

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium úlohy arginasy při klíčení semen rostlin**

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Nicole Šmídová**  
Studijní program: R19278 Biochemie  
Studijní obor: Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **prof. Mgr. Marek PETŘIVALSKÝ, Dr.**  
Rok: : 2023

### **Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Olomouci dne: 31. 7. 2023

Nicole Šmídová

**Poděkování:**

Děkuji prof. Petřivalskému, vedoucímu bakalářské práce, za odborné vedení a poskytnutí cenných rad a materiálních podkladů a věcné připomínky v průběhu psaní práce. V neposlední řadě také za ochotu, vstřícnost a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům katedry biochemie za ochotu a vstřícnost při provádění výzkumu v biochemické laboratoři Univerzity Palackého.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Nicole Šmídová
Název práce	Studium úlohy arginasy při klíčení semen rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2023

### Abstrakt

Arginasa je manganoenzym, který katalyzuje hydrolytický rozklad L-argininu na ornithin a močovinu. U rostlin bylo zjištěno, že hraje důležitou roli např. při klíčení rostlin, vývoji a dozrání plodů. Arginasa v souvislosti s metabolismem polyaminů jako důležitých stresových regulátorů je zapojena také do rostlinných odpovědí na různé stresové podmínky.

Klíčová slova	Arginasa, polyaminy, <i>Pisum sativum</i> cv. Abarth
Počet stran	44
Počet příloh	0
Jazyk	Český



## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Nicole Šmídová
Title	Role of arginase in plant seed germination
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr
The year of presentation	2023

### Abstract

Arginase is a manganese enzyme, that catalyzes the hydrolytic breakdown of L-arginine into ornithine and urea. In plants, it was found, that it plays an important role, for example in plant germination, development and ripening of fruits. Arginase in connection with the metabolism of polyamines as important stress regulators is also involved in plant responses to various stress conditions.

Keywords	Arginase, polyamins, <i>Pisum sativum</i> cv. Abarth
Number of pages	44
Number of appendices	0
Language	Czech

# Obsah

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>11</b>
2.1 Arginasa.....	11
2.2 Rostlinné arginasy vs. živočišné (nerostlinné) arginasy.....	12
2.3 Struktura rostlinných arginas.....	15
2.4 Rostlinné arginasy .....	16
2.4.1 Porovnání struktur .....	16
2.4.2 Geny .....	17
2.4.3 Sekvenční zarovnání rostlinných arginas .....	18
2.5 Biochemické vlastnosti rostlinných arginas .....	18
2.5.1 Vliv dvoumocných kationtů na biochemické vlastnosti.....	19
2.5.2 Arginin jako prekurzor .....	20
2.5.3 Další vlastnosti rostlinných arginas.....	21
2.6 Obranný mechanismus rostlin .....	22
2.6.1 Oxid dusnatý.....	23
2.6.2 Úloha arginasy při abiotickém stresu .....	26
2.6.3 Úloha arginasy při biotickém stresu .....	27
2.7 Arginasa a vývoj rostlin.....	27
2.8 Arginasa a její vliv na výnos rostlin .....	28
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>29</b>
3.1 Seznam přístrojů a pomůcek .....	29
3.2 Seznam chemikálií.....	29
3.3 Biologický materiál .....	29
3.3.1 Zpracování materiálu pro izolaci mitochondriálního podílu .....	30
3.3.2 Izolace mitochondriální frakce .....	32
3.4 Stanovení aktivity arginasy .....	32
3.4.1 Stanovení aktivity arginasy za stresových podmínek.....	33

<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>34</b>
4.1 Stanovení aktivity arginasy .....	34
4.2 Stanovení aktivity arginasy za stresových podmínek.....	37
4.2.1 Inhibice L-prolinem .....	37
4.2.2 Sůl jako abiotický stresor .....	37
4.2.3 Porovnání výsledků z prvního a druhého experimentu .....	38
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>39</b>
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>40</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>41</b>
<b>8. ZRATKY .....</b>	<b>44</b>

*CÍLE PRÁCE:*

- Vypracovat literární rešerši shrnující dostupné poznatky o enzymu arginase, její úloze v metabolismu dusíkatých látek u rostlin, se zaměřením na funkci arginasy v metabolismu polyaminů během klíčení rostlin
- Optimalizace spektrofotometrických metod stanovení aktivity arginasy
- Studium změn aktivity arginasy při klíčení semen hrachu za normálních a stresových podmínek, částečná purifikace enzymu a charakterizace jeho enzymových vlastností

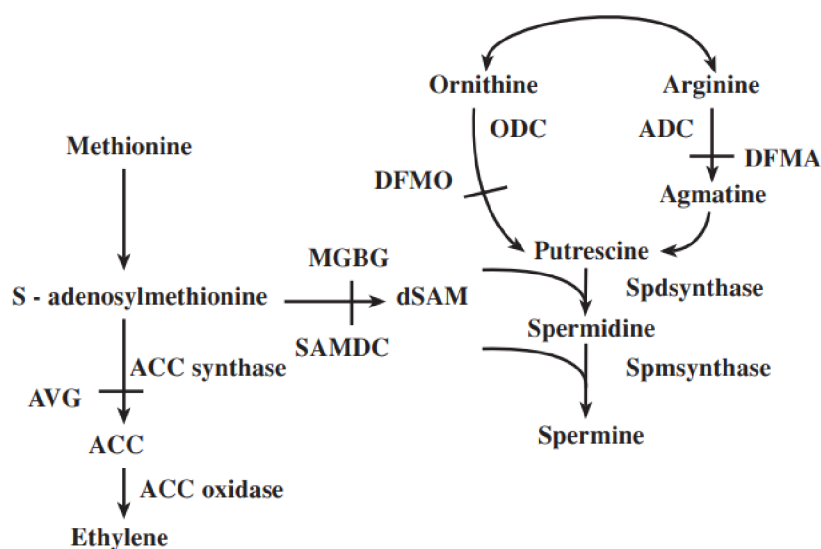
# 1. ÚVOD

Polyaminy jsou molekuly s více než jednou aminoskupinou a mají nízkou molekulovou hmotnost. Nalézají se ve všech živých organismech (Cohen, 1998). V přírodě se vyskytují buď ve formě volné, anebo se vážou na nízkomolekulární látky (proteiny, nukleové kyseliny) či na fenolické sloučeniny. Mezi nejznámější polyaminy patří diamin putrescin (Put), triamin spermidin (Spd) nebo tetraamin spermin (Spm).

Hrají velmi důležitou roli při růstu a vývoji prokaryot i eukaryot. Jejich biologická aktivita je přisuzována jejich kationtové povaze. Polyaminy jako takové stimulují replikaci, transkripci a translaci DNA. Dále se zapojují do širokého spektra biologických procesů v růstu a vývoji rostlin, včetně

stárnutí, environmentálního stresu a infekcemi houbami a viry. Některé z důležitých pozorování naznačují, že polyaminy mohou způsobovat stabilizaci membrány, zachycují volné radikály, ovlivňují nukleové kyseliny a syntézu proteinů, RNAsy, proteasy a další enzymové aktivity a interakce s hormony, fytochromy a biosyntézu ethylenu (*přehled v Slocum a kol., 1984; Galston a Tiburcio, 1991*). Kvůli těmto četným biologickým interakcím PA v rostlinných systémech bylo obtížné určit jejich přesnou roli v růstu a vývoji rostlin. V posledních letech však vyšetřování do molekulární genetiky rostlinných PA vedlo k izolaci řady genů kódujících enzymy biosyntézy PA a vývoj protilátek proti některým genům.

Stručný popis biosyntézy je popsán na Obrázku 1. Polyaminy jsou syntetizovány z argininu a ornithinu arginasou, argininem dekarboxylasou (ADC) a ornitindekarboxylasou (ODC), meziproduct agmatin, jenž je syntetizován z argininu, je přeměněn na Put, který se dále transformuje na Spd a Spm pomocí postupných transportů aminopropylových skupin z dekarboxylovaného S-adenosylmethioninu (dSAM), který je katalyzován specifickými synthasami Spd a Spm. Aminopropylové skupiny jsou odvozeny od methioninu, který se nejprve přeměňuje na S-adenosylmethionin (SAM) a poté je v reakci dekarboxylován pomocí SAM dekarboxylasy (SAMDC). Výsledný dekarboxylovaný SAM se používá jako aminopropylový donor. SAM je společným předchůdcem jak polyaminů, tak ethylenu a SAMDC reguluje obě biosyntetické dráhy, jak je také znázorněno na Obrázku 1.



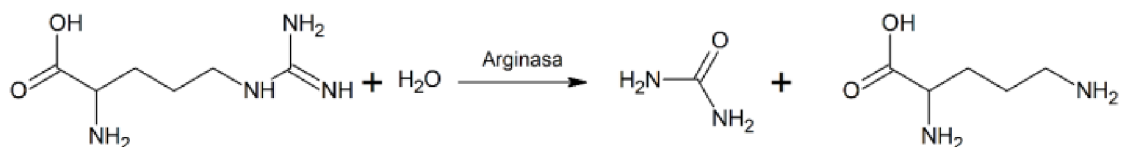
Obrázek 1 Biosyntéza polyaminů

Mnoho vědců také zkoumá inhibitory polyaminů za účelem stanovení jejich rolí v různých rostlinných procesech. Mezi čtyři běžně používané inhibitory syntézy polyaminů patří Difluormethylornithin (DFMO), nevratný inhibitor ODC (*přehled v Bey et al., 1987*). Druhým inhibitorem je Difluormethylarginin (DFMA), nevratný inhibitor ADC, dále Methylglyoxyl-bisguanylhydrazon (MGBG), konkurenční inhibitor S-adenosyl-methionin dekarboxylasy (SAMDC) a čtvrtým je Cyklohexylamin (CHA), konkurenční inhibitor spermidin synthasy. Mezi běžné oxidázy se řadí diaminoxidasa a polyaminoxidasa (PAO). Bylo zjištěno, že každý polyamin je katabolizován specifickou oxidasou.

