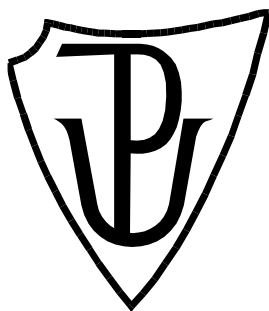


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Funkční charakterizace N-acetyltransferasy  
z *Arabidopsis thaliana***

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

|                   |                                |
|-------------------|--------------------------------|
| Autor:            | <b>Natálie Bahulová</b>        |
| Studijní program: | B1406 Biochemie                |
| Studijní obor:    | Biochemie                      |
| Forma studia:     | Prezenční                      |
| Vedoucí práce:    | <b>Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.</b> |
| Rok:              | 2021                           |

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a 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. Byl/a jsem seznámen/a 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 .....

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Janu Frömmelovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, pomoc při sepsání této práce a čas, který mně věnoval při konzultacích.

Bakalářská práce byla realizována s přispěním projektu IGA PrF\_2020\_013 Studium produkce a funkce enzymů a dalších biologicky aktivních molekul a jejich genetické variability v důležitých metabolických procesech rostlinných a živočišných systémů.

## Bibliografická identifikace

|                         |                                                                             |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Jméno a příjmení autora | Natálie Bahulová                                                            |
| Název práce             | Funkční charakterizace N-acetyltransferasy<br>z <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| Typ práce               | Bakalářská                                                                  |
| Pracoviště              | Katedra biochemie                                                           |
| Vedoucí práce           | Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.                                                     |
| Rok obhajoby práce      | 2021                                                                        |

### Abstrakt

Polyaminy jsou nízkomolekulární polykationty vyskytující se v rostlinách, jejichž hlavní zástupci jako putrescin, spermin a spermidin hrají důležitou roli při buněčném dělení, růstu, stárnutí listů, abiotické či biotické stresové reakci. Acetylace těchto polyaminů byla pozorována nejen u savců, ale také u rostlin, kde má podstatnou regulační funkci ve stresových reakcích. V *Arabidopsis thaliana* je přítomen enzym N-acetyltransferasové aktivity 1 a 2 (NATA1, NATA2), přičemž oba isoenzymy vykazují odlišnou substrátovou specifitost. V případě NATA1 se předpokládá funkce putrescinacetyltransferasy, zatímco NATA2 má pravděpodobně funkci sperminacetyltransferasy.

V experimentální části byla pomocí geneticky modifikované bakterie *Escherichia coli* obsahující plazmid s čtecím rámcem pro příslušný protein vyprodukována NATA1 a NATA2 z *Arabidopsis thaliana*. Za použití Ellmanovy spektroskopické metody byla stanovena substrátová specifitost obou isoenzymů, vliv vybraných solí na jejich aktivitu. Na základě naměřených hodnot byla potvrzena odlišná substrátová specifitost NATA1 a NATA2, přičemž NATA1 acetylovala ornithin rychleji než diaminopropan, zatímco NATA2 pomaleji. Také přítomnost jednotlivých solí o koncentraci  $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  měla za následek pokles aktivity enzymu.

|               |                                                                                                                            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Klíčová slova | <i>Arabidopsis thaliana</i> , N-acetyltransferasová aktivita, spermin/spermidin $\text{N}^1$ -acetyltransferasa, polyaminy |
| Počet stran   | 57                                                                                                                         |
| Počet příloh  | 0                                                                                                                          |
| Jazyk         | Český                                                                                                                      |

## Bibliographical identification

|                                |                                                                                     |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Autor's first name and surname | Natálie Bahulová                                                                    |
| Title                          | Functional characterization of N-acetyltransferase from <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| Type of thesis                 | Bachelor                                                                            |
| Department                     | Department of biochemistry                                                          |
| Supervisor                     | Mgr. Jan Frömmel, Ph.D.                                                             |
| The year of presentation       | 2021                                                                                |

### Abstract

Polyamines are low molecular weight polycations found in plants, whose main representatives such as putrescine, spermine and spermidine play an important role in cell division, growth, leaf ageing, abiotic or biotic stress response. The acetylation of these polyamines has been observed not only in mammals, but also in plants where it has substantial regulatory function on stress reactions. The enzyme N-acetyltransferase activity 1 and 2 (NATA1, NATA2) is present in *Arabidopsis thaliana*, wherein the two isoenzymes exhibit different substrate specificity. In the case of NATA1, a putrescine acetyltransferase function is supposed, while NATA2 has probably a function as a spermine acetyltransferase.

In the experimental part, the genetically modified bacterium *Escherichia coli* containing a plasmid with a reading framework for the respective protein was used for production of NATA1 a NATA2 from *Arabidopsis thaliana*. The substrate specificity of both isoenzymes as well as the effect of the selected salts on its activity were determined using Ellman's spectroscopic method. Based on the measured values, different substrate specificity of NATA1 and NATA2 was confirmed, wherein NATA1 acetylated ornithine faster than diaminopropane, while NATA2 slower. Also, the presence of salts with a concentration of  $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  resulted in a decrease of enzyme activity.

|                      |                                                                                                                               |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Keywords             | <i>Arabidopsis thaliana</i> , N-acetyltransferase activity, spermine/spermidine N <sup>1</sup> -acetyltransferase, polyamines |
| Number of pages      | 57                                                                                                                            |
| Number of appendices | 0                                                                                                                             |
| Language             | Czech                                                                                                                         |

## OBSAH

|         |                                                                               |    |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | ÚVOD .....                                                                    | 1  |
| 2       | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....                                       | 3  |
| 2.1     | Polyaminy .....                                                               | 3  |
| 2.1.1   | Biosyntéza .....                                                              | 5  |
| 2.1.2   | Katabolismus .....                                                            | 8  |
| 2.1.3   | Regulace hladiny polyaminů a jejich transport v rostlinách .....              | 10 |
| 2.1.4   | Role polyaminů při abiotickém stresu u <i>Arabidopsis thaliana</i> .....      | 11 |
| 2.1.5   | Acetylce polyaminů .....                                                      | 12 |
| 2.2     | N-acetyltransferasa .....                                                     | 14 |
| 2.2.1   | Lidská amin N-acetyltransferasa .....                                         | 14 |
| 2.2.2   | N-acetyltransferasová aktivita 1 a 2 (EC 2.3.1.57) .....                      | 18 |
| 2.2.2.1 | Funkce N-acetyltransferasové aktivity 1 jako putrescinacetyltransferasa ..... | 19 |
| 2.2.2.2 | Přeměna N <sup>δ</sup> -acetylornithinu na N-acetylputrescin .....            | 19 |
| 2.2.2.3 | Methyl jasmonát a jeho vliv v rostlinách .....                                | 21 |
| 2.2.2.4 | Funkce N-acetyltransferasové aktivity 2 jako sperminacetyltransferasa .....   | 22 |
| 3       | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....                                                     | 24 |
| 3.1     | Materiál a přístroje .....                                                    | 24 |
| 3.1.1   | Chemikálie .....                                                              | 24 |
| 3.1.2   | Roztoky .....                                                                 | 25 |
| 3.1.3   | Přístroje a vybavení .....                                                    | 26 |
| 3.1.4   | Biologický materiál .....                                                     | 27 |
| 3.2     | Metody .....                                                                  | 27 |
| 3.2.1   | Produkce bakterií a indukce exprese .....                                     | 27 |
| 3.2.2   | Rozbití bakterií a purifikace enzymu .....                                    | 28 |
| 3.2.3   | Kontrola purifikace enzymu pomocí SDS-PAGE .....                              | 29 |
| 3.2.4   | Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA .....                              | 31 |
| 3.2.5   | Stanovení substrátové specifčnosti enzymu .....                               | 32 |
| 3.2.6   | Měření vlivu solí na aktivitu enzymu .....                                    | 34 |
| 3.2.7   | Plánované experimenty .....                                                   | 35 |
| 3.2.7.1 | Stanovení pH optima .....                                                     | 35 |
| 3.2.7.2 | Stanovení kinetických parametrů .....                                         | 35 |
| 4       | VÝSLEDKY A DISKUSE .....                                                      | 37 |
| 4.1     | Purifikace enzymu .....                                                       | 37 |

|     |                                                 |    |
|-----|-------------------------------------------------|----|
| 4.2 | Stanovení substrátové specifčnosti enzymu ..... | 39 |
| 4.3 | Stanovení vlivu solí na aktivitu enzymu .....   | 40 |
| 4.4 | Plánované experimenty .....                     | 42 |
| 5   | ZÁVĚR .....                                     | 43 |
| 6   | LITERATURA .....                                | 44 |
| 7   | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....                   | 49 |

## **CÍLE PRÁCE**

Teoretická část:

Vypracování literární rešerše na téma biosyntéza a katabolismus polyaminů, regulace hladiny polyaminů, acetylace polyaminů, N-acetyltransferasová aktivita 1 a 2 (NATA1, NATA2) a jejich funkce.

Praktická část:

- Izolace a purifikace rekombinantní NATA
- Stanovení substrátové specifčnosti enzymu
- Stanovení vlivu solí na aktivitu NATA1 a NATA2
- Stanovení pH optima a kinetických parametrů enzymu



# 1 ÚVOD

Polyaminy v rostlinách jako jsou putrescin, spermidin a spermin hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech jako například při buněčném dělení, růstu, stárnutí listů, modulaci činnosti určitých skupin iontových kanálů nebo také při abiotickém stresu, kdy jejich vyšší hladiny způsobují odolnost rostliny. S tím je i spjata důležitost homeostázy polyaminů, která je zajištěna biosyntézou, katabolismem a transportem. Polyaminy jsou obvykle biosyntetizovány z aminokyselin, zejména argininu a lysinu, zatímco odbourávání je zajištěno jejich postupnou oxidací. Častým jevem je však také acetylace polyaminů.

U savců se vyskytují acetylované polyaminy, jako jsou N<sup>1</sup>-acetylspermin, N<sup>1</sup>-acetylspermidin a N<sup>8</sup>-acetylspermidin, které vznikají za katalýzy spermin/spermidin N<sup>1</sup>-acetyltransferasou. Ta se podílí na udržování homeostázy polyaminů či kyslíkové homeostáze a má také významnou roli při stresových reakcích. Avšak acetylované polyaminy mohou mít i negativní vliv na změny metabolismu a na karcinogenezi. Později byly také acetylované polyaminy detekovány v rostlinách, přičemž u *Arabidopsis thaliana* byla zjištěna stejná míra přítomnosti N<sup>1</sup>-acetylsperminu a N<sup>1</sup>-acetylspermidinu v kořenové i nadzemní části.

V *A. thaliana* je přítomen enzym N-acetyltransferasové aktivity 1 a 2 (NATA1, NATA2) a i přes to, že jejich geny přímo sousedí v genomu, je jejich funkce odlišná s výjimkou schopnosti katalyzovat acetylaci ornithinu na N<sup>δ</sup>-acetylornithin. NATA1 má funkci jako putrescinacetyltransferasa, která katalyzuje přeměnu putrescinu na N-acetylputrescin, zatímco NATA2 má funkci jako sperminacetyltransferasa, která katalyzuje přeměnu sperminu na N-acetylspermin. Z toho také vyplývá, že oba enzymy se vyznačují rozdílnou substrátovou specifíčností. K dalším odlišnostem také patří exprese genu, která je u NATA1 vyvolaná fytohormonem kyselinou jasmonovou nebo koronatinem, přičemž v případě NATA2 tomu tak není.

Lidské N-acetyltransferasy patřící mezi cytosolické enzymy mají také důležitou roli, a to při detoxikaci arylaminových nebo hydrazinových léčiv a při aktivaci arylaminových karcinogenů. I u lidské NAT vykazují oba isoenzymy NAT1 i NAT2 nejen odlišnou substrátovou specifíčnost, ale také tkáňovou distribuci. Významné jsou však také inhibitory tohoto lidského enzymu, které jsou schopny zastavit jeho aktivitu v nádorových buňkách.

V této bakalářské práci je studována funkční charakterizace N-acetyltransferasy z *A. thaliana*, která doposud není zcela známa. Jde především o izolaci a purifikaci rekombinantního proteinu NATA s následným stanovením koncentrace proteinu a substrátové specifity enzymu a také stanovením vlivu solí na aktivitu NATA1 a NATA2, přičemž další kroky by měly směřovat ke stanovení pH optima a kinetických parametrů studovaného enzymu.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Polyaminy

Polyaminy jsou nízkomolekulární polykationty, které se vyskytují u všech organismů včetně živočichů, rostlin, hub a bakterií a řadí se také mezi biogenní aminy, do nichž patří například tryptamin či fenylethylamin. Putrescin, kadaverin, spermidin a spermin (Obr. 1) jsou hlavními polyaminy vyskytující se v rostlinách, kde jsou lokalizovány zejména v cytoplazmě, dále také ve vakuolách, mitochondriích a chloroplastech (Adámková a Petřivalský, 2012). Dalším důležitým zástupcem polyaminů je diaminopropan, jehož acetylovaná forma ovlivňuje elektrické vlastnosti plazmatické membrány a iontový transport (Jammes *et al.*, 2014). Klíčovým substrátem pro syntézu polyaminů, ale také prolinu či citrulinu je ornithin, který patří mezi neesenciální aminokyseliny a vzniká jako meziprodukt v močovinovém cyklu (Sivashanmugam *et al.*, 2017).

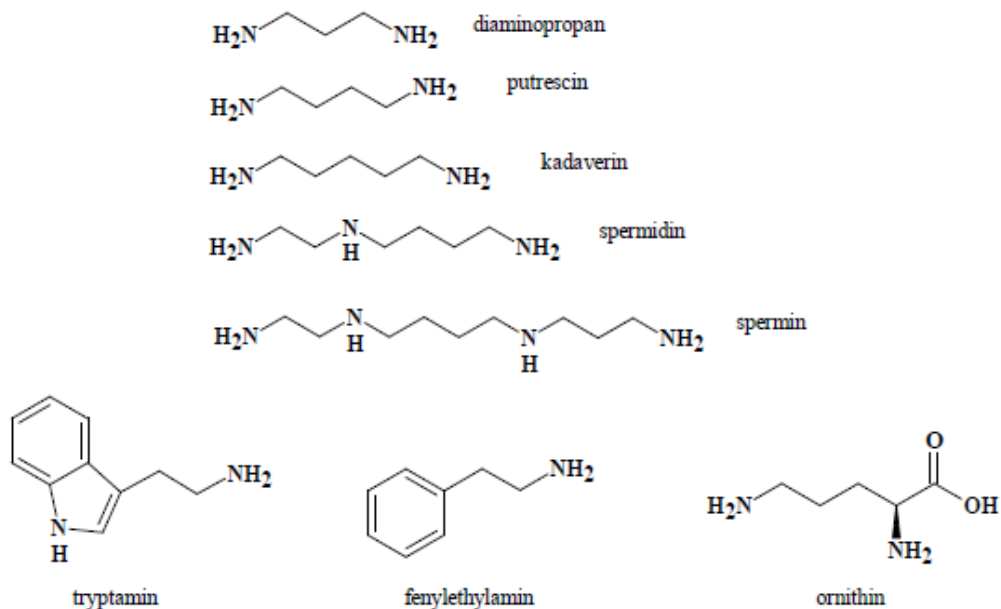
Bazické vlastnosti polyaminů umožňují vázat se na negativně nabitě makromolekuly, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny a podílet se na regulaci jejich funkce. Interakce polyaminů s fosfolipidy hraje také významnou roli při regulaci fyzikálních a chemických vlastností buněčných membrán (Adámková a Petřivalský, 2012).

Účastní se také řady fyziologických procesů odehrávajících se v rostlině, jako například buněčné dělení, růst, diferenciace, embryogeneze, vývoj orgánů, stárnutí listů, abiotické a biotické stresové reakce (Adámková a Petřivalský, 2012). Jejich další funkcí je modulace činnosti určitých skupin iontových kanálů. Vzhledem k těmto mnohostranným funkcím je homeostáza polyaminů zásadní a je zajištěna regulací biosyntézy, katabolismu a transportu. Také polyaminy a jejich metabolismus mají lékařský a farmakologický význam, neboť jsou přítomny v relativně vysokých koncentracích v mozku savců a jsou součástí patofyziologických procesů mozkové ischemie (Kusano *et al.*, 2008).

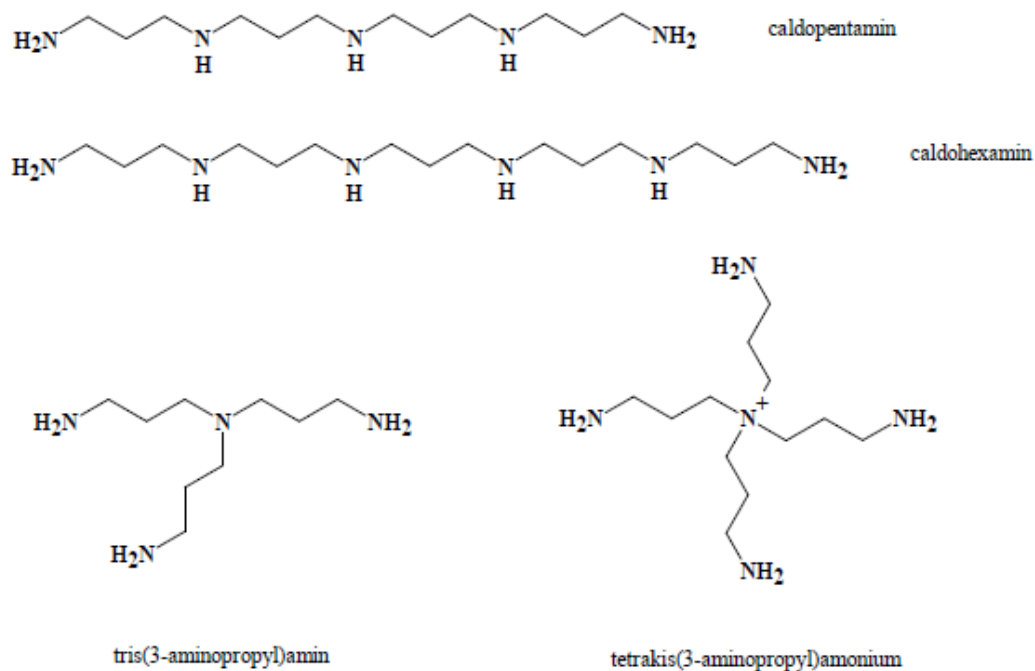
Kromě již zmíněných základních polyaminů vyskytujících se v rostlinách je také známo mnoho méně obvyklých polyaminů. Například termofilní bakterie *Thermus thermophilus* obsahují dvě kategorie polyaminů, do níž patří caldopentamin a caldohexamin, které se řadí mezi polyaminy s delším řetězcem, a tris(3-aminopropyl)amin společně s tetrakis(3-aminopropyl)amonium, které se řadí mezi rozvětvené polyaminy (Obr. 1) (Kusano *et al.*, 2008). Dlouhé či rozvětvené polyaminy byly také identifikovány v buňkách hypertermofilních bakterií *Thermotoga maritima*

a *Aquifex pyrophilum* nebo u hypertermofilních archea *Aeropyrum pernix* a *Methanococcus jannaschii* (Kneifel *et al.*, 1986; Hamana *et al.*, 1998, 1999; Oshima 2007).

