

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra biochemie

**STUDIUM REGULACE
FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASY
VE VYŠŠÍCH ROSTLINÁCH**

**STUDY OF THE REGULATION OF
PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE
ACTIVITY IN HIGHER PLANTS**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: RNDr. Veronika Doubnerová, PhD.

Praha 2010

Denisa Škrletová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucí mé diplomové práce Doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za skvělé vedení, odbornou pomoc a cenné rady a také své konzultantce RNDr. Veronice Doubnerové, PhD. za vstřícnost a všestrannou pomoc při řešení experimentální části práce.

Děkuji i celému kolektivu za nápady a připomínky ohledně chodu laboratoře.

A stejně tak svým rodičům za jejich podporu poskytovanou po celou dobu mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne.....

Denisa Škrletová.....

Anotace

Phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31; PEPC) is one of the carbon dioxide-fixing enzymes, which yields oxaloacetate from phosphoenolpyruvate and bicarbonate. Regulation of PEPC activity occurs at many levels. In addition to pH and concentration of activators and inhibitors, it is phosphorylation as well. Phosphorylation of PEPC causes a change of kinetic parameters, such as maximal reaction rate, sensitivity to activation or inhibition. Considering that, there is still little information like this about C₃ plants and that regulation is in various plant species different, I have dealt with monitoring of the kinetic parameters and regulation possibilities of PEPC isolated from C₃ plant sources (*Cannabis sativa* L., *Chenopodium quinoa*, *Pisum sativum* L., *Lens culinaris*). While the activity of PEPC from leaves of *Cannabis sativa* L. was decreased by alkaline phosphatase, the activity of PEPC from seeds of *Chenopodium quinoa*, *Pisum sativum* L., *Lens culinaris* was not affected by alkaline phosphatase. The affinity of PEPC from seeds *Chenopodium quinoa*, *Pisum sativum* L., *Lens culinaris* to the substrate PEP was higher than in the case of PEPC from leaves of *Cannabis sativa* L.. For PEPC from *Cannabis sativa* L. was found that the apparent dephosphorylation leads to decrease of sensitivity to the activation by glukose-6-phosphate and to increase of sensitivity to inhibition by L-malate.

The results were compared with kinetic parameters of PEPC from maize seeds and tobacco leaves.

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (EC 4.1.1.31; PEPC) je jedním z enzymů fixujících oxid uhličitý, který poskytuje oxaloacetát z fosfoenolpyruvátu a hydrogenuhličitanového aniontu v přítomnosti hořečnatých iontů. Aktivita PEPC je regulována na mnoha úrovních. Vedle pH a koncentrace aktivátorů a inhibitorů, je to i fosforylace. Fosforylace PEPC působí změnu kinetických parametrů, jakými jsou afinita enzymu k substrátu, maximální rychlost reakce, citlivost vůči inhibici či aktivaci. Vzhledem k tomu, že o regulaci PEPC v C₃ rostlinách je informací stále málo a že se v různých rostlinných druzích liší, zabývala jsem se sledováním kinetických parametrů a možnostmi regulace PEPC izolované z C₃ rostlinných zdrojů (technického konopí,

merlíku chilského, hrachu setého, čočky jedlé). Zatímco aktivita PEPC z listů technického konopí byla alkalickou fosfatasou snižována, aktivita PEPC ze semen merlíku, hrachu a čočky alkalickou fosfatasou ovlivněna nebyla. Afinita PEPC ze semen merlíku, hrachu a čočky k substrátu PEP byla vyšší, než v případě PEPC z listů technického konopí. Pro PEPC z listů technického konopí bylo dále zjištěno, že zdánlivá defosforylace působí snížení citlivost k aktivaci glukosa-6-fosfátem a naopak zvýšení citlivosti k inhibici L-malátem.

Výsledky jsem porovnála s kinetickými parametry PEPC ze semen kukuřice, listů tabáku i dalšími dostupnými publikacemi.

Seznam použitých zkratek

AP	alkalická fosfatasa
ATP	adenosintrifosfát
C ₃ rostlina	rostlina, jejímž prvním fotosyntetickým produktem je 3-fosfoglycerát (tříuhlíkatá sloučenina)
C ₄ rostlina	rostlina, u které prvním fotosyntetickým produktem je oxalacetát (čtyřuhlíkatá sloučenina)
CAM	Crassulacean acid metabolism
BSA	hovězí sérový albumin
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraacetát
g	tíhové zrychlení (g = 9,80665)
Glukosa-6-fosfát	D-Glukosa-6-fosfát
NAD (NADH)	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NADP (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
OAA	oxalacetát
P _i	anorganický fosfát
PEP	fosfoenolpyruvát sodný
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N,N',N' – tetramethylenethylendiamin

Obsah

Anotace

Seznam použitých zkratk

1. LITERÁRNÍ ÚVOD	9
1.1. Fosfoenolpyruvátkarboxylasa	9
1.1.1. Obecná charakteristika PEPC	9
1.1.2. Malá genová rodina PEPC	10
1.1.3. Struktura PEPC.....	11
1.1.4. Mechanismus reakce katalyzované PEPC.....	13
1.1.5. Funkce PEPC.....	14
1.1.5.1. Funkce PEPC v C ₄ a CAM rostlinách.....	14
1.1.5.2. Funkce PEPC v C ₃ rostlinách	16
1.1.6. Regulace aktivity PEPC	18
1.1.6.1. Fosfoenolpyruvátkarboxylasa-kinasa	20
1.1.6.2. Semena rostlin a regulace aktivity PEPC	21
1.2. Poznatky a navazující studie	23
1.3. Experimentální rostliny	24
1.3.1. Listy <i>Cannabis sativa</i> L.	24
1.3.2. Semena <i>Chenopodium quinoa</i>	25
1.3.3. Semena <i>Pisum sativum</i> L.	26
1.3.4. Semena <i>Lens culinaris</i>	26
2. CÍL PRÁCE.....	28
3. MATERIÁL.....	29
3.1. Rostlinný materiál	29
3.2. Chemikálie	29
3.3. Přístroje a pomůcky	30
4. METODY	31
4.1. Purifikace PEPC z rostlinného materiálu.....	31
4.1.1. Příprava rostlinného extraktu	31
4.1.2. Srážení síranem amonným	31

4.1.3. Dialýza.....	31
4.1.4. Iontově výměnná chromatografie.....	32
4.1.5. Gelová chromatografie	32
4.2. Stanovení množství bílkovin.....	32
4.3. Metody stanovení enzymové aktivity PEPC.....	33
4.3.1. Měření aktivity PEPC.....	33
4.4. Kinetické metody	34
4.4.1. Stanovení kinetických parametrů	34
4.4.2. Studium fosforylace	35
4.4.3. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC.....	35
4.5. Elektroforetické metody.....	36
4.5.1. Příprava vzorků pro elektroforetickou separaci	36
4.5.2. Elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS.....	36
4.5.3. Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu	37
4.5.4. Elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu v nativním prostředí.....	37
4.5.5. Detekce aktivity PEPC po nativní elektroforéze.....	38
5. VÝSLEDKY	39
5.1. Izolace PEPC.....	39
5.1.1. Sledování aktivity v průběhu izolace	39
5.1.2. Detekce PEPC a její aktivity v polyakrylamidovém gelu	42
5.2. Charakteristika PEPC.....	44
5.2.1. Charakteristika PEPC izolované z listů technického konopí	44
5.2.1.1. Stanovení kinetických parametrů	44
5.2.1.2. Časový průběh defosforylace	46
5.2.1.3. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC	47
5.2.1.4. Vliv teploty na aktivitu PEPC.....	51
5.2.1.5. Vliv pH na aktivitu PEPC	52
5.2.2. Charakteristika PEPC izolované ze semen merlíku chilského.....	53
5.2.2.1. Stanovení kinetických parametrů	53
5.2.2.2. Časový průběh defosforylace	54

5.2.2.3. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC	55
5.2.2.4. Vliv teploty na aktivitu PEPC.....	57
5.2.2.5. Vliv pH na aktivitu PEPC	58
5.2.3. Charakteristika PEPC izolované ze semen hrachu setého	59
5.2.3.1. Stanovení kinetických parametrů	59
5.2.3.2. Časový průběh defosforylace	60
5.2.3.3. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC	61
5.2.3.4. Vliv teploty na aktivitu PEPC.....	63
5.2.3.5. Vliv pH na aktivitu PEPC	64
5.2.4. Charakteristika PEPC izolované ze semen čočky seté.....	65
5.2.4.1. Stanovení kinetických parametrů	65
5.2.4.2. Časový průběh defosforylace	66
5.2.4.3. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC	67
5.2.4.4. Vliv teploty na aktivitu PEPC.....	69
5.2.4.5. Vliv pH na aktivitu PEPC	70
6. DISKUZE.....	72
6.1. Stanovení kinetických parametrů.....	72
6.2. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC	75
6.3. Vliv teploty a pH na aktivitu PEPC	78
7. ZÁVĚR.....	79
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	80

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1. Fosfoenolpyruvátkarboxylasa

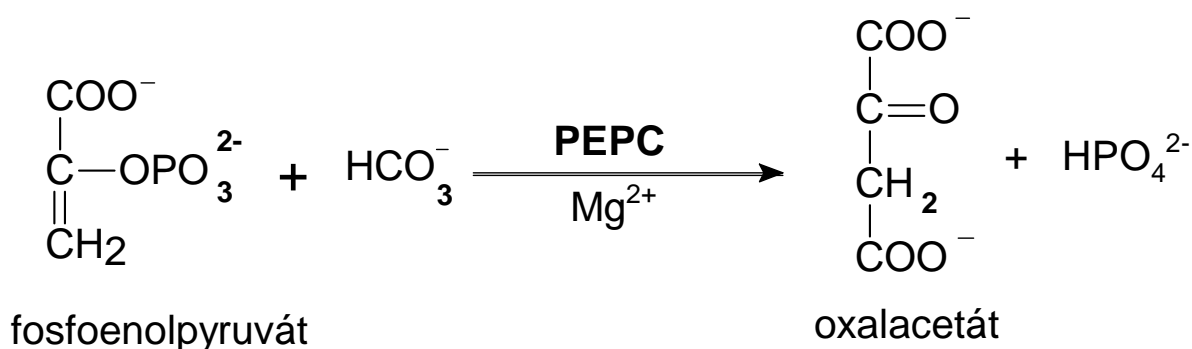
Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (EC 4.1.1.31), dále jen PEPC, systematický název - fosfát: oxalacetát karboxy-lyasa, byla objevena Bandurskim a Greinerem roku 1953 v listech špenátu. [1]

Od té doby je intenzivně zkoumána především v souvislosti se svojí úlohou v C₄ a CAM rostlinách, dále jsou sledovány možnosti regulace modulátory a změny kinetických parametrů po fosforylaci. [2]

V poslední době se objevují práce zaměřené na spojitost mezi PEPC a stresem rostlin.

1.1.1. Obecná charakteristika PEPC

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa je jeden z enzymů fixujících CO₂, který katalyzuje ireverzibilní β-karboxylaci fosfoenolpyruvátu na oxalacetát, v přítomnosti hydrogenuhličitanového aniontu (HCO₃⁻) a dvojmocného kationtu (Mg²⁺, Mn²⁺) jako kofaktoru, za současného uvolnění fosfátu (P_i). [2, 3, 4]



Jedná se o velmi rozšířený cytosolický enzym, který je přítomný ve všech fotosyntetizujících organismech (vyšší rostliny, bakterie, sinice, zelené řasy), ale také

v nefotosyntetizujících bakteriích a protozoích. Jeho přítomnost v houbách, kvasinkách a živočišných tkáních však nebyla prokázána. [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]

Ve vyšších rostlinách můžeme rozlišit čtyři skupiny PEPC. PEPC přítomná v mezofylových buňkách C_4 rostlin a v nefotosyntetických částech C_4 rostlin. Dále pak PEPC vyskytující se v CAM rostlinách a v rostlinách C_3 typu. [2, 3, 4, 5, 6]

PEPC ze semen rostlin nebyla doposud podrobně prozkoumána. Zatím byla v několika pracích sledována pouze aktivita PEPC (kukuřice [9], skočce [10, 11, 12], ječmene [13], pšenice [14, 15], fazole [16], vojtěšky [17] a révy [18]), popřípadě její imunodetekce. Kinetické studie byly částečně provedeny pro PEPC ze semen kukuřice, skočce a fazole.

1.1.2. Malá genová rodina PEPC

Geny pro PEPC byly identifikovány v rostlinách, bakteriích a v nedávné době také u archebakterií. [19]

Prokaryota obsahují pouze jeden gen kódující PEPC, nicméně u vyšších rostlin molekulární studie prokázaly celé malé genové rodiny. Izoformy PEPC byly identifikovány ve fotosyntetických i nefotosyntetických částech různých druhů rostlin. [2, 4, 20]

U C_4 rostlin je známý jejich polyfyletický původ, vyvinuly se během evoluce krytosemenných rostlin a předpokládá se, že C_4 izoforma pochází z nefotosyntetické formy PEPC genu, který byl přítomný již u C_3 předků. [21]

Podrobně byly studovány geny v kukuřici, kde byly objeveny minimálně 3 izoformy PEPC – C_4 a C_3 specifické izoformy v listech a kořenová izoforma. [2, 22, 23, 24]

U dvouděložných rostlin druhu *Flaveria* byly nalezeny C_3 (*F. pringlei*) i C_4 (*F. trinervia*) typy PEPC, které obsahují velmi podobné rodiny různých *Ppc* podskupin. Podle způsobu fotosyntézy se *Flaveria* dělí na C_3 , C_{3-4} přechodné, podobné C_4 a C_4 . [21, 25]

C_4 PEPC druhu *F. trinervia* je kódována genem *PpcA* třídy a má typické kinetické a regulační funkce C_4 typů PEPC. Jeho nejbližším sousedem je *PpcA* gen C_3 druhu

F. pringlei, který kóduje typický nefotosyntetický C₃ PEPC typ a zdá se být společným předkem C₃ a C₄ typů PEPC rodu *Flaveria*. [21, 25]

Ve fakultativních CAM rostlinách *M. crystallinum* (kosmatec křišťálový) byly popsány dva geny (*Ppc1*, *Ppc2*), transkripční aktivita *Ppc1* je silně a selektivně posílena během přechodu z C₃ metabolismu na CAM. K tomuto „přepínání“ dochází v případě, že je rostlina vystavena suchu a souvisejícímu solnému stresu. [2, 26]

Z C₃ rostlin je známá genová rodina PEPC rostlin se známým genomem *Arabidopsis thaliana* a *Oryza sativa*. Tato rodina je formována čtyřmi geny. Tři z těchto genů kódující PEPC izoformy jsou vysoce homologní (84-91%). [27]

Avšak byl identifikován jeden gen kódující PEPC s vysokou podobností k PEPC bakteriálního typu (42%) a zároveň nízkou podobností k typu rostlinnému. Tato izoforma současně postrádá fosforylovatelnou N-terminální sekvenci. [27]

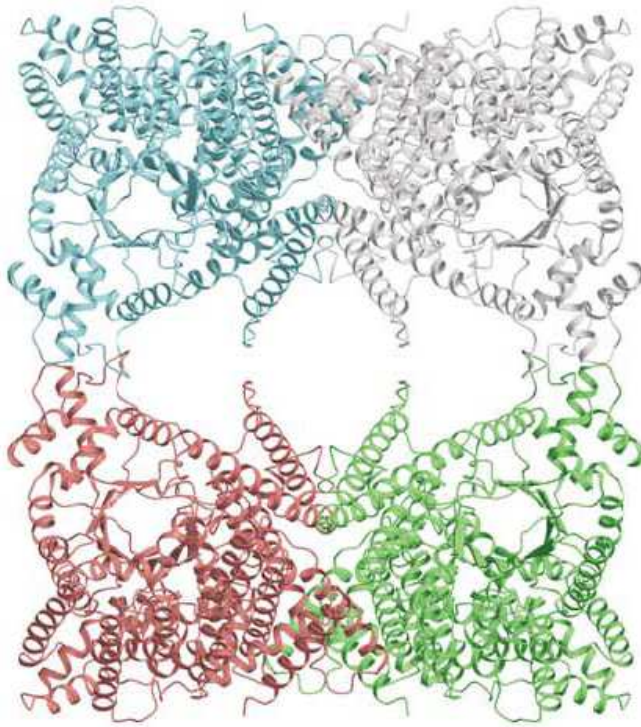
Výskyt PEPC genových rodin se také předpokládá pro cukrovou třtinu, tabák, vojtěšku, rýži, či pšenici. [2]

1.1.3. Struktura PEPC

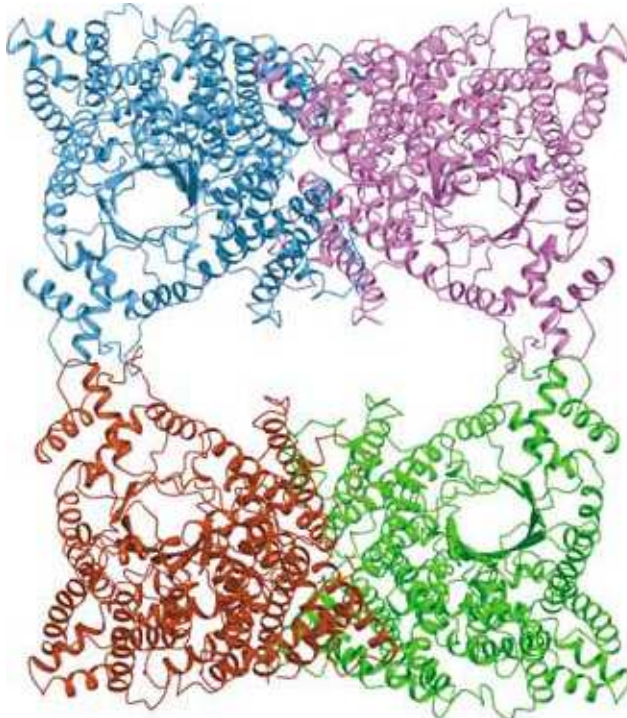
Fosfoenolpyruvátcarboxylasa se nejčastěji vyskytuje jako homotetramer skládající se ze čtyř identických podjednotek s molekulovou hmotností okolo 95-110 kDa. Výslednou tetramerickou strukturu je možné chápat jako dimer dimerů, který je stabilizován iontovými vazbami mezi karboxylovou skupinou kyseliny glutamové a =NH₂⁺ skupinou argininu. [4]

Primární struktura PEPC monomeru byla poprvé vyřešena pro *E. coli* v roce 1984. [28] Od té doby byla primární struktura zjištěna u více než 75 rostlinných a bakteriálních druhů, včetně tří izoform u kukuřice a čiroku. [3, 4, 15, 27, 29, 30, 31] První třídímenzionální struktura byla rozřešena pro PEPC z *E. coli* a *Zea mays*. [32, 33]

Monomer C₄ PEPC z kukuřice se skládá z osmi stočených β-struktur a 42 α-helixů. Sekundární struktura následně ukazuje, že molekula obsahuje 65% struktury α-šroubovice, zatímco β prvky jsou zastoupeny pouze 5%. Sekundární struktury C₄ PEPC z kukuřice jsou v podstatě totožné jako u *E. coli* PEPC. [4]



Obr. 1: Struktura fosfoenolpyruvátcarboxylasy izolované z *E.coli*, celkový pohled – „dimer dimerů“ [46]



Obr. 2: Struktura fotosyntetické fosfoenolpyruvátcarboxylasy z kukuřice [46]

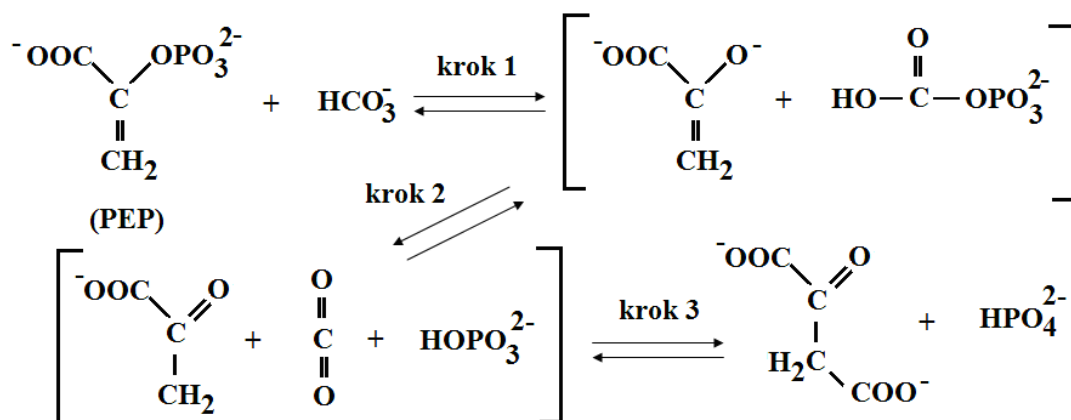
Katalyticky aktivní místo PEPC je lokalizováno na C-terminálním konci β -struktury a rozhodující roli v aktivním centru mají hlavně zbytky His, Glu, Asp a Arg. Struktura místa vázajícího Me^{2+} je překvapivě obdobná jako u dalších enzymů využívajících PEP (pyruvátkinasa, pyruvátorthofosfátdikinas), a to i přes nedostatečnou podobnost sekvence aminokyselin. [34]

1.1.4. Mechanismus reakce katalyzované PEPC

Fixace CO_2 na molekulu fosfoenolpyruvátu za vzniku oxalacetátu a volného fosfátu katalyzovaná PEPC je vysoce exergonická a striktně ireverzibilní reakce. Skutečným substrátem není oxid uhličitý, ale hydrogenuhličitanový anion. [2]

K určení přesného mechanismu reakce napomohlo rozluštění třídimenzionální struktury a krystalografické studie provedené pro PEPC z *E. coli* a *Zea mays*, tento výzkum poskytl informace o molekulárním mechanismu a alosterické regulaci. [4, 33, 34]

V současné době je považován za nejpravděpodobnější tříkrokový mechanismus (obr.3). V prvním kroku je částečně reverzibilní reakcí tvořen enolátový anion pyruvátu z fosfoenolpyruvátu (PEP) a z hydrogenuhličitanového aniontu vzniká karboxyfosfát. V druhém kroku následuje izomerace enolátového aniontu a štěpení karboxyfosfátu na oxid uhličitý a P_i (uvnitř katalytického místa). V posledním kroku dochází k elektrofilnímu ataku enolátového aniontu oxidem uhličitým a k uvolnění oxalacetátu a P_i . [2, 4]



Obr. 3: Reakční mechanismus PEPC [4]

1.1.5. Funkce PEPC

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa se v rostlinách uplatňuje v mnoha fyziologických funkcích, které zahrnují významné role např. ve fotosyntéze C_4 a CAM rostlin [35], v C_3 rostlinách plní řadu anaplerotických funkcí. [6, 36, 37]

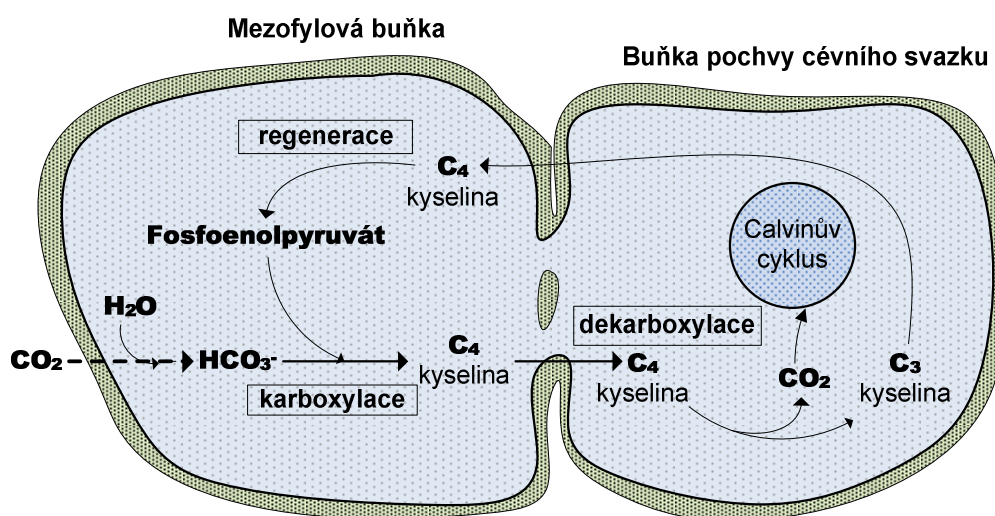
1.1.5.1. Funkce PEPC v C_4 a CAM rostlinách

V C_4 rostlinách a rostlinách s metabolismem typu CAM plní PEPC klíčovou roli při fotosyntetické fixaci CO_2 , kdy katalyzuje vznik fotosyntetického meziprojektu - čtyřuhlíkaté dikarboxylové kyseliny - oxalacetátu. [36]

V C_4 rostlinách probíhá primární karboxylace v mezofylových buňkách, dekarboxylace a vlastní Calvinův cyklus v buňkách pochev cévních svazků. Procesy jsou tedy odděleny prostorově. [38, 39, 40]

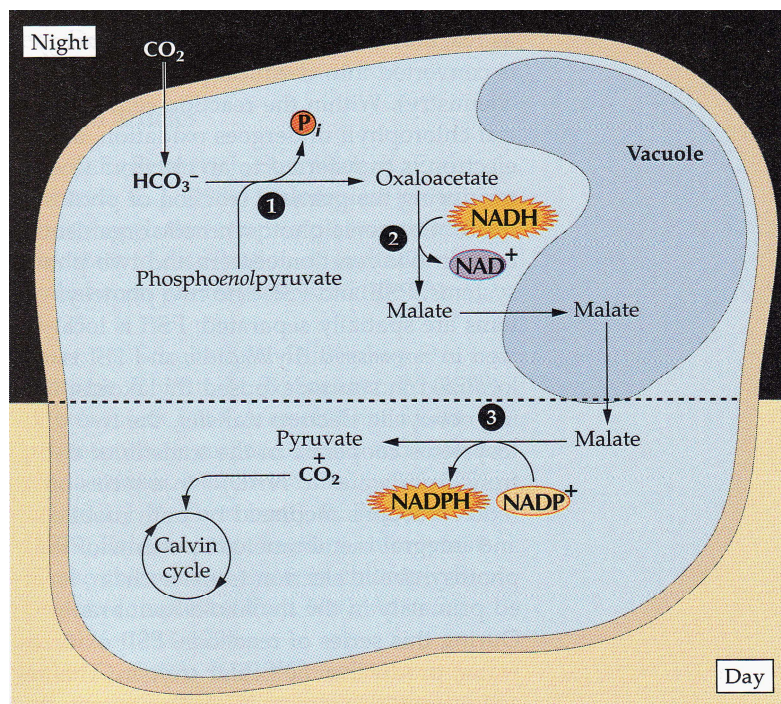
C_4 kyselina ve formě malátu nebo aspartátu je transportována do pochev cévních svazků, kde jsou specifickými enzymy (NADP-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační), NAD-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační) nebo fosfoenolpyruvátkarboxykinasa) dekarboxylovány. Oxid uhličitý je následně zachycen RubisCO v chloroplastech. [41]

K fixaci atmosférického CO_2 pomocí fotosyntetické PEPC dochází s využitím PEP, který je regenerován v chloroplastech za katalýzy orthofosfátdikinasou (PPDK).



