, V., Morris P. F. (2017): Altered expression of polyamine transporters reveals a role for spermidine in the timing of flowering and other developmental response pathways. *Plant Science* **258**, 146–155.
- Alabadí D., Agüero M. S., Pérez-Amador M. A., Carbonell J. (1996): Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase and polyamines in tomato ovaries. *Plant Physiology* **112**, 1237-1244.
- 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.
- Alemayehu A., Zelinova V., Bocova B., Huttova J., Mistrik I., Tamás L. (2015): Enhanced nitric oxide generation in root transition zone during the early stage of cadmium stress is required for maintaining root growth in barley. *Plant and Soil* **390**, 213-222.
- Arc E., Galland M., Godin B., Cueff G., Rajjou L. (2013): Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science* **346**, doi: 10.3389/fpls.2013.00346.
- Archibald R. M. (1945): Colorimetric determination of urea. *Journal of Biological Chemistry* **157**, 507-518.
- Bagni N., Tassoni A. (2001): Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**, 301–317.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Quirós M., León A. M., Romero-Puertas M. C., Esteban F. J., Valderrama R., Palma J. M., Sandalio L. M., Gómez M., del Río L. A. (2004): Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* **136**, 2722-2733.
- Bassard, J. E., Ullmann, P., Bernier, F., and Al, E. (2010): Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* **71**, 1808–1824.
- Boutin Jean-Pierre (1982): Purification, properties and subunitstructure of arginase from Iris bulbs. *European Journal of Biochemistry* **127**, 237-243
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brauc S., De Vooght E., Claeys M., Geuns J. M., Höfte M., Angenon G. (2012): Overexpression of arginase in *Arabidopsis thaliana* influences defence responses against *Botrytis cinerea*. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* **14**, 39-45.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006): Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* **11**, 80–88.
- Cooney R. V., Harwood P. J., Custer L. J., Franke A. A. (1994): Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives* **102**, 460-462.
- Corpas F. J., Barroso J. B., del Rio L. A., (2001): Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**, 145-150.
- Corpas F. J., Barroso J. B. (2015): Functions of nitric oxide (NO) in roots during development and under adverse stress conditions. *Plants (Basel)* **4**, 240-252.
- Corpas F. J., Barroso J. B., Carreras A., Valderrama R., Palma J. M., Len A. M., Sandalio L. M., del Rio L. A., (2006): Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**, 246-254.
- Crawford M. J., Galli M., Tischner R., Heimer Y. M., Okamoto M., Mack A. (2006): Response to Zemojtel *et al*: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends in Plant Science* **11**, 526-527.
- Daghigh F., Cavalli R. C., Soprano D. R., Ash D. E. (1996): Chemical modification and inactivation of rat liver arginase by *N*-bromosuccinimide: reaction with His-141. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **327**, 107-112.

- Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S. (2002): A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16314-16318.
- De Ruiter H., Kollöffel C. (1982): Activity of enzymes of arginine metabolism in the cotyledons of developing and germinating pea seeds. *Plant Physiology* **70**, 313-315.
- Di H., Li R., Tian Y., Meng X., Zhang P., Liu D., Zeng X., Wang Z. (2016): Over-expression of ZmARG encoding an arginase improves grain production in maize. *Pakistani Journal of Botany* **48**, 1062-1072.
- Dilworth M. F., Dure L. (1978): Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: X. Nitrogen flow from arginine to asparagine in germination. *Plant Physiology* **61**, 698-702.
- Dorighetto Cogo, A. J., Dutra Ferreira, K. D. R., Okorokov, L. A., Ramos, A. C., Facanha, A. R., and Okorokova-Facanha, A. L. (2018): Spermine modulates fungal morphogenesis and activates plasma membrane H⁺-ATPase during yeast to hyphae transition. *Biology Open* **7**, 1-13.
- Dzik J. M., Golos B., Jagielska E., Zielinski Z., Wałajtys-Rode E. (2004): A non-classical type of alveolar macrophage response to *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunology* **26**, 197-205.
- Expasy: https://web.expasy.org/compute_pi/ (24. 4. 2020).
- Fancy N. N., Bahlmann A. K., Loake G. J. (2017): Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant cell & Environment* **40**, 462-472.
- Flores T., Todd Ch. D., Tovar-Mendez A., Dhanoa P. K., Correa-Aragunde N., Hoyos M. E., Brownfield D. M., Mullen R. T., Lamattina L., Polacco J. C. (2008): Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signalling in root development. *Plant Physiology* **147**, 1936-1946.