A



B



Obr. 1 Strukturní vzorce vybraných základních polyaminů, biogenních aminů a aminokyseliny ornithin (A) a vybraných neobvyklých polyaminů (B) (Vytvořeno pomocí programu ChemSketch).

Za stresových podmínek jsou rostliny schopné kromě volných polyaminů vytvářet konjugáty polyaminů, jejichž velmi důležitou vlastností je jejich antioxidační aktivita projevující se schopností vazby na reaktivní formy kyslíku. Rostliny vystavené stresu jsou tudíž schopné produkovat konjugáty ke zlepšení antioxidativního obranného mechanismu a zmírnit tím poškození organismu. Syntéza těchto konjugátů je založena na posttranslačním navázání se na proteiny, které je katalyzováno specifickými enzymy transglutaminasami (EC 2.3.2.13). Tyto transglutaminasy se nacházejí uvnitř buněk či v mezibuněčném prostoru. Důležitými konjugáty jsou také konjugáty polyaminů s kyselinou hydroxyskořicovou, které mají významnou roli při kontrole vnitrobuněčné koncentrace polyaminů (Adámková a Petřivalský, 2012).

### 2.1.1 Biosyntéza

Biosyntéza polyaminů je lokalizována v cytoplazmě buněk (Vannier-Santos a Suarez-Fontes, 2017) a jejími prekurzory jsou aminokyseliny L-arginin a L-methionin (Adámková a Petřivalský, 2012). Biosyntéza putrescinu, spermidinu a sperminu je navozena v reakci na patogenní infekci rostlin (Lou *et al.*, 2016).

Putrescin vytvářející se z argininu slouží jako metabolický prekurzor dalších polyaminů, včetně spermidinu a sperminu (Obr. 2). Syntéza putrescinu probíhá dvěma cestami, při níž je meziproduktem buď ornithin nebo agmatin (Adámková a Petřivalský, 2012). V případě cesty přes ornithin nejprve arginasa (ARG, EC 3.5.3.1) hydrolyzuje guanidinovou skupinu za odštěpení močoviny a poté dojde k dekarboxylaci vzniklého ornithinu katalyzované ornithindekarboxylasou (ODC, EC 4.1.1.17) za vzniku putrescinu. Naproti tomu syntéza putrescinu z agmatinu je tvořena sledem tří reakcí. Jedná se o dekarboxylaci argininu katalyzovanou arginindekarboxylasou (ADC, EC 4.1.1.19) za vzniku agmatinu, jeho přeměnu agmatiniminohydrolasou (AIH, EC 3.5.3.12) na N-karbamoylputrescin a konečně odštěpení amoniaku a oxidu uhličitého N-karbamoylputrescinamidohydrolasou (CPA, EC 3.5.1.53) za vzniku putrescinu (Adámková a Petřivalský, 2012; Tiburcio *et al.*, 1997). Aminokyselina ornithin může být internalizována z extracelulárního prostoru povrchovými transportéry nebo může být získána z L-argininu působením ARG, přičemž tato aminokyselina může také sloužit jako substrát pro syntézu NO (Vannier-Santos a Suarez-Fontes, 2017). I když v genomu *Arabidopsis thaliana* jsou dva isoenzymy arginasy (ARGAH1 a ARGAH2) (Bronfield *et al.*, 2008), ODC chybí, což naznačuje, že na rozdíl od většiny jiných druhů rostlin ornithin

není v tomto případě přímým metabolickým prekurzorem pro syntézu putrescinu (Hanfrey *et al.*, 2001; Lou *et al.*, 2016).

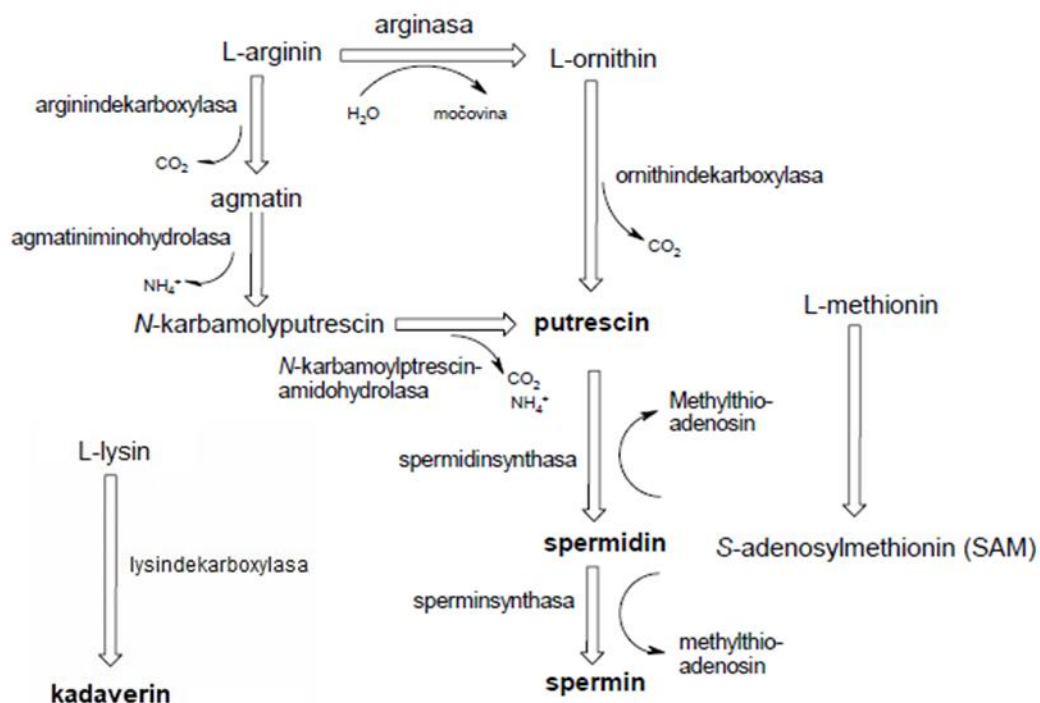
Spermidin vzniká přeměnou putrescinu za účasti enzymu spermidinsyntasy (SPDS, EC 2.5.1.16). Dekarboxylovaný S-adenosylmethionin, který je syntetizován z methioninu ve dvou následných reakcích katalyzovaných methioninadenosyltransferasou (EC 2.5.1.6) a S-adenosylmethionindekarboxylasou (SAMDC, EC 4.1.1.50), je donorem aminopropylové skupiny. Spermin je syntetizován ze spermidinu za účasti enzymu sperminsyntasy (SPMS, EC 2.5.1.22). Zatímco diamin kadaverin je syntetizován z L-lysinu za účasti enzymu lysindekarboxylasy (LDC, EC 4.1.1.18) (Adámková a Petřivalský, 2012).

U *A. thaliana* byly zjištěny dva ADC geny, a to gen At2G16500 pro ADC1 a gen At4G34710 pro ADC2, které kódují arginindekarboxylasovou aktivitu. I když tyto geny kódují proteiny s 80% identickou sekvencí aminokyselin, jejich exprese se liší v různých podmínkách prostředí. V závislosti na stresové reakce je exprese ADC1 vyvolaná chladem, kdežto exprese ADC2 je vyvolaná například suchem či salinitou. Tato studie ukazuje, že nemají při stresových reakcích identické, ale překrývající se funkce. Dále bylo prokázáno, že enzym ADC1 je lokalizován v endoplazmatickém retikulu, zatímco ADC2 v chloroplastech (Lou *et al.*, 2020).

Také biosyntéza polyaminů se u bakterií, hub i savců ve srovnání s rostlinami liší. U savců a hub je regulační kontrola biosyntézy prováděna primárně dvěma enzymy, a to ODC a SAMDC, přičemž v podstatě přenos aminopropylové skupiny je katalyzován samostatnými a odlišnými enzymy, SPDS a SPMS. U savců existují také další sledy reakcí přeměňující spermidin na spermin a naopak pomocí acetylace a oxidace, zatímco houby mají tuto acetylpolyaminovou dráhu téměř nedetekovatelnou. Ornithin u savců, který je dostupný pro biosyntézu polyaminů, pochází převážně ze stravy a může být tvořen pouze z argininu působením ARG. V houbách i když je potřebný ornithin pro biosyntézu syntetizován *de novo*, ARG umožňuje buňkám použít arginin jako jeho alternativní zdroj za podmínky zpětné vazby argininu inhibující biosyntézu ornithinu (Davis *et al.*, 1992; Tiburcio *et al.*, 1997).

Bakterie se v metabolismu polyaminů výrazně liší od hub a savců a zároveň se v některých ohledech podobají rostlinám. U bakterií může putrescin vznikat dvěma cestami, a to přeměnou ornithinu za katalýzy ODC nebo dekarboxylací argininu pomocí ADC, přičemž vzniklý agmatin je přeměněn přímo na putrescin agmatin ureohydrolasou (AUH, EC 3.5.3.11) se současnou eliminací močoviny. A přítomnost dráhy ADC je stejně

jako přítomnost ARG v houbách alternativní způsob syntézy putrescinu, pokud zpětná vazba argininu inhibuje biosyntézu *de novo* ornithinu (Davis *et al.*, 1992; Tiburcio *et al.*, 1997).



Obr. 2 Schéma biosyntézy polyaminů u rostlin (Převzato a upraveno dle Adámková a Petřivalský, 2012).

### 2.1.2 Katabolismus

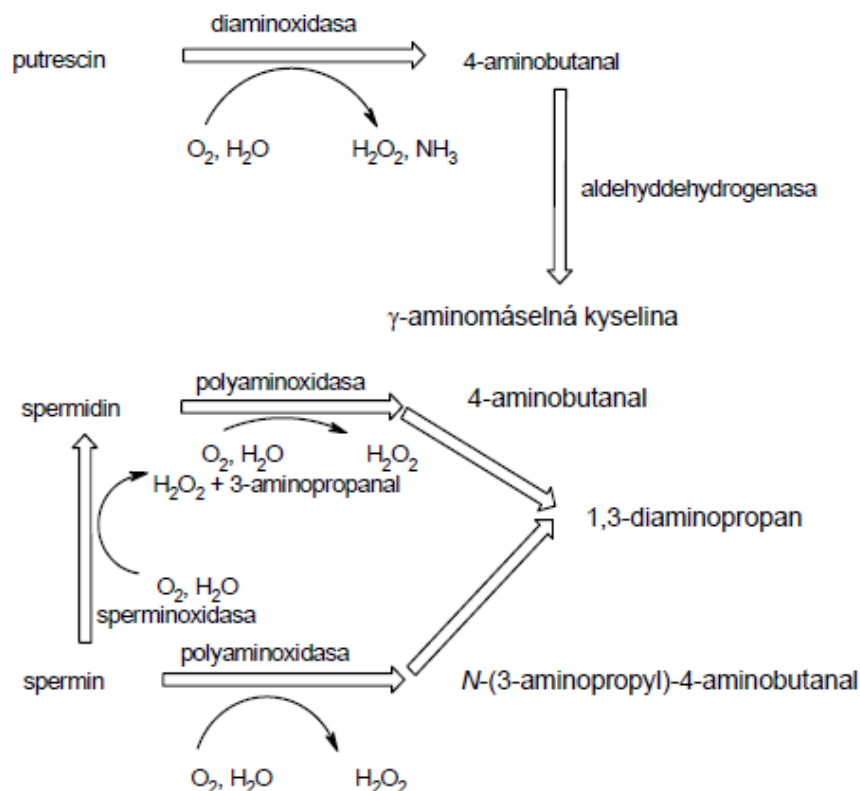
Na katabolismu polyaminů se podílí dvě skupiny enzymů, a to enzym polyaminoxidasa (PAO) obsahující flavinadenindinukleotid (FAD) jako kofaktor (Lou *et al.*, 2016) a dále druhý enzym diaminoxidasa (DAO, EC 1.4.3.22, původně EC 1.4.3.6) obsahující aktivní místo s TOPA-chinonovým kofaktorem a měďnatým iontem (Frébort a Adachi, 1995; Tylichová *et al.*, 2007).

Diaminoxidasa tvoří homodimery a katalyzuje oxidaci polyaminů na jejich primární aminoskupině. Katalyzuje oxidaci putrescinu za vzniku aldehydu 4-aminobutanal,  $\text{NH}_3$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Lou *et al.*, 2016). Přičemž peroxid vodíku jako jeden ze vzniklých produktů se podílí na lignifikaci buněčné stěny a jejím zpevněním po invazi patogenů. Analogicky DAO odbourává také kadaverin (Adámková a Petřivalský, 2012).

Živočišné PAO oxidují uhlík na vnější straně sekundární aminoskupiny polyaminů spermidinu nebo sperminu, zatímco u rostlin PAO oxidují uhlík na vnitřní straně  $\text{N}^4$ -dusíku u těchto již zmíněných polyaminů (Šebela *et al.*, 2001; Tylichová *et al.*, 2007). Obecně reakci katalyzovanou PAO lze rozdělit na dvě části, a to redukční část reakce, v níž je flavin redukován při oxidaci polyaminů a oxidační část reakce, v níž je redukován flavin reoxidován molekulárním kyslíkem za uvolnění peroxidu vodíku (Binda *et al.*, 1999).

Savčí PAO přeměňuje spermidin a spermin, kdy přeměnou spermidinu dochází ke tvorbě putrescinu a příslušného aldehydu 3-aminopropanal, zatímco přeměnou sperminu dochází ke tvorbě spermidinu a aldehydu 3-aminopropanal, kdy v obou případech vzniká  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Obr. 3). Rostlinné PAO, které jsou převážně lokalizovány v buněčné stěně (Šebela *et al.*, 2001), katalyzují společně s bakteriální PAO přeměnu spermidinu a sperminu na 4-aminobutanal a 1-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal, dále při této reakci vzniká propan-1,3-diamin a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Binda *et al.*, 1999). Tento rozdíl ve specifčnosti účinku vedl k nové klasifikaci PAO. Původní kategorie EC 1.5.3.11 byla zrušena a nahrazena pěti novými. Byly tak zavedeny  $\text{N}^1$ -acetylpolyaminoxidasa (EC 1.5.3.13), polyaminoxidasa tvořící diaminopropan (EC 1.3.5.14),  $\text{N}^8$ -acetylspermidinoxidasa tvořící diaminopropan (EC 1.5.3.15), sperminoxidasa (EC 1.5.3.16) a nespecifická polyaminoxidasa (EC 1.5.3.17). Rostlinné PAO nalezneme především pod označením EC 1.5.3.14 (BRENDA, 5. 5. 2021).





Obr. 3 Schéma katabolismu polyaminů u rostlin (Převzato z Adámková a Petřivalský, 2012).

Vzniklé aminoaldehydy dále podléhají spontánní cyklizaci na 1-piperidein, 1-pyrrolin a 1-(3-aminopropyl)pyrrolinium, přičemž se poslední sloučenina cyklizuje až na 1,5-diazobicyklo[4.3.0]nonan. Naproti tomu 3-aminopropanal z důvodu vysokého vazebného pnutí čtyřčetný cyklus nevytváří (Lichman, 2021; Šebela *et al.*, 2001; Tylichová *et al.*, 2007). Cyklické formy aminoaldehydů jsou základem rostlinných alkaloidů. Například z putrescinu odvozené alkaloidy se vyskytují v čeledi *Solanaceae* (lilkovitých), kam spadá *Nicotiana tabaccum* obsahující nikotin či *Atropa bella-donna* bohatá na tropanové alkaloidy (Lichman, 2021).

V rostlinách se mohou vzniklé  $\omega$ -aminoaldehydy dále oxidovat na odpovídající  $\omega$ -aminokyseliny za katalýzy NAD-dependentních aminoaldehyddehydrogenas (AMADHs, EC 1.2.1.19) (Tylichová *et al.*, 2010). Zatímco 3-aminopropanal je oxidován na  $\beta$ -alanin, který může být dále trimethylován za vzniku osmoprotektanu  $\beta$ -alanin betainu, 4-aminobutanal je oxidován na kyselinu  $\gamma$ -aminomásečnou (GABA) (Petřivalský *et al.*, 2007). Vzniklá GABA může být dále přeměněna na sukcinyl semialdehyd za účasti enzymu GABA transaminasy (EC 2.6.1.19) s následným krokem přeměny na sukcinát pomocí sukcinát-semialdehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.16 nebo EC 1.2.1.24) poskytující

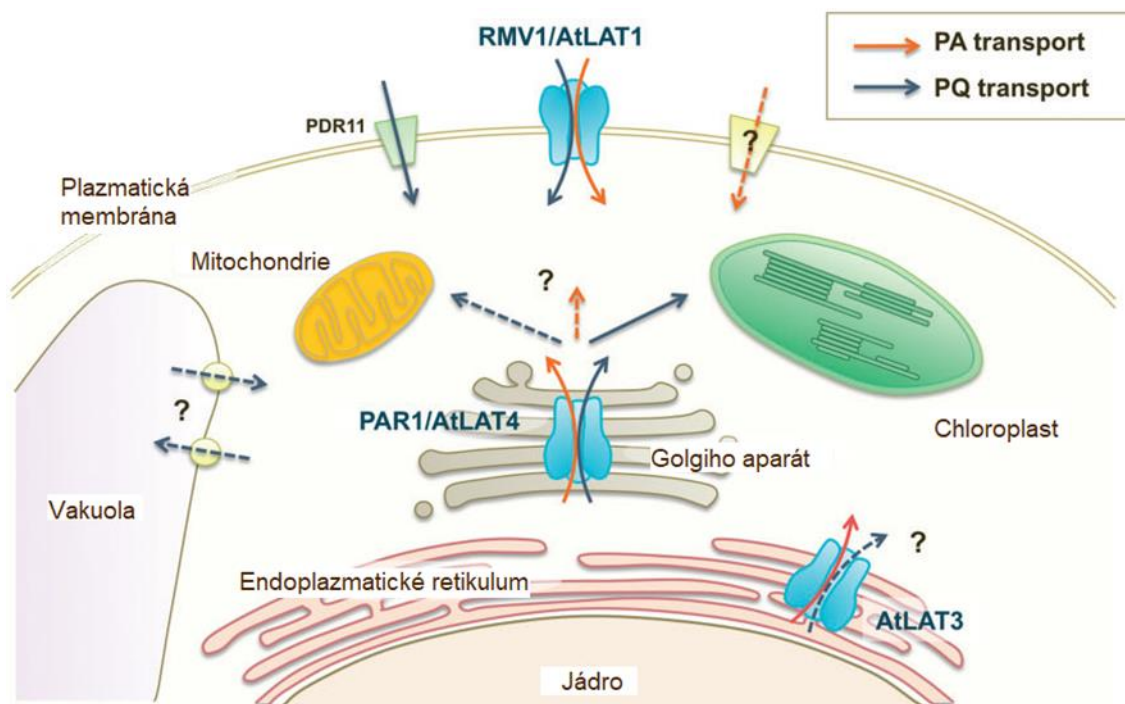
alternativní cestu pro vstup do Krebsova cyklu (Tylichová *et al.*, 2007). GABA hraje také důležitou roli při mnoha fyziologických procesech. Funguje jako neurotransmiter nejen u živočichů, ale také u rostlin či jako osmoregulátor. Dále také chrání rostlinu proti hmyzu, reguluje cytosolické pH, plní ochrannou funkci proti oxidačnímu stresu nebo se podílí na obecném metabolismu dusíku a jeho případném skladování či transportu (Bouché a Fromm, 2004).

