

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium úlohy oxidu dusnatého v katabolismu
polyaminů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Miluše Rusnoková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Jana Jahnová
Rok:	2018

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

V Olomouci dne 12. 5. 2018

Miluše Rusnoková

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí své bakalářské práce doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady. Dále děkuji Mgr. Janě Jahnové a Mgr. Tereze Tiché Ph.D. za poskytování konzultací a všestrannou pomoc při vypracování experimentální části. Zvláštní poděkování patří mému partnerovi Janu Chalupkovi, jehož psychické podpory a trpělivosti si nesmírně vážím a bez něhož by tato práce nikdy nevznikla.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Miluše Rusnoková
Název práce	Studium úlohy oxidu dusnatého v katabolismu polyaminů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Jana Jahnová
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Rostlinné polyaminy (PA) působí jako regulační molekuly v mnoha základních buněčných procesech. Klíčovými enzymy katabolismu PA jsou diaminoxidasy (DAO) a aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH). DAO se podílí na katabolických reakcích polyaminů za vzniku odpovídajících ω -aminoaldehydů. Tyto aldehydy jsou dále metabolizovány pomocí NAD^+ -dependentních AMADH za vzniku ω -aminokyselin.

Úkolem bakalářské práce bylo stanovit vliv zvýšené koncentrace NO v důsledku použití donoru NO (S-nitrosoglutathionu - GSNO) v růstovém médiu na aktivitu AMADH a DAO. Současně jsme se zaměřily na stanovení aktivity askorbátperoxidasy (APX) a obecně peroxidasy, které přeměňují substrát guajakol na detekovatelný barevný produkt (GPX). Studie byla realizována na dvou kultivarech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset významně se lišících odolností vůči některým patogenům, tzn. schopností aktivovat obranné mechanismy. Vliv zvýšené koncentrace NO na aktivity studovaných enzymů v důsledku aplikace GSNO do růstového média se projevil zejména u odolného kultivaru *P. sativum* cv. Twinset. Na základě změn enzymových aktivit po aplikaci donoru NO (GSNO) do růstového média lze předpokládat regulaci aktivací zejména enzymu AMADH v kořenové části a GPX v nadzemní části kultivaru Twinset. V případě APX získané výsledky poukazují na možný inhibiční efekt zvýšené koncentrace NO v kořeni, ale naopak výrazný aktivační efekt NO na aktivitu APX v apikální části kořene cv. Twinset.

Klíčová slova

Askorbátperoxidasa, aminoaldehyddehydrogenasa, diaminoxidasa, guajakolperoxidasa, oxid dusnatý, *Pisum sativum*, polyaminy, reaktivní formy dusíku, reaktivní formy kyslíku.

Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Miluše Rusnoková
Title	Study of the role of nitric oxide in catabolism of polyamines
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Consultant	Mgr. Jana Jahnová
The year of presentation	2018

Abstract

Plant polyamines (PAs) act as regulatory molecules in many fundamental cellular processes. Key enzymes of PAs catabolism are diamine oxidases (DAOs) and aminoaldehyde dehydrogenases (AMADHs). DAOs participate in catabolic reactions of polyamines to form the corresponding ω -amino aldehydes. These aldehydes are further metabolized by NAD⁺-dependent AMADH to form ω -amino acids.

The aim of this bachelor thesis was to determine the effect of increased NO concentration due to the use of NO donor (S-nitrosoglutathione - GSNO) in growth medium on the activity of AMADH and DAO. At the same time, we focused on determining the activity of ascorbate peroxidase (APX) and generally peroxidases that convert the guaiacol substrate to a detectable color product (GPX). The study was carried out on two cultivars of *P. sativum* cv. Kudrnáč and *P. sativum* cv. Twinset, which significantly differ in resistance to some pathogens, i.e., ability to activate defense mechanisms. The effect of elevated NO concentration on the activities of studied enzymes as a result of the application of GSNO to the growth medium was manifested especially in the resistant cultivar *P. sativum* cv. Twinset. On the basis of changes in enzyme activities after application of the NO donor (GSNO) to the growth medium, the activation of the AMADH enzyme in the root part and GPX in the above-ground part of the Twinset cultivar can be expected. In the case of APX, the obtained results indicate a potential inhibitory effect of increased NO concentration in the root, but a significant NO activation effect on APX activity in the apical part of the root cv. Twinset.

Keywords

Ascorbate peroxidase, aminoaldehyde dehydrogenase, diamine oxidase, guaiacol peroxidase, nitric oxide, *Pisum sativum*, polyamines, reactive nitrogen species, reactive oxygen species.

Number of pages	77
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

- 2.1 Polyaminy
 - 2.1.1 Biosyntéza polyaminů
 - 2.1.2 Katabolismus polyaminů
 - 2.1.2.1 Metabolismus kadaverinu
 - 2.1.2.2 Aminoxidasy
 - 2.1.2.3 Aminoaldehyddehydrogenasy
- 2.2 Úloha/funkce polyaminů u rostlin
 - 2.2.1 Úloha polyaminů za fyziologických podmínek v růstu a vývoji rostlin
 - 2.2.1.1 Úloha polyaminů v senescenci listů
 - 2.2.2 Úloha polyaminů v reakci rostlin na stres
 - 2.2.2.1 Mechanismus zapojení polyaminů v reakci rostlin na stres
 - 2.2.2.2 Úloha polyaminů v reakci rostlin na abiotický stres
 - 2.2.2.3 Úloha polyaminů v reakci rostlin na biotický stres
- 2.3 Úloha reaktivních forem dusíku v regulaci metabolických drah
 - 2.3.1 Základní charakteristika reaktivních forem dusíku
 - 2.3.2 Produkce a degradace reaktivních forem dusíku
 - 2.3.3 Zapojení reaktivních forem dusíku v regulaci metabolických drah

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

- 3.1 Materiál a metody
 - 3.1.1 Biologický materiál
 - 3.1.2 Použité chemikálie
 - 3.1.3 Přístroje
 - 3.1.4 Příprava rostlinného materiálu
 - 3.1.5 Zpracování rostlinného materiálu
 - 3.1.6 Stanovení proteinů
 - 3.1.7 Stanovení aktivity enzymů
 - 3.1.7.1 Stanovení aktivity aminoaldehyddehydrogenasy
 - 3.1.7.2 Stanovení aktivity diaminoxidasy
 - 3.1.7.3 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy
 - 3.1.7.4 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy
 - 3.1.8 Příprava pevného S-nitrosoglutathionu
 - 3.1.9 Nativní elektroforéza (PAGE)

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

- 4.1 Stanovení proteinů
- 4.2 Vliv modulátorů hladiny oxidu dusnatého na růst hrachu setého
- 4.3 Porovnání aktivity vybraných enzymů u dvou kultivarů *Pisum sativum*
- 4.4 Vliv modulátorů hladiny oxidu dusnatého na aktivitu vybraných enzymů u dvou kultivarů *Pisum sativum*
- 4.5 Nativní elektroforéza – vliv modulátorů hladiny oxidu dusnatého

5 ZÁVĚR

6 LITERATURA

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši zaměřenou na charakterizaci:

1. enzymů podílejících se na katabolismu polyaminů u hrachu setého (aminoxidasa, aminoaldehyddehydrogenasa);
2. úlohy polyaminů v reakci rostlin na působení stresových faktorů;
3. úlohy reaktivních forem dusíku v reakci rostlin na působení stresových faktorů.

V experimentální části bylo cílem bakalářské práce studium efektu sloučenin ovlivňujících hladinu reaktivních forem dusíku na modelovém systému dvou kultivarů *Pisum sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset s odlišnou odolností na patogenní organismy. Byl sledován vliv donoru NO (GSNO) a lapače NO (PTIO) na:

1. růst a vývoj kořenové a nadzemní části rostlin;
2. aktivitu aminoxidasy a aminoaldehyddehydrogenasy;
3. aktivitu askorbátperoxidasy a guajakolperoxidasy.

1 ÚVOD

Polyaminy (PA) jsou nízkomolekulární alifatické polykationty přítomné ve všech živých buňkách prokaryotních i eukaryotních organismů. Vzhledem k jejich pozitivnímu náboji mohou tyto sloučeniny vázat různé buněčné makromolekuly včetně DNA, RNA, chromatinu a proteinů elektrostatickými vazbami, které mohou způsobit jejich stabilizaci či destabilizaci.

Rostlinné PA mají významnou roli v procesech růstu a vývoje rostlin, v morfogenezi, embryogenezi, vývoji orgánů, senescenci listů, ale i v reakci rostlin na působení abiotických a biotických stresových faktorů. Nejběžnějšími PA vyskytujícími se v rostlinách jsou putrescin, kadaverin, spermidin, spermin a thermospermin.

PA jsou oxidačně deaminovány aminoxidasami (AO) za současné produkce H_2O_2 . Na základě přítomnosti rozdílného kofaktoru lze AO klasifikovat do dvou skupin: diaminoxidasy obsahující měď (DAO) a FAD-dependentní polyaminoxidasy (PAO). DAO a PAO se liší substrátovou specifitou, mechanismem oxidace substrátu a subcelulární lokalizací.

Aminoaldehyddehydrogenasy jsou enzymy, které se společně s DAO a PAO podílí na katabolismu PA v rostlinách. Jak bylo prokázáno, vznikající aminoaldehydy působením enzymů DAO a PAO jsou dále metabolizovány pomocí NAD^+ -dependentních aminoaldehyddehydrogenas, které katalyzují přeměnu ω -aminoaldehydů na odpovídající ω -aminokyseliny v přítomnosti koenzymu NAD^+ .

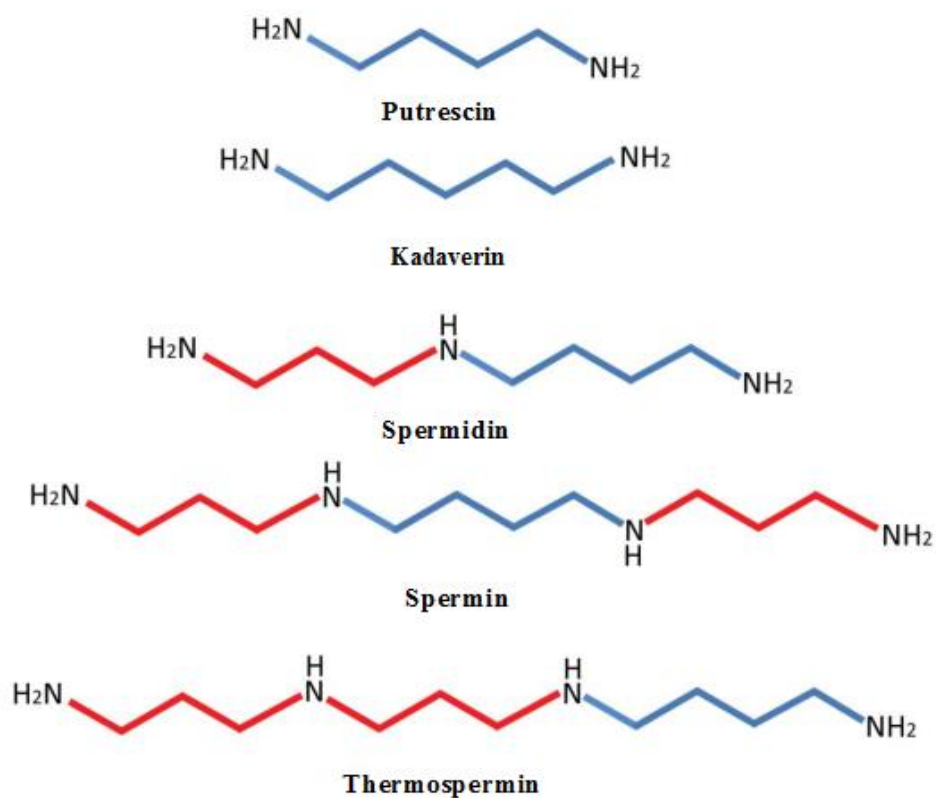
Reaktivní formy dusíku (RNS) zahrnují sloučeniny odvozené od oxidu dusnatého (NO). NO je klíčová signální molekula, která se v rostlinách podílí na řadě fyziologických funkcí. Mezi tyto funkce patří růst a vývoj, regulace vývoje kořenů, podpora klíčivosti semen nebo snížení počtu dormantů, gravitropismus, stomatální pohyby, senescence a reakce na abiotické a biotické stresové faktory.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Polyaminy

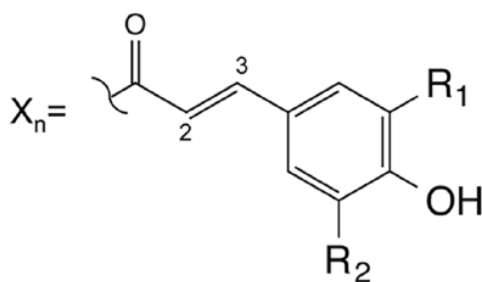
Polyaminy (PA) jsou nízkomolekulární alifatické polykationty přítomné ve všech živých buňkách prokaryotních i eukaryotních organismů. Vzhledem k jejich pozitivnímu náboji mohou tyto sloučeniny interagovat elektrostatickými vazbami s řadou buněčných makromolekul, jako jsou DNA, RNA a proteiny a následně ovlivnit jejich stabilizaci či destabilizaci. PA jsou zapojeny v řadě základních buněčných procesů včetně regulace genové exprese, translace, proliferace buněk, modulace buněčné signalizace a stabilizace membrány. PA mohou také regulovat buněčnou smrt, zejména apoptózu (Tabor a Tabor, 1984; Kumar *et al.*, 1997; Walden *et al.*, 1997; Malmberg *et al.*, 1998; Igarashi a Kashiwagi, 2000; Liu *et al.*, 2000; Thomas a Thomas, 2001; Seiler a Raul, 2005; Alcázar *et al.*, 2006a; Groppa a Benavides, 2007; Kusano *et al.*, 2007). Rostlinné PA mají významnou roli v procesech růstu a vývoje rostlin, v morfogenezi, embryogenezi, vývoji orgánů, senescenci listů, ale i v reakci rostlin na působení abiotických a biotických stresových faktorů (Wimalasekera *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2013; Wimalasekera *et al.*, 2015).

Nejběžnějšími PA vyskytujícími se v rostlinách jsou putrescin (butan-1,4-diamin, PUT), kadaverin (pentan-1,5-diamin, KAD), spermidin ([N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin], SPD), spermin ([N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin], SPM) a thermospermin (N'-[3-(3-aminopropylamino)propyl]butan-1,4-diamin, tSPM) (Obr. 1).



Obr. 1 Strukturní vzorce putrescinu, kadaverinu, spermidinu, sperminu a thermosperminu. Aminopropylové části (červeně) se přidávají ke čtyřuhlíkatému lineárnímu řetězci putrescinu (modře) za vzniku spermidinu, sperminu a thermosperminu (převzato a upraveno podle Bitrián *et al.*, 2012).

Většinou se PA v přírodě vyskytují ve volné formě. Díky svému pozitivnímu náboji za fyziologického pH jsou schopny asociace s polyanionty např. s DNA a RNA, čímž stimulují jejich biosyntézu a sbalování. PA mohou existovat ve dvou různých frakcích, rozpustné a nerozpustné – ve vodě. Rozpustná frakce zahrnuje volné PA a také PA konjugované s organickými kyselinami, zejména kyselinou hydroxyskořicovou (Obr. 2). Nerozpustná frakce se naopak skládá z PA, které jsou vázány na makromolekuly, jako jsou proteiny, polysacharidy buněčných membrán nebo záporně nabitě fosfolipidové složky na membránách, čímž dochází ke změně stability těchto membrán (Martin-Tanguy, 2001).



Konjugát		R ₁	R ₂	Δ ^{2,3}
X ₁	p-kumaroyl	H	H	
X ₂	kafeoyl	OH	H	
X ₃	dihydrokafeoyl	OH	H	dihydro
X ₄	feruloyl	OCH ₃	H	
X ₅	hydroxyferuloyl	OCH ₃	OH	
X ₆	sinapoyl	OCH ₃	OCH ₃	

Obr. 2 Strukturní vzorce hydroxyskořicových kyselin (HCA, p-kumaroyl, kafeoyl, dihydrokafeoyl, feruloyl, hydroxyferuloyl a sinapoyl), na které mohou být N-acylací vázány PA za vzniku mono-, di- nebo tri-konjugovaných amidů kyseliny hydroxyskořicové (HCAA). R₁ a R₂ označují substituenty různých HCA (převzato a upraveno dle Tiburcio *et al.*, 2014).

2.1.1 Biosyntéza polyaminů

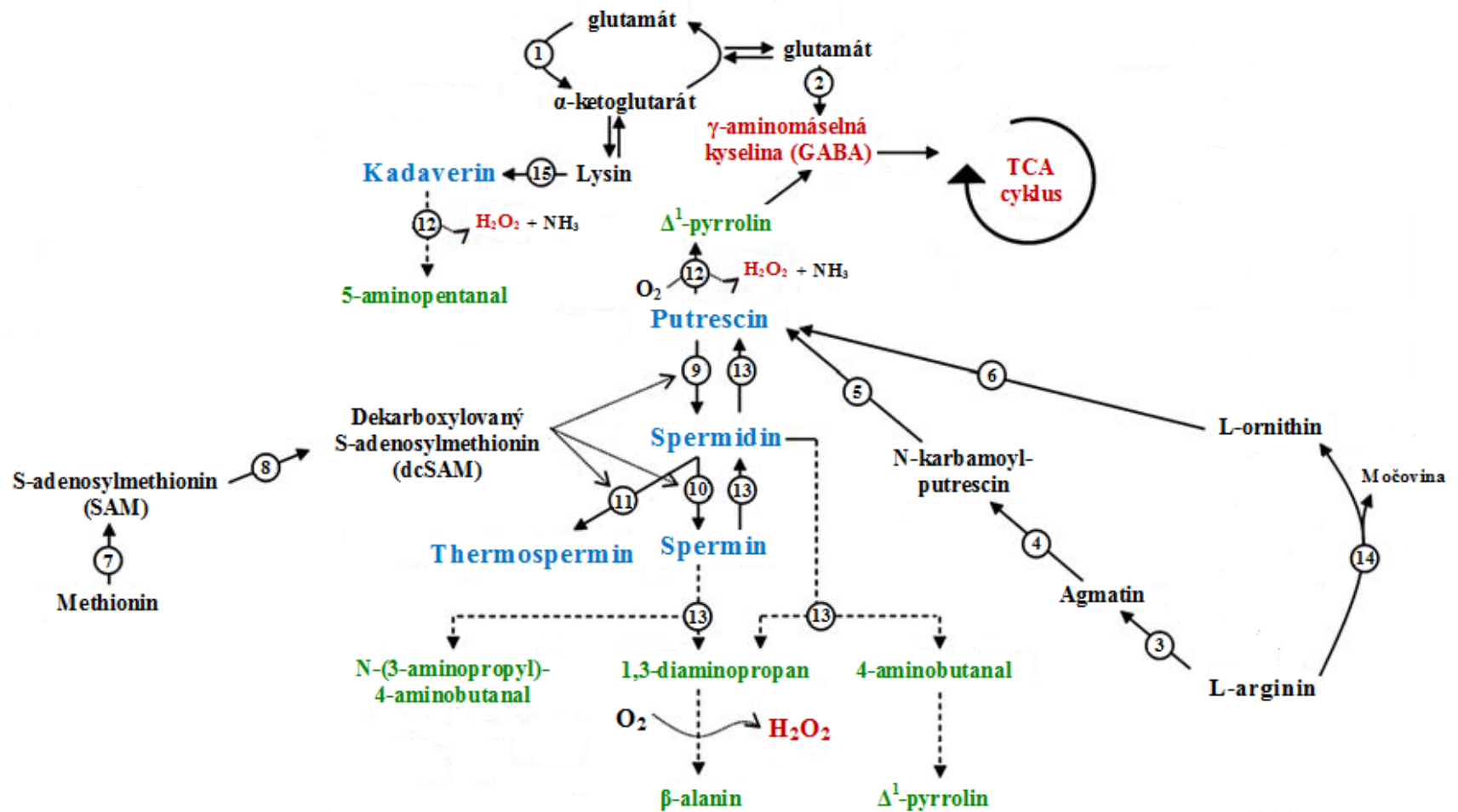
Výchozí sloučeninou při biosyntéze putrescinu je aminokyselina arginin. Jedna z drah biosyntézy putrescinu je zahájena přeměnou argininu za katalýzy enzymu arginasy (EC 3.5.3.1) na ornithin. Putrescin je následně syntetizován dekarboxylací aminokyseliny ornithinu v reakci katalyzované ornithindekarboxylasou (ODC, EC 4.1.1.17) (Obr. 3), která se nachází převážně v rostlinném cytosolu (Flemetakis *et al.*, 2004). Některé regulační mechanismy, které se podílí na regulaci aktivity ODC u savců, jako je například ubiquitin-nezávislá proteasomová degradace ODC indukovaná proteinem nazývaným "antizym", se v rostlinách nenachází (Murakami *et al.*, 1992; Kahana, 2007). Proto je pravděpodobné, že dráha ODC, stejně jako regulace aktivity ODC, se v rostlinách vyvíjela odlišně ve srovnání se savci, což mohlo vést k případné ztrátě této cesty u některých studovaných rostlinných druhů.

Biosyntéza putrescinu může probíhat i alternativním způsobem. Jedná se o dráhu, která pro jeho biosyntézu rovněž využívá arginin jako substrát (Slocum *et al.*, 1984). V této dráze probíhá konverze argininu na putrescin ve třech po sobě jdoucích enzymových reakcích (Obr. 3). Prvním krokem je enzymová dekarboxylace argininu pomocí arginindekarboxylasy (ADC, EC 4.1.1.19). Tento enzym se nachází převážně v chloroplastech fotosyntetických buněk (Borrell *et al.*, 1995; Bortolotti *et al.*, 2004). Produktem této enzymové reakce je agmatin, který slouží jako substrát pro

agmatiniminohydrolasu (AIH, EC, 3.4.3.12) za vzniku N-karbamoyl-putrescinu. Konečným krokem v ADC dráze je hydrolyza N-karbamoylputrescinu na putrescin za katalýzy N-karbamoylputrescinamidohydrolasou (CPA, EC 3.5.1.53) (Alcázar *et al.* 2005; přehledně shrnuto v Alcázar *et al.*, 2010).

Diamin putrescin je výchozí sloučeninou pro biosyntézu polyaminů sperminu a spermidinu (Obr. 3). PA s vyšší molekulovou hmotností (SPM, SPD a tSPM) jsou syntetizovány postupným přidáváním aminopropylových částí ke čtyřčlennému skeletu lineárního řetězce putrescinu (Obr. 1) enzymovými reakcemi katalyzovanými spermidinsynthasou (SPDS, EC 2.5.1.16) a sperminsynthasou (SPMS, EC 2.5.1.22) (Obr. 3). Alternativně thermosperminsynthasa (tSPMS, EC 2.5.1.79) tvoří thermospermin přidáním aminopropylové skupiny na opačný konec molekuly SPM. Donorem aminopropylových skupin je dekarboxylovaný S-adenosylmethionin (dcSAM), který je syntetizován dekarboxylací S-adenosyl-methioninu (SAM) pomocí SAM-dekarboxylas (SAMDC, EC 4.1.1.50) (Obr. 3). Dostupnost dcSAM ovlivňuje biosyntézu SPD a SPM (Hanfrey *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2006).

Biosyntéza dalšího významného biogenního diaminu kadaverinu vychází z aminokyseliny lysinu. Ten vzniká jako vedlejší produkt aspartátové dráhy při biosyntéze methioninu. Dekarboxylací lysinu, která je závislá na pyridoxalfosfátu, enzymem lysindekarboxylasou (LDC, EC 4.1.1.18) vzniká diamin KAD (Gill-Amado a Gomez-Jimenez, 2012) (Obr. 3).

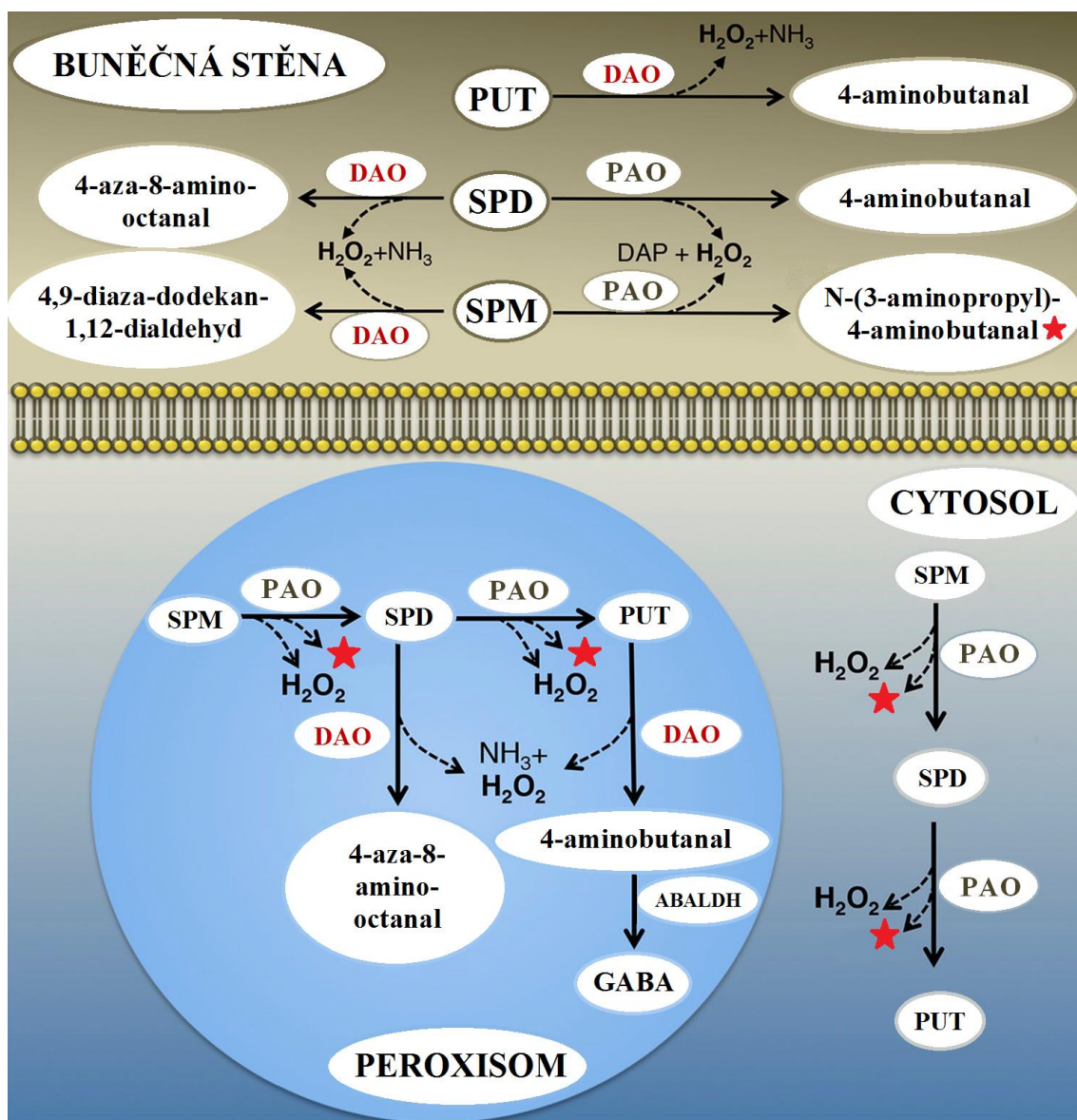


Obr. 3 Metabolismus polyaminů a interakce s jinými metabolickými drahami. Biosyntetické dráhy pro polyaminy a příbuzné metabolity jsou označeny kontinuálními liniemi. Přerušované čáry ukazují katabolické procesy. Čísla se týkají následujících enzymů: 1 glutamát-synthasa, 2 glutamát-dekarboxylasa, 3 arginin-dekarboxylasa, 4 agmatin-iminohydrolasa, 5 N-karbamoyl-putrescin-amidohydrolasa, 6 ornithin-dekarboxylasa, 7 SAM-synthetasa, 8 SAM-dekarboxylasa, 9 spermidin-synthetasa, 10 spermin-synthetasa, 11 thermospermin-synthetasa, 12 diaminoxidasa, 13 polyaminoxidasa, 14 arginasa, 15 lysin-dekarboxylasa (převzato a upraveno dle Alcázar *et al.*, 2010).