- Flores-Pérez U., Sauret-Güeto S., Gas E., Jarvis P., Rodríguez-Concepción M. (2008): A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids. *The Plant Cell* **20**, 1303-1315.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L. (2010): Characterization of a nitric oxide synthase from plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *The Plant Cell* **22**, 3816-3830.
- Föstermann U., Sessa W. C. (2012): Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* **33**, 829-837.
- Geyer J. W., Dabich D. (1971): Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analytical Biochemistry* **39**, 412-417.
- Ghughe S. A., Tisi A., Carucci A., Rodrigues-Pousada R. A., Franchi S., Tavladoraki P., Angelini R., Cona A. (2015): Cell wall amine oxidases: New player in root xylem differentiation under stress conditions. *Plants (Basel, Basel Switzerland)* **14**, 489-504.
- Goldraj A., Polacco J. C. (1999): Arginase is inoperative in developing soybean embryos. *Plant Physiology* **199**, 297-303.
- Gravot A., Deleu C., Wagner G., Lariagon C., Lugan R., Todd C., Wendehenne D., Delourme R., Bouchereau A., Manzaneres-Dauleux M. J. (2012): Arginase induction represses gall development during clubroot infection in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **53**, 901-911.
- Gross F., Rudolf E. E., Thiele B., Durner J., Astier J. (2017): Copper amine oxidase 8 regulates arginine-dependent nitric oxide production in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **68**, 2149-2162.
- Guo F. Q., Crawford N. M. (2005): *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *The Plant Cell* **17**, 3436-3450.
- Gupta K. J., Fernie A. R., Kaiser W. M., van Dongen J. T. (2011): On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**, 160-168.

- Hao F., Zhao S., Dong H., Zhang H., Sun L., Miao C. (2010): Nia1 and Nia2 are involved in exogenous salicylic acid-induced nitric oxide generation and stomatal closure in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 298-307.
- Hanfrey C., Sommer S., Mayer M. J., Burtin D., Michael A. J. (2001): Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **27**, 551-560.
- Hasanuzzaman M., Oku H., Nahar K., Borhannuddin Bhuyan M. H. M., Al Mahmud J., Baluska F., Fujita M. (2018): Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. *Plant Biotechnology Reports* **12**, 77-92.
- He Y., Tang R. H., Hao Y., Stevens R. D., Cook Ch. W., Ahn S. M., Jing L., Ya Z. (2004): Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* **305**, 1968-1971.
- Hu X., Neill S. J., Tang Z., Cai W. (2005): Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology* **137**, 663-670.
- Hwang H. J., Kim E. H., Cho Y. D. (2001): Isolation and properties of arginase from a shade plant, ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) roots. *Phytochemistry* **58**, 1015-1024.
- Chaki M., de Morales P. A., Ruiz C., Begara-Morales J. C., Barroso J. B., Corpas F. J., Palma J. M. (2015): Ripening of pepper (*Capsicum annuum*) fruit is characterized by an enhancement of protein tyrosine nitration. *Annals of Botany* **116**, 637-647.
- Chen D., Shao Q., Yin L., Younis A., Zheng B. (2019): Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science* **9**:1945. doi: 10.3389/fpls.2018.01945.
- Chen H., McCaig B. C., Melotto M., He S. Y., Howe G. A. (2004): Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate and the phytotoxin coronatine. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 45988-46007.
- Chen H., Wilkerson C. G., Kuchar J. A., Phinney B. S., Howe G. A. (2005): Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 19237-19242.
- Ioannidis, N. E., Malliarakis, D., Torne, J. M., Santos, M., and Kotzabasis, K. (2016). The over-expression of the plastidial transglutaminase from maize in Arabidopsis increases the activation threshold of photoprotection. *Frontiers in Plant Science* **7**, doi: 10.3389/fpls.2016.00635
- Ioannidis, N. E., Sfichi, L., and Kotzabasis, K. (2006): Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1757**, 821-828.
- Jeandroz S., Wipf D., Stühr D. J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E. J., Wong G. K., Wendehenne D. (2016): Occurrence, structure and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signalling* **9**, doi: 10.1126/scisignal.aad4403.
- Jenkinson C. P., Grody W. W., Cederbaum S. D. (1996): Comparative properties of arginases
- Kang J. H., Cho Y. D. (1990): Purification and properties of arginase from soybean, *Glycine max*, axes. *Plant physiology* **93**, 1230-1234.
- King J. E., Gifford D. J (1997): Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth (I. Arginine and arginase activity). *Plant physiology* **113**, 1125-1135.
- Kolbert Z., Erdei L. (2008): Involvement of nitrate reductase in auxin-induced NO synthesis. *Plant Signalling & Behaviour* **3**, 972-973.
