

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



*Vliv sacharosu v kultivačním médiu na aktivitu fosfoenolpyruvátkarboxylasy v listech
tabáku*

*Influence of sucrose in culture medium on phosphoenolpyruvate carboxylase activity in
tobacco leaves*

Bakalářská práce

Školitelka: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultantka: RNDr. Veronika Doubnerová, PhD.

Praha 2010

Martin Fiala

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. a konzultantce RNDr. Veronice Doubnerové, PhD. za velkou pomoc, trpělivost a veškerý čas, který mi věnovaly. Dále Květě Garčkové za rady a nápady při vypracovávání bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. A všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

Martin Fiala

Abstract

Plants are under physiological conditions autotrophic organisms that are capable to fix CO₂ for the synthesis of carbohydrates. Metabolism of plants may be affected by presence of sucrose in the culture medium. The aim of this study was to determine whether activity of phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31, PEPC) and nitrate reductase (EC 1.7.1.1, NR) were affected by the presence of sucrose in the culture medium. PEPC plays important role in photosynthesis of C₄ and CAM plants; in C₃ plants PEPC plays an anaplerotic role by replenishing of citric acid cycle intermediates and providing carbon skeletons to support nitrogen assimilation. PEPC activity in plants grown in culture medium with sucrose was about 70 % higher than in plants grown without sucrose. Level of phosphorylation of PEPC was studied by determination of PEPC activity after alkaline phosphatase treatment, activation of PEPC by D-glucose-6-phosphate and inhibition of PEPC by L-malate. PEPC activity after dephosphorylation in both groups of plants was decreased at similar level. Also activation of PEPC by D-glucose-6-phosphate and inhibition of PEPC by L-malate was very similar in plants grown with sucrose and without sucrose. NR is a key enzyme in nitrogen fixation. Activity of NR in plants grown with sucrose was about 90 % higher than in plants without sucrose. Amount of soluble proteins in plants grown in culture medium with sucrose was about 52% higher than in plants grown without sucrose.

Key words: PEPC, NR, *Nicotiana tabacum* L., sucrose

Rostliny jsou za fyziologických podmínek autotrofní organismy, které využívají energii slunečního záření k fixaci CO₂ pro syntézu sacharidů. Přítomnost sacharosy v kultivačním médiu může ovlivnit metabolismus celé rostliny. Cílem této práce bylo zjistit, zda přítomnost sacharosy ovlivní aktivitu fosfoenolpyruvátkarboxylasy (EC 4.1.1.31, PEPC) a nitrátreduktasy (EC 1.7.1.1., NR). PEPC je v C₄ a CAM rostlinách fotosyntetickým enzymem, v C₃ rostlinách plní řadu funkcí, dodává intermediáty citrátového cyklu a spojuje tak metabolismus sacharidů a aminokyselin. Aktivita PEPC v rostlinách pěstovaných se sacharosou byla o 70 % vyšší než v rostlinách pěstovaných bez sacharosy. Stupeň fosforylace PEPC byl studován stanovením aktivity PEPC po působení alkalické fosfatasy, aktivaci D-glukosa-6-fosfátem a inhibici L-malátem. Aktivita PEPC se po působení alkalické fosfatasy snížila. Pokles byl pro rostliny pěstované se sacharosou i bez sacharosy velmi podobný. Aktivace PEPC D-glukosa-6-fosfátem a inhibice PEPC L-malátem byla srovnatelná v rostlinách pěstovaných se sacharosou i bez sacharosy. Nitrátreduktasa je klíčovým enzymem fixace dusíku. Aktivita NR byla v rostlinách pěstovaných se sacharosou o 90 % vyšší než v rostlinách pěstovaných bez sacharosy. V rostlinách pěstovaných se sacharosou bylo o 52 % víc bílkovin než v rostlinách pěstovaných bez sacharosy.