Obr. 4: Asimilace CO_2 v C_4 rostlinách [42]

U rostlin s metabolismem fotosyntézy CAM je asimilace CO_2 oddělena v čase. [43] V rostlinách je PEPC aktivní během noci. Dochází k fixaci CO_2 a tvorbě oxalacetátu, který je následně redukován NAD-dependentní malátdehydrogenasou na čtyřuhlíkatý meziprodukt (malát) a skladován ve vakuole. Ve dne, kdy jsou stomata uzavřena, probíhá dekarboxylace malátu a uvolněný CO_2 je fixován RubisCO v Calvinově cyklu. [40, 44]



Obr. 5: Asimilace CO_2 v CAM rostlinách [42]

1 – enzym PEPC

2 – enzym NAD-dependentní malátdehydrogenasa

3 – enzym NADP-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační)

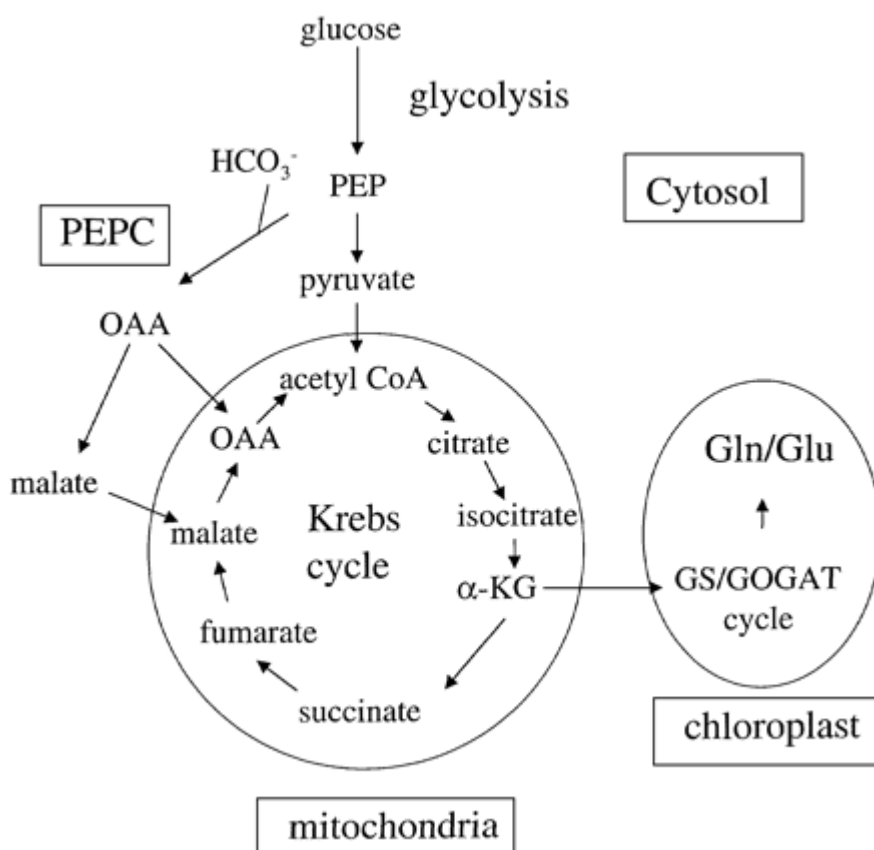
Oba typy rostlin (C_4 a CAM) jsou výsledkem adaptace rostlin na vysoké intenzity slunečního záření, sucha a horko a PEPC plní v procesu fotosyntézy velmi významnou roli. Rostliny s metabolismem CAM jsou současně metabolickou adaptací na aridní prostředí, kdy jsou stomata během dne uzavřena a otevírají se až v noci. Rostliny tak zabraňují nadměrné ztrátě vody transpirací.

1.1.5.2. Funkce PEPC v C_3 rostlinách

V C_3 rostlinách vykonává PEPC velmi rozmanité fyziologické role, působí v anaplerotických drahách, které jsou přítomny i u C_4 a CAM rostlin.

Důležitou funkcí je doplňování intermediátů cyklu trikarboxylových kyselin. Za primární úlohu PEPC je považováno doplňování OAA, který může být následně redukován na malát nebo transaminován na aspartát a rostlina tak získává čtyřuhlíkatý skelet pro další metabolismus. [6, 45] PEPC poskytuje intermediáty citrátového cyklu v případě, že jsou vyčerpány a α -ketoglutarát je využit pro syntézu aminokyselin v chloroplastech pomocí glutaminsynthetasy/glutamát- α -ketoglutarátaminotransferasy v GS/GOGAT cyklu (viz obrázek 6). [38]

Aminokyseliny, které jsou v době růstu aktivně syntetizovány, většinou pocházejí z uhlíkatého skeletu pyruvátu, α -ketoglutarátu a oxalacetátu. Také biosyntéza chlorofylu je odvozena od α -ketoglutarátu. [38]

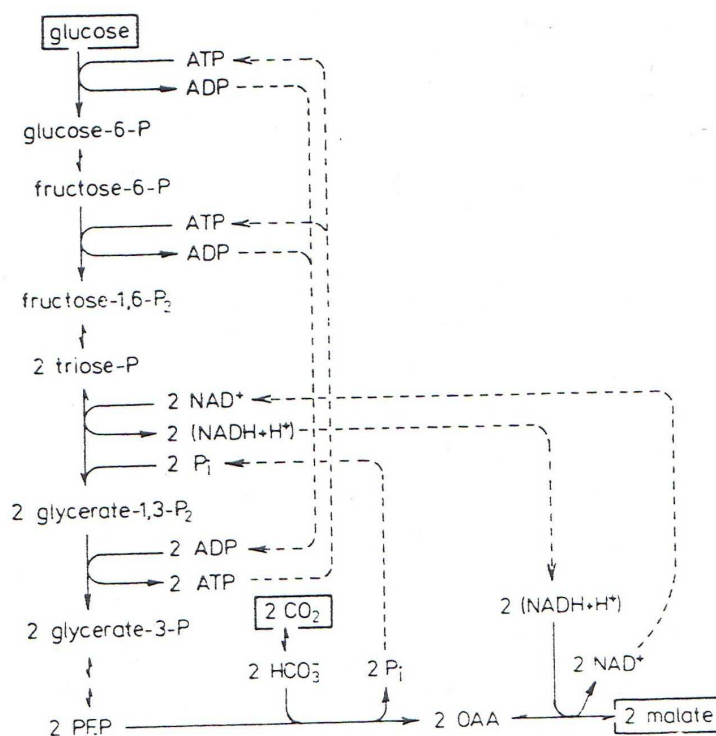


Obr. 6: Anaplerotické dráhy vedoucí k syntéze aminokyselin [38]

Využití kooperace mezi PEPC, NAD-dependentní malátdehydrogenasou a NADP-dependentní malátdehydrogenasou (dekarboxylační) slouží při regeneraci NAD^+ a poskytování redukčních ekvivalentů NADPH. Fosfoenolpyruvát se při této reakci mění na pyruvát a anorganický fosfát. [6]

PEPC se také účastní vycytávání molekul CO_2 uvolněných respirací. Několik studií prokázalo, že ve zrajících plodech a semenech je poměrně aktivní PEPC, která může vycytávat CO_2 uvolněný respirací a zpětně jej fixovat do OAA. [6]

Při anaerobióze (kořeny ponořené ve vodě, klíčení semen) získává rostlina energii především kvašením. Jedná se o sled reakcí, ve kterých organická sloučenina slouží jako akceptor vodíku. Při alkoholovém kvašení je akceptorem vodíku acetaldehyd, při mléčném kvašení pyruvát, u malátového kvašení může být jako akceptor vodíku využit OAA. Malátové kvašení není kvašení v pravém slova smyslu, neboť přeměna glukózy na malát neposkytuje přímo energii, ale reoxiduje se vznikající NADH, udržuje se adenylátový pool a koncentrace anorganického fosfátu.



Obr. 7: Participace PEPC na malátovém kvašení [6]

Zvýšené pH cytoplazmy PEPC aktivuje, neutrální cukry se přeměňují na kyselý malát a ten pH vrací na fyziologickou hodnotu. Naopak při snížení pH je aktivována NADP-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační) a akumulovaný malát je přeměňován na mnohem méně kyselý pyruvát, pH se opět vrací na původní hodnotu. [6]

1.1.6. Regulace aktivity PEPC

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa je citlivě regulována na mnoha úrovních. Enzym má široké spektrum alosterických efektorů, které souvisí také s druhem rostliny. Regulace rostlinné PEPC probíhá na úrovni exprese a jedná se o velmi složitý a komplexní mechanismus, zahrnující regulaci mnoha enzymů, metabolitů a signalizačních drah. [4]

Regulace aktivity PEPC v C_4 rostlinách *in vivo* je ovlivněna hlavně dostupností substrátu PEP a efektorů souvisejících s fotosyntézou. [19, 46, 47] Závislost rychlosti reakce katalyzované PEPC, která byla získána z řady různých zdrojů, na koncentraci substrátu fosfoenolpyruvátu má klasický hyperbolický tvar. Současně však byla prokázána i závislost sigmoidální. [62] Několik pozdějších studií objevilo, že ve srovnání s C_4 PEPC vykazuje PEPC z C_3 druhů rostlin rozdílné kinetické vlastnosti. Pro PEPC z C_3 rostlin byla prokázána vyšší afinita k substrátu právě ve srovnání s PEPC z C_4 druhů. [21]

Další pokusy současně objevily variabilitu v afinitě vůči HCO_3^- a následně bylo potvrzeno, že C_4 PEPC mají nižší hodnotu K_m (HCO_3^-), než enzymy z C_3 rostlin. Evoluce C_4 PEPC tedy souvisí se změnami v afinitě vůči substrátům PEP a HCO_3^- . [21] Aktivitu enzymu ovlivňuje teplota a pH. PEPC C_4 rostlin má většinou teplotní optimum okolo 35°C , optimum pH je 8,1. [46] Avšak i malá změna pH se může projevit velkým vlivem na aktivitu PEPC. *In vitro* je aktivita C_4 PEPC výrazně citlivá právě ke změnám pH. [48, 49] Nižší pH může mít vliv jak na aktivitu enzymu, tak i na jeho citlivost k modulátorům, např. inhibice L-malátem. [46]

Další možnou úrovní regulace PEPC je změna koncentrace inhibitorů. Jedním z nejdůležitějších inhibitorů PEPC je L-malát, ten je přímým produktem redukce

oxalacetátu a inhibuje PEPC bakterií, rostlin a také některých archebakterií. [19] Dalším možným inhibitorem je také L-aspartát, rovněž přímý produkt metabolismu oxalacetátu. Některé rostlinné typy PEPC mohou být také senzitivní vůči citrátu a pyruvátu (např. C₄ izoforma kukuřice), PEPC izolovaná z *E. coli* je inhibována sukcinátem a dalšími karboxylovými kyselinami. [19]

PEPC z CAM rostlin je regulována oligomerizací. Ve dne, kdy enzym není aktivní, existuje v podobě homodimeru (α_2), zatímco v noci tvoří aktivní homotetramer (α_4). [50] Působení alosterických aktivátorů a stupeň aktivace jsou více závislé na daném druhu rostliny a zdroji PEPC. Rostlinná C₄ izoforma PEPC je většinou modulována glukosa-6-fosfátem, popřípadě i dalšími metabolity glykolýzy jako je fruktosa-1,6-bisfosfát. Specifickým aktivátorem PEPC z C₄ jednoděložných rostlin je glycin. [47] Bakteriální PEPC je modulována metabolity β -oxidace mastných kyselin – acetylkoenzymem A, i samotnými mastnými kyselinami. [19]

Regulace PEPC z C₃ rostlin byla ve srovnání s PEPC C₄ rostlin zkoumána zatím méně. Nicméně pro PEPC z listů tabáku byl zaznamenán inhibiční účinek právě L-malátu [51] a pro PEPC ze sojových bobů byla pozorována aktivace glukosa-6-fosfátem, fruktosa-6-fosfátem, glukosa-1-fosfátem a dihydroxyacetonfosfátem. [52]

Další úrovní regulace PEPC je reverzibilní fosforylace, která je velmi koordinovaná a závislá na světle. K modifikaci dochází na serinovém zbytku v blízkosti N-terminálního konce molekuly PEPC. [2, 4]

Fosforylaci zajišťuje specifická PEPC-kinsa (PEPC-k) a během fosforylace se mění hlavně funkční vlastnosti enzymu vzhledem k inhibitorům a aktivátorům. Velmi často nastává také změna kinetických parametrů, jako je maximální rychlost reakce, afinita enzymu k substrátu, nebo Hillův koeficient. [53]

U fotosyntetické C₄ PEPC bylo v souvislosti s fosforylací zjištěno zvýšení maximální reakční rychlosti, aktivační konstanty pro glukosa-6-fosfát a naopak snížení citlivosti vůči L-malátu. [53, 54, 55]

V CAM rostlinách je enzym fosforylován během noci a tento proces úzce souvisí s cirkadiálním rytmem. [56]

Regulace fosforylace C_3 PEPC je komplexnější proces, než u C_4 PEPC a souvisí se světlem, přítomností dusíkatých metabolitů a dalšími vlivy. [51, 57, 58]

1.1.6.1. Fosfoenolpyruvátkarboxylasa-kinasa

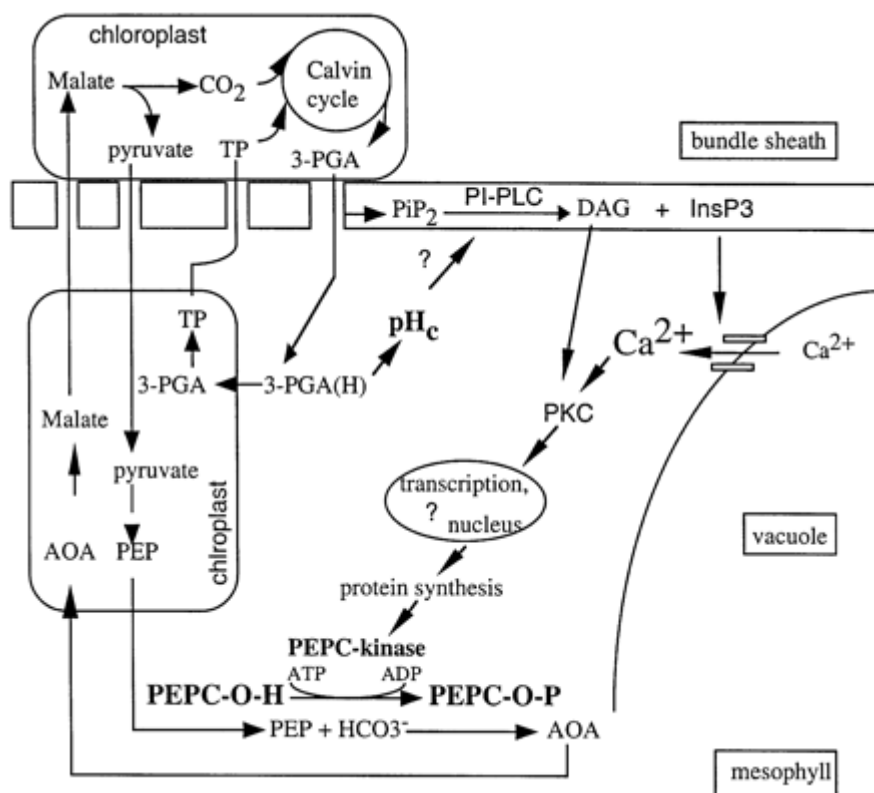
Specifická fosfoenolpyruvátkarboxylasa-kinasa (PEPC-k) je nejmenší známá proteinkinasa (molekulová hmotnost přibližně 30 kDa) a řadí se do rodiny Ser/Thr kinas. Je tvořena pouze katalytickou doménou, postrádá N-terminální část a C-terminální regulační oblast a je nezávislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů. [56]

Samotný proces fosforylace je regulován především expresí PEPC-k, která je aktivována u rostlin typu C_4 světlem a u rostlin s typem metabolismu CAM cirkadiálním rytmem. Regulace exprese PEPC-k v C_3 rostlinách je složitější, vedle regulace světlem je důležitá také dostupnost dusíkatých látek. [56]

Exprese PEPC-k může být ovlivněna i oxidačním a solným stresem. [4, 59]

Fosforylace C_4 PEPC fosfoenolpyruvátkarboxylasou-kinasou (PEPC-k) byla studována v C_4 listu a zahrnuje uspořádanou kaskádu. Tato komplexní a na světle závislá kaskáda zapojuje příspěvky různých komponent (pH, iontové kanály, signalizační enzymy), různé typy buněk (pochev cévních svazků, mezofylové) a subcelulární kompartmenty (chloroplasty, vakuolu a jádro). [38]

Aktivace začíná osvětlením, v chloroplastu – v buňkách pochev cévních svazků se tvoří 3-fosfoglycerát, který vystupuje jako mezibuněčný metabolický posel a difunduje do buněk mezofylových. K transportu dochází díky změně pH (právě v chloroplastu). Změnou pH je aktivována v mezofylových buňkách fosfolipasa C a přechodně je produkován sekundární posel inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol. Inositol-1,4,5-trifosfát způsobuje otevření Ca^{2+} kanálů tonoplastu a odtok Ca^{2+} iontů do cytosolu, zatímco diacylglycerol a Ca^{2+} aktivují proteinkinasu C. Prudké zvýšení aktivity PEPC kinasy, nezávislé na Ca^{2+} iontech, současně vede k fosforylaci C_4 PEPC (obr.8, str. 21). [38]



Obr. 8: Schématický model uspořádání transdukční kaskády fosforylace PEPC v C_4 listu [38]

1.1.6.2. Semena rostlin a regulace aktivity PEPC

Produkce semen, jejich dozrávání a následná ztráta vody – dormance jsou ovlivněny řadou látek, které umožňují rostlině přežít a adaptovat se na sezónní změny. Dormanci lze charakterizovat sníženou metabolickou aktivitou a zastavením růstu. V semenech jsou také uloženy inhibitory proteas, toxiny, antimikrobiální, antifungální a antiherbivorní látky, které zajišťují semenům ochranu. [60]

S dormancí souvisejí fytohormony, např. kyseliny abscisové a giberelinové, či přítomnost inhibitorů růstu. Důležitou roli má i obal semen, který brání růstu a rehydrataci, jež by mohla plně aktivovat uložené enzymy. Odstranění, porušení obalu, světlo, chlad, stimulace teplotou – mohou přerušit dormanci a zahájit germinaci. [61, 62]

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa ze semen rostlin je oblastí, která nebyla doposud podrobněji zkoumána. Kinetické studie byly částečně provedeny pro PEPC ze semen kukuřice, skočce a fazole. Fosforylací a PEPC-k se zabývaly pouze studie semen skočce, ječmene, pšenice a kukuřice.

V semenech kukuřice byla nalezena pouze jedna izoforma [9], dvě izoformy PEPC byly detekovány v klíčících semenech ječmene [13], podobný závěr přinesla studie semen skočce. [11] Avšak jedna z izoform skočce vykazuje neobvyklé složení – jedná se o heterooktamer, který je složen ze čtyř podjednotek 107 kDa (ty jsou totožné s druhou izoformou charakterizovanou u semen skočce) a čtyř podjednotek o 64 kDa.

V případě PEPC z ječmene [13], pšenice [15] a skočce [15] je enzym uložený v suchých semenech defosforylovaný. PEPC v semenech ječmene je fosforylován během prvních 24 hodin imbibice a byla zde detekována i aktivita PEPC kinasy, která není ovlivněna signální kaskádou záviselící na světle, jež je popisována v listech C₄ rostlin. [13]

Fosforylovaný enzym má vyšší aktivitu a je méně citlivý vůči inhibici L-malátem, přesně opačnou charakteristiku vykazuje právě neobvyklá heterooktamerní izoforma skočce. [12]

Pro PEPC ze semen kukuřice bylo zjištěno, že nativní forma uložená právě v semenech, je plně fosforylována, což naznačuje existenci dosud nepopsaného způsobu regulace specifické PEPC kinasy. [62]

1.2. Poznatky a navazující studie

V laboratoři Doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. bylo na téma regulace PEPC vypracováno již několik prací. Předmětem studia byla PEPC ze semen kukuřice [62] a PEPC z listů tabáku. [63, 64]

U PEPC izolované ze semen kukuřice byly studovány kinetické vlastnosti zvláště ve vztahu k fosforylaci. Nativní forma PEPC nalezená v semenech kukuřice je plně fosforylovaná, naopak enzym defosforylovaný má nižší hodnotu maximální reakční rychlosti, vykazuje sigmoidální průběh závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP a rovněž došlo ke změně Hillova koeficientu. [62]

Při studiu vlivu efektorů bylo zjištěno, že glukosa-6-fosfát působí pouze mírnou aktivaci PEPC, ale L-malát je velmi silným inhibitorem defosforylované formy PEPC, inhibuje i formu fosforylovanou, ale ne v takové míře. [62]

Pro defosforylovanou formu enzymu, izolovaného z listů tabáku, byl také zaznamenán pokles maximální reakční rychlosti (ve srovnání s PEPC izolovanou ze semen kukuřice). Vliv inhibitoru L-malátu na fosforylovaný a defosforylovaný enzym byl srovnatelný pro obě formy, avšak aktivace glukosa-6-fosfátem byla pozorována mnohem výraznější pro formu defosforylovanou. [63, 64]

Na základě provedených pokusů byly pro další izolace a studia regulací vybrány rostliny a semena rostlin, které by mohly posloužit pro rozšíření dodnes známých poznatků a získané kinetické parametry mohou být současně dobře porovnány s doposud známými hodnotami.

1.3. Experimentální rostliny

1.3.1. Listy *Cannabis sativa* L.

Technické konopí (*Cannabis sativa* L.) (obr. 9) je velmi odolná C₃ rostlina patřící do čeledi konopovitých rostlin (*Cannabiaceae*), jedná se o odnož kulturní rostliny konopí setého. Dorůstá do výšky 2,5 m i více, má štíhlý stonk a je typické svými dlaňovitými listy a malými zelenými květy. Technické konopí je velmi dobře využitelné v oblasti průmyslu - textilní, papírenský, ale i automobilový, strojní a stavební (má dobré tepelné a zvukové izolační vlastnosti). Nejvíce se však uplatňuje při výrobě kosmetiky a potravinářských doplňků.

Současně je rostlina známá tvorbou sekundárních metabolitů. Konopné sekundární metabolity představují širokou škálu sloučenin, které jsou odvozeny z acetátové a šikimátové biosyntetické cesty, hojně je rozšířen i terpenový metabolismus. Mezi farmakologicky aktivní sekundární metabolity patří kanabionidy, dále byly identifikovány flavonoidy a flavonoidům podobné dihydrostilbenové metabolity, dihydrofenantreny a spiroindany. Zároveň můžeme nalézt sloučeniny se dvěma benzenovými jádry – kanabistilbeny a také tricyklické sloučeniny. V konopí byly také objeveny alkaloidy odvozené od spermidinu a celá řada terpenů. Nejvíce jsou zastoupeny mono- a sekviterpeny, které jsou díky své těkavosti zodpovědné za výrazný pach rostliny.