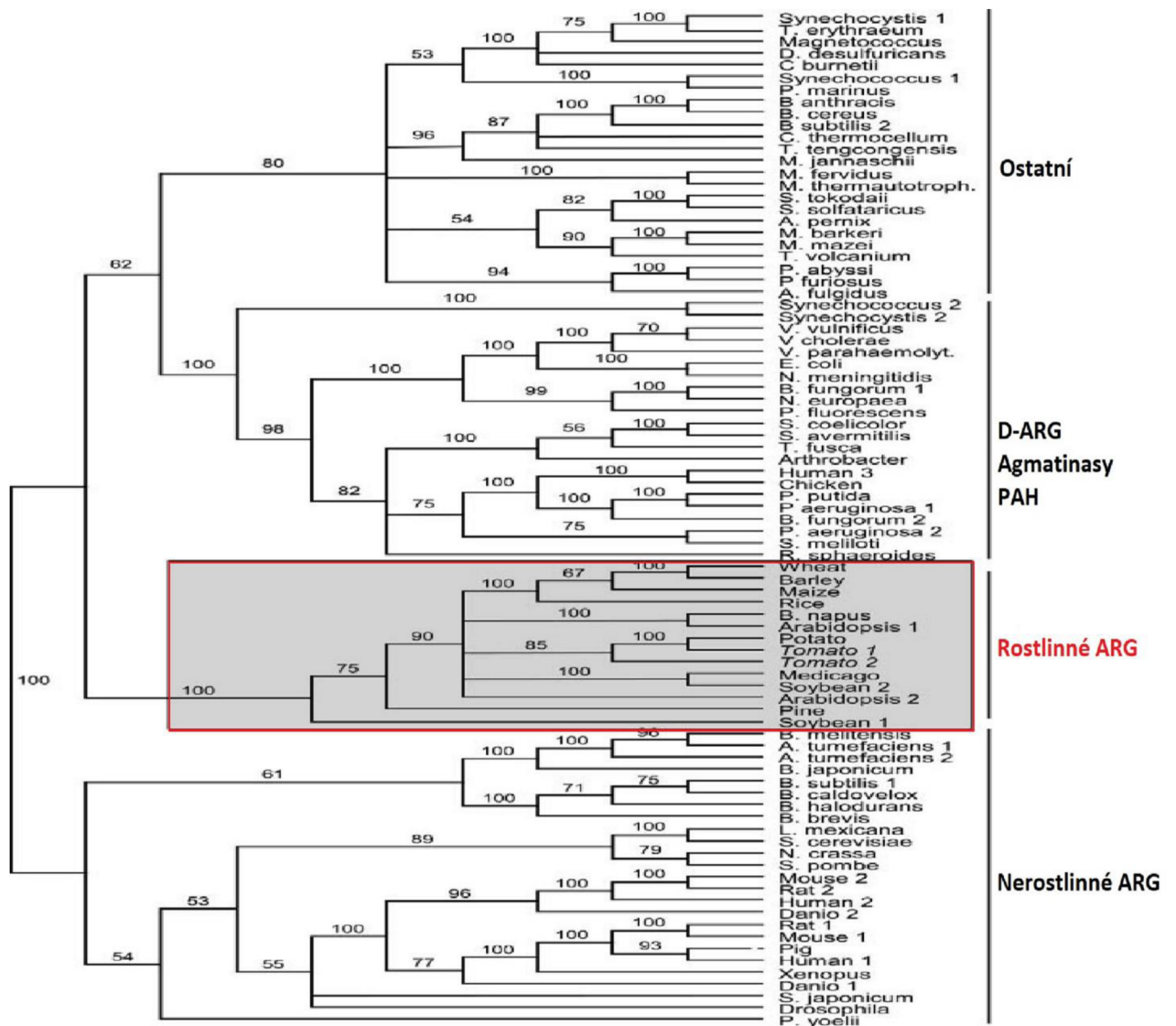
## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Arginasa

L-arginasa (L-argininamidinohydroláza, ARGAH, EC 3.5.3.1, dále také jako ARG) je enzym, který se nachází v celém evolučním spektru v rozmanitých organismech, jako jsou bakterie, kvasinky, rostliny, bezobratlí a obratlovci (Wu a Morris, 1998; Cederbaum et al., 2004). Tento enzym přeměňuje v hydrolytické reakci závislé na manganu L-arginin na neproteinovou aminokyselinu L-ornithin a močovinu, která je následnou hydrolyzou přeměněna na oxid uhličitý a amoniak. Tato reakce je zobrazena na Obrázku 2. Jsou známy 2 isoformy arginasy, arginasa I a arginasa II. Arginasa má jako hlavní úkol mobilizovat uložený arginin během klíčení semen rostlin a poskytovat zdroje dusíku a uhlíku pro syntézu dalších aminokyselin a polyaminů během vývoje a zvládnání stresu (*Spittstoesser, 1969; Kolloffel a van Dijke, 1975; de Ruiter a Kolloffel, 1983; Micallef a Shelp, 1989; King a Gifford, 1997; Winter a kol., 2015*). Jak je již napsáno v úvodu, je arginin v rostlinách metabolizován třemi různými enzymy, mezi nimiž je právě i popisovaná ARG. ARG je rozdělena do 4 skupin, a to díky sestavení fylogenetického stromu ARG, který byl sestaven pomocí srovnání aminokyselinových sekvencí 85 amidinohydrolas z různorodých organismů (Chen *et al.*, 2004). První skupinou jsou rostlinné ARG, do druhé skupiny patří ARG bakterií, hub a obratlovců. Agmatinasy a enzymy podobné agmatinase se řadí do třetí skupiny a poslední skupina patří hypotetickým ARG, které jsou podobné proteinům z eubakterií a archéí.



Obrázek 2 Reakce katalyzovaná arginásou



Obrázek 3 Fylogenetický strom 85 amidinohydrolas, PAH – prokavaminátamidinohydrolasy. (Přepřacováno podle Chen *et al.*, 2004)

## 2.2 Rostlinné arginasy vs. živočišné (nerostlinné) arginasy

Tento enzym je v přírodě všudypřítomný, přesto se jeho úloha u různých organismů odlišuje. U savcí ARG je hlavní rolí eliminovat toxický amoniakální dusík, a to prostřednictvím cyklu močoviny (Visek, 1979; Caldwell *et al.*, 2018). U rostlin je tomu jinak. Pomocí kombinovaného působení ARG a ureasy neprovádějí detoxikační proces, ale místo toho si dusík zachovávají (Sirko a Brodzik, 1999; Shi a Chan, 2013 Zhang *et al.*, 2014; Winter *et al.*, 2015). Lokalizace enzymu je dalším významným rozdílem mezi živočišnou a rostlinnou ARG. ARG I se u zvířat nachází v cytosolu, kdežto isoforma II je lokalizována v mitochondriích (Ratner, 1973; Miyanaka *et al.*, 1998; Munder, 2009; Dzik, 2014). Některé dřívější výzkumy naznačují přítomnost isoformy I i II v mitochondriích (Kolloffel a van



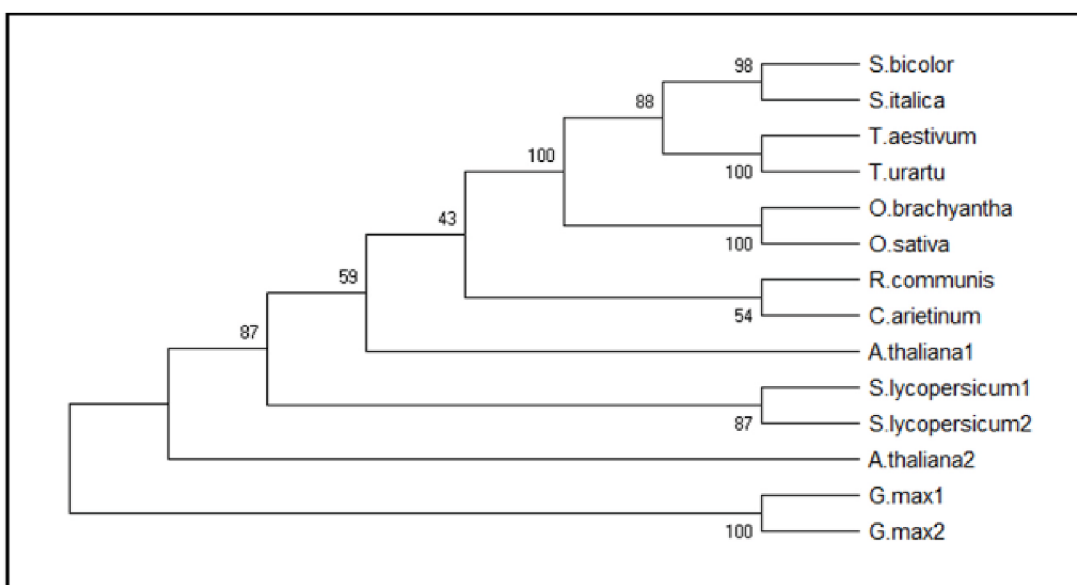
Dijke, 1975; Goldraj a Polacco, 2000; Flores *et al.*, 2008). Přítomnost mitochondriálního cílového peptidu na N-terminálním konci proteinu byla odhalena pomocí fylogenetické analýzy enzymů rodiny ARG (Goldraj a Polacco, 2000; Flores *et al.*, 2008). V poslední době She a jeho kolektiv provedl analýzu subcelulárních signálů 43 genů ARG a dokázali výskyt mitochondriální cílové signální sekvence u většiny vybraných arginasových sekvencí (She *et al.*, 2017). Avšak zhruba třetina z vybraných rostlinných ARG postrádala mitochondriální cílové signály, což mohlo být zapříčiněno neúplným N-koncem sekvence. V rozporu s tím, Patel a jeho kolektiv nedávno dokázal přítomnost ARG2 (jeden z genů pro ARG) v chloroplastech (Tabulka 1). Na podporu tohoto výzkumu prokázaly další dvě studie z *Arabidopsis* přítomnost ARG v chloroplastech (Kleffmann *et al.*, 2004; Helm *et al.*, 2014). Další významný rozdíl je role rostlinné a živočišné ARG při syntéze putrescinu a dalších polyaminů. U živočišné ARG je biosyntéza polyaminů závislá na dráze ornithin dekarboxylasy (ODC), kdy ARG katalyzuje reakci přeměny argininu na ornithin a močovinu. Ornithin je následně přeměněn na putrescin (Coleman *et al.*, 2004; Hoyt a Davis, 2004; Pegg 2009, 2016; Valdés-Santiago a Ruiz-Herrera, 2014). Biosyntéza polyaminů u rostlin se člení na dvě cesty, jmenovitě cesta ADC a ODC (Martin-Tanguy, 2001; Jiménez-Bremont a kol., 2014; Liu a kol., 2015; Chen a kol., 2019). Některé rostliny, např. rajče (*Solanum lycopersicum*) „používají“ obě cesty k biosyntéze polyaminů, avšak je zajímavé, že některé rostliny, jako např. *Arabidopsis thaliana*, postrádají gen ODC a jsou zcela závislé na dráze ADC pro biosyntézu (Hanfrey *et al.*, 2001). Při biosyntéze pomocí ODC se přeměňuje ornithin přímo na putrescin. V případě druhé cesty, prostřednictvím ADC, probíhá reakce, kdy ADC štěpí arginin na agmatin, který je dále metabolizován na putrescin díky dvěma různým cestám. První cesta obsahuje přímou konverzi agmatinu na putrescin pomocí enzymu agmatinasy (AGMAT) (Patel *et al.*, 2017). Druhá cesta zahrnuje složitější dvoustupňový proces za přítomnosti N-karbamoylputrescin hydrolasy (NCPH) a agmatin iminohydrolasy (AIH) (Liu *et al.*, 2015).