### **2.1.3 Regulace hladiny polyaminů a jejich transport v rostlinách**

K regulaci hladiny polyaminů u rostlin přispívají aktivity PAO a DAO tím, že se podílejí na jejich degradaci oxidativní deaminací. Vyšší hladiny polyaminů jsou toxické a vedou k usmrcení buňky. Enzym S-adenosylmethionedekarboxylasa (SAMDC) je klíčový enzym, který se podílí na regulaci hladiny sperminu a spermidinu (Adámková a Petřivalský, 2012). S-adenosylmethionedekarboxylasa má jako kofaktor pyruvát a jeho aktivita je také regulována mnoha hormony a dalšími růstovými stimuly (Pegg a McCann, 1982), avšak na rozdíl od savčího či kvasinkového enzymu tento rostlinný enzym není stimulován putrescinem (Tiburcio *et al.*, 1997). U enzymu SAMDC jednou z možností regulace hladiny polyaminů je na úrovni transkripce a translace, kdy vyšší hladiny polyaminů blokují translaci a nízké naopak aktivují (Hanfrey *et al.*, 2005; Adámková a Petřivalský, 2012).

Za normálních okolností jsou buňky schopny syntetizovat jakékoliv množství polyaminů, jehož je potřeba. Proto jsou buňky vybaveny účinným transportním systémem pro příjem externích polyaminů (Tiburcio *et al.*, 1997). Energeticky závislé transportní systémy, které jsou zprostředkovány proteinem, slouží právě k absorpci polyaminů v rostlinných buňkách. Paraquat (PQ), který je jeden z nejrozšířenějších herbicidů, je přenášen jak u mnoha organismů, tak u rostlin transportním systémem polyaminů. Studie tuto transportní interakci polyaminy/PQ navrhla z důvodu společných specifických strukturních podobností. Také byl identifikován L-tyt aminokyselinových transportérů (LAT), které se řadí mezi transmembránové proteiny a patří mezi transportéry polyaminů a PQ. *Arabidopsis* LAT proteiny se tedy podílejí na intracelulárním přenosu polyaminů a jejich příjmu přes plazmatickou membránu (Obr. 4) (Fujita a Shinozaki, 2014).

U vyšších rostlin je příjem polyaminů na buněčné úrovni velmi rychlý, kdy přijaté polyaminy jsou skladovány ve vakuolách. Přičemž jde o aktivní příjem, který je stimulován působením auxinu (Tiburcio *et al.*, 1997).



Obr. 4 Schéma transportní cesty polyaminů (PA) a paraquatu (PQ) a znázornění substrátové preference PA/PQ transportérů u *Arabidopsis*. Genová rezistence na methyl viologen 1 (RMV1), jiný název pro PQ, a gen AtLAT1 společně lokalizovány v plazmatické membráně jsou primární cestou vstupu PQ do buněk. PDR11 – protein podílející se na transportu PQ přes plazmatickou membránu. PAR1, gen zodpovědný za paraquat rezistentních mutantů 1, a gen AtLAT4 se podílejí na akumulaci PQ v chloroplastu cestou zprostředkovanou Golgiho aparátem. Gen AtLAT3 je lokalizován v endoplazmatickém retikulu, avšak jeho funkce není známa (Převzato a upraveno dle Fujita a Shinozaki, 2014).

#### 2.1.4 Role polyaminů při abiotickém stresu u *Arabidopsis thaliana*

Při mnoha druzích abiotického stresu dochází k akumulaci tří hlavních polyaminů, a to putrescinu, spermidinu a sperminu. Obecně u rostlin osmotický stres, salinita, ozon či UV záření, které se řadí mezi abiotický stres, vyvolávají vyšší aktivitu ADC než ODC. A tedy vyšší hladina putrescinu je přisuzována zvýšené aktivitě ADC. Salinita je spojena s akumulací iontů, které jsou pro rostlinu toxické při vysokých koncentracích solí a ta narušuje integritu buněčné membrány, aktivitu různých iontů a funkci fotosyntetického aparátu (Groppa a Benavides, 2008).

Polyaminy zvyšují odolnost rostlin vůči abiotickému stresu jako je například sucho, salinita, teplo či chlad. Avšak může také docházet ke stresové toleranci pomocí zvýšení exprese genů souvisejících s tvorbou polyaminů u geneticky upravených rostlin (Adámková a Petřivalský, 2012; Kasukabe *et al.*, 2004).

Byl proveden experiment, v němž byla do *A. thaliana* naklonovaná cDNA spermidinsyntasy. Ve srovnání s planě rostoucími rostlinami vykazovala tato transgenní

rostlina zvýšenou aktivitu spermidinsyntasy společně s vyšším obsahem spermidinu v listech. Vykazovala také zvýšenou toleranci vůči stresu včetně chladu, sucha, salinitě a hyperosmózy. Tyto výsledky ukazují důležitou roli spermidinu jako signálního regulátoru v signální dráze stresu (Kasukabe *et al.*, 2004).

### 2.1.5 Acetylace polyaminů

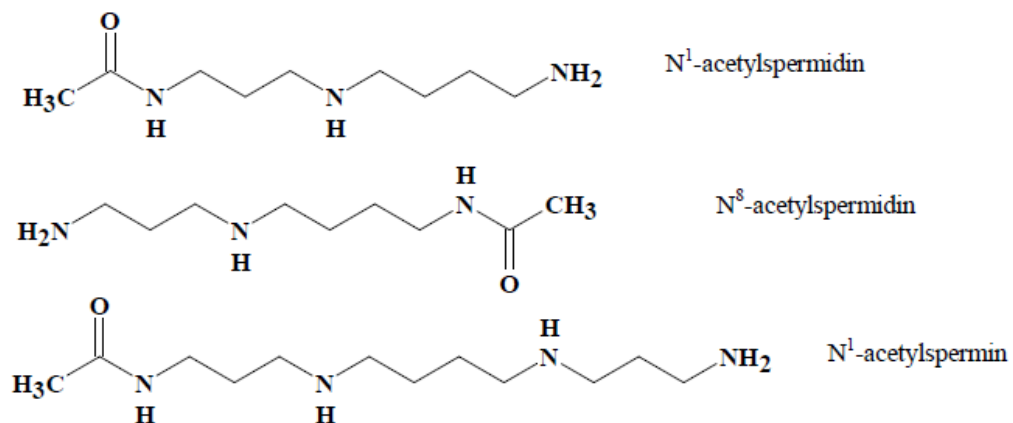
Acetylace polyaminů, která má důležitou regulační funkci, byla pozorována v savcích buňkách a později také u několika rostlinných druhů (Lou *et al.*, 2016). Vnitrobuněčná koncentrace polyaminů je kontrolována kombinací regulovaných enzymatických kroků, a to včetně biosyntetických enzymů, jako jsou ODC a SAMDC, a katabolických enzymů, jako jsou PAO, DAO a spermin/spermidin N<sup>1</sup>-acetyltransferasa (SSAT, EC 2.3.1.57) (Zhu *et al.*, 2006).

Savčí SSAT katalyzuje celou řadu polyaminových acetylačních reakcí, v nichž dochází k přenosu acetylové skupiny z acetyl-CoA na N<sup>1</sup> pozici spermidinu či sperminu. U živočichů se vyskytuje N<sup>1</sup>-acetylspermidin nebo N<sup>1</sup>-acetylspermin, což jsou hlavní polyaminy exportované přes membránu a vyskytují se ve vysokých hladinách v nádorových buňkách. To úzce souvisí se změnami v metabolismu polyaminů a karcinogenezi (Tavladoraki *et al.*, 2012).

Lidský SSAT1 je tedy enzym, jehož životnost je velmi krátká a jeho aktivita je velmi nízká v buněčných bazálních podmínkách. Aktivita SSAT1 může být zvýšena řadou fyziologických nebo farmakologických podnětů. Polyaminové analogy, jako jsou například BE-3-4-3 [N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(ethyl)spermin] a BE-3-3-3 [N<sup>1</sup>,N<sup>11</sup>-bis(ethyl)norspermin] (Casero *et al.*, 2001; Wolff *et al.*, 2003), jsou klinicky hodnoceny jako protinádorové látky a zároveň jsou silnými induktory buněčné SSAT1 aktivity. Zatímco pro SSAT1 jsou polyaminy dobrým substrátem, v případě SSAT2 tomu tak není. Pro SSAT2 je pravděpodobným fyziologickým substrátem thialysin [S-(2-aminoethyl)-L-cystein], který je účinně acetylován na ε-aminoskupině za vzniku S-(2-acetylaminooethyl)-L-cysteinu. SSAT2 tak poskytuje strukturní srovnání s SSAT1, jelikož nereaguje na polyaminové analogy a slabě váže polyaminové substráty (Coleman *et al.*, 2004).

Acetylované polyaminy byly také pozorovány v rostlinách, a to zejména N<sup>1</sup>-acetylspermin, N<sup>1</sup>-acetylspermidin a N<sup>8</sup>-acetylspermidin (Obr. 5). V *A. thaliana* bylo

prokázáno, že N<sup>1</sup>-acetylspermidin se vyskytuje v kořenové i nadzemní části ve stejné míře jako spermidin (Kadama-Nobusada *et al.*, 2008; Lou *et al.*, 2016).



Obr. 5 Strukturní vzorce vybraných acetylovaných polyaminů (Vytvořeno pomocí programu ChemSketch).

## 2.2 N-acetyltransferasa

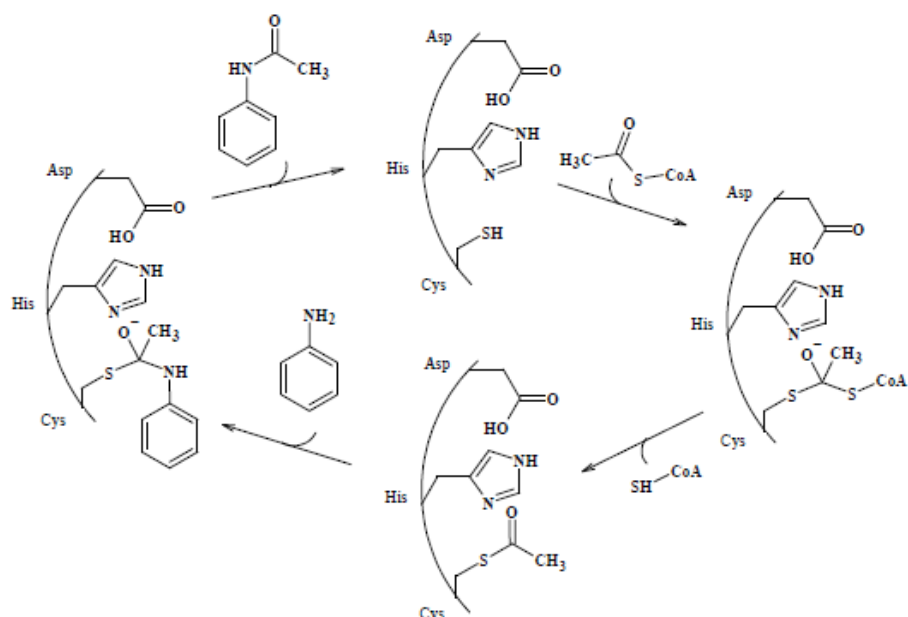
Acetylace je jednou z hlavních posttranslačních modifikací proteinů v buňce, která má rozmanité účinky nejen na jejich hladiny, ale také na hladiny metabolomů (Drazic *et al.*, 2016). N-acetyltransferasy obecně katalyzují přenos acetylové skupiny z acetyl-CoA na primární aminoskupinu malé molekuly nebo na N-konec peptidu či proteinu (Parks a Escalante-Semerena, 2020) a jsou hojně zastoupeny v široké škále organismů od *A. thaliana* až po lidský organismus (Drazic *et al.*, 2016).

### 2.2.1 Lidská amin N-acetyltransferasa

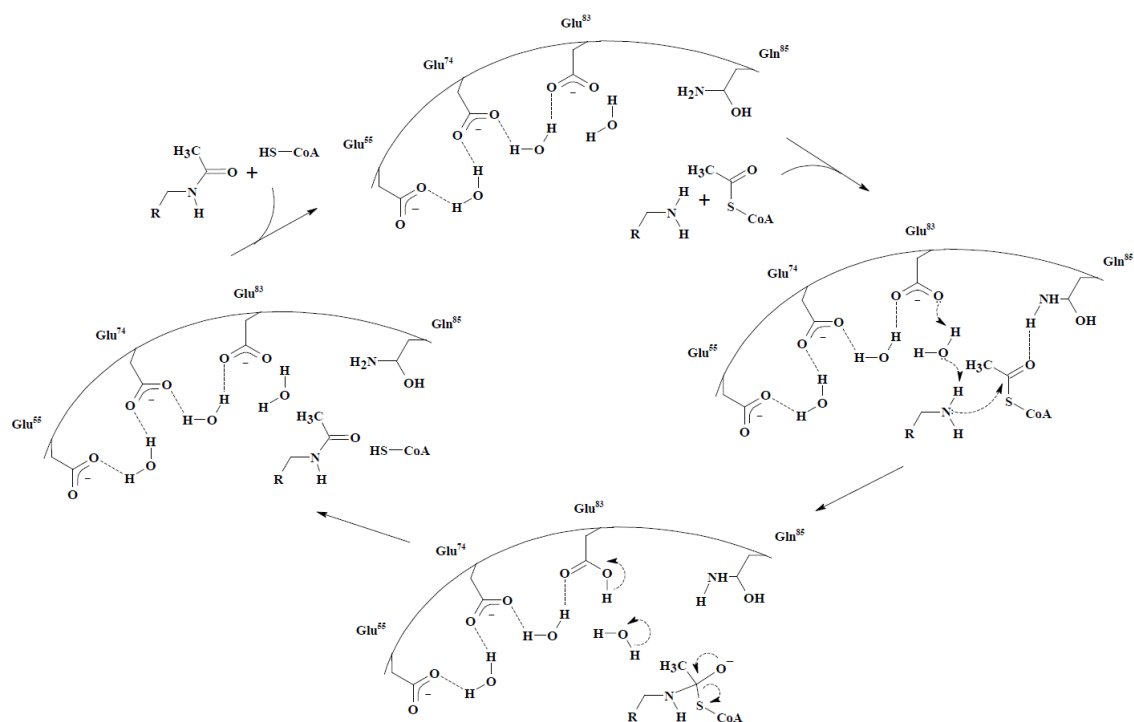
V živočišných buňkách bylo popsáno více N-acetyltransferas mezi ně náleží mimo jiné již zmíněná SSAT a také arylamin N-acetyltransferasy (NAT, EC 2.3.1.5), které hrají důležitou roli jak při detoxikaci arylaminových či hydrazinových léčiv, tak při aktivaci arylaminových karcinogenů (Zhou *et al.*, 2009).

NAT se tedy podílí na biotransformaci přenosem acetylové skupiny z acetyl-CoA na volnou aminoskupinu mateřské sloučeniny (Jancova *et al.*, 2010). Tato acetylační reakce probíhá ping pong bi-bi mechanismem (Obr. 6) (Andres *et al.*, 1983; 1988; Sinclair a Sim, 1997). Zatímco Zhou *et al.* (2013) popisují neuspořádaný sekvenční mechanismus u reakce katalyzované NAT, při níž je v prvním kroku acetylová skupina přesunuta z acetyl-CoA za tvorby enzymového intermediátu a v druhém kroku dochází k acetylaci substrátu a následné tvorbě příslušného produktu, u reakce katalyzované SSAT popisují Bewley *et al.* (2006), Hedge *et al.* (2007) a Filippova *et al.* (2019) uspořádaný sekvenční mechanismus, kdy dochází nejprve ke spojení aminu a acetyl-CoA za vzniku oxyaniontového tetrahedrálního meziproductu, který je posléze rozštěpen za vzniku N-acetylaminu a koenzymu A (Obr. 7) (Sugiyama *et al.*, 2016). Sugiyama *et al.* (2016) rovněž uvádějí přítomnost katalytických reziduí, a to Glu<sup>55</sup>, Glu<sup>74</sup>, Glu<sup>83</sup>, Gln<sup>85</sup>. Tento uspořádaný sekvenční mechanismus je také popsán ve studii Dempsey *et al.* (2014, 2015, 2017) u reakcí katalyzovaných arylalkylamin N-acetyltransferasou (AANAT, EC 2.3.1.87).

Strukturní analýza, při níž byla zjištěna u lidské NAT významná strukturní odchylka v uspořádání reziduí C-konce ve srovnání s prokaryotickou NAT, ukazuje, že přenos acetylu v NAT je usnadněn katalytickou triádou Cys-His-Asp (Cys<sup>68</sup>-His<sup>107</sup>-Asp<sup>122</sup> v lidské NAT) striktně zachovanou ve stejných pozicích ve všech strukturách NAT (Sinclair *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2013).



Obr. 6 Schéma mechanismu reakce katalyzované NAT se znázorněním katalytické triády. V prvním kroku reakce dochází k přenosu acetylové skupiny z acetyl-CoA na cysteinylový zbytek enzymu za tvorby enzymového intermediátu. Ve druhém kroku k uvolnění koenzymu A. Ve třetím kroku dochází k navázání aminu a posléze k tvorbě příslušného produktu (Převzato a upraveno dle Zhou *et al.*, 2013).



Obr. 7 Schéma uspořádaného sekvenčního mechanismu reakce katalyzované SSAT. V prvním kroku dochází k navázání příslušného aminu a acetyl-CoA za následného vzniku oxyaniontového tetrahedrálního meziproduktu. Ve třetím kroku je meziprodukt rozštěpen na N-acetylamin a koenzym A (Převzato a upraveno dle Sugiyama *et al.*, 2016).

NAT jsou cytosolické enzymy, které se nacházejí v mnoha různých tkáních. U lidí se vyskytují ve dvou isoformách, N-acetyltransferasa 1 (NAT1) s takřka všudypřítomnou tkáňovou distribucí a N-acetyltransferasa 2 (NAT2) detekovaná především v játrech, tlustém střevě a střevním epitelu. Oba funkční lidské genové lokusy byly lokalizovány na krátkém raménku chromozomu 8. Nukleotidové sekvence těchto genů jsou z 85 % identické a kódují dva enzymy s rozdílnou substrátovou specifičností. Typickými specifickými substráty lidské NAT1 jsou například kyselina p-aminobenzoová (PABA), p-aminosalicylová kyselina (PAS) a p-aminobenzylglutamát (Kawamura *et al.*, 2005; Jancova *et al.*, 2010) a pro lidský NAT2 je typickým substrátem sulfamethazin (Grant *et al.*, 1991). Lidský NAT2 slouží jako hlavní cesta pro detoxikaci léků: isoniazid (antituberkulotikum), hydralazin (antihypertenzivum), sulfonamidy (antibakteriální léky) (Kawamura *et al.*, 2005; Jancova *et al.*, 2010).