2.1.2 Katabolismus polyaminů

Katabolismus polyaminů je rozhodující pro regulaci hladiny PA v buňkách. PA jsou oxidačně katabolizovány aminoxidasami. První třídou těchto enzymů jsou diaminoxidasy (DAO, EC 1.4.3.22) (Wimalasekera *et al.*, 2011; Wimalasekera *et al.*, 2015). DAO jsou homodimery obsahující měď jako kofaktor (Zeller, 1938; Federico a Angelini, 1991; Brazeau *et al.*, 2004). Rostlinné DAO přednostně katalyzují oxidaci diaminu putrescinu na atomu uhlíku sousedícím s primární aminoskupinou, čímž vzniká 4-aminobutanal a současně dochází k uvolňování NH_3 a H_2O_2 . 4-aminobutanal je dále převeden na Δ^1 -pyrrolin a kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) katalytickým účinkem aminobutyraldehyddehydrogenasy (ABALDH, EC 1.2.1.19, synonyma: 1-pyrrolindehydrogenasa) Tato reakce je lokalizována v peroxisomech (Obr. 4). GABA po své transaminaci a oxidaci poskytuje kyselinu jantarovou, která vstupuje do Krebsova cyklu. Tím je zajištěna recyklace uhlíku a dusíku vznikajících při degradaci putrescinu (Rea *et al.*, 2004; Wimalasekera *et al.*, 2015). Katabolismus diaminu kadaverinu je rovněž realizován pomocí diaminoxidas. Jeho oxidací vzniká 5-aminopentanal, amoniak a H_2O_2 (přehledně shrnuto v Cona *et al.*, 2006; Bunsupa *et al.*, 2012b) (Obr.3).

Druhou třídou enzymů, které katabolizují PA jsou polyaminoxidasy (PAO, EC 1.5.3.17), jejichž kofaktorem je flavinadenindinukleotid (FAD). PAO přednostně oxidují spermidin a spermin na atomech uhlíku sousedících se sekundární aminoskupinou, a mohou být rozděleny do dvou skupin. První skupina se podílí na oxidaci PA s využitím molekulárního O_2 (donor elektronů) na konečné produkty 1,3-diaminopropan (DAP) a H_2O_2 . V závislosti na typu oxidovaného PA (SPD nebo SPM) vzniká také 4-aminobutanal případně N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal. K těmto reakcím dochází v apoplastu buněk (Obr. 4).



Obr. 4 Oxidační dráhy polyaminů nacházející se v cytosolu, apoplastu a peroxisomech. PA jsou oxidačně deaminovány pomocí DAO a PAO produkujících odpovídající aminoaldehydy a H_2O_2 . Oxidací prostřednictvím DAO vzniká z PUT 4-aminobutanal, ze SPD 4-aza-8-amino-octanal a ze SPM 4,9-diaza-dodekan-1,12-dialdehyd. PAO katalyzují terminální oxidaci SPD nebo SPM produkující 4-aminobutanal nebo N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal. Červená hvězdička znázorňuje sloučeninu N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal (převzato a upraveno dle Tiburcio *et al.*, 2014).

Druhá skupina PAO katalyzuje zpětnou konverzi sperminu na spermidin a spermidinu na putrescin. Zároveň dochází k produkci 3-aminopropanalu a H_2O_2 a tyto reakce jsou lokalizovány v buněčném cytosolu (Obr. 4). (Bolkenius a Seiler, 1981; Moschou *et al.*, 2008; Fincato *et al.*, 2011; Wimalasekera *et al.*, 2015).

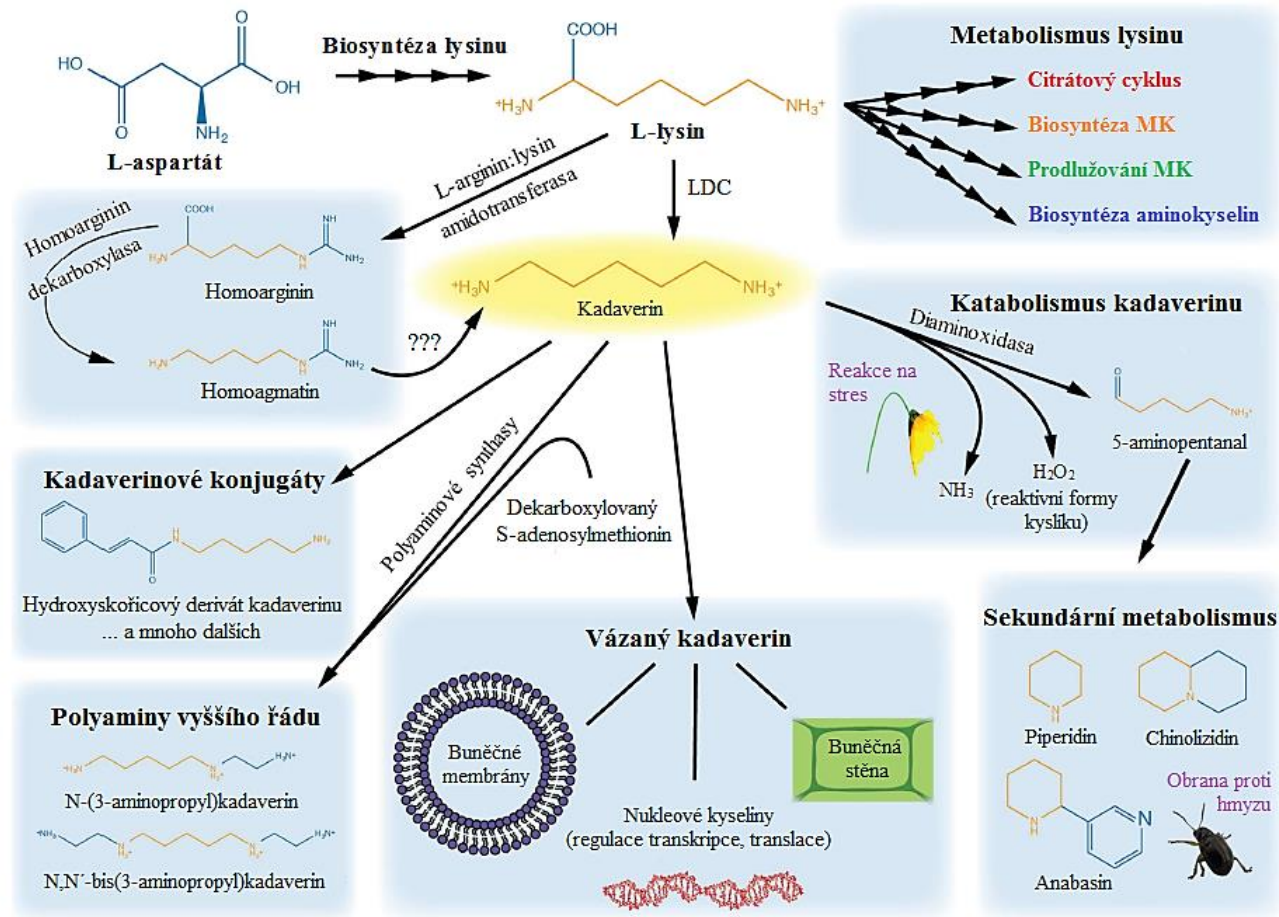
2.1.2.1 Metabolismus kadaverinu

Diamin kadaverin se u rostlin podílí především na jejich růstu a vývoji, buněčné signalizaci, přispívá ke stresové toleranci a obraně rostlin proti hmyzu. Metabolismus kadaverinu je spojen s několika biochemickými drahami (Obr. 5). Hlavním prekurzorem při biosyntéze kadaverinu je aminokyselina lysin. Lysin je dekarboxylován primárně pomocí lysindekarboxylasy (LDC), která se nachází v chloroplastech (Schoofs *et al.*, 1983; Wink, 1992; Bunsupa *et al.*, 2012a). U některých rostlin, jako je např. *Lathyrus sativus*, se předpokládá také syntéza kadaverinu z homoargininu prostřednictvím homoagmatinu (přehledně shrnuto v Bagni a Tassoni, 2001).

Kadaverin se v rostlinách podílí na vzniku PA vyšších řádů. Je známo, že S-adenosylmethionin (SAM) přenese N-aminopropylovou skupinu na kadaverin za vzniku N-(3-aminopropyl)kadaverinu a N,N'-bis(3-aminopropyl)kadaverinu (Igarashi *et al.*, 1986). O funkci těchto odvozených molekul je zatím známo jen velmi málo.

Katabolismus kadaverinu je realizován pomocí diaminoxidasy. Za účasti kyslíku a vody je kadaverin přeměněn na 5-aminopentanal, amoniak a peroxid vodíku (přehledně shrnuto v Cona *et al.*, 2006; Bunsupa *et al.*, 2012b). V některých rostlinných druzích, jako je např. *Leguminosae* slouží 5-aminopentanal jako kritický substrát pro syntézu sekundárních metabolitů nazývaných chinolizidinové alkaloidy, které se podílí na obraně rostlin proti hmyzu (Wink, 1992; Hirai *et al.*, 2000; přehledně shrnuto v Cona *et al.*, 2006; Bunsupa *et al.*, 2012a, b). Tyto alkaloidy jsou syntetizovány v chloroplastech, chrání rostliny proti herbivorům, a to buď odpuzením hmyzu, nebo jsou pro hmyz toxické v důsledku ovlivnění biosyntézy bílkovin, stability membrán nebo procesů v DNA a RNA (Wink, 1992, 2010; Bunsupa *et al.*, 2012a).

Metabolismus kadaverinu

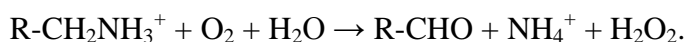


Obr. 5 Metabolismus kadaverinu: lysin slouží jako prekurzor kadaverinu a je rozhodující pro metabolismus mastných kyselin, cyklus kyseliny citronové a syntézu aminokyselin. Kadaverin může být konjugován s fenolickými látkami nebo použit pro vznik polyaminů vyšších řádů. Kadaverin může být oxidován nebo převeden na chinolizidinové alkaloidy. Vázaný kadaverin může ovlivnit vlastnosti buněčné stěny, stabilitu membrán, genovou expresi a stabilitu nukleových kyselin (převzato a upraveno dle Jancewicz *et al.*, 2016).

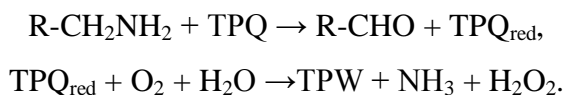
2.1.2.2 Aminoxidasy

PA jsou oxidačně deaminovány aminoxidasami (AO) za současné produkce H_2O_2 . Na základě přítomnosti rozdílného kofaktoru lze AO klasifikovat do dvou skupin: diaminoxidasy obsahující měď (DAO) a FAD-dependentní polyaminoxidasy (PAO). DAO a PAO se liší substrátovou specifitou, mechanismem oxidace substrátu a subcelulární lokalizací. Rostlinné DAO se vyskytují ve vysokých koncentracích u čeledi *Fabaceae* a volně se sdružují s buněčnými stěnami (přehledně shrnuto v Cona *et al.*, 2006).

DAO jsou homodimerní enzymy s vysokou afinitou pro oxidaci primárních aminoskupin PUT a CAD a nižší afinitou ke SPM a SPD (přehledně shrnuto v Moschou *et al.*, 2012). Oxidační deaminací primárního aminu vzniká aldehyd podle celkové reakce



Aktivní místo všech doposud charakterizovaných DAO obsahuje Cu^{2+} a organický kofaktor 2,4,5-trihydroxyfenylalanin chinon (TPQ). Katalytická reakce probíhá ping-pongovým mechanismem, přičemž se TPQ střídá mezi oxidovanou formou a dvěma elektrony redukovaným NH_2 -substituovaným aminochinolem (TPQ_{red}) podle poloreakcí (přehledně shrnuto v Dove a Klinman, 2001)



Polyaminoxidasy jsou monomerní enzymy, které nesou nekovalentně vázanou molekulu FAD jako kofaktor. Katalyzují oxidaci SPD a SPM (přehledně shrnuto v Tavladoraki *et al.*, 2012). PAO se řadí do dvou skupin podle toho, zda terminálně oxidují PA, nebo zda katalyzují jejich zpětnou konverzi. První skupina PAO se nachází pouze v rostlinách a bakteriích. Tyto PAO oxidují uhlík na vnitřní straně N^4 SPD a SPM, čímž vzniká 1,3-diaminopropan a H_2O_2 , a dále, podle typu oxidovaného substrátu, také 4-aminobutanal a N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal. PAO které katalyzují zpětnou konverzi PA oxidují uhlík na vnější straně N^4 SPM a SPD. Jedním

z produktů je u této skupiny 3-aminopropionaldehyd (APAL) (přehledně shrnuto v Moschou *et al.*, 2012).

DAO a PAO ovlivňující hladinu polyaminů v organismu se podílejí téměř na všech aspektech růstu a vývoje rostlin, stejně jako mají významnou roli v obranných reakcích rostlin na působení abiotických i biotických stresových faktorů, jako je např. sucho, teplo, salinita, poranění a invaze patogenů. PAO jsou diferencovaně regulovány jako odezva na kyselinu abscisovou (ABA), kyselinu jasmonovou a kyselinu salicylovou, což svědčí o významu PAO při stresových reakcích (Wimalasekera *et al.*, 2015).

2.1.2.3 Aminoaldehyddehydrogenasy

Aldehyddehydrogenasy (ALDH) jsou enzymy podílející se na metabolismu endogenních i exogenních aldehydů. Enzymy rodiny ALDH používají jako kofaktory pro konverzi aldehydů na odpovídající karboxylové kyseliny NAD^+ nebo NADP^+ (přehledně shrnuto v Bartels a Sunkar, 2005). Mezi zástupce těchto enzymů patří aminobutyraldehyddehydrogenasa (ABALDH, EC 1.2.1.19), guanidinobutyraldehyddehydrogenasa (GBALDH, EC 1.2.1.54). ABALDH i GBALDH vykazují zejména u rostlin velmi širokou substrátovou specifickou, což je příčinou jejich označení za aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) (Šebela *et al.*, 2000; Tylichová *et al.*, 2007). ALDH se nachází ve všech rostlinných druzích. Rostlinné ALDH jsou lokalizovány v mnoha vnitrobuněčných kompartmentech včetně cytosolu, mitochondrií, plastidů chloroplastů, chromoplastů, leukoplastů, peroxisomů a mikrosomů (Mitsuya *et al.*, 2009; Missihoun *et al.*, 2011).

Aminoaldehyddehydrogenasy jsou enzymy, které se společně s DAO a PAO podílí na katabolismu PA v rostlinách. Jak bylo prokázáno, vznikající aminoaldehydy jsou působením enzymů DAO a PAO dále metabolizovány pomocí NAD^+ -dependentních aminoaldehyddehydrogenas (Šebela *et al.*, 2000), které katalyzují přeměnu ω -aminoaldehydů na odpovídající ω -aminokyseliny v přítomnosti koenzymu NAD^+ .

Koncovými produkty katabolismu SPM a SPD pomocí rostlinných PAO jsou 4-aminobutanal (ABAL) a N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal za současného vzniku 1,3- diaminopropanu (DAP) a H_2O_2 (Šebela *et al.*, 2000). ABAL je dále oxidován na kyselinu γ -aminomáselnou (GABA), která se účastní různých fyziologických procesů (Duhazé *et al.*, 2002; Shelp *et al.*, 1999). DAP je dále konvertován na 3-aminopropionaldehyd (APAL) (Duhazé *et al.*, 2002). DAP patří k prekurzorům

β -alaninu (prostřednictvím APAL). Tyto prekurzory mohou být dále trimethylovány za vzniku osmoprotektivního β -alaninbetainu.

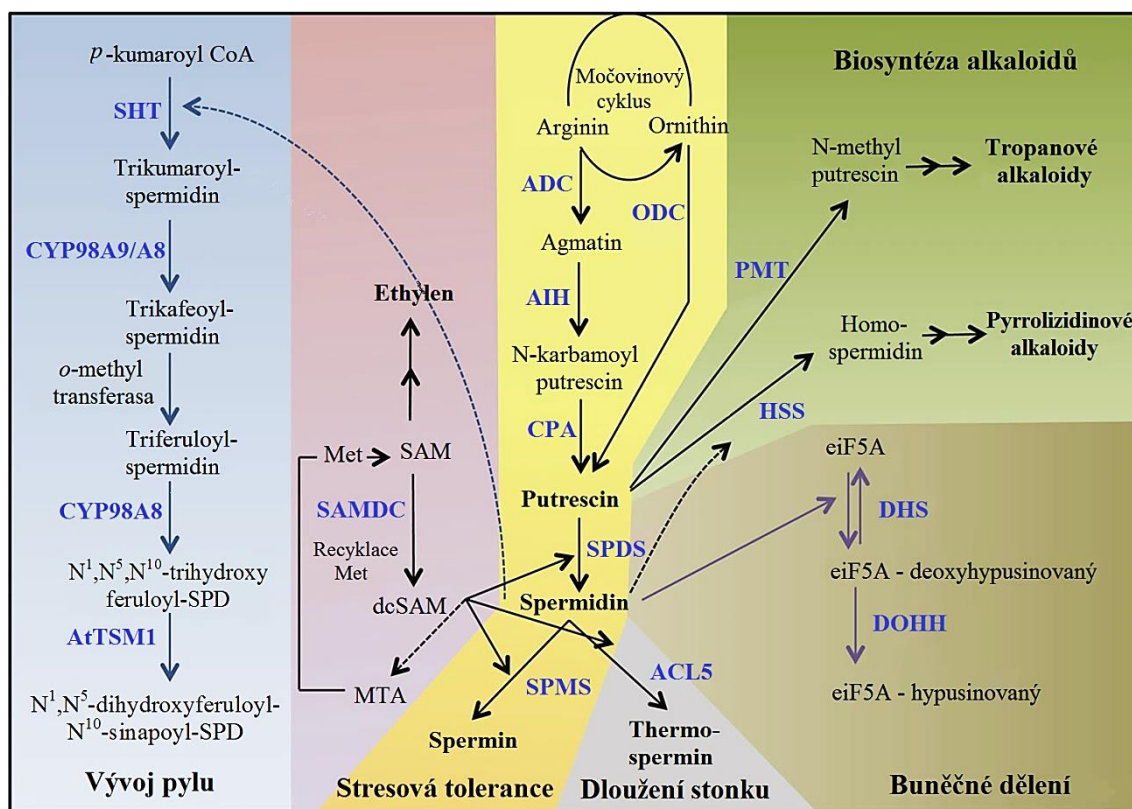
Za fyziologických podmínek AMADH obvykle existuje jako tetramer (4 x 57 kDa). Každá podjednotka obsahuje tři důležité domény, katalytickou, oligomerizační a doménu vytvářející kapsu, do níž je vázán koenzym. Z hlediska isoelektrického bodu, jehož hodnota se obvykle nachází mezi 5 a 6, jsou AMADH kyselými proteiny (Johansson *et al.*, 1998, Tylichová *et al.*, 2007). Hrachová AMADH sice neoxiduje betainový aldehyd, jeho N-koncová aminokyselinová sekvence se však podobá sekvenci různých rostlinných betainaldehyddehydrogenas (BADH, EC 1.2.1.8) (Šebela *et al.*, 2000). BADH nacházející se v rostlinách jsou intracelulární enzymy, které katalyzují tvorbu glycinbetainu využívaného jako kompatibilní osmolyt v buňkách (Weretilnyk a Hanson, 1990). Glycinbetain se u některých rostlinných druhů (ne však u hrachu) hromadí v buňkách jako reakce na zvýšenou salinitu prostředí (Nuccio *et al.*, 1999).

Nejlépe prozkoumanými AMADH jsou enzymy purifikované z hrachu setého (*Pisum sativum*), které jsou označovány jako PsAMADH1 a 2. Oba isoenzymy obsahují 503 aminokyselin, z nichž 81 % se u obou isoenzymů shoduje a 92 % aminokyselin vykazuje podobnost (Brauner *et al.*, 2003). Hrachová AMADH oxiduje různé ω -aminoaldehydy s délkou uhlíkového řetězce v intervalu C3-C6 na odpovídající ω -aminokyseliny (Šebela *et al.*, 2000). Vzhledem k této skutečnosti se mohou AMADH1 a AMADH2 podílet na syntéze různých osmoprotektantů jako je kyselina γ -aminomáselná a β -alaninu (Brauner *et al.*, 2003).

2.2 Úloha polyaminů u rostlin

PA jsou malé organické báze nacházející se ve všech živých organismech. PA se podílí např. na ochraně makromolekul, udržování buněčného pH, odstraňování kyslíkových radikálů (Liu *et al.*, 2007). PA hrají významnou roli v regulaci růstu, vývoje a v reakcích na působení abiotických a biotických stresových faktorů. Ovlivňují řadu buněčných procesů, jako je např. buněčné dělení, diferenciace, apoptóza, syntéza a funkce proteinů a nukleových kyselin. Tato rozmanitost funkcí pochází částečně ze schopnosti PA interagovat s negativně nabitými částmi molekul, jako jsou proteiny, lipidy a nukleové kyseliny (přehledně shrnuto v Masson *et al.*, 2017). PA mohou také působit jako zdroj reaktivních forem kyslíku (ROS), ale zároveň i jako jejich lapače

a aktivátory klíčových antioxidačních enzymů (přehledně shrnuto v Pottosin a Shabala, 2014). Tyto vlastnosti shrnuje Obr. 6.



Obr. 6 Metabolické dráhy úlohy polyaminů (PA) u rostlin. Je znázorněno propojení mezi biosyntézou polyaminů, biosyntézou entylenu, konjugací PA za vzniku fenylpropanoidů, biosyntézou tropanových a pyrrolizidinových alkaloidů a eiF5A hypusinací. Jednotlivé biologické funkce jsou zobrazeny v samostatných větvích. ADC arginindekarboxylasa, ACL5 acaulis5 (resp. thermosperminsynthasa), AIH agmatiniminohydrolasa, AtTSM1 *Arabidopsis thaliana* Tapetum specifická methyltransferasa 1, CPA N-karbamoyldehydrogenasa, CYP98A8/A9 cytochrom P450 98A8/A9, DHS deoxyhypusinsynthasa, DOHH deoxyhypusinhydrolasa, dcSAM dekarboxylovaný S-adenosylmethionin, HSS homospermidinsynthasa, Met methionin, MTA 5'-methylthioadenosin, ODC ornithindekarboxylasa, PMT PUT N-methyltransferasa, SAM S-adenosylmethionin, SAMDC S-adenosylmethionindekarboxylasa, SHT SPD hydroxycinnamoyltransferasa, SPDS spermidinsynthasa, SPMS sperminsynthasa (převzato a upraveno dle Tiburcio *et al.*, 2014).

2.2.1 Úloha polyaminů za fyziologických podmínek v růstu a vývoji rostlin

PA jsou přítomny ve všech kompartmentech rostlinných buněk, což svědčí o jejich nepostradatelné povaze a roli v různých buněčných procesech. Rostlinné polyaminy jsou detekovatelné zejména v aktivně rostoucích pletivech. Koncentrace se může výrazně lišit v závislosti na druhu, orgánu a typu pletiva rostlin, stejně jako na vývojové fázi (přehledně shrnuto v Hussain *et al.*, 2011).