Tabulka 1 Porovnání různých vlastností rostlinných a živočišných arginas (přeloženo a přepracováno podle *Plant Physiology and Biochemistry* 156 (2020) 600–610, *What we know about plant arginases?*; Shiva Siddappa a, Gopal Kedihithlu Marath); L-NOHA: No-hydroxy-arginin

Funkce	Rostlinné arginasy	Živočišné arginasy
Počet isoform a jejich subcelulární lokalizace	Dvě isoformy (I A II), obě v mitochondriích, typ II také v chloroplastech	Dvě isoformy (I A II), typ I v cytosolu, typ II v mitochondriích
Cesta biosyntézy polyaminů	ODC a ADC cesta, možná také cesta pomocí agmatinasy	Převážně ODC cesta
Osud močoviny	Recyklace	Vylučování
Osud ornithinu	Použití pro syntézu prolinu, glutamátu a polyaminů	Použití pro syntézu prolinu, glutamátu a polyaminů
Velikost arginasy [kDa]	36-37 kDa a 50-60 kDa	Obvykle 34-38 kDa
Organizace podjednotek	Tetramer až dekamer, nikdy trimer	Trimer
Požadavek $Mn^{2+}$ pro katalýzu	Ano	Ano
Schopnost jiných dvojmocných kovových iontů nahradit $Mn^{2+}$	Částečně	Částečně
Typ inhibice L-NOHA	Konkurenční inhibice	Konkurenční inhibice

### 2.3 Struktura rostlinných arginas

Ve své struktuře vytvářejí rostlinné ARG monofyletický shluk, kterým se zřetelně rozlišují od živočišných arginas a dalších příslušníků superrodiny arginas (Chen *et al.*, 2004). Monofyletismus obecně znamená stav skupiny, který zahrnuje příslušníky jedné fylogenetické linie. Jednoděložné ARG jsou evolučně konzervovanější oproti dvouděložným ARG (She *et al.*, 2017). Jedna z fylogenetických analýz odhalila, že rostlinné sekvence ARG jsou více příbuzné s agmatinasou než s živočišnými ARG (Perozich *et al.*, 1998; Sekowska *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004). Další fylogenetická analýza nastiňuje nezávislou duplikaci genů ARGAH1 a ARGAH2 z *Arabidopsis* ARG z jiných rostlinných ARG (Obrázek 4) (Brownfield *et al.*, 2008). V nedávné době se podařilo objasnit krystalovou strukturu ARG ze dvou modelových rostlin, *Arabidopsis thaliana* (AtARGAH1) a *Medicago truncatula* (MtARGAH) (Sekula, 2020). V krystalové struktuře se ukázalo, že rostlinné ARG jako hexamery jsou tvořeny dvojicí tří podjednotek (Sekula, 2020). Interakce podjednotky z prvního tripletu probíhá pouze s jednou z podjednotek druhého tripletu. U rostlinné ARG je dalším významným znakem přítomnost vyčnívající smyčky, která tvoří aktivní místo pro vstup sousední podjednotky v oligomeru. Ve smyčce ARGAH se vyskytuje odlišná oblast, která obsahuje zbytky aktivního místa. Toto rozdílné místo je zachováno mezi všemi rostlinnými ARG. Na Obrázku 5 jsou zobrazeny aminokyselinové zbytky, které se účastní budování vazebného místa pro substrát, vazby  $Mn^{2+}$  a tvorby vodíkových vazeb se substrátem mezi rostlinnými ARG.



Obrázek 4 Fylogenetický strom

A.thaliana1	-----MS--RIIGRKGINYIHLNLSASFT---SVSASSIEKGNRVIDASLTLIRE	46
A.thaliana2	-----MnkIGQGVYFYFQRLIAAFPFTLRLSLPTSLVETGQNRVIDASLTLIRE	48
S.lycopersicum1	-----M--RSAGRMGIHYMQLHAS-----NVFKELVEKGNRVIDEASLTLIRE	42
S.lycopersicum2	-----M--KSAGSMGINYMQKLLTS-----NVFKEVVKRQQRVVEASLTLIRE	42
G.max1	MSFLRSFARNKDISKVGRRGIIHMCQKLCAE-----KISPSDSLEKQNRVIDAALTTLIRE	54
G.max2	MSFLRSFARNKDISKVGRRGIIHMCQKLCAE-----KISPSDSLEKQNRVIDAALTTLIRE	54
R.communis	-----M--TVIGRRGTHYLQKLA-----NIPAELEKQNRVIDASLTLIRE	42
C.arietinum	-----M--STIARRGIIHYVQLNAA-----NVSSALLEKQQRVIDASLTLIRE	42
S.bicolor	-----MGGAAAGTKIWHIHFRLSAA-----KVS TEAVERGQSRVIDASLTLIRE	44
O.brachyantha	-----MGGVAAGTRNIIHVFRLSAA-----KVSADALERGQSRVIDASLTLIRE	44
O.sativa	-----MGGVAAGTRNIIHVFRLSAA-----KVS TDALERGQSRVIDASLTLIRE	44
S.italica	-----MGGAAATGAARWIRLSAA-----RISTEALERGQSRVIDASLTLIRE	44
T.aestivum	-----MGGAAATGAARWIRLSAA-----RISTEALERGQSRVIDASLTLIRE	44
T.urartu	-----MGGAAATGAARWIRLSAA-----RISTEALERGQSRVIDASLTLIRE	45
A.thaliana1	RAKLLKGLVRLIGGAKASTSLGVPFLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	106
A.thaliana2	RAKLLKGLVRLIGGAKASTSLGVPFLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	108
S.lycopersicum1	RAKLLKGLVRLIGGAVASTSLGVPFLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	102
S.lycopersicum2	RAKLLKGLVRLIGGAVASTSLGVPFLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	102
G.max1	NTGLRKNLCHSLGGAVASTSLGVPFLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	114
G.max2	NTRLKELVHSLGGAVASTSLGVPFLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	114
R.communis	RAKLLKGLVRLIGGAKASTSLGVPFLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	102
C.arietinum	RAKLLKGLVRLIGGAVASTSLGVPFLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	102
S.bicolor	DLKDLRIHVDVGDIPIQEMRDGIGDERLHMVVSQSVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	174
O.brachyantha	RAKLKAELLRALGGVKASACL LGVPLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	104
O.sativa	RAKLKAELLRALGGVKASACL LGVPLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	104
S.italica	RAKLKAELLRALGGVKASACL LGVPLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	104
T.aestivum	RAKLLKGLVRLIGGAVASTSLGVPFLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	104
T.urartu	RAKLLKGLVRLIGGAVASTSLGVPFLGHNSFLLQGFAPFAPPRIREAIIWCGSTNSSTTEEGK	105
A.thaliana1	ELKDPVRLTDVGDVFPVQEIIRDCGVDDDRLMNVVISESVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	166
A.thaliana2	ELKDPVRLTDVGDVFPVQEIIRDCGVDDDRLMNVVISESVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	168
S.lycopersicum1	ELDDPRILT DVGDPVQELRDAGVDLMSIISESVKLVMEENPLRPLVLGGDHSISYP	162
S.lycopersicum2	ELDDQVRLTDVGDVFPVQELRDTGDDDRLMSTVISESVKLVMEENPLRPLVLGGDHSISYP	162
G.max1	DLKDLRIHVDVGDIPIQEMRDGIGDERLHMVVSQSVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	174
G.max2	DLKDLRIHVDVGDIPIQEMRDGIGDERLHMVVSQSVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	174
R.communis	ELNDPVRILT DVGDPVQEIIRDCGVDDDRLMNVVISESVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	162
C.arietinum	DLQDARVLT DVGDPVQEIIRDCGVDDDRLMNVVISESVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	162
S.bicolor	ELNDPVRILT DVGDPVQEIIRDCGVDDDRLMNVVISESVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	164
O.brachyantha	ELNDPVRILT DVGDPVQEIIRDCGVDDDRLMNVVISESVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	164
O.sativa	ELNDPVRILT DVGDPVQEIIRDCGVDDDRLMNVVISESVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	164
S.italica	ELNDPVRILT DVGDPVQEIIRDCGVDDDRLMNVVISESVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	164
T.aestivum	ELNDPVRILT DVGDPVQEIIRDCGVDDDRLMNVVISESVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	164
T.urartu	ELNDPVRILT DVGDPVQEIIRDCGVDDDRLMNVVISESVKLVMEEDPLRPLVLGGDHSISYP	165
A.thaliana1	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	226
A.thaliana2	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	228
S.lycopersicum1	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	222
S.lycopersicum2	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	222
G.max1	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	234
G.max2	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	234
R.communis	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	222
C.arietinum	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	222
S.bicolor	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	224
O.brachyantha	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	224
O.sativa	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	224
S.italica	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	224
T.aestivum	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	224
T.urartu	VVRVAVSEKLGPPVDILHLDAHPDIYDFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGRSIN	225
A.thaliana1	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	286
A.thaliana2	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	288
S.lycopersicum1	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	282
S.lycopersicum2	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	282
G.max1	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	294
G.max2	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	294
R.communis	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	282
C.arietinum	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	282
S.bicolor	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	284
O.brachyantha	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	284
O.sativa	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	284
S.italica	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	284
T.aestivum	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	284
T.urartu	QEGREQKRFQVGEQYEMRTFSKDRPMLLENLKLGGVKG VYISIDVDCLDPAFAPGVSHIE	285
A.thaliana1	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	342
A.thaliana2	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	344
S.lycopersicum1	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	338
S.lycopersicum2	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	338
G.max1	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	350
G.max2	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	350
R.communis	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	338
C.arietinum	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	338
S.bicolor	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	340
O.brachyantha	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	340
O.sativa	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	340
S.italica	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	340
T.aestivum	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	340
T.urartu	PGGLSFRDVLNIIHLNLQGDVVAADVVEFNQPRDITVDGMTAMVAAKLVRELAAKISK	341

Obrázek 5 Červené hvězdy označují zbytky, které se podílejí jak na konstrukci vazebného místa substrátu, tak na interakcích vodíkových vazeb se substrátem. Modrá hvězda označuje zbytky, které vytvářejí vazebné místo substrátu. Červené kroužky označují zbytky, které se podílejí jak na tvorbě vodíkové vazby se substrátem, tak na koordinaci  $Mn^{2+}$ . Modré kroužky znázorňují zbytky, které se účastní pouze koordinace  $Mn^{2+}$ . (Převzato od Sidsappa et al., 2020)

## 2.4 Rostlinné arginasy

### 2.4.1 Porovnání struktur

Arginasy z různých rostlin se vyznačují odlišnými velikostmi monomerů a homooligomerů. ARG ze ženšenu (*Panax ginseng*) (Hwang et al., 2001), s podjednotkovou molekulovou hmotností 34,5 kDa, má tvar dekameru. ARG vyskytující se v sójových bobech (*Glycine max*) (Kang a Cho, 1990) je homotetramer a molekulová hmotnost podjednotek je 60 kDa.