Obr. 9: Technické konopí (*Cannabis sativa* L.)

1.3.2. Semena *Chenopodium quinoa*

Merlík chilský (*Chenopodium quinoa*) (obr. 10) je jednoletá dvouděložná rostlina, která je velmi nenáročná a je schopná růstu i ve vysokých nadmořských výškách (až 4000 m n.m.). Řadí se do čeledi merlíkovitých (*Chenopodiaceae*) a původem pochází z Latinské Ameriky, kde je využívána jako tzv. pseudoobilovina (nepatří mezi trávy). Komerčně se merlík chilský označuje jako quinoa. V jižní Bolívii a Peru je quinoa důležitým zemědělským produktem, hlavní potravou a také jediným zemědělským výrobkem, který je možné směnit za hotovost. Její drobná kulovitá zrna (obr. 11) se využívají podobně jako ječmen, listy je možné zpracovat jako špenát. Quinoa je v dnešní době velmi ceněná, obsahuje velké procento celkových bílkovin (OSN klasifikovalo quinou jako plodinu s vysokým obsahem bílkovin), esenciální aminokyseliny, sacharidy, vitaminy a minerály. Je důležitým zdrojem vlákniny a neobsahuje lepek. NASA quinou zařadila do výzkumného programu na podporu a udržení lidského života během dlouhých vesmírných letů, což vypovídá o její významné nutriční hodnotě.



Obr. 10: Merlík chilský
(*Chenopodium quinoa*)



Obr. 11: Semena merlíku chilského

1.3.3. Semena *Pisum sativum* L.

Hrách setý neboli *Pisum sativum* L. (obr. 12) patří do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Je to jednoletá kulturní rostlina, která dosahuje výšky až 200 cm, daří se jí v mírném pásu i tropech, avšak je možné ji pěstovat i v horských oblastech. V Evropě se pěstovala již v mladší době kamenné, v Asii ještě dříve, což dokazují i prehistorické nálezy.

Hrách se nejčastěji využívá jako píce nebo zelené hnojení, semena představují velmi výživnou luštěninu (obr. 13). Podobně jako ostatní luskoviny obsahuje i hrách antinutriční látky typu inhibitorů trypsinu, lektiny, taniny a hemaglutininy.



Obr. 12: Hrách setý (*Pisum sativum* L.)



Obr. 13: Semena hrachu setého

1.3.4. Semena *Lens culinaris*

Čočka (obr. 14, str. 27) je jednoletá rostlina řadící se také do čeledi bobovitých (*Fabaceae*), dosahuje výšky přibližně 40 cm a ve srovnání s jinými luskovinami je náročná na teplo. Pochází z Přední Asie a je poměrně rozšířená v okolí Středozemního moře, v Indii, Pakistánu Chile a Etiopii.

Pěstuje se především pro svá semena (obr. 15, str. 24), která jsou ukryta v luscích, obvykle po dvou. Obsahuje výrazné množství bílkovin, díky čemuž je velmi důležitou složkou stravy. Cenný je také vysoký podíl železa, mědi, zinku, draslíku, hořčíku,

chromu a dalších látek, významný je podíl vitamínu B a obsah kyseliny listové a některých aminokyselin. Čočka současně napomáhá snižovat množství cukru v krvi, dále podporuje odvodňování organismu a povzbuzuje produkci hormonů.



Obr. 14: Čočka setá (*Lens culinaris*)



Obr. 15: Semena čočky seté

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce je především porovnání kinetických parametrů PEPC ze semen kukuřice a listů tabáku s PEPC z jiných rostlinných zdrojů.

1. Purifikace PEPC z rostlinného materiálu – z C_3 rostlin
2. Studium enzymových charakteristik PEPC – K_m , V_{lim}
 - vliv fosforylace PEPC na maximální rychlost reakce a afinitu enzymu k substrátu
 - vliv fosforylace PEPC na inhibici L-malátem a aktivaci glukosa-6-fosfátem

3. MATERIÁL

3.1. Rostlinný materiál

Jako experimentální materiál byly využity listy technického konopí, semena merlíku chilského, semena hrachu setého a čočky jedlé.

Rostliny technického konopí laskavě poskytl ÚEB AV ČR.

3.2. Chemikálie

Akrylamid – Sigma, USA

Alkalická fosfatasa (P6774-10KU; 2,000-4,000 U/mg) – Sigma, USA

BSA – Sérový albumin

Bradfordovo činidlo – Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R, G – Sigma, USA

DEAE-celulosa – Whatman, USA

Dithiothreitol (DTT) – Sigma, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS) – Serva, Německo

Fast Violet B – Sigma, USA

Glukosa-6-fosfát – Sigma, USA

Inhibitory fosfatas – Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (P5726) – Sigma, USA

Inhibitory rostlinných proteas – Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts (P9599) – Sigma, USA

L-malát sodný – Sigma, USA

N,N,N',N' – tetramethylenethylendiamin (TEMED) – Serva, Německo

N,N'-methylenbisakrylamid – Serva, Německo

NADH - Sigma, USA

Nitroblue tetrazolium chlorid – Sigma, USA

Oxalacetát – Sigma, USA

Ostatní chemikálie – Lachema, ČR; Sigma, USA

Phenazin methosulfát - Sigma, USA

Phenylmethylsulfonyl fluorid – Sigma, USA
Polyvinylpyrrolidon (PVP) - Sigma, USA
Sephacryl S300 – Pharmacia, Švédsko
Sephadex G200 - Pharmacia, Švédsko
Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Serva, Německo

3.3. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy 100 A – Denver instrument Company, USA
Centrifuga Hettich Universal 32R – Hettich, Německo
Elektroforetická souprava Multigel G-44 – Biometra, Německo
Elektromagnetické míchadlo KMO 2 basic – Labortechnik, Německo
Mísič gradientu GM-1 – Pharmacia, Švédsko
Peristaltická pumpa P-1 – Pharmacia, Švédsko
PH metr Ultrabasic UB 10 – Denver instrument Company, USA
Sběrač frakcí FCC 61 – Laboratorní přístroje Praha, ČR
Spektrofotometr Hélios α – Hermo Spectronic, USA
Spektrofotometr Ultrospec 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

4. METODY

4.1. Purifikace PEPC z rostlinného materiálu

4.1.1. Příprava rostlinného extraktu

Listy technického konopí (30g) byly homogenizovány v třecí misce pomocí tloučku, semena (60g) byla nejprve rozemleta v mlýnku a následně byla extrahována po dobu 15 minut. Homogenizace a extrakce byla provedena v trojnásobném množství pufru A, který obsahoval 100 mM pufr Tris–HCl (pH 7,8); 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂ a 5% glycerol.

Získaný homogenát a extrakt byl přefiltrován přes čtyři vrstvy gázy a k filtrátu byl přidán asi 1 g PVP a 1 mM PMSF. Poté byla provedena centrifugace při 9000 RPM (9400 x g) při 4°C po dobu 30 minut. Supernatant byl označen jako hrubý extrakt a byla v něm změřena aktivita PEPC a množství bílkovin.

4.1.2. Srážení síranem amonným

Hrubý extrakt byl srážen síranem amonným do 35% nasycení. Dále byla provedena centrifugace při 9000 RPM (9400 x g) při 4°C po dobu 30 minut. Supernatant byl vysrážen do 55% (pro listy technického konopí), resp. do 60% (pro semena merlíku, hrachu a čočky) a centrifugován za stejných podmínek. Po resuspendaci sedimentu v pufru B obsahujícím 25 mM Tris – HCl pufr (pH 7,8); 0,5 mM DTT; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂ a 5% glycerol byla změřena aktivita PEPC a množství bílkovin.

4.1.3. Dialýza

Síranová frakce byla resuspendována v 8 ml pufru B a dialyzována proti 1 l pufru B při 4°C přes noc. Po dialýze byla změřena aktivita PEPC a množství bílkovin.

4.1.4. Iontově výměnná chromatografie

Odsolený preparát PEPC byl nanesen na kolonu DEAE – celulosy ekvilibrovanou pufrům B. Po jejím promytí byly eluovány nezachycené bílkoviny a následně byla provedena eluce lineárním gradientem NaCl v pufru B (0-300 mM) průtokovou rychlostí 1 ml/min.

V průběhu chromatografie byl sledován obsah bílkovin v jednotlivých frakcích měřením absorpce při 280 nm a stanovena aktivita PEPC. Aktivní frakce byly slity a sráženy síranem amonným do 80% nasycení, následovala centrifugace při 9400 x g při 4°C po dobu 20 minut. Sediment byl resuspendován v minimálním objemu pufru B (100 µl).

4.1.5. Gelová chromatografie

Gelová filtrace byla provedena na koloně, kde byl jako chromatografický materiál použit Sephacryl S 300 (velikost 1,5 x 65 cm). K eluci byl využit pufr B a v získaných frakcích byla opět měřena absorpce při 280 nm pro sledování množství bílkovin a také stanovena aktivita PEPC.

4.2. Stanovení množství bílkovin

Metoda stanovení koncentrace bílkovin dle Bradfordové je založena na interakci barviva Coomassie Brilliant Blue G 250 s bazickými a aromatickými aminokyselinami v proteinech [65].

Dochází k posunu absorpčního maxima z 464 nm na 595 nm a vzrůst absorpce při 595 nm může být následně použit jako měřítko koncentrace bílkovin.

K 33,3 µl hrubého extraktu byl přidán 1 ml Bradfordova činidla, popřípadě byl vzorek dle potřeby naředěn. Směs byla promíchána a po 20 minutách stání byla změřena absorpce při 595 nm proti slepému vzorku. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 0,25 – 1,4 mg.ml⁻¹.

4.3. Metody stanovení enzymové aktivity PEPC

Enzymová aktivita PEPC byla stanovena spektrofotometricky. Využita byla spřažená reakce s NAD-dependentní malátdehydrogenasou, kdy byl sledován úbytek NADH při 340 nm po dobu 5 minut.

Měření bylo provedeno v kyvetě o délce 1 cm, laboratorní teplotě a celkovém objemu reakční směsi 1 ml.

4.3.1. Měření aktivity PEPC

Pro stanovení aktivity enzymu PEPC byla využita spřažená reakce, kdy v prvním kroku vzniká OAA, jež je následně pomocí NAD-dependentní malátdehydrogenasy redukována za spotřeby NADH na malát, přičemž NAD-dependentní malátdehydrogenasa je přítomna ve vzorku v dostatečném množství. Spektrofotometricky byl zaznamenán pokles absorbance způsobený úbytkem NADH. V objemu 1 ml reakční směs obsahovala: 250 mM Tris-HCl pufr (pH 8,1); 5 mM NaHCO₃; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADH; 2 mM PEP a 1,42 μmol.min⁻¹.ml⁻¹ NAD-dependentní malátdehydrogenasy. Reakce byla startována přidávkem 50 μl extraktu. Měření bylo provedeno na spektrofotometru *Ultrospec 2100 pro* a aktivita byla vyjádřena v mikromolech přeměněného substrátu za 1 minutu ($\epsilon = 6200 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), případně vztažena na množství bílkovin a uvedena jako aktivita specifická.

4.4. Kinetické metody

4.4.1. Stanovení kinetických parametrů

Rychlost reakce katalyzované PEPC byla v kinetických studiích měřena podobně jako v 4.3.1. pomocí spřažené reakce s malátdehydrogenasou jako pokles absorbance při 340 nm. Reakční směs obsahovala v 1 ml 250 mM Tris-HCl pufr (pH 8,1 a 7,3); 5 mM NaHCO₃; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADH. Substrát PEP byl použit v koncentracích (0,1 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 1 mM; 2 mM; 4 mM). Reakce byla startována přidáním 50 μl extraktu. Rychlost reakce byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při 340 nm na přístroji *Hélios α* po dobu 5,83 min a vyjádřena v mikromolech přeměněného substrátu za 1 minutu ($\epsilon = 6200 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), případně vztažena na množství bílkovin a uvedena jako aktivita specifická.

Kinetické parametry jako maximální reakční rychlost (V_{lim}) a Michaelisova konstanta (K_m) byly vypočteny nelineární regreseí v programu MS Excel proložením experimentálních dat hodnotami vypočtenými z příslušné rovnice (rovnice 1). Statistický soubor zahrnoval 2 sady měření a 6 koncentrací substrátu PEP.

$$v = \frac{V_{\text{lim}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Rovnice 1: v.....reakční rychlost

[S].....koncentrace substrátu

V_{lim}maximální reakční rychlost

K_mMichaelisova konstanta

Stanovení aktivity PEPC v závislosti na teplotě bylo provedeno v reakční směsi pro měření aktivity PEPC (viz. 4.3.1.), která byla inkubována 5 minut při požadované teplotě (26°C; 30°C; 34°C a 40°C). Reakce byla startována přidáním enzymu.

Závislost aktivity PEPC na pH byla proměřena v reakční směsi podobné jako v odstavci 4.3.1.. Jako pufr byl využit Tris-HCl pufr a škála pH se pohybovala od pH=6,5; přes pH=6,8; 7,1; 7,3; 7,6 a 7,9 až k pH=8,1 a 8,5. V 1 ml směs obsahovala 250 mM Tris-HCl pufr (o daném pH); 5 mM NaHCO₃; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADH. Substrát PEP byl použit v saturační koncentraci 2 mM. Reakce byla startována přidavkem 50 µl extraktu. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při 340 nm na přístroji *Hélios α* po dobu 5,83 min a vyjádřena v mikromolech přeměněného substrátu za 1 minutu ($\epsilon = 6200 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Paralelně bylo provedeno jedno kontrolní měření.

4.4.2. Studium fosforylace PEPC

Pro studium fosforylace PEPC byl použit enzym alkalická fosfatasa.

Vzorek PEPC po gelové chromatografii byl s alkalickou fosfatasou inkubován po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Množství alkalické fosfatasy, přidávané ke vzorku, bylo stanoveno podle množství bílkovin, které bylo ve vzorku zjištěno – 30 µl alkalické fosfatasy přibližně na 2,25 mg bílkovin.

4.4.3. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC

V pokusu byl sledován vliv inhibitoru L-malátu a aktivátoru glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC. Vliv efektorů byl měřen v reakční směsi viz. 4.3.1. za použití pufru Tris-HCl o pH 7,3; při saturační (2 mM) a subsaturační (0,2 mM) koncentraci substrátu PEP. Koncentrace jednotlivých efektorů byla 0 mM; 1 mM; 2 mM a 5 mM. Proměřeny byly dvě sady vzorků.

Rychlost reakce byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při 340 nm na přístroji *Hélios α* po dobu 5,83 min a vyjádřena v mikromolech přeměněného substrátu za 1 minutu ($\epsilon = 6200 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), případně vztažena na množství bílkovin a uvedena jako aktivita specifická.

4.5. Elektroforetické metody

Elektroforéza využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se ve stejnosměrném elektrickém poli. Rychlost pohybu částic je závislá na velikosti náboje a velikosti molekuly. Různě nabité a různě velké molekuly se budou pohybovat odlišnou rychlostí.

Běžně je jako nosič používán polyakrylamidový gel, který je inertní, mechanicky pevný a průhledný. Polyakrylamidový gel se připravuje kopolymerací dvou monomerů, akrylamidu a N,N'-metylen-bis(akrylamidu) [66].

Jako katalyzátor se nejčastěji používá N,N,N',N' – tetramethylenethyldiamin (TEMED) [67].

4.5.1. Příprava vzorků pro elektroforetickou separaci

Vzorky po gelové chromatografii byly pro SDS-PAGE smíchány s SDS vzorkovým pufrům (0,5 M Tris-HCl pufr pH 6,8; 100 mM DTT; 10% SDS; 20% glycerol; 0,1 % bromfenolová modř) v poměru 1:1. Před aplikací na gel byly vzorky v SDS vzorkovém pufru přivedeny cca na 5 minut k varu. Aplikovaný objem byl zvolen tak, aby u jednotlivých vzorků odpovídal stejnému množství bílkovin.

Pro nativní elektroforézu byly vzorky po gelové chromatografii nanášeny na gel ve 20% sacharose pomocí Hamiltonovy stříkačky. Objem byl také zvolen tak, aby odpovídal stejnému množství bílkovin u jednotlivých vzorků.

4.5.2. Elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Separace SDS-PAGE je elektroforéza v prostředí polyakrylamidového gelu (PAGE) v přítomnosti SDS. Metoda je založená na dělení proteinů dle jejich velikosti. Detergent SDS redukuje proteiny na jejich linearizovanou strukturu a obalí je uniformním nábojem. [66, 67]

Diskontinuální elektroforéza za denaturujících podmínek v přítomnosti SDS byla provedena metodou dle Laemmliho [68].

Byl použit gradient polyakrylamidového gelu s využitím 10% a 15% koncentrace separačního gelu a 5% koncentrace gelu zaostřovacího. Separace byla provedena na elektroforetické soupravě Multigel Biometra s SDS elektrodoým pufrem (25 mM Tris-HCl pufr pH 8,3; 250 mM glycin; 3,5 mM SDS) při napětí 70V pro gel zaostřovací, pro gel separační bylo napětí zvýšeno na 140 V.

4.5.3. Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu

Před barvením byl zaostřovací gel opatrně odstraněn a proteiny separačního gelu byly detekovány barvicí lázní obsahující Coomassie Brilliant Blue (2 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250; 425 ml ethanolu; 100 ml kyseliny octové; 50 ml methanolu a 425 ml vody). Pozadí bylo následně odbarveno roztokem obsahujícím ethanol, kyselinu octovou a vodu v poměru 25: 10: 65.

4.5.4. Elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu v nativním prostředí

Pro nativní elektroforézu byl využit gradient polyakrylamidového gelu z 6% a 12% separačního gelu a 3% zaostřovací gel. Nativní elektroforéza byla provedena za účelem následné detekce enzymu PEPC.

Separací gel obsahoval 3 ml 30% akrylamid a N,N'-metylen-bis(akrylamid); 3,8 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (pH 8,8); 0,15 ml 10% glycerolu; 0,15 ml 10% peroxodisíranu amonného a 0,012 ml TEMED.

Zaostřovací gel byl připraven z 0,4 ml 30% akrylamidu a N,N'-metylen-bis(akrylamidu); 0,5 ml 1M Tris-HCl pufru (pH 6,8); 0,04 ml 10% glycerolu; 0,04 ml 10% peroxodisíranu amonného a 0,008 ml TEMED.

Použitý elektrodový pufr měl složení 18,8 g glycinu, 3 g Tris-HCl a 10 ml 10% glycerolu na 1000 ml destilované vody. Pro detekci postupujícího čela bylo před začátkem elektroforézy přidáno několik kapek bromfenolové modři. Nejprve separace probíhala při napětí 70 V, po dosažení hranice dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 140 V. Obě desky byly během elektroforézy chlazeny proudící vodou.

4.5.5. Detekce aktivity PEPC po nativní elektroforéze

Detekce PEPC byla provedena kolorimetrickým stanovením produktu oxalacetátu v reakci s Fast Violet B (6-benzamino-4-methoxy-*m*-toluidin diazonium chlorid) dle Karna. [69]

Po nativní elektroforéze byl celý gel rychle pokryt roztokem smíchaným z 100 mM Tris pufr pH 7,5; 25 mM NaHCO₃⁻; 10 mM MgCl₂; 10 mM PEP. A roztokem připraveným ze 100 mM Tris pufru pH 7,5 a 50 mg agarosy zahřáté na 100 °C, aby se veškerá agarosa rozpustila. Po 60-90 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla agarosa z povrchu gelu odstraněna a přítomnost PEPC se projevila jako výrazné červené proužky.

5. VÝSLEDKY

5.1. Izolace PEPC

Z listů technického konopí a semen merlíku, hrachu a čočky byl podle izolačního postupu uvedeném v kapitole 4.1. izolován enzym PEPC. Po jednotlivých krocích izolace byla měřena aktivita PEPC. Aktivita byla změřena v hrubém extraktu, v resuspendovaných sedimentech po srážení síranem amonným, aktivita PEPC ve vzorku po dialýze, po ionexové chromatografii na sloupci DEAE-celulose a aktivita PEPC po gelové chromatografii. Výsledky jsou pro jednotlivý experimentální materiál uvedeny ve formě izolační tabulky (tab. 1).

Aktivita sledovaného enzymu byla vztažena na jednotku objemu a také na množství bílkovin přítomných v jednotlivých preparátech – jako specifická aktivita. V každém kroku bylo také určeno celkové množství bílkovin. Ke stanovení byla využita metoda dle Bradfordové a výsledky jsou uvedeny v tabulce 1 (str. 40).

5.1.1. Sledování aktivity PEPC v průběhu izolace

Celkové množství proteinů po jednotlivých izolačních krocích postupně klesalo (tab. 1), a to z 398 mg na 29 mg v případě listů technického konopí, u semen merlíku byl zaznamenán pokles z 444 mg na 31 mg, pro semena hrachu byl pak pokles podobný jako pro semena čočky z 596 mg (resp. 548 mg) na 23 mg (resp. 41mg). Naopak specifická aktivita v průběhu izolace stoupala - zcela postupně u PEPC izolované ze semen čočky, pro PEPC izolovanou z listů technického konopí, semen merlíku a hrachu nebyl nárůst specifické aktivity až tak pravidelný, avšak nejvyšší hodnota byla zjištěna po gelové chromatografii. S výjimkou PEPC izolované ze semen hrachu.

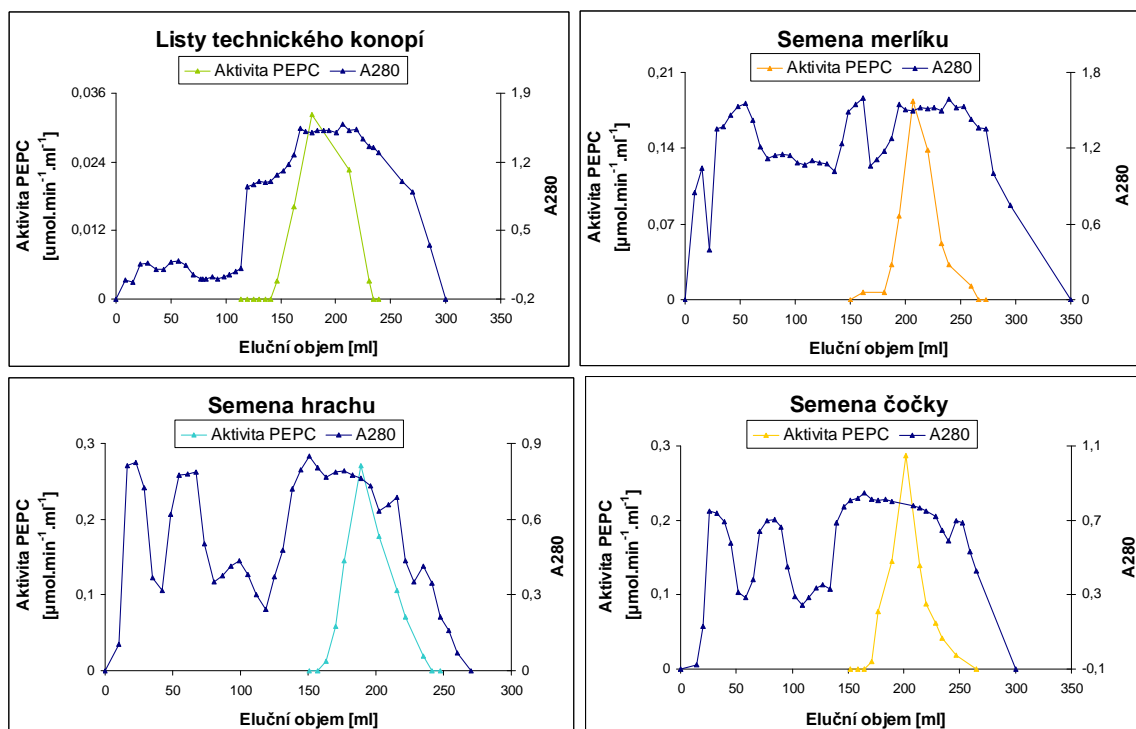
Prvním krokem izolace byla homogenizace a extrakce vzorků, v těchto frakcích bylo velké množství bílkovin a specifická aktivity byla poměrně nízká. S výjimkou stanovení specifické aktivity v hrubém extraktu pro listy technického konopí.

Po srážení síranem amonným ve frakci do 35-60% nasycení se množství celkových bílkovin ve vzorcích výrazně snížilo. Výsledky shrnuje tabulka 1.