Klíčová slova: PEPC, NR, *Nicotiana tabacum* L., sacharosa

Seznam zkratek:

ADP	adenosindifosfát
AP	alkalická fosfatasa
ATP	adenosintrifosfát
BIS	N,N'-methylen-bis(akrylamid)
BSA	hovězí sérový albumin
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
g	tíhové zrychlení
GS/GOGAT	glutaminsynthetasa/gluamátsynthasa
NAD⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid redukovaná forma
NNEDD	N-(1-naftyl)ethylendiamindihydrochlorid
NR	nitrátreduktasa
PEP	fosfoenolpyruvát
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
P_i	anorganický fosfát
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N,N',N'-tertamethylenethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	uridindifosfát

Obsah

SEZNAM ZKRATEK

1.	Literární úvod.....	9
1.1.	Sacharosa.....	9
1.2.	Propojení metabolismu uhlíku a dusíku.....	10
1.3.	Příjem a fixace dusíku.....	11
1.4.	Přehled enzymů.....	12
1.4.1.	Fosfoenolpyruvátkarboxylasa	12
1.4.1.1.	Charakterizace fosfoenolpyruvátkarboxylasy.....	12
1.4.1.2.	Regulace aktivity fosfoenolpyruvátkarboxylasy.....	13
1.4.2.	Nitrátreduktasa.....	15
1.4.2.1.	Charakterizace nitrátreduktasy.....	15
1.4.2.2.	Regulace aktivity nitrátreduktasy.....	16
2.	Cíl práce.....	18
3.	Materiál.....	18
3.1.	Přístroje a pomůcky.....	18
3.2.	Chemikálie.....	18
3.3.	Rostlinný materiál.....	19
4.	Metody.....	20
4.1.	Příprava vzorku z rostlinného materiálu.....	20
4.1.1.	Pěstování rostlin tabáku.....	20
4.1.2.	Příprava rostlinného extraktu pro stanovení aktivity enzymů.....	21
4.2.	Měření aktivity enzymů.....	22
4.2.1.	Měření aktivity NR.....	22
4.2.2.	Defosforylace NR.....	22
4.2.3.	Měření aktivity PEPC.....	22
4.2.4.	Aktivace PEPC glukosa-6-fosfátem.....	23
4.2.5.	Inhibice PEPC L-malátem.....	23
4.2.6.	Působení alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC.....	23
4.3.	Stanovení bílkovin metodou dle Bradfordové.....	24
4.4.	Elektroforetická separace proteinů.....	24
4.4.1.	Elektroforetickou separaci proteinů v prostředí SDS.....	24

4.4.1.1. Příprava gelu pro elektroforetickou separaci proteinů v denaturujícím prostředí.....	25
4.4.1.2. Příprava vzorku pro elektroforetickou separaci proteinů v denaturujícím prostředí.....	25
4.4.1.3. Detekce proteinů v gelu.....	26
4.4.2. Elektroforetická separace proteinů v nedenaturujícím prostředí.....	26
4.4.2.1. Příprava gelu pro elektroforetickou separaci proteinů v nedenaturujícím prostředí.....	26
4.4.2.2. Příprava vzorku pro elektroforetickou separaci proteinů v nedenaturujícím prostředí.....	27
4.4.2.3. Detekce aktivity nitrátreduktasy.....	27
5. Výsledky.....	28
5.1. Množství bílkovin v rostlinném extraktu.....	28
5.2. Aktivita PEPC v rostlinách pěstovaných se sacharosou a bez sacharosy.....	30
5.3. Studium regulace PEPC.....	31
5.3.1. Působení alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC.....	31
5.3.2. Vliv L-malátu na aktivitu PEPC.....	33
5.3.3. Vliv D-glukosa-6-fosfátu na aktivitu PEPC.....	35
5.4. Aktivita NR v rostlinách pěstovaných se sacharosou a bez sacharosy.....	37
6. Diskuse.....	41
7. Závěr.....	43
8. Seznam použité literatury.....	44