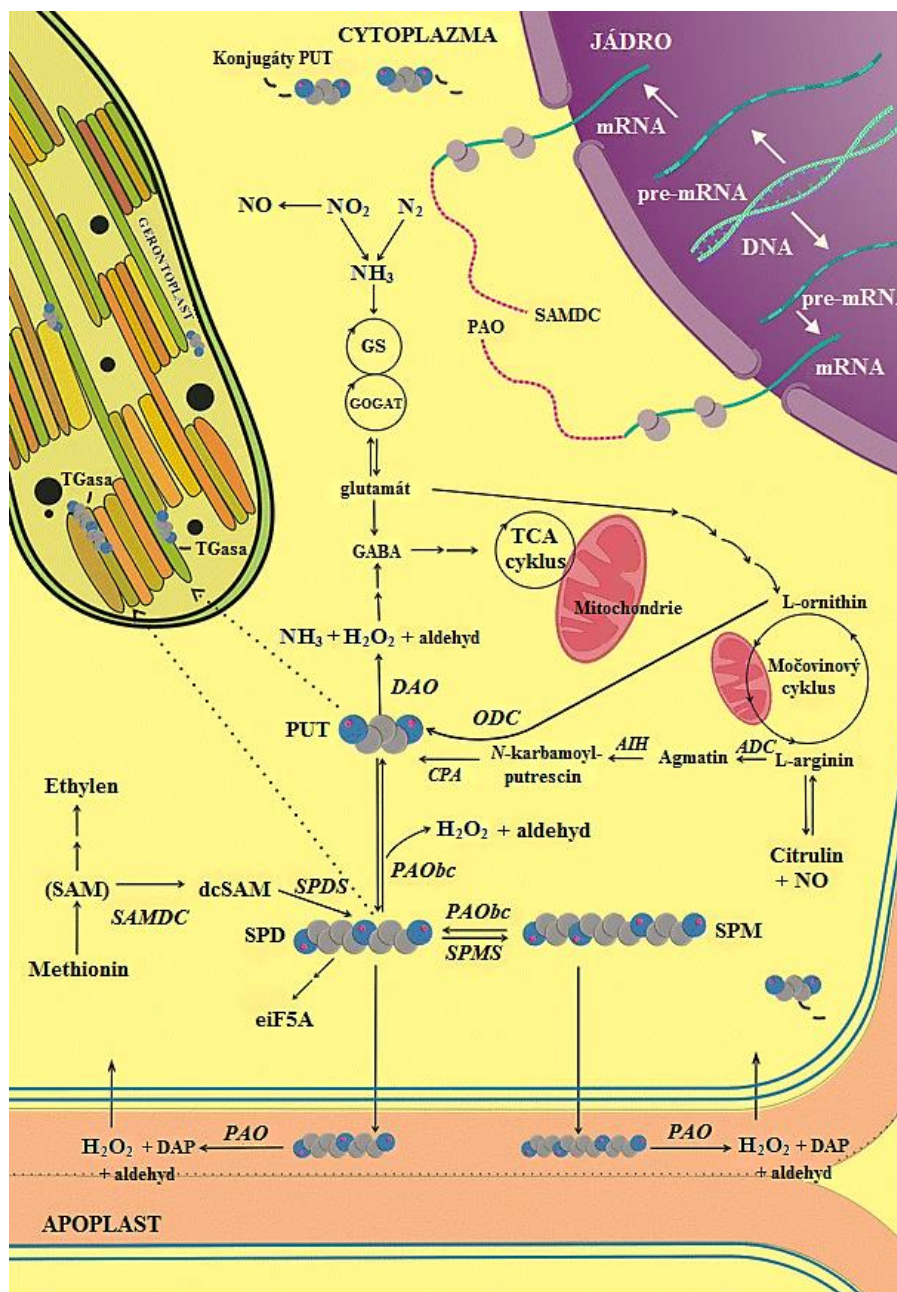
PA jsou v rostlinách zapojeny do řady fyziologických procesů, jako je např. embryogeneze, organogeneze, iniciace a vývoj květů, dozrávání ovoce a senescence listů (Gupta *et al.*, 2013). Rozmanitost funkcí polyaminů vyplývá z jejich schopnosti interagovat s řadou makromolekul, jako jsou např. proteiny, nukleové kyseliny a fenolické sloučeniny. Tvorba těchto sloučenin zároveň chrání makromolekuly před degradací a případnou modifikací (přehledně shrnuto v Masson *et al.*, 2017). Některé práce ukazují, že PA konjugáty jsou ve srovnání s původními sloučeninami účinnější a vykazují silnější ochrannou antioxidační aktivitu (Edreva *et al.*, 2007).

2.2.1.1 Úloha polyaminů v senescenci listů

PA se podílejí na tvorbě signalizačních molekul a metabolitů, které přímo souvisejí s odpovědí buněk na senescenci. Jedná se zejména o ethylen, kyselinu γ -aminomáselnou (GABA), aminokyseliny (glutamin, glutamát), arginin, ornithin, H_2O_2 , NO a translační faktor (prekurzor eIF5A) (Sobieszczuk-Nowicka *et al.*, 2016).

Listová senescence je nejdůležitějším studovaným procesem stárnutí u rostlin a je konečným krokem v jejich růstu a rozvoji (přehledně shrnuto ve Woo *et al.*, 2013). Na začátku procesu senescence je pozorován rychlý nárůst hladiny volných PA, jmenovitě PUT, SPD a SPM, což je způsobeno současnou up-regulací souboru genů kódujících proteiny zapojené v biosyntéze PA (Obr. 7). Zároveň dochází ke tvorbě PUT konjugátů, které se ve vysokých koncentracích hromadí v senescentních listech. V pozdějších fázích procesu senescence dochází ke zvýšení aktivit PA katabolických enzymů a hladiny PA začnou klesat. Katabolismus PA dále pokračuje zpětnou konverzí PUT na SPD a SPM, které jsou transportovány do apoplastu, kde produkují H_2O_2 a DAP. Obě tyto látky se poté mohou podílet na degradačních procesech doprovázejících senescenci.

PA přispívají ke stresové reakci související se senescencí inhibicí fotosyntézy a smrtí buněk, konverzí chloroplastu na gerontoplast a buněčnou dezintegrací. Tuto skutečnost naznačují posttranslační modifikace plastidových proteinů pomocí PA (proteiny konjugované s PA) přes transglutaminasy (TGasy) během senescence (Sobieszczuk-Nowicka *et al.*, 2016; přehledně shrnuto v Sobieszczuk-Nowicka 2017).



Obr. 7 Úloha PA v senescenci listů. *ADC* arginindekarboxylasa, *AIH* agmatiniminohydrolasa, *CPA* N-karbamoylputrescinamidohydrolasa, *ODC* ornithindekarboxylasa, *SAM* S-adenosylmethionin, *SAMS* SAM-synthetasa, *SAMDC* SAM-dekarboxylasa, *SPDS* spermidinsynthasa, *SPMS* sperminsynthasa, *PAO* polyaminoxidasa, *PAObc* polyaminoxidasa zpětné konverze, *DAO* diaminoxidasa (převzato a upraveno dle Sobieszczuk-Nowicka, 2017).

2.2.2 Úloha polyaminů v reakci rostlin na stres

Rostliny vystavené stresovým podmínkám reagují na tyto podněty zvýšenou akumulací PA v buňkách. PA jsou zapojeny v obranných mechanismech rostlin aktivovaných v důsledku působení řady biotických a abiotických stresových faktorů, např. sucho, salinita, oxidační stres, toxicita těžkých kovů, vysoká/nízká teplota, hypoxie, UV-B záření, ozón, osmotický stres, mechanické poranění, patogeny a herbicidy. Vysoké hladiny PA v buňce korelují s tolerancí rostlin na širokou škálu environmentálních stresů. Změny hladiny PA se projevují zejména změnami na úrovni biosyntézy PA, jejich oxidací a/nebo interakcí s jinými cestami v reakci na stres (přehledně shrnuto v Hussain *et al.*, 2011; Rangan *et al.*, 2014 a Tiburcio *et al.*, 2014).

2.2.2.1 Mechanismus zapojení polyaminů v reakci rostlin na stres

Pro získání odpovědí na základní biologické otázky týkající se úlohy a mechanismu působení zvýšené koncentrace PA u rostlin v důsledku vlivu stresových faktorů bylo využito několika klasických přístupů, jako je např. studium vlivu exogenní aplikace PA, mutací ovlivňujících biosyntézu PA a použití inhibitorů enzymů zapojených do biosyntetické dráhy PA. O významné úloze PA v reakcích rostlin na působení stresových faktorů hovoří čtyři typy studií: (1) zvýšená regulace biosyntézy PA v rostlinách pomocí transgenní exprese obecně zvyšuje toleranci rostlin k různým stresům, (2) zvýšená akumulace PA v rostlinách během stresových podmínek je doprovázena zvýšenou aktivitou enzymů biosyntézy PA a expresí jejich genů, (3) mutace genů spojených s negativním ovlivněním biosyntézy PA vedou obecně k menší toleranci rostliny vůči abiotickému stresu a (4) zatímco exogenní dodávka PA činí rostliny odolnější vůči stresu, inhibice jejich biosyntézy je činí k poškození stresem náchylnější (Borrell *et al.*, 1996; Watson *et al.*, 1998; Velikova *et al.*, 2000; Hoth *et al.*, 2002; Navakouidis *et al.*, 2003; Urano *et al.*, 2003; Urano *et al.*, 2004; Alcázar *et al.*, 2006a; Rodríguez-Kessler *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Bylo prokázáno, že exogenní aplikace PA může v různé míře (1) zachovat integritu membrán rostlinných buněk, (2) minimalizovat inhibici růstu způsobenou stresem, (3) zmírnit expresi osmoticky citlivých genů, (4) redukovat obsah superoxidových radikálů a H₂O₂, (5) redukovat akumulaci Na⁺ a Cl⁻ iontů v různých orgánech a (6) zvyšovat aktivitu antioxidantních enzymů (Ali, 2000; Iqbal a Ashraf, 2005; Tang a Newton, 2005; Ndayiragiji a Lutts, 2006; Afzal *et al.*, 2009; Yiu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

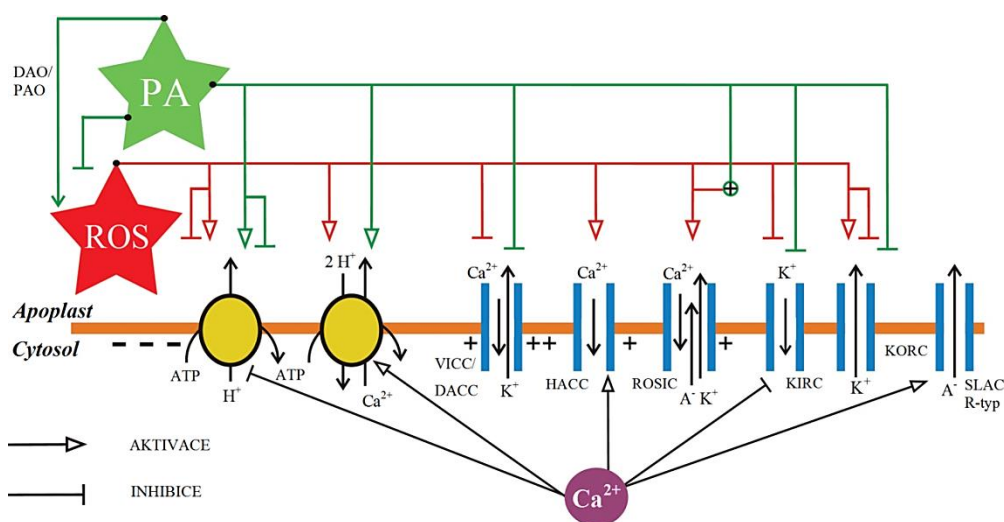
Účinnost jednotlivých PA se může významně lišit, což může být způsobeno rozdíly v absorpci, transportu a schopnosti využití jednotlivými druhy rostlin (přehledně shrnuto v Hussain *et al.*, 2011).

PA – signální molekula v reakci na stres

Změna hladiny PA může mít signální funkci aktivující procesy vedoucí k aktivaci obranných mechanismů rostliny. Je známo, že změněné koncentrace endogenních PA se podílí na tvorbě komplexů polyamin-RNA.

PA - regulace iontových kanálů a homeostázy Ca^{2+}

V reakci na vnější podněty může mít změněná koncentrace PA vliv na iontové kanály. Při fyziologických hodnotách pH jsou PA kladně nabitě molekuly a v důsledku toho mohou interagovat s negativně nabitými molekulami proteinů včetně iontových kanálů. PA jsou také silnými blokátory rychlých a pomalých vakuolárních kanálů, včetně vápenatých kanálů (Brüggemann *et al.*, 1999; Dobrovinskaya *et al.*, 1999a, b). Na přímou blokaci kanálů pomocí PA poukazuje i fakt, že vliv PA na iontové kanály je úměrný velikosti jejich náboje ($\text{SPM}^{4+} > \text{SPD}^{3+} > \text{PUT}^{2+}$) jak na úrovni celé buňky, tak jednoho kanálu (Brüggemann *et al.*, 1998). Garufi *et al.* (2007) naznačuje, že PA mohou rovněž regulovat aktivitu mnoha iontových kanálů nepřímo tak, že ovlivní potenciál cytoplazmatické membrány aktivací H^+ -ATPasy prostřednictvím zvýšené interakce s proteiny 14-3-3 (Obr. 8).

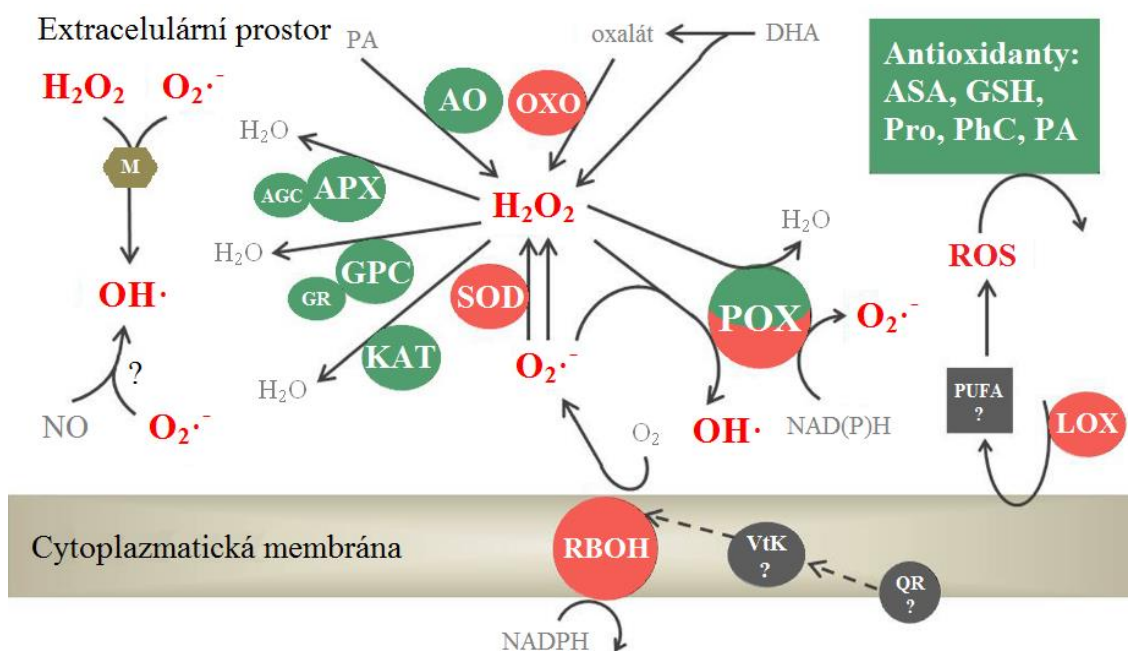


Obr. 8 Přehled efektů reaktivních forem kyslíku (ROS) a polyaminů (PA) na kanály a pumpy rostlinné cytoplazmatické membrány. Pro vysvětlení influxu Ca²⁺ indukovaného ROS je zahrnuta regulace cytosolickým Ca²⁺. Zleva doprava: P-typ H⁺ a Ca²⁺ ATPasy; NSCC (neselektivní kationový kanál) na napětí nezávislý (VICC) a aktivovaný depolarizací (DACC); hyperpolarizací aktivovaná NSCC (HACC); ROS-závislé slabé napětí závislé na vodivosti (ROSIC); vnitřní (KIRC) a vnější (KORC) rektifikační K⁺ selektivní kanály, a pomalu (SLAC) a rychle (R-typ) aktivované aniontové kanály (převzato a upraveno dle Pottosin *et al.*, 2014).

PA – kompatibilní sloučeniny vyšších rostlin

Rostliny se proti abiotickému stresu chrání aktivací řady obranných mechanismů. Mezi základní strategie ochrany a přežití patří akumulace kompatibilních sloučenin. Kompatibilní rozpustné látky jsou netoxické molekuly, které slouží k udržování turgoru a za nepříznivých podmínek stabilizují makromolekulární struktury. PA indukované stresem jsou často považovány za lepší stabilizátory než jiné (např. prolin), jelikož lépe chrání biomolekuly a za stresových podmínek zabraňují denaturaci membrán (přehledně shrnuto v Hussain *et al.*, 2011).

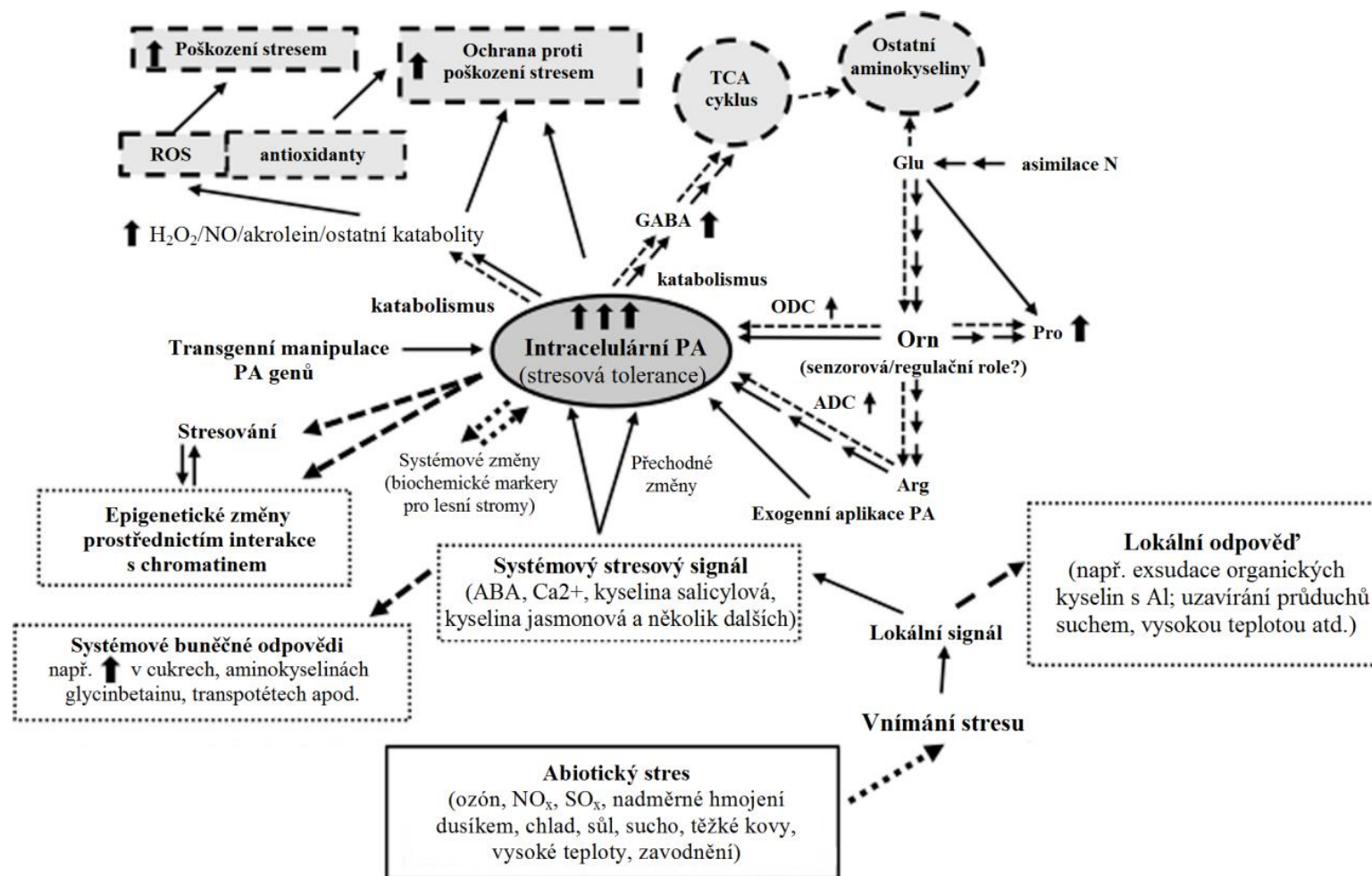
Kromě reakcí na vnější stimuly, na které reagují PA změnou koncentrace, mohou také měnit iontové kanály, stimulovat speciální druh syntézy bílkovin, sestavení 30S podjednotek ribozomů a tvorbu Ile-tRNA. Zvýšení tolerance vůči toxicitě těžkých kovů bylo popsáno pomocí změny titrů PA v kombinaci s epibrassinolidy, aktivní formou brassinosteroidů, které regulují dráhy kyseliny abscisové (ABA) a kyseliny indol-3-octové (IAA). Kromě toho, že samotné těžké kovy jsou pro rostliny toxické, navíc stimulují oxidační stres. Kombinace PA s brassinosteroidy moduluje kromě dráhy ABA a IAA a jejich kaskádových účinků na toleranci k těžkým kovům také hladiny antioxidantů jako jsou kyselina askorbová, glutathion apod. a dále antioxidantních enzymů jako je glutathionreduktasa (GR), superoxiddismutasa (SOD), katalasa (KAT), peroxidasa (POX) atd. (Obr. 9) (přehledně shrnuto v Rangan *et al.*, 2014).



Obr. 9 Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) a následné detoxikační/antioxidační reakce v apoplastu. Za produkci H_2O_2 jsou zodpovědné enzymy jako je NADPH oxidasa, superoxiddismutasa (SOD), peroxidasa (POX), aminoxidasa (AO) a oxalát oxidasa (OXO). POX buněčné stěny mohou také katalyzovat tvorbu $\text{O}_2^{\cdot-}$ a OH^\cdot nebo naopak detoxikaci H_2O_2 . Mezi antioxidační enzymy přítomné v apoplastu patří askorbátperoxidasa (APX), která se účastní askorbát-glutathionového cyklu, glutathionperoxidasa (GPC) a katalasa (KAT). V apoplastických tekutinách je rozpustný neenzymový antioxidant redukovaný askorbát (AsA) a glutathion (GSH), prolin (Pro), fenolické sloučeniny (PhC) a polyaminy (PA). V přítomnosti kovových kofaktorů (M) nebo oxidu dusnatého (NO) mohou také vznikat neenzymové zdroje ROS. Aktivita lipoxygenasy (LOX) může vytvářet produkty peroxidace lipidů (polynenasycené mastné kyseliny, PUFA), které se mohou případně také podílet na tvorbě ROS (převzato a upraveno dle Podgórska *et al.*, 2017).

2.2.2.2 Úloha polyaminů v reakci rostlin na abiotický stres

Je známo, že u rostlin vykazujících zvýšenou toleranci vůči abiotickému stresu, dochází v reakci na působení stresových faktorů ke zvýšení koncentrace PA (PUT, SPM a SPD) v buňkách (Ahmad *et al.*, 2012). Indukce většiny genů odpovídajících proteinů zapojených v biosyntéze PA během působení abiotických stresů naznačuje pravděpodobný funkční vztah mezi metabolismem PA, jejich zapojení v obranných mechanismech rostlin a abiotickými stresovými faktory (Obr. 10) (Shi *et al.*, 2013).



Obr. 10 Interakce mezi polyaminy (PA) a abiotickou stresovou odpovědí v rostlinách. Obrázek také ukazuje centrální úlohu ornithinu (Orn) v metabolické interakci PA s glutamátem (Glu), prolinem (Pro), argininem (Arg) a γ -aminomáselnou kyselinou (GABA). Více šipek naznačuje více kroků; přerušované šipky označují zvýšenou regulační roli; široké svíslé šipky naznačují zvýšení koncentrací nebo účinku (převzato a upraveno dle Minocha *et al.*, 2014).

2.2.2.3 Úloha polyaminů v reakci rostlin na biotický stres

Ačkoliv je věnována velká pozornost řady vědeckých pracovišť úloze a s tím korelujícím metabolismem PA u rostlin vystavených působení abiotického stresu, studie zaměřené na pochopení úlohy PA v reakci rostlin na patogenní organismy jsou omezené (přehledně shrnuto v Hussain *et al.*, 2011).

Během interakce rostlina-patogen dochází ke změnám metabolismu PA (Greenland a Lewis, 1984). Role PA u rostlin v rámci reakce na patogen je komplexní. Je to dáno skutečností, že PA jsou nejen nezbytné pro udržení životaschopnosti buněk, ale fungují zároveň jako signalizační molekuly regulující řadu reakcí, které rostlině pomáhají vyrovnat se s biotickým stresem. Tento efekt je dán působením přímo – PA, nebo zprostředkovaně v důsledku jejich katabolismu. Modulace metabolismu PA, tzn. hladina PA, je natolik důležitá pro výsledek interakcí rostlina-patogen, že nejen rostlina reaguje změnou koncentrace PA v reakci na patogeny, ale některé mikroorganismy disponují mechanismy pro vyvolání změny hladin PA v hostitelských pletivech (Walters a Wylie, 1986; Coghlan a Walters, 1990; Stes *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013).

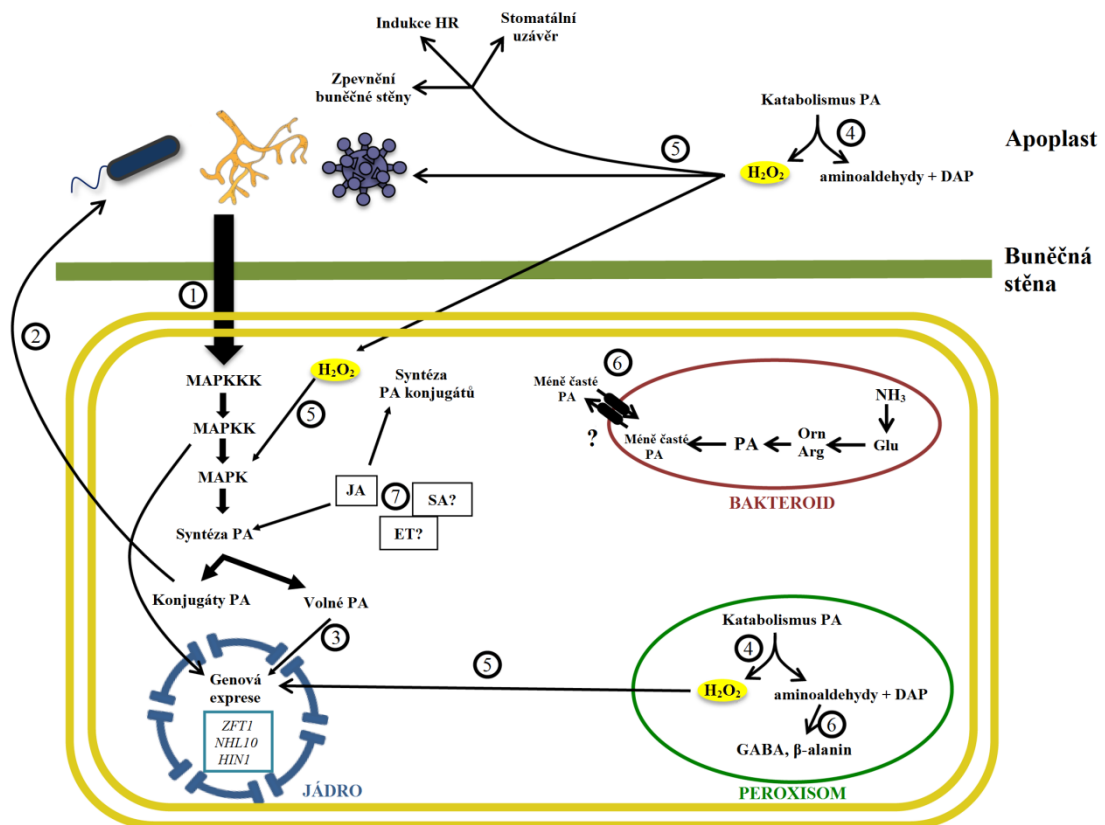
Současný výzkum ukazuje, že PA se aktivně účastní interakcí mezi rostlinami a patogeny. Bylo prokázáno, že během mikrobiální kolonizace dochází v infikovaných tkáních k nárůstu koncentrace PA a aktivity metabolických enzymů PA. Zdá se, že toto zjištění platí nezávisle na povaze patogenu, tj. ať už je to biotrof nebo nekrotrof.