Homotetramer je také strukturálním tvarem u borovice loblolly (*Pinus taeda*) (Todd *et al.*, 2001(a)) a vigny (*Vigna catjang*) (Dabir *et al.*, 2005). Posledním příkladem je ARG z cibulí kosatce (*Iris hollandica*), která je homohexamer (Boutin, 1982).

#### 2.4.2 Geny

Arginasy jsou buď tvořeny z homooligomerů nebo z heterooligomerů (Winter *et al.*, 2015). Díky nedávným studiím o expresi genu ARG bylo získáno více informací ohledně tvorby heterooligomerů. Navazující studie dokázala indukci genu ARGAH2 po léčbě methyljasmonátem, což znamená, že tyto geny – paralogy (vzniklé zdvojením genu v rámci jednoho genomu) jsou funkčně odlišné.

Funkční diverzitu mezi isoformami potvrdila nedávná studie, kdy She a jeho kolektiv dokázal u pšenice (*Triticum aestivum*) indukci různých isoform ARG při různorodém zatížení (She *et al.*, 2017). Po infekci plísní a suchem byly indukovány obě isoformy ARG, Ta-ARG-2BS a Ta-ARG-2DS. Zatímco stresové podmínky způsobené solí způsobily indukci pouze Ta-ARG-2BS. Dalším příkladem, kdy byl posílen koncept tvorby smíšených oligomerů, byla studie isoform ARG rajčete (*Solanum lycopersicum*). Slabší exprese LeARG1 a LeARG2 se vyskytovala v malých zelených plodech, nezralých květních poupatech a v zralých otevřených květech rajčete. Silná exprese těchto genů byla pozorována pouze ve zralých otevřených květech rajčete. Následkem poranění a ošetření methyljasmonátem probíhá exprimace LeARG1 prioritně v kořenech, zatímco LeARG2 exprimuje v listech, což ukazuje na rozdílné funkce dvou ARG (Chen *et al.*, 2004). Methyljasmonát je těkavá organická sloučenina, kterou rostliny vylučují v obranném mechanismu při biotickém či abiotickém stresu. Dále byla provedena fylogenetická analýza mezi geny ARG exprimovanými v jednoděložných a dvouděložných rostlinách. Oproti jednoděložným ARG byla u dvouděložných ARG dokázána přítomnost 3 kladů<sup>1</sup> a 6 podrodin, což dokazuje, že geny dvouděložných rostlin se více rozšířily a mají různorodé funkce (She *et al.*, 2017).

Díky těmto různým interakcím obou isoform byla potvrzena tvorba homo a heterooligomerů, a právě proto jsou nutné pro odhalení funkcí genů pro ARG další hlubší výzkumy. Je možné, že různé uspořádání homo – a heterooligomerů ARG a jejich interakce s proteiny by mohly mít význam v nové možnosti regulace aktivity ARG v reakci na různé změny v prostředí.

---

<sup>1</sup> Skupina organismů (genů), která zahrnuje společného předka

### 2.4.3 Sekvenční zarovnání rostlinných arginas

Sekvenční zarovnání je v bioinformatice metodou, která identifikuje oblast v DNA (RNA i proteinu), ze které mohou vyplývat funkční, strukturální nebo evoluční vztahy mezi sekvencemi.

Mezi rostlinnými arginasami sekvenční zarovnání naznačuje po celé délce polypeptidu vysoký stupeň identity aminokyselinové sekvence. Největší sekvenční rozmanitost mezi rostlinnými arginasami se objevuje u N-konce, který je složen z mitochondriálního tranzitního peptidu (Chen *et al.*, 2004; She *et al.*, 2017). Dále byly provedeny analýzy mitochondriální presekvence s prostřednictvím Target P. Tato metoda předpovídá subcelulární umístění eukaryotických proteinů. Určení polohy je založeno na předpokládané přítomnosti kterékoli z N-koncových presekvenčí. She a spol. dokázali v této analýze přítomnost a vysvětlili význam tří konzervovaných aminokyselinových zbytků na pozicích 16-18 (R, L a S). Tyto zbytky jsou u jednoděložných arginas více uchované než u dvouděložných arginas. I tento poznatek naznačuje funkční rozmanitost proteinů ARGAH (She *et al.*, 2017). U dvou arginasových genů – ARGAH1 a ARGAH2 sekvenční homologie má 86 % sekvenční diverzitu i včetně mitochondriálního tranzitního peptidu, zatímco větší rozdíly byly zaznamenány u N-konců aminokyselin mitochondriálních tranzitních peptidů – jen 39 % sekvenční identita. Arabidopsis A1 a A2 mají společných pouze 13 ze 33 N-konců aminokyselin. Podobná situace nastává i u ARG z rajčat (*Solanum lycopersium*), kdy LEARG1 a LEARG2 jsou identické na 89 % (Chen *et al.*, 2004).

Dostupné rostlinné arginasy a jejich sekvence (Obrázek 4) byly zarovnány prostřednictvím Crustal W. Fylogenetický strom je sestaven pomocí softwaru Mega – X.

### 2.5 Biochemické vlastnosti rostlinných arginas

Dřívější studie uvádějí, že některé arginasy nejsou stabilní. K odůvodnění (ne)stability u arginas jsou nutné další výzkumy. Jedna z nestabilních arginas se nachází u kiwi (*Actinidia deliciosa*), která ztrácí 25 % své aktivity jen během jedné noci a dokonce během 6 dnů 60 % (Hale *et al.*, 1997). Mezi další nestabilní arginasy se řadí arginasa z cibule duhovky (*Iris hollandica*) a hlízy jeruzalémského artyčoku (*Helianthus tuberosus*) (Wright *et al.*, 1981; Boutin, 1982). Stabilní arginasy jsou přítomny u borovice laločnaté (*Pinus taeda*) (Todd *et al.*, 2001(a)), ženšenu (*Panax ginseng*) (Hwang *et al.*, 2001) a koriandru (*Coriandrum sativum*) (Siddappa *et al.*, 2018).

### 2.5.1 Vliv dvoumocných kationtů na biochemické vlastnosti

Důležitou roli hraje molekula  $Mn^{2+}$ , na které jsou všechny arginasy závislé (Winter *et al.*, 2015). Částečnou aktivitu vykazují některé rostlinné ARG za přítomnosti dalších dvoumocných kationtů (např. vápník, zinek, nikl, hořčík, kadmium, kobalt). Po kationtu  $Mn^{2+}$  byla nejvyšší aktivita ARG naměřena v přítomnosti kationtu  $Co^{2+}$ . Další výzkum aktivity ARG v přítomnosti kationtem  $Co^{2+}$  je velmi důležitý, protože kation  $Co^{2+}$  je schopen do určité míry zachovat danou aktivitu ARG za nedostatku kationtu  $Mn^{2+}$ . Avšak u ARG z kiwi (*Actinidia deliciosa*) byla naměřena vyšší aktivita s kationtem  $Ni^{2+}$  než  $Co^{2+}$  (Hale *et al.*, 1997). Souhrn dvoumocných kationtů a aktivity ARG v jejich přítomnosti je shrnuta v Tabulce 2.

Tabulka 2 Souhrn dvoumocných kationtů a jejich schopnost nahradit  $Mn^{2+}$  (aktivita s  $Mn^{2+}$  se bere jako 100 %. ND tzn. nezjištěno a „-“ tzn. neurčeno). (Přepřacováno podle Sidsappa *et al.*, 2020)

rostlinný zdroj	kovový iont (aktivita ARG v %)								
	$Mn^{2+}$	$Co^{2+}$	$Ni^{2+}$	$Mg^{2+}$	$Ca^{2+}$	$Cd^{2+}$	$Fe^{2+}$	$Zn^{2+}$	$Cu^{2+}$
sójové boby ( <i>Glycine max</i> )	100 %	26 %	-	6 %	-	-	1 %	4 %	3 %
kiwi ( <i>Actinidia deliciosa</i> )	100 %	90 %	130 %	-	-	-	ND	-	-
ženšen ( <i>Panax ginseng</i> )	100 %	67 %	-	1 %	ND	-	3 %	-	-
vigna ( <i>Vigna catjang</i> )	100 %	66 %	55 %	61 %	35 %	11 %	52 %	38 %	-
koriandr ( <i>Coriandrum sativum</i> )	100 %	43 %	15 %	ND	ND	ND	0 %	ND	ND

## 2.5.2 Arginin jako prekurzor

Arginin, jehož přeměna je katalyzovaná arginasou, je prekurzorem pro polyaminy (Liu *et al.*, 2015; Winter *et al.*, 2015). Právě z tohoto důvodu byly zkoumány inhibiční a stimulační účinky polyaminů. Stimulační účinky byly dokázány u putrescinu, sperminu a spermidinu na ARG u ženšenu (*Panax ginseng*) (Hwang *et al.*, 2001) a sójových bobů (*Glycine max*) (Kang a Cho, 1990). Tyto polyaminy mají jak stimulační, tak inhibiční účinky na ARG z koriandru (*Coriandrum sativum*) (Siddappa *et al.*, 2018).

Arginin je také prekurzorovou molekulou pro syntézu některých aminokyselin. Prolin inhibuje ARG z vigny (*Vigna catjang*), a to v nižší koncentraci - 10 mM, zatímco u dalších testovaných aminokyselin jako např. ornithin, lysin, leucin, isoleucin nebyla při této koncentraci prokázána žádná inhibice. (Dabir *et al.*, 2006). U ARG z koriandru (*Coriandrum sativum*) byla dokázána inhibice leucinem, isoleucinem, ornithinem, lysinem, avšak prolinem ne (Siddappa *et al.*, 2018). Rostlinné ARG mají schopnost rozpoznat i jiné analogy argininu, patří mezi ně: L-homoarginin, L-canavanin a L-agmatin jako substráty spolu s L-argininem. Mezi výjimku se řadí ARG z koriandru (*Coriandrum sativum*), která hydrolyzuje pouze L-arginin (Siddappa *et al.*, 2018). Je pravděpodobné, že odlišné vlastnosti jsou způsobeny strukturální rozmanitostí. V Tabulce 3 jsou uvedeny výše zmíněné rostlinné ARG a jejich substrátová specifita.