- Kolbert Z., Ortega L., Erdei L. (2010): Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress-induced NO generation of Arabidopsis thaliana L. roots. *Journal of Plant Physiology* **167**, 77-80.
- Kollöffel C., van Dijke H. D. (1975): Mitochondrial arginase activity from cotyledons of developing and germinating seeds of *Vicia faba* L. *Plant physiology* **55**, 507-510.
- Kreplak, J., Madoui, M., Cápál, P., Novák P., Labadie K., Aubert G., Beyer P. E., Gali K. K., Syme R. A., Main D., Klein A., Bérard A., Vrbová I., Fournier C., d'Agata L., Belser C., Berrabah W., Toeglová H., Milec Z., Vrána J., Lee H., Kougbéadjo A., Térézol M., Huneau C., Turo C. J., Mohellibi N., Neumann P., Falque M., Gallardo K., McGee R., Tar'an B., Bendehmane A., Aury J. M., Batley J., Le Paslier M. C., Ellis N., Warkentin T. D., Coyne C.

- J., Salse J., Edwards D., Lichtenzveig J., Macas J., Doležel J., Wincker P., Burstin J. (2019): A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nature Genetics* **51**, 1411–1422.
- Kumar A., Castellano I., Patti F. P., Palumbo A., Buia M. C. (2015): Nitric oxide in marine photosynthetic organisms. *Nitric oxide* **47**, 34-39.
- Labudda M., Róžańska E., Cieśla J., Sobczak M., Dzik J. M. (2016): Arginase activity in *Arabidopsis thaliana* infected with *Heterodera schachtii*. *Plant Pathology* **65**, 1529-1538.
- Lombardo M. C., Lamattina L. (2012): Nitric oxide is essential for vesicle formation and trafficking in *Arabidopsis* root hair growth. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4875-4885.
- Ma X., Cheng Z., Qin R., Qiu Y., Heng Y., Yang H., Ren H., Wang X., Bi J., Ma X., Zhang X., Wang J., Lei C., Guo X., Wang J., Wu F., Jiang L., Wang H., Wan J. (2013): *OsARG* encodes an arginase that plays critical roles in panicle development and grain production in rice. *The Plant Journal* **73**, 190-200.
- Martin-Tanguy, J. (1997): Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiologia Plantarum* **100**, 675–688.
- Mendéz-Bravo A., Raya-González J., Herrera-Estrella L., López-Bucio J. (2010): Nitric oxide is involved in alkamide-induced lateral root development in *Arabidopsis*.
- Meng Z., Meng Z., Zhang R., Liang Ch., Wan J., Yanling W., Zhai H., Sandui G. (2015): Expression of the rice arginase gene *OsARG* in cotton influences the morphology and nitrogen transition of seedling. *PLoS ONE* **10**: e0141530.doi:10.1371/journal.pone.0141530
- Meyer C., Lea U. S., Provan F., Kaiser W. M., Lillo C. (2005): Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynthesis Research* **83**, 181-189.
- Moore K. P., Mani A. R. (2002): Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine. *Methods in Enzymology* **359**, 256-268.
- Moschou P. N., Wu J., Cona A., Tavladoraki P., Angelini R., Roubelakis-Angelakis K. A. (2012): The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **63**, 5003-2015.
- NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> (24. 4. 2020).
- Nelson R. L., Povey S., Hopkinson D. A., Harris H. (1997): Detection after electrophoresis of enzymes involved in ammonia metabolism using L-glutamate dehydrogenase as a linking enzyme. *Biochemical Genetics* **15**, 1023-1035.
- Paschalidis, K. A., Toumi, I., Moschou, P. N., and Roubelakis-Angelakis, K. A. (2010): ABA-dependent amine oxidases-derived H₂O₂ affects stomata conductance. *Plant Signaling & Behaviour* **5**, 1153–1156.
- Perozich J., Hempel J., Morris Jr. S. M. (1998): Roles of conserved residues in the arginase family. *Biochimica et Biophysica Acta* **1382**, 23-37.
- Pottosin I., Velarde-Buendía A. M., Bose J., Zepeda-Jazo I., Shabala S., Dobrovinskaya O. (2014): Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane: implications for plant adaptive responses. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1271-1283.
- Puppo A., Pauly N., Boscari A., Mandon K., Brouquisse R. (2013): Hydrogen peroxide and nitric oxide: Key regulators of the legume – Rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxidants & Redox Signalling* **18**, 2202-2219.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W. M. (2002): Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* **53**, 103-110.
- Rümer S., Kapuganti J. G., Kaiser W.M. (2009): Oxidation of hydroxylamines to NO by plant cells. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 853-855.