Dosud provedené experimentální práce jasně naznačují, že při vytváření interakcí rostlina-mikrob vykazují PA důležité biologické aktivity:

- 1) Po rozpoznání mikrobu dochází ke změnám hladiny rostlinných PA; během tohoto procesu je obvykle aktivována biosyntéza PA, která vede k akumulaci volných a konjugovaných forem PA. Časová osa akumulace, stejně jako povaha akumulovaných PA, závisí na typu interakce rostlina-mikrob.
- 2) Výsledná úloha PA v interakcích mezi rostlinami a mikroby může být dána na základě různých mechanismů, tj. interakce PA s makromolekulami, regulace genové exprese, stability proteinu a indukce obranné signalizační dráhy. S akumulací PA často souvisí i indukce oxidace PA. Katabolismus PA je pro aktivaci obranných reakcí rostlin nezbytný, zejména pokud se jedná o PA v apoplastu.

3) Nedávné studie naznačují, že jak rostliny, tak mikroorganismy vyvinuly mechanismy pro modulaci PA ve svůj vlastní prospěch (přehledně shrnuto v Jiménez-Bremont *et al.*, 2014).

Souhrn interakcí mezi rostlinami a patogeny je znázorněn na Obr. 11.



Obr. 11 Metabolismus polyaminů v interakcích mezi rostlinami a mikroorganismy. (1) Přítomnost mikroorganismů je vnímána specifickými rostlinnými receptory, které aktivují dráhy signální transdukce. Kinasy, které se účastní těchto drah, stimulují expresi obranných genů a biosyntézu PA. Tento proces vede k akumulaci volných a konjugovaných PA. (2) Některé konjugované PA mají antimikrobiální účinek. (3) Volné PA mohou naopak přispět k aktivaci genové exprese, a to buď přímo, nebo prostřednictvím jejich katabolismu. (4) Oxidace PA pomocí DAO a PAO se odehrává v peroxisomu a apoplastu, a produkty reakcí jsou H_2O_2 , DAP a aminoaldehydy. (5) H_2O_2 působí jako signální molekula a stimuluje expresi obranných genů. Kromě toho ovlivňuje tato molekula růst patogenů, vyvolává zesílení buněčné stěny, stomatální uzávěr a aktivuje hypersenzitivní reakci (HR). Jiné produkty oxidace PA mohou hrát obrannou roli. Např. aminoaldehydy jsou prekurzory pro biosyntézu GABA (v cytosolu a peroxisomu), která se účastní ochrany rostlin a komunikace mezi rostlinami a bakteriemi. DAP je substrát pro syntézu méně častých PA a β -alaninu, sloučenin, které se zdají mít důležitou roli v průběhu rostlinného biotického stresu. (6) Fytohormony, jako je kyselina jasmonová (JA), přispívají k obranným reakcím stimulováním PA biosyntézy a konjugace. Úloha kyseliny salicylové (SA) a ethylenu (ET) v metabolismu PA je méně jasná (převzato a upraveno dle Jiménez-Bremont *et al.*, 2014).

2.3 Úloha reaktivních forem dusíku v regulaci metabolických drah

2.3.1 Základní charakteristika reaktivních forem dusíku

Reaktivní formy dusíku (RNS) zahrnují sloučeniny odvozené od oxidu dusnatého (NO). NO je klíčová signální molekula, která se podílí na řadě fyziologických funkcí v rostlinách. Mezi tyto funkce patří růst a vývoj, regulace vývoje kořenů, podpora klíčivosti semen nebo snížení počtu dormantů, gravitropismus, stomatální pohyby, senescence a reakce na abiotické a biotické stresové faktory. Kromě NO patří do této skupiny radikálové molekuly jako peroxydusitan (ONOO^-), radikál oxidu dusičitého (NO_2^\cdot), S-nitrosoglutathion (GSNO), oxid dusitý (N_2O_3), dimer oxidu dusičitého (N_2O_4), nitroso kation (NO^+) a anion oxidu dusnatého (NO^-) (Durner *et al.*, 1998; Beligni a Lamattina, 2000; Di Stasi *et al.*, 2002; Pagnussat *et al.*, 2002; Corpas *et al.*, 2004; Feechan *et al.*, 2005; Bethke *et al.*, 2006; Libourel *et al.*, 2006; Kolbert *et al.*, 2008; Begara-Morales *et al.*, 2013).

2.3.2 Produkce a degradace reaktivních forem dusíku

Na produkci NO v rostlinách se podílí enzym nitrátreduktasa (NR, EC 1.7.1.1). Jedná se o cytosolární protein, který hraje klíčovou roli v asimilaci dusičnanů. Katalyzuje redukcí dusičnanů na dusitany za použití NAD(P)H jako donoru elektronů (Lea, 1999). *In vivo* i *in vitro* analýzy rovněž prokázaly, že NR vytváří NO i z dusitanů (Yamasaki a Sakihama, 2000; Rockel *et al.*, 2002). NR tedy redukuje dusičnany a dusitany v listech a kořenech až na NO (Shi a Li, 2008).

Druhá možná dráha syntézy NO v rostlinách předpokládá tvorbu NO závislou na argininu, podobně jako je tomu v živočišných buňkách. Zde se jedná o NADPH-dependentní oxidaci L-argininu na L-citrulin a NO za účasti tří isoform NO-synthasy (NOS). Tento předpoklad potvrzuje zejména skutečnost, že tvorba NO v rostlinách je blokována inhibitory živočišné NOS. Jasný homolog k živočišné NOS však doposud nebyl z rostlin extrahován (Rasul *et al.*, 2012; přehledně shrnuto v Glyan'ko, 2013).

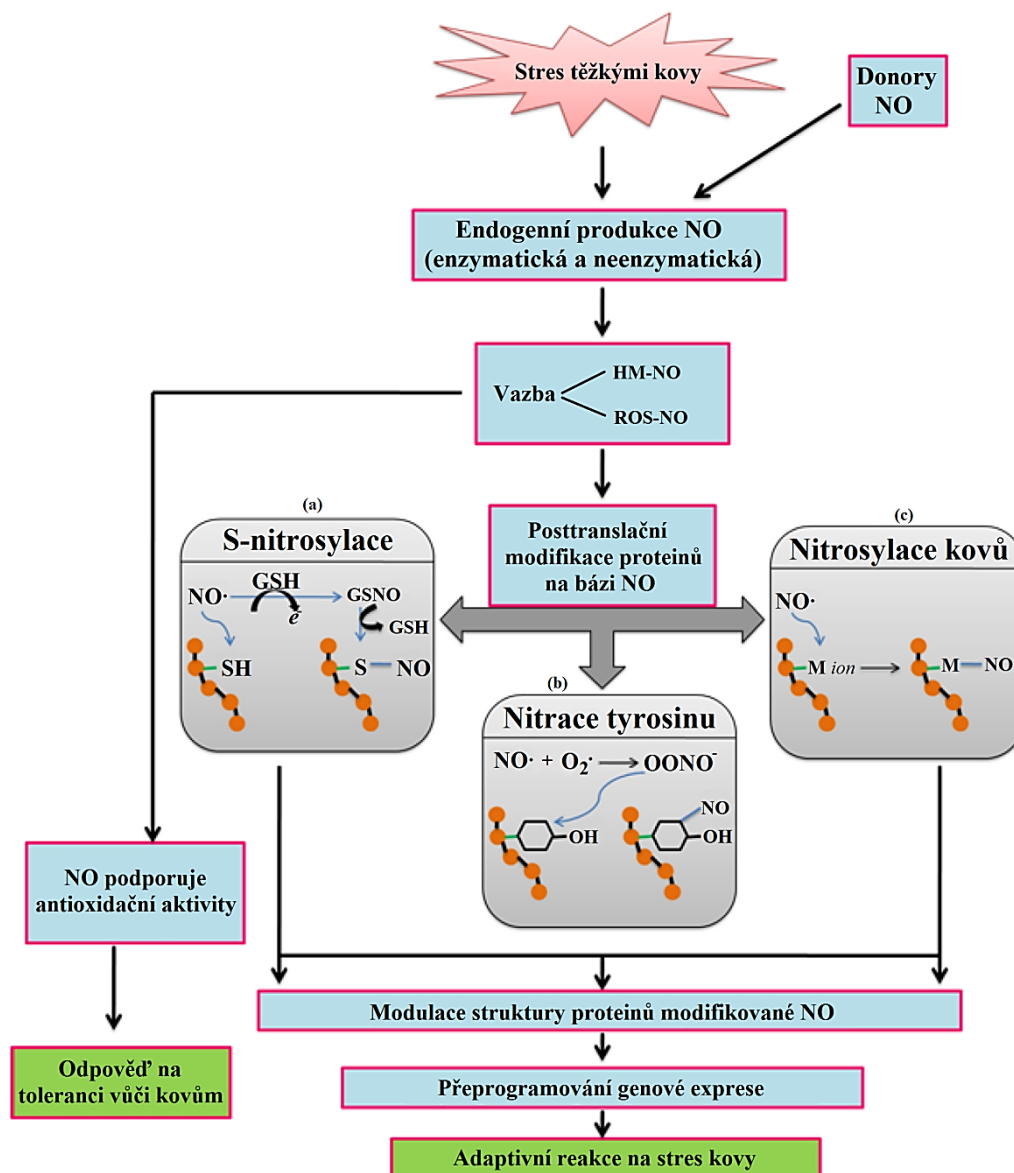
Kromě NR a předpokládaného enzymu podobnému živočišné NOS bylo prokázáno, že NO je produkován také z PA pomocí doposud necharakterizovaného mechanismu. NO může být tvořen také neenzymově z dusitanu, zejména v mitochondriích, kde působí dusitan jako akceptor elektronů v elektron-transportním řetězci za sníženého

přístupu kyslíku (Bethke *et al.*, 2004; Vanin *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2005; Tun *et al.*, 2006; Horchani *et al.*, 2011).

2.3.3 Zapojení reaktivních forem dusíku v regulaci metabolických drah

O metabolismu RNS v rostlinných buňkách je zatím známo jen velmi málo. RNS mohou zprostředkovávat posttranslační modifikace proteinů (PTM) zahrnující procesy jako vazbu na centrální atomy kovů, S-nitrosylaci thiolových a aminových skupin a nitraci tyrosinu a dalších aminokyselin (Obr. 12). Při nitraci tyrosinu dochází k přidání nitro (-NO₂) skupiny k jednomu ze dvou ekvivalentních ortho uhlíků aromatického kruhu tyrosinového zbytku za vzniku 3-nitrotyrosinu. Tato reakce může změnit funkci proteinu z důvodu začlenění velkých skupin do aromatického kruhu, které snižuje pKa fenolické skupiny a způsobuje sterické i elektronové poruchy ovlivňující funkční schopnost tyrosinu v elektron-transportních reakcích a schopnost udržení správné proteinové konformace. Nitrace proteinů je ovlivněna řadou faktorů jako je kvarterní struktura proteinu, prostředí, ve kterém se daný protein nachází, a samotný mechanismus nitrace. Vlivem těchto kovalentních modifikací může dojít ke ztrátě nebo naopak zisku proteinové funkce, nebo nedochází k žádným změnám (Begara-Morales *et al.*, 2013; Begara-Morales *et al.*, 2014; Begara-Morales *et al.*, 2015).

Při S-nitrosylaci dochází k vazbě NO skupiny na cysteinový zbytek proteinu vedoucí ke vzniku S-nitrosothiolů (RSNO), což může mít vliv na řadu proteinů (Obr. 12). Hlavním nízkomolekulárním S-nitrosothiolem je S-nitrosoglutathion (GSNO). Vzniká S-nitrosylací antioxidantu glutathionu (GSH). Předpokládá se, že GSNO slouží v buňkách jako hlavní zásobník NO. GSNO může dále zprostředkovat transnitrosylační reakce, při nichž dochází k tvorbě nového S-nitrosothiolu přenosem NO skupiny z GSNO na thiolovou skupinu cysteinu jiného peptidu nebo proteinu za vzniku RSNO. S-nitrosylace je reverzibilní proces. RSNO mohou být rozloženy za katalýzy enzymů pomocí thiooxidinů, nebo neenzymovou cestou pomocí antioxidantů, jako např. askorbátu nebo glutathionu. GSNO může být degradován za katalýzy S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR), která tak nepřímou reguluje hladiny RSNO (Begara-Morales *et al.*, 2013; Begara-Morales *et al.*, 2014; Begara-Morales *et al.*, 2015; Benhar *et al.*, 2008; Feechan *et al.*, 2005; Kneeshaw *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2001).



Obr. 12 Oxid dusnatý (NO) zprostředkovává posttranslační modifikace proteinů (NO-PTM). Obrázek ukazuje endogenně produkovaný NO a molekuly odvozené od NO (vzniklé (ne)enzymově), které jsou indukované konformačními změnami aktivity/funkce proteinů cílených proti stresu pomocí posttranslačních modifikací (PTM). Tři hlavní PTM zprostředkované pomocí NO jsou (a) S-nitrosylace, (b) nitrace tyrosinu, (c) nitrosylace kovů. Proteinové funkce modifikované pomocí NO vedou k přeprogramování genové exprese a přispívají k vytváření adaptivních reakcí proti abiotickému stresu, včetně stresu těžkými kovy v rostlinách (převzato a upraveno dle Sahay a Gupta, 2017).

Pomocí proteomické analýzy bylo nalezeno množství potenciálních rostlinných proteinů schopných nitrace a S-nitrosylace. Patří zde proteiny cytoskeletu, metabolické, redoxní, stresové a signální/regulační proteiny. Doposud bylo studováno pouze omezené množství proteinů s cílem zjistit, jak jsou tyto posttranslační modifikace regulovány na molekulární úrovni (Begara-Morales *et al.*, 2013; Begara-Morales *et al.*, 2014; Begara-Morales *et al.*, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Biologický materiál

V této práci byla použita semena hrachu setého (*Pisum sativum* cv. *Kudrnáč*, *P. sativum* cv. *Twinsset*). Hrách setý kultivar *Twinsset* je rezistentní k padlí, fusáriovému vadnutí i k viru PSbMV (Pea Seed-borne Mosaic Virus). Hrách setý kultivar *Kudrnáč* je naopak k těmto chorobám citlivý.

3.1.2 Použité chemikálie

- 1-amino-3,3-diethoxypropan (APAL) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- 2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxy-3-oxid (PTIO) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- 2-methoxyfenol (guajakol) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) (Carl Roth GmbH + Co, Německo)
- 4-chloro-1-naftol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- aceton (Lach-Ner, ČR)
- agar (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- akrylamid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- brilliant blue G (CBB G – 250) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- diethylether (Honeywell, Rumunsko)
- dihydrát disodné soli ethylendiamintetraoctové (EDTA) (Fluka, Švýcarsko)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Ing. Petr Švec - PENTA, ČR)
- dihydrochlorid putrescinu (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- dimethylsuofoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- dithiotreitol (DTT) (DUCHEFA BIOCHEMIE B.V., Nizozemsko)
- dusík kapalný (Messer, ČR)
- dusitan sodný (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- fenazin methosulfát (PMS) (Acros Organics, USA)
- glutathion (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- glycerol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)

- glycin (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR)
- křenová peroxidasa (Serva, Německo)
- kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR)
- kyselina L-askorbová (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- MES hydrát (hydrát kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- methanol (Lach-Ner, ČR)
- Murashige&Skoog médium s vitamíny (DUCHEFA BIOCHEMIE B.V., Nizozemsko)
- N,N'-metylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- n-butanol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- nikotinamidadeninukleotid (NAD⁺) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- nitrotetrazoliová modř (NBT) (Carl Roth GmbH + Co, Německo)
- o-fenylendiamin dihydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- pefabloc[®] SC (Fluka, Švýcarsko)
- peroxid vodíku (Ing. Petr Švec - PENTA, ČR)
- persíran amonný (Serva, Německo)
- poly(vinylpolypyrrolidon) (PVPP) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- sacharosa (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- SAVO (Unilever, ČR)
- tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)

3.1.3 Přístroje

- analytické předvážky (Radwag, Polsko)
- analytické váhy (Denver instrument, USA)
- autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo)
- centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)
- detekční zařízení BIO-RAD Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- digitální pH metr (Multical WTW, Německo)
- digitální předvážky 440-47 (KERN, Německo)
- elektroforetická komůrka (Bio-Rad, USA)
- laminární box (Angelantoni Life Science, Itálie)

- magnetická míchačka (IKA, Německo)
- mikrovlnná trouba (Tescoma, ČR)
- minitřepačka (BioSan, Lotyšsko)
- mrazicí box (Electrolux, Švédsko)
- mrazicí box (SANYO, Japonsko)
- pipety 5000, 1000, 200, 100, 20, 10, 5 μ l (Eppendorf, Německo)
- spektrofotometr Synergy H1 (BioTek, USA)
- termostat (BioSan, Lotyšsko)
- třepačka (BioSan, Lotyšsko)
- zdroj pro elektroforézu (Bio-Rad, USA)

3.1.4 Příprava rostlinného materiálu

Semena hrachu setého byla sterilizována 2 minuty v 70% ethanolu a poté 30 minut na třepačce v 100% roztoku SAVO. Následně byla semena 3x promyta sterilní destilovanou vodou a dána bobtnat do následujícího dne v 50 ml plastové zkumavce naplněné sterilní vodou. Po 24 h byla semena přenesena do sterilních čtvercových Petriho misek na sterilní filtrační papír navlhčený sterilní destilovanou vodou a byla ponechána 2 dny klíčit ve tmě při 25°C. Po 48 h byla naklíčená semena vysazena do čtvercových sterilních Petriho misek obsahujících 60 ml 0,5 x MS média (Tab. 1) s nebo bez přídavku testovaných sloučenin GSNO (S-nitrosoglutathion) a PTIO (2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxy-3-oxid) (Tab. 2). MS médium obsahuje makro- i mikroprvky a organické látky dle práce Murashige a Skoog (1962) a vitamíny podle práce Gamborg *et al.* (1968). Semena byla pěstována 7 dní ve fytotronu za podmínek světelného režimu 12 h světlo/12 h tma a teploty 25°C. Poté byly misky se semenáčky vyfoceny pro vyhodnocení délky nadzemní části a kořene (použit software ImageJ). Nadzemní část a kořen byly zvlášť zváženy a ihned zamrazeny zvlášť nadzemní část, kořen a apikální část kořene. Vzorčky byly dále použity pro stanovení enzymových aktivit a nativní elektroforézu.

Tab. 1 Příprava MS média

Složka	Navážka v g na přípravu 1 l média
MS médium s vitamíny	2,2
Agar	8
Sacharosa	5
MES hydrát	0,0975

Tab. 2 Příprava média pro pěstování rostlin – koncentrace testovaných látek

Sloučenina	Koncentrace zásobního roztoku	Objem zásobního roztoku přidáný do 60 ml MS média	Finální koncentrace v MS médiu
GSNO	100 mmol.l ⁻¹	60 µl	0,1 mmol.l ⁻¹
PTIO	250 mmol.l ⁻¹	24 µl	0,1 mmol.l ⁻¹

3.1.5 Zpracování rostlinného materiálu

Z jednotlivých částí semenáčků hrachu byly připraveny směsné vzorky homogenizací v tekutém dusíku v třecí misce na jemný prášek, které byly poté rozděleny po malých alikvotech do mikrozkušavek a uchovány v mrazicím boxu při -80°C pro další práci. Extrakce vzorků byla provedena přidáním 100 mmol.l⁻¹ K-fosfátového pufru (pH 7), který obsahoval 1% PVPP, 2 mmol.l⁻¹ DTT, 0,5 mmol.l⁻¹ pefabloc a 2 mmol.l⁻¹ EDTA, k zamraženému zhomogenizovanému směsnému vzorku v poměru 1:2 (w/v). Suspenze byla ponechána 20 minut na ledu za občasného promíchání na vortexu a poté byla centrifugována 20 minut při 16 000 g a teplotě 4°C. Supernatant byl odebrán do čistých mikrozkušavek a ihned použit pro stanovení aktivity enzymů a koncentrace proteinů.

3.1.6 Stanovení proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů byla zvolena metoda podle Bradforda využívající barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250. Barvivo se váže v kyselém prostředí na molekulu proteinu za vzniku modrého zbarvení. Barevná změna je úměrná množství proteinů ve vzorku (Bradford, 1976).

Nejprve byla připravena kalibrační řada standardů hovězího sérového albuminu (BSA) v koncentracích 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1,0 – 1,2 – 1,4 mg.ml⁻¹. Zásobní roztok Bradfordova činidla byl připraven smícháním 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 ml methanolu, 50 ml 85% kyseliny fosforečné a doplněním na objem 100 ml destilovanou vodou.

Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky na mikrodestičkovém readeru Synergy HT. Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 45 µl destilované H₂O, 5 µl H₂O/standard/vzorek a 200 µl Bradfordova činidla, které bylo připraveno ze zásobního roztoku ředěním destilovanou vodou v poměru 1:4. Reakční směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm.

3.1.7 Stanovení aktivity enzymů

Aktivita enzymu je definována jako nárůst koncentrace produktů nebo úbytek koncentrace substrátu za určitý časový interval enzymem katalyzované reakce. Jednotkou aktivity je katal. 1 katal udává množství enzymu, které přemění 1 mol substrátu na produkt za 1 sekundu. V případě použití spektrofotometrických metod lze využít Lambert-Beerův zákon

$$A = \varepsilon * c * l$$

A – absorbance, ε – molární absorpční koeficient ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l – délka optické dráhy (cm).

Aktivitu enzymu lze pak vypočítat z následujícího vztahu:

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

kde ΔA je změna absorbance, Δt je doba po kterou reakce probíhá (s), V udává celkový objem reakční směsi v jamce (ml).

3.1.7.1 Stanovení aktivity aminoaldehyddehydrogenasy

Při katabolismu diaminu putrescinu pomocí diaminoxidas dochází ke vzniku 3-aminopropionaldehydu (APAL), který může být dále metabolizován pomocí NAD^+ -dependentní aminoaldehyddehydrogenasy. Při této reakci dochází k oxidaci APALu na β -alanin za současné redukce NAD^+ na NADH. Tvorbu NADH lze měřit spektrofotometricky jako nárůst absorbance při 340 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu je $6220 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Šebela *et al.*, 2000).

Aktivita AMADH byla stanovena spektrofotometricky na mikrodestičkovém readeru Synergy HT na základě změny absorbance při 340 nm za časovou jednotku. Do jamek byl dle rozpisu v Tab. 3 nejprve pipetován Tris-HCl pufr (pH 9), poté NAD^+ , neředěný rostlinný extrakt, destilovaná H_2O a reakce byla zahájena přidávkem 20 mmol.l^{-1} APALu. Nárůst absorbance při 340 nm byl měřen po dobu 10 minut při 30°C .

Tab. 3 Složky reakční směsi pro stanovení aktivity AMADH

Použité roztoky	Koncentrace zásobního roztoku	Pipetovaný objem (μl)
Tris-HCl pufr (pH 9)	150 mmol.l ⁻¹	155
NAD ⁺	20 mmol.l ⁻¹	10
Rostlinný extrakt	-	15
H ₂ O	-	15
APAL v 0,2 mol.l ⁻¹ HCl	20 mmol.l ⁻¹	10

3.1.7.2 Stanovení aktivity diaminoxidasy

V reakci katalyzované diaminoxidasou (DAO) vzniká vedle aminoaldehydu jako druhý produkt peroxid vodíku. Ten ve sprážené reakci využívá peroxidasa k oxidaci guajakolu za vzniku 3,3'-dimethoxyfenyl-4,4'-bifenočinonu. Při reakci vzniká žlutohnědé zbarvení, které lze spektrofotometricky měřit při 436 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu je 4500 l.mol⁻¹.cm⁻¹ (Frébort a Adachi, 1995; Doerge *et al.*, 1997).

Aktivita DAO byla stanovena spektrofotometricky na mikrodestičkovém readeru Synergy HT na základě změny absorbance při 436 nm za časovou jednotku. Reakční směs byla složena z 15 ml 100 mmol.l⁻¹ K-fosfátového pufru (pH 7), 250 μl 35 mmol.l⁻¹ guajakolu a 250 μl 0,01% křenové peroxidasy. Do jamek byla dle rozpisu v Tab. 4 nejprve pipetována reakční směs, poté neředěný rostlinný extrakt a reakce byla zahájena přidávkem 87,5 mmol.l⁻¹ putrescinu. Nárůst absorbance při 436 nm byl měřen po dobu 5 minut při 30°C.

Tab. 4 Složky reakční směsi pro stanovení aktivity DAO

Použité roztoky	Koncentrace zásobního roztoku	Pipetovaný objem (μl)
Reakční směs	-	155
Rostlinný extrakt	-	15
Putrescin	87,5 mmol.l ⁻¹	5

3.1.7.3 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy

Při reakci katalyzované guajakolperoxidase (GPX, EC. 1.11.1.7) dochází k oxidaci guajakolu (*o*-methoxyfenolu) za vzniku 3,3'-dimethoxyfenyl-4,4'-bifenočinonu. Při reakci vzniká žlutohnědé zbarvení, které lze spektrofotometricky měřit při 436 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu je $4500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Frébort a Adachi, 1995; Doerge *et al.*, 1997).

Aktivita GPX byla stanovena spektrofotometricky na mikrodestičkovém readeru Synergy HT na základě změny absorbance při 436 nm za časovou jednotku. Reakční směs byla složena z 9,86 ml $121 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru (pH 6) a 141 μl $8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guajakolu. Do jamek byla dle rozpisu v Tab. 5 nejprve pipetována reakční směs, poté rostlinný extrakt ředěný 200x v destilované vodě a reakce byla zahájena přidáním $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 . Nárůst absorbance při 436 nm byl měřen po dobu 30 sekund při 30°C .

Tab. 5 Složky reakční směsi pro stanovení aktivity GPX

Použité roztoky	Koncentrace zásobního roztoku	Pipetovaný objem (μl)
Reakční směs	-	155
Rostlinný extrakt (200x ředěný)	-	15
H_2O_2	$2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10

3.1.7.4 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy

V reakci katalyzované askorbátperoxidasou (APX, EC. 1.11.1.11) dochází k redukci H_2O_2 na vodu za současné oxidace askorbátu (AsA) na monodehydroaskorbát (MDAsA). Tvorbu MDAsA/úbytek AsA lze měřit spektrofotometricky jako pokles absorbance při 290 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu je $2800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Nakano a Asada, 1981).

Aktivita APX byla stanovena spektrofotometricky na mikrodestičkovém readeru Synergy HT na základě změny absorbance při 290 nm za časovou jednotku. Do jamek byl dle rozpisu v Tab. 6 nejprve pipetován K-fosfátový pufr (pH 6), poté roztok kyseliny askorbové, rostlinný extrakt ředěný 5x do K-fosfátového pufru (pH 6) a reakce byla zahájena přidavkem $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$. Pokles absorbance při 290 nm byl měřen po dobu 4 minut při 30°C .