Izolační krok	aktivita [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$]	V [ml]	celk. aktivita [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$]	množství bílkovin [mg/ml]	spec. aktivita [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	celk. množství proteinu [mg]
Listy technického konopí						
hrubý extrakt	0,10	85	8,22	4,58	21	389
síranová frakce	0,32	9	2,90	19	17	171
ionexová chromatografie	0,02	57	1,29	2,06	11	117
gelová chromatografie	0,08	8	0,67	3,64	23	29
Semena merlíku						
hrubý extrakt	0,15	100	14,52	4,44	33	444
síranová frakce	0,68	10,5	7,11	23	30	242
ionexová chromatografie	0,11	54	6,10	2,32	49	125
gelová chromatografie	0,25	10	2,48	3,06	81	31
Semena hrachu						
hrubý extrakt	0,27	110	29,10	5,42	49	596
síranová frakce	1,37	10	13,71	21,35	64	214
ionexová chromatografie	0,18	50	8,87	1,25	142	63
gelová chromatografie	0,25	10	2,52	2,34	108	23
Semena čočky						
hrubý extrakt	0,27	90	24,68	6,09	45	548
síranová frakce	1,08	14	15,13	22,80	47	319
ionexová chromatografie	0,17	50	8,39	3,07	55	154
gelová chromatografie	0,35	10	3,48	4,05	86	41

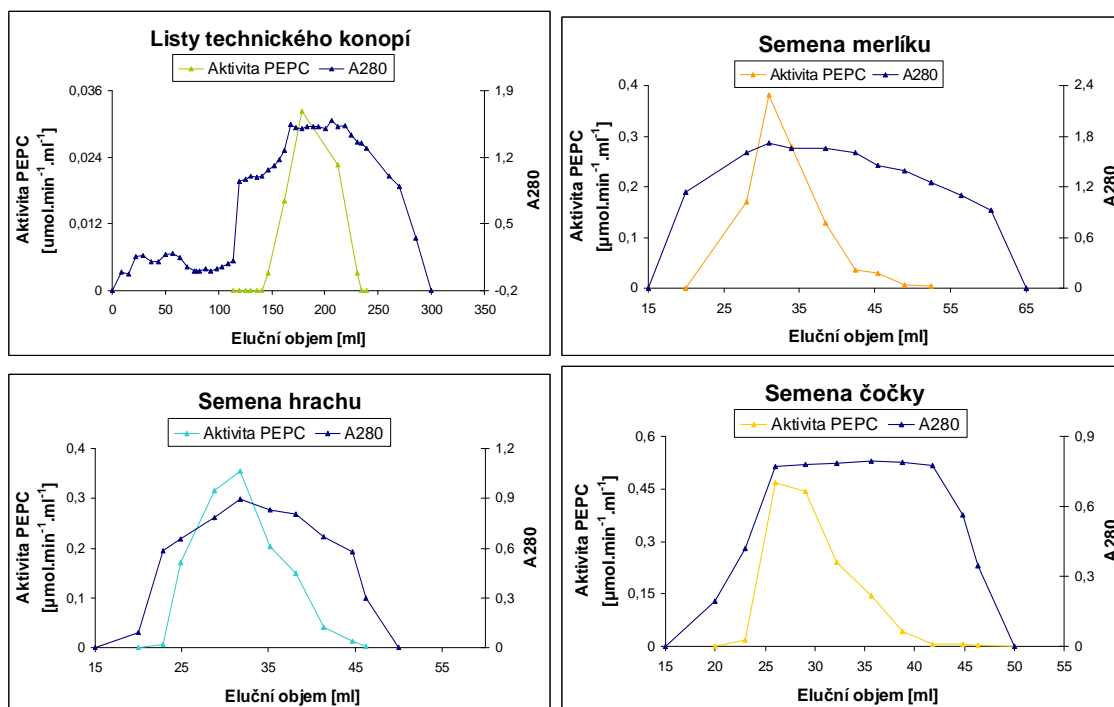
Tabulka 1: Průběh purifikace PEPC z listů technického konopí, semen merlíku, hrachu a čočky. Na jednotlivé izolace bylo použito 30g (listy technického konopí) resp. 60 g (semena merlíku, hrachu a čočky) experimentálního materiálu.

Při ionexové chromatografii na sloupci DEAE-celulose se enzym PEPC eluoval gradientem 0-300 mM NaCl. V průběhu ionexové chromatografie byl ve všech frakcích sledován obsah bílkovin měřením absorbance při 280 nm. Ve frakcích, které vykazovaly vysokou absorbanci, byla změřena aktivita PEPC při 340 nm. Závislost aktivity PEPC a absorbance při 280 nm na elučním objemu znázorňuje obrázek 16, str. 41.



Obr. 16: Separace PEPC ionexovou chromatografií na koloně DEAE-celulosy (objem kolony cca 15 ml). Závislost aktivity PEPC na elučním objemu – aktivita PEPC izolovaná z listů technického konopí (zeleně), ze semen merlíku (oranžově), hrachu (modře) a čočky (žlutě) je vynesena na hlavní ose vlevo. Závislost absorbance naměřené při 280 nm na elučním objemu je vynesena na vedlejší ose vpravo.

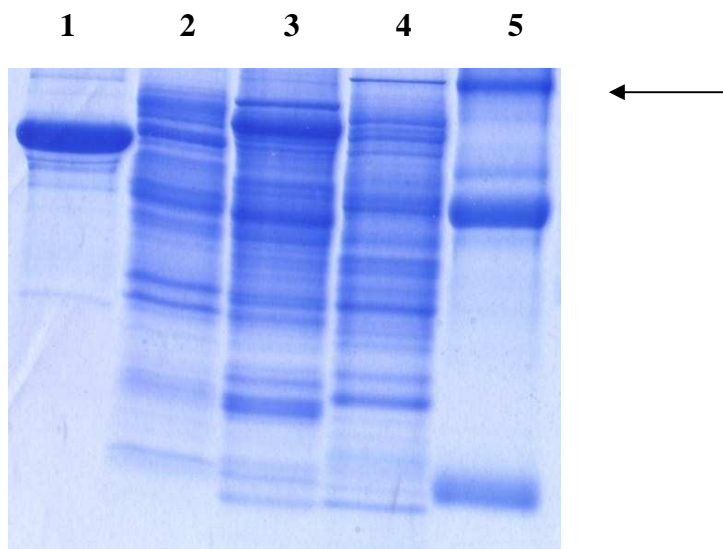
Průběh gelové separace byl sledován podobně jako u chromatografie ionexové – v jednotlivých frakcích byl také sledován obsah bílkovin měřením absorbance při 280 nm a ve všech frakcích byla také změřena aktivita PEPC. Průběh gelové chromatografie znázorňuje obrázek 17, str. 42.



Obř. 17: Separace PEPC gelovou chromatografií na koloně Sephacryl S 300. PEPC byla eluována puřem B. Závislost aktivity PEPC v jednotlivých frakcích na elučním objemu je znázorněna pro enzym izolovaný z listů technického konopí (zeleně), semen merlíku (oranřově), hrachu (modře) a čočky (řlutě). Hodnoty aktivity PEPC jsou vyneseny na hlavní ose vlevo. Závislost absorbance naměřené při 280 nm na elučním objemu je vynesena na vedlejší ose vpravo.

5.1.2. Detekce PEPC a její aktivity v polyakrylamidovém gelu

Pro detekci PEPC a její aktivity byla využita elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS a elektroforéza za nativních podmínek. Pro pokus byly použity vzorky merlíku, hrachu a čočky po gelové chromatografii. Obrázek 18 (str. 43) znázorňuje elektroforézu v přítomnosti SDS, kdy byla PEPC vizualizována barvicí lázní Coomassie Brilliant Blue G 250. Na obrázku 19 (str. 43) je zaznamenána detekce aktivity PEPC po nativní elektroforéze, která byla provedena kolorimetrickým stanovením produktu oxalacetátu v reakci s fast Violet B.



Obr. 18: Elektroforetická separace v přítomnosti SDS. Vzorky po gelové chromatografii. Dráha 1 - standard BSA ($M_r = 67\ 000$), 2 - PEPC izolovaná z listů technického konopí, dráha 3 - PEPC izolovaná ze semen merlíku, dráha 4 - PEPC izolovaná ze semen čočky, dráha 5 - PEPC izolovaná ze semen hrachu.



Obr. 19: Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek. Vzorky po gelové chromatografii. Dráha 1 – PEPC izolovaná z merlíku, dráha 2 – PEPC izolovaná z hrachu, dráha 3 – PEPC izolovaná z technického konopí.

5.2. Charakteristika PEPC

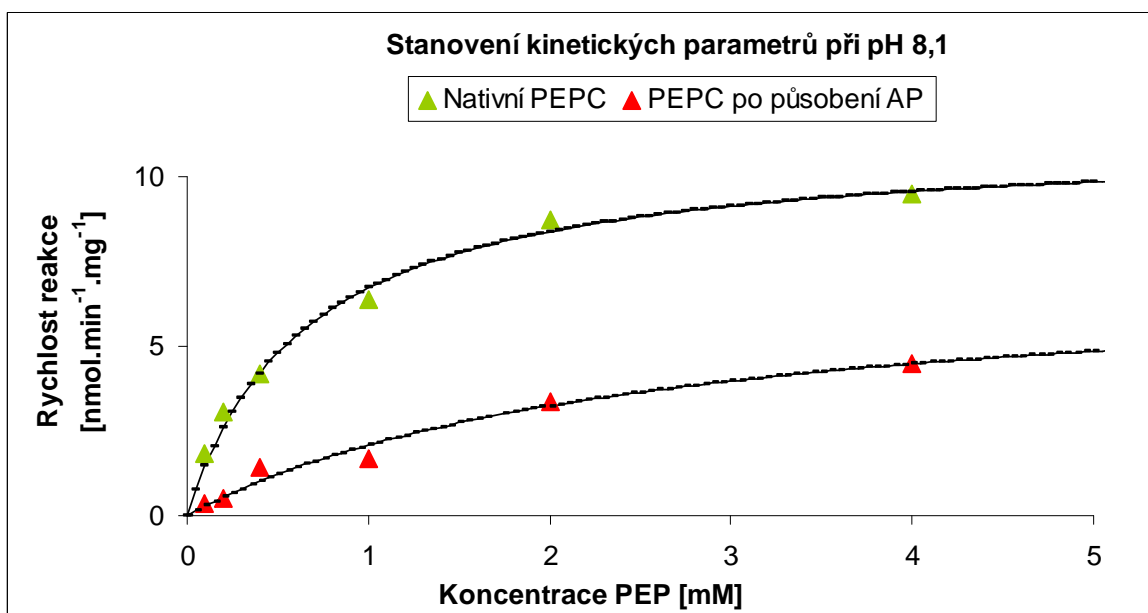
5.2.1. Charakteristika PEPC izolované z listů technického konopí

5.2.1.1. Stanovení kinetických parametrů

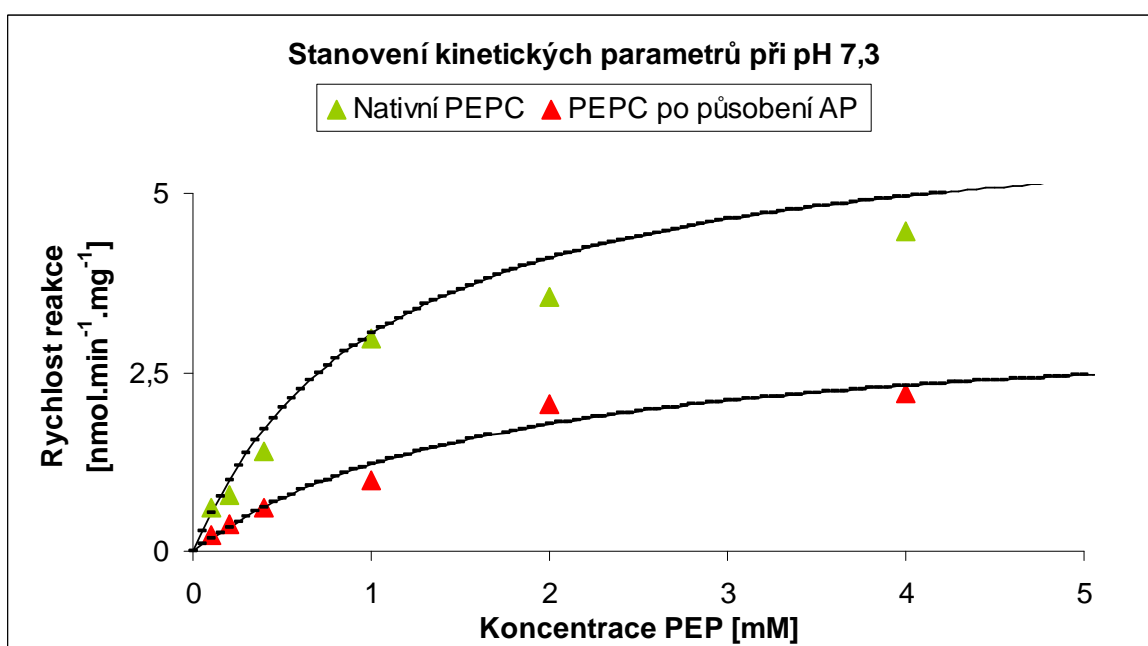
Pro určení kinetických parametrů byla změřena rychlost reakce katalyzované PEPC, která byla izolována z listů technického konopí po gelové chromatografii. Měření bylo provedeno při pH optimu 8,1 a pH 7,3, které koresponduje s fyziologickými podmínkami, v reakční směsi pro 6 koncentrací substrátu PEP (0,1 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 1 mM; 2 mM; 4 mM PEP) a ve dvou paralelních pokusech. Maximální reakční rychlost a Michaelisova konstanta byly vypočteny nelineární regresí v programu MS Excel. Současně byly kinetické konstanty stanoveny pro PEPC, která byla inkubována s alkalickou fosfatase, která je schopna PEPC defosforylovat. Fosforylovaná forma PEPC má často odlišné kinetické parametry než PEPC defosforylovaná (oddíl 1.1.6.).

Inkubace byla provedena po dobu 1 hodiny v přítomnosti inhibitorů rostlinných proteas a při laboratorní teplotě.

Následující obrázky ukazují závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu a stanovení kinetických konstant pro PEPC izolovanou z listů naměřené při pH 8,1 (obr. 20, str. 45) a pH 7,3 (obr. 21, str. 45) a také srovnání nativní formy PEPC a PEPC po působení alkalické fosfatasy.



Obr. 20: Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP. Stanovení kinetických konstant PEPC izolované z technického konopí. Měření při pH 8,1. Srovnání PEPC po působení AP (červeně) a nativní formy (zeleně).



Obr. 21: Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP. Stanovení kinetických konstant PEPC izolované z technického konopí. Měření při pH 7,3. Srovnání PEPC po působení AP (červeně) a nativní formy (zeleně).

Kinetické parametry stanovené při pH 8,1 u nativní formy PEPC a PEPC po působení alkalické fosfatasy (AP) shrnuje tabulka 2.

	pH 8,1	
	K _m [mM]	V _{lim} [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]
PEPC nativní forma	0,66	11,1
PEPC po působení AP	2,47	7,3

Tabulka 2: Stanovení kinetických parametrů PEPC izolované z listů technického konopí u nativní formy a PEPC po působení AP při pH 8,1.

Maximální reakční rychlost stanovená pro PEPC po působení AP byla přibližně o čtvrtinu nižší, než u nativní formy PEPC. Zjištěná hodnota K_m byla téměř 4x vyšší pro PEPC po působení AP.

Kinetické parametry PEPC byly zjištěny i pro pH 7,3, a to u nativní formy PEPC i u PEPC po působení AP. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

	pH 7,3	
	K _m [mM]	V _{lim} [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]
PEPC nativní forma	1,07	6,6
PEPC po působení AP	1,73	3,3

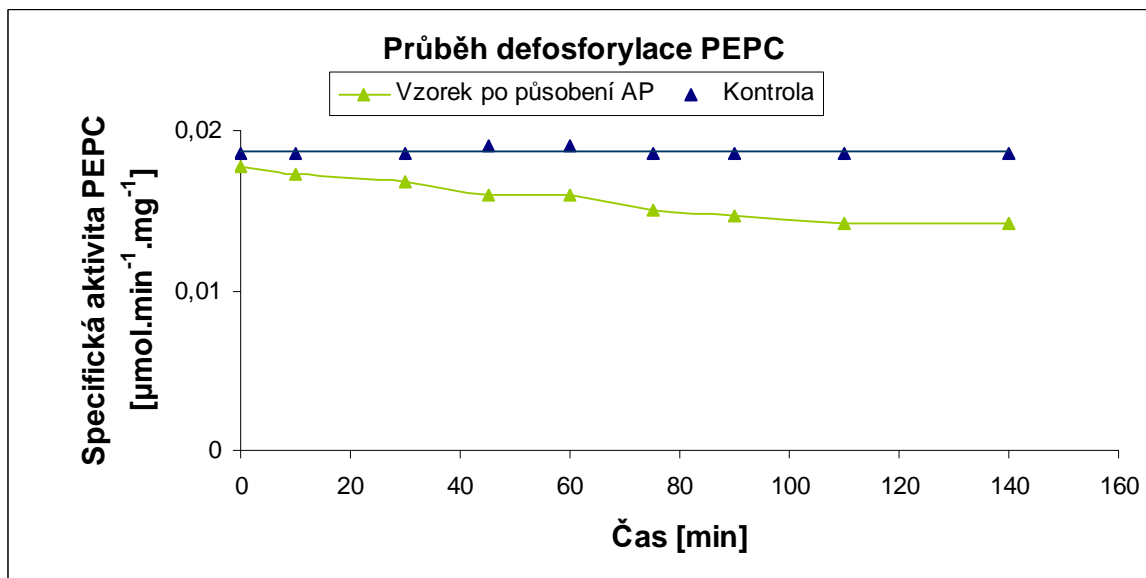
Tabulka 3: Stanovení kinetických parametrů PEPC izolované z listů technického konopí u nativní formy a PEPC po působení AP při pH 7,3.

Hodnota maximální reakční rychlosti pro PEPC po působení AP byla poloviční, než hodnota zjištěná pro nativní formu PEPC. Avšak zvýšení konstanty K_m nebylo v tomto případě tak výrazné, ve srovnání s měřením při pH 8,1.

5.2.1.2. Časový průběh defosforylace

V tomto pokusu byl sledován vliv alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC izolované z listů technického konopí. PEPC byla inkubována s alkalickou fosfatou (AP) při laboratorní teplotě a v jednotlivých časových intervalech (po 0, 10, 30, 45, 60, 75, 90, 110 a 140 minutách) byla změřena aktivita PEPC (podle odstavce 4.3.1.). Z obrázku 22 (str. 47), který zobrazuje průběh defosforylace PEPC, je patrné, že

s rostoucím časem se aktivita PEPC ve vzorku s AP postupně snižovala. Hodnota aktivity kontrolního vzorku bez přídavku alkalické fosfatasy byla po celou dobu měření téměř konstantní.



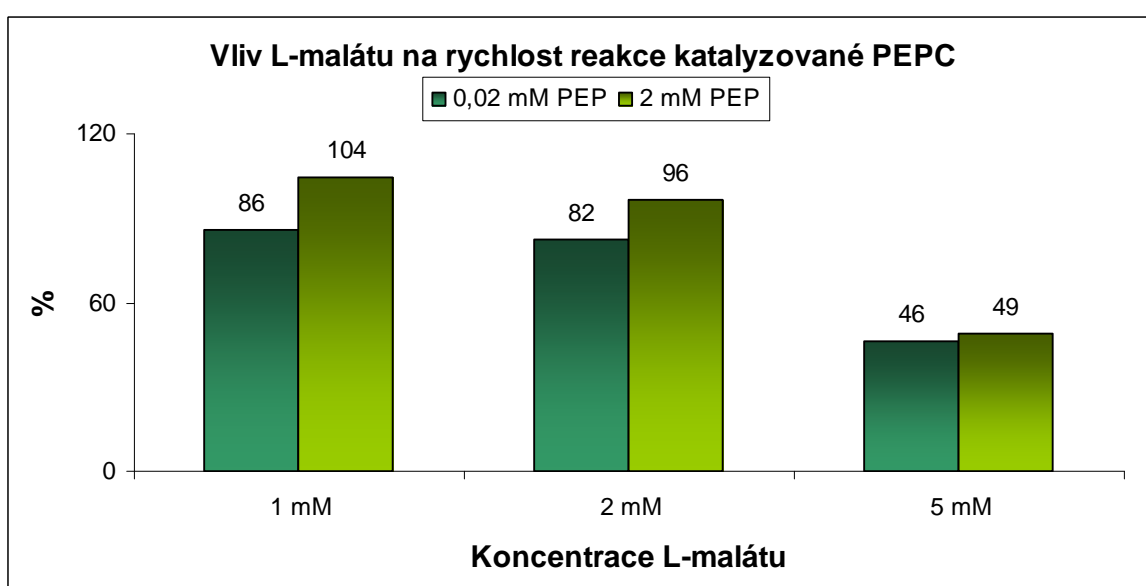
Obr. 22: Průběh defosforylace PEPC izolované z listů technického konopí. Závislost specifické aktivity PEPC na čase. Modře je znázorněna kontrola bez přídavku alkalické fosfatasy, zeleně vzorek PEPC po působení alkalické fosfatasy.

5.2.1.3. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC

Pro studium vlivu alosterických modulátorů na rychlost reakce katalyzované PEPC byly vybrány dvě látky. L-malát, který má inhibiční účinek na aktivitu PEPC a glukosa-6-fosfát, která působí jako aktivátor. Následující obrázky znázorňují nejprve vliv L-malátu na PEPC izolovanou z listů technického konopí, následně je uveden graf zobrazující vliv aktivátoru glukosa-6-fosfátu. Měření bylo provedeno ve dvou sadách vzorků a výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá aktivitě PEPC, která byla naměřena bez přídavku inhibitoru, či aktivátoru.

K měření byla využita reakční směs viz. 4.3.1. za použití pufru Tris-HCl o pH 7,3; při saturační (2 mM) a subsaturační (0,2 mM) koncentraci substrátu PEP. Koncentrace jednotlivých efektorů byla 1 mM; 2 mM a 5 mM.

Pro PEPC izolovanou z listů technického konopí je vliv L-malátu na rychlost reakce znázorněn na obrázku 23. Jak se dalo předpokládat, nejvýraznější byla inhibice 5 mM L-malátem, kdy hodnoty klesly přibližně na polovinu, a to při subsaturační (0,2 mM) i saturační koncentraci (2 mM) substrátu PEP, a to ve srovnání s kontrolami bez přídavku L-malátu. Vliv 1 mM a 2 mM L-malátu byl malý, naměřené hodnoty klesly těsně pod hodnoty naměřené pro kontrolní vzorky bez přídavku L-malátu. Rozdíl v inhibici při subsaturační (0,2 mM) a saturační koncentraci (2 mM) substrátu PEP pak není příliš patrný ani u jedné z použitých koncentrací L-malátu.

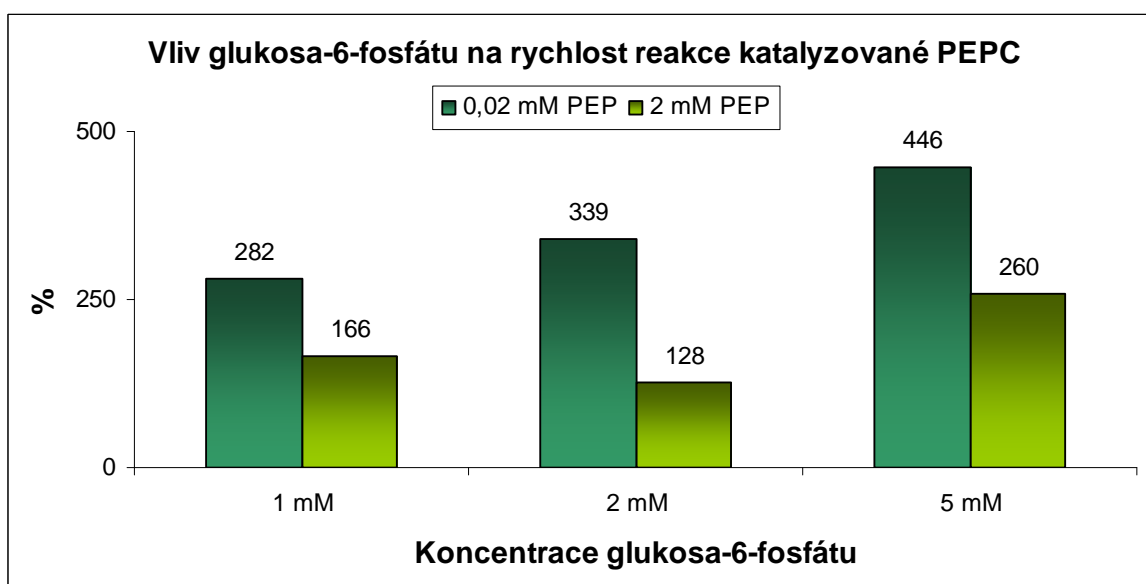


Obr. 23: Vliv L-malátu na rychlost reakce katalyzované PEPC, která byla izolována z listů technického konopí. Sloupec vlevo znázorňuje měření při subsaturační koncentraci substrátu PEP, pravý sloupec hodnoty naměřené při saturační koncentraci. Výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá kontrolnímu měření bez přídavku L-malátu.