Tabulka 3 Arginasa a její substrátová specifita. (Přepřacováno podle Siddappa *et al.*, 2020)

rostlinný zdroj	Substrátové analogy (aktivita ARG zobrazena v %)					
		L-arginin	L-homoarginin	L-canavanin	L-agmatin	D-arginin
rajče ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) A1	100%	14%	0%	50%	2%	
rajče ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) A2	100%	13%	0%	1%	4%	
ženšen ( <i>Panax ginseng</i> )	100%	6%	ND	ND	-	
Vigna ( <i>Vigna catjang</i> )	100%	ND	13%	16%	ND	
fazole ( <i>Canavalia ensiformis</i> )	100%	-	22%	-	16%	
kosatec ( <i>Iris holandica</i> )	100%	6%	1%	-	ND	
hrachor setý ( <i>Lathyrus sativus</i> )			100%	5%	-	
koriandr ( <i>Coriandrum sativum</i> )				ND	ND	



### 2.5.3 Další vlastnosti rostlinných arginas

Hodnota pI je hodnota pH roztoku, kdy se amfion<sup>2</sup> nepohybuje v elektrickém poli, tzn. že jeho volný náboj je nulový. Hodnota pI u ARG hlízy jeruzalemského artyčoku (*Helianthus tuberosus*) je 5,3 a u ARG kosatce (*Iris hollandica*) je 5,6. Z toho vyplývá, že rostlinná ARG je spíše kyselým proteinem (Wright *et al.*, 1981; Boutin, 1982).

Maximální aktivita rostlinných ARG se nachází v alkalických podmínkách, pH 8 až 10.

Dalším důležitým faktorem je Michaelisova konstanta ( $K_m$ ). Tato konstanta definuje takovou látkovou koncentraci substrátu, při které rychlost enzymové reakce je ( $v$ ) polovinou rychlosti maximální ( $V_{max}$ ).  $K_m$  se u různých rostlinných ARG rozlišuje. Rozmezí je od 7,85 mM do 145 mM. Každá rostlina má potřebuje jinou teplotu, u ARG se rozmezí pohybuje mezi 37 až 60 °C.

Tyto popsané vlastnosti jsou shrnuty v Tabulce 4.

Tabulka 4 Chemické vlastnosti arginas u různých rostlinných zdrojů. (Přepřacováno podle Siddappa *et al.*, 2020)

Vlastnosti	Molekulová hmotnost [kD]	Podjednotková molekula	Počet podjednotek	Optimální pH	Optimální teplota [°C]	pI hodnota	m pro ARG [mV]	Zdroje
Rostlinný zdroj								
Jeruzalémský artyčok ( <i>Helianthus tuberosus</i> )	140	-	-	-	-	5,3	145	Wright <i>et al.</i> (1981)
Cibulky kosatce ( <i>Iris hollandica</i> )	191	36,5	6	9	-	5,6	-	Boutin (1982)
Sójové boby ( <i>Glycine max</i> )	240	60	4	9,5	-	-	83	Kang a Cho (1990)
Kiwi ( <i>Actinidia deliciosa</i> )	-	-	-	8,8	-	-	7,85	Hale <i>et al.</i> (1997)
Borovice kadidlová ( <i>Pinus taeda</i> )	140	37	4	-	-	-	-	Todd <i>et al.</i> 2001 (a)
Ženšen ( <i>Panax ginseng</i> )	352	34,5	10	9,5	60	-	82,7	Hwang <i>et al.</i> (2001)
Vigna ( <i>Vigna catjang</i> )	210	52	4	10	37	-	42	Dabir <i>et al.</i> (2005)
Rajče ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	-	37	-	9,5	-	-	32	Chen <i>et al.</i> (2004)
Rajče ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	-	36,8	-	9,5	-	-	29	Siddappa <i>et al.</i> (2018)
Koriandr ( <i>Coriandrum sativum</i> )	160	49-60	nejspíše 3	7,5-8,1	40-60	-	29,5	

<sup>2</sup> sloučenina, která má ve své molekule centra kladného i záporného elektrického náboje navzájem prostorově oddělená, takže má charakter dipólu

## 2.6 Obranný mechanismus rostlin

Jako lidé, tak i rostliny ve svém životě bojují se stresem a nežádoucími vlivy. Rostlinný stres rozdělujeme na biotický a abiotický. Biotický stres souvisí se živými organismy, např. stres vyvolaný různými houbovými nebo virovými chorobami, patogenem či hmyzem. Naopak abiotický stres nesouvisí s živými organismy. Mezi tento typ patří např. stres vyvolaný z nedostatku/ nadbytku světla, nedostatku vody či kyslíku, nízkou/ vysokou teplotou atd. Aby mohly čelit těmto změnám prostředí, vyvinuly rostliny několik způsobů, jak se adaptovat (krátkodobě/dlouhodobě) na takové změny prostředí se schopností vrátit se do původního metabolického stavu (Jones a Dangl, 2006; Andolfo a Ercolano, 2015; Miller *et al.*, 2017; Nejat a Mantri, 2017; Saijo a Loo, 2020).

I rostliny mají jako lidé svůj rozmanitý imunitní systém, díky kterému se chrání před nástrahami okolí. Tento systém velmi složitý a je složen ze tří úrovní. Rozpoznávací vrstva, kde dochází k rozpoznání efektoru. Druhou vrstvou je vrstva integrace signálu, která přijímá signály z rozpoznávací vrstvy a poslední vrstvou je obranno-akční vrstva, která přijímá uspořádané sady signálů. V těchto procesech dochází k fosforylaci cílového proteinu, uvolnění specifických chemických signálů, jako např. reaktivní formy kyslíku, lipidové deriváty a rostlinné hormony (Tyler, 2017; Wu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Při signalizaci (a)biotických podmínek a ve vývojových procesech rostlin představují klíčovou roli rostlinné hormony. Obranný systém rostlin regulují hlavně tyto rostlinné hormony: kyselina salicylová, kyselina jasmonová, kyselina abscisová a ethylen (Bari a Jones, 2009). Tento systém rostlin se dělí na vytvořené a vyvolané (Mithöfer a Boland, 2012). Při vyvolané obraně rostlin dochází k aktivaci obranných genů, programované buněčné smrti a anti-nutričních proteinů. Dále dochází např. k produkci antimikrobiálních sloučenin. Při poranění nebo při infekci patogenem či jiných škůdcem dochází k syntéze kyseliny jasmonové, která vzniká díky aktivaci sérii následných signalizačních událostí (Li *et al.*, 2002). Kyselina jasmonová indukuje speciální proteiny, které mají antiherbivorální účinky. Tyto speciální proteiny indukované kyselinou jasmonovou mají zkratku JIP.

Právě arginasou katalyzovaný L – arginin má při stresových podmínkách velké využití. Jak již bylo zmíněno v úvodu, arginin se zabudovává do proteinů a slouží jako prekurzor pro polyaminy, oxid dusnatý a také prolin.

### 2.6.1 Oxid dusnatý

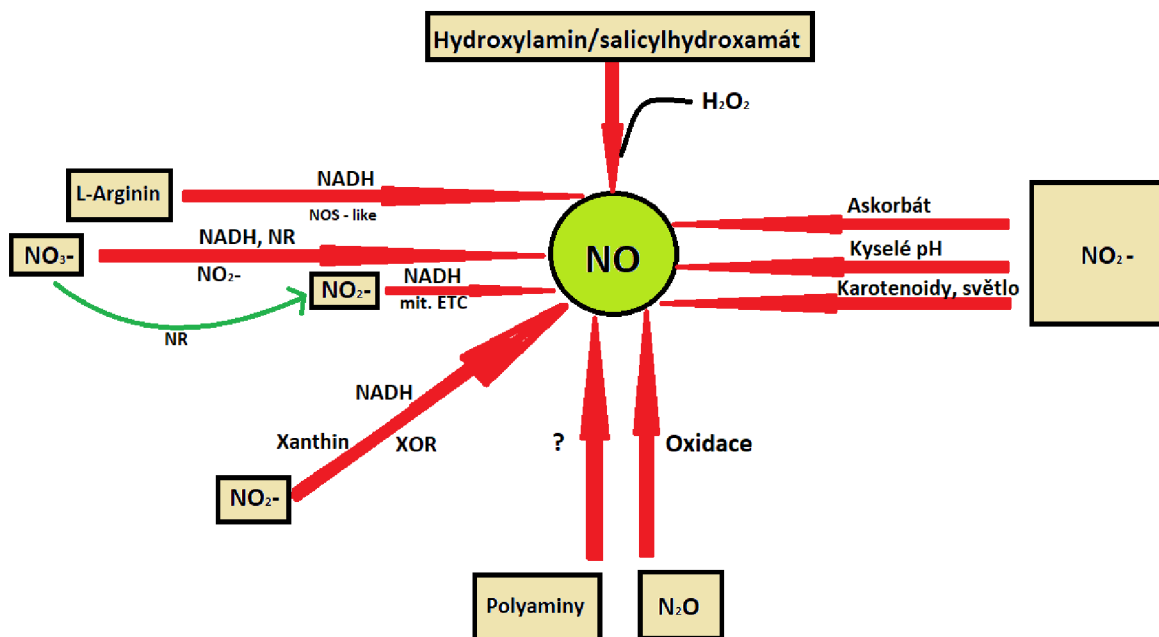
Pro lepší pochopení zapojení arginasy do obranného mechanismu rostlin je nutno znát důležitou sloučeninu, oxid dusnatý, dále jako NO. NO řadíme mezi velmi reaktivní, bezbarvou molekulu. Vysoká reaktivita je způsobena jedním nepárovým elektronem v jeho valenční vrstvě. Díky interakcím s mastnými kyselinami, DNA a proteiny způsobuje NO:

- změnu ve funkcích a ve struktuře daných molekul
- aktivaci signálních drah
- změnu exprese genů

Produkce NO u rostlin ještě není přesně objasněna a je stále předmětem mnoha biochemických výzkumů. NO může být produkován buď neenzymově nebo naopak cestou přes enzymy. Všechny známé cesty jsou vyobrazeny na Obrázku 6. Jak již bylo řečeno, NO je jednou z nejdůležitějších sloučenin při vývojových a fyziologických dějích v rostlinách a také při obranném mechanismu při boji s patogeny (Trapet *et al.*, 2015). Reguluje:

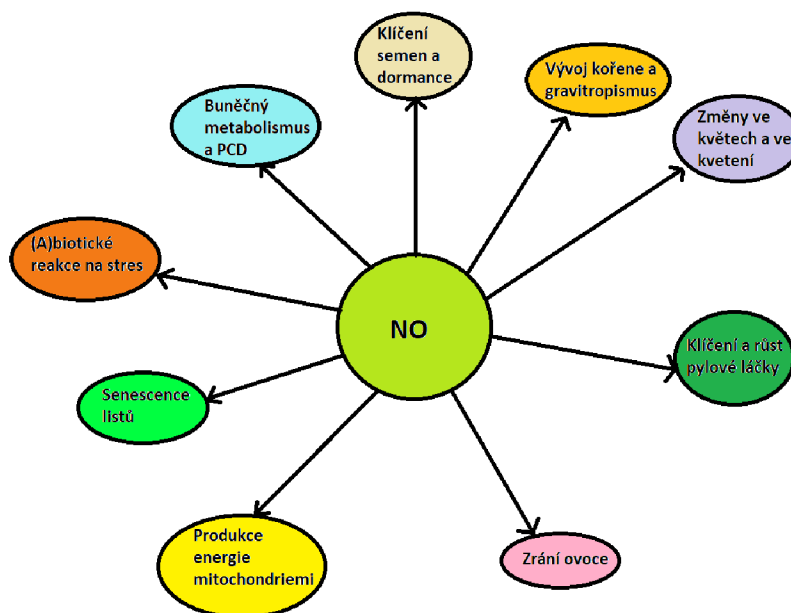
- dobu kvetení
- otevírání průduchů
- růst pylových váčků
- dormanci semen
- maturaci
- senescenci
- klíčení semen
- vývoj kořenů
- zelenání díky světlu

(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). Převzato od BP Jakuba Foldyna.