Tab. 6 Složky reakční směsi pro stanovení aktivity APX

Použité roztoky	Koncentrace zásobního roztoku	Pipetovaný objem (μl)
K-fosfátový pufr (pH 6)	$100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	125
Kyselina L-askorbová	$3,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	72
Rostlinný extrakt (5x ředěný)	-	15
H_2O_2	$10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	38

3.1.8 Příprava pevného S-nitrosoglutathionu

Pevný S-nitrosoglutathion (GSNO) byl připraven metodou dle Moore a Mani (2002). Navážka 614 mg glutathionu (GSH) byla rozpuštěna ve 3 ml 1 mol.l⁻¹ HCl a vychlazena na ledové lázni. Navážka 138 mg NaNO₂ byla za stálého míchání přidána k roztoku GSH. Reakční směs byla ponechána 40 minut na ledové lázni, aby došlo ke vzniku červené sraženiny. Sraženina byla odsáta přes filtrační papír na Büchnerově nálevce. Po odsátí byla sraženina promyta 2 x 10 ml ledově vychlazené destilované vody, 2 x 10 ml ledově vychlazeného acetonu a 2 x 10 ml ledově vychlazeného diethyletheru. Odsátá sraženina byla seškrabána z filtračního papíru na hliníkovou folii a lehce zabalena (ochrana před světlem) byla ponechána v exsikátoru do následujícího dne na dosušení. Poté byla přenesena do plastové mikrozkušavky a byla uchovávána při -30°C.

3.1.9 Nativní elektroforéza (PAGE)

Gelová elektroforéza je metoda, která se používá pro dělení biologických látek pomocí elektrického proudu. Separace molekul je založena na elektroforetické pohyblivosti dělených látek a velikosti molekul. Běžně používaným nosičem je polyakrylamidový gel vznikající polymerací akrylamidu (AA) a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), která je zahájena volnými radikály, které vznikají při rozkladu persíranu amonného (APS). Pro stabilizaci volných radikálů se do směsi přidává N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin (TEMED).

Elektroforéza probíhala v 1 mm silných polyakrylamidových gelech v diskontinuálním uspořádání. Dělicí a zaostřovací gely, ve kterých byla po elektroforetické separaci detekována aktivita POX, AMADH a DAO, byly připraveny dle Tab. 7. Gely pro detekci APX byly připraveny dle Tab. 8.

Tab. 7 Složení a objemy roztoků pro dělicí a zaostřovací gely POX, AMADH a DAO

Složky	Dělicí gel (10%)	Zaostřovací gel (4%)
AA/BIS (30% T, 2,67% C)	16 ml	3,2 ml
Destilovaná voda	10 ml	14,8 ml
1,5 mol.l ⁻¹ Tris/HCl (pH 8,8)	12,5 ml	-
0,5 mol.l ⁻¹ Tris/HCl (pH 6,8)	-	6,25 ml
TEMED	50 µl	50 µl
APS	750 µl	500 µl

Tab. 8 Složení a objemy roztoků pro dělicí a zaostřovací gely APX

Složky	Dělicí gel (14%)	Zaostřovací gel (5%)
AA/BIS (30% T, 2,67% C)	9 ml	1,6 ml
Destilovaná voda	5,4 ml	5,6 ml
1,5 mol.l ⁻¹ Tris/HCl (pH 8,8)	5 ml	-
0,5 mol.l ⁻¹ Tris/HCl (pH 6,8)	-	2,5 ml
TEMED	20 μl	20 μl
APS	300 μl	200 μl

Vzorky extraktů pro nativní elektroforézu byly připraveny stejným způsobem jako vzorky pro měření aktivity enzymů (viz. kapitola 3.1.5 Zpracování rostlinného materiálu). Pro detekci AMADH byla použita extrakce 2:1; v případě POX, DAO a APX pak extrakce 1:1. Vzniklé extrakty byly smíchány s 60% glycerolem v poměru 3:1. 25 μl vzorků bylo napipetováno do jamek gelu. Do krajních jamek bylo jako kontrola napipetováno 20 μl roztoku bromfenolové modři v glycerolu (1 mg bromfenolové modři byl rozpuštěn v 5 ml destilované vody a k tomuto roztoku bylo přidáno 2,5 ml 60% glycerolu), který během elektroforetického dělení indikoval pohyb čela dělicích se látek.

Jako elektrodotový pufr byl použit Tris-glycinový pufr (0,025 mmol.l⁻¹ Tris, 0,192 mol.l⁻¹ glycin) pH 8,3 (Laemmli, 1970). V případě gelů pro AMADH, DAO a POX probíhala elektroforéza při 4°C při konstantním napětí 100 V, dokud zóna bromfenolové modři nedoputovala na rozhraní dělicího a zaostřovacího gelu. Poté bylo napětí zvýšeno na 180 V a elektroforéza pokračovala, dokud čelo dělicích se látek nadosáhlo úrovně spodního okraje skla.

V případě gelů pro APX byl použit upravený protokol dle Mittler a Zilinskas (1993). Elektrodotový pufr obsahoval 2 mmol.l⁻¹ kyseliny askorbovou. Elektroforéza probíhala 30 minut při 100 V s prázdnými gely, aby došlo k absorpci kyseliny askorbové do gelů. Po aplikaci vzorků do jamek připraveného gelu probíhala elektroforéza při 4°C při napětí 100 V, dokud zóna bromfenolové modři nedoputovala na rozhraní dělicího a zaostřovacího gelu. Poté bylo zvýšeno napětí na 120 V a elektroforéza pokračovala, dokud čelo dělicích se látek nadosáhlo úrovně spodního okraje skla. Po ukončení elektroforézy byly gely inkubovány nejprve 3 x 10 minut v roztoku 50 mmol.l⁻¹ K-fosfátového pufru (pH 6) s 2 mmol.l⁻¹ kyselinou askorbovou. Poté byly gely inkubovány 20 minut v roztoku 50 mmol.l⁻¹ K-fosfátového pufru (pH 6) obsahujícího 4 mmol.l⁻¹ kyseliny askorbovou a 2 mmol.l⁻¹ peroxid vodíku.

Po ukončení elektroforézy byly získané gely barveny na aktivitu AMADH, POX, DAO a APX.

Barvicí směs pro AMADH (dle Veverková, 2016):

- 150 mmol.l⁻¹ Tris/HCl (pH 8,5),
- 20 mmol.l⁻¹ NAD⁺,
- 5 mmol.l⁻¹ APAL,
- 18 mg.ml⁻¹ MTT,
- 1 mg.ml⁻¹ PMS.

Gely byly inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 30 minut.

Barvicí směs pro POX (dle Angelini a Federico, 1989):

- 1,49 mmol.l⁻¹ 4-chloro-1-naftol,
- 24,66 mol.l⁻¹ methanol (ledově vychlazený),
- 100 mmol.l⁻¹ Tris/HCl (pH 7),
- 30% H₂O₂.

1. Barvicí směs pro DAO (upraveno dle Houen a Leonardsen, 1992):

- 2,8 mmol.l⁻¹ 4-chloro-1-naftol,
- 24,66 mol.l⁻¹ methanol (ledově vychlazený),
- 100 mmol.l⁻¹ K-fosfátový pufr (pH 7),
- 6,21 mmol.l⁻¹ dihydrochlorid putrescinu,
- 0,1% křenová peroxidasa.

2. Barvicí směs pro DAO (upraveno dle Calinescu et al., 2010):

- 100 mmol.l⁻¹ K-fosfátový pufr (pH 7),
- 30 mmol.l⁻¹ dihydrochlorid putrescinu,
- 0,1% křenová peroxidasa,
- 17 mmol.l⁻¹ OPDA.

Gely byly inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny.

Barvicí směs pro APX (upraveno dle Mittler a Zilinskas, 1993):

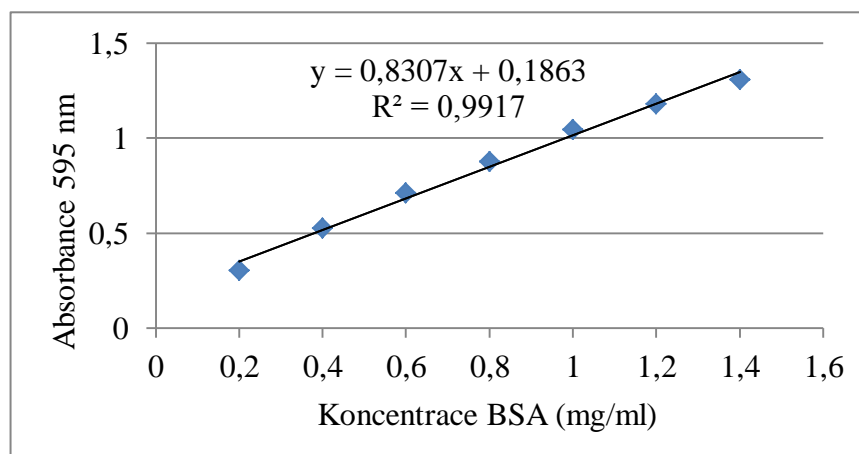
- 50 mmol.l⁻¹ K-fosfátový pufr (pH 7,8),
- 28 mmol.l⁻¹ TEMED,
- 2,45 mmol.l⁻¹ NBT.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část předložené bakalářské práce je součástí projektu zaměřeného na studium úlohy NO v regulaci hladiny polyaminů. Cílem projektu je prozkoumat možnosti regulace aktivity klíčových enzymů katabolismu polyaminů, diaminoxidasy a aminoaldehyddehydrogenasy, S-nitrosylací. Bioinformatická analýza predikce S-nitrosylovaných míst pomocí programu GPS-SNO1.0 (Xue *et al.*, 2010; Kovacs a Lindermayr, 2013), odhalila, že u proteinu *PsAMADH1* jsou možná dvě místa S-nitrosylace Cys100 a Cys 348. Naopak u *PsDAO1* nebylo predikováno žádné místo (nepublikované výsledky T. Tichá). Úkolem bakalářské práce bylo stanovit vliv zvýšené koncentrace NO v důsledku použití donoru NO GSNO v růstovém médiu na aktivitu aminoaldehyddehydrogenasy a aminoxidasy. Současně jsme se zaměřily na stanovení aktivity askorbátperoxidasy a obecně peroxidasy, které přeměňují substrát guajakol na detekovatelný barevný produkt. Studie byla realizována na dvou kultivarech *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset významně se lišících odolností vůči některým patogenům, tzn. schopností aktivovat obranné mechanismy.

4.1 Stanovení proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů byla použita kalibrační řada standardů BSA v rozsahu 0,2 – 1,4 mg.ml⁻¹. Z naměřených hodnot byl sestrojen kalibrační graf závislosti absorbance na rostoucí koncentraci standardů BSA (Obr. 13). Rostlinné extrakty byly pro stanovení proteinů ředěny 5x. Koncentrace proteinů ve vzorcích je vypočtena z rovnice kalibrační přímky.



Obr. 13 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích; rovnice kalibrační přímky pro výpočet koncentrace proteinů: $y = 0,8307x + 0,1863$.

4.2 Vliv modulátorů hladiny NO na růst hrachu setého

Jedním z dílčích cílů předložené bakalářské práce bylo studium vlivu modulátorů hladiny oxidu dusnatého na růst a vývoj hrachu setého. Jako modulátor koncentrace NO byl použit S-nitrosoglutahion (GSNO) a 2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxy-3-oxid (PTIO) ve výsledné koncentraci 0,1 mmol.l⁻¹. GSNO je zásobárnou NO v rostlinných buňkách a je považován za potenciální fyziologický donor NO (Liu *et al.*, 2007; Zandonadi *et al.*, 2010; Semchuk *et al.*, 2011, Fernández-Marcos *et al.* 2012). GSNO vzniká S-nitrosylací glutathionu (GSH), slouží jako donor oxidu dusnatého a může dále zprostředkovat transnitrosylační reakce, při nichž dochází k tvorbě nového S-nitrosothiolu přenosem NO skupiny z GSNO na thiolovou skupinu cysteinu jiného peptidu nebo proteinu. PTIO a jeho karboxy derivát (cPTIO) byly v mnoha studiích použity jako pravděpodobně účinné lapače NO (Pagnussat *et al.*, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Fernández-Marcos *et al.*, 2011, 2012).

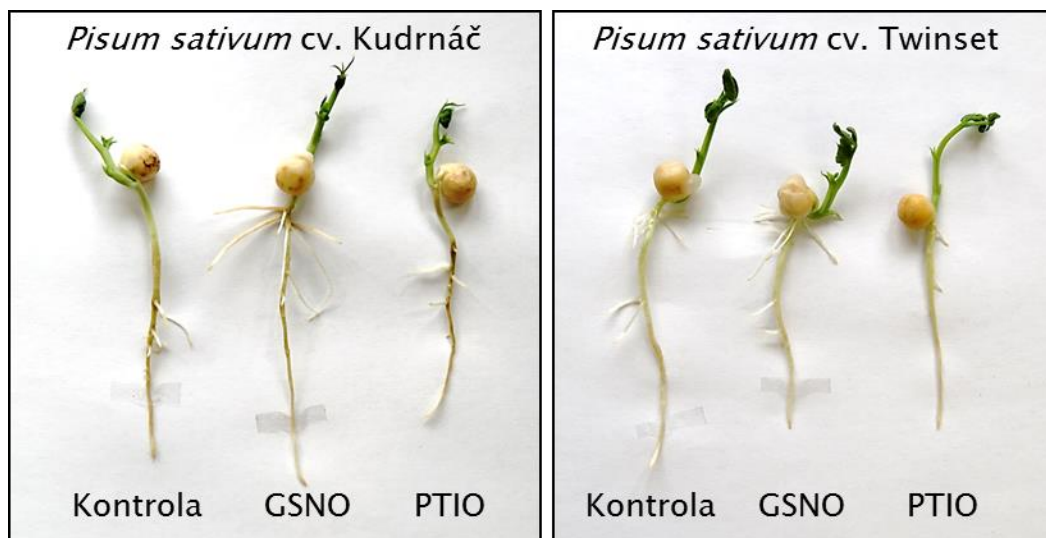
Hrách je u nás jednou z nejoblíbenějších zelenin. Jedná se o jednoletou luštěninu se sbíhavými, prorostlými listy zakončenými úponky, pocházející z východního Středomoří. Pěstuje se kvůli chutným plodům. Dělí se do čtyř skupin: hrách polní, obecný, dřeňový a cukrový. Studie byla realizována na dvou kultivarech hrachu setého dřeňového používaných v zemědělství, které se významně liší svou odolností vůči patogenům. *P. sativum* cv. Kudrnáč je bezlistý typ, polopozdní, velkozrnný, dorůstá 60 - 70 cm výšky, listy jsou přeměněny v úponky, lusk je dlouhý, prohnutý, ostře zakončený. Druhým kultivarem hrachu, který byl používán ve studii je nově vyšlechtěný kultivar *P. sativum* cv. Twinset. Jedná se o kultivar rezistentní k viru PSbMV (Pea Seed-borne Mosaic Virus), dále je rezistentní k padlí i k fusáriovému vadnutí a dosahuje špičkových výnosů. Hrách zahradní Twinset je středně pozdní kultivar s větším zrnem a delším, tupým luskem. Díky dlouhému a rovnému luskou je Twinset ideálním kultivarem pro ruční sklizeň (katalog výrobků Neoseeds, 2018).

Při pěstování rostlin hrachu pro následné experimenty zaměřené na stanovení změn aktivit enzymů podílejících se na katabolismu polyaminů (AMADH, DAO) a enzymů degradujících peroxid vodíku (GPX, APX), byl vyhodnocen vliv modulátorů hladiny NO na růst rostlin. U sedmidenních semenáčků byla stanovena délka a hmotnost kořene a nadzemní části. *P. sativum* cv. Kudrnáč vykazoval celkově rychlejší růst v porovnání s *P. sativum* cv. Twinset (Obr. 15). Rozdíl v délce nadzemní části, resp. kořene mezi kultivary Kudrnáč a Twinset byl cca 20, resp. 30 %. Rozdíl v hmotnosti nadzemních

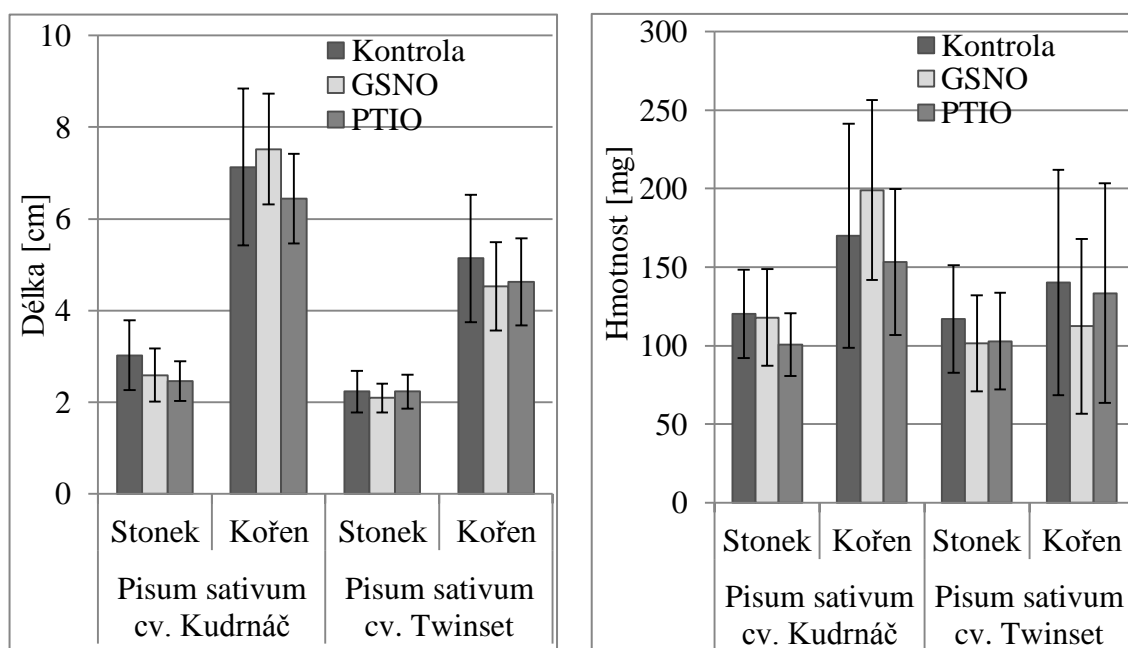
částí byl poměrně malý cca 5 %. V případě porovnání hmotnosti kořene byl naopak zaznamenán až cca 30% rozdíl.

Vliv modulátorů NO na růst semenáčků nebyl výrazný (Obr. 14,15). Získaná data jsou zatížena poměrně velkou statistickou chybou, zejména při hodnocení hmotnosti kořenové a nadzemní části rostlin. Při interpretaci výsledků je nutné k tomu přihlídnout. Lze konstatovat pouze to, že zvýšená koncentrace NO v důsledku aplikace GSNO do růstového média může mít spíše mírný negativní efekt na vývoj hrachu kultivar Twinset na rozdíl od efektu pozorovaného u kultivaru Kudrnáč v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 14). Efekt lapače NO PTIO je u obou kultivarů shodný. Jak v kořenové, tak v nadzemní části rostlin lze v přítomnosti PTIO pozorovat mírné zpomalení vývoje (Obr. 14). Malý a statisticky neprůkazný detekovaný efekt donoru NO na vývoj hrachu potvrzují i výsledky práce Tripathi *et al.* (2017), kde nebyl prokázán vliv donoru NO 0,1 mmol.l⁻¹ nitroprusidu sodného (SNP) na délku a hmotnost kořenové a nadzemní části u 15 denních rostlin *Pisum sativum* L. cv. Azad P-1. Naopak u 5 denních rostlin pšenice SNP testovaný v koncentraci 0,01 a 0,1 mmol.l⁻¹ výrazně potlačil růst. Fernández-Marcos *et al.* (2012) použil různé donory NO (SNAP, SNP, GSNO) aby potvrdil, že vysoké hladiny NO mají inhibiční účinky na růst primárních kořenů *Arabidopsis*, a že rozsah inhibice je závislý na použitých koncentracích donoru NO. Ve srovnání s ostatními testovanými donory NO měla koncentrace 1 mmol.l⁻¹ nejslabší inhibiční účinek.

Z obr. 14 je zřejmý efekt zvýšené koncentrace NO na vývoj a růst postranních kořenů u rostlin pěstovaných na médiu s GSNO v porovnání s kontrolními rostlinami. Naopak u rostlin pěstovaných na médiu s PTIO (lapač NO) byl vývoj postranních kořenů potlačen. V práci Correa-Aragunde *et al.* (2004) byl studován vliv exogenního donoru NO (SNP) a lapače NO (karboxy derivát PTIO, cPTIO) na růst a vývoj laterálních kořenů u rajčat. V této práci byl rovněž pozorován nárůst počtu postranních kořenů po přidavku exogenního NO a naopak snížený počet po přidavku lapače NO.



Obr. 14 Fotografie sedmidenních semenáčků hrachu setého pěstovaných na médiu s přidavkem GSNO a PTIO. A) *Pisum sativum* cv. Kudrnáč, B) *Pisum sativum* cv. Twinset. Koncentrace GSNO a PTIO 0,1 mmol.l⁻¹.



Obr. 15 Vliv modulátorů NO na růst nadzemní části a kořene u hrachu setého. A) Porovnání délky nadzemní části a kořene, B) porovnání hmotnosti nadzemní části a kořene. Koncentrace GSNO a PTIO 0,1 mmol.l⁻¹.

4.3 Porovnání aktivity vybraných enzymů u dvou kultivarů *Pisum sativum*

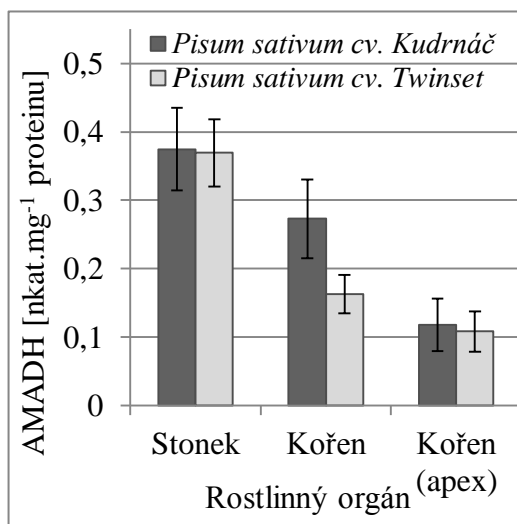
Rostlinné polyaminy působí jako regulační molekuly v mnoha základních buněčných procesech (přehledně shrnuto v Alcázar *et al.*, 2010). Mezi tyto procesy řadíme v rostlinách např. buněčné dělení, diferenciaci a proliferaci, syntézu DNA a proteinů, expresi genů či programovanou buněčnou smrt. Polyaminy jsou zapojeny do řady fyziologických procesů jako je růst kořenů, růst pylu, vývoj květů a plodů, organogeneze, embryogeneze, senescence listů, stabilizace membrán a buněčných stěn (Kushad a Dumbroff, 1991; Slocum, 1991; přehledně shrnuto v Tiburcio *et al.*, 2014).

V bakalářské práci jsem se zaměřila na studium enzymů zapojených v katabolismu polyaminů DAO a AMADH a enzymů podílejících se na degradaci toxického H₂O₂. Experimenty byly realizovány na dvou kultivarech hrachu významně se lišících odolností k patogenním organismům. Jedním z dílčích cílů předložené bakalářské práce bylo porovnání aktivity studovaných enzymů (AMADH, DAO, GPX, APX) u obou kultivarů za fyziologických podmínek. Enzymové aktivity byly stanovovány v nadzemní části, v kořeni a v apikální části kořene.

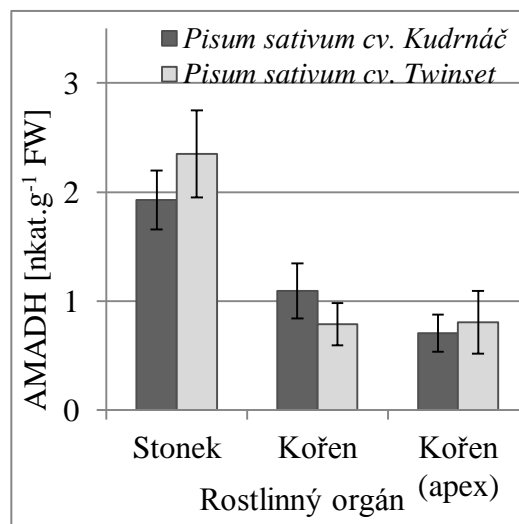
Nejvyšší aktivita AMADH byla detekovaná v nadzemní části hrachových semenáčků, nejnižší v apikální části kořene. Specifická aktivita enzymu AMADH u obou kultivarů ve stonku a apikální části kořene byla srovnatelná. Pouze při vyhodnocení aktivity AMADH vztažené na čerstvou váhu byly naměřené hodnoty vyšší v nadzemní části u kultivaru hrachu Twinset. Významně nižší aktivita AMADH byla detekovaná v kořenové části kultivaru Twinset v porovnání s kultivarem Kudrnáč (Obr. 16). V práci Petřivalský *et al.* (2007) byla u 7 denních rostlin *P. sativum* cv. Lantra pěstovaných v perlitu (ve vodě) za standardních světelných podmínek detekována nejvyšší AMADH aktivita v apikální části kořene a nejmenší v nadzemní části. Podobné výsledky byly publikovány v práci Piterková *et al.* (2012) u 14 denních rostlin *P. sativum* cv. Lantra pěstovaných rovněž v perlitu (ve vodě) za standardních světelných podmínek. Hodnoty stanovených enzymových aktivit AMADH uvedené ve výše citovaných publikacích byly srovnatelné, tj. v jednotkách nkat.g⁻¹ FW s aktivitami AMADH změřenými v bakalářské práci. Rozdílné výsledky při porovnání aktivity AMADH v nadzemní a kořenové části v předložené práci a výše uvedených publikacích mohou být dány růstovými podmínkami, kdy naše experimenty byly realizovány na 0,5 x MS médiu s vitamíny na agaru za sterilních podmínek. Zatímco v případě výše

uvedených publikací byly rostliny pěstovány pouze ve vodě a v perlitu. Vliv může mít i použitý typ kultivaru hrachu. V následujících experimentech by bylo vhodné ověřit vliv růstových podmínek na aktivitu AMADH v kořeni a nadzemní části rostlin *P. sativum* cv. Lantra, Kudrnáč a Twinset.