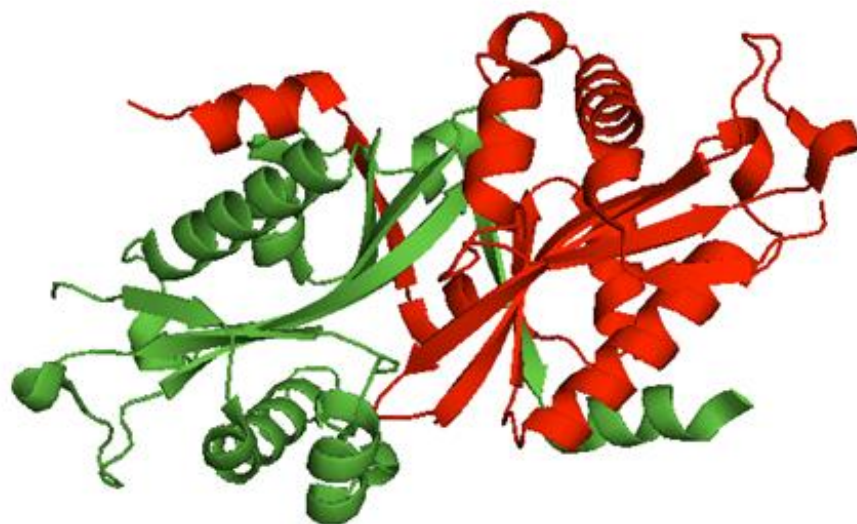
Lidská SSAT je klíčovým enzymem při kontrole hladin polyaminů v buňkách, jelikož acetylace sperminu a spermidinu spouští jejich export nebo naopak degradaci. Právě zvýšené hladiny intracelulárních polyaminů doprovázejí několik typů rakoviny i dalších lidských onemocnění (Bewley *et al.*, 2006).

Lidská, krysí i myší SSAT jsou lokalizovány převážně v cytosolu (Ragione a Pegg, 1982; Pegg 2008; Uimari *et al.*, 2009). Nicméně u lidských nádorových buněk L56Br-C1 spojených s rakovinou prsu uvádí Holst *et al.* (2008) přítomnost SSAT nejen v cytosolu, ale i v mitochondriích. U myších fetálních fibroblastů pak byla SSAT detekována i v buněčném jádru (Uimari *et al.*, 2009). Tkáňová distribuce všech tří zmíněných živočišných SSAT je rovněž velmi široká. Seiler a Al-Therib (1974) uvádí přítomnost krysí SSAT v mozku, játrech, ledvinách a střevech, přičemž nejvyšší aktivitu pozorovali v mozku. Myší SSAT se stejně jako krysí vyskytuje v játrech, ledvinách a dále také v plicích a tukové tkáni (Hyvönen *et al.*, 2012). V mozku a ledvinách byla také pozorována přítomnost lidské SSAT (Klempner *et al.*, 2009; Zahedi *et al.*, 2007), ta je však ve větší míře u nádorových buněk prsu, prostaty, plic (Maksymiuk *et al.*, 2018) či jater a tlustého střeva (Wang *et al.*, 2017).

SSAT je dimer (Obr. 8), jehož oba monomery jsou shodné v aminokyselinové sekvenci, ale nemají identickou strukturu. Nejvýraznější rozdíl mezi strukturami obou monomerů je v C-koncových ramenech. U tohoto dimeru byly pozorovány dvě konformace, a to symetrická forma se dvěma otevřenými povrchovými kanály schopnými vázat substrát nebo kofaktor a asymetrická forma, ve které je pouze jeden z povrchových kanálů schopen vázat a acetylovat polyaminy. SSAT je také schopen sám acetylovat



lysine-26 v přítomnosti acetyl-CoA a nepřítomnosti substrátu. Tyto dvě konformace dimeru a také sebeacetylační reakce mohou mít roli při regulaci aktivity a stability SSAT jako prvek v polyaminové homeostáze (Bewley *et al.*, 2006).

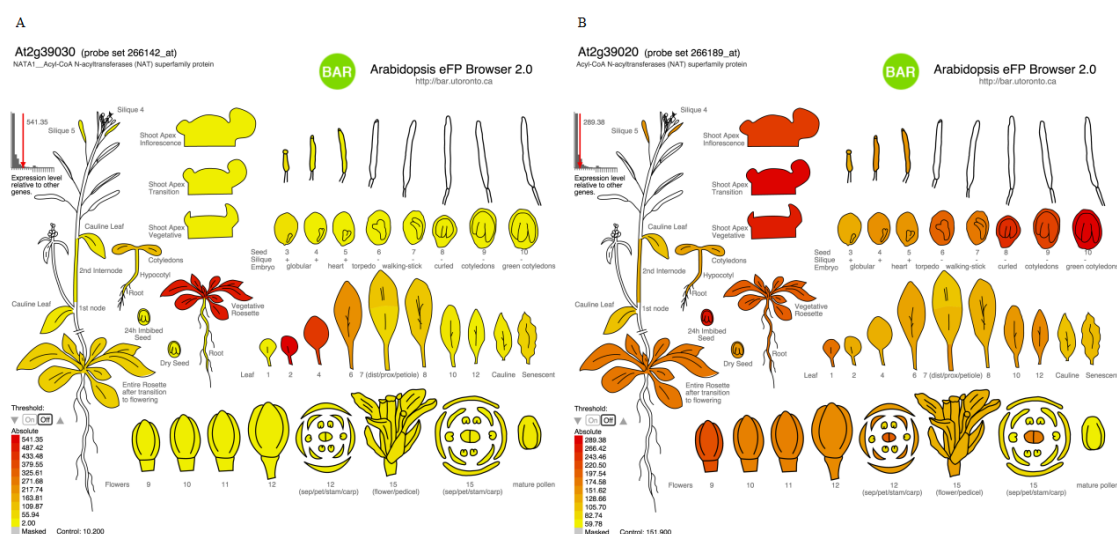


Obr. 8 Struktura dimerního enzymu lidské SSAT (PDB 2B4D) (Vytvořeno pomocí programu PyMOL).

## 2.2.2 N-acetyltransferasová aktivita 1 a 2 (EC 2.3.1.57)

*Arabidopsis* geny N-acetyltransferasové aktivity 1 a 2 (NATA1, NATA2) jsou nejbližšími homology polyaminoacetyltransferasy u savců. NATA1 u *A. thaliana* katalyzuje acetylaci putrescinu na N-acetylputrescin a tím konkuruje spermidinsyntase jako běžnému substrátu. Dále NATA1 produkuje N<sup>δ</sup>-acetylornithin z ornithinu. Tato studie také ukazuje možnou přeměnu N<sup>δ</sup>-acetylornithinu na N-acetylputrescin pomocí ADC1 (Lou *et al.*, 2020). Exprese genu *Arabidopsis* NATA1 (At2g39030) je vyvolaná signální molekulou obrany rostlin kyselinou jasmonovou a koronatinem, který je produkován kmenem bakterie *Pseudomonas syringae* DC3000. Během infekce *P. syringae* a jinými patogeny rostlin se používají polyaminoxidasy sperminu a spermidinu jako substráty pro produkci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lou *et al.*, 2016).

Gen NATA2 (At2g39020) je přímo sousedící s NATA1 v genomu *A. thaliana*, avšak jeho exprese není indukována kyselinou jasmonovou či koronatinem (Obr. 9) (Adio *et al.*, 2011; Lou *et al.*, 2016).



Obr. 9 Prostorová a časová exprese genu NATA1 (A) a NATA2 (B) u *A. thaliana* (Převzato z Lou *et al.*, 2016).

### 2.2.2.1 Funkce N-acetyltransferasové aktivity 1 jako putrescinacetyltransferasa

Enzym NATA1 acetyluje 1,3-diaminopropan na N-acetyl-1,3-diaminopropan, který je antagonistou při zavírání průduchů rostlin vyvolané kyselinou abscisovou (ABA) (Jammes *et al.*, 2014). Kromě použití ornithinu a diaminopropanu jako substrátů NATA1 má funkci jako putrescinacetyltransferasa, kdy zvýšená regulace exprese NATA1 pomocí *P. syringae* DC3000 způsobuje vyšší produkci N-acetylputrescinu a nižší produkci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> polyaminoxidasou. Zatímco vyšší tvorba H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u NATA1 mutantních rostlin *A. thaliana* má za následek vyšší expresi genů, snížení růstu bakterií a také snížení akumulace N-acetylputrescinu. To ukazuje důležitou roli NATA1 jako putrescinacetyltransferasy u potlačování antimikrobiální obrany (Lou *et al.*, 2016).

Aby byla prokázána katalytická aktivita NATA1 a dále byla zjištěna preference substrátu, byly provedeny testy *in vitro* s *Arabidopsis* NATA1, který byl pro tyto účely purifikován po expresi v *Escherichia coli*. Jako substráty acetyltransferasy byl použit ornithin, putrescin a 1,3-diaminopropan. Spermidin a spermin nemohly sloužit jako substráty acetyltransferasy z důvodu nepřítomnosti či akumulace pod hranicí detekce. Po provedení experimentu byla zjištěna u NATA1 největší preference ornithinu, poté putrescinu a v poslední řadě 1,3-diaminopropanu jako substrátu, u katalytické aktivity enzymu bylo pořadí opačné (Lou *et al.*, 2016).

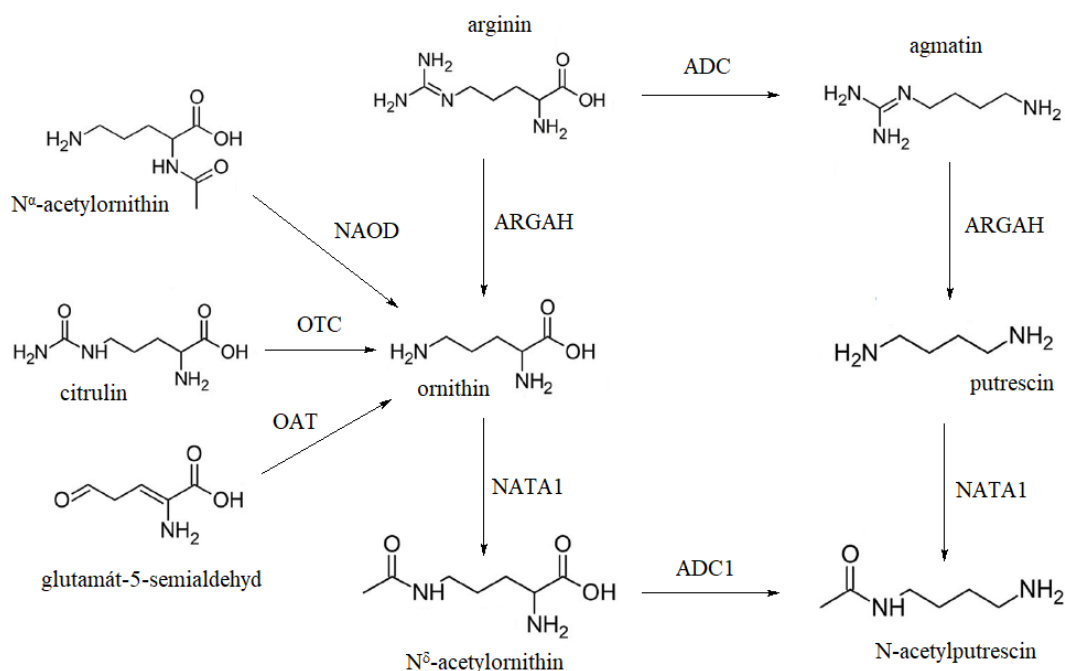
### 2.2.2.2 Přeměna N<sup>δ</sup>-acetylornithinu na N-acetylputrescin

Ve většině rostlin je putrescin tvořen z L-argininu, přičemž vznikají jako meziprodukty agmatin nebo ornithin. Biosyntéza ornithinu může být umožněna pomocí několika rostlinných metabolitů, které slouží jako její přímé prekurzory. Ornithin tedy vzniká několika cestami, a to přeměnou argininu za účasti enzymu ARGAH, N<sup>δ</sup>-acetylornithinu za účasti enzymu N-acetylornithindeacetylasy (NAOD, EC 3.5.1.16), dále přeměnou citrulinu pomocí ornithintranskarbamylasy (OTC, EC 2.1.3.3) či glutamát-5-semialdehydu za účasti enzymu ornithinacetyltransferasou (OAT, EC 2.6.1.13) (Lou *et al.*, 2020).

U *A. thaliana* ADC1 katalyzuje syntézu agmatinu z L-argininu, ale také N-acetylputrescinu z N<sup>δ</sup>-acetylornithinu za pomoci NATA1 (Obr. 10). Rychleji však vzniká N-acetylputrescin z putrescinu aktivitou NATA1 v reakci na léčbu methyl jasmonátem (MeJA) (Lou *et al.*, 2016), než dekarboxylací N<sup>δ</sup>-acetylornithin (Lou *et al.*, 2020). N<sup>δ</sup>-

acetylornithin, který patří mezi méně časté neproteinové aminokyseliny, byl objeven při cíleném hledání metabolitů silně indukovaných fytohormonem MeJA (Adio *et al.*, 2011).

Duplikace a neofunkcionalizace enzymů ADC1 a NATA1 syntetizujících N<sup>δ</sup>-acetylornithin v *A. thaliana* se také vyskytují u příbuzných druhů v čeledi *Brassicaceae* (brukvovité). Nejenže duplikace ADC1-ADC2 a NATA1-NATA2 mohou pravděpodobně kompenzovat ztrátu ODC, ale zároveň poskytuje cestu pro biosyntézu N-acetylputrescinu (Lou *et al.*, 2020).

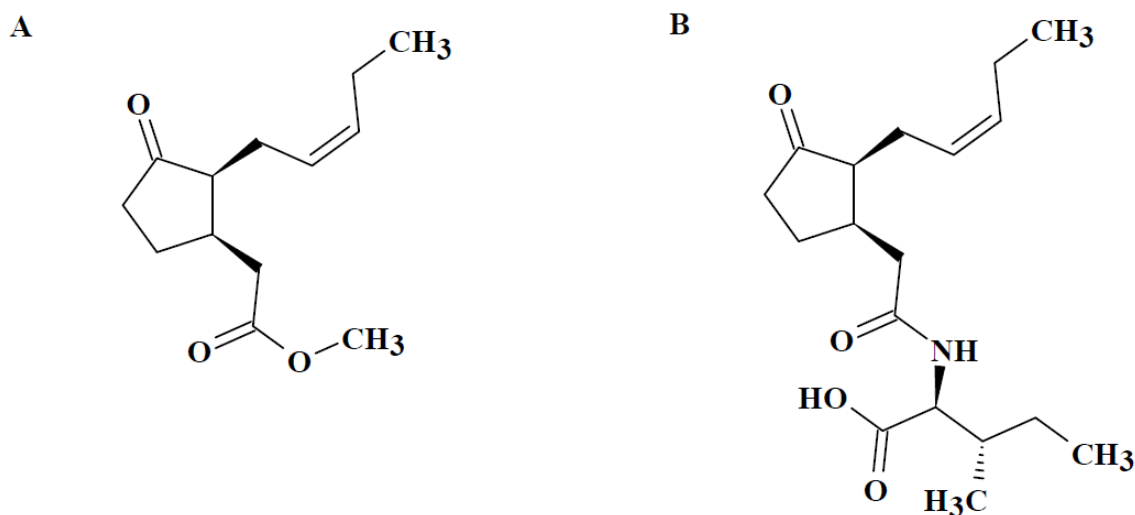


Obr. 10 Schéma biosyntézy ornithinu, putrescinu a následná přeměna N<sup>δ</sup>-acetylornithinu na N-acetylputrescin u *A. thaliana*. ADC a ADC1 – arginindekarboxylasa, ARG – arginasa, NAOD – N-acetylornithindeacetylase, OTC – ornithintranskarnamylasa, OAT – ornithinacetyltransferasa, NATA1 – N-acetyltransferasová aktivita 1 (Převzato a upraveno dle Lou *et al.*, 2020).

### 2.2.2.3 Methyl jasmonát a jeho vliv v rostlinách

Methyl jasmonát, který je vyobrazen na obr. 11, patří společně s jasmonoyl izoleucinem (JA-Ile) mezi konjugáty kyseliny jasmonové (JA), souhrnně označované jako jasmonáty, jejichž syntéza probíhá v cytoplasmě, chloroplastech a peroxizomech. MeJA je tvořen z kyseliny jasmonové, jejíž prekurzorem pro syntézu je kyselina linolenová. Jasmonáty jsou důležité molekuly pro regulaci mnoha fyziologických procesů, a to zejména v růstu rostlin a zprostředkování reakcí rostlin na biotické a abiotické stresy. Signalizační dráhy zprostředkované jasmonáty souvisejí s rezistencí rostlin, což vede k reakcím rostlin na vnější mechanické poškození, poškození hmyzem a býložravci nebo patogenní infekci, tím dochází k expresi genů rezistence (Ruan *et al.*, 2019).

MeJA zprostředkovává indukci volných nebo konjugovaných polyaminů u mnoha rostlin. U *A. thaliana* je ornithin přeměněn na N<sup>δ</sup>-acetylornithin za účasti enzymu NATA1. Byl proveden experiment, kdy po léčbě MeJA byl zjištěn N<sup>δ</sup>-acetylornithin v listech, stoncích, květech a kořenech. V rozetových listech akumulace vyvrcholila po 4 dnech a do 10. dne se vrátila do nedetekovatelné hladiny. To naznačuje existenci katabolické cesty N<sup>δ</sup>-acetylornithinu v *A. thaliana* (Adio *et al.*, 2011).



Obr. 11 Strukturní vzorce methyl jasmonátu (A) a jasmonoyl izoleucinu (B) (Vytvořeno pomocí programu ChemSketch).

Ke zvýšené expresi NATA1 a akumulaci N<sup>δ</sup>-acetylornithinu může docházet pomocí poškozením rostliny hmyzem jako například *Myzus persicae* (mšice broskvoňová) či infekcí *P. syringae*. N<sup>δ</sup>-acetylornithin má vliv na produkci mšice broskvoňové, kdy po přidání do umělé stravy mšic listy *A. thaliana* naznačovaly přímý toxický účinek. Docházelo tedy k snížení reprodukce mšice broskvoňové. NATA1 také zvyšuje rezistenci vůči tomuto hmyzu přeměnou aminokyselin ve floému na formu, kterou hmyz nemůže využít. Z těchto výsledků vyplývá, že signalizační dráha JA přispívá k obraně proti mšicím (Adio *et al.*, 2011).

Koronatin je toxin produkovaný některými *P. syringae*, který je molekulární napodobeninou konjugátu (JA-Ile). Váže se na COI1 receptor, což je receptor signální dráhy kyseliny jasmonové, a aktivuje obranné reakce, které jsou specifické pro jasmonáty. Jestliže se bakterie vyskytují na povrchu listu, může koronatin zabránit uzavírání průduchu a tím umožnit průnik bakterií do listů. Koronatin také vyvolává akumulaci N<sup>δ</sup>-acetylornithinu v závislosti na koncentraci (Adio *et al.*, 2011).