1 Literární úvod

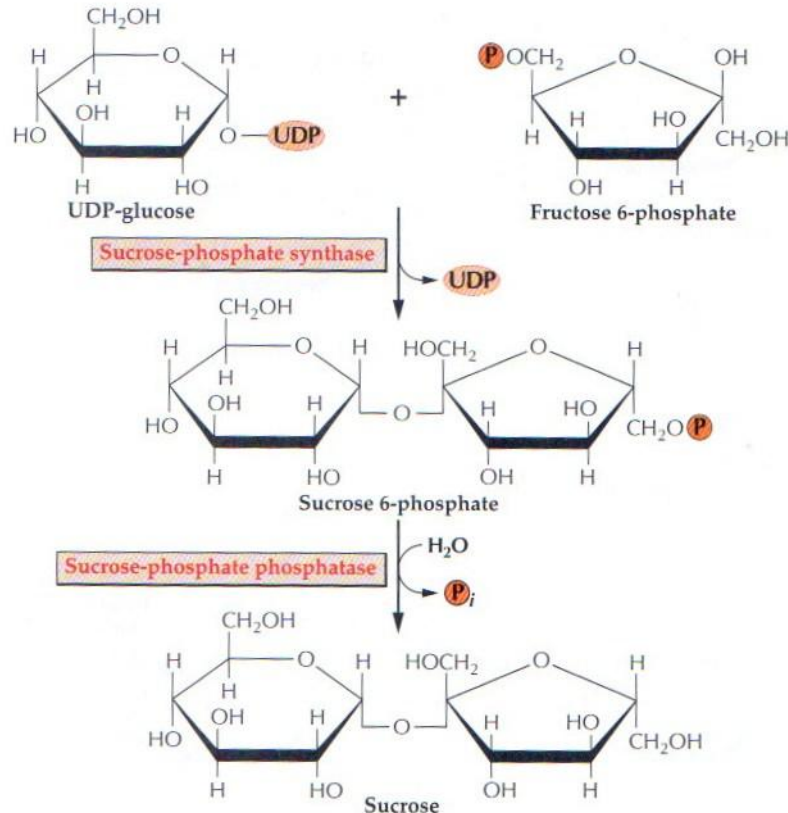
Rostliny jsou často pro pokusné a biotechnologické účely pěstované v kultivačních médiích o přesném složení, které může být podle potřeby upraveno. Součástí těchto kultivačních médií je často sacharosa jako zdroj uhlíku.

Rostlina je za fyziologických podmínek autotrofním organismem, který využívá fotosyntetickou fixaci oxidu uhličitého pro syntézu sacharidů. Dostupnost sacharosy v kultivačním médiu bude pravděpodobně ovlivňovat celkový metabolismus rostliny [1,2].

1.1 Sacharosa

Sacharosa je disacharid skládající se z glukosy a fruktosy. Patří mezi nejdůležitější metabolity rostlin. Slouží jako hlavní transportní forma fotosyntetických asimilátů. Kromě funkce transportní má sacharosa ještě funkci nutriční a zvyšuje odolnost rostliny před nízkou teplotou a osmotickým stresem [3,4].

Sacharosa je syntetizovaná v cytoplasmě fotosyntetických orgánů z UDP-glukosy a fruktosy (Obr. 1, str. 10). Odtud je transportována do ostatních částí rostliny, kde může být využita jako zdroj energie v dýchacím řetězci. Sacharosa je nejprve rozštěpena a poté ve formě glukosy vstupuje do glykolýzy, kde je přeměněna řadou reakcí na fosfoenolpyruvát (PEP), který po přeměně na acetyl-CoA vstupuje do citrátového cyklu. V citrátovém cyklu a glykolýze vznikají redukované koenzymy FADH_2 a NADH , které vstupují do dýchacího řetězce, kde se syntetizuje ATP [3,5,6].