Obrázek 6 Schéma drah produkce NO; NR – nitrátreduktasa; XOR – xanthinreduktasa; mit. ETC – mitochondriální elektronový řetězec; NOS – synthasa oxidu dusnatého. (Přepřacováno podle Mirza Hasanuzzaman et al., 2018)

V práci Mirza Hasanuzzaman *et al.*, 2018 byl také vytvořen hypotetický model (Obrázek 7), který zobrazuje, jak může být NO zapojen do systému na odpověď při abiotickém stresu.



Obrázek 7 NO a jeho zapojení v reakci na abiotický stres (přepřacováno podle Mirza Hasanuzzaman *et al.*, 2018)

### 2.6.2 Úloha arginasy při abiotickém stresu

V posledních výzkumech byly jako modelové rostliny při těchto stresových podmínkách použity *Arabidopsis thaliana* a rajče (*Solanum lycopersicum*).

Při abiotickém stresu dochází k snížení akumulace reaktivních forem kyslíku (ROS) v ARGAH mutantech v *Arabidopsis*. To signalizuje, že inhibice exprese *Arabidopsis* ARGAH může zvýšit toleranci vůči vysokému obsahu soli, dehydrataci či jinému z abiotických stresů. Naopak nadměrná exprese genů ARG ukazuje opačné následky. V jednom z výzkumů, konkrétně v práci Shi *et al.* 2013 bylo dokázáno, že negativní regulace ARGAH u *Arabidopsis* je založena na regulaci ARG na metabolismu argininu a akumulaci ROS. Také bylo dokázáno, že manipulování s expresí těchto genů ARG může mít za následek změnu aktivit i u odlišných antioxidantních enzymů, jako např. CAT, POD v různých stresových situacích. Plíseň šedá (*Botrytis cinerea*) způsobuje indukci exprese ARGAH2 a právě zvýšená exprese ARGAH2 způsobuje zvýšenou rezistenci proti plísni (Brauc *et al.*, 2012; Brownfield *et al.*, 2008b). V jedné starší studii bylo dokázáno, že pokud dojde k vyřazení genů pro ARG *Arabidopsis*, dochází k akumulaci NO. Naopak zvýšená exprese genu ARGAH2 posiluje vývoj kalusu při infekci kořenů brukvovitých rostlin. Kalus, jinak také nazývaný zával, je vrstva ochranného pletiva, která chrání ránu rostliny při poškození. Jak již bylo zmíněno dříve, při poranění u rajčat je aktivován pouze gen LeARG2 (Chen *et al.*, 2004). ARG tedy může díky regulaci drah argininu a polyaminu různě reagovat na abiotické stresy (Shi *et al.*, 2013).

### 2.6.3 Úloha arginasy při biotickém stresu

ARG hraje důležitou roli v odpovědích rostlin na biotický stres, zejména při interakci s herbivorním hmyzem. V případě, že rostliny jsou požírány herbivorním hmyzem, je ARG exprimována v rostlinných pletivech a prochází trávicím traktem hmyzu. ARG je odolná vůči proteolýze a rozkládá L-arginin, který je pro hmyz důležitou aminokyselinou.

V jedné studii byly využity transgenní rostliny rajčat, které byly geneticky upraveny k nadexprimaci ARG. Tyto rostliny vykazaly vyšší rezistenci vůči larvám motýlů lišaje tabákového (*Manduca sexta*). To naznačuje, že ARG může hrát důležitou roli při obraně rostlin proti herbivornímu stresu. V jiné studii byl zkoumán vliv manipulace exprese genu *AtARGAH2* na aktivitu ARG při infekci plísní šedou (*Botrytis cinerea*) u rostliny *A. thaliana*. Ve wild-type rostlinách docházelo ke zvýšené exprese *AtARGAH2*, zejména při 12 hodinách po infekci, což naznačuje, že *AtARGAH2* může hrát roli v raných stresových odpovědích rostlin. Transgenní linie s nadexprimovaným *AtARGAH2* vykazaly sníženou citlivost na *B. cinerea*, zatímco linie s umlčeným genem pro *AtARGAH2* byly stejně náchylné k infekci jako wild-type rostliny. Tyto studie naznačují, že ARG a *AtARGAH2* mohou hrát důležitou roli v stresových odpovědích rostlin na biotický stres, jako je například požívání herbivorním hmyzem nebo infekce plísní.

### 2.7 Arginasa a vývoj rostlin

Studie z přelomu tisíciletí zaměřené na aktivity ARG v post-germinálním vývoji rostlin přinášejí důležité poznatky o tom, jak se rostliny vyvíjejí po klíčení semen. Tyto studie se zaměřují na genové exprese a regulaci ARG během procesů jako je tvorba kořenového systému, růst stonků a větví, tvorba listů a květů, dozrávání plodů a další. Díky nim jsme schopni lépe porozumět molekulárním mechanismům a regulaci těchto procesů v rostlinách a jejich odpovědi na různé vnitřní i vnější podněty. Tyto poznatky mají široké uplatnění v zemědělství, vývoji nových odrůd rostlin s lepšími vlastnostmi a také v ochraně rostlin před abiotickými a biotickými stresy.

V případě rýže bylo zjištěno zvýšení aktivity arginázy v semenáčcích, zejména na začátku kořene a během prvních dvou dnů klíčení výhonků. Toto zvýšení aktivity arginázy odpovídá zvýšenému obratu Arg, avšak nebyly zaznamenány žádné další důkazy o akumulaci močoviny (Cao *et al.*, 2010).

Podle studie vedené Chenem *et al.* (2004) byla u rajčat pozorována nejvyšší míra exprese ARG v rozmnožovacích pletivech. Autoři vyvodili hypotézu, že ARG má roli v tvorbě polyaminů, které se podílejí na vývoji plodů u rajčat.

Výzkum provedený Toddem *et al.* (2001) ukázal, že u kadidlových borovic (*Pinus taeda*) je pozorována nízká úroveň transkriptů genů ARG jak ve zralých, tak nezralých embryích. Nicméně po vyklíčení semen se exprese těchto genů zvyšuje. Tento výsledek může naznačovat, že ARG geny mají důležitou roli během klíčení semen a růstu semenáčků u borovic kadidlových.

Výzkum, který provedl She a kolegové v roce 2017, ukázal, že ARG gen má nejvyšší úroveň exprese v nadzemních částech pšenice během vývoje květenství a plnění zrn.

## **2.8 Arginasa a její vliv na výnos rostlin**

Tři následující studie se zaměřují na využití genu kódujícího arginas (ARG) pro zlepšení vlastností rostlin. Na základě těchto studií bylo zjištěno, že nadexpresí tohoto genu dochází k zvýšení výnosu a dalších požadovaných vlastností rostlin.

Práce Ma *et al.* (2013) provedla analýzu mutace genu OsARG u rýže. Bylo zjištěno, že rýže s nefunkčním genem OsARG má sníženou výšku, menší panikly a menší zrna. Naopak, nadexpresí tohoto genu bylo dosaženo zvýšení počtu zrn při omezeném množství dusíku.

Práce Meng *et al.* (2015) využila poznatky z předchozí studie a aplikovala je na bavlník. Transgenní linie bavlníku s nadexpresí genu OsARG vykazovaly v průměru delší vlákna o délce o 2 mm.

Práce Di *et al.* (2016) se soustředila na kukuřici a využití genu ZmARG. Transgenní rostliny kukuřice s nadexpresí tohoto genu vykazovaly vyšší hmotnost klasů a semen. Všechny tyto studie ukazují perspektivu a potenciál využití nadexprese genů ARG pro zlepšení výnosů a dalších požadovaných vlastností rostlin, jako je délka zrna, délka vláken nebo hmotnost semen. Tato technika může být v budoucnu využita pro šlechtění plodin s vyššími výnosy a lepšími agronomickými vlastnostmi.



## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Seznam přístrojů a pomůcek

- Analytické váhy (Denver instrument, USA)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 5425 R (Eppendorf, Německo)
- Homogenizátor (neznámý původ)
- Chladicí/ zahřívací termostat (Biosan, Litva)
- Chlazená centrifuga Rotanta 460R (Hettich zentrifugen, Německo)
- Chlazená stolní centrifuga Megafure 8R (Thermo Scientific, USA)
- Mikrodestičkový spektrofotometr PowerWaveXS (Biotek Instruments, USA)
- Mikrodestičky Testplate 96F (TPP, Švýcarsko)
- pH metr (XS Instruments, Itálie)

### 3.2 Seznam chemikálií

- Chlorid manganatý (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina fosforečná (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika)
- L-arginin (Acros Organics, USA)
- D – Mannitol (Penta, Česká republika)
- MES (Sigma Aldrich, Německo)
- Triton X-100 (Acros Organics, USA)
- $\alpha$  – isonitropropiofenon (Sigma Aldrich, Německo)
- L-prolin (Acros Organics, USA)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, Německo)

### 3.3 Biologický materiál

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

### 3.3.1 Zpracování materiálu pro izolaci mitochondriálního podílu

Zpočátku se semena namočila ve vodě, což jim umožnilo absorbovat vlhkost a nabobtnat. Po 24 hodinách se voda slila a semena se přesunula na navlhčený filtrační papír. Klíčení probíhalo mezi dvěma vrstvami papíru, který zajišťoval vlhké prostředí pro semena. Důležité bylo, aby semena byla umístěna ve tmě, protože je to přirozená podmínka pro klíčení. Takto byl hrášek ponechán po dobu 2 dnů.