A)

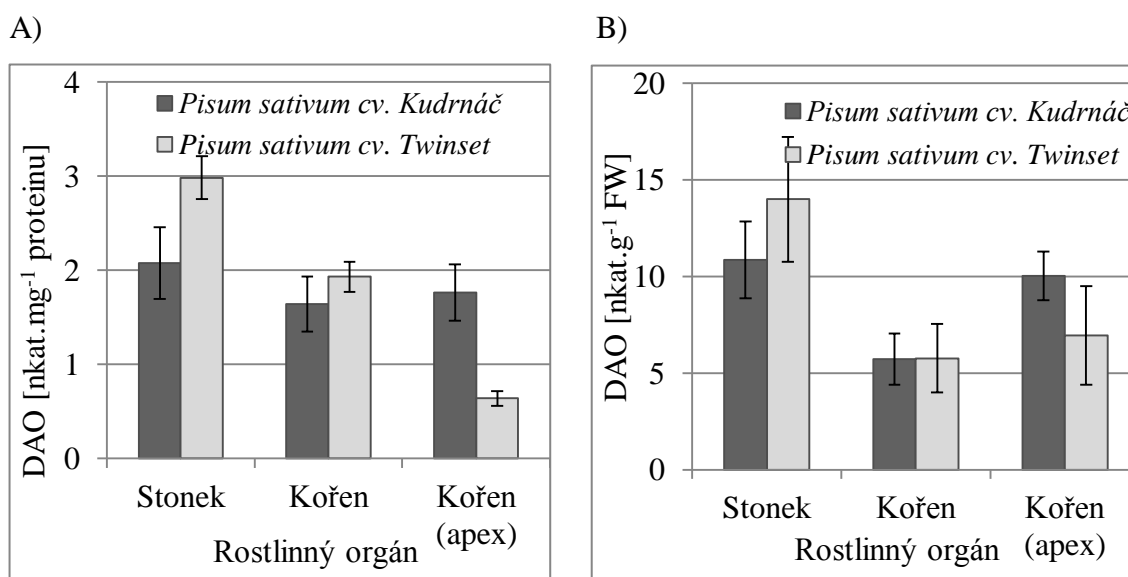


B)



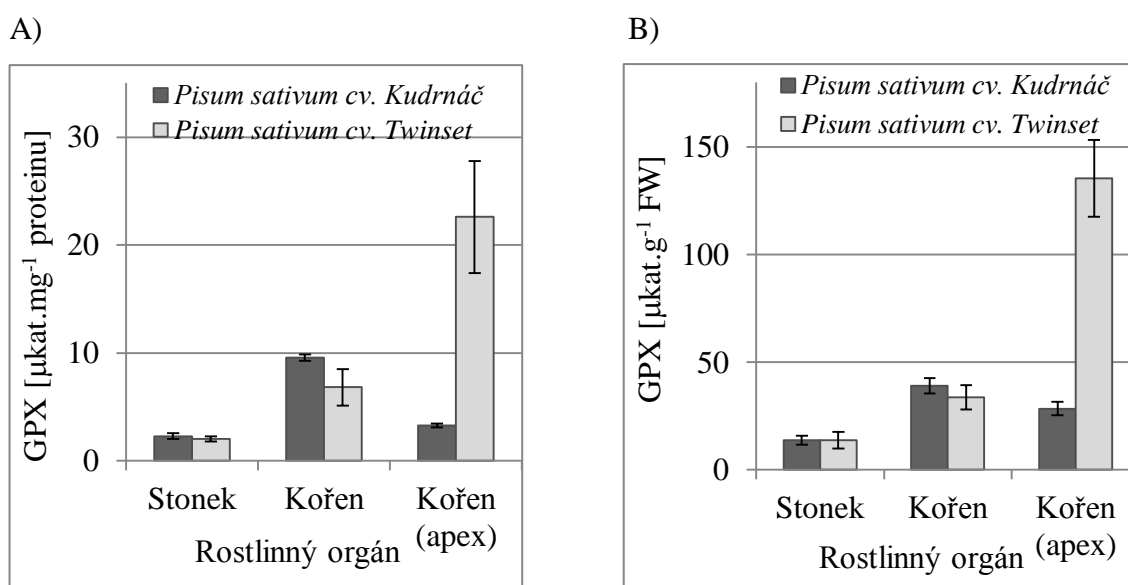
Obr. 16 Porovnání aktivity enzymu AMADH u dvou kultivarů *Pisum sativum* cv. Twinset a cv. Kudrnáč v nadzemní části, kořeni a apikální části kořene. A) Specifická aktivita AMADH v jednotkách nkat.mg⁻¹ proteinu, B) aktivita AMADH v jednotkách nkat.g⁻¹ FW. Měření bylo realizováno minimálně ve třech nezávislých experimentech.

Podobně jako u AMADH, nejvyšší aktivita DAO byla detekována v nadzemní části sedmidenních semenáčků hrachu. Specifická aktivita i aktivita vztažená na g FW enzymu DAO byla výrazně vyšší v nadzemní části kultivaru Twinset v porovnání s hodnotami detekovanými u kultivaru Kudrnáč. Naopak v apikální části kořene byla aktivita DAO vyšší u kultivaru Kudrnáč. Aktivita enzymu DAO vztažená na g FW u obou kultivarů v kořeni byla srovnatelná (Obr. 17). Naše výsledky korespondují s daty publikovanými v práci Petřivalský *et al.* (2007), kdy byla u 7 denních rostlin *P. sativum* cv. Lantra pěstovaných v perlitu (ve vodě) za standardních světelných podmínek detekována nejvyšší aktivita DAO v nadzemní části a nejmenší v apikální části kořene. Hodnoty stanovených enzymových aktivit DAO v práci Petřivalský *et al.* (2007), byly srovnatelné, tj. v jednotkách až desítkách nkat.g⁻¹ FW s aktivitami DAO změřenými v bakalářské práci.



Obr. 17 Porovnání aktivity enzymu DAO u kultivarů *Pisum sativum* cv. Twinset a cv. Kudrnáč v nadzemní části, kořeni a apikální části kořene. A) Specifická aktivita DAO v jednotkách nkat.mg⁻¹ proteinu, B) aktivita DAO v jednotkách nkat.g⁻¹ FW. Měření bylo realizováno minimálně ve třech nezávislých experimentech.

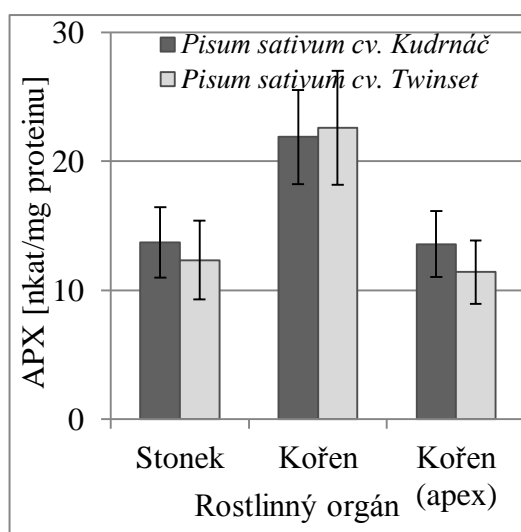
V případě stanovení aktivity GPX byly detekovány výrazné rozdíly v apikální části kořene mezi studovanými kultivary hrachu: u kultivaru Twinset byla aktivita GPX několikanásobně vyšší v porovnání s kultivarem Kudrnáč. V kořeni u obou kultivarů byla stanovena vyšší GPX aktivita v porovnání s nadzemní částí podobně jako v práci Petřivalský *et al* (2007). Specifická aktivita enzymu GPX u obou kultivarů ve stonku byla srovnatelná. Při vyhodnocení specifické aktivity v kořeni byly naměřené hodnoty vyšší u kultivaru hrachu Kudrnáč (Obr. 18).



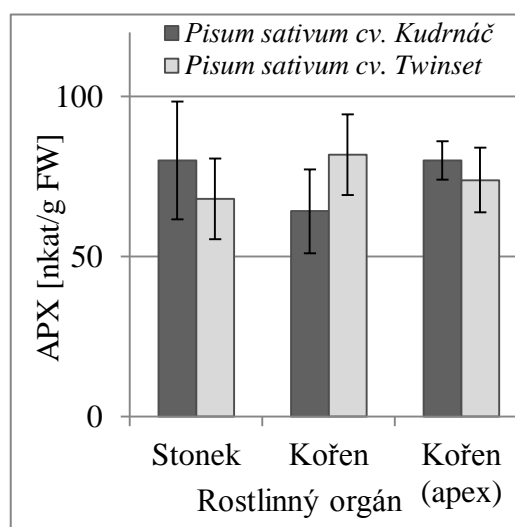
Obr. 18 Porovnání aktivity enzymu GPX u kultivarů *Pisum sativum* cv. Twinset a cv. Kudrnáč v nadzemní části, kořeni a apikální části kořene. A) Specifická aktivita GPX v jednotkách $\mu\text{kat.mg}^{-1}$ proteinu, B) aktivita GPX v jednotkách $\mu\text{kat.g}^{-1}$ FW. Měření bylo realizováno minimálně ve třech nezávislých experimentech.

Nejvyšší specifická aktivita APX byla detekována v kořeni hrachových semenáčků. Specifická aktivita u obou kultivarů v kořeni byla srovnatelná. Hodnoty specifické aktivity ve stonku a apikální části kořene byly u jednotlivých kultivarů téměř totožné. Při vyhodnocení aktivity APX vztažené na čerstvou váhu byla v kořeni kultivaru Twinset naměřena vyšší hodnota v porovnání s kultivarem Kudrnáč. Rozdíly však vzhledem k směrodatným odchýlkám nejsou příliš významné (Obr. 19).

A)



B)



Obr. 19 Porovnání aktivity enzymu APX u kultivarů *Pisum sativum* cv. Twinset a cv. Kudrnáč v nadzemní části, kořeni a apikální části kořene. A) Specifická aktivita APX v jednotkách $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu, B) aktivita APX v jednotkách $\text{nkat}\cdot\text{g}^{-1}$ FW. Měření bylo realizováno minimálně ve třech nezávislých experimentech.

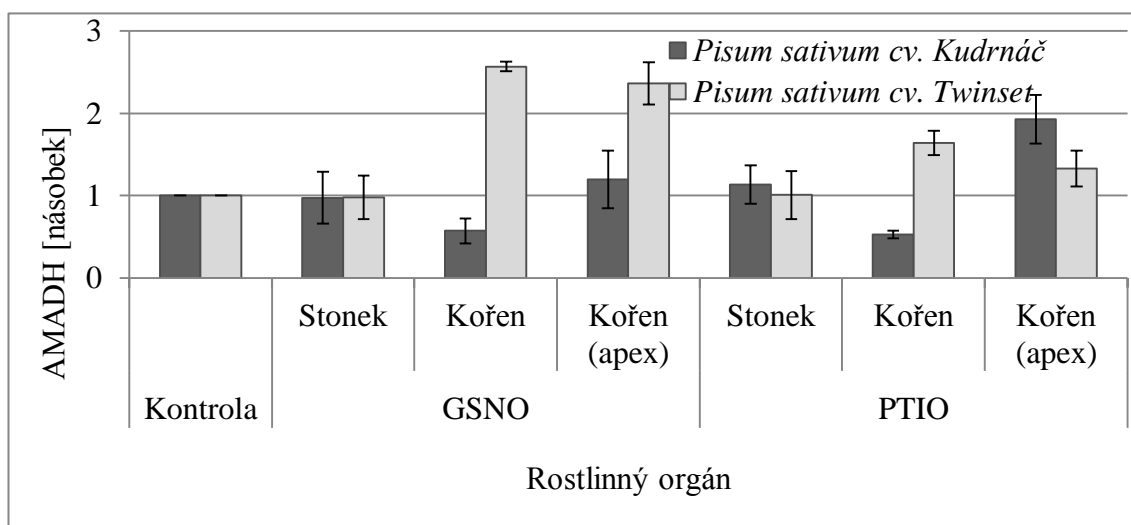
4.4 Vliv modulátorů hladiny oxidu dusnatého na aktivitu vybraných enzymů u dvou kultivarů *Pisum sativum*

V bakalářské práci jsem se dále zaměřila na studium možnosti ovlivnění aktivity enzymů zapojených v katabolismu polyaminů DAO a AMADH a enzymů APX a GPX podílejících se na degradaci H₂O₂ změnou hladiny NO. V současné době byla v řadě prací potvrzena významná regulační úloha NO prostřednictvím S-nitrosylace případně nitrace významných enzymů v průběhu fyziologického vývoje rostlin a zejména v reakci rostlin na stresové faktory (Begara-Morales *et al.*, 2013; Begara-Morales *et al.*, 2014; Begara-Morales *et al.*, 2015).

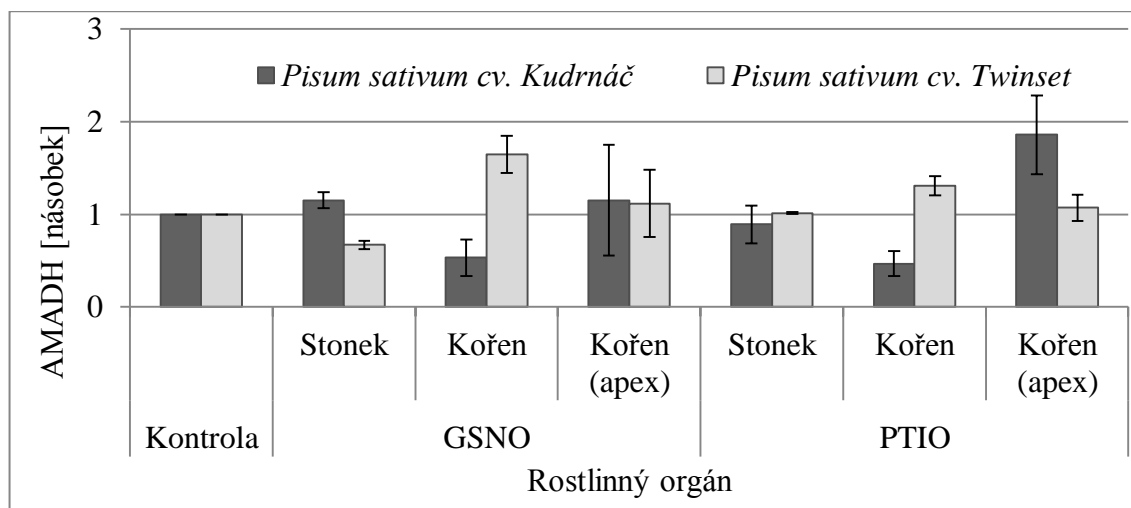
Mezi enzymy, u kterých byla prokázána negativní regulace jejich enzymové aktivity S-nitrosylací patří např. peroxiredoxin (Prx) II E, PrxII F a katalasa (Clark *et al.*, 2000; Romero-Puertas *et al.*, 2007; Ortega-Galisteo *et al.*, 2012; Camejo *et al.*, 2015). Dalším enzymem, který byl identifikován jako cíl posttranslačních modifikací pomocí S-nitrosylace je APX. V práci Begara-Morales *et al.* (2014) byla prokázána aktivace APX S-nitrosylací. Aktivita cytosolární hrachové APX byla v tomto případě stimulována *in vitro* a *in vivo*. Výhodou této práce bylo, že sekvence hrachové APX obsahuje pouze jeden cysteinový zbytek (Cys32), takže tento zbytek je jediným kandidátem, který může být S-nitrosylován a je tedy zodpovědný za zvýšení aktivity APX (Begara-Morales *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015).

U *P. sativum* cv. Twinset byl detekován po přidavku GSNO do média významný nárůst specifické aktivity AMADH v kořeni a apikální části kořene. U kultivaru Kudrnáč došlo v kořeni k mírnému poklesu specifické aktivity AMADH. Ve stonku obou kultivarů nebyla zaznamenána po aplikaci GSNO do média žádná změna specifické aktivity tohoto enzymu. Po přidavku látky PTIO do média byl detekován nárůst specifické aktivity v apikální části obou kultivarů a také v kořeni kultivaru Twinset. V kořeni kultivaru Kudrnáč byla specifická aktivita AMADH významně snížena (Obr. 20 A). Při porovnání aktivity AMADH vztažené na g FW u hrachu pěstovaného na médiu s GSNO případně PTIO s kontrolními vzorky byly zaznamenány podobné výsledky jako v případě specifické aktivity (tj. aktivity vztažené na mg proteinu). Lišily se pouze hodnoty po přidavku GSNO v nadzemní části, kde došlo u kultivaru Twinset k poklesu aktivity (nkat.g⁻¹ FW) vůči kontrole; a hodnoty apikální části kořene, kdy nebyla detekována změna AMADH aktivity v porovnání s kontrolou (Obr. 20 B).

A)



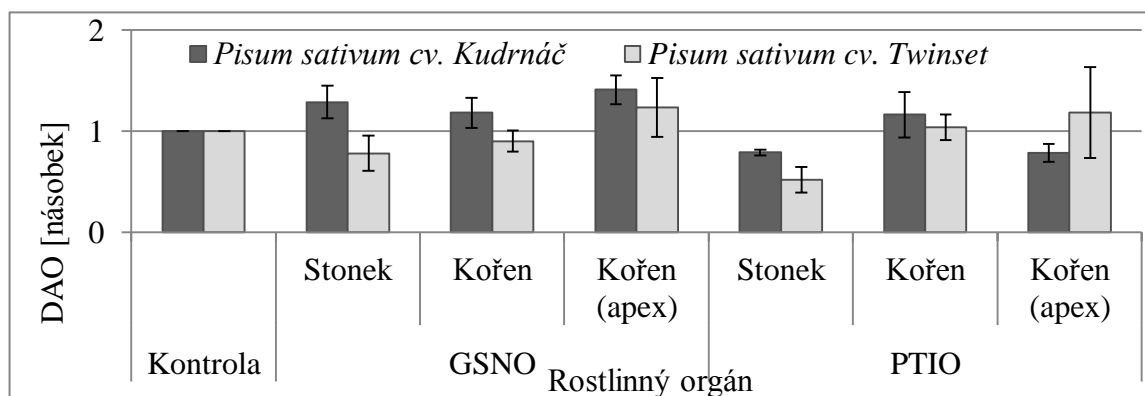
B)



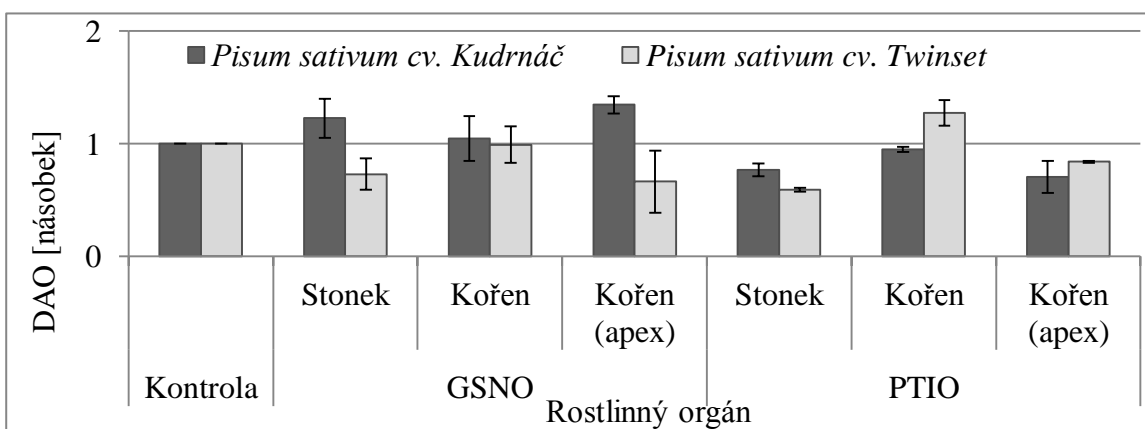
Obr. 20 Vliv aplikace GSNO a PTIO do růstového média na aktivitu AMADH. Uvedeny změny (násobky). A) specifické aktivity AMADH, B) AMADH aktivity v nkat.g⁻¹ FW po vztážení na kontrolní vzorky.

V případě enzymu DAO došlo po přidavku GSNO do média k mírnému nárůstu specifické aktivity tohoto enzymu v nadzemní části, kořeni i apikální části kořene u *P. sativum* kultivar Kudrnáč. V nadzemní části a v kořeni kultivaru Twinset byla naopak naměřena mírně snížená aktivita DAO oproti kontrole. Po přidavku látky PTIO do média byl detekován v nadzemní části obou kultivarů pokles specifické aktivity DAO. Snížená specifická aktivita DAO byla zaznamenána i v apikální části kořene kultivaru Kudrnáč (Obr. 21 A). Při porovnání aktivity DAO vztažené na g FW u hrachu pěstovaného na médiu s GSNO případně PTIO s kontrolními vzorky byly zaznamenány podobné výsledky jako v případě vyhodnocení specifické aktivity (tj. aktivity vztažené na mg proteinu). Pouze v případě vyhodnocení aktivit vztažených na g FW nebyl pozorován vliv GSNO na aktivitu DAO v kořeni a v apikální části kořene byl detekován naopak pokles aktivity DAO u kultivaru Twinset. Dále po přidavku látky PTIO byl v kořeni kultivaru Twinset zaznamenán mírný nárůst aktivity vůči kontrole (Obr. 21 B).

A)



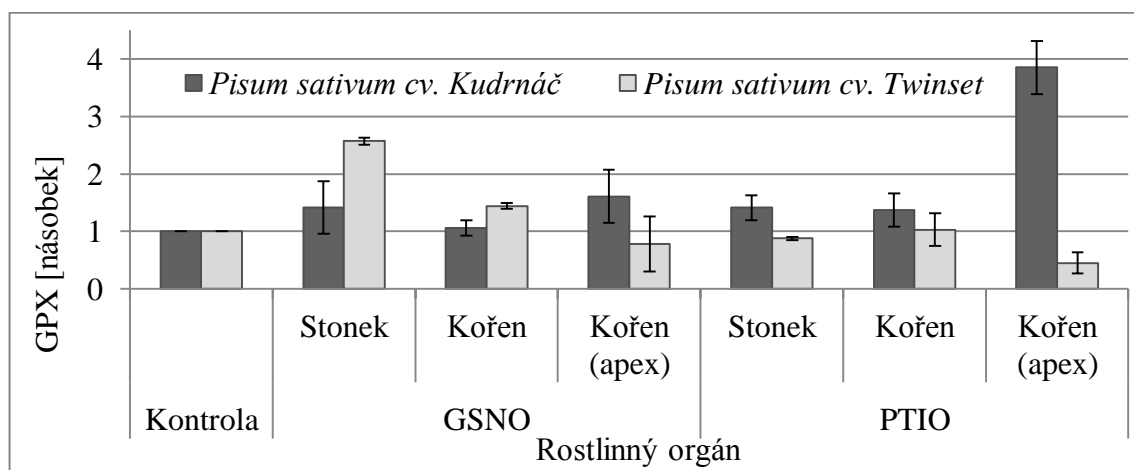
B)



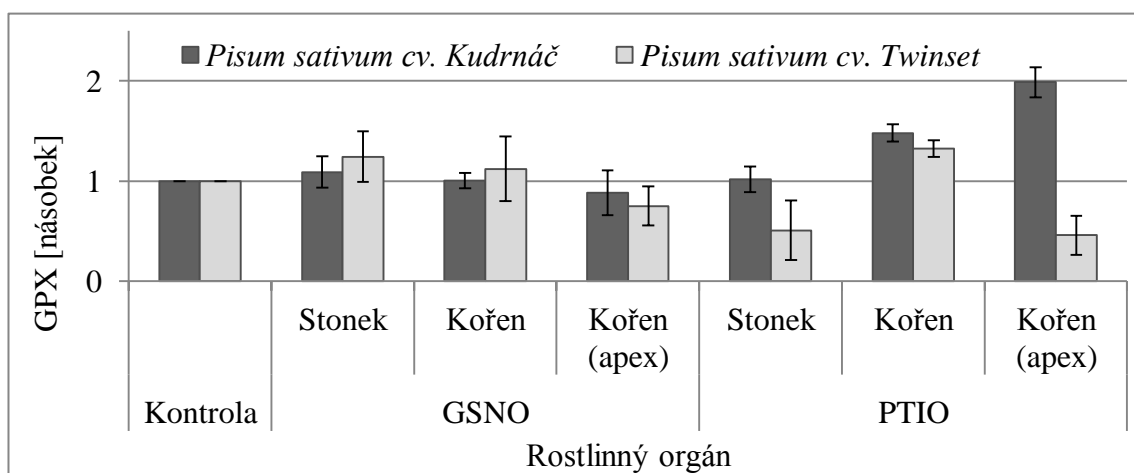
Obr. 21 Vliv aplikace GSNO a PTIO do růstového média na aktivitu DAO. Uvedeny změny (násobky). A) specifické aktivity DAO, B) DAO aktivity v nkat.g⁻¹ FW po vztažení na kontrolní vzorky.

Aplikace GSNO měla pozitivní vliv na specifickou aktivitu GPX u obou kultivarů hrachu. Nejvýraznější navýšení specifické aktivity GPX bylo detekováno v nadzemní části kultivaru Twinset. Po přidavku látky PTIO byla u kultivaru Kudrnáč naměřena zvýšená specifická aktivita GPX, a to několikanásobně v apikální části kořene. U kultivaru Twinset došlo v apikální části kořene naopak k poklesu aktivity GPX (Obr. 22 A). Při porovnání aktivity GPX vztážené na g FW u hrachu pěstovaného na médiu s GSNO případně PTIO s kontrolními vzorky byly zaznamenány podobné výsledky jako v případě specifické aktivity (tj. aktivity vztážené na mg proteinu). Pouze navýšení aktivity GPX (po vyhodnocení na g FW) v nadzemní části kultivaru Twinset nebylo tak významné jako v případě specifické aktivity (Obr. 22 B).