Byla také provedena studie, v níž byl zkoumán vliv nejen JA, ale i kyseliny salicylové (SA) na rezistenci vůči *Plasmodiophora brassicae* (nádorovka kapustová) u *A. thaliana*, která je zodpovědná za kořenové onemocnění clubroot vyskytující se u čeledi brukvovitých. Životní cyklus tohoto patogena zahrnuje primární fázi omezenou na kořenové chloupky a sekundární fázi v kortikálních a stelových buňkách, která trvá několik týdnů. Po sledování exprese genů reagujících na JA a SA v infikovaných kořenech *A. thaliana*, exogenní aplikaci těchto fytohormonů a analýze mutantů s nedostatkem hormonů bylo prokázáno, že JA a SA přispívají k rezistenci vůči patogenu nádorovce kapustové. I když tyto signální reakce nemusí být indukovány společně a vyvolat rovnocenný účinek rezistence. Také bylo potvrzeno, že JA zprostředkovaná indukce NATA1 způsobila akumulaci N<sup>δ</sup>-acetylornithinu (Lemarié *et al.*, 2015).

#### **2.2.2.4 Funkce N-acetyltransferasové aktivity 2 jako sperminacetyltransferasa**

Vzhledem k tomu, že spolu geny NATA1 a NATA2 přímo sousedí v genomu *A. thaliana* a jsou nejbližšími homology polyaminoacetyltransferasy u savců (Lou *et al.*, 2016), byla vyslovena hypotéza o funkci NATA2 jako polyaminoacetyltransferasa. Po provedení *in vitro* testů s purifikovaným enzymem *Arabidopsis* NATA2 po přechodné genové expresi v *Nicotiana benthamiana*, kdy při podávání ornithinu a sperminu jako substrátu

pro NATA2 došlo k výrazné akumulaci CoA. Tato volná akumulace CoA signalizovala přenos acetylové skupiny z acetyl-CoA a také tvorbu N<sup>δ</sup>-acetylornithinu a N-acetylsperminu. Menší množství CoA bylo zjištěno také při podání 1,3-diaminopropanu a N-acetylputrescinu jako substrátů (Lou, 2017).

Jak již bylo dříve zmíněno, exprese genu NATA1 je indukována kyselinou jasmonovou nebo koronatinem (Lou *et al.*, 2016), zatímco exprese genu NATA2 je indukovaná primárně tepelným stresem (Schmid *et al.*, 2005). Byl však proveden experiment s *A. thaliana*, kdy byl exogenně aplikován spermin, který měl schopnost chránit rostlinu před poškozením způsobeným tepelným stresem. Tento výsledek poukázal na toleranci rostlin vůči tepelnému stresu a také na důležitost sperminu, který ji při vyšších hladinách zvyšuje (Sagor *et al.*, 2013).

### **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1 Materiál a přístroje**

##### **3.1.1 Chemikálie**

- Acetyl-koenzym A (AppliChem, Německo)
- Akrylamid (SERVA, Německo)
- Ampicilin (Carl Roth, Německo)
- Butan-1-ol (Lach-Ner, Česká republika)
- Coomassie Brilliant blue R 250 (CBB R-250; VWR international, Belgie)
- Denarasa (c-LEcta, Německo)
- Diaminopropan (Acros Organics, Belgie)
- Dodecylsulfát sodný (SDS; VWR international, Belgie)
- Fenylethylamin (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)
- Glycin (AppliChem, Německo)
- Hovězí sérový albumin (BSA; Thermo scientific, USA)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid hořečnatý (VWR international, Belgie)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid vápenatý (VWR international, Belgie)
- Imidazol (Alfa Aesar, Německo)
- Inhibitor proteas (Roche diagnostic, Německo)
- Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG; VWR international, Belgie)
- Kadaverin (Sigma-Aldrich, USA)
- Kit na měření koncentrace proteinů (Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit; Thermo scientific, USA)
- Koenzym A (Cayman Chemical, USA)
- Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová (Acros Organics, Belgie)
- Kyselina ethylendiaminotetraoctová (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina 2-morfolinoethansulfonová (MES; Fluka, USA)
- Kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)



- Kyselina trihydrogenboritá (AMRESCO, USA)
- Kyselina trihydrogenfosforečná (Lach-Ner, Česká republika)
- Laemmliho vzorkovací pufr (Bio-Rad, USA)
- LB médium (Carl Roth, Německo)
- $\beta$ -merkapt ethanol (Fluka, USA)
- Methanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Močovina (Lach-Ner, Česká republika)
- Náplň separačních kolon (His Pur<sup>TM</sup> cobalt superflow agarose; Thermo scientific, USA)
- N,N'-methylenbisakrylamid (SERVA, Německo)
- N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin (GE Healthcare, PlusOne, USA)
- Ornithin (Sigma-Aldrich, USA)
- Persíran amonný (Bio-Rad, USA)
- Putrescin (Sigma-Aldrich, USA)
- Spermidin (Sigma-Aldrich, USA)
- Spermin (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, USA)
- Tryptamin (Sigma-Aldrich, USA)

### 3.1.2 Roztoky

- Barvicí roztok pro SDS PAGE: 0,1% (w/v) CBB R-250, 15% (v/v) kyselina octová, 45% (v/v) methanol
- Britton-Robinsonův pufr I. pro stanovení pH optima (pH 4,0-11,0): 40 mmol·l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mmol·l<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COOH, 40 mmol·l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>
- Čisticí roztok pro purifikaci proteinů: 6 mol·l<sup>-1</sup> guanidin hydrochlorid, 1% Triton X-100
- Ekvilibrační pufr pro purifikaci proteinů (pH 8,0): 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 10 mmol·l<sup>-1</sup> imidazol, 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl, 5% (v/v) glycerol
- Elektrodový roztok pro SDS PAGE (pH 8,3): 25 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycin, 0,1% (w/v) SDS
- Eluční pufr pro purifikaci proteinů (pH 8,0): 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 250 mmol·l<sup>-1</sup> imidazol, 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl, 5% (v/v) glycerol

- Laemmliho vzorkovací pufr pro SDS PAGE: 950  $\mu$ l Laemmliho pufru, 50  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanolu
- Odbarvovací roztok pro SDS PAGE: 7% (v/v) kyselina octová, 5% (v/v) methanol
- Promývací pufr pro purifikaci proteinů (pH 8,0): 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 5% (v/v) glycerol
- Regenerační pufr pro purifikaci proteinů (pH 5,0): 100 mmol·l<sup>-1</sup> MES, 500 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl

### 3.1.3 Přístroje a vybavení

- Analytické váhy sartorius (Biotech, Česká republika)
- Centrifuga centrifuge 5430R (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga HERAUS multifuge X3R centrifuge (Thermo scientific, USA)
- Desintegrátor OS (Constant systems, Anglie)
- Gel Doc<sup>TM</sup> EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- Inkubátor Sanyo incubator (Schoeller, Česká republika)
- Laminární box (MERCI, Česká republika)
- Míchačka Basic C (IKA<sup>®</sup>, Německo)
- Parní sterilizátor 3870 ELVC (Tuttnauer, Holansko)
- pH metr pHenomenal pH 1000 L (VWR international, Belgie)
- Rotační třepačka Loopster digital (IKA<sup>®</sup>, Německo)
- Sada automatických pipet (Eppendorf, Německo)
- Separační kolonky His Pur<sup>TM</sup> cobalt spin columns (Thermo scientific, USA)
- Spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, Anglie)
- Spektrofotometr UV-VIS 8453 (Agilent, USA)
- Termoblock Accublock Digital Dry baths (Labnet international, USA)
- Třepačka MaxQ 4000 (Thermo scientific, USA)
- Ultrafiltrační filtry Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 Centrifugal filter units (Sigma-Aldrich, USA)
- Vortex MS3 basic (IKA<sup>®</sup>, Německo)
- Zdroj napětí pro elektroforézu PowerPac<sup>TM</sup> Basic (Bio-Rad, USA)

### 3.1.4 Biologický materiál

- Bakteriální kultura *Escherichia coli*, která obsahuje plasmid pGEX, do kterého byl vložen otevřený čtecí rámec pro příslušný protein AtNATA1 a AtNATA2 (poskytnuto Dr. Valérií Gaudin, Institut Jean-Piere Bourgin, Versailles, Francie)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Produkce bakterií a indukce exprese

Pro zmnožení bakterií bylo připraveno LB médium o koncentraci  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , které bylo rozděleno do zásobních lahví a autoklávováno při  $121^\circ \text{C}$ . Z připraveného LB média bylo odebráno 10 ml do čtyř Erlenmeyerových baněk pro NATA1 a NATA2, do nichž bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  antibiotika ampicilinu o koncentraci  $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (výsledná koncentrace  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), dále také 1,2  $\mu\text{l}$  bakteriální kultury *E. coli* nesoucí gen pro produkci rekombinantního proteinu NATA1 a NATA2. Takto připravená prekultura byla inkubována přes noc při  $37^\circ \text{C}$  za stálého třepání.

Po inkubaci byly prekultury centrifugovány 5 min při  $5000 g$  a  $10^\circ \text{C}$ , přičemž následně byl supernatant odlit. Z Erlenmeyerových baňek pro NATA1 a NATA2 obsahujících 400 ml LB média a ampicilinu o výsledné koncentraci  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  bylo odebráno po 10 ml. Tento objem byl přidán do každé zkumavky obsahující precipitát. Po resuspendaci precipitátu zvortexováním byl obsah jednotlivých zkumavek přelit zpět do označených Erlenmeyerových baněk pro NATA1 a NATA2. Ty byly ponechány na třepačce po dobu 3 hodin, dokud optická hustota kultury při 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) nebyla vyšší než 0,7. Kontrolně se tedy měřila absorbance pomocí spektrofotometru při  $\lambda = 600 \text{ nm}$ , kdy hodnota absorbance vzorku NATA1 činila 0,871 a vzorku NATA2 0,872. Z jednotlivých kultur byl odebrán vzorek (1 ml) pro SDS-PAGE, který byl označen „kultura“ a uchován při teplotě  $-20^\circ \text{C}$ .

Poté bylo do každé Erlenmeyerovy baňky přidáno 80  $\mu\text{l}$   $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  IPTG (výsledná koncentrace  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) za účelem indukce exprese. Kultura byla inkubována přes noc při  $20^\circ \text{C}$  na třepačce.

Následně bylo provedeno další spektrofotometrické měření, při němž bylo do kyvety napipetováno 200  $\mu\text{l}$  kultury z Erlenmeyerovy baňky pro NATA1 a 800  $\mu\text{l}$  destilované vody, přičemž hodnota absorbance vzorku NATA1 činila 0,871. Pro měření absorbance vzorku NATA2 bylo do kyvety napipetováno 200  $\mu\text{l}$  kultury z příslušné Erlenmeyerovy baňky a 1,8 ml destilované vody, kdy naměřená hodnota absorbance činila 0,750. Na

základě zmíněného spektrofotometrického měření byl odebrán druhý vzorek (200  $\mu$ l NATA1, resp. 120  $\mu$ l NATA2) pro SDS-PAGE, který byl označen „exprese“ a uchován při teplotě -20 °C.

Všechny roztoky v Erlenmeyerových baňkách byly přelity do centrifugačních kyvet, které byly centrifugovány 30 min při 4000  $g$  a 10 °C. Po centrifugaci byl supernatant odlit a do každé kyvety bylo přidáno 35 ml 9  $g \cdot l^{-1}$  NaCl. Ty byly zvortexovány a suspenze byla přelita do 50ml plastových zkumavek, které byly centrifugovány 5 min při 5000  $g$  a 10 °C. Supernatant byl odlit a zkumavky se sedimentem bakterií byly uloženy při teplotě -20 °C.

### **3.2.2 Rozbití bakterií a purifikace enzymu**

Purifikace enzymu probíhala pomocí extrakce na základě chelatační chromatografie za použití separačních kolonek naplněných His Pur<sup>TM</sup> cobalt superflow agarosou (Thermo scientific, USA). Před nanesením vzorku byly kolonky nejprve centrifugovány 30 s při 30  $g$  a 10 °C, aby došlo k odstranění ethanolu, ve kterém byly uchovávány. Kolonky byly třikrát promyty 5 ml destilované vody, voda byla mezi jednotlivými promytími odstraněna centrifugací (30  $g$  po dobu 30 s). Posléze byl přidán čistící roztok a po inkubaci po dobu 15 minut na rotátoru (40 rpm) byla provedena opět centrifugace za stejných podmínek. Kolonky opět také třikrát promyty 5 ml destilované vody a opět centrifugovány jako v předchozím kroku. Dále byly kolonky promyty regeneračním pufrem, kdy při použití tohoto pufru byla nutná inkubace po dobu 15 minut a po centrifugaci (30  $g$  po dobu 30 s) opět třikrát destilovanou vodou a vždy zcentrifugovány (30  $g$  po dobu 30 s).

Po posledním promytí kolonek destilovanou vodou byla provedena ekvilibrace kolonek, kolonky byly inkubovány s 5 ml ekvilibračního pufru na rotátoru po dobu 30 min při 5 °C a 40 rpm a zcentrifugovány (30  $g$  po dobu 30 s). Inkubace kolonek s ekvilibračním pufrem proběhla třikrát. Po každé provedené centrifugaci byl obsah protečený kolonkou vylit. Takto připravené kolonky byly použity na purifikaci enzymu.

K rozbití bakteriálních buněk bylo do zkumavek obsahujících rozmražený sediment bakterií s exprimovanými geny NATA1 a NATA2 napipetováno 5,26 ml destilované vody, 750  $\mu$ l 400  $mol \cdot l^{-1}$  Tris-HCl pH = 8,0 a 50  $\mu$ l inhibitoru proteas. Obsah zkumavek byl resuspendován pomocí zvortexování a napipetován do desintegrátoru, který byl předem nastaven na 20 000 psi (138 MPa), komora dezintegrátoru byla uzavřena

a dezintegrátor byl spuštěn. Po rozbití bakterií byl obsah převeden do nových zkumavek. Tento postup byl proveden pro každý vzorek zvlášť.

K jednotlivým lyzátům byl poté přidán 1  $\mu$ l denarasy. Obsah byl lehce promíchán pětinasobným převrácením zkumavky a inkubován po dobu 30 minut při 37 °C. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 750  $\mu$ l 50% (v/v) glycerolu a 750  $\mu$ l NaCl o koncentraci 1 mol·l<sup>-1</sup> a zkumavky byly centrifugovány 30 min při 12000 g a 10 °C. Po centrifugaci bylo ze supernatantu odebráno 100  $\mu$ l vzorku, který byl označen „extrakce“ a uchován při -20 °C.

Zbýlý supernatant přelit do předem připravených separačních kolonek. Tyto kolonky, s nimiž bylo následně pracováno v chladu při 5 °C, byly ponechány na rotátoru po dobu 60 minut při 40 rpm. Po uplynutí 60 minut byla mobilní fáze z kolonek odstraněna centrifugací při 30 g po dobu 30 s za teploty 10 °C. Z protečeného obsahu bylo odebráno 100  $\mu$ l vzorku, který byl označen „flow-through“ a uchován při -20 °C. Kolonky s navázaným enzymem byly následně inkubovány s 5 ml ekvilibračního pufru po dobu 2 minut na rotátoru při 40 rpm a 5 °C a poté byla mobilní fáze odstraněna centrifugací (30 s, 30 g, 10 °C). Tato inkubace byla opakována třikrát.

Poté byly na kolonky nanесeny 4 ml elučního pufru a následovala inkubace na rotátoru při 5 °C a 40 rpm po dobu 30 min. Poté byla mobilní fáze z kolonek odstraněna centrifugací (30 s, 30 g, 10 °C) a přenesena do nových zkumavek. Eluce proběhla ve dvou opakováních. Z eluátu bylo odebráno 100  $\mu$ l vzorku, který byl po označení „eluce“ uchován při -20 °C.

V dalším kroku byl eluát částečně přepipetován do ultrafiltračních zkumavek o kapacitě 4 ml s hraniční molekulovou hmotností 10 kDa, které byly následně centrifugovány po dobu 10 min při 5000 g a 10 °C. Po centrifugaci byl vždy přidán další díl eluátu a centrifugace se opakovala, dokud nebyl takto zakoncentrován veškerý eluát. Na závěr byly přidány 3 ml promývacího pufru, s nímž proběhla centrifugace za stejných podmínek jako v předešlém kroku. Tento odsolovací krok byl opakován třikrát. Výsledný purifikovaný enzym byl umístěn do mikrozkušavek a uchován při -20 °C pro následující měření.

### **3.2.3 Kontrola purifikace enzymu pomocí SDS-PAGE**

Pro SDS-PAGE elektroforézu na polyakrylamidovém gelu byl připraven 12% dělicí gel a 4% zaostřovací gel (Tab. 1). Po přípravě směsi pro dělicí gel byla zahájena polymerace

přidáním persíranu amonného a směs byla nalita mezi předem připravená skla, převrstvena butan-1-olem a ponechána ke ztuhnutí. Po ztuhnutí gelu byl butan-1-ol odlit a gel byl propláchnut destilovanou vodou.

Následně byla připravena směs pro zaostřovací gel, jejíž polymerace byla opět zahájena přidavkem persíranu amonného. Po zahájení polymerace byla směs nalita mezi skla na dělicí gel s hladinou cca 3 mm pod okraj skel. Do směsi byl vsunut hřebínek a daný gel byl ponechán k tuhnutí po dobu 15 až 20 minut.

Tab. 1 Přehled jednotlivých složek pro přípravu 12% dělicího gelu a 4% zaostřovacího gelu.

| Jednotlivé složky                                          | Dělicí gel | Zaostřovací gel |
|------------------------------------------------------------|------------|-----------------|
|                                                            | Objem (ml) |                 |
| Směs akrylamidu (30%) a bisakrylamidu (1%)                 | 4,0        | 0,65            |
| Tris-HCl ( $1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 8,8) | 2,5        | -               |
| Tris-HCl ( $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 6,8) | -          | 1,25            |
| Destilovaná voda                                           | 3,2        | 2,95            |
| Dodecylsulfát sodný (SDS, 10%)                             | 0,100      | 0,100           |
| N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin                         | 0,015      | 0,015           |
| Persíran amonný (SDS, 10%)                                 | 0,050      | 0,060           |

Mezitím byly připraveny bakteriální vzorky, a to kultura před indukcí exprese a po expresi, které byly rozmrazeny a centrifugovány po dobu 5 min při 5000 g a 10 °C. Supernatant byl odlit a k peletu bylo následně přidáno 20 µl močoviny o koncentraci 8 mol·l<sup>-1</sup>. Mikrozkušavky se vzorky byly zvortexovány a dále bylo napipetováno 20 µl Laemmliho vzorkovacího pufru. Opět byl obsah mikrozkušavek zvortexován a poté byl povařen na termobloku po dobu 5 min při 100 °C a stočen. K 50 µl vzorku z extrakce z bakteriálního sedimentu, „flow-through“ vzorku a vzorku z eluce byl přidán stejný objem (50 µl) vzorkovacího pufru. Obsah všech jednotlivých vzorků byl zvortexován, povařen na termobloku po dobu 5 min při 100 °C a stočen.