Obr. 1: Syntézy sacharosy enzymy sacharosa-fosfátsynthasou a sacharosa-fosfátfosfatasou. [1]

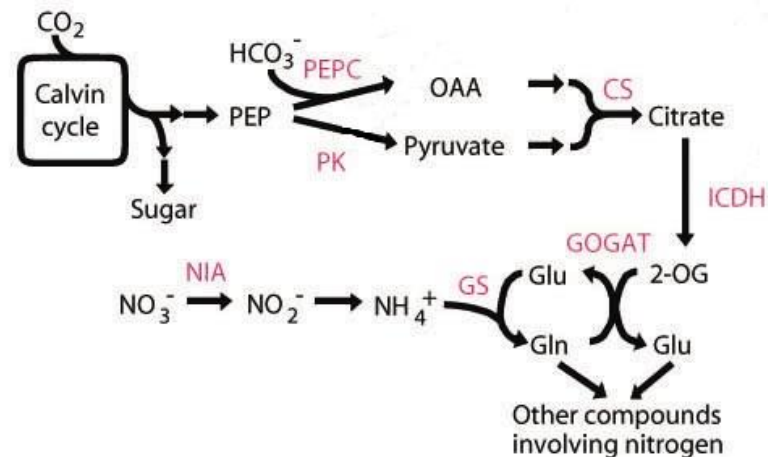
1.2 Propojení metabolismu uhlíku a dusíku

Asimilace dusičnanů je těsně propojena s metabolismem uhlíku. Během asimilace dusičnanů je snížena aktivita syntetických drah ve prospěch glykolýzy. Produktem glykolýzy je fosfoenolpyruvát, který má dvě zásadní funkce při asimilaci dusičnanů [7].

Zprvé může být fosfoenolpyruvát karboxylován za katalýzy PEPC (EC 4.1.1.31, PEPC) za vzniku oxalacetátu, který je redukován NAD-malátdehydrogenasou (EC 1.1.1.37) na malát. Malát je v kořenech dekarboxylován a tím rostlina brání okyselování cytoplazmy, ke kterému dochází během asimilace dusičnanů [7].

Zadruhé fosfoenolpyruvát je sérií reakcí katalyzovaných PEPC, pyruvátkinasou (EC 1.1.1.27), citrát-synthasou (EC 2.3.3.1), pyruvátdehydrogenasou (EC 1.2.4.1) a isocitrátdehydrogenasou (EC 1.1.1.41) přeměněn na α -ketoglutarát. Enzymový komplex

glutaminsynthetasa/glutamátsynthasa (EC 6.3.2.1/1.4.1.14, GS/GOGAT) využívá α -ketoglutarát jako akceptor amonného kationu vzniklého redukcí dusičnanu nitrátreduktasou (EC 1.7.1.1, NR) a nitritreduktasou (EC 1.7.7.1) (Obr. 2) [1,5,7].



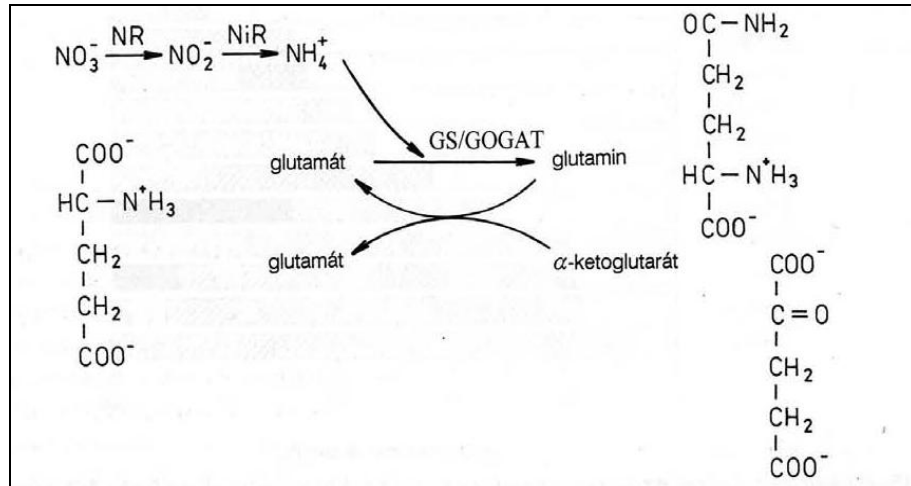
Obr. 2: Propojení asimilace dusičnanů s metabolismem uhlíku. PEP -fosfoenolpyruvát, OAA - oxalacetát, PEPC - fosfoenolpyruvátcarboxylasa, PK - pyruvátkinasa, CS - citrátsynthasa, ICDH - isocitrátdehydrogenasa, GOGAT - glutamátsynthasa, GS - glutaminsynthetasa, NIA - nitrátreduktasa [8].