A)



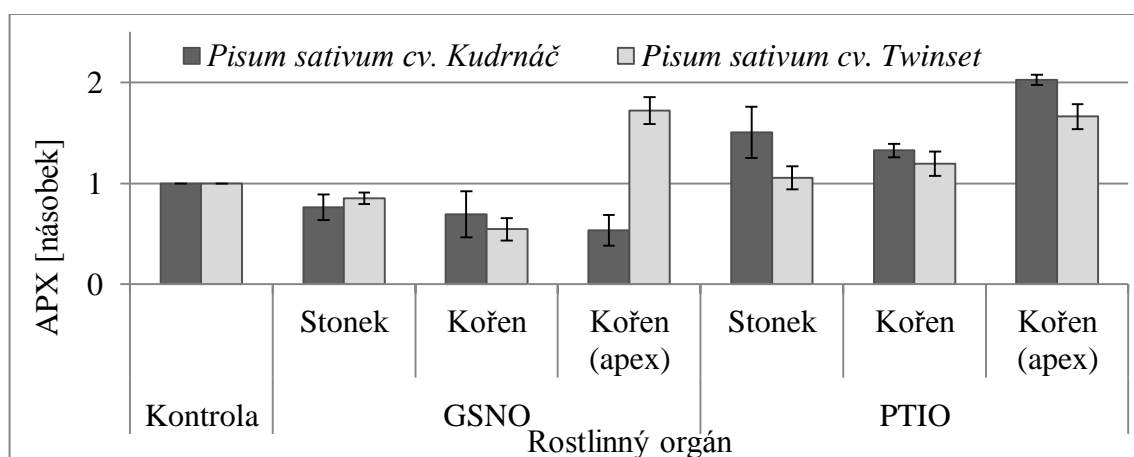
B)



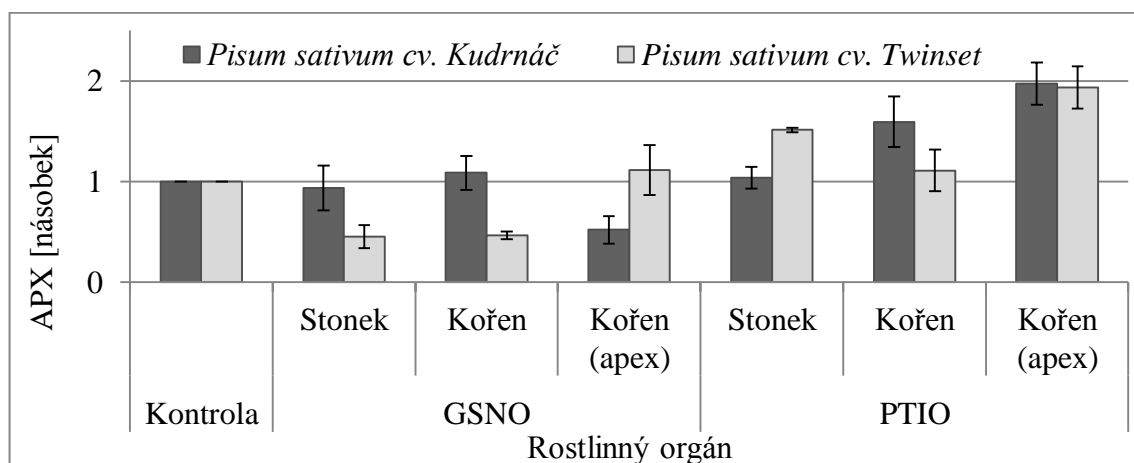
Obr. 22 Vliv aplikace GSNO a PTIO do růstového média na aktivitu GPX. Uvedeny změny (násobky). A) specifické aktivity GPX, B) GPX aktivity v $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ FW po vztážení na kontrolní vzorky.

V případě enzymu APX byl po přidavku GSNO do média zaznamenán pokles aktivity u obou kultivarů, s výjimkou apikální části kořene kultivaru Twinset, kde byla naopak detekována významně zvýšená aktivita APX. Po přidavku látky PTIO do média došlo naopak téměř ve všech vzorcích k nárůstu aktivity APX vůči kontrole, pouze v nadzemní části kultivaru Twinset nebyla zaznamenána žádná změna aktivity. Největší nárůst aktivity byl pozorován v apikální části kořene obou kultivarů (Obr. 23 A). Při porovnání aktivity APX vztažené na g FW u hrachu pěstovaného na médiu s GSNO případně PTIO s kontrolními vzorky byly zaznamenány podobné výsledky jako v případě vyhodnocení specifické aktivity (tj. aktivity vztažené na mg proteinu). Pouze v případě stanovení vlivu GSNO a PTIO byly pozorovány rozdíly při porovnání specifické aktivity nebo aktivity vztažené na g FW u nadzemní části rostlin (Obr. 23 B).

A)



B)



Obr. 23 Vliv aplikace GSNO a PTIO do růstového média na aktivitu APX. Uvedeny změny (násobky). A) specifické aktivity APX, B) APX aktivity v nkat.g^{-1} FW po vztažení na kontrolní vzorky.

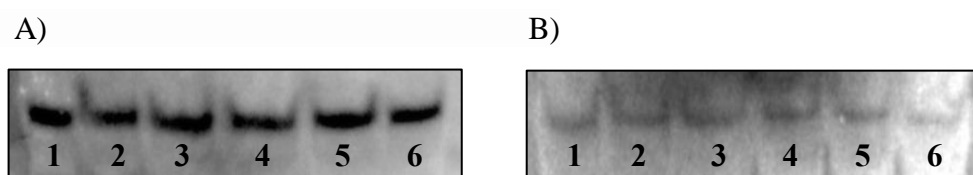
NO, popř. GSNO, se může účastnit procesu S-nitrosylace, který reguluje aktivitu enzymů, např. APX (aktivace S-nitrosylací, inhibice nitrací) (Begara-Morales *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). APX byla identifikována jako potenciální cíl S-nitrosylace (Fares *et al.*, 2011). Inhibice aktivity APX byla dříve popsána jako důsledek zvýšení koncentrace GSNO v extraktech tabákových listů (Clark *et al.*, 2000). Nedávné studie nicméně prokázaly opak, různé isoenzymy APX v kořenových nodech sóji ošetřené donorem NO vykazovaly zvýšenou aktivitu (Keyster *et al.*, 2011). Begara-Morales *et al.* (2014) prokázali, že GSNO (o koncentracích 0,5 mmol.l⁻¹ a 2 mmol.l⁻¹) zvyšuje aktivitu hrachové APX.

Z našich výsledků vyplývá, že aplikace 0,1 mmol.l⁻¹ koncentrace GSNO s výjimkou apikální části u kultivaru Twinset neměla žádný nebo měla negativní efekt na aktivitu APX na rozdíl od výsledků publikovaných v práci Begara-Morales *et al.* (2014). V této práci použili 5x a 20x větší koncentrace GSNO. Lze předpokládat, že podobně jako na růst, i na změnu aktivity bude mít vliv typ a koncentrace donoru NO použité v experimentech (Fernández-Marcos *et al.* 2012). Je zajímavé, že v naší studii má aplikace PTIO pozitivní efekt na aktivitu APX a to zejména v apikální části kořene obou kultivarů hrachu. Měření enzymových aktivit v apikální části kořene je zatíženo poměrně velkou statistickou chybou. Vzhledem k malému množství rostlinného materiálu (apikální část kořene) bylo měření provedeno pouze ve 3 replikátech na rozdíl od stanovení enzymových aktivit v kořeni a nadzemní části hrachu (5-8 replikátů).

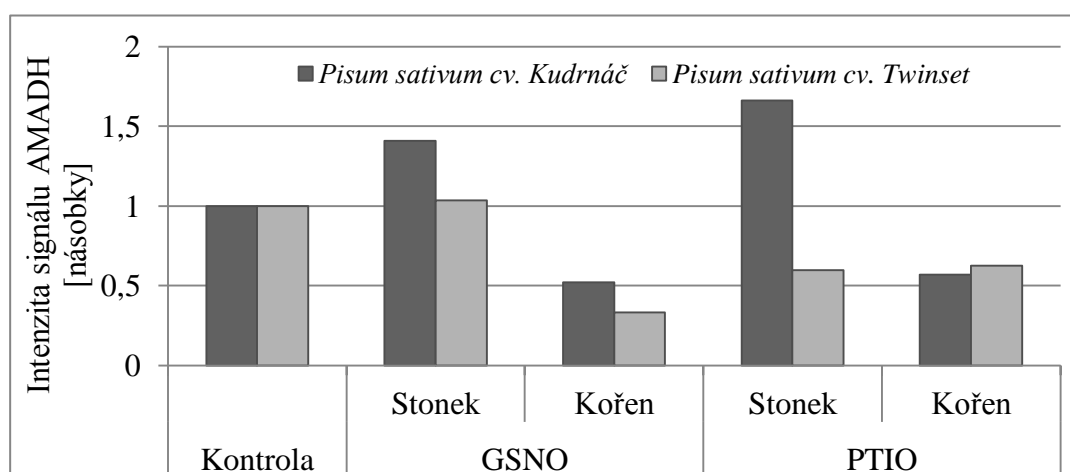
4.5 Nativní elektroforéza – vliv modulátorů hladiny oxidu dusnatého

Vliv donoru NO (GSNO) a lapače NO (PTIO) na enzymy s AMADH, DAO, GPX a APX aktivitou byl dále sledován s využitím metody nativní elektroforézy. Výsledky jsou pouze orientační, nebyly potvrzeny opakováním experimentu.

Pro detekci AMADH v gelech po nativní elektroforéze bylo vybráno barvení s MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid) a PMS (fenazin methosulfát) (Obr. 24). Vliv GSNO a PTIO na AMADH aktivitu v případě kultivaru Kudrnáč detekovaný nativní elektroforézou je srovnatelný s výsledky spektrofotometrického stanovení aktivity AMADH (Obr 25, Obr. 20). V případě detekce AMADH po extrakci ze vzorků kultivaru Twinset byly detekované intenzity bandů poměrně slabé a stanovení jejich intenzity je velmi nepřesné a výsledky nekorelují s daty ze spektrofotometrického měření.

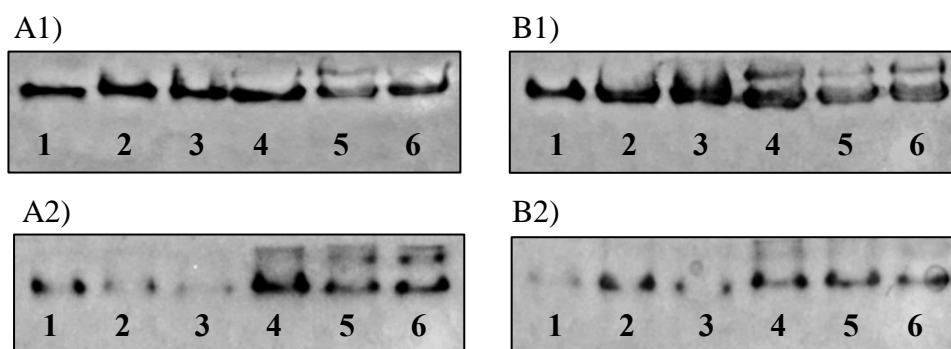


Obr. 24 Nativní elektroforéza - barvení na aktivitu AMADH. A) AMADH u *P. sativum* cv. Kudrnáč, B) AMADH u *P. sativum* cv. Twinset. 1 – kořen KONTROLA, 2 – kořen GSNO, 3 - kořen PTIO, 4 – stonek KONTROLA, 5 – stonek GSNO, 6 – stonek PTIO. Extrakce vzorků v poměru 2:1; do jamek pipetováno 25 μ l vzorku.

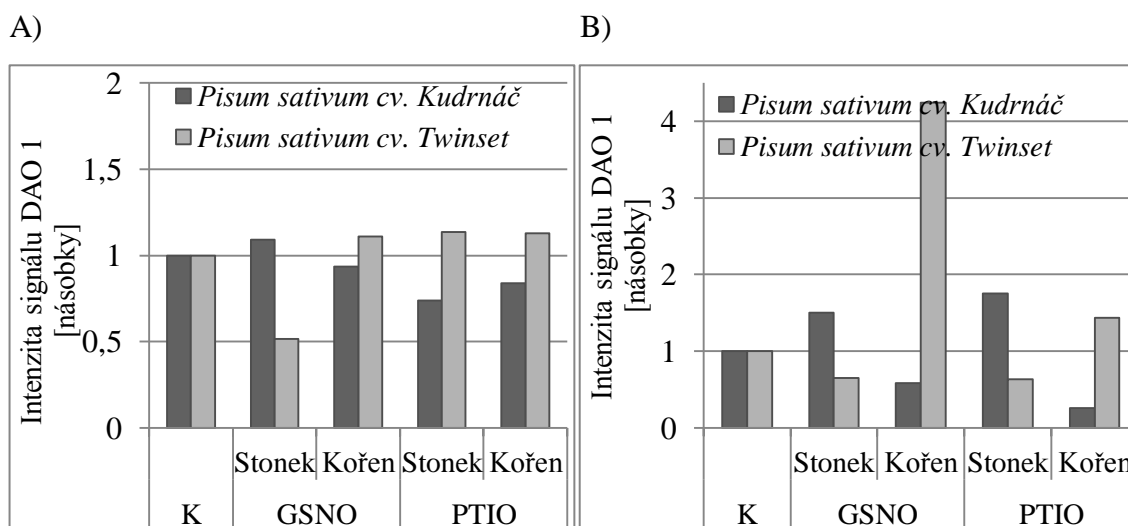


Obr. 25 Vyhodnocení intenzity bandů po nativní elektroforéze. Barvení na aktivitu AMADH.

Pro detekci DAO v gelech po nativní elektroforéze byly vybrány dva způsoby barvení. V prvním případě byla použita barvicí směs s 4-chloro-1-naftolem. Ve vzorcích kořene byla detekována jedna isoforma tohoto enzymu, ve vzorcích nadzemní části pak isoformy dvě, a to jak u kultivaru Kudrnáč (Obr. 26 A1), tak u kultivaru Twinset (Obr. 26 B1). Druhý způsob barvení zahrnoval použití *o*-fenylendiaminem v barvicí směsi. Získané výsledky jsou srovnatelné a zejména v případě vyhodnocení intenzity bandů po barvení pomocí 4-chloro-1-naftolu korespondují ve většině případů s výsledky ze spektrofotometrického stanovení aktivity DAO (Obr. 27).

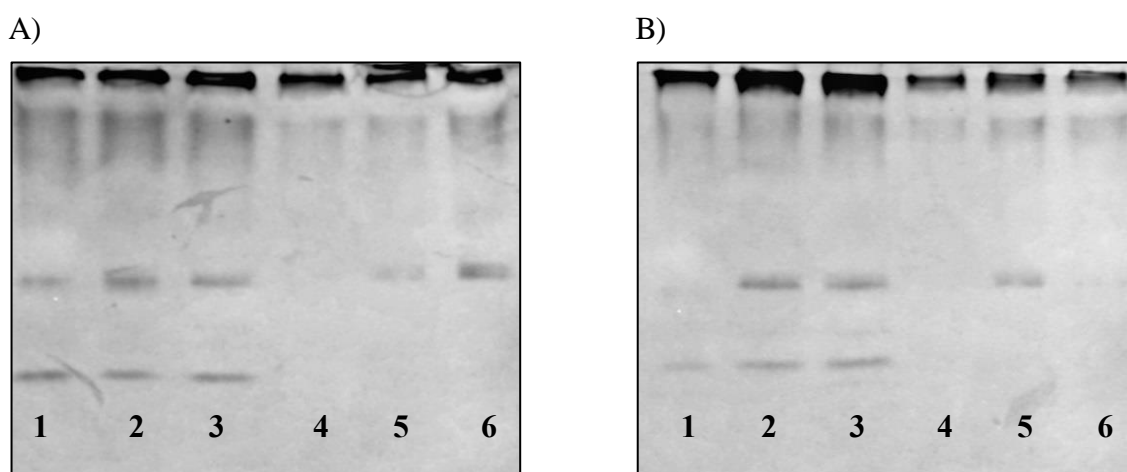


Obr. 26 Nativní elektroforéza - barvení na aktivitu DAO. Barvení 1) DAO s 4-chloro-1-naftolem, 2) s *o*-fenylendiaminem. A) *P. sativum* cv. Kudrnáč, B) *P. sativum* cv. Twinset. 1 - kořen KONTROLA, 2 – kořen GSNO, 3 – kořen PTIO, 4 – stoněk KONTROLA, 5 – stoněk GSNO, 6 – stoněk PTIO. Extrakce vzorků v poměru 1:1; do jamek pipetováno 25 μ l vzorku.

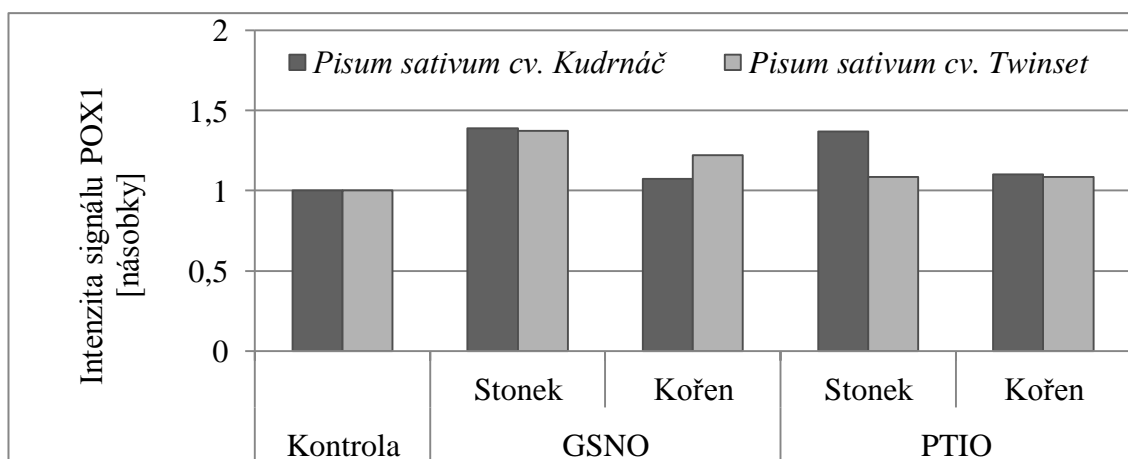


Obr. 27 Vyhodnocení intenzity bandů po nativní elektroforéze. Barvení na aktivitu DAO A) s 4-chloro-1-naftolem, B) s *o*-fenylendiaminem.

Pro detekci POX v gelech po nativní elektroforéze bylo vybráno barvení s 4-chloro-1-naftolem. U *P. sativum* cv. Kudrnáč i cv. Twinset byly v kořeni detekovány čtyři isoformy hrachových peroxidas. V nadzemní části vzorků s GSNO a PTIO pak byly detekovány tři isoformy a ve vzorku kontrolním pouze dvě (Obr. 28). Intenzita bandů byla vyhodnocena pro POX1 (Obr. 29). Získané výsledky vyhodnocení intenzity bandů ve většině případů korelují s výsledky ze spektrofotometrického stanovení aktivity GPX.

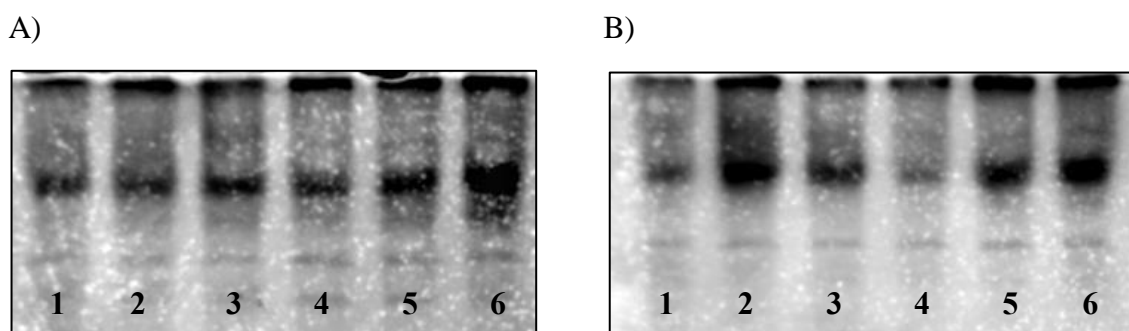


Obr. 28 Nativní elektroforéza - barvení na aktivitu POX. A) POX u *P. sativum* cv. Kudrnáč, B) POX u *P. sativum* cv. Twinset. 1 – kořen KONTROLA, 2 – kořen GSNO, 3 – kořen PTIO, 4 - stonek KONTROLA, 5 – stonek GSNO, 6 – stonek PTIO. Extrakce vzorků v poměru 1:1; do jamek pipetováno 25 μ l vzorku.

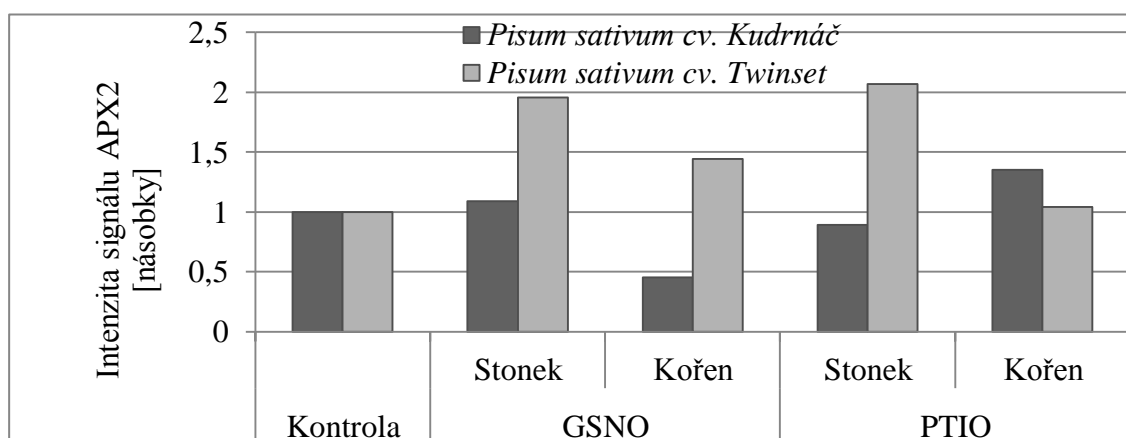


Obr. 29 Vyhodnocení intenzity bandů po nativní elektroforéze. Barvení na aktivitu POX s 4-chloro-1-naftolem.

Pro detekci APX v gelech po nativní elektroforéze bylo vybráno barvení s NBT (nitrotetrazoliová modř). U *P. sativum* kultivar Kudrnáč byly detekovány celkem čtyři isoformy tohoto enzymu v nadzemní části i v kořeni semenáčků (Obr. 30 A). U kultivaru Twinset byly v obou hrachových částech detekovány pouze 3 isoformy APX (Obr. 30 B). Intenzita bandů byla vyhodnocena pro APX2. Vliv PTIO na aktivitu APX u obou kultivarů detekovaný nativní elektroforézou je srovnatelný s výsledky spektrofotometrického stanovení aktivity APX. V případě GSNO získané výsledky nekorespondují s výsledky ze spektrofotometrického stanovení aktivity APX (Obr. 31).



Obr. 30 Nativní elektroforéza - barvení na aktivitu APX. A) APX u *P. sativum* cv. Kudrnáč, B) APX u *P. sativum* cv. Twinset. 1 – kořen KONTROLA, 2 – kořen GSNO, 3 – kořen PTIO, 4 - stoněk KONTROLA, 5 – stoněk GSNO, 6 – stoněk PTIO. Extrakce vzorků v poměru 1:1; do jamek pipetováno 25 μ l vzorku.



Obr. 31 Vyhodnocení intenzity bandů po nativní elektroforéze. Barvení na aktivitu APX.

5 ZÁVĚR

V teoretické části předložené bakalářské práce byla vypracována literární rešerše zaměřená na charakterizaci, biosyntézu a katabolismus rostlinných polyaminů. Byly shrnuty poznatky týkající se úlohy polyaminů u rostlin za fyziologických podmínek a také jejich role v reakcích rostlin na stres. Dále byla popsána funkce enzymů aminoxidas a aminoaldehyddehydrogenas v katabolismu polyaminů. Následně byla vypracována stručná charakteristika reaktivních forem dusíku, jejich produkce, degradace a zapojení v regulaci metabolických drah.

V experimentální části bakalářské práce byl studován vliv modulátorů koncentrace NO na aktivitu dvou klíčových enzymů metabolismu polyaminů – diaminoxidasy (DAO) a aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) a enzymů podílejících se na degradaci H_2O_2 guajakolperoxidasy (GPX) a askorbátperoxidasy (APX) u dvou kultivarů *P. sativum* cv. Kudrnáč a *P. sativum* cv. Twinset lišících se citlivostí na některé patogenní organismy.

Z provedených experimentů lze vyvodit následující závěry:

- 1) *P. sativum* cv. Kudrnáč vykazoval rychlejší růst a vývoj v porovnání s cv. Twinset.
- 2) Aktivity studovaných enzymů u kultivarů hrachu Twinset a Kudrnáč se většinou v rámci směrodatných odchylek významně nelišily. Rozdíly byly detekovány pouze v kořenové části při stanovení AMADH aktivity, ve stonku a apikální části kořene při detekci DAO aktivity a zejména v apikální části kořene při stanovení GPX aktivity.
- 3) Na aplikaci donoru NO reagovaly jednotlivé kultivary *P. sativum* odlišně. U cv. Kudrnáč došlo k prodloužení hlavního kořene, u cv. Twinset naopak k jeho zkrácení. V obou případech byl zaznamenán pozitivní vliv donoru NO na růst laterálních kořenů. Po aplikaci lapače NO došlo u obou kultivarů ke krácení délky hlavního kořene a byl zaznamenán negativní vliv na růst laterálních kořenů.
- 4) Vliv zvýšené koncentrace NO na aktivity studovaných enzymů v důsledku aplikace GSNO do růstového média se projevil zejména u odolného kultivaru *P. sativum* cv. Twinset.
- 5) Na základě změn enzymových aktivit po aplikaci donoru NO (GSNO) do růstového média lze předpokládat regulaci aktivací zejména enzymů AMADH

v kořenové části a GPX v nadzemní části kultivaru Twinset. V případě APX získané výsledky poukazují na možný inhibiční efekt zvýšené koncentrace NO v kořeni, ale naopak výrazný aktivační efekt NO na aktivitu APX v apikální části kořene cv. Twinset.

- 6) Sloučenina PTIO se v řadě studií používá jako lapač NO. Reaguje s NO za vzniku NO₂. PTIO vychytává NO radikál a mělo by inhibovat dráhy, kde vystupuje jako signální molekula vlastní NO. Z celkového pohledu na RNS to není tak jednoznačné, protože naopak v důsledku přeměny NO na NO₂ se může zvyšovat tzv. nitrační reakce.
- 7) Zvýšená aktivita APX u obou kultivarů hrachu setého pěstovaných na médiu s přídavkem lapače NO PTIO poukazuje na možný regulační efekt NO. Posttranslační modifikace S-nitrosylace APX aktivitu obvykle zvyšuje naopak nitrace tyrosinu aktivitu APX snižuje, jak bylo publikováno v Begara-Morales *et al.* (2015).
- 8) V následující studii je nutné se zaměřit, zda jsou detekované změny v aktivitách enzymů ovlivněny posttranslačními modifikacemi enzymů (S-nitrosylace nebo nitrace) nebo např. změnou intenzity exprese odpovídajících genů.