Vliv aktivátoru glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC izolované z listů technického konopí je znázorněn na obrázku 24 (str. 49). Byl potvrzen předpoklad nejvýznamnější aktivace 5 mM glukosa-6-fosfátem, kdy byla naměřená hodnota rychlosti reakce skoro 4,5x vyšší, než u kontroly bez přídavku aktivátoru, a to při subsaturační (0,2 mM) koncentraci substrátu PEP. Pro saturační koncentraci (2 mM) substrátu PEP byla zaznamenána hodnota přibližně 2,5x vyšší ve srovnání

s kontrolou bez aktivátoru. Výrazný vliv na aktivaci PEPC izolovanou z listů technického konopí byl zjištěn i pro ostatní koncentrace aktivátoru (1 mM a 2 mM glukosa-6-fosfát). Hodnoty pro rychlost reakce katalyzované PEPC zjištěné při subsaturační koncentraci substrátu se pohybovaly okolo 300% ve srovnání s kontrolními měřeními bez přídavku glukosa-6-fosfátu. Pro saturační koncentraci PEP se rychlost reakce zvýšila přibližně o polovinu, také ve srovnání s kontrolními měřeními.

Při porovnání hodnot naměřených za subsaturační a saturační koncentrace substrátu jsou patrné poměrně významné rozdíly u všech koncentrací glukosa-6-fosfátu.

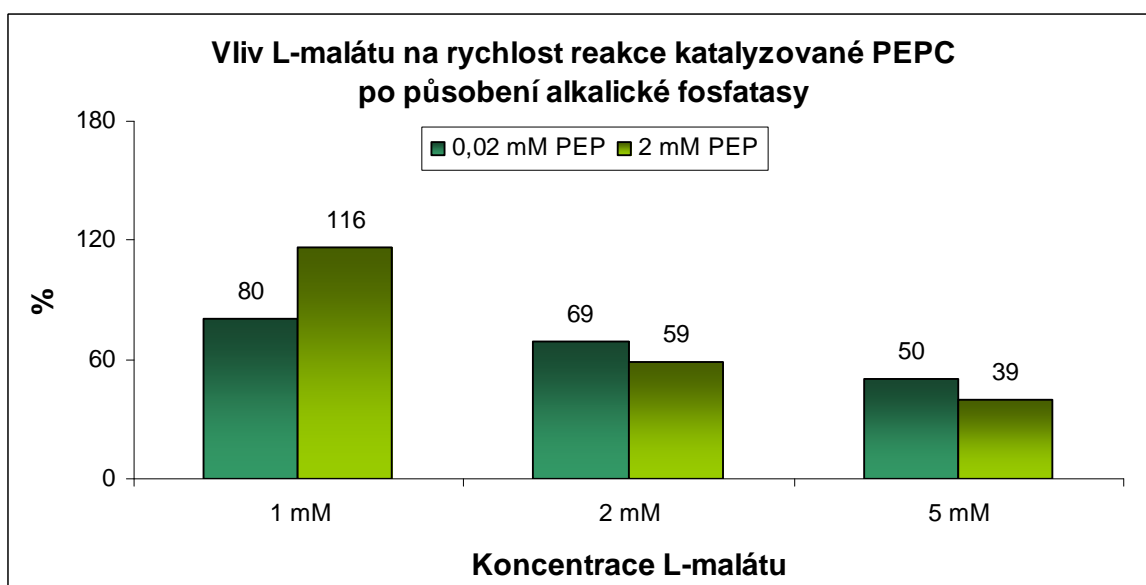


Obr. 24: Vliv glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC, jež byla izolována z listů technického konopí. Sloupec vlevo znázorňuje měření při subsaturační koncentraci substrátu PEP, pravý sloupec hodnoty naměřené při saturační koncentraci. Výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá kontrolnímu měření bez přídavku aktivátoru glukosa-6-fosfátu.

Vliv alosterických modulátorů byl sledován i pro PEPC izolovanou z listů technického konopí, která byla vystavena působení alkalické fosfatasy. Inkubace byla provedena po dobu 1 hodiny v přítomnosti inhibitorů rostlinných proteas a při laboratorní teplotě.

Vliv L-malátu na rychlost reakce katalyzované PEPC z listů technického konopí, která byla vystavena působení AP je zaznamenán na obrázku 25.

Nejvýraznější byla inhibice 5 mM L-malátem a to v případě subsaturační i saturační koncentraci PEP. Rozdíl v inhibici při subsaturační (0,2 mM) a saturační koncentraci (2 mM) substrátu PEP pak není u 2 mM a 5 mM koncentrace L-malátu příliš patrný. V případě 1 mM L-malátu byl pozorován při saturační koncentraci PEP dokonce opačný efekt. Celkově jsou hodnoty naměřené pro PEPC izolovanou z technického konopí po působení AP nižší, než u měření s nativní formou PEPC (obr. 23, str. 48).

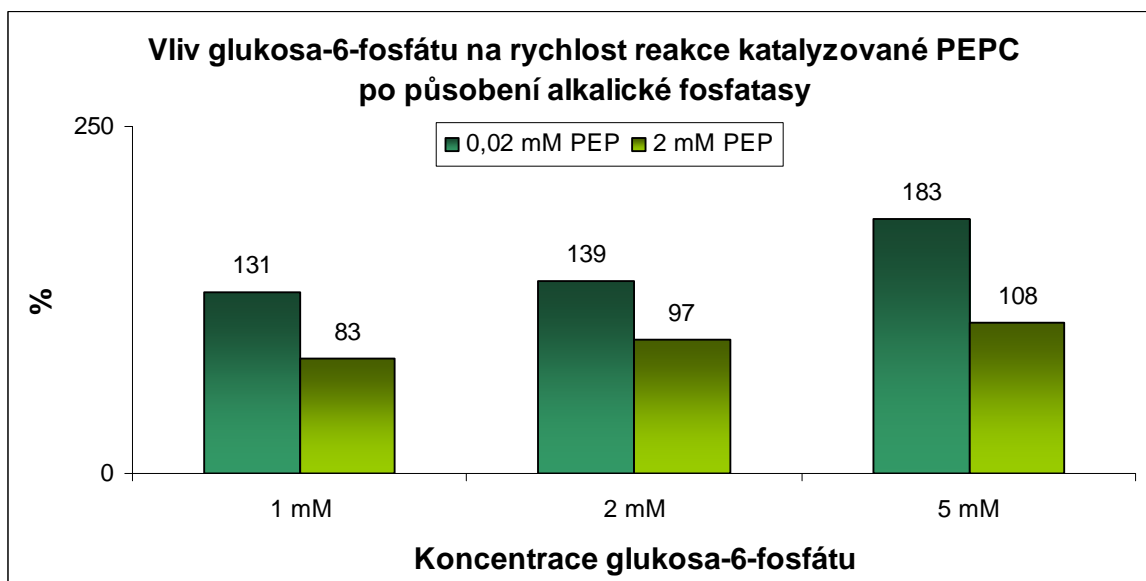


Obr. 25: Vliv L-malátu na rychlost reakce katalyzované PEPC, která byla izolována z listů technického konopí a vystavena působení alkalické fosfatasy. Sloupec vlevo znázorňuje měření při subsaturační koncentraci substrátu PEP, pravý sloupec hodnoty naměřené při saturační koncentraci. Výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá kontrolnímu měření bez přídavku L-malátu.

Vliv aktivátoru glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC izolované z listů technického konopí, která byla inkubována s AP, je znázorněn na obrázku 26 (str. 51). Byl potvrzen předpoklad nejvýznamnější aktivace 5 mM glukosa-6-fosfátem, a to při subsaturační (0,2 mM) koncentraci PEPu. Při saturační koncentraci byla také

zaznamenána aktivace, ale jen velmi slabá, ve srovnání s kontrolami bez přídavku glukosa-6-fosfátu.

V případě 1 mM a 2 mM koncentrace glukosa-6-fosfátu byla zaznamenána mírná aktivace jen při subsaturační koncentraci substrátu. I v tomto případě jsou celkově hodnoty naměřené pro PEPC izolovanou z technického konopí po působení AP nižší, než u měření s nativní formou PEPC (obr. 24, str. 49).

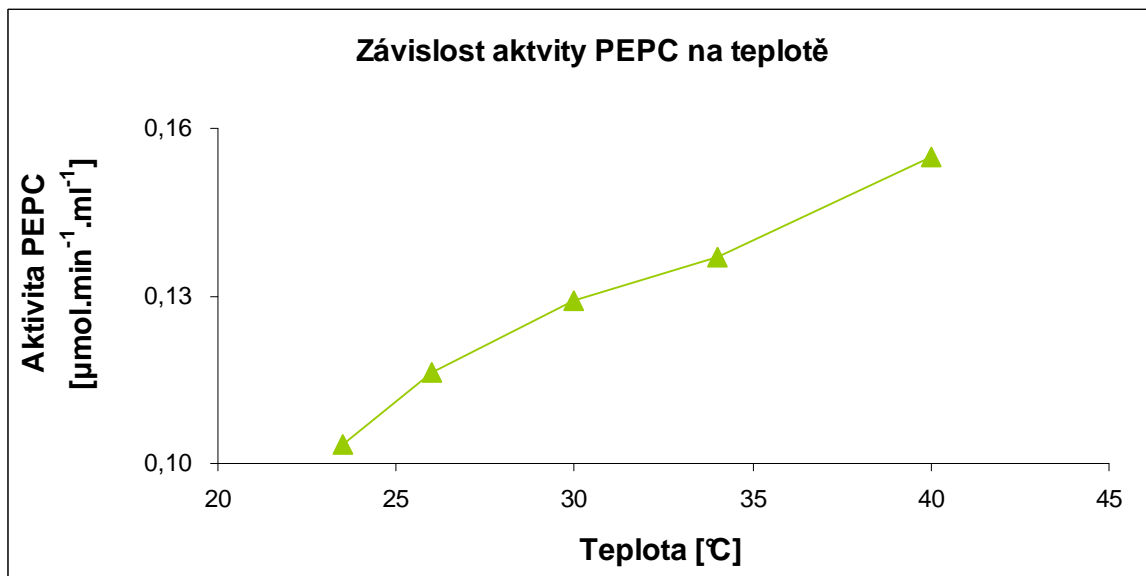


Obr. 26: Vliv glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC izolované z listů technického konopí, která byla vystavena působení alkalické fosfatasy. Sloupec vlevo znázorňuje měření při subsaturační koncentraci substrátu PEP, pravý sloupec hodnoty naměřené při saturační koncentraci. Výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá kontrolnímu měření bez přídavku aktivátoru glukosa-6-fosfátu.

5.2.1.4. Vliv teploty na aktivitu PEPC

V pokusu byl sledován vliv teploty na aktivitu PEPC izolovanou z listů technického konopí. Měření bylo provedeno ve dvou sadách v reakční směsi podle odstavce 4.4.1.. Reakční směs byla při dané teplotě (26°C, 30°C, 34°C a 40°C) inkubována po dobu 5 minut. Současně bylo provedeno měření při teplotě laboratorní.

V případě PEPC izolované z listů technického konopí stoupala aktivita v celém rozsahu použitých teplot. Průběh závislosti aktivity PEPC na dané teplotě zobrazuje obrázek 27 a je z něj patrná téměř lineární závislost.

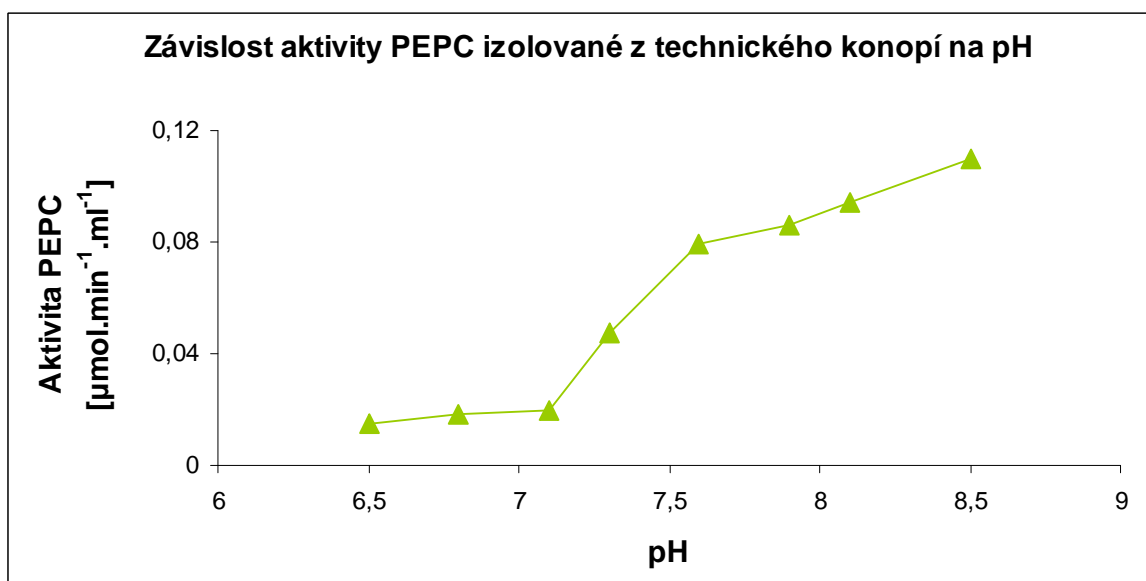


Obr. 27: Závislost aktivity PEPC izolované z listů technického konopí na teplotě.

5.2.1.5. Vliv pH na aktivitu PEPC

Závislost aktivity PEPC na pH byla proměřena podle postupu popsaném v odstavci 4.4.1., jako pufr byl využit Tris-HCl pufr a škála pH se pohybovala od pH=6,5; přes pH=6,8; 7,1; 7,3; 7,6 a 7,9 až k pH=8,1 a 8,5.

Na obrázku 28 (str. 53) je zobrazen výsledný graf závislosti aktivity PEPC izolované z listů technického konopí na daném pH. Z grafu je patrné, že až do pH=7,1 byla hodnota aktivity velmi nízká. Ke skokové změně došlo v případě použití Tris-HCl pufru o pH=7,3. Naměřená hodnota aktivity byla přibližně dvojnásobná, než při pH=7,1. Postupně se hodnoty aktivity PEPC zvyšovaly až do pH=8,5.



Obr. 28: Závislost aktivity PEPC izolované z listů technického konopí na pH použitého pufru.

5.2.2. Charakteristika PEPC izolované ze semen merlíku chilského

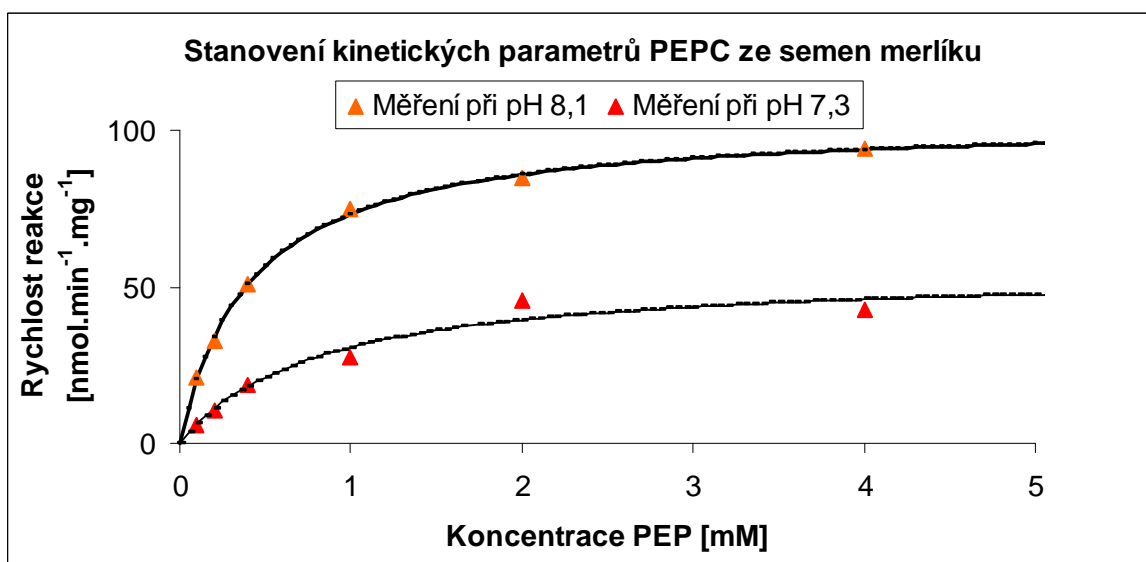
5.2.2.1. Stanovení kinetických parametrů

Pro určení kinetických parametrů PEPC izolované ze semen merlíku byla použita PEPC načištěná ionexovou a gelovou chromatografií. Měření bylo provedeno opět při pH optimu 8,1 a pH 7,3; obdobně jako pro PEPC izolovanou z listů technického konopí (odstavec 5.2.1.1).

V případě semen nebyla PEPC vystavena působení alkalické fosfatasy, jelikož časový průběh defosforylace (odstavec 5.2.2.2.) prokázal, že působení alkalické fosfatasy nevyvolalo téměř žádné změny v aktivitě PEPC (obr. 29, str. 54).

Pro PEPC izolovanou ze semen merlíku byly stanoveny hodnoty $V_{\text{lim}} = 103,5 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ a $K_m = 0,41 \text{ mM}$ při pH 8,1. Při pH 7,3 byly získány hodnoty $V_{\text{lim}} = 55,1 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ a $K_m = 0,80 \text{ mM}$.

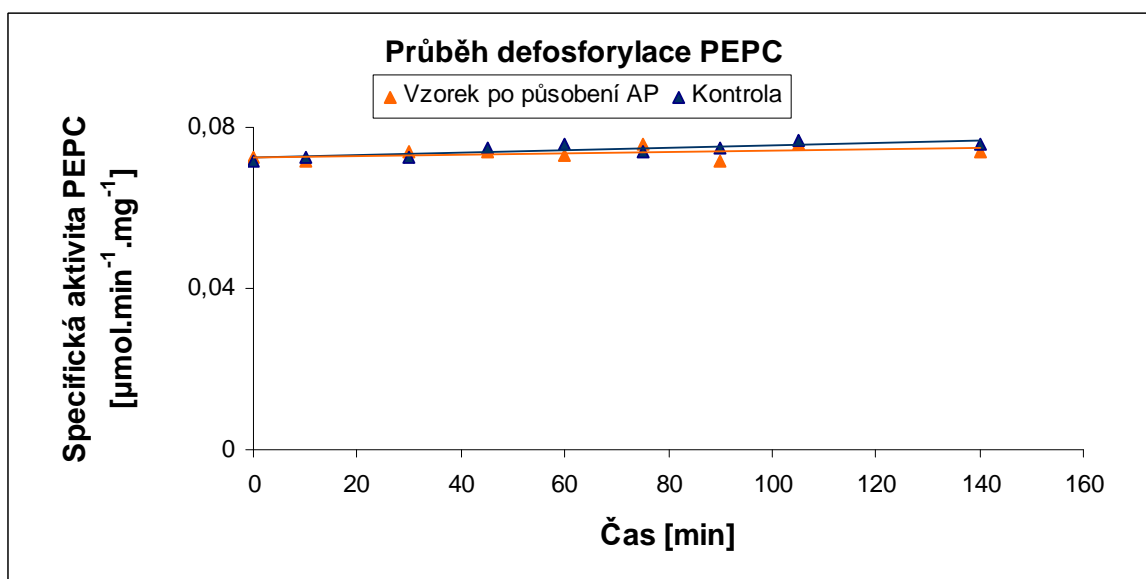
Hodnota V_{lim} zjištěná při pH 8,1 je téměř dvojnásobná, hodnota K_m poloviční, oproti pokusu provedeném při pH 7,3.



Obr. 29: Závislost rychlosti reakce katalyzované PEPC, která byla izolována ze semen merlíku na koncentraci substrátu PEP. Oranžově je znázorněno měření při pH 8,1 a červeně měření při pH 7,3.

5.2.2.2. Časový průběh defosforylace

Časový průběh vlivu alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC byl sledován také pro PEPC izolovanou ze semen merlíku. Pokus byl proveden obdobně jako při měření s PEPC izolovanou z listů technického konopí. PEPC byla opět inkubována s alkalickou fosfatasou při laboratorní teplotě a v jednotlivých časových intervalech (po 0, 10, 30, 45, 60, 75, 90, 110 a 140 minutách) byla změřena aktivita PEPC (podle odstavce 4.3.1.). Časový průběh defosforylace PEPC izolované ze semen merlíku je znázorněn na obrázku 30 (str. 55). Z obrázku je patrné, že po působení alkalické fosfatasy nedošlo v případě PEPC izolované ze semen merlíku k téměř žádným změnám.



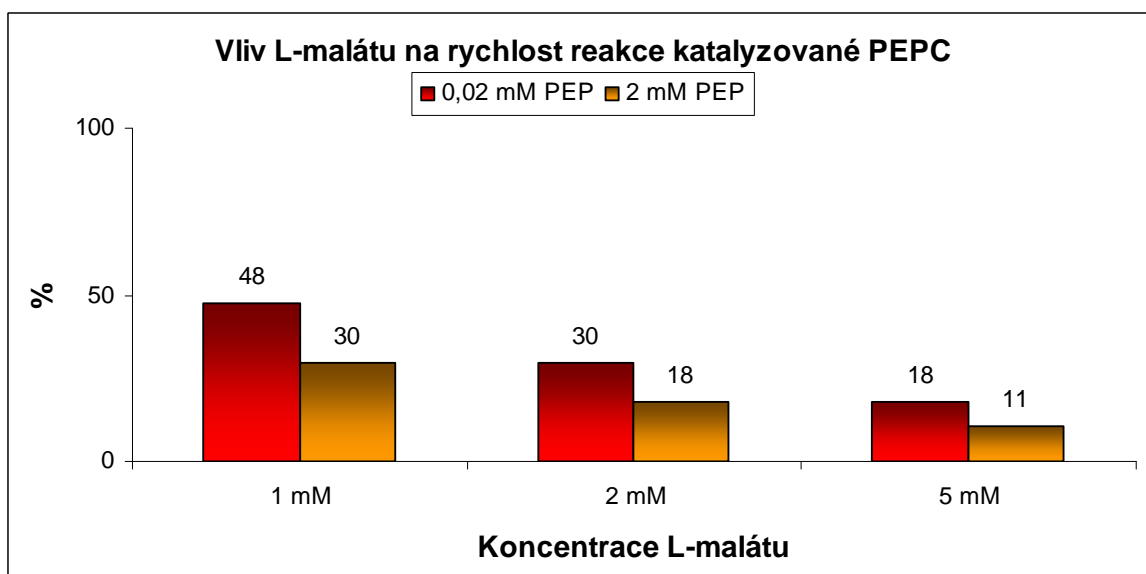
Obr. 30: Průběh defosforylace PEPC izolované ze semen merlíku. Závislost specifické aktivity PEPC na čase. Modře je znázorněna kontrola bez přidavku alkalické fosfatasy, oranžově vzorek PEPC po působení alkalické fosfatasy.

5.2.2.3. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC

Vliv alosterických modulátorů byl sledován pro PEPC izolovanou ze semen merlíku stejně jako pro PEPC izolovanou z listů technického konopí (dle odstavce 5.2.1.3.). Sledován byl vliv inhibitoru L-malátu a aktivátoru glukosa-6-fosfátu o koncentracích 1 mM; 2 mM a 5 mM. Měření bylo provedeno ve dvou sadách vzorků a výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá aktivitě PEPC, která byla naměřena bez přidavku inhibitoru, či aktivátoru.

Obrázek 31 (str. 56) zobrazuje vliv L-malátu na rychlost reakce katalyzované PEPC, která byla izolována ze semen merlíku. Opět je patrné, že nejvýraznější inhibiční účinek měl 5 mM L-malát. Hodnota naměřená při subsaturační koncentraci substrátu PEP klesla na 18%, hodnota naměřená se saturační koncentrací PEP dokonce až na 11%. Pro ostatní dvě koncentrace L-malátu byl inhibiční vliv také velmi zřetelný. Hodnoty reakční rychlosti pro PEPC zaznamenané při 1 mM a 2 mM koncentraci L-malátu se pohybovaly pod 50% hodnot, které byly naměřeny pro kontrolní vzorky bez přidavku L-malátu. U všech tří použitých koncentrací L-malátu není patrný příliš

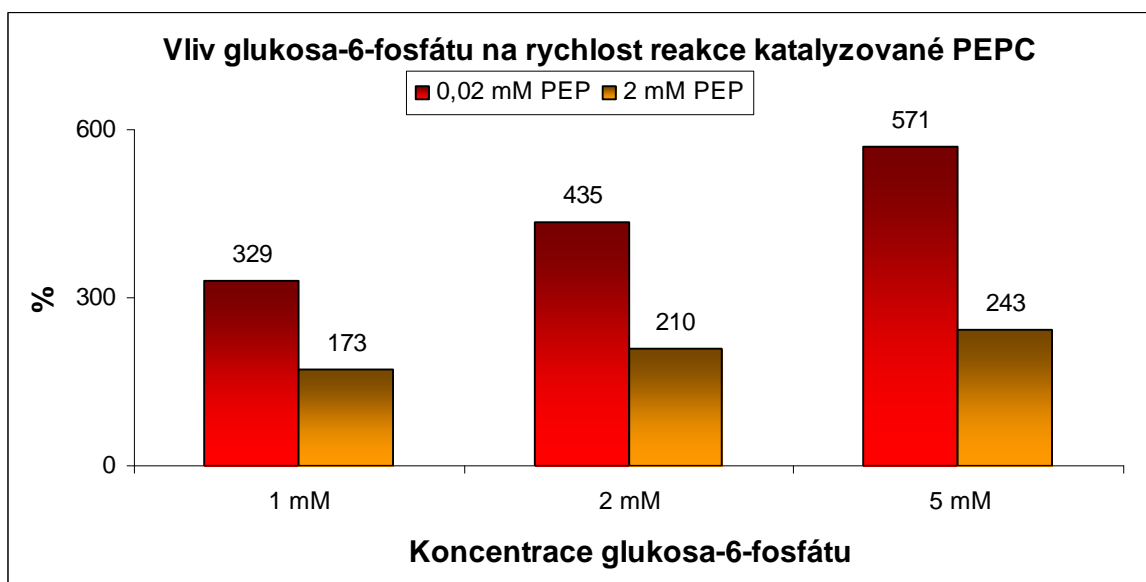
významný rozdíl pro hodnoty naměřené při subsaturaci (0,2 mM PEP) a saturaci (2 mM PEP).