Při dalším měření jsem byl použit hrášek, který byl umístěn taktéž ve tmě, ale filtrační papír byl namočen místo vody buď do roztoku 100 mM NaCl či do 200 mM NaCl. Další odlišností byla doba, po kterou byl hrášek ve tmě. V tomto případě se jednalo o 4 dny. Rozdíl ve klíčení těchto 2 hrášků s rozdílnými roztoky NaCl je uveden na Obrázku 8 a 9. Obrázek 10 zobrazuje kontrolu, tzn. klíčící semena hrášku namořená do vody. Oproti kontrolním semenům a semenům namočených ve 100 mM NaCl, semena klíčící v přítomnosti 200 mM nevyklíčila tolik, a navíc byla semena výrazně napadena plísní.



Obrázek 8 Klíčení semen hrachu při přítomnosti roztoku 100 mM NaCl



Obrázek 9 Kličení semen hrachu při přítomnosti roztoku 200 mM NaCl



Obrázek 10 Kontrolní kličení semen hrášku

### 3.3.2 Izolace mitochondriální frakce

Metoda izolace mitochondriální frakce dle Kollöffel a Dijke (1975) s modifikacemi začala klíčením semen hrachu, která byla následně rozdělena na kotyledony. Kotyledony byly homogenizovány v chlazené třecí misce s mořským pískem a extrakčním pufrem obsahujícím 50 mM MES (pH 7,4) a 400 mM D-mannitolu.

Homogenát byl přecezen přes nylonovou tkaninu a následně byl homogenizován v laboratorním homogenizátoru (za přítomnosti extrakčního pufru). Po homogenizaci byl použit pouze supernatant, který byl následně centrifugován 10 min při 40.000 xg, za stálého chlazení (10 °C). Po této centrifugaci byl odebrán supernatant a následně se centrifugoval pouze pelet za stejných podmínek jako při první centrifugaci. Odebraný supernatant i pelet byly použity pro následné měření aktivity arginasy.

### 3.4 Stanovení aktivity arginasy

Metoda pro stanovení aktivity ARG v mitochondriální frakci, která je popsána v článku Kollöffel a Dijke, 1975, se opírá o detekci močoviny reagující s  $\alpha$ -isonitrosopropiofenonem v kyselém prostředí a vytvářející růžový produkt s maximální absorbcí při 540 nm.

Nejdříve byla provedena aktivaci enzymu, kdy do mikrozkušavky bylo napipetováno 0,9 ml enzymového extraktu, 0,1 ml 20 mM  $MnCl_2$  a 10% Triton X-100 a následovala inkubace 10 min při 37 °C.

Poté byla připravena reakční směs, kdy do mikrozkušavky bylo napipetováno 400  $\mu$ l 250 mM L-argininu a 50  $\mu$ l 20 mM  $MnCl_2$ . Reakce byla nastartována přidavkem 50  $\mu$ l aktivovaného enzymu a proběhla inkubace 30 min při 37 °C. Reakce byla ukončena přidavkem 0,5 ml 15 %  $HClO_4$ . Vysrážené proteiny byly odstraněny centrifugací při 15 000 xg a době 10 min.

Dále byly odebrány 100  $\mu$ l alikvoty supernatantu do čistých mikrozkušavek a bylo přidáno ke každému alikvotu 50  $\mu$ l činidla B (3 %  $\alpha$ -isonitrosopropiofenonu v 95 % EtOH) a 1,5 ml činidla A (9 %  $H_3PO_4$ , 27 %  $H_2SO_4$ ) pro stanovení močoviny. Reakční směs byla zahřívána 60 min na 90 °C ve tmě a následně ochlazená na laboratorní teplotu.

Reakční směs byla pipetována v triplicátu po 300  $\mu$ l do mikrodestiček a byla měřena absorbance při 540 nm.

Byla tedy měřena absorbance výchozího extraktu, supernatantu a peletu po centrifugaci. Také byl změřen slepý vzorek, do kterého bylo pipetováno stejné množství všech komponent, ale místo 50  $\mu$ l aktivovaného enzymu bylo napipetováno 50  $\mu$ l extrakčního pufu.

Výpočet aktivity ARG byl založen na sestavení kalibrační křivky z různých standardů močoviny o koncentracích 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 3,5; 5; 7,5 a 10 mM. Aktivita byla vyjádřena v nanomolech vytvořené močoviny za sekundu (nkatal).

### **3.4.1 Stanovení aktivity arginasy za stresových podmínek**

#### **3.4.1.1 Inhibice L-prolinem**

Jak již bylo zmíněno dříve, L-prolin inhibuje aktivitu ARG, a proto bylo provedeno další měření.

Postup pro stanovení aktivity ARG je totožný jako v kapitole 3.5 pouze s rozdílem, že místo 400  $\mu$ l 250 mM L-argininu bylo napipetováno pouze 200  $\mu$ l 250 mM L-argininu a dále bylo napipetováno 200  $\mu$ l 100 mM L-prolinu. Další postup (centrifugace, inkubace atd.) byl již totožný.

#### **3.4.1.2 Sůl jako abiotický stresor**

Přílišná koncentrace soli může negativně ovlivnit schopnost rostlin přijímat vodu a živiny. Rostliny jsou vysoce závislé na správném osmotickém potenciálu, což je vyvážení vody mezi rostlinou a půdou. Při vysoké koncentraci solí v půdě se zvyšuje osmotický potenciál půdy a rostliny mají problém udržet vodu ve svých buňkách. To vede k dehydrataci rostlin a narušení růstu.

Jak je popsáno v kapitole 3.3.1, semena hrachu byla ponechána ve filtračním papíru namočeným ve 100 mM NaCl, 200 mM NaCl a také byla provedena kontrola (semena ve filtračním papíru namočeného v ddH<sub>2</sub>O – Obrázek 8, 9 a 10).

Postup pro měření aktivity ARG za těchto stresových podmínek je totožný jako je popsáno v kapitole 3.5.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Stanovení aktivity arginasy

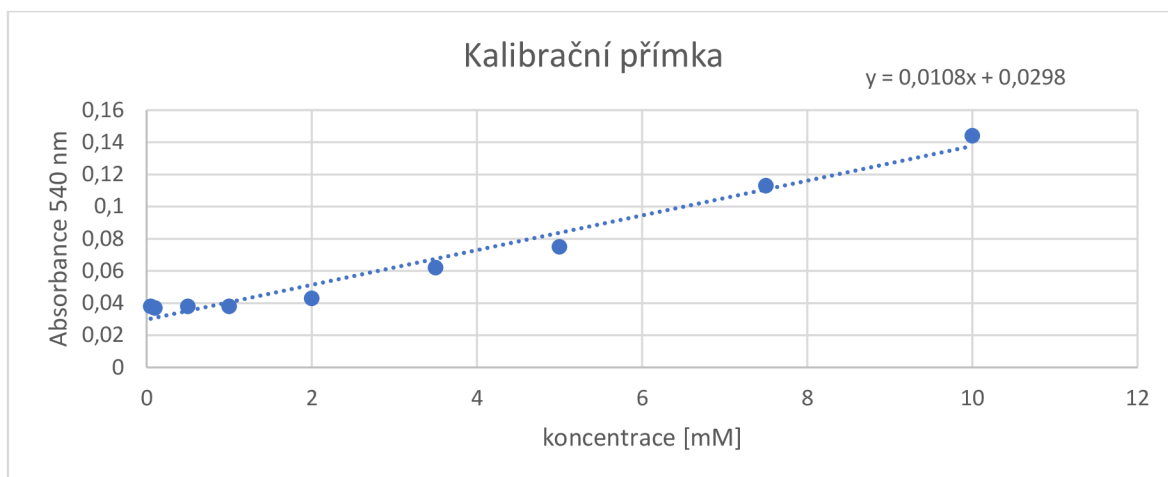
V provedeném experimentu byla měřena aktivita ARG v extraktu ze semen hrachu. Výraznější aktivita ARG byla změřena v peletu obsahující mitochondriální proteiny, zatímco v supernatantu a celkovém vzorku byla nižší. Aktivita v supernatantu a v celkovém extraktu byla vyšší než ve slepém vzorku. Tyto výsledky odpovídají očekávání, protože dle dřívějších výzkumů a poznatků se nejvyšší podíl ARG nachází v mitochondriích rostlinných buněk.

V Tabulce 5 je uvedena výsledná kalibrace pro spektrofotometrické stanovení močoviny.

*Tabulka 5 Kalibrace pro spektrofotometrické stanovení močoviny*

koncentrace močoviny	průměr z naměřených absorbancí	průměr vypočítané koncentrace z kalibrační přímky [mg/ml]
0,05	0,038	0,759
0,1	0,037	0,667
0,5	0,038	0,759
1	0,038	0,759
2	0,043	1,222
3,5	0,062	2,981
5	0,075	4,185
7,5	0,113	7,704
10	0,144	10,574

Z Tabulky 5 byla následně sestrojena kalibrační přímka pro spektrofotometrické stanovení močoviny, což je zobrazeno na Grafu 1. Z této přímky mohla být vypočítána finální aktivita ARG v extraktu semen hrachu. V Tabulce 6 jsou shrnuty výsledky z měření pro stanovení aktivity ARG.