6 LITERATURA

- Afzal I., Munir F., Ayub C. M., Basra S. M. A., Hameed A., Nawaz A. (2009): Changes in antioxidant enzymes, germination capacity and vigour of tomato seeds in response of priming with polyamines. *Seed Science and Technology* **37**, 765–770.
- Ahmad P., Kumar A., Gupta A., Hu X., Azooz M. M., Sharma S. (2012): Polyamines: role in plants under abiotic stress. In: *Crop Production for Agricultural Improvement*. (Ashraf M., Öztürk M., Ahmad M., Aksoy A. ed.), Springer, Amsterdam, The Netherlands, 491-512.
- 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.
- Alcázar R., Cuevas J. C., Patrón M., Altabella T., Tiburcio A. F. (2006a): Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **128**, 448-455.
- Alcázar R., García-Martínez J. L., Cuevas J. C., Tiburcio, A. F., Altabella T. (2005): Overexpression of *ADC2* in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *The Plant Journal* **43**, 425–436.
- Alcázar R., Marco F., Cuevas J. C., Patron M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A. F., Altabella T. (2006b): Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* **28**, 1867–1876.
- Ali R. M. (2000): Role of putrescine in salt tolerance of *Atropa belladonna* plant. *Plant Science* **152**, 173–179.
- Angelini R., Federico R. (1989): Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *Journal of Plant Physiology* **135**, 212–217.
- Bagni N., Tassoni A. (2001): Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**, 301–317.
- Bartels D., Sunkar R. (2005): Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**, 23-58.
- Begara-Morales J. C., Chaki M., Sánchez-Calvo B., Mata-Pérez C., Letierrier M., Palma J. M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2013): Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *Journal of Experimental Botany* **64**, 1121–1134.
- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Mata-Pérez C., Valderrama R., Padilla M. N., López-Jaramillo J., Luque F., Corpas F. J., Barroso J. B. (2015): Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **66**, 5983–5996.
- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., López-Jaramillo J., Padilla M. N., Carreras A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2014): Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **65**, 527–538.
- Beligni M. V., Lamattina L. (2000): Nitric oxide stimulates seed germination, de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light inducible responses in plants. *Planta* **210**, 215–221.
- Benhar M., Forrester M. T., Hess D. T., Stamler J. S. (2008): Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* **320**, 1050–1054.
- Bethke P. C., Badger M. R., Jones R. L. (2004): Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell* **16**, 332–341.
- Bethke P. C., Libourel I. G., Jones R. L. (2006): Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 517–526.
- Bitrián M., Zarza X., Altabella T., Tiburcio A. F., Alcázar R. (2012): Polyamines under Abiotic Stress: Metabolit Crossroads and Hormonal Crosstalks in Plants. *Metabolites* **2**, 516-528.
- Bolkenius F. N., Seiler N. (1981): Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism. *International Journal of Biochemistry* **13**, 287–292.
- Borrell A., Bestford T., Altabella T., Masgrau C., Tiburcio A. F. (1996): Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Physiologia Plantarum* **98**, 105–110.
- Borrell A., Culiñez-Macia F. A., Altabella T., Besford R. T., Flores D., Tiburcio A.F. (1995): Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiology* **109**, 771–776.

- Bortolotti C., Cordeiro A., Alcázar R., Borrell A., Culiañez-Macià F. A., Tiburcio, A. F., Altabella T. (2004): Localization of arginine decarboxylase in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* **120**, 84–92.
- 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.
- Brauner F., Šebela M., Snégaroff F., Peč P., Meunier J. C. (2003): Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 1-10.
- Brazeau B. J., Johnson B. J., Wilmot C. M. (2004): Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **428**, 22–31.
- Brüggemann L., Pottosin I., Schönknecht G. (1998): Cytoplasmic polyamines block the fast activating vacuolar cation channel. *The Plant Journal* **16**, 101–105.
- Brüggemann L., Pottosin I., Schönknecht G. (1999): Selectivity of the fast activating vacuolar cation channel. *Journal of Experimental Botany* **50**, 873–876.
- Bunsupa S., Katayama K., Ikeura E., Oikawa A., Toyooka K., Saito K., Yamazaki M. (2012a): Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in leguminosae. *The Plant Cell* **24**, 1202–1216.
- Bunsupa S., Yamazaki M., Saito K. (2012b): Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. *Frontiers in Plant Science* **3**:239. doi: 10.3389/fpls.2012.00239.
- Calinescu C., Federico R., Mondovi B., Mateescu M. A. (2010): Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**, 1281-1290.
- Camejo D., Ortiz-Espín A., Lázaro J. J., Romero-Puertas M. C., Lázaro- Payo A., Sevilla F., Jiménez A. (2015): Functional and structural changes in plant mitochondrial PrxII F caused by NO. *Journal of Proteomics* **119**, 112–125.
- Clark D., Durner J., Navarre D. A., Klessig D. F. (2000): Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 1380–1384.
- Coghlan S. E., Walters D. R. (1990): Polyamine metabolism in “green-islands” on powdery mildew-infected barely leaves: possible interactions with senescence. *NewPhytologist* **116**, 417–424.
- 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.
- Corpas F. J., Barroso J. B., 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.
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**, 900–905.
- Di Stasi, A. M., Mallozzi, C., Macchia, G., Maura, G., Petrucci, T. C., Minetti, M. (2002): Peroxynitrite affects exocytosis and SNARE complex formation and induces tyrosine nitration of synaptic proteins. *Journal of Neurochemistry* **82**, 420–429.
- Dobrovinskaya O. R., Muñiz J., Pottosin I. I. (1999a): Asymmetric block of the plant vacuolar Ca²⁺ permeable channel by organic cations. *European Biophysics Journal* **28**, 552–563.
- Dobrovinskaya O. R., Muñiz J., Pottosin I. I. (1999b): Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *The Journal of Membrane Biology* **167**, 127–140.
- Doerge D. R., Divi R. L., Churchwell M. I. (1997): Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases. *Analytical Biochemistry* **250**, 10 - 17.
- Dove J. E., Klinman J. P. (2001): Trihydroxyphenylalanine quinone (TPQ) from copper amine oxidases and lysyl tyrosylquinone (LTQ) from lysyl oxidase. *Advances in Protein Chemistry* **58**, 141-174.

- Duhazé C., Gouzerh G., Gagneul D., Larher F., Bouchereau A. (2002): The conversion of spermidine to putrescine and 1,3- diaminopropane in the roots of *Limonium tataricum*. *Plant Science* **163**, 639–646.
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F. (1998): Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10328–10333.
- Edreva A. M., Velikova V. B., Tsonov T. D. (2007): Phenylamides in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **54**, 289–301.
- Fan H.-F., Du C.-X., Guo S.-R. (2013): Nitric oxide enhances salt tolerance in cucumber seedlings by regulating free polyamine content. *Environmental and Experimental Botany* **86**, 52-59.
- Fares A., Rossignol M., Peltier J. B. (2011): Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **416**, 331-336
- Federico R., Angelini R. (1991): Polyamine catabolism in plants. In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, (Slocum R.D., Flores H.E. eds.), Boca Raton, CRC Press, Florida, 41–56.
- Feechan A., Kwon E., Yun B.-W., Wang Y., Pallas J. A., Loake G. J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8054–8059.
- Fernández-Marcos M., Sanz L., Lewis D. R., Muday G. K., Lorenzo O. (2011): Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PINFORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **108**, 18506-18511.
- Fernández-Marcos M., Sanz L., Lorenzo O. (2012): Nitric oxide: An emerging regulator of cell elongation during primary root growth. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 196-200.
- Fincato P., Moschou P. N., Spedaletti V., Tavazza R., Angelini R., Federico R., Roubelakis-Angelakis K. A., Tavladoraki P. (2011): Functional diversity inside the *Arabidopsis* polyamine oxidase gene family. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1155–1168.
- Flemetakis E., Efrose R. C., Desbrosses G., Dimou M., Delis C., Aivalakis G., Edvardi M. K., Katinakis P. (2004): Induction and spatial organization of polyamine biosynthesis during nodule development in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 1283–1293.
- Frébert I., Adachi O. (1995): Copper/Quinone-Containing Amine Oxidases, an Exciting Class of Ubiquitous Enzymes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 625-635.
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**, 151-158.
- Garufi A., Visconti S., Camoni L., Aducci P. (2007): Polyamines as physiological regulators of 14-3-3 interaction with the plant plasmamembrane H⁺-ATPase. *Plant and Cell Physiology* **48**, 434–440.
- Ge C. M., Cui X., Wang Y.H., Hu Y.X., Fu Z.M., Zhang D.F., Cheng Z.K., Li J.Y. (2006): BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for *Arabidopsis* growth and development. *Cell Research* **16**, 446–456.
- Gill-Amado J. A., Gomez-Jimenez M. C (2012): Regulation of polyamine metabolism and biosynthetic gene expression during olive mature-fruit abscission. *Planta* **235**, 1221-1237.
- Glyan'ko A. K. (2013): Initiation of nitric oxide (NO) synthesis in roots of etiolated seedlings of pea (*Pisum sativum* L.) under the influence of nitrogen-containing compounds. *Biochemistry (Moscow)* **78**, 471-476.
- Greenland A. J., Lewis D. H. (1984): Amines in barley leaves infected with brown rust and their possible relevance to formation of 'green-islands'. *New Phytologist* **96**, 283-291.
- Groppa M. D., Benavides M. P. (2007): Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* **34**, 35–45.
- Gupta K. J., Stoimenova M., Kaiser W. M. (2005): In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2601–2609.

- Gupta K., Dey A., Gupta B. (2013): Plant polyamines in abiotic stress response. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 2015-2036.
- Hanfrey C., Franceschetti M., Mayer M. J., Illingworth C., Elliott K., Collier M., Thompson B., Perry B., Michael A.J. (2003): Translational regulation of the plant S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochemical Society Transactions* **31**, 424-427.
- 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* **27**, 551-560.
- Hirai M. Y., Suzuki H., Yamazaki M., Saito K. (2000): Biochemical and partial molecular characterization of bitter and sweet forms of *Lupinus angustifolius*, an experimental model for study of molecular regulation of quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **48**, 1458-1461.
- Horchani F., Prévot M., Bosdari A., Evangelisti E., Meilhoc E., Bruand C., Raymond P., Boncompagni E., Aschi-Smiti S., Puppo A., Brouquisse R. (2011): Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiology* **155**, 1023-1036.
- Hoth S., Morgante M., Sanchez J. P., Hanafey M. K., Tingey S. V., Chua N. H. (2002): Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science* **115**, 4891-4900.
- Houen G., Leonardsen L. (1992): A specific peroxidase-coupled activity stain for diamine oxidases. *Analytical Biochemistry* **204**, 296-299.
- Hussain S. S., Ali M., Ahmad M., Siddique K. H. M. (2011): Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances* **29**, 300-311.
- Igarashi K., Kashiwagi K. (2000): Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**, 559-564.
- Igarashi K., Kashiwagi K., Hamasaki H., Miura A., Kakegawa T., Hirose S., Matsuzaki S. (1986): Formation of a compensatory polyamine by *Escherichia coli* polyamine-requiring mutants during growth in the absence of polyamines. *Journal of Bacteriology* **166**, 128-134.
- Iqbal M., Ashraf M. (2005): Changes in growth, photosynthetic capacity, and ionic relations in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) due to pre-sowing seed treatment with polyamines. *Plant Growth Regulation* **46**, 19-30.
- Jancewicz A. L., Gibbs N. M., Masson P. H. (2016): Cadaverine's Functional Role in Plant Development and Environmental Response. *Frontiers in Plant Science* **7**:870 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00870/full>.
- Jiménez-Bremont J. F., Marina M., De la Luz Guerrero-González M., Rossi F. R., Sánchez-Rangel D., Rodríguez-Kessler M., Ruiz O. A., Gárriz A. (2014): Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Frontiers in Plant Science* **5**:95, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3957736/>.
- Johansson K., El-Ahmad M., Ramaswamy S., Hjelmqvist L., Jornvall H., Eklund H. (1998): Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Science* **7**, 2106-2117.
- Kahana C. (2007): Ubiquitin dependent and independent protein degradation in the regulation of cellular polyamines. *Amino Acids* **33**, 225-230.
- Keyster M., Klein A., Egbich I., Jacobs A., Ludidi N. (2011): Nitric oxide increases the enzymatic activity of three ascorbate peroxidase isoforms in soybean root nodules. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 956-961.
- Kim N. H. D., Kim B. S. D., Hwang B. K. D. (2013): Pepper arginine decarboxylase is required for polyamine and gamma-aminobutyric acid signaling in cell death and defense response. *Plant Physiology* **162**, 2067-2083.
- Kneeshaw S., Gelineau S., Tada Y., Loake G. J., Spoel S. H. (2014): Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecular Cell* **56**, 153-162.

- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L. (2008): Osmotic stress- and indole-3-butyric acid induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum* **133**, 406–416.
- Kovacs I, Lindermayr C. (2013): Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science* **4**, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00137/full>.
- Kumar A., Altabella T., Taylor M., Tiburcio A. F. (1997): Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Science* **2**, 124–130.
- Kusano T., Yamaguchi K., Berberich T., Takahashi Y. (2007): The polyamine spermine rescues *Arabidopsis* from salinity and drought stresses. *Plant Signaling & Behaviour* **2**, 250–251.
- Kushad M. M., Dumbroff E. B. (1991): Metabolic and Physiological Relationship Between the Polyamine and Ethylene Biosynthetic Pathways. In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, (Slocum R.D., Flores H.E. eds.), Boca Raton, CRC Press, Florida, 77–92.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lea P. J. (1999): Nitrate assimilation. In: *Plant biochemistry and molecular biology*. (Lea P. J. ed.), Wiley, London, U. K., 163–192.
- Libourel I. G., Bethke P. C., De Michele R., Jones R. L. (2006): Nitric oxide gas stimulates germination of dormant *Arabidopsis* seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta* **223**, 813–820.
- Liu H. Y., Yu X., Cui D. Y., Sun M. H., Sun W. N., Tang Z. C. (2007): The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. *Cell Research* **17**, 638–649.
- Liu J. H., Kitashiba H., Wang J., Ban Y., Moriguchi T. (2007): Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology* **24**, 117–26.
- Liu K., Fu H., Bei Q., Luan S. (2000): Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiology* **124**, 1315–1326.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S. (2001): A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490–494.
- Malmberg R. L., Watson M.B., Galloway G.L., Yu W. (1998): Molecular genetic analyses of plant polyamines. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**, 199–224.
- Martin-Tanguy J. (2001): Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* **34**, 135–148
- Masson P. H., Takahashi T., Angelini R. (2017): Editorial: Molecular Mechanisms Underlying Polyamine Functions in Plants. *Frontiers in Plant Science* **8**:14 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5258739/>.
- Minocha R., Mujamdar R., Minocha S. C. (2014): Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Frontiers in Plant Science* **5**:175 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4017135/>.
- Missihoun T. D., Schmitz J., Klug R., Kirch H. H., Bartels D. (2011): Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta* **233**, 369–382.
- Mitsuya S., Yokota Y., Fujiwara T., Mori N., Takabe T. (2009): OsBADH1 is possibly involved in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes. *FEBS Letters* **583**, 3625–3629.
- Mittler R., Zilinskas B. A. (1993): Detection of Ascorbate Peroxidase Activity in Native Gels by Inhibition of the Ascorbate-Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium. *Analytical Biochemistry* **212**, 540–546.
- 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., Sanmartin M., Andriopoulou A.H., Rojo E., Sanchez-Serrano, J.J., Roubelakis-Angelakis K.A. (2008): Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**, 1845–1857.

- 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.
- Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., Hayashi S., Igarashi K., Tamura T., Tanaka K., Ichihara A. (1992): Ornithine decarboxylase is degraded by the 26s-proteasome without ubiquitination. *Nature* **360**, 597–599.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Nakano Y., Asada K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **22**, 867-880.
- Navakoudis E., Lütz C., Langebartels C., Lütz-Meindl U., Kotzabasis K. (2003): Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects* **1621**, 160– 169.
- Ndayiragiji A., Lutts S. (2006): Exogenous putrescine reduces sodium and chloride accumulation in NaCl-treated calli of the salt-sensitive rice cultivar I Kong Pao. *Plant Growth Regulation* **48**, 51–63.
- Neoseeds home page: <http://www.neoseeds.cz/cz/e-shop/1247633/c70061-novinky/hrach-drenovy-twinset-spanbaleni-obsahuje-30g-semen-span.html> (6.5.2018).
- Neoseeds home page: <http://www.neoseeds.cz/cz/e-shop/1512526/c76428-hrach/hrach-kudrnac-balkonovy-spanbaleni-obsahuje-30-g-semen-span.html> (6.5.2018).
- Nuccio M. L., Rhodes D., McNeil S. D., Hanson A. D. (1999): Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 128–134.
- Ortega-Galisteo A. P., Rodríguez-Serrano M., Pazmiño D. M., Gupta D. K., Sandalio L. M., Romero-Puertas M. C. (2012): S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2089–2103.
- Pagnussat G. C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L. (2002): Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* **129**, 954–956.
- Petřivalský M., Brauner F., Luhová L., Gagneul D., Šebela M. (2007): Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1410-1418.
- Piterková J., Luhová L., Zajoncová L., Šebela M., Petřivalský M. (2012): Modulation of Polyamine Catabolism in Pea Seedlings by Calcium during Salinity Stress. *Plant Protection Science* **48**, 53-64.
- Podgórska A., Burian M., Szal B. (2017): Extra-Cellular But Extra-Ordinarily Important for Cells: Apoplastic Reactive Oxygen Species Metabolism. *Frontiers in Plant Science* **8**:1353 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01353/full>.
- Pottosin I., Shabala S. (2014): Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Frontiers in Plant Science* **5**:154 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4006063/>
- 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.
- Rangan P., Subramani R., Kumar R., Singh A. K., Singh R. (2014): Recent Advances in Polyamine Metabolism and Abiotic Stress Tolerance. *BioMed Research International* **2014**, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/239621>.
- Rasul S., Dubreuil-Maurizi C., Lamotte O., Koen E., Poinssot B., Alcaraz G., Wendehenne D., Jeandroz S. (2012): Nitric oxide production mediates oligogalacturonides-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **35**, 1483-1499.
- Rea G., de Pinto M. C., Tavazza R., Biondi S., Gobbi V., Ferrante P., De Gara L., Federico R., Angelini R., Tavladoraki P. (2004): Ectopic expression of maize polyamine oxidase and pea copper amine oxidase in the cell wall of tobacco plants. *Plant Physiology* **134**, 1414–1426.

- 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.
- Rodríguez-Kessler M., Alpuche-Solís A. G., Ruiz O. A., JiménezBremont J. F. (2006): Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. *Plant Growth Regulation* **48**, 175–185.
- Romero-Puertas M. C., Laxa M., Mattè A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A. M. E., Perazzolli M., Vandelle E., Dietz K. J., Delledonne M. (2007): S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *The Plant Cell* **19**, 4120–4130.
- Sahay S., Gupta M. (2017): An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. *Nitric Oxide* **67**, 39-52.
- Seiler N., Raul F. (2005): Polyamines and apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **9**, 623–642.
- Semchuk N. M., Vasylyk V., Kubrak O. I., Lushchak V. I. (2011): Effect of sodium nitroprusside and S-nitrosoglutathione on pigment content and antioxidant system of tocopherol-deficient plants of *Arabidopsis thaliana*. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* **83**, 69-79.
- Shelp B. J., Bown A. W., McLean M. D. (1999): Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* **4**, 446–452.
- Shi F. M., Li Y. Z. (2008): *Verticillium dahliae* toxins-induced nitric oxide production in *Arabidopsis* is major dependent on nitrate reductase. *BMB Reports* **41**, 79-85.
- Shi H., Ye T., Chan Z. (2013): Comparative proteomic and physiological analyses reveal the protective effect of exogenous polyamines in the bermudagrass (*Cynodon dactylon*) response to salt and drought stresses. *Journal of Proteome Research* **12**, 4807–4864.
- Schoofs G., Teichmann S., Hartmann T., Wink M. (1983): Lysine decarboxylase in plants and its integration in quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **22**, 65–69.
- Slocum R. D. (1991): Polyamine biosynthesis in plants. In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, (Slocum R.D., Flores H.E. eds.), Boca Raton, CRC Press, Florida, 23-40.
- Slocum R. D., Kaur-Sawhney R., Galston A. W. (1984): The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **235**, 283–303.
- 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., Legocka J. (2016): From Accumulation to Degradation: Reprogramming Polyamine Metabolism Facilitates Dark-Induced Senescence in Barley Leaf Cells. *Frontiers in Plant Science* **6**:1198 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.01198/full>.
- Stes E., Biondi S., Holsters M., Vereecke D. (2011): Bacterial and plant signal integration via D3-type cyclins enhances symptom development in the *Arabidopsis-Rhodococcus fascians* interaction. *Plant Physiology* **156**, 712–725.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1480**, 329-341.
- Tabor C. W., Tabor H. (1984): Polyamines. *Annual Review of Biochemistry* **53**, 749–790.
- Tang W., Newton R J. (2005): Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation* **46**, 31–43.
- Tavladoraki P., Cona A., Federico R., Tempera G., Viceconte N., Saccoccio S., Battaglia V., Toninello A., Agostinelli E. (2012): Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino Acids* **42**, 411-426.
- Thomas T., Thomas T. J. (2001): Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 244–258.
- Tiburcio A., Altabella T., Bitrián M., Alcázar R. (2014): The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* **240**, 1-18.

- Tomar P. C., Lakra N., Mishra S.N. (2013): Cadaverine: A lysine catabolite involved in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* **8**:10 <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.25850>.
- Tripathi D. K., Singh S., Singh S., Srivastava P. K., Singh V. P., Singh S., Prasad S. M., Singh P. K., Dubey N. K., Pandey A. C., Chauhan D. K. (2017): Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* **110**, 167-177.
- 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.
- Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M. (2007): Aminoaldehyde dehydrogenases: has the time now come for new interesting discoveries? *Curent. Topics in Plant Biology* **8**, 45–70.
- Urano K., Yoshiba Y., Nanjo T., Igarashi Y., Seki M., Sekiguchi F., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2003): Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant, Cell & Environment* **26**, 1917–1926.
- Urano K., Yoshiba Y., Nanjo T., Ito T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2004): *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 369–375.
- Vanin A. F., Svistunenko D. A., Mikoyan V. D., Serezhenkov V. A., Fryer M. J., Baker N. R., Cooper C. E. (2004): Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 24100–24107.
- Velikova V., Yordanov I., Edreva A. (2000): Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* **151**, 59–66.
- Veverková E. (2016): Identifikace isoenzymů aldehyddehydrogenas pomocí interakcí s různými koenzymy a substráty. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Walden R., Cordeiro A., Tiburcio A. F. (1997): Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiology* **113**, 1009–1013.
- Walters D. R., Wylie M. A. (1986): Polyamines in discrete regions of barley leaves infected with the powdery mildew fungus. *Erysiphegraminis. Physiologia Plantarum* **67**, 630–633.
- Wang X., Shi G., Xu, Q., Hu, J. (2006): Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1062-1070.
- Watson M. B., Emory K. K., Piatak R. M., Malmberg R. L. (1998): Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibit altered root growth. *The Plant Journal* **13**, 231–239.
- Weretilnyk E. A., Hanson A. D. (1990): Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 2745-2749.
- Wimalasekera R., Schaarschmidt F., Angelini R., Cona A., Tavladoraki P., Scherer G. F. E. (2015): POLYAMINE OXIDASE2 of *Arabidopsis* contributes to ABA mediated plant developmental processes. *Plant Physiology and Biochemistry* **96**, 231-240.
- Wimalasekera R., Villar C., Begum T., Scherer G. F. E. (2011): COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* Contributes to Abscisic Acid- and Polyamine-Induced Nitric Oxide Biosynthesis and Abscisic Acid Signal Transduction. *Molecular Plant* **4**, 663-678.
- Wink M. (1992): The role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. In: *Insect-Plant Interactions*. (Bernays E. A. ed.), CRC-Press, Arizona, U. S. A., 133-169.
- Wink M. (2010): Molecular modes of action of cytotoxic alkaloids: from DNA intercalation, spindle poisoning, topoisomerase inhibition to apoptosis and multiple drug resistance. In: *The Alkaloids: Chemistry and Biology* 64. (Cordell G. A. ed.), Elsevier, Amstredam, 1–47

- Woo H. R., Kim H. J., Nam H. G., Lim P. O. (2013): Plant leaf senescence and death: regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science* **126**, 4823–4833.
- Xue Y., Liu Z., Gao X., Jin C., Wen L., Yao X., Ren J. (2010): GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PLOS one* **5**, e11290.
- Yamasaki H., Sakihama Y. (2000): Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitratereductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* **468**, 89–92.
- Yang H., Mu J., Chen L., Feng J., Hu J., Li L., Zhou J. M., Zuo J. (2015): S-Nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiology* **167**, 1604–1615.
- Yiu J. C., Juang L. D., Fang D. Y. T., Liu C. W., Wu S. J. (2009): Exogenous putrescine reduces flooding-induced oxidative damage by increasing the antioxidant properties of Welsh onion. *Scientia Horticulturae* **120**, 306–314.
- Zandonadi D. B., Santos M. P., Dobbss L. B., Olivares F. L., Canellas L. P., Binzel M. L., Okorokova-Facanha A. L., Facanha A. R. (2010): Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta* **231**, 1026-1035.
- Zeller E. A. (1938): Zur Kenntnis der Diamin-oxydase. 3. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Poly-aminen. *Helvetica Chimica Acta* **21**, 1645–1665.
- Zhang W., Jiang B., Li W., Song H., Yu Y., Chen J. (2009): Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating antioxidative system. *Scientia Horticulturae* **122**, 200–208.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	Kyselina abscisová
ABAL	4-aminobutanal
ABALDH	Aminobutyraldehyddehydrogenasa
ADC	Arginindekarboxylasa
AIH	Agmatiniminohydrolasa
ALDH	Aldehyddehydrogenasa
AMADH	Aminoaldehyddehydrogenasa
AO	Aminoxidasa
APAL	3-aminopropionaldehyd
APX	Askorbátperoxidasa
BADH	Betainaldehyddehydrogenasa
BSA	Hovězí sérový albumin
CPA	N-karbamoyl-Put-amidohydrolasa
cPTIO	Karboxy derivát PTIO
DAO	Diaminoxidasy
DAP	1,3-diaminopropan
dcSAM	Dekarboxylovaný S-adenosylmethionin
ET	Ethylen
FAD	Flavinadenindinukleotid
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
GPC	Glutathionperoxidasa
GPX	Guajakolperoxidasa
GR	Glutathionreduktasa
GSH	Glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
HR	Hypersenzitivní reakce
IAA	Kyselina indol-3-octová
JA	Kyselina jasmonová
KAD	Kadaverin
KAT	Katalasa
LDC	Lysinidekarboxylasa
NOS	NO-synthasa
NR	Nitrátreduktasa
ODC	Ornithindekarboxylasa
OXO	Oxalát oxidasa
PA	Polyaminy
PAO	Polyaminoxidasy
POX	Peroxidasa
Prx	Peroxiredoxin
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxy-3-oxid
PTM	Posttranslační modifikace
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
PUT	Putrescin
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RSNO	S-nitrosothioly
SA	Kyselina salicylová

SAM	S-adenosyl-methionin
SAMDC	SAM-dekarboxylasy
SNP	Nitroprusid sodný
SOD	Superoxiddismutasa
SPD	Spermidin
SPDS	Spermidinsynthasa
SPM	Spermin
SPMS	Sperminsynthasa
TCA	Trikarboxylové kyseliny
TGasa	Transglutaminasa
TPQ	2,4,5-trihydroxyfenylalanin chinon
tSPM	Thermospermin
tSPMS	Thermosperminsynthasa