Gely po ztuhnutí byly umístěny do elektroforetické komůrky, kdy do obou elektrodových prostorů byl nalit elektrodový roztok. Následně byl z gelu vytažen hřebínek a byly naneseny vzorky společně s markerem Novex<sup>®</sup> Sharp Pre-Stained Protein Standard od firmy Invitrogen. Nanesený objem vzorků činil 10 µl, zatímco markeru byly naneseny 4 µl. Po uzavření elektroforetické komůrky bylo nastaveno napětí na 120 V a byla spuštěna elektroforéza. Po dosažení dělicího gelu bylo zvýšeno napětí na 180 V. Elektroforéza byla ukončena po dosažení konce gelu.

Gel byl přesunut do Petriho misky a ponořen do barvicího roztoku a ponechán na třepačce přes noc. Poté byl odlit barvicí roztok a přidán odbarvovací roztok. Odbarvovací roztok byl vyměňován po hodině až do odbarvení gelu. Po úplném odbarvení byl gel vyfocen pomocí přístroje Gel Doc<sup>TM</sup> EZ Imager ovládán pomocí softwaru Image Lab 6.0.1 a vyhodnocen.

### 3.2.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Koncentrace proteinů byla měřena spektrofotometricky za použití kyseliny bicinchoninové (BCA), která je schopna tvořit s Cu<sup>+</sup> ionty v alkalickém prostředí modrofialový komplex, který je produkován při reakci proteinu s Cu<sup>2+</sup> ionty a je detekován při  $\lambda = 562$  nm (Smith *et al.*, 1985).

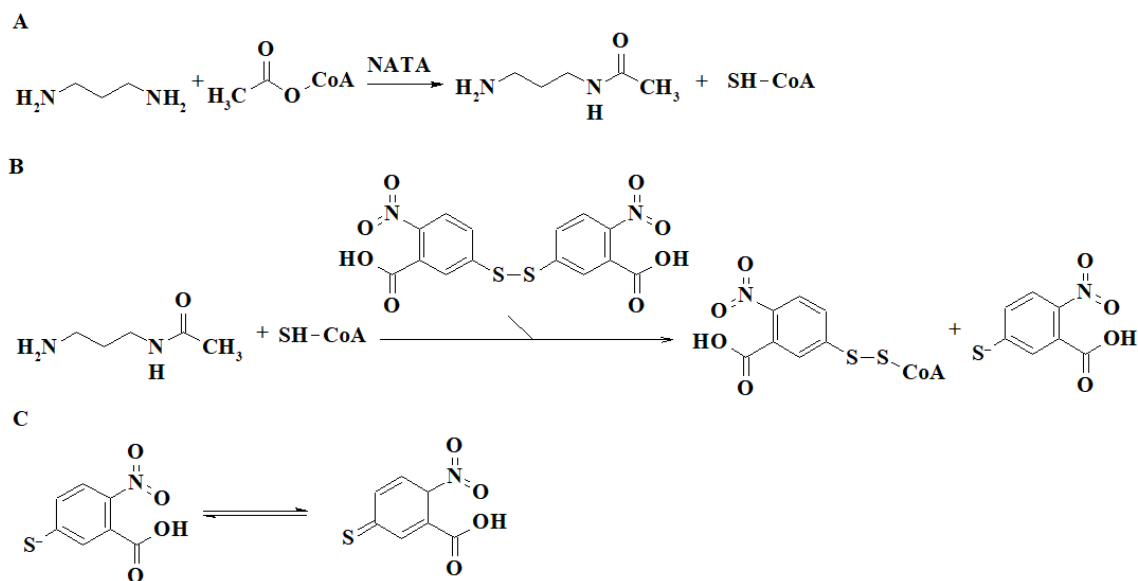
Pro stanovení kalibrační řady byly nejprve připraveny dva roztoky BSA o koncentraci 10 mg·ml<sup>-1</sup> a 0,5 mg·ml<sup>-1</sup>. Z takto připravených roztoků byl do jednotlivých mikrozkušavek napipetován roztok obsahující 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 a 50 µg BSA pro vytvoření kalibrační řady. Poté byly do dalších tří mikrozkušavek napipetovány 4 µl roztoku NATA1 a do dalších tří mikrozkušavek stejný objem NATA2. Těsně před měřením byl připraven reakční roztok smísením 20 ml činidla A (26 mmol·l<sup>-1</sup>

bicinchoninan sodný,  $160 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ ,  $700 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  vinan sodný,  $110 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ ,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$  a  $600 \text{ } \mu\text{l}$  činidla B ( $16 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ ).

Ke všem vzorkům přičemž  $1 \text{ ml}$  byl napipetován reakčního roztoku, jako blank byl využit  $1 \text{ ml}$  reakčního roztoku. Všechny mikrozkušavky byly zvortexovány a inkubovány po dobu 30 minut při  $37^\circ\text{C}$ . Nejprve byla měřena absorbance kalibrační řady a poté zbylé roztoky s NATA1 a NATA2 při  $\lambda = 562 \text{ nm}$ . Ze závislosti absorbance na koncentraci BSA byla odvozena rovnice přímky, z které se pomocí naměřených absorbancí vzorků spočetla jejich koncentrace.

### 3.2.5 Stanovení substrátové specifčnosti enzymu

Aktivita studovaného enzymu byla měřena spektrofotometricky za použití Ellmanovy spektroskopické metody, jejíž podstatou je interakce thiolové skupiny koenzymu A s kyselinou 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou za souběžného uvolnění 5-merkapto-2-nitrobenzoového aniontu, který je detekován při  $\lambda = 412 \text{ nm}$  (Obr. 12) (Ellman *et al.*, 1961).



Obr. 12 Princip detekce aktivity NATA s využitím Ellmanovy metody: (A) Acetylace aminu katalyzovaná NAT, (B) Štěpení DTNB a vznik chromoforu, (C) Přechod chromoforu na detekovanou formu (Vytvořeno pomocí programu ChemSketch).



Nejprve byla připravena reakční směs, která obsahovala DTNB o koncentraci  $625 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Tris-HCl o koncentraci  $125 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $\text{pH} = 7,5$ , 12,5% (v/v) glycerol, EDTA o koncentraci  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $\text{pH} = 7,5$ . Také byly připraveny roztoky aminů L-ornithinu, diaminopropanu, putrescinu, kadaverinu, spermidinu, sperminu, tryptaminu a fenylethylaminu o koncentraci  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Přičemž diaminopropan byl pro dosažení neutrálního pH rozpuštěn v kyselině chlorovodíkové o koncentraci  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , zatímco zbylé aminy pořízené jako hydrochloridy byly rozpuštěny v destilované vodě. Následně byl připraven roztok acetyl-CoA o koncentraci  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Poté bylo provedeno spektrofotometrické měření bez enzymu sloužící k odečtení případného samovolného vzniku zbarvení, s enzymem NATA1 a poté s NATA2, kdy do kyvet byly napipetovány jednotlivé látky v příslušném pořadí (Tab. 2), kyvety byly promíchány a byla měřena absorbance při  $\lambda = 412 \text{ nm}$  po dobu 15-30 minut s intervalem měření 16 s, přičemž kyvetový prostor byl vyhříván na  $30^\circ\text{C}$ . Jako blank byla použita směs v kyvetě po promísení, těsně před přidávkem příslušného aminu. Měření bez enzymu bylo provedeno dvakrát, zatímco měření s jednotlivými enzymy proběhlo třikrát.

Tab. 2 Přehled napipetovaných látek a jejich objemy u jednotlivých měření pro stanovení substrátové specifčnosti enzymu.

| Látky            | Měření bez enzymu<br>(blank) | Měření s enzymem<br>NATA1 | Měření s enzymem<br>NATA2 |
|------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                  | Objem ( $\mu\text{l}$ )      |                           |                           |
| Reakční směs     | 800                          | 800                       | 800                       |
| Destilovaná voda | 80                           | 78                        | 86                        |
| Enzym            | -                            | 2                         | 4                         |
| Acetyl-CoA       | 20                           | 20                        | 10                        |
| Příslušný amin   |                              | 100                       |                           |

Pro vlastní kalibraci metody byla nejprve připravena stejná reakční směs jako v předešlém měření. Do mikrozkušavky byl připraven roztok koenzymu A o koncentraci  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Následně byla vytvořena koncentrační řada roztoků (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 125, 150, 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Do kyvety byla napipetována reakční směs, destilovanou vodu a koenzym A o celkovém objemu 1 ml. Poté byla měřena absorbance při  $\lambda = 412 \text{ nm}$ , kdy jako blank bylo použito 800  $\mu\text{l}$  reakční směsi a 200  $\mu\text{l}$  destilované vody. Naměřené hodnoty byly dále použity pro výpočet molárního absorpčního koeficientu pomocí vzorce Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kdy  $A$  představuje absorbanci,  $\varepsilon$  [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ] vyjadřuje molární absorpční koeficient,  $c$  [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ] je koncentrace roztoku a  $l$  [ $\text{cm}$ ] udává délku kyvety.

### 3.2.6 Měření vlivu solí na aktivitu enzymu

Pro měření vlivu solí na aktivitu enzymu byl nejprve připravena reakční směs, která obsahovala DTNB o koncentraci  $1,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , Tris-HCl o koncentraci  $250 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $\text{pH} = 7,5$ , EDTA o koncentraci  $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $\text{pH} = 7,5$ . Následně byl připraven roztok diaminopropanu o koncentraci  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  v kyselině chlorovodíkové o koncentraci  $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , roztok acetyl-CoA o koncentraci  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a také roztoky solí NaCl, KCl,  $\text{MgCl}_2$  a  $\text{CaCl}_2$ , jejichž koncentrace činila  $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Bylo připraveno 8 kyvet, do nichž bylo v určitém pořadí (Tab. 3) napipetováno 400  $\mu\text{l}$  reakční směsi, 200  $\mu\text{l}$  50% (v/v) glycerolu, 200  $\mu\text{l}$  roztoku dané soli, enzym s rozdílným objemem pro NATA1 (2  $\mu\text{l}$ ) a pro NATA2 (4  $\mu\text{l}$ ) a destilovaná voda. Obsah kyvet byl protřepán a inkubován po dobu 5 min při pokojové teplotě. Poté bylo do kyvet dopipetováno 10  $\mu\text{l}$  acetyl-CoA, přístroj byl vyblankován, bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  diaminopropanu a byla měřena absorbance při  $\lambda = 412 \text{ nm}$ . Výsledný objemem v kyvetě činil 1 ml. Obsah kyvet 1 a 2 byl použit k detekci případného samovolného zbarvení směsi.

Tab. 3 Přehled napipetovaných látek v jednotlivých kyvetách pro měření vlivu solí na aktivitu enzymu.

| Látky            | Kyveta |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|
|                  | č. 1   | č. 2 | č. 3 | č. 4 | č. 5 | č. 6 | č. 7 | č. 8 |
| Reakční směs     | ano    | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  |
| Glycerol         | -      | ano  | -    | ano  | -    | ano  | -    | ano  |
| Sůl              | ano    | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  |
| Enzym            | -      | -    | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  |
| Destilovaná voda | ano    | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  |
| Acetyl-CoA       | ano    | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  |
| Diaminopropan    | ano    | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  | ano  |

### 3.2.7 Plánované experimenty

Vzhledem k epidemické situaci v ČR v souvislosti s pandemií onemocnění COVID-19 způsobenou koronavirem SARS-CoV-2 a vládními opatřeními v boji proti tomuto onemocnění včetně zákazu osobní přítomnosti studentů ve školách byla provedena jen malá část původně plánovaných experimentů. V první fázi se jednalo zejména o stanovení pH optima a základních kinetických parametrů reakce.

#### 3.2.7.1 Stanovení pH optima

Pro stanovení pH optima by byla nejprve připravena reakční směs o složení  $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  EDTA pH = 7,5,  $1,25 \text{ mmol l}^{-1}$  DTNB, 25% (v/v) glycerolu a destilované vody. Také by byl připraven Britton-Robinsonův pufr I. s rozsahem pH 4,0-11,0 nastaveného pomocí NaOH,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  roztok diaminopropanu a roztok acetyl-CoA o koncentraci  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Do kyvet by bylo napipetováno 400  $\mu\text{l}$  reakční směsi, 400  $\mu\text{l}$  Britton-Robinsonova pufru I. o daném pH, destilovaná voda, enzym s rozdílným objemem pro NATA1 (2  $\mu\text{l}$ ) a pro NATA2 (4  $\mu\text{l}$ ), 10  $\mu\text{l}$  acetyl-CoA a 50  $\mu\text{l}$  diaminopropanu, přičemž celkový objem v kyvetě by činil 1 ml. Kyvety by byly promíchány a byla by měřena absorbance při  $\lambda = 412 \text{ nm}$ , přičemž kyvetový prostor by byl vyhříván na 30 °C.

#### 3.2.7.2 Stanovení kinetických parametrů

Pro stanovení kinetických parametrů by byla připravena reakční směs o stejném složení jako při stanovení substrátové specifčnosti enzymu. Dále by byl připraven roztok acetyl-

CoA a vybraných aminů o koncentraci odpovídající zásobním roztokům použitým při stanovení substrátové specifčnosti.

Do kyvet by bylo napipetováno 800  $\mu\text{l}$  reakční směsi, enzym s rozdílným objemem pro NATA1 (2  $\mu\text{l}$ ) a pro NATA2 (4  $\mu\text{l}$ ), 20  $\mu\text{l}$  acetyl-CoA (výsledná koncentrace 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), destilovaná voda a příslušný amin. Koncentrace aminu by závisela na potřebách konkrétního měření (pravděpodobně od 0,05 do 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Celkový objem v kyvetě by byl 1 ml. Poté by bylo provedeno spektrofotometrické měření při  $\lambda = 412 \text{ nm}$  a teplotě 30 °C po dobu 20-30 min s intervalem odečtu absorbance 16 s. Výsledky by byly průběžně zaznamenávány a vyhodnocovány v programu Microsoft Excel 2016 pomocí linearizace dle Lineweavera a Burka.

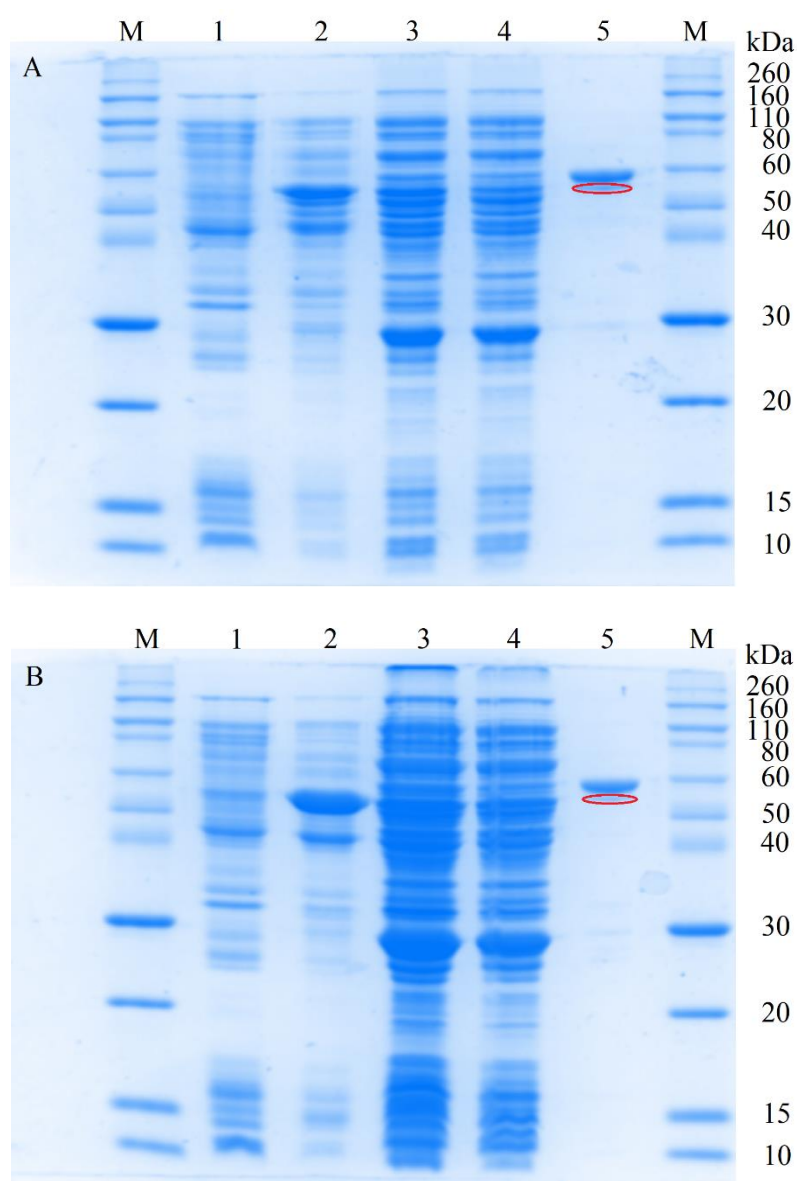
Stanovení kinetických parametrů pro acetyl-CoA by proběhlo obdobným způsobem. Jako substrát by byl použit diaminopropan o stálé koncentraci 5,0  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , rozsah koncentrací acetyl-CoA se předpokládal od 20 do 2000  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Základní kinetické parametry, a to Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) a limitní rychlost ( $V_{\text{lim}}$ ) by byly definitivně vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 8 za použití rovnice Michaelis-Mentenové  $v = (V_{\text{lim}} \cdot [S]) / (K_m + [S])$  a v případě, že by došlo k inhibici nadbytkem substrátu, byly by oba parametry včetně inhibiční konstanty ( $K_i$ ) určeny za využití rovnice  $v = (V_{\text{lim}} \cdot [S]) / (K_m + [S] \cdot (1 + [S]/K_i))$ .

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Purifikace enzymu

Z jedné kultury bylo získáno přibližně 700 µl roztoku NATA1 a 800 µl roztoku NATA2 o specifické aktivitě uvedené v Tab. 4. Po purifikaci studovaného enzymu byla provedena SDS-PAGE elektroforéza pro kontrolu exprese a purifikace. Z elektroforegramu pro příslušný enzym NATA1 a NATA2 (Obr. 13) je patrné vytvoření dvou bandů, přičemž označený band náleží studovanému enzymu a druhý band s molekulovou hmotností ~60 kDa patří chaperoninu z *E. coli*.