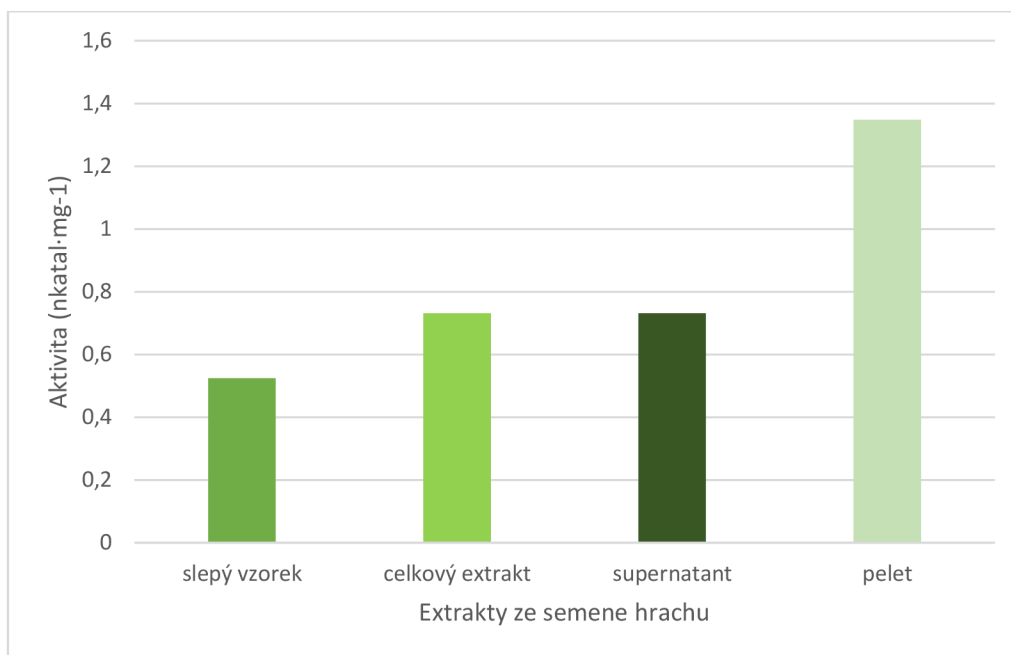


Graf 1 Kalibrační přímka spektrofotometrického stanovení močoviny

Tabulka 6 Stanovení aktivity arginasy v extraktu semen hrachu – dílčí výpočty

Vzorek	průměrná absorbance	množství močoviny [mM]	celková aktivita arginasy ve vzorku [nkat/ml]
slepý vzorek	0,04	0,944	0,524
celkový extrakt	0,044	1,315	0,731
supernatant	0,044	1,315	0,731
pelet	0,056	2,426	1,348

Pro lepší představu v rozdílu aktivit byl sestaven Graf 2.



Graf 2 Aktivita arginas v jednotlivých frakcích semen hrachu



## 4.2 Stanovení aktivity arginasy za stresových podmínek

### 4.2.1 Inhibice L-prolinem

V provedeném experimentu byla aktivita arginasy stanovena stejným způsobem jako je popsáno v kapitole 4.1.

I po několika pokusech se bohužel nepodařilo stanovit aktivitu ARG, protože spektrofotometické měření neposkytlo žádné rozdíly v absorbancích mezi vzorky s L – prolinem a kontrolou. Mohlo to být způsobeno špatným pipetováním, nepřesnými objemy či nevhodnou dobou inkubace.

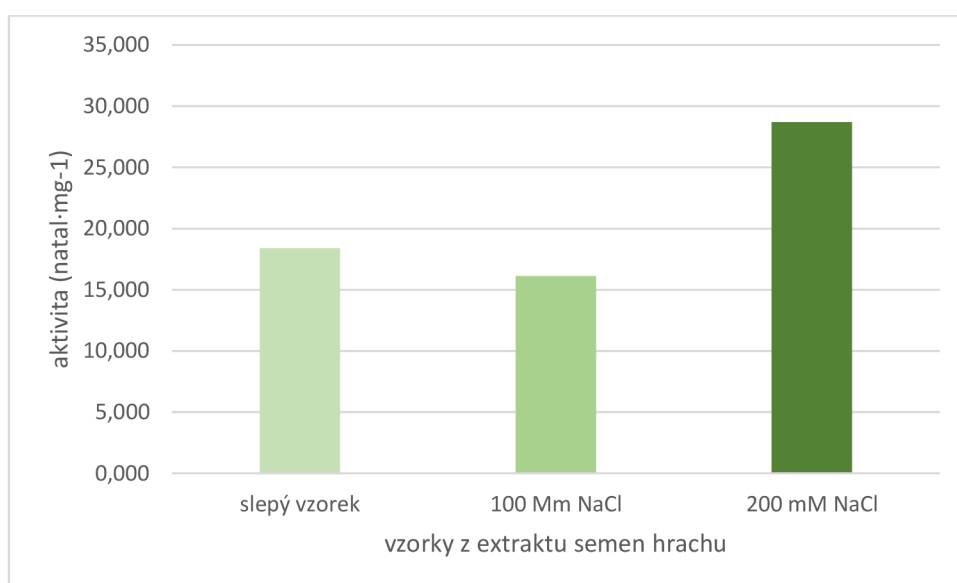
### 4.2.2 Sůl jako abiotický stresor

I v tomto experimentu byl postup stanovení totožný jako je popsáno v kapitole 4.1.

Tentokrát byla měřena aktivita enzymu ve slepém vzorku, ve vzorku se 100 mM NaCl a 200 mM NaCl.

Výsledky ukázaly, že mezi slepým vzorkem a vzorkem 100 mM NaCl téměř není žádný rozdíl. Za to u vzorku s 200 mM NaCl se aktivita enzymu ARG již výrazně zvýšila.

Graf 3 znázorňuje rozdíly mezi jednotlivými vzorky.



Graf 3 Výsledky z měření aktivity arginasy při stresových podmínkách

### **4.2.3 Porovnání výsledků z prvního a druhého experimentu**

Bylo možné si všimnout, že výsledná aktivita ARG slepého vzorku z druhého měření (stresové podmínky) a aktivita ARG z prvního měření se odlišuje. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben rozdílnou dobou klíčení semen ve tmě, První experiment byl proveden na semenech hrachu 2 dny po vyklíčení, zatímco druhý experiment byl proveden na semenech hrachu až 4 dny po vyklíčení.

## 5. DISKUSE

Tato bakalářská práce navazuje na diplomovou práci Jakuba Foldyny a zabývá se studiem arginasy, což je manganoenzym, který má schopnost katalyzovat hydrolytický rozklad L-argininu na ornithin a močovinu.

Dřívější studie se zaměřovaly na úlohu arginasy ve vývoji rostlin, která může být různá v závislosti na druhu rostliny. U rajčat se předpokládá, že ARG hraje důležitou roli v tvorbě polyaminů, které podporují vývoj plodů. U semen (kotyledonů) bobů, dýně a hrachu byla zaznamenána výrazně zvýšená aktivita arginasy během klíčení, zatímco u klíčících semen bavlny byla aktivita ARG zvýšena nepatrně. Tyto výsledky byly publikovány v různých studiích (Alabadí *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2004; Splittstoesser, 1969; Kollöffel a van Dijke, 1975; Dilworth a Dure, 1978; de Ruiter a Kollöffel, 1982).

V souladu s dřívějšími výzkumy bylo potvrzeno, že největší podíl arginasy je obsaženo v mitochondriích rostlinných buněk.

Nejen v rostlinné biochemii je velmi důležité pochopit obranný mechanismus rostlin vůči různým stresovým podmínkám. Dřívější výzkumy dokázaly, že při (a)biotickém stresu u rostlin dochází k indukci exprese ARG, a to na úrovni transkripce (Chen *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2013).

V experimentu této bakalářské práce byla změřena aktivita arginasy a to konkrétně při zasolení biologického materiálu.

Dle starších výzkumů byla potvrzena hypotéza, že stresové podmínky výrazně zvyšují aktivitu tohoto enzymu.

Jeden z cílů práce, a to částečná purifikace enzymu a charakterizace jeho enzymových vlastností bohužel nemohla být splněna z časových důvodů.

## 6. ZÁVĚR

Teoretická část obsahuje zpracovanou literární rešerši, která shrnuje tyto témata:

1. Stručný přehled o polyaminech a obranném mechanismu rostlin
2. Přehled o rostlinných arginasech – geny, struktura, enzymové vlastnosti, lokalizace, význam v metabolismu
3. Specifické funkce arginasy při klíčení semen rostlin
4. Specifické funkce arginasy při odpovědi rostlin na (a)biotické stresy

Z praktické části této práce se mohou odvodit tyto závěry:

1. Potvrzení dřívějších hypotéz (dřívějších výzkumů a diplomové práce Jakuba Foldyny)
2. Velký význam tohoto enzymu pro mnoho odvětví, a proto nutnost dalších výzkumů.

## 7. LITERATURA

- 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.
- Agrobio: <https://agrobio.cz/poradna/clanek/159> (15. 1. 2023)
- Bagni N., Tassoni A. (2001): Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**, 301–317.
- Boutin Jean-Pierre (1982): Purification, properties and subunitstructure of arginase from Iris bulbs. *European Journal of Biochemistry* **127**,237-243
- 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.
- 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.
- 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.
- Flores T., Todd Ch. D., Tovar-Mendez A., Dhanoa P. K., Correa-Arragunde 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.
- Gravot A., Deleu C., Wagner G., Lariagon C., Lugan R., Todd C., Wendehenne D., Delourme R., Bouchereau A., Manzanares-Dauleux M. J. (2012): Arginase induction represses gall development during clubroot infection in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* **53**, 901-911.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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
- 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

- Mdpi: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/4/3346> (12. 2. 2023)
- Jigar Patela, Menaka Ariyaratne, Sheaza Ahmed, Lingxiao Ge, Vipaporn Phuntumart, Andrea Kalinoski, Paul F. Morris (2017): Dual functioning of plant arginases provides a third route for putrescine synthesis. Elsevier in Plant Science **262**, 62-73
- 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.
- Sekula B. (2020) The Neighboring Subunit Is Engaged to Stabilize the Substrate in the Active Site of Plant Arginases. Frontiers in Plant Science **11**, 987
- Shi HT and Chan ZL (2013) In vivo role of *Arabidopsis* arginase in arginine metabolism and abiotic stress response. Plant Signaling & Behavior :5, e24138
- 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.
- Sidsappa S, Marathe (2020) What we know about plant arginases? Plant Physiology and Biochemistry **156**, 600–610
- Xuefeng Ma, Zhijun Cheng , Ruizhen Qin , Yang Qiu , Yueqin Heng , Hui Yang, Yulong Ren, Xiaole Wang, Jingcui Bi , Xiaoding Ma , Xin Zhang, Jiulin Wang , Cailin Lei, Xiuping Guo , Jie Wang, Fuqing Wu , Ling Jiang, Haiyang Wang, Jianmin Wan (2013) OsARG encodes an arginase that plays critical roles in panicle development and grain production in rice **73**, 190-200.
- 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.

## 8. ZRATKY

ACC	Acetyl-CoAkarboxylasa
ADC	Arginindekarboxylasa
ARG	Arginasa
AtARGAH1	Isoenzym I arginasy z <i>A. thaliana</i>
AtARGAH2	Isoenzym II arginasy z <i>A. thaliana</i>
AVG	Aminoethoxyvinylglycin
DFMO	Difluoromethylornithin
DFMA	Dimethylforamid
ETC	Elektrontransportní řetězec
FAD	Flavinadenindinukleotid
LeARG1	Isoenzym I arginasy z rajčete
LeARG2	Isoenzym II arginasy z rajčete
MES	Kyselina 2-(N-morfolino)ehtansulfonová
MGBC	Methylglyoxal-bis-butyl-amidinohydrazon
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
PUT	Putrescin
SAMDC	S-Adenosyl-L-Methionine Decarboxylase
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
XOR	Xanthinoxidoreduktasa
ZmARG	Arginasa z kukuřice