- Santhanam L., Lim H. K., Lim H. K., Miriel V., Brown T., Patel M., Balanson S., Ryoo S., Anderson M., Irani K., Khanday F., Di Constanzo L., Nyhan D., Hare J. M., Christianson D. W., Rivers R., Shoukas A., Berkowitz D. E. (2007): Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circulation Research* **101**, 692-702.
- Sayas E., Pérez-Benavente B., Manzano C., Farras R., Alejandro S., Del Pozo J. C., Ferrando A., Serrano R. (2019): Polyamines interfere with protein ubiquitylation and

- Sayas, E., Perez-Benavente, B., Manzano, C., Farras, R., Alejandro, S., Del Pozo, J. C., Ferrando A., Serrano R. (2019): Polyamines interfere with protein ubiquitylation and cause depletion of intracellular amino acids: a possible mechanism for cell growth inhibition. *FEBS Letters* **593**, 209–218.
- Sekowska A., Danchin A., Risler J. L. (2000): Phylogeny of related functions: the case of polyamine biosynthetic enzymes. *Microbiology UK* **146**, 1815-1828.
- Seligman K., Saviani E. E., Oliveira H. C., Pinto-Maglio C. A., Salgado I. (2008): Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant & Cell Physiology* **49**, 1112-1121.
- She M., Wang J., Wang X., Yin G., Wang K., Du L., Ye X. (2017): Comprehensive molecular analysis of arginase-encoding genes in common wheat and its progenitor species. *Scientific Reports* **7**, doi: 10.1038/s41598-017-07084-0.
- Shi H., Ye T., Chen F., Cheng Z., Wang Y., Pingfang Y., Zhang, Y., Chan Z. (2013): Manipulation of arginase expression modulates abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*: effect on arginine metabolism and ROS accumulation. *Journal of experimental botany* **64**, 1367-1379.
- Shi K., Li X., Zhang H., Zhang G., Liu Y., Zhou Y., Xia X., Chen Z., Yu J. (2015a): Guard cells hydrogen peroxide and nitric oxide mediate elevated CO₂ -induced stomatal movement in tomato. *New Phytologist* **208**, 342-353.
- Shi Y., Liu J., Xin N., Gu R., Qin Zhu L., Zhang C., Wang Q. C., Lei Z. H., Liu Y. Y., Ren J. Y. (2015b): Signals induced by exogenous nitric oxide and their role in controlling brown rot disease caused by *Monilinia fructicola* in postharvest peach fruit. *Plant Pathology* **81**, 68-76.
- Schimke R. T. (1970): Arginase (rat liver). *Methods in Enzymology* **17**, 313-317.
- Sobieszczuk-Nowicka E. (2017): Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. *Amino acids* **49**, 49-56.
- Sobieszczuk-Nowicka, E., Kubala, S., Zmienko, A., Malecka, A., and Legocka, J. (2015). From accumulation to degradation: reprogramming polyamine metabolism facilitates dark-induced senescence in barley leaf cells. *Frontiers in Plant Science* **1198**, doi: 10.3389/fpls.2015.01198.
- Splitstoeser W. E. (1969): Metabolism of arginine by aging and 7 day old pumpkin seedling. *Plant physiology* **44**, 361-366.
- Stöhr C., Stremelau S. (2006): Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* **57**, 463-470.
- Stöhr Ch., Ullrich W. R. (2002): Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2293-2303.
- Šírová J., Sedlářová M., Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2011): The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Science* **181**, 560-572.
- Takano A., Kakeki J.-I., Takahashi T. (2012): Thermospermine is not a minor polyamine in the plant kingdom. *Plant & Cell Physiology* **53**, 606-616.
- Todd Ch. D., Cooke J. E. K., Mullen R. T., Gifford D. J. (2001): Regulation of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) arginase in developing seedling tissue during germination and post-germinative growth. *Plant Molecular Biology* **45**, 555-565.
- Tsaniklidis G., Kotsiras A., Tsafouros A., Roussos P. A., Aivalakis G., Katinakis P., Delis C. (2016): Spatial and temporal distribution and temporal distribution of genes involved in polyamine metabolism during tomato fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry* **100**, 27-36.
- Tsaniklidis, G., Kotsiras, A., Tsafouros, A., Roussos, P. A., Aivalakis, G., Katinakis, P., Delis C. (2016): Spatial and temporal distribution of genes involved in polyamine metabolism during tomato fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry* **100**, 27–36.
- Tun N. N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E. I., Scherer G. F. (2006): Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology* **47**, 346–354.