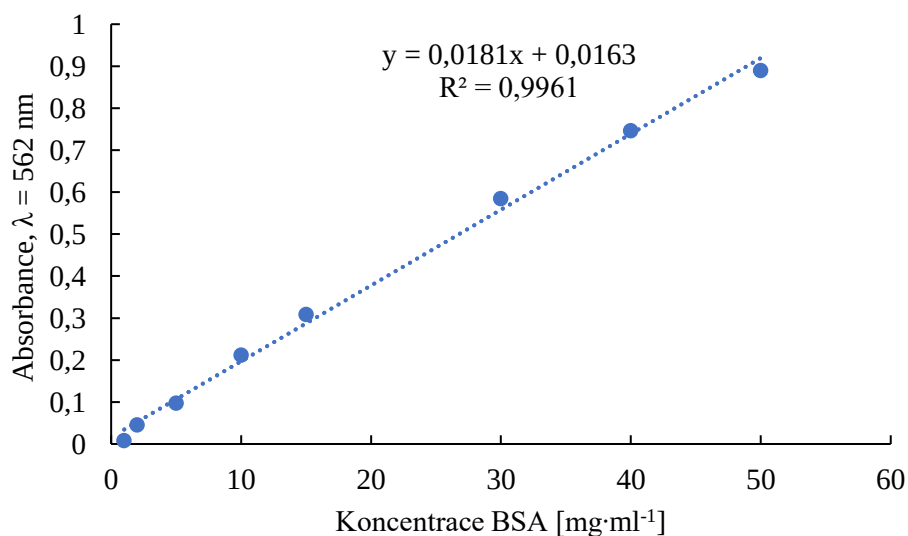


Obr. 13 SDS-PAGE gely NATA1 (A), NATA2 (B) s označeným studovaným proteinem. Pořadí vzorků (M) proteinový marker, (1) Bakteriální kultura *E. coli* před indukcí exprese, (2) Kultura *E. coli* po expresi, (3) Extrakce z bakteriálního sedimentu, (4) Flow-through, (5) Eluce.

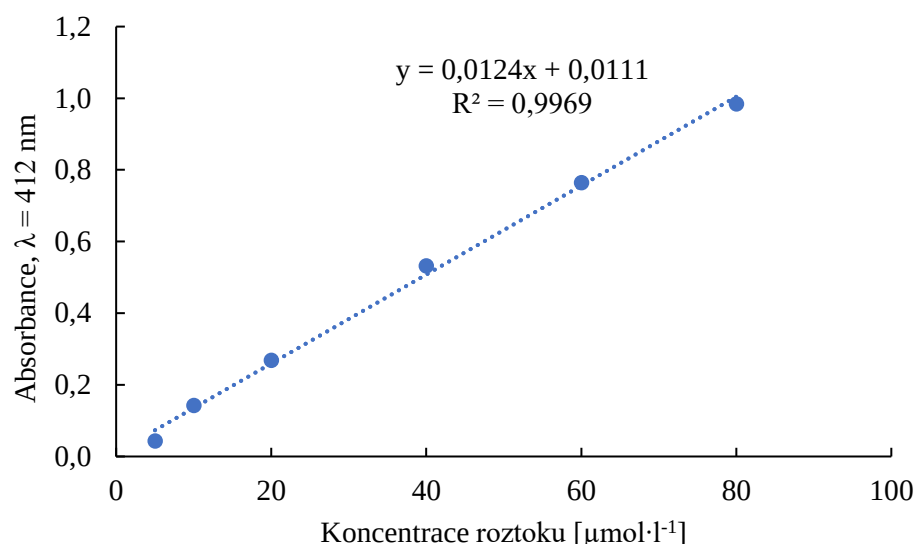
Pro stanovení koncentrace proteinů byla sestrojena kalibrační křivka (Obr. 14), přičemž z rovnice přímky byla spočtena koncentrace proteinů, která byla následně použita i pro výpočet specifické aktivity získaných obou enzymů (Tab. 4). Také byla provedena kalibrace spektrofotometrické detekce 5-merkaptonitrobenzoového aniontu se sestrojením kalibrační křivky (Obr. 15) pro účely měření aktivity enzymů.

Ze spočtených hodnot specifické aktivity jednotlivých enzymů vyplývá, že NATA1 vykazoval vyšší specifickou aktivitu ve srovnání s NATA2.

Ve studii Chen *et al.* (2003) uvádějí hodnotu specifické aktivity lidské SSAT1  $0,0067 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  a pro SSAT2  $0,0038 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  za použití sperminu jako substrátu. Také za použití putrescinu jako substrátu je hodnota specifické aktivity SSAT1  $0,0015 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  a pro SSAT2  $0,0012 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Pro srovnání aktivity rostlinného a lidského enzymu byla podle studie Hickman *et al.* (1998) také pozorována vyšší aktivita u lidské NAT1 než u NAT2. Dále Kawamura *et al.* (2005) potvrdili překrývající se, ale stále velmi odlišnou specifickou aktivitu lidské NAT1 a NAT2 a také poukázali na podobnost specifické aktivity křeččí NAT2 spíše s lidskou NAT1 než s NAT2.



Obr. 14 Kalibrační graf BSA s vyobrazenou rovnicí přímky pro stanovení koncentrace proteinů metodou BCA.



Obr. 15 Kalibrační graf s vyobrazenou rovnicí přímky pro stanovení hodnoty molárního absorpčního koeficientu při vlastní kalibraci metody.

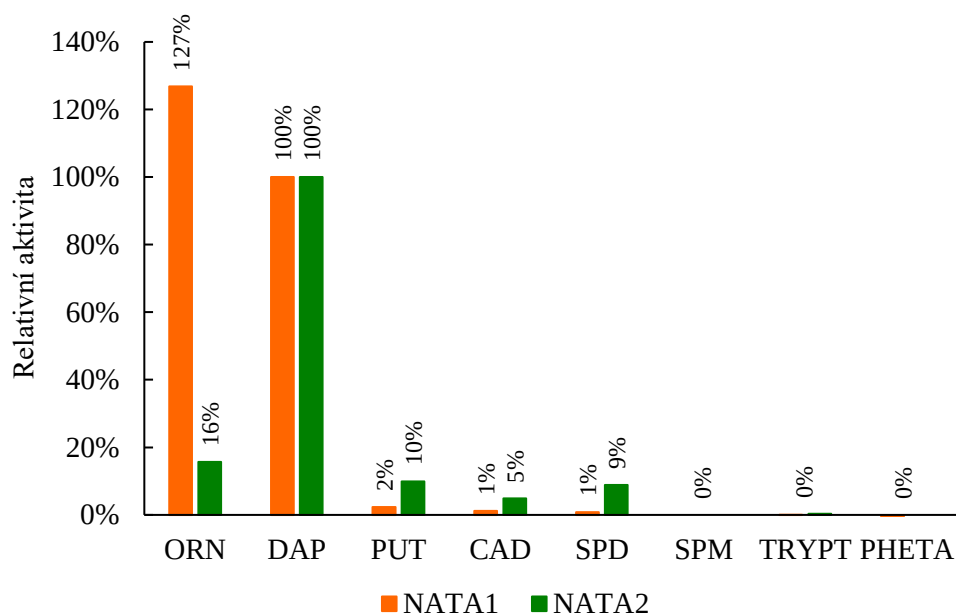
Tab. 4 Spočtené hodnoty koncentrace proteinů a specifické aktivity u enzymů NATA1 a NATA2. Měření aktivity probíhalo při teplotě 30 °C a koncentraci acetyl-CoA 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a diaminopropanu 5,0  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

| Enzym | Konc. proteinů ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) | Spec. aktivita ( $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) |
|-------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| NATA1 | 2,0623                                            | 1,4802                                              |
| NATA2 | 4,6300                                            | 0,0708                                              |

## 4.2 Stanovení substrátové specifčnosti enzymu

Substrátová specifčnost enzymu byla měřena pro jednotlivé substráty o stálé koncentraci 5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 16). Je patrné, že diaminopropan byl acetylován oběma enzymy vcelku solidně. NATA1 acetylovala ornithin rychleji než diaminopropan (127 %), zatímco NATA2 pomaleji než diaminopropan (16 %). Ostatní testované aminy včetně tryptaminu a fenylethylaminu byly jen slabými substráty obou enzymů. Dalšími testovanými substráty, jejichž měření bylo plánováno, ovšem vzhledem k zákazu prezenční výuky nerealizováno, by byly agmatin, norspermidin, lysin, histamin, ethylendiamin, thialysin či hydroxylysin.

Ve studii Lou et al. (2016) byly pro potvrzení katalytické aktivity enzymu NATA1 a zjištění preferencí substrátu provedeny *in vitro* testy s purifikovaným enzymem *Arabidopsis* NATA1 po expresi v *E. coli*, kdy výsledky poukázaly, že nejpreferovanějším substrátem pro NATA1 je ornithin s relativní aktivitou 100 %, dále putrescin 40 % a diaminopropan 20 %. Naproti tomu Jammes *et al.* (2014) uvádí v případě NATA1 výraznou preferenci diaminopropanu před putrescinem.



Obr. 16 Graf stanovení substrátové specifčnosti NATA1 a NATA2 při teplotě 30 °C, koncentraci substrátu  $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a acetyl-CoA  $250 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . ORN (ornithin), DAP (diaminopropan), PUT (putrescin), CAD (kadaverin), SPD (spermidin), SPM (spermin), TRYPT (tryptamin), PHETA (fenylethylamin).

### 4.3 Stanovení vlivu solí na aktivitu enzymu

Salinita se řadí mezi hlavní abiotické stresy u rostlin, přičemž vyšší koncentrace solí jsou toxické a způsobují nejen vyšší akumulaci polyaminů, ale také mohou narušovat aktivitu enzymů (Groppa a Benavides, 2007).

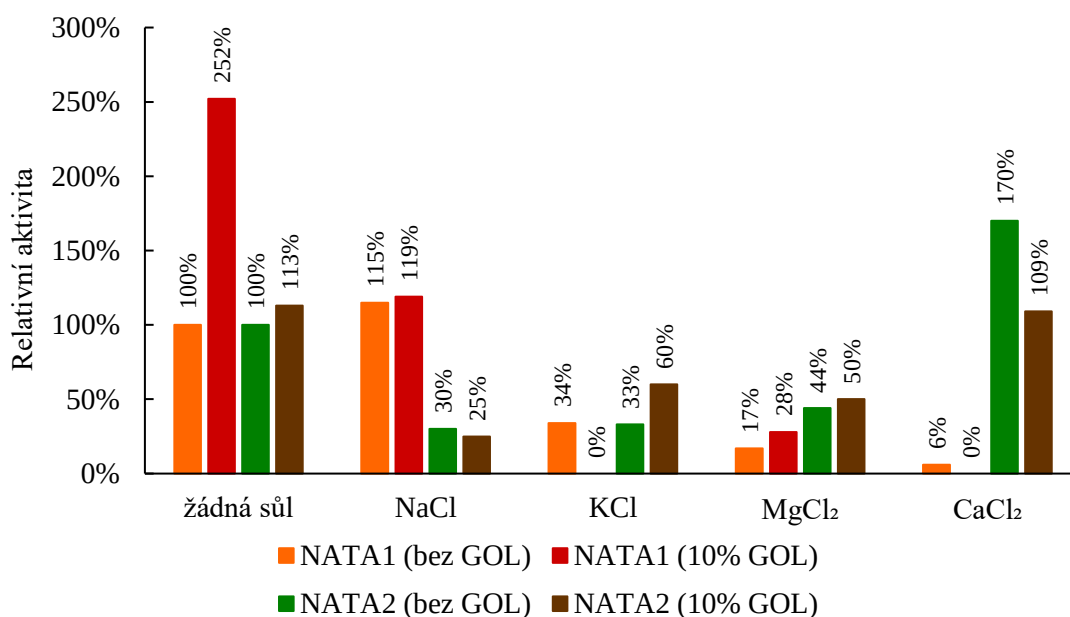
V experimentální části bakalářské práce byl měřen vliv vybraných solí při koncentraci  $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  na aktivitu enzymu, kdy všechny testované ionty vedly k poklesu aktivity enzymu s výjimkou  $\text{Ca}^{2+}$ , který aktivitu zvyšoval. Po porovnání vliv  $\text{NaCl}$  na aktivitu NATA1 byl menší, zatímco u NATA2 byl větší (Obr. 17). Přítomnost glycerolu vedla obvykle k vyšší aktivitě enzymu, což ukazuje na jeho protektivní účinky. Pouze v případě  $\text{KCl}$  u NATA1 a  $\text{CaCl}_2$  u obou enzymů vedla přítomnost glycerolu k výrazně nižší aktivitě enzymu.

Ve studii Andres *et al.* (1987) byl během kinetických studií králičí NAT pozorován silný účinek solí na aktivitu daného enzymu. U  $\text{NaCl}$  a  $\text{KCl}$ , jejichž koncentrace činila  $350 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , byla pozorována 50% inhibice enzymu, avšak  $\text{MgCl}_2$  a  $\text{CaCl}_2$  s koncentrací  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  byly prokázány jako mnohem silnější inhibitory. Také Chang a Chung (1998) zkoumali vliv solí na enzymovou aktivitu *E. coli* NAT. Aktivita studovaného



bakteriálního enzymu byla inhibována řadou solí o koncentraci  $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , přičemž  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  vykazovaly opět vyšší inhibici než  $\text{KCl}$ .

Pokud by nenastalo uzavření vysokých škol pro prezenční výuku, bylo v plánu změřit vliv těchto solí na aktivitu NATA i při jejich nižší koncentraci, pravděpodobně  $50\text{--}100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Také by došlo ke stanovení vlivu některých dalších solí, kterými by byly například  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  či  $\text{CuCl}_2$ .



Obr. 17 Graf stanovení vlivu solí na aktivitu enzymu při koncentraci solí  $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  bez obsahu glycerolu a s 10% glycerolem (GOL).

#### 4.4 Plánované experimenty

Stanovení pH optima a kinetických parametrů nebylo možné realizovat z důvodu vládních opatření souvisejících s epidemií Covid-19. Tyto plánované experimenty by dále mohly vést k lepšímu objasnění funkční charakterizace *Arabidopsis* NATA1 a NATA2.

Očekávané výsledky hodnot pH optima studovaného enzymu se mohou pohybovat v rozmezí hodnot stanovených pro jiné organismy či lidské hodnotě (Tab. 5). Také hodnoty základních kinetických parametrů jako například  $K_m$  se mohou blížit hodnotám naměřených u jiných organismů (Tab. 6), které se však mohou lišit v závislosti na různých podmínkách při měření jako je pH nebo teplota. Ve studii Lou *et al.* (2016) byla měřena  $K_m$  *Arabidopsis* NATA1, jejíž hodnota pro ornithin činila  $133 \pm 7,37 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pro diaminopropan  $707 \pm 128 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a pro acetyl-CoA  $70,7 \pm 18,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pokud by se v průběhu měření ukázalo, že hodnoty  $K_m$  výrazně přesahují uvedené hodnoty (více než  $2,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro jednotlivé aminy a více než  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro acetyl-CoA), bylo by rovněž nutné zopakovat stanovení substrátové specifčnosti a vlivu solí při použití takových koncentrací substrátů, u nichž lze předpokládat nasycení enzymu.

Tab. 5 Hodnota pH optima studovaného enzymu u vybraných organismů.

| Organismus       | Latinský název            | pH optimum    | Zdroj                                                                             |
|------------------|---------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Škrkavka prasečí | <i>Ascaris suum</i>       | 7,7 – 7,9     | Wittich a Walter (1989)                                                           |
| Křeček čínský    | <i>Cricetulus griseus</i> | 7,8           | McCloskey a Pegg (2003)                                                           |
| Potkan           | <i>Rattus norvegicus</i>  | 7,8; 8,0      | Takao <i>et al.</i> (2008), Seiler a Al-Therib (1974)                             |
| Člověk           | <i>Homo sapiens</i>       | 7,2; 7,8; 8,0 | Chen <i>et al.</i> (2003), Aubel <i>et al.</i> (2003), Hedge <i>et al.</i> (2007) |

Tab. 6 Hodnota  $K_m$  studovaného enzymu pro substráty acetyl-CoA a diaminopropanu u vybraných organismů.

| Organismus       | Latinský název           | Substrát      | $K_m$ ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) | Zdroj                                             |
|------------------|--------------------------|---------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Škrkavka prasečí | <i>Ascaris suum</i>      | Acetyl-CoA    | 0,0077                                    | Wittich a Walter (1989)                           |
|                  |                          | Diaminopropan | 1,2500                                    |                                                   |
| Potkan           | <i>Rattus norvegicus</i> | Acetyl-CoA    | 0,0015; 0,0130                            | Ragione a Pegg (1982), Takao <i>et al.</i> (2008) |
| Člověk           | <i>Homo sapiens</i>      | Acetyl-CoA    | 0,0038                                    | Hedge <i>et al.</i> (2007)                        |
|                  |                          | Diaminopropan | 0,1070                                    |                                                   |

## 5 ZÁVĚR

V teoretické části byla vypracována literární rešerše zahrnující biosyntézu a katabolismus polyaminů, regulaci hladiny polyaminů a jejich transport v rostlinách, acetylaci polyaminů, dále také N-acetyltransferasovou aktivitu 1 a 2 společně s jejich funkcí a lidskou N-acetyltransferasu, přičemž získané teoretické poznatky byly podloženy experimentální částí.

V experimentální části byly vyprodukovány *Arabidopsis* NATA1 a NATA2 v bakteriální kultuře *E. coli*. Oba isoenzymy byly následně vypurifikovány a pomocí metody BCA byla stanovena jejich koncentrace. Také byla měřena substrátová specifčnost studovaného enzymu a vliv vybraných solí na jeho aktivitu. Stanovení pH optima a kinetických parametrů bylo z důvodu epidemické situace pouze teoreticky zpracováno za pomoci již provedených studií.

Z naměřených hodnot v experimentální části byla potvrzena rozdílná substrátová specifčnost NATA1 a NATA2. Ornithin byl acetylován pomocí NATA1 rychleji než diaminopropan, zatímco v případě NATA2 se jednalo o velmi slabý substrát. Také byl potvrzen rozdílný vliv solí na aktivitu enzymu, přičemž přítomnost soli způsobila snížení jeho aktivity. Dále po provedení vlastní kalibrace metody byla potvrzena hodnota molárního absorpčního koeficientu.