Obr. 31: Vliv L-malátu na rychlost reakce katalyzované PEPC. PEPC byla izolována ze semen merlíku chilského. Sloupec vlevo znázorňuje měření při subsaturační koncentraci substrátu PEP, pravý sloupec hodnoty naměřené při saturační koncentraci. Výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá kontrolnímu měření bez přídavku aktivátoru glukosa-6-fosfátu.

Působení aktivátoru glukosa-6-fosfátu na reakční rychlost pro PEPC izolovanou ze semen merlíku znázorňuje obrázek 32 (str. 57). Nejvýznamnější vliv na aktivaci PEPC byl opět nalezen pro 5 mM koncentraci glukosa-6-fosfátu. Zjištěná hodnota byla v tomto případě téměř šestinásobná, než hodnota změřená pro kontrolu bez přídavku aktivátoru, a to při subsaturační (0,2 mM) koncentraci substrátu PEP. Pro saturační koncentraci (2 mM) substrátu PEP byla zaznamenána hodnota přibližně 2,5x vyšší ve srovnání s kontrolou bez aktivátoru. Velmi výrazný vliv na aktivaci PEPC ze semen merlíku byl zjištěn i pro 1 mM a 2 mM koncentraci glukosa-6-fosfátu. Při subsaturační koncentraci substrátu se hodnota pohybovala okolo 300% pro 1 mM glukosa-6-fosfát, v případě 2 mM koncentrace kolem 400%, v porovnání s kontrolními měřeními. Pro saturační koncentraci PEP byla zaznamenána přibližně dvojnásobná hodnota, také

ve srovnání s kontrolními měřeními, a to pro obě koncentrace (1 mM i 2 mM glukosa-6-fosfát). Při porovnání jednotlivých hodnot naměřených za subsaturační a saturační koncentrace substrátu jsou patrné významné rozdíly u všech koncentrací glukosa-6-fosfátu. Nejvýraznější rozdíl byl však zjištěn pro 5 mM koncentraci aktivátoru.



Obr. 32: Vliv glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC, která byla izolována ze semen merlíku. Sloupec vlevo znázorňuje měření při subsaturační koncentraci substrátu PEP, pravý sloupec hodnoty naměřené při saturační koncentraci. Výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá kontrolnímu měření bez přídavku aktivátoru glukosa-6-fosfátu.

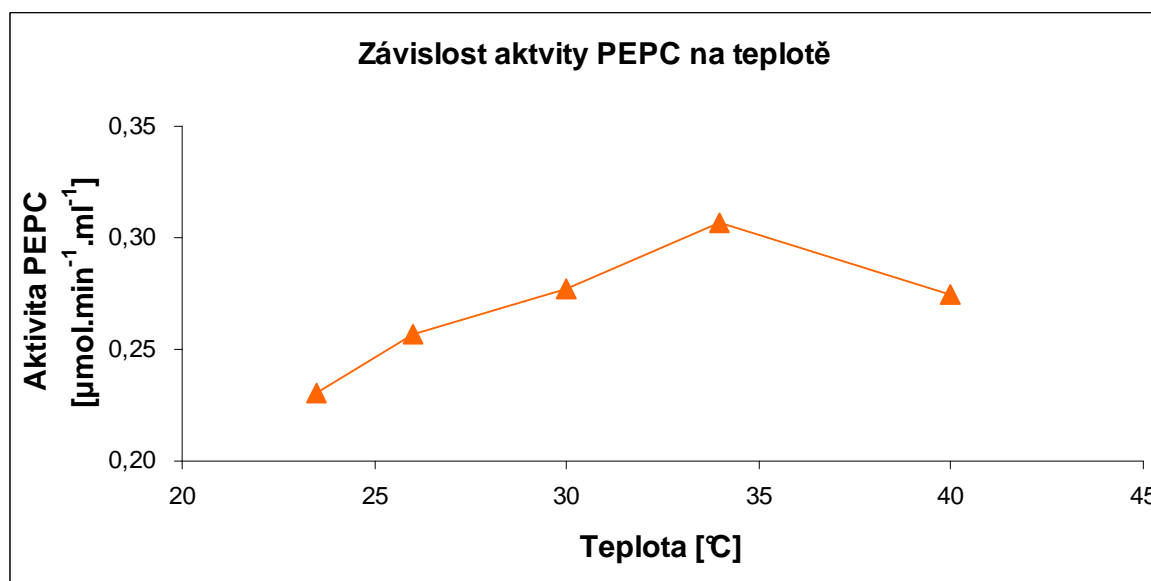
5.2.2.4. Vliv teploty na aktivitu PEPC

Vliv teploty na aktivitu PEPC izolovanou ze semen merlíku byl sledován podobně jako u PEPC izolované z listů technického konopí. Měření bylo provedeno ve dvou sadách v reakční směsi podle odstavce 4.4.1..

Reakční směs byla při dané teplotě (26°C, 30°C, 34°C a 40°C) inkubována po dobu 5 minut. Současně bylo provedeno měření při teplotě laboratorní.

Obrázek 33 (str. 58) znázorňuje souvislost teploty s aktivitou PEPC izolovanou ze semen merlíku. Až do teploty 34°C je patrné zvyšování aktivity PEPC s rostoucí

teplotou, avšak při teplotě 40°C byl zaznamenán pokles aktivity na hodnotu srovnatelnou s aktivitou naměřenou při 30°C.

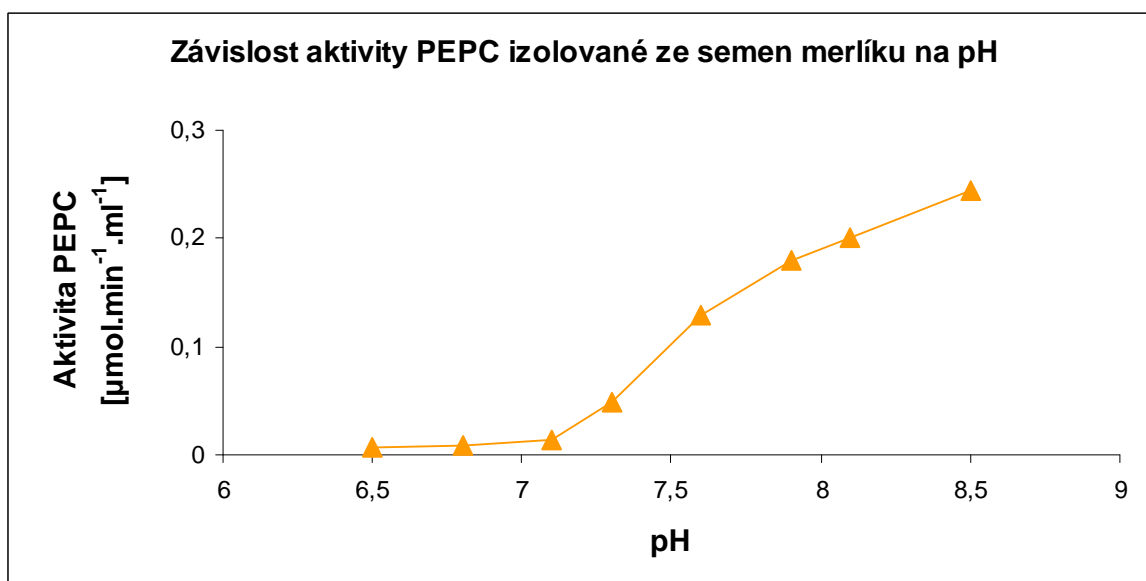


Obr. 33: Závislost aktivity PEPC izolované ze semen merlíku na teplotě.

5.2.2.5. Vliv pH na aktivitu PEPC

Stanovení závislosti aktivity PEPC izolované ze semen merlíku na pH bylo provedeno obdobně jako pro PEPC izolovanou z listů technického konopí (odstavec 5.2.1.5).

Na obrázku 34 (str. 59) je zobrazen výsledný graf závislosti aktivity PEPC izolované ze semen merlíku na daném pH. Z grafu je patrné, že až do pH=7,1 byla hodnota aktivity velmi nízká. Ke skokové změně došlo v případě použití Tris-HCl pufru o pH=7,3. Pro PEPC izolovanou ze semen merlíku byla naměřena při pH=7,3 skoro čtyřnásobná hodnota aktivity. Postupně se hodnoty aktivity PEPC zvyšovaly až do pH=8,5.



Obr. 34: Závislost aktivity PEPC izolované ze semen merlíku na pH použitého pufru.

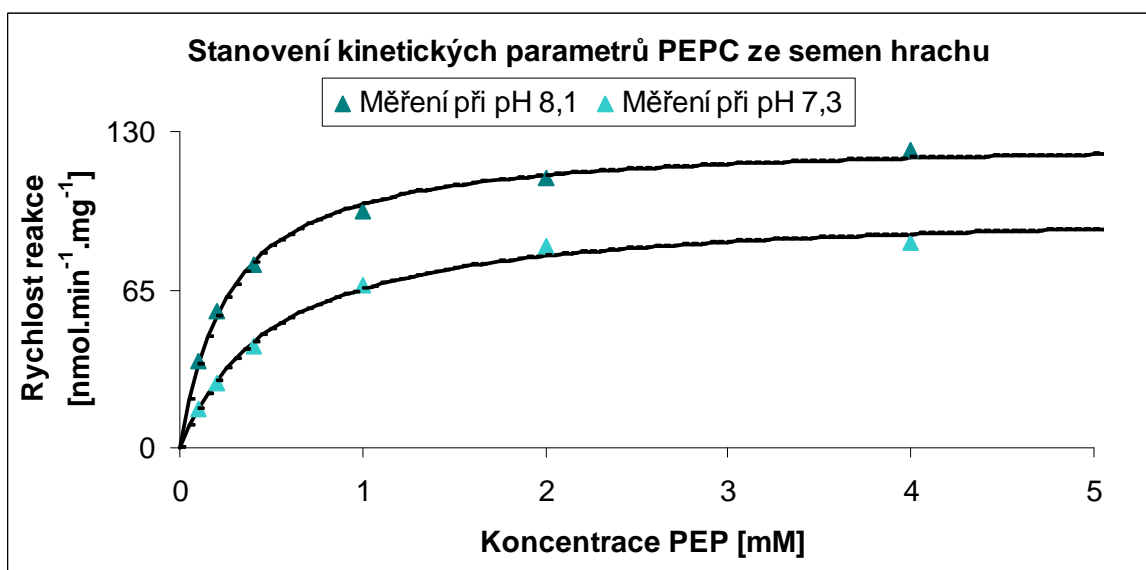
5.2.3. Charakteristika PEPC izolované ze semen hrachu setého

5.2.3.1. Stanovení kinetických parametrů

Stanovení maximální reakční rychlosti a konstanty K_m pro PEPC izolovanou ze semen hrachu bylo provedeno stejně jako v pokusu s PEPC izolovanou ze semen merlíku chilského (odstavec 5.2.2.1).

Obrázek 35 (str. 60) znázorňuje závislost aktivity PEPC izolované ze semen hrachu na koncentraci substrátu PEP. Pro pH 8,1 byly stanoveny hodnoty $V_{\text{lim}} = 127 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ a $K_m = 0,27 \text{ mM}$. Při pH 7,3 byly získány hodnoty $V_{\text{lim}} = 99 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ a $K_m = 0,52 \text{ mM}$.

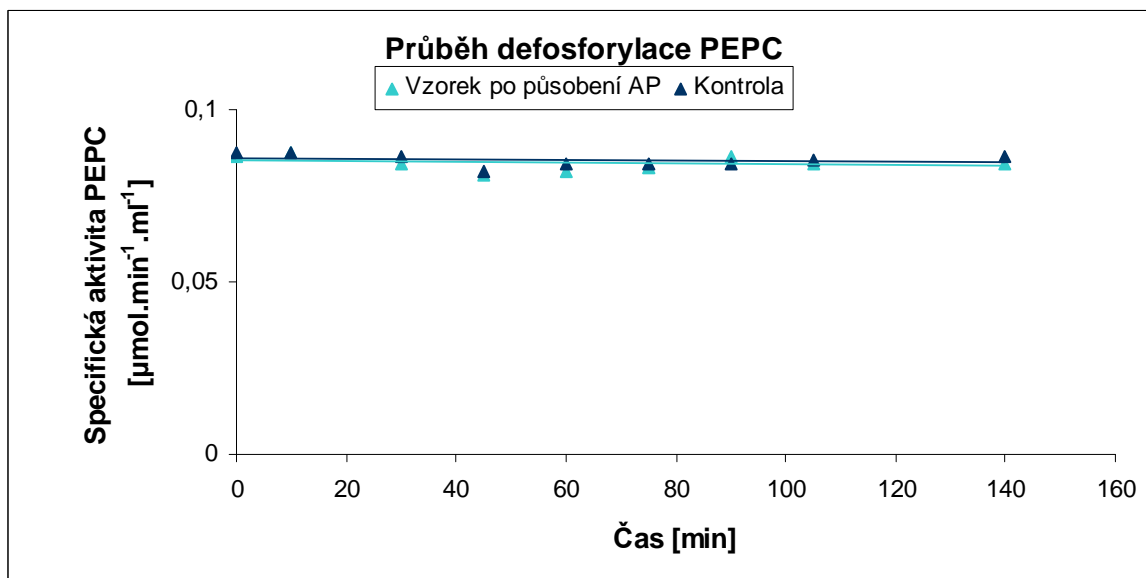
Hodnota maximální reakční rychlosti pro pH 8,1 je opět o něco vyšší než při pH 7,3, ale rozdíl není tolik výrazný. Konstanta K_m stanovená při pH 7,3 je skoro dvojnásobná v porovnání s konstantou stanovenou při pH 8,1.



Obr. 35: Závislost rychlosti reakce katalyzované PEPC izolované ze semen hrachu na koncentraci substrátu PEP. Tmavě modrá barva znázorňuje měření při pH 8,1 a světle modře je znázorněno měření při pH 7,3.

5.2.3.2. Časový průběh defosforylace

Vliv alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC byl sledován i pro vzorek PEPC izolovaný ze semen hrachu. Měření bylo provedeno stejně jako v pokusu s PEP izolovanou z listů technického konopí a semen merlíku. Časový průběh defosforylace PEPC izolované ze semen hrachu je znázorněn na obrázku 36 (str. 61). Z obrázku je patrné, že po působení alkalické fosfatasy nedošlo ani v případě PEPC izolované ze semen hrachu k výraznějším změnám.



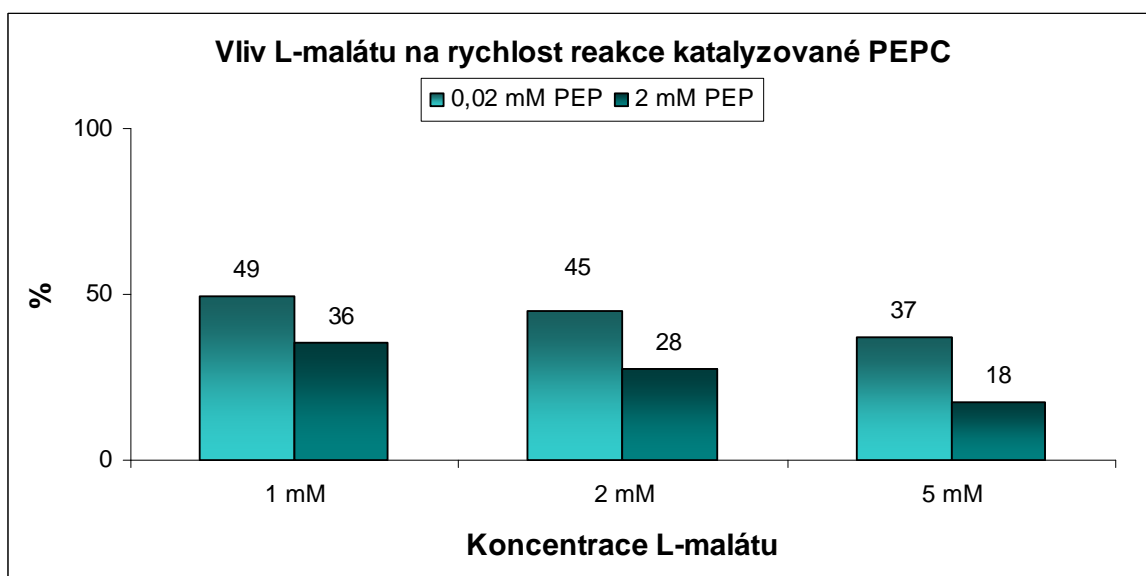
Obr. 36: Průběh defosforylace PEPC izolované ze semen hrachu. Závislost specifické aktivity PEPC na čase. Tmavě modře je znázorněna kontrola bez přidavku alkalické fosfatasy, světle modře vzorek PEPC po působení alkalické fosfatasy.

5.2.3.3. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC

Působení inhibitoru L-malátu a aktivátoru glukosa-6-fosfátu na reakční rychlost pro PEPC izolovanou ze semen hrachu setého bylo sledováno způsobem, který odpovídal pokusu s PEPC z listů technického konopí i semen merlíku. Opět byly využity tři koncentrace efektorů 1 mM; 2 mM a 5 mM. Měření bylo provedeno paralelně pro dvě sady vzorků, výsledky jsou uvedeny také v %, kdy 100% odpovídá reakční rychlosti, která byla naměřena zcela bez přidavku modulátoru.

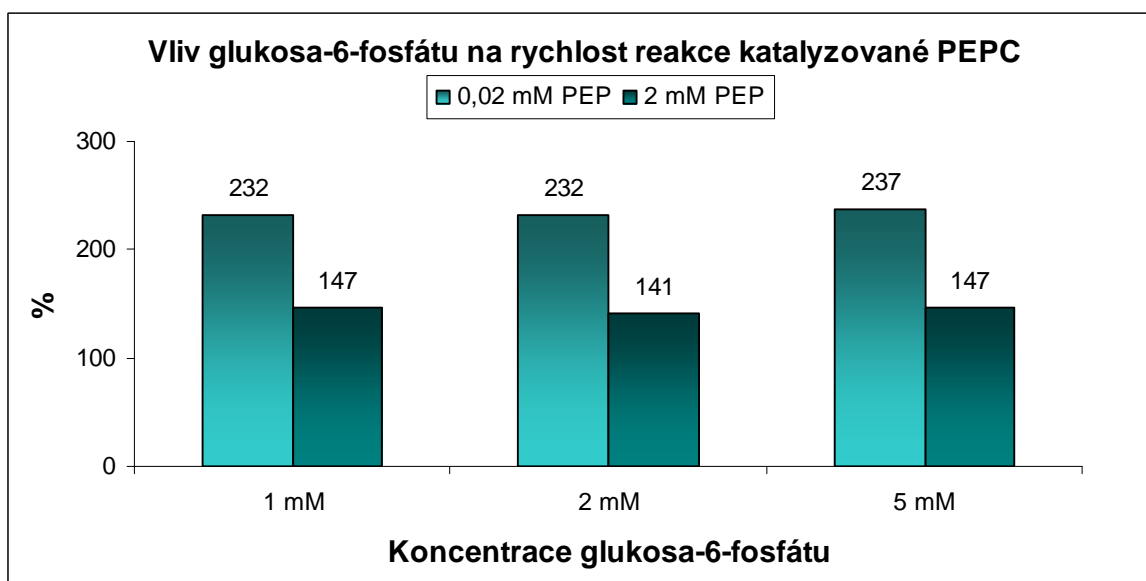
Pro PEPC izolovanou ze semen hrachu je vliv L-malátu znázorněn na obrázku 37 (str. 62). Nejvýraznější inhibiční účinek se projevil při působení 5 mM L-malátu, ale z obrázku je patrné, že inhibice 1 mM a 2 mM L-malátem je téměř srovnatelná s hodnotami naměřenými při 5 mM koncentraci. Inhibice PEPC izolované ze semen hrachu je poměrně výrazná, naměřené hodnoty klesly pod 50% hranici hodnot naměřených u vzorků bez přidavku L-malátu. Při porovnání hodnot reakčních rychlostí

pro PEPC naměřených při 0,2 mM a 2 mM koncentraci substrátu PEP nebyl zaznamenán znatelnější rozdíl.



Obr. 37: Vliv L-malátu na rychlost reakce katalyzované PEPC, která byla izolována ze semen hrachu. Sloupec vlevo znázorňuje měření při subsaturační koncentraci substrátu PEP, pravý sloupec hodnoty naměřené při saturační koncentraci. Výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá kontrolnímu měření bez přídavku L-malátu.

Podobně jako u inhibice L-malátem nebyl pro PEPC izolovanou ze semen hrachu zaznamenán výrazný rozdíl ve vlivu aktivátoru glukosa-6-fosfátu v závislosti na jeho zvyšující se koncentraci. Účinek aktivátoru glukosa-6-fosfátu na reakční rychlost pro PEPC získanou ze semen hrachu znázorňuje obrázek 38, str. 63. Hodnoty naměřené při 0,2 mM koncentraci substrátu PEP se pro všechny použité koncentrace pohybují okolo 230% ve srovnání s kontrolami bez přídavku aktivátoru. Stejně tak hodnoty změřené při 2 mM koncentraci substrátu a jednotlivých koncentracích glukosa-6-fosfátu jsou srovnatelné a pohybují se kolem 140% při porovnání s kontrolním měřením bez glukosa-6-fosfátu. Z grafu též vyplývá znatelný rozdíl mezi hodnotami naměřenými při subsaturaci a saturaci, téměř shodný pro všechny tři použité koncentrace aktivátoru.

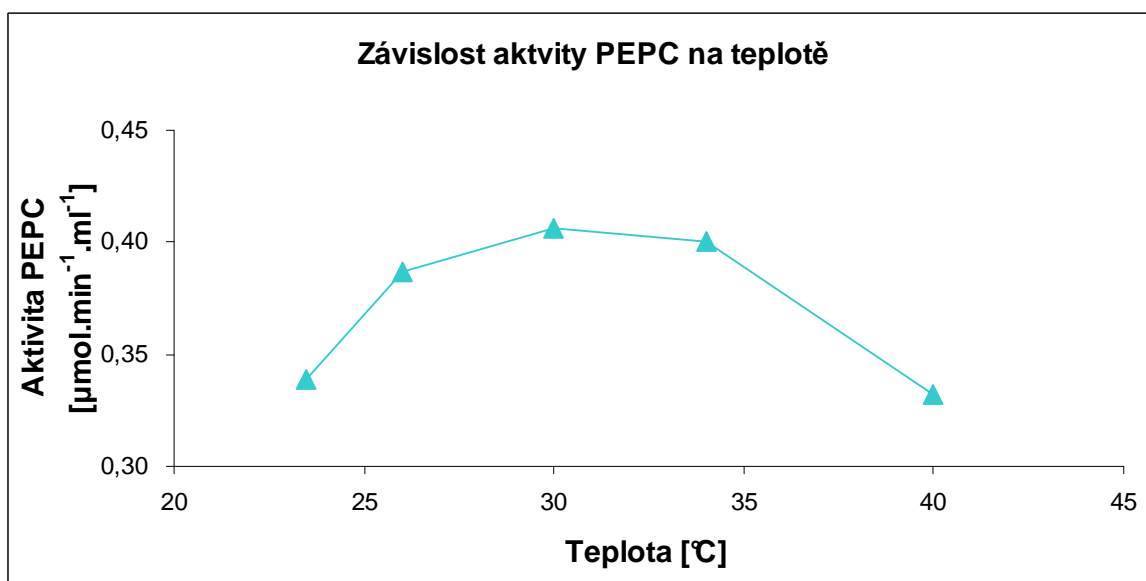


Obr. 38: Vliv glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC. PEPC byla izolována ze semen hrachu. Sloupec vlevo znázorňuje měření při subsaturační koncentraci substrátu PEP, pravý sloupec hodnoty naměřené při saturační koncentraci. Výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá kontrolnímu měření bez přídavku glukosa-6-fosfátu.