- Unité de Recherche Génomique INRA: <https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Pisum/Pea-Genome-project> (24. 4. 2020).

- Wang P., Zhu J. K., Lang Z. (2015): Nitric oxide suppresses the inhibitory effect of abscisic acid on seed germination by S-nitrosylation of SnRK2 proteins. *Plant Signalling & Behaviour* **10**, e1031939. doi: 10.1080/15592324.2015.1031939.
- Weiner H., Kaiser W. M. (2001): Antibodies to assess phosphorylation of spinach leaf nitrate reductase on serine 543 and its binding to 14-3-3 proteins. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1165-1172.
- Wright L. C., Brady C. J., Hinde R. W. (1981): Purification and properties of the arginase from Jerusalem artichoke tubers. *Phytochemistry* **20**, 2641-2645.
- Xie Y., Mao Y., Lai D., Zhang W., Zheng T., Shen W. (2013): Roles of NIA/NR/NOA1-dependent nitric oxide production and HY1 expression in the modulation of Arabidopsis salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*. **64**, 3045-3060.
- Yamasaki H. (2000): Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **355**, 1477-1488.
- Zhang X., Shen L., Li F., Meng D., Sheng J. (2013): Hot air treatment-induced arginine catabolism is associated with elevated polyamines and proline levels and alleviates chilling injury in postharvest tomato fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**, 3245-3251.
- Zhang X., Li F., Ji N., Shao S., Wang D. (2016): Involvement of arginase in methyl-jasmonate induced tomato fruit chilling tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **141**, 139-145.
- Zhang X., Shen L., Li F., Zhang Y., Meng D., Sheng J. (2010): Up-regulating arginase contributes to amelioration of chilling stress and the antioxidant system in cherry tomato fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 2195-2202.
- Zhao M. G., Chen L., Zhang L. L., Zhang W. H. (2009): Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology* **151**, 755-767.
- Zonia L. E., Stebbins N. E., Polacco J. C. (1995): Essential role of urease in germination of nitrogen-limited Arabidopsis thaliana seeds. *Plant physiology* **107**, 1097-1103.

8 SEZNAM ZKRATEK

AA/BIS	Akrylamid/bisakrylamid
ADC	Arginindekarboxylasa,
AdoMetDC	S-adenosylmethionindekarboxylasa,
AIH	Agmatiniminohydrolasa,
APS	Persíran amonný
ARG	Arginasa
AtARGAH1	Isoenzym 1 arginasy z <i>A. thaliana</i>
AtARGAH2	Isoenzym 2 arginasy z <i>A. thaliana</i>
AtNOA	Protein spojený s oxidem dusnatým z <i>A. thaliana</i>
AtNOS1	Domnělá NO synthasa z <i>A. thaliana</i>
BSA	Hovězí sérový albumin
CPA	N-karbamoylputrescinaminohydrolasa,
DAO	Diaminoxidasa
ETC	Elektrontransportní řetězec
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GDH	Glutamátdehydrogenasa
GSNO	S-nitrosoglutathion
HEPES	Kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
kDa	Kilodalton
KKPA	Kovalentně konjugované polyaminy
LeARG1	Isoenzym 1 arginasy z rajčete
LeARG2	Isoenzym 2 arginasy z rajčete
MES	Kyselina 2-(N-morfolino)ehtansulfonová
MTA	Methylthioadenosin,
Ni:NOR	Nitritreduktasa
Ni-NR	Nitritreduktasová aktivita nitrátreduktasy
NKKPA	Nekovalentně konjugované polyaminy
NO	Oxid dusnatý
NOHA	Nw-hydroxy-arginin
NOS	Synthasa oxidu dusnatého
NOS-like	enzym podobný NO synthase

NR	Nitrátreduktasa
ODC	Ornithindekarboxylasa
OsARG	Arginasa z rýže
PA	Polyaminy
PAH	Proklavaminátamidinohydrolasy
PAO	Polyaminoxidasy
PUT	Putrescin
SPD	Spermidin
SPDS	Spermidinsynthasa
SPM	Spermin
SPMS	Sperminsynthasa
TEMED	
TPSMS	Thermosperminsynthasa
TSPM	Thermospermin
TSPMS/ACL5	Acaulis5 (označení rostlinného genu pro thermosperminsynthasu)
v/v	Objem na objem
VPA	Volné polyaminy
w/v	Hmotnost na objem
WT	Wild type (divoký typ)
XDH	Xanthindehydrogenasa
XOD	Xanthinoxidasa
XOR	Xanthinoxidoreduktasa
ZmARG	Arginasa z kukuřice