## 6 LITERATURA

- Adámková Š., Petřivalský M. (2012): Vztah metabolismu a signálních funkcí oxidu dusnatého a polyaminů v rostlinách. *Chemické listy* **106**, 166-173.
- Adio A.M., Casteel C.L., De Vos M., Kim J.H., Joshi V., Li B., Juéry C., Daron J., Kliebenstein D.J., Jander G. (2011): Biosynthesis and Defensive Fuction of N<sup>δ</sup>-Acetylornithine, a Jasmonate-Induced Arabidopsis Metabolite. *The Plant Cell* **23**, 3303-3318.
- Andres H.H., Kolb H.J., Schreiber R.J., Weiss L. (1983): Characterization of the active site, substrate specificity and kinetic properties of acetyl-CoA:arylamine N-acetyltransferase from pigeon liver. *Biochimica et Biophysica Acta* **746**, 193-201.
- Andres H.H., Vogel R.S., Tarr G.E., Johnson L., Weber W.W. (1987): Purification, Physicochemical, and Kinetic Properties of Liver Acetyl-CoA:Arylamine N-Acetyltransferase from Rapid Acetylators Rabbits. *Molecular Pharmacology* **31**, 446-456.
- Andres H.H., Klem A.J., Schopfer L.M., Harrison J.K., Weber W.W. (1988): On the active site of liver acetyl-CoA. Arylamine N-acetyltransferase from rapid acetylators rabbits (III/J). *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 7521-7527.
- Aubel C., Chabanon H., Carraro V., Wallace H.M., Brachet P. (2003): Expression of spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase in HeLa cells in regulated by amino acid sufficiency. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**, 1388-1398.
- Bewley M.C., Graziano V., Jiang J., Matz E., Studier F.W., Pegg A.E., Coleman C., Flanagan J.M. (2006): Structures of wild-type and mutant human spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase, a potential therapeutic drug target. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 2063-2068.
- Binda C., Coda A., Angelini R., Federico R., Ascenzi P., Mattevi A. (1999): A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure* **7**, 265-276.
- Bouché N., Fromm H. (2004): GABA in plants: just a metabolite? *TRENDS in Plant Science* **9**, 110-115.
- BRENDA: <https://www.brenda-enzymes.org> (5. 5. 2021).
- Bronfield D.L., Todd C.D., Deyholos M.K. (2008): Analysis of *Arabidopsis* arginase gene transcription patterns indicated specific biological functions for recently diverged paralogs. *Plant Molecular Biology* **67**, 429-440.
- Casero R.A., Woster P.M. (2001): Terminally Alkylated Polyamine Analogues as Chemotherapeutic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 1-26.
- Coleman C.S., Stanley B.A., Jones A.D., Pegg A.E. (2004): Spermidine/Spermine-N<sup>1</sup>-acetyltransferase-2 (SSAT2) acetylates thialysine and is not involved in polyamine metabolism. *Biochemical Journal* **384**, 139-148.
- Davis R.H., Morris D.R., Coffino P. (1992): Sequestered End Products and Enzyme Regulation: The Case of Ornithine Decarboxylase. *Microbiological reviews* **56**, 280-290.
- Dempsey D.R., Jeffries K.A., Bond J.D., Carpenter A.M., Rodriguez-Ospina S., Breydo L., Caswell K.K., Merkler D.J. (2014): Mechanistic and Structural Analysis of *Drosophila melanogaster* Arylalkylamine N-Acetyltransferases. *Biochemistry* **53**, 7777-7793.
- Dempsey D.R., Jeffries K.A., Handa S., Carpenter A.M., Rodriguez-Ospina S., Breydo L., Merkler D.J. (2015): Mechanistic and Structural Analysis of a *Drosophila melanogaster* Enzyme, Arylalkylamine N-Acetyltransferase Like 7, an Enzyme That Catalyzes the Formation of N-Acetylarylalkylamides and N-Acetylhistamine. *Biochemistry* **54**, 2644-2658.
- Dempsey D.R., Nichols D.A., Battistine M.R., Pemberton O., Rodriguez Ospina S., Zang X., Carpenter A.M., O'Flynn B.G., Leahy J.W., Kanwar A., Lewandowski E.M., Chen Y., Merkler D.J. (2017): Structural and Mechanistic Analysis of *Drosophila melanogaster* Agmatine N-Acetyltransferase, an Enzyme that Catalyzes the Formation of N-Acetylarginine. *Scientific Reports* **7**:13432 <https://www.nature.com/articles/s41598-017-13669-6>.
- Drazic A., Myklebust L.M., Ree R., Arnesen T. (2016): The word of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1864**, 1372-1401.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. (1961): A new and rapid colorimetricdetermination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**, 88-95.

- Filippova E.V., Weigand S., Kiryukhina O., Wolfe A.J., Anderson W.F. (2019): Analysis of crystalline and solution states of ligand-free spermidine N-acetyltransferase (SpeG) from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology* **75**, 545-553.
- Frébort I., Adachi O. (1995): Copper/quinone-containing amine oxidases, an exciting class of ubiquitous enzymes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 625-632.
- Fujita M., Shinozaki K. (2014): Identification of Polyamine Transporters in Plants: Paraquat Transport Provides Crucial Clues. *Plant and Cell Physiology* **55**, 855-861.
- Grant D.M., Blum M., Beer M., Meyer U.A. (1991): Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Molecular Pharmacology* **39**, 184-191.
- Groppa M.D., Benavides M.P. (2008): Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* **34**, 35-45.
- Hamana K., Niitsu M., Samejima K., Itoh T., Hamana H., Shinozawa T. (1998): Polyamines of the thermophilic eubacteria belonging to the genera *Thermotoga*, *Thermodesulfovibrio*, *Thermoleophilum*, *Thermus*, *Rhodothermus* and *Meiothermus*, and the thermophilic archaeobacteria belonging to the genus *Aeropyrum*, *Picrophilus*, *Methanobacterium* and *Methanococcus*. *Microbios* **94**, 7-21.
- Hamana K., Hamana H., Shinozawa T., Niitsu M., Samejima K., Itoh T. (1999): Polyamines of the thermophilic eubacteria belonging to the genera *Aquifex*, *Thermodesulfobacterium*, *Thermus* and *Meiothermus*, and the thermophilic archaeobacteria belonging to the genera *Sulfurisphaera*, *Sulfobococcus*, *Stetteria*, *Thermocladium*, *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Methanopyrus* and *Methanothermus*. *Microbios* **97**, 117-130.
- Hanfrey C., Sommer S., Mayer M.J., Burtin D., Michael A.J. (2001): Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence for ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *The Plant Journal* **27**, 551-560.
- Hanfrey C., Elliot K.A., Franceschetti M., Mayer M.J., Illingworth C., Michael A.J. (2005): A Dual Upstream Open Reading Frame-based Autoregulatory Circuit Controlling Polyamine-responsive Translation. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 39229-39237.
- Hedge S.S., Chandler J., Vetting M.W., Yu M., Blanchard J.S. (2007): Mechanistic and Structural Analysis of Human Spermidine/Spermine N<sup>1</sup>-Acetyltransferase. *Biochemistry* **46**, 7187-7195.
- Hickman D., Pope J., Patil S.D., Fakis G., Smelt V., Stanley L.A., Payton M., Unadkat D., Sim E. (1998): Expression of arylamine N-acetyltransferase in human intestine. *Gut* **42**, 402-409.
- Holst M.C., Nevsten P., Johansson F., Carlén E., Öredsson S.M. (2008): Subcellular distribution of spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase. *Cell Biology International* **32**, 39-47.
- Hyvönen M.T., Uimari A., Vepsäläinen J., Khomutov A.R., Keinänen T.A., Alhonen L. (2012): Tissue-specific alternative splicing of spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase. *Amino Acids* **42**, 485-493.
- Chang F.C., Chung J.G. (1998): Evidence for Arylamine N-Acetyltransferase Activity in the *Escherichia coli*. *Current Microbiology* **36**, 125-130.
- Chen Y., Vujcic S., Liang P., Diegelman P., Kramer D.L., Porter C.W. (2003): Genomic identification and biochemical characterization of a second spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase. *Biochemical Journal* **373**, 661-667.
- Jammes F., Leonhardt N., Tran D., Bousserouel H., Véry A.A., Renou J.P., Vavasseur A., Kwak J.M., Bouteau F., Leung J. (2014): Acetylated 1,3-diaminopropane antagonizes abscisic acid-mediated stomatal closing in Arabidopsis. *The Plant Journal* **79**, 322-333.
- Jancova P., Anzenbacher P., Anzenbacherova E. (2010): Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **154**, 103-116.
- Kamada-Nobusada T., Hayashi M., Fukazawa M., Sakakibara H., Nishimura M. (2008): A Putative Peroxisomal Polyamine Oxidase, AtPAO4, is Involved in Polyamine Catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1272-1282.
- Kasukabe Y., He L., Nada K., Misawa S., Ihara I., Tachibana S. (2004): Overexpression of Spermidine Synthase Enhances Tolerance to Multiple Environmental Stresses and Up-

- Regulates the Expression of Various Stress-Regulated Genes in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 712-722.
- Kawamura A., Graham J., Mushtaq A., Tsiftoglou S.A., Vath G.M., Hanna P.E., Wagner C.R., Sim E. (2005): Eukaryotic arylamine N-acetyltransferase: Investigation of substrate specificity by high-throughput screening. *Biochemical Pharmacology* **69**, 347-359.
- Klempan T.A., Rujescu D., Mérette Ch., Himmelman C., Sequeira A., Canetti L., Fiori L.M., Schneider B., Bureau A., Turecki G. (2009): Profiling brain expression of the spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase 1 (SAT1) gene in suicide. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* **150B**, 934-943.
- Kneifel H., Stetter K.O., Andreessen J.R., Wegel J., König H., Schoberth S.M. (1986): Distribution of polyamines in representative species of archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **7**, 241-245.
- Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. (2008): Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**, 367-381.
- Lemarié S., Robert-Seilanianz A., Lariagon C., Lemoine J., Marnet N., Jubault M., Manzanares-Dauleux M.J., Gravot A. (2015): Both the Jasmonic Acid and the Salicylic Acid Pathways Contribute to Resistance to the Biotrophic Clubroot Agent *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **56**, 2158-2168.
- Lichman B.R. (2021): The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis. *Natural Product Reports* **38**, 103-129.
- Lou Y.R., Bor M., Yan J., Preuss A.S., Jander G. (2016): *Arabidopsis* NATA1 Acetylates Putrescine and Decreases Defense-Related Hydrogen Peroxide Accumulation. *Plant Physiology* **171**, 1443-1455.
- Lou Y.R. (2017): *Functional Analysis of Acetyltransferases in Plant Polyamine Metabolism*. Ph.D. thesis, Cornell University, Ithaca, New York.
- Lou Y.R., Ahmed S., Yan J., Adio A.M., Powell H.M., Morris P.F., Jander G. (2020): *Arabidopsis* ADC1 functions as an N<sup>δ</sup>-acetylornithine decarboxylase. *Journal of Integrative Plant Biology* **62**, 601-613.
- Maksymiuk A.W., Sitar D.S., Ahmed R., Cheng B., Bach H., Bagchi R.A., Aroutiounová N., Tappia P.S., Ramjiawan B. (2018): Spermidine/Spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase-1 as a diagnostic biomarker in human cancer. *Future Science OA* **4**:FSO345 <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.4155/fsoa-2018-0077>.
- McCloskey D.E., Pegg A.E. (2003): Properties of the Spermidine/Spermine N<sup>1</sup>-Acetyltransferase Mutant L156F That Decreases Cellular Sensitivity to the Polyamine Analogue N<sup>1</sup>, N<sup>11</sup>-Bis(ethyl)nospermine. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 13881-13887.
- Oshima T. (2007): Unique polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Amino Acids* **33**, 367-372.
- Parks A.R., Escalante-Semerena J.C. (2020): Modulation of the bacterial CobB sirtuin deacylase activity by N-terminal acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 15895-15901.
- Pegg A.E., McCann P.P. (1982): Polyamine metabolism and function. *American Journal of Physiology* **243**, C212-C221.
- Pegg A.E. (2008): Spermidine/spermine-N<sup>1</sup>-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **294**, E995-E1010.
- 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.
- Ragione F.D., Pegg A.E. (1982): Purification and Characterization of Spermidine/Spermin N<sup>1</sup>-Acetyltransferase from Rat Liver. *Biochemistry* **21**, 6152-6158.
- Riddles P.W., Blakeley R.L., Zerner B. (1979): Ellman's Reagent: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) – a Reexamination. *Analytical Biochemistry* **94**, 75-81.
- Ruan J., Zhou Y., Zhou M., Yan J., Khurshid M., Weng W., Cheng J., Zhang K. (2019): Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 2479.

- Sagor G.H.M., Berberich T., Takahashi Y., Niitsu M., Kusano T. (2013): The polyamine spermine protects *Arabidopsis* from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic Research* **22**, 595-605.
- Seiler N., Al-Therib M.J. (1974): Acetyl-CoA: 1,4-diaminobutane N-acetyltransferase. Occurrence in vertebrate organs and subcellular localization. *Biochimica et Biophysica Acta* **354**, 206-212.
- Schmid M., Davison T.S., Henz S.R., Pape U.J., Demar M., Vingron M., Schölkopf B., Weigel D., Lohmann J.U. (2005): A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* **37**, 501-506.
- Sinclair J., Sim E. (1997): A fragment consisting of the first 204 aminoterminal amino acids of human arylamine N-acetyltransferase one (NAT1) and the first transacetylation step of catalysis. *Biochemical Pharmacology* **53**, 11-16.
- Sinclair J.C., Sandy J., Delgoda R., Sim E., Noble M.E.M. (2000): Structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. *Nature Structural Biology* **7**, 560-564.
- Sivashanmugam M., Jaidev J., Umashankar V., Sulochana K.N. (2017): Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **86**, 185-194.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85.
- Sugiyama S., Ishikawa S., Tomitori H., Niiyama M., Hirose M., Miyazaki Y., Higashi K., Murata M., Adachi H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Mori Y., Kashiwagi K., Igarashi K., Matsumura H. (2016): Molecular mechanism underlying promiscuous polyamine recognition by spermidine acetyltransferase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **76**, 87-97.
- Šebela M., Radová A., Angelini R., Tavladoraki P., Frébort I., Peč P. (2001): FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers on biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**, 197-207.
- Takao K., Miyatake S., Fukazawa K., Wada M., Sugita Y., Shirahata A. (2008): Measurement of spermidine/spermine-N<sup>1</sup>-acetyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with N<sup>1</sup>-dansylspermine as the substrate. *Analytical Biochemistry* **376**, 277-279.
- Tiburcio A.F., Altabella T., Borrell A., Masgrau C. (1997): Polyamine metabolism and its regulation. *Physiologia Plantarum* **100**, 664-674.
- Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M. (2007): Aminoaldehyde dehydrogenases: has the time now come for new interesting discoveries? *Current Topics in Plant Biology* **8**, 45-70.
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobal R., Snégaroff J., Šebela M. (2010): Structural and Functional Characterization of Plant Aminoaldehyde Dehydrogenase from *Pisum sativum* with a Broad Specificity for Natural and Synthetic Aminoaldehydes. *Journal of Molecular Biology* **396**, 870-882.
- 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.
- Uimari A., Keinaenen T.A., Karppinen A., Woster P., Uimari P., Jaenne J., Alhonen L. (2009): Spermine analogue regulated expression of spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase and its effects on depletion of intracellular polyamine pools in mouse fetal fibroblasts. *The Biochemical Journal* **422**, 101-109.
- Vannier-Santos M.A., Suarez-Fontes A.M. (2017): Role of Polyamines in Parasite Cell Architecture and Function. *Current Pharmaceutical Design* **23**, 3342-3358.
- Wang C., Ruan P., Zhao Y., Li X., Wang J., Wu X., Liu T., Wang S., Hou J., Li W., Li Q., Li J., Dai F., Fang D., Wang Ch., Xie S. (2017): Spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase regulates cell growth and metastasis via AKT/ $\beta$ -catenin signaling pathways in hepatocellular and colorectal carcinoma cells. *Oncotarget* **8**, 1092-1109.
- Wittich R.M., Walter R.D. (1989): A novel type of putrescine (diamine)-acetylating enzyme from the nematode *Ascaris suum*. *Biochemical Journal* **260**, 265-269.

- Wolff A.C., Armstrong D.K., Fetting J.H., Carducci M.K., Riley C.D., Bender J.F., Casero R.A., Davidson N.E. (2003): A Phase II Study of the Polyamine Analog N<sup>1</sup>,N<sup>11</sup>-Diethylnorspermine (DENSp<sup>m</sup>) Daily for Five Days Every 21 Days in Patients with Previously Treated Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* **9**, 5922-5928.
- Zahedi L., Bissler J.J., Wang Z., Josyula A., Lu L., Diegelman P., Kisiel N., Porter C.W., Soleimani M. (2007): Spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase overexpression in kidney epithelial cells disrupts polyamine homeostasis, leads to DNA damage, and causes G<sub>2</sub> arrest. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **292**, C1204-C1215.
- Zhou X., Zhang N., Walters K.J., Hanna P.E., Wagner C.R. (2009): Probing the Catalytic Potential of the Hamster Arylamine N-Acetyltransferase 2 Catalytic Triad by Site-directed Mutagenesis of the Proximal Conserved Residue, Tyrosine 190. *The FEBS Journal* **276**, 6928-6941.
- Zhou X., Ma Z., Dong D., Wu B. (2013): Arylamine N-acetyltransferases: a structural perspective. *British Journal of Pharmacology* **169**, 748-760.
- Zhu Y.Q., Zhu D.Y., Yin L., Zhang Y., Vonnrhein C., Wang D.Ch. (2006): Crystal Structure of Human Spermidine/Spermine N<sup>1</sup>-Acetyltransferase (hSSAT): The First Structure of a New Sequence Family of Transferase Homologous Superfamily. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **63**, 1127-1131.



## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|              |                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------|
| AANAT        | arylalkylamin N-acetyltransferasa                           |
| ABA          | abscisová kyselina                                          |
| ADC          | arginindekarboxylasa                                        |
| AIH          | agmatiniminohydrolasa                                       |
| AMADHs       | aminoaldehyddehydrogenasy                                   |
| ARG          | arginasa                                                    |
| ARGAH        | gen arginasy                                                |
| <i>AtLAT</i> | gen <i>Arabidopsis</i> L-typ aminokyselinových transportérů |
| AUH          | agmatin ureohydrolasa                                       |
| BCA          | bicinchoninová kyselina                                     |
| BSA          | hovězí sérový albumin                                       |
| COI1         | receptor signální dráhy kyseliny jasmonové                  |
| CPA          | N-karbamoylputrescinamidohydrolasa                          |
| DAO          | diaminooxidasa                                              |
| DTNB         | 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina                     |
| GABA         | $\gamma$ -aminomáselná kyselina                             |
| IPTG         | isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid                |
| JA           | jasmonová kyselina                                          |
| JA-Ile       | jasmonyl izoleucin                                          |
| LAT          | L-typ aminokyselinových transportérů                        |
| LDC          | lysindekarboxylasa                                          |
| MeJA         | methyl jasmonát                                             |
| NAOD         | N-acetylnithindeacetylasa                                   |
| NAT          | arylamin N-acetyltransferasa                                |
| NATA         | N-acetyltransferasová aktivita                              |
| OAT          | ornithinacetyltransferasa                                   |
| ODC          | ornithindekarboxylasa                                       |
| OTC          | ornithintranskarbamylasa                                    |
| PA           | polyaminy                                                   |
| PABA         | p-aminobenzoová kyselina                                    |
| PAO          | polyaminooxidasa                                            |
| <i>PAR1</i>  | gen rezistentních paraquat mutantů                          |
| PAS          | p-aminosalicylová kyselina                                  |
| PDR11        | transportní protein paraquatu přes plazmatickou membránu    |
| PQ           | paraquat                                                    |
| <i>RMV1</i>  | gen rezistence na methyl viologen 1                         |
| SA           | salicylová kyselina                                         |
| SAMDC        | S-adenosylmethionindekarboxylasa                            |
| SPDS         | spermidinsyntasa                                            |
| SPMS         | sperminsyntasa                                              |
| SSAT         | spermin/spermidin N <sup>1</sup> -acetyltransferasa         |