5.2.3.4. Vliv teploty na aktivitu PEPC

Vliv teploty na aktivitu PEPC izolovanou ze semen hrachu byl sledován stejným postupem jako u PEPC izolované z listů technického konopí a merlíku chilského.

U pokusu s PEPC izolovanou ze semen hrachu (obr. 39, str. 64) byl zaznamenán nárůst hodnot aktivity PEPC, ale pouze do teploty 30°C. Při 34°C následoval již mírný pokles aktivity a u měření při 40°C byla hodnota aktivity srovnatelná s hodnotou naměřenou za laboratorní teploty (23,5°C).

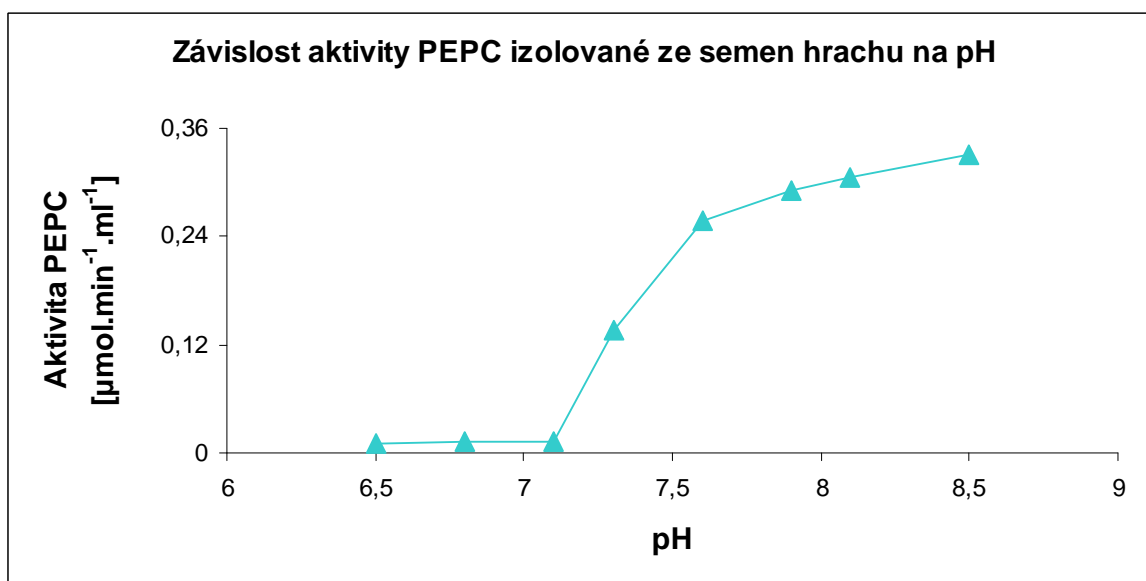


Obr. 39: Závislost aktivity PEPC na teplotě. PEPC izolovaná ze semen hrachu.

5.2.3.5. Vliv pH na aktivitu PEPC

Stanovení závislosti aktivity PEPC izolované ze semen hrachu na pH bylo provedeno stejným postupem jako pro PEPC izolovanou z listů technického konopí (odstavec 5.2.1.5).

Na obrázku 40 (str. 65) je zobrazen výsledný graf závislosti aktivity PEPC izolované ze semen hrachu na daném pH. Z grafu je patrné, že až do pH=7,1 byla hodnota aktivity velmi nízká. Ke skokové změně došlo v případě použití Tris-HCl pufru o pH=7,3. Hodnota aktivity PEPC izolované ze semen hrachu se zvýšila až 10,5x ve srovnání s hodnotou naměřenou při pH=7,1. Postupně se hodnoty aktivity PEPC zvyšovaly až do pH=8,5.



Obr. 40: Závislost aktivity PEPC izolované ze semen hrachu na pH použitého pufru.

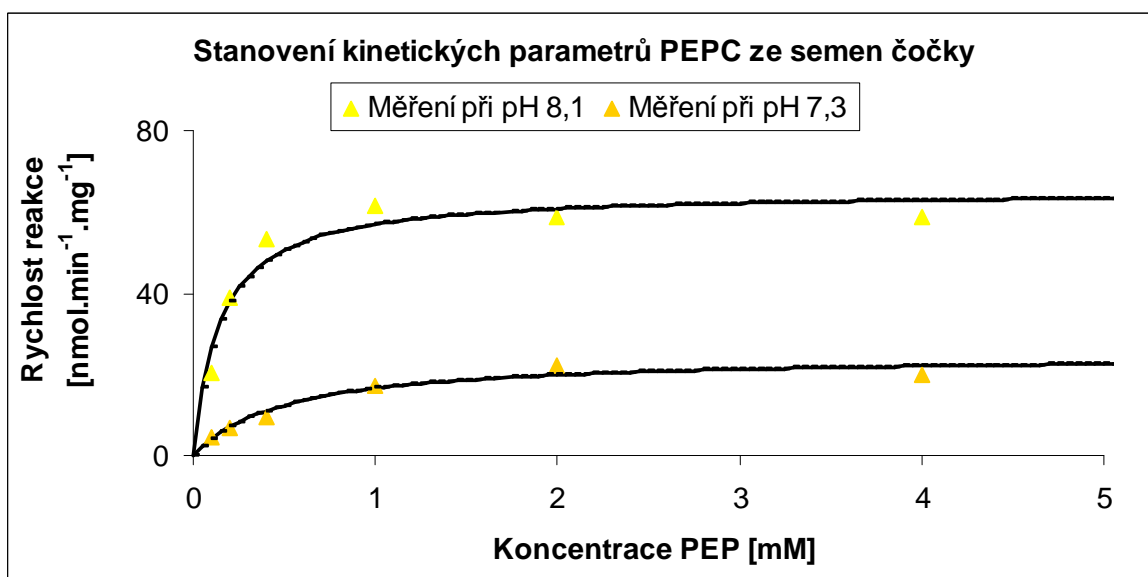
5.2.4. Charakteristika PEPC izolované ze semen čočky seté

5.2.4.1. Stanovení kinetických parametrů

Stanovení maximální reakční rychlosti a konstanty K_m pro PEPC izolovanou ze semen čočky bylo provedeno stejně jako v pokusu s PEPC izolovanou ze semen merlíku chilského a hrachu setého.

U vzorku PEPC izolované ze semen čočky byly pro pH 8,1 stanoveny kinetické parametry: $V_{\text{lim}} = 65,1 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ a $K_m = 0,14 \text{ mM}$; pro pH 7,3 byly hodnoty $V_{\text{lim}} = 24,8 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ a $K_m = 0,50 \text{ mM}$.

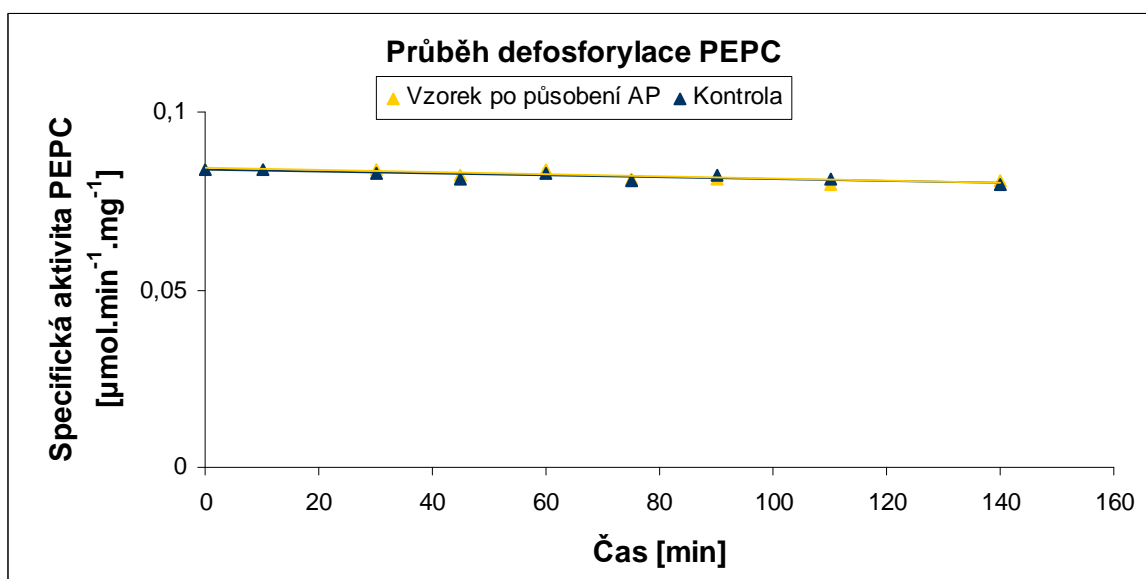
Při pH optimu 8,1 je stanovená maximální reakční rychlost přibližně 2,6x vyšší a konstanta K_m naopak téměř 3,5x, než hodnoty získané měřením při pH 7,3. Závislost aktivity PEPC na koncentraci substrátu PEP znázorňuje obrázek 41, str. 66.



Obr. 41: Závislost rychlosti reakce katalyzované PEPC, která byla izolována ze semen čočky na koncentraci substrátu PEP. Světle žlutou barvou je znázorněno měření při pH 8,1. Tmavší barvou měření při pH 7,3.

5.2.4.2. Časový průběh defosforylace

Časový průběh vlivu alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC byl sledován i pro PEPC izolovanou ze semen čočky. Pokus byl proveden obdobně jako při měření s PEPC izolovanou z listů technického konopí, ze semen merlíku a hrachu. PEPC byla opět inkubována s alkalickou fosfatasou při laboratorní teplotě a v jednotlivých časových intervalech (po 0, 10, 30, 45, 60, 75, 90, 110 a 140 minutách) byla změřena aktivita PEPC (podle odstavce 4.3.1.). Časový průběh defosforylace PEPC izolované ze semen čočky je znázorněn na obrázku 42, str. 67. Z obrázku je patrné, že po působení alkalické fosfatasy nedošlo v případě PEPC izolované ze semen čočky také k žádným výrazným změnám.

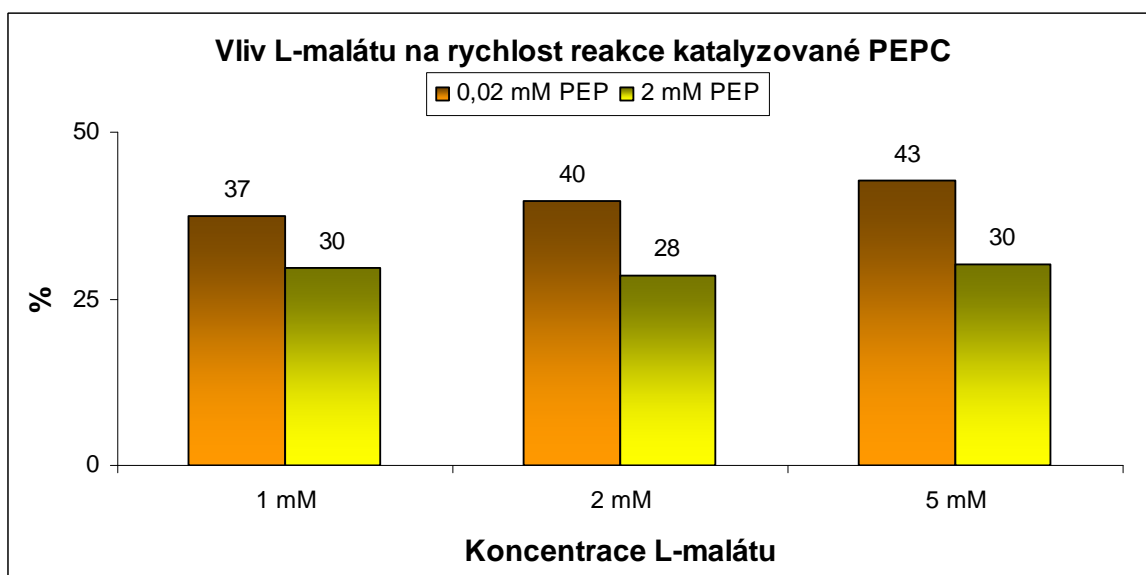


Obr. 42: Průběh defosforylace PEPC izolované ze semen čočky. Závislost specifické aktivity PEPC na čase. Modře je znázorněna kontrola bez přidavku alkalické fosfatasy, žlutě vzorek PEPC po působení alkalické fosfatasy.

5.2.4.3. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC

Inhibice a aktivace PEPC izolované ze semen čočky efektry L-malátem a glukosa-6-fosfátem byla provedena obdobně jako u PEPC izolované z předchozích experimentálních vzorků. Koncentrace efektorů byla 1 mM; 2 mM a 5 mM. Měření bylo provedeno paralelně pro dvě sady vzorků, výsledky jsou uvedeny také v %, kdy 100% odpovídá reakční rychlosti, která byla naměřena zcela bez přidavku modulátoru.

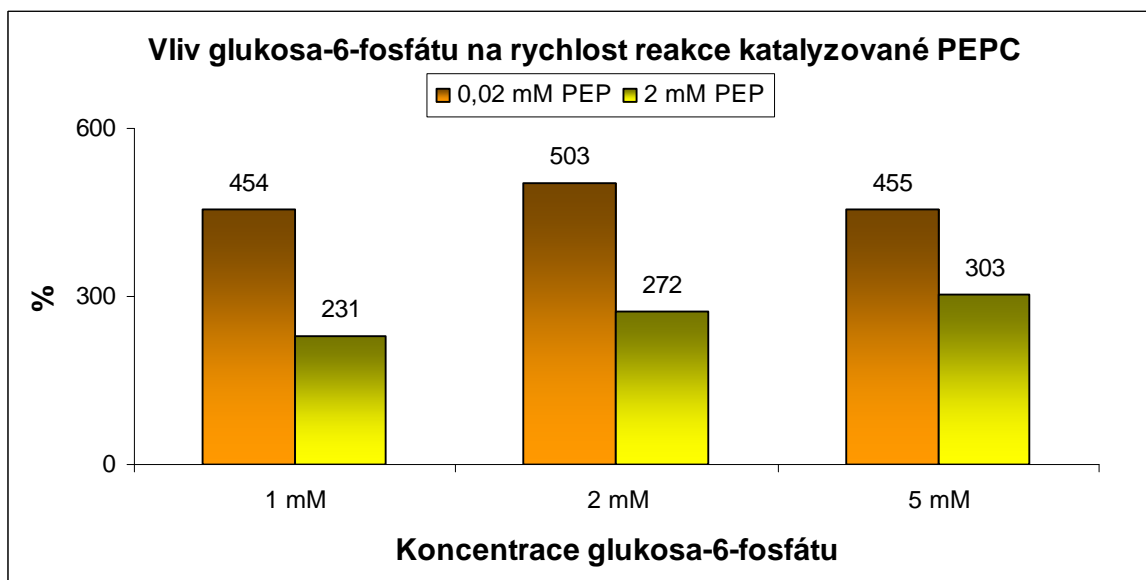
Pro PEPC izolovanou ze semen čočky je vliv L-malátu na rychlost reakce jí katalyzovanou znázorněn na obrázku 43 (str. 68). Pro tento vzorek nebyl zaznamenán příliš výrazný rozdíl ve vlivu jednotlivých koncentrací L-malátu. Hodnoty naměřené při 1 mM, 2 mM i 5 mM koncentraci L-malátu pro subsaturační koncentraci substrátu se pohybují okolo 40%. Pro saturační koncentraci substrátu okolo 30%, výsledky byly opět vztaženy ke kontrolním vzorkům bez přidavku inhibitoru L-malátu.



Obr. 43: Vliv inhibitoru L-malátu na rychlost reakce katalyzované PEPC, která byla izolována ze semen čočky. Sloupec vlevo znázorňuje měření při subsaturační koncentraci substrátu PEP, pravý sloupec hodnoty naměřené při saturační koncentraci. Výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá kontrolnímu měření bez přídavku L-malátu.

Vliv aktivátoru glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC izolované ze semen čočky je znázorněn na obrázku 44 (str. 69). Předpoklad nejvýznamnější aktivace 5 mM glukosa-6-fosfátem, nebyl v tomto případě potvrzen. O málo výrazněji se projevila aktivace 2 mM glukosa-6-fosfátem, kdy byla naměřená hodnota reakční rychlosti pro PEPC přibližně 5x vyšší, než u kontroly bez přídavku aktivátoru, a to při subsaturační (0,2 mM) koncentraci substrátu PEP. Pro saturační koncentraci (2 mM) substrátu PEP byla zaznamenána hodnota přibližně 2,7x vyšší ve srovnání s kontrolou bez aktivátoru. Výrazný vliv na aktivaci PEPC izolovanou ze semen čočky byl zjištěn i pro další dvě koncentrace aktivátoru (1 mM a 5 mM glukosa-6-fosfát). Hodnoty zjištěné při subsaturační koncentraci substrátu se pohybovaly okolo 450% ve srovnání s kontrolními měřeními bez přídavku glukosa-6-fosfátu. Pro saturační koncentraci PEP se reakční rychlost zvýšila přibližně 2,3x pro 1 mM koncentraci glukosa-6-fosfátu, při použití 5 mM koncentrace aktivátoru byla zjištěna přibližně trojnásobná hodnota, také ve srovnání s kontrolními měřeními.

Při porovnání hodnot naměřených za subsaturační a saturační koncentrace substrátu jsou patrné poměrně významné rozdíly, které jsou pro všechny použité koncentrace glukosa-6-fosfátu srovnatelné.

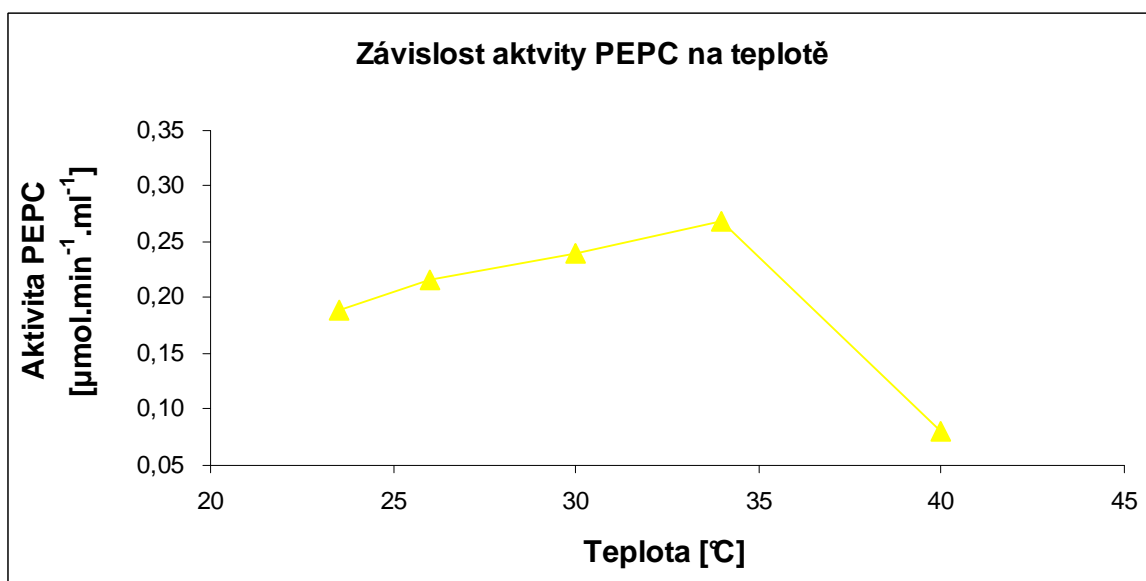


Obr. 44: Vliv glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC, která byla izolována ze semen čočky. Sloupec vlevo znázorňuje měření při subsaturační koncentraci substrátu PEP, pravý sloupec hodnoty naměřené při saturační koncentraci. Výsledky jsou uvedeny v procentech, kdy 100% odpovídá kontrolnímu měření bez přídavku aktivátoru glukosa-6-fosfátu.

5.2.4.4. Vliv teploty na aktivitu PEPC

Vliv teploty na aktivitu PEPC izolovanou ze semen čočky byl sledován stejným postupem jako u PEPC izolované z listů technického konopí, semen merlíku chilského a semen hrachu.

Pro PEPC izolovanou ze semen čočky (obr. 45, str. 70) byl zaznamenán skoro lineární nárůst aktivity v závislosti na zvyšující se teplotě, a to až do teploty 34°C. Při 40°C však hodnota aktivity PEPC velice prudce klesla. Aktivita při této teplotě byla skoro 2,5x nižší, než aktivita naměřená při laboratorní teplotě (23,5°C).

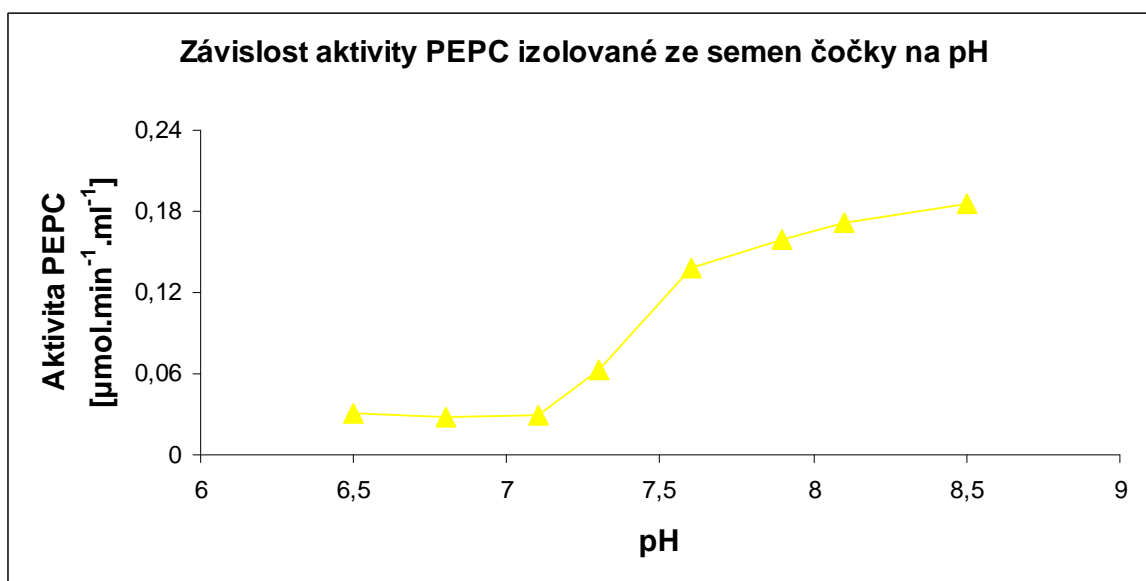


Obr. 45: PEPC izolovaná ze semen čočky. Závislost aktivity PEPC na teplotě.

5.2.4.5. Vliv pH na aktivitu PEPC

Stanovení závislosti aktivity PEPC izolované ze semen čočky na pH bylo provedeno stejným postupem jako pro PEPC izolovanou z listů technického konopí (odstavec 5.2.1.5).

Na obrázku 46 (str. 71) je zobrazen výsledný graf závislosti aktivity PEPC izolované ze semen čočky na daném pH. Z grafu je patrné, že až do pH=7,1 byla hodnota aktivity velmi nízká. Ke skokové změně došlo v případě použití Tris-HCl pufru o pH=7,3; kdy hodnota aktivity PEPC izolované ze semen čočky byla přibližně dvojnásobná, než hodnoty získané měřením při pH=7,1. Postupně se hodnoty aktivity PEPC zvyšovaly až do pH=8,5.



Obr. 46: Závislost aktivity PEPC izolované ze semen čočky na pH použitého pufru.

6. DISKUZE

Fosfoenolpyruvátcarboxylasa je v popředí zájmu již více než 50 let. Nejprve byla PEPC studována v souvislosti s C_4 a CAM fotosyntézou, později byla velká pozornost věnována stanovení kinetických parametrů PEPC z různých zdrojů a možnostem regulace její aktivity. PEPC z rostlinných zdrojů obsahují konzervovanou sekvenci (kyselina-zásada-X-X-S-I-D-A-Q-A-L-R) [38], kde Ser je fosforylovatelný specifickou PEPC-kinasou. Fosforylovaný enzym má většinou vyšší maximální reakční rychlost, vyšší afinitu k substrátu, je více aktivovaný glukosa-6-fosfátem a méně inhibovaný L-malátem. [4, 19, 21, 46, 47, 48, 49] Tyto změny kinetických vlastností nejsou obecné, liší se pro PEPC z různých zdrojů. V naší laboratoři byla studována regulace PEPC v listech tabáku [64] a v této práci byla pro srovnání připravena PEPC z listů C_3 rostliny – technického konopí.

Dosud je málo informací o PEPC v semenech rostlin, a to především o fosforylaci PEPC během dozrávání a klíčení semen. V semenech skočce [12], ječmene [13] a pšenice [15] bylo zjištěno, že v suchém semeni je PEPC přítomna jako nefosforylovaná. Pravděpodobně to souvisí s aktivací PEPC-kinasy světlem. Jiná situace je v semenech kukuřice, kde je PEPC přítomna ve fosforylované formě. [62] V této práci jsem vybrala k porovnání další semena, a to semena, u kterých jsme předpokládali vysokou aktivitu PEPC s ohledem na vysoký obsah proteinů. Jedná se o luštěniny – hrách, čočku a semena merlíku chilského, která jsou rovněž bohatá na bílkoviny a představují jihoamerickou pseudoobilovinu.

6.1. Stanovení kinetických parametrů

Pro kinetické studie byly použity enzymové preparáty purifikované precipitací síranem amonným, ionexovou a gelovou chromatografií. Nejvyšší specifickou aktivitu po izolaci měla PEPC ze semen hrachu ($108 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), ze semen merlíku ($81 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), semen čočky ($86 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), specifická aktivita PEPC listů technického konopí pak byla nižší ($23 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) (tabulka 1, str. 40).

Z chromatogramů (obr. 16, str. 41; obr. 17, str. 42) je patrné, že při všech chromatografických separacích se PEPC eluovala jako jeden vrchol, což spolu s jedním proužkem nativní elektroforézy (obr. 19, str. 43) naznačuje přítomnost jedné izofomy. Byla sledována fosforylace PEPC z různých zdrojů, a to působením alkalické fosfatasy (AP). V případě PEPC izolované ze semen C_3 rostlin merlíku, hrachu a čočky neměla AP na aktivitu PEPC vliv (obr. 30, str. 55; obr. 36, str. 61; obr. 42, str. 67). Tento výsledek ukazuje, že v semenech merlíku, hrachu a čočky je PEPC buď v nefosforylované, nebo již defosforylované formě. Fosforylace PEPC ze semen C_3 rostlin byla detailně studována pro skočec [12], ječmen [13] a pšenici [15]. Provedené studie prokázaly, že PEPC byla v těchto suchých semenech přítomna defosforylovaná. Avšak u PEPC izolované ze semen kukuřice došlo již po jedné hodině působení AP k poklesu aktivity až na 60% původní hodnoty a následně k dalšímu snížení nedošlo.[62] Dalšími pokusy bylo prokázáno, že PEPC uložená v suchých semenech C_4 rostliny kukuřice je fosforylovaná a její defosforylace alkalickou fosfatasou se projevuje poklesem aktivity PEPC [62].

V listech technického konopí, stejně jako v listech tabáku, byla aktivita PEPC působením AP snížena.

Tabulka 4 shrnuje poznatky o průběhu defosforylace PEPC izolované z listů technického konopí, semen merlíku, hrachu a čočky s výsledky zjištěnými pro PEPC ze semen kukuřice a listů tabáku.

	Pokles aktivity PEPC po působení AP 1 hodinu
Semena merlíku*	0%
Semena hrachu*	1%
Semena čočky*	1%
Listy technického konopí*	10%
Semena kukuřice [62]	40%
Listy tabáku** [64]	40%

Tabulka 4: Porovnání vlivu alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC izolovanou z rostlinného materiálu. Procenta odpovídají zjištěnému poklesu aktivity, 100% odpovídá aktivitě zjištěné v čase 0 min, bez přídatku AP.

* zjištěno v této DP

** PEPC z listů tabáku byla s alkalickou fosfatasou inkubována 4 hodiny

Dále byly v jednotlivých enzymových preparátech, včetně preparátu z listů technického konopí po působení AP, stanoveny K_m PEPC pro PEP, a to při optimálním pH 8,1 a suboptimálním pH 7,3. Nejnižší afinitu k PEP vykazovala PEPC z listů technického konopí (0,66 mM). Po působení AP se tato Michaelisova konstanta ještě 4x zvýšila. V semenech merlíku, hrachu a čočky byla afinita PEPC k PEP vyšší. Nejvyšší K_m vykazovala PEPC ze semen čočky (0,14 mM). Nízké hodnoty K_m jsou pro nefotosyntetické PEPC charakteristické. [21] Hodnoty zjištěné pro PEPC z listů technického konopí odpovídají spíše hodnotám fotosyntetických izoforem PEPC. Také hodnota K_m pro PEPC ze semen kukuřice je nižší ve srovnání s hodnotou Michaelisovy konstanty C_4 izoforem (PEPC z listů kukuřice K_m 1,1 mM při pH 8,1 a 8,7 mM při pH 7,3). [77] Snížení pH z optimálního vedlo dle očekávání ke zvýšení Michaelisových konstant pro PEP a ke snížení maximálních reakčních rychlostí (viz tabulka 5). Poměr Michaelisových konstant PEPC z listů technického konopí po působení AP a nativní formy se změnou pH snížil z 3,7 na 1,6. Tento výsledek naznačuje, že v prostředí méně výhodného pH a po defosforylaci AP už není tolik ovlivňována afinita PEPC k substrátu PEP.

	pH 8,1		pH 7,3	
	K_m [mM]	V_{lim} [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]	K_m [mM]	V_{lim} [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]
PEPC z listů tech.konopí				
<i>nativní forma PEPC</i>	0,66	11,1	1,07	6,6
<i>po působení AP</i>	2,47	7,3	1,73	3,3
PEPC ze semen merlíku	0,41	103,1	0,80	55,1
PEPC ze semen hrachu	0,27	127,0	0,52	99,1
PEPC ze semen čočky	0,14	65,1	0,50	24,8

Tabulka 5: Shrnutí výsledků – zjištěné kinetické konstanty pro PEPC izolovanou z listů technického konopí, semen merlíku, hrachu a čočky.

Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP měla ve všech případech hyperbolický charakter. A to i v případě PEPC izolované z listů technického konopí, která byla vystavena působení AP (obr. 20, str. 45; obr. 21, str. 45; obr. 29, str. 54; obr. 35, str. 60; obr. 41, str. 66). Toto zjištění koresponduje s výsledky zjištěnými pro PEPC izolovanou z listů tabáku [64], ale liší se od výsledku, který byl zjištěn pro defosforylovanou formou PEPC izolovanou ze semen kukuřice, u které došlo

po působení AP ke změně závislosti z hyperbolické na sigmoidální [62]. Sigmoidální kinetika představuje efektivní způsob regulace enzymové aktivity.

6.2. Vliv alosterických efektorů na aktivitu PEPC

Změna koncentrace inhibitorů a aktivátorů je jednou z možností regulace PEPC. L-malát je jedním z nejdůležitějších inhibitorů PEPC. Inhibuje PEPC bakterií, rostlin a také některých archebakterií. [19]

Je přímým produktem redukce oxalacetátu, metabolitem citrátového cyklu, produktem malátové fermentace a zároveň hlavní součástí C_4 a CAM asimilace uhlíku.

Inhibice L-malátem je ovlivněna fosforylací molekuly PEPC, nefosforylovaný enzym je více citlivý k inhibici L-malátem.

Tabulka 6 shrnuje inhibiční vliv L-malátu na PEPC izolovanou z listů technického konopí, semen merlíku, hrachu a čočky.

[L-malát]	Subsaturace (0,2 mM PEP)			Saturace (2 mM PEP)		
	1mM	2mM	5mM	1mM	2mM	5mM
Listy technického konopí	86%	82%	46%	104%	96%	49%
Semena merlíku	48%	30%	18%	30%	18%	11%
Semena hrachu	49%	45%	37%	36%	28%	18%
Semena čočky	37%	40%	43%	30%	28%	30%

Tabulka 6: Vliv inhibitoru L-malátu na rychlost reakce katalyzované PEPC izolované z experimentálních C_3 rostlin. Výsledky jsou uvedeny v procentech a 100% odpovídá měření kontrolního vzorku bez přídavku inhibitoru.

Z výsledků je patrné, že k inhibici L-malátem je nejméně citlivá PEPC z listů technického konopí. Důvodem je pravděpodobně to, že PEPC v listech technického konopí je fosforylovaná. Porovnáme-li aproximovanou hodnotu I_{50} s hodnotou pro PEPC ze semen kukuřice, dostáváme srovnatelné výsledky. Podobně hodnota I_{50} pro inhibici L-malátem PEPC z listů pšenice byla vyšší než pro PEPC izolovanou ze semen C_3 rostlin a také listů kukuřice a plodu avokáda. Semena jsou tedy mnohem citlivější k inhibici L-malátem, zřejmě proto, že PEPC je v suchých semenech

skladována jako nefosforylovaná molekula a tedy citlivá k inhibici L-malátem. Výjimkou jsou semena kukuřice, kde je PEPC uložena ve fosforylované formě a hodnota I_{50} mnohonásobně vyšší (viz tabulka 7).

Defosforylací dochází ke zvýšení citlivosti k inhibici L-malátem u PEPC ze sledovaných zdrojů (viz tabulka 7). Avšak změna citlivosti po fosforylaci PEPC vůči L-malátu neplatí obecně, PEPC z listů tabáku je stejně citlivá ve fosforylované i nefosforylované formě. [64]

V tabulce 7 je uvedeno porovnání vlivu L-malátu na PEPC izolovanou z listů technického konopí, semen merlíku, hrachu a čočky s hodnotami nalezenými v odborných publikacích.

	I_{50}	
	nativní forma	po působení AP
Listy technického konopí*	4,9 mM	2,4 mM
Semena kukuřice [62]	4 mM	1,5 mM
Listy pšenice [53]	1,23 mM	0,26 mM
Semena hrachu*	0,72 mM	-
Listy kukuřice [71]	0,72 mM	0,27 mM
Semena řepky olejky [70]	0,72 mM	0,085 mM
Semena merlíku*	0,6 mM	-
Semena čočky*	0,6 mM	-
Skočec PEPC2 [12]	0,57 mM	1,47 mM
Skočec PEPC1 [12]	0,075 mM	0,029 mM
Plod avokáda [72]	0,01 mM	-

Tabulka 7: Vliv inhibitoru L-malátu na rychlost reakce katalyzované PEPC izolované z experimentálních rostlin, srovnání s publikovanými hodnotami, saturační koncentrace substrátu PEP.

* zjištěno v této DP

Další možnou regulací aktivity PEPC je aktivace glukosa-6-fosfátem, důležitým metabolitem bioenergetických reakcí v buňce. [47]

Vliv aktivátoru glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC, která byla izolována z listů technického konopí, semen merlíku, hrachu a čočky je zaznamenán v tabulce 8, str. 77.

[glukosa-6-fosfát]	Subsaturace (0,2 mM PEP)			Saturace (2 mM PEP)		
	1mM	2mM	5mM	1mM	2mM	5mM
Listy technického konopí	282%	339%	446%	166%	128%	260%
Semena merlíku	329%	435%	571%	173%	210%	243%
Semena hrachu	232%	232%	237%	147%	141%	147%
Semena čočky	454%	503%	455%	231%	272%	303%

Tabulka 8: Vliv aktivátoru glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC izolované z experimentálních C_3 rostlin. Výsledky jsou uvedeny v procentech a 100% odpovídá měření kontrolního vzorku bez přídavku aktivátoru.

Glukosa-6-fosfát se projevil jako výrazný aktivátor PEPC izolované z experimentálních C_3 rostlin. Z tabulky 8 je patrné, že nejvýznamnější aktivační účinek měl 2 mM glukosa-6-fosfát na PEPC izolovanou ze semen čočky (503%) a merlíku (435%). U všech sledovaných PEPC byla aktivace glukosa-6-fosfátem výraznější při subsaturační koncentraci PEP, než při saturaci.

Aktivace PEPC glukosa-6-fosfátem nesouvisí jen s fosforylačním stavem molekuly, ale i se zdrojem PEPC, jak dokazuje tabulka 9, str. 77. PEPC ze semen kukuřice a listů tabáku byla 2 mM glukosa-6-fosfátem aktivována méně, než PEPC izolovaná ze semen merlíku, hrachu, čočky a listů technického konopí.

	Aktivace glukosa-6-fosfátem	
	nativní forma	po působení AP
Semena čočky*	503%	-
Semena merlíku*	435%	-
Listy technického konopí*	339%	139%
Semena hrachu*	232%	-
Semena řepky olejky [70]	230%	-
Listy tabáku [64]	200%	140%
Listy kukuřice [71]**	150%	-
Semena kukuřice [62]**	120%	110%

Tabulka 9: Vliv 2 mM glukosa-6-fosfátu na rychlost reakce katalyzované PEPC izolované z experimentálních rostlin, srovnání s publikovanými hodnotami, subsaturační koncentrace substrátu PEP.

* zjištěno v této DP

** saturační koncentrace

6.3. Vliv teploty a pH na aktivitu PEPC

Aktivita enzymů rostlin je významně regulována teplotou. Pro C₃ rostliny obecně platí, že jsou to rostliny mírného pásma s teplotním optimem 15 – 25°C, oproti C₄ rostlinám, které jsou teplomilné s optimem 25 – 40°C. Nejvyšší teplotní optimum měla PEPC z listů technického konopí, a to 40°C. Nejnižší teplotní optimum vykazovala PEPC ze semen hrachu 30°C. Hrách je obecně nenáročný na klimatické podmínky, daří se mu i v podhůří. Výsledky zjištěné pro PEPC izolovanou z listů technického konopí, semen merlíku, hrachu a čočky shrnuje tabulka 10, str. 78.

	Teplota, kdy byla zjištěna maximální aktivita PEPC
Semena hrachu*	30°C
Semena merlíku*	34°C
Semena čočky*	34°C
Listy technického konopí*	40°C
Semena kukuřice [62]	40°C

Tabulka 10: Porovnání teplot, při kterých byla zjištěna nejvyšší hodnota aktivity PEPC izolovaná z jednotlivých rostlinných zdrojů.

* zjištěno v této DP

Aktivitu PEPC výrazně ovlivňuje pH, i malá změna se může projevit významným vlivem na její aktivitu. *In vitro* je aktivita C₄ PEPC výrazně citlivá právě ke změnám pH, jehož optimum je 8,1. [46, 48, 49]

Také u PEPC z listů technického konopí, semen merlíku, hrachu a čočky bylo pH optimum okolo 8,1. Na hranici pH 7,3 došlo k výraznému poklesu a pH 7,1 již představovalo skokové snížení aktivity na téměř neměřitelné hodnoty. Nejvýraznější změna byla patrná u PEPC ze semen hrachu (obr. 40, str.65).

Fosfoenolpyruvátcarboxylasa z C₃ rostliny – technického konopí je v listech ve formě fosforylované, PEPC v semenech merlíku chilského, hrachu a čočky je nefosforylovaná. Všechny studované PEPC jsou aktivovány glukosa-6-fosfátem a inhibovány L-malátem, ale značně se liší v míře ovlivnění.

7. ZÁVĚR

1. Částečnou purifikací byly získány enzymové preparáty PEPC z C₃ rostlin: listů technického konopí, semen merlíku, hrachu a čočky. Nejvyšší specifickou aktivitu měl preparát izolovaný ze semen hrachu.
2. Defosforylace PEPC byla sledována pomocí alkalické fosfatasy. Zatímco aktivita PEPC z listů technického konopí byla alkalickou fosfatasou snížena (a dá se tedy předpokládat, že se jedná o fosforylovanou formu), aktivita PEPC ze semen merlíku, hrachu a čočky alkalickou fosfatasou ovlivněna nebyla.
3. Afinita PEPC ze semen merlíku, hrachu a čočky k substrátu PEP byla vyšší, než v případě PEPC z listů technického konopí. Po defosforylaci se afinita ještě snížila a zároveň došlo i ke snížení maximální reakční rychlosti.
4. PEPC z listů technického konopí byla po defosforylaci méně citlivá k aktivaci glukosa-6-fosfátem a naopak citlivost k inhibici L-malátem se zvýšila.

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Bandurski R., Greiner C.M.: *J. Biol. Chem.* **204**, 781-786 (1953)
2. Chollet R., Vidal J., O'Leary M.H.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 273-298 (1996)
3. Lepinec L., Vidal J., Chollet R., Gadal P., Cetin, C.: *Plant Sci.* **99**, 111-124 (1994)
4. Izui K., Matsumura H., Furumoto T., Kai Y.: *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 69-84 (2004)
5. O'Leary M.H.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**, 297-315 (1982)
6. Latzko E., Kelly G.J.: *Physiol. Veg.* **21**, 805-815 (1983)
7. Andreo C.S., Gonzalez D.H., Iglesias A.A.: *FEBS Lett.* **213**, 1-8 (1987)
8. Stiborová M.: *Photosynthetica* **22**, 240-263 (1988)
9. Ryšlavá H.: *Kandidátská disertační práce*. PřF UK (1989)
10. Blonde J.D., Plaxton W.C.: *J. Biol. Chem.* **278**, 11867-11873 (2003)
11. Sangwan R., Singh N., Plaxton W.C.: *Plant Physiol.* **99**, 445-449 (1992)
12. Tripodi K.E., Turner W.L., Gennidakis S., Plaxton W.C.: *Plant Physiol.* **139**, 969-978 (2005)
13. Osuna L., Pierre J. Gonzalez M., Alvarez R., Cejudo F.J., Echevarria C., Vidal J.: *Plant Physiol.* **119**, 511-520 (1999)
14. Gonzalez M.C., Osuna L., Echevarria C., Vidal J., Cejudo F.J.: *Plant Physiol.* **116**, 1249-1258 (1998)
15. Osuna L., Gonzalez, Cejudo F.J., Vidal J., Echevarria C.: *Plant Physiol.* **111**, 551-558 (1996)
16. Golombek S., Heim U., Horstmann C., Wobus U., Weber H.: *Planta* **208**, 66-72 (1999)
17. Aivalakis G., Dimou M., Flemetakis E., Plati F., Katinakis P., Drossopoulos J.B.: *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 181-186 (2004)
18. Famiani F., Walker R.P., Tecsí L., Chen Z.H., Proietti P., Leegood R.C.: *J. Exp. Bot.* **51**, 675-683 (2000)

19. Etterman T.J.G., Makarova K.S., Jellema G.L., Gierman H.J., Koonin E.V., Huynen M.A., de Vos W.M., van der Oost J.: *J. Bacteriol.* **186**, 7754-7762 (2004)
20. Sanchez R., Flores A., Cejudo F.J.: *Planta* **213**, 901-909 (2006)
21. Svensson P., Bläsing O.E., Westhoff P.: *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 180-188 (2003)
22. Grula J.W., Hudspeth R.L.: *Plant gene systems and their biology*. New York: Liss, 207-216 (1987)
23. Schäffner A.R., Sheen J.: *Plant J.* **2**, 221-232 (1992)
24. Ku M.S.B., Kano-Murakami Y., Matsuoka M.: *Plant Physiol.* **111**, 949-957 (1996)
25. Drincovich M.F., Casati P., Andreo C.S., Chesin S.J., Franceschi V.R., Edwards G.E., Ku M.S.B.: *Plant Physiol.* **117**, 733-744 (1998)
26. Cushman J.C.: *Eur. J. Biochem.* **208**, 259-266 (1992)
27. Sanchez R., Cejudo F.J.: *Plant Physiol.* **132**, 949-957 (2003)
28. Fujita N., Miwa T., Ishijima S., Izui K., Katsuki H.: *J. Biochem.* **95**, 909-916 (1984)
29. Toh H., Kawamura T., Izui K.: *Plant Cell Environ.* **17**, 31-43 (1994)
30. Dong L.Y., Masuda T., Kawamura T., Hata S., Izui K.: *Plant Cell Physiol.* **39**, 865-879 (1998)
31. Bläsing O.E., Ernst K., Streubel M., Westhoff P., Svensson P.: *Planta* **215**, 448-456 (2002)
32. Kai Y., Matsumura H., Inoue T., Terada K., Nagara Y., Yoshinaga T., Kihara A., Tsumara A., Izui K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 823-828 (1999)
33. Matsumura H., Xie Y., Shirakata S., Inoue T., Yoshinaga T., Ueno Y., Izui K., Kai Y.: *Structure* **10**, 1721-1730 (2002)
34. Matsumura H., Terada M., Shirakata S., Inoue T., Yoshinaga T., Izui K., Kai Y.: *FEBS Lett.* **458**, 93-96 (1999)
35. González M.C., Sánchez R., Cejudo F.J.: *Planta* **216**, 985-992 (2002)
36. Thing I.P., Osmond C.B.: *Plant Physiol.* **51**, 448-453 (1973)
37. Sakano K.: *Plant Cell Physiol.* **39**, 467-473 (1998)

38. Jeanneau M., Vidal J., Gouseet-Dupont A., Lebouteiller B., Hodges M., Gerentes D., Perez P.: *J. Exp. Bot.* **53**, 1837-1845 (2002)
39. Nelson D., Cox M.: *Lehninger Principles of Biochemistry 4th Edition*. WH Freeman (2004)
40. Šetlík, Seidlová, Šantrůček (unpublished): *Fyziologie rostlin – 5. Enzymové reakce fotosyntézy*
41. Slack C.R., Hatch M.D.: *Biochem. J.* **103**, 660-665 (1967)
42. Buchanan B., Gruissem W., Jones R.: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Wiley (2002)
43. Barthová, J.: *Biochemie základní kurz*. Univerzita Karlova v Praze (1999)
44. Cushman J.C., Bohnert H.J.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Plant Pathol.* **50**, 305-332 (1999)
45. Melzer E., O'leary M.H.: *Plant Physiol.* **84**, 58-60 (1987)
46. Kai Y., Matsumura H., Izui K.: *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 170-179 (2003)
47. Tovar-Mendéz A., Munoz-Clares R.A.: *Biochem. Biophys. Acta* **1546**, 242-252 (2001)
48. Echevarria C., Pacquit V., Barkim N., Osuna L., Delgado B., Arriodupont M., Vidal J.: *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 425-430 (1994)
49. Gao Y., Woo K.C.: *Aust. J. Plant Physiol.* **23**, 25-32 (1996)
50. Wu M.X., Wedding R.T.: *Plant Physiol.* **84**, 1080-1083 (1987)
51. Wang Y.H., Chollet R.: *FEBS Lett.* **328**, 215-218 (1993)
52. Schuller K.A., Turbin D.H., Platon W.C.: *Plant Physiol.* **94**, 1429-1435 (1990)
53. Duff S.M.G., Chollet R.: *Plant Physiol.* **107**, 775-782 (1995)
54. Nimmo G.A., Nimmo H.G., Hamilton I.D., Fewson C.A., Wilkins M.B.: *Biochem. J.* **239**, 213-220 (1986)
55. Willeford K.O., Wedding R.T.: *Plant Physiol.* **99**, 755-758 (1992)
56. Nimmo H.G.: *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 189-196 (2003)
57. Schuller K.A., Werner D.: *Plant Physiol.* **101**, 1267-1273 (1993)
58. Vidal J., Chollet R.: *Trends Plant Sci.* **2**, 230-237 (1997)
59. Garcia-Maurino S., Montreal J.A., Alvarez R., Vidal J., Echevarria C.: *Planta* **216**, 648-655 (2003)
60. Öpik H., Rolfe S.: *The Physiology of Flowering Plants*. Cambridge (2005)

61. Pavlová L.: *Fyziologie rostlin*. Karolinum (2006)
62. Černý M.: *Izolace a charakterizace fosfoenolpyruvátcarboxylasy ze semen Zea mays*. Diplomová práce PŘF UK Praha. katedra biochemie (2007)
63. Müller K., Doubnerová V., Synková H., Čeřovská N., Ryšlavá H.: *Biol. Chem.* **390**, 245-251 (2009)
64. Müller K.: *Regulation of fosfoenolpyruvate carboxylase in tobacco plants during potyviral infection*. Disertační práce PŘF UK Praha, katedra biochemie (2008)
65. Bradford M.M.: *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)
66. Káš J., Kodíček M., Valentová O. : *Laboratorní cvičení z biochemie*. Olomouc (2000)
67. Krajhanzl A., Hladík J. a kol: *Biochemické metody – návody k pokročilým praktickým cvičením*. Skriptum PŘF UK Praha (1991)
68. Leamlí U.K.: *Nature* **227**, 680 (1970)
69. Karn R., Kivic P., Hudock G.A.: *Biochem. Biophys. Acta* **293**, 567-569 (1973)
70. Moraes T.F., Plaxton W.C.: *Eur. J. Biochem.* **267**, 4465-4476 (2000)
71. Tovar-Mendez A., Mújica-Jiménez C., Muñoz-Clares R.A.: *Plant Physiol.* **123**, 149-160 (2000)
72. Notton B.A., Blanket M.M.: *Phytochemistry* **33**, 1333-1337 (1993)
73. Montreal J.A., López-Beana F.J., Vidal J., Echevarría C., García-Maurino S.: *Planta* **225**, 801-812 (2007)
74. Leitao L., Bethenod O., Biolley J.-P.: *Plant Biol.* **9**, 478-488 (2007)
75. Krantev A., Yordanova R., Janda T., Szalai G., Popova L.: *J. Planta Physiol.* **165**, 920-931 (2008)
76. Sánchez R., Flores A., Cejudo F.J.: *Planta* **223**, 901-909 (2006)
77. Frank J., Clarke R.J., Vater J., Holzwarth J.F.: *Biophys. Chem.* **92**, 53-64 (2001)