1.3 Příjem a fixace dusíku

Jako zdroj dusíku rostlině slouží dusičnanové nebo amonné ionty. Aby mohly být dusičnanové ionty metabolicky využity, musí být redukovány na amonné ionty. K redukcí dochází buď přímo v kořenech, nebo jsou nitrátové anionty transportovány do listů a až zde redukovány [2,5,7].

Amonné ionty jsou pro rostlinu ve větší míře toxické, a proto jsou ihned zabudovávány do organických sloučenin. To provádí enzymový systém GS/GOGAT (Obr. 3, str. 11). Amonný kation se naváže na glutamát za vzniku glutaminu. Ten reaguje s α -ketoglutarátem za vzniku dvou molekul glutamátu. Jedna molekula je

využita pro obnovení glutaminu a druhá reaguje za katalýzy asparátaminotransferasy s oxalacetátem za vzniku α -ketoglutarátu a aspartátu [1,7].



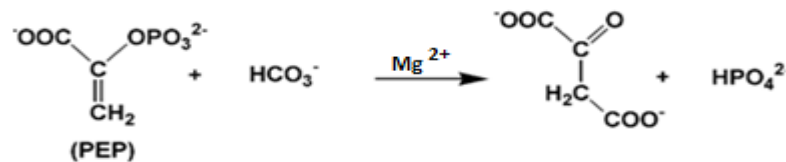
Obr. 3: Schéma redukce dusičnanových iontů nitrátreduktasou (NR) a nitritreduktasou (NiR) na amonné ionty a jejich zabudování do aminokyselin systémem GS/GOGAT [2].

1.4 Přehled enzymů

1.4.1 Fosfoenolpyruvátkarboxylasa

1.4.1.1 Charakterizace fosfoenolpyruvátkarboxylasy

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (EC 4.1.1.31, PEPC) je cytosolový enzym vyskytující se u vyšších rostlin, řas, sinic a bakterií. Většinou obsahuje čtyři identické podjednotky o molekulové hmotnosti přibližně 95 – 110 kDa [9]. Katalyzuje nevratnou reakci vzniku oxalacetátu z fosfoenolpyruvátu v přítomnosti HCO_3^- a kofaktoru Mn^{2+} nebo Mg^{2+} (Obr. 4, str. 13). Mechanismus reakce je rozložen do více kroků. PEPC nejprve naváže Mg^{2+} kation, poté PEP a nakonec HCO_3^- . Tato reakce je exergonická. Vzniklý oxalacetát může být dále redukován na L-malát NAD-malátdehydrogenasou [10,11,12].



Obr. 4: Reakce vzniku oxalacetátu z fosfoenolpyruvátu katalyzovaná PEPC rostlin [10]

V listech C_4 a CAM rostlin se PEPC vyskytuje ve velkém množství. Zde plní funkci primární fixace CO_2 pro fotosyntézu. V C_4 rostlinách je aktivní během dne. V CAM rostlinách je aktivní během noci a souvisí s cirkadiálním rytmem. Fixace CO_2 v noci u CAM rostlin umožňuje rostlině uzavřít průduchy během dne a tím minimalizovat ztrátu vody. Stejně tak v C_4 rostlinách prefixace CO_2 PEPC umožňuje snižovat ztráty fotosyntézy fotorespirací, což je především v prostředí sucha a horka výhodné [9,10,13].

Hlavní funkcí enzymu C_3 rostlin je doplňování meziproduktů citrátového cyklu. V citrátovém cyklu vzniká α -ketoglutarát, který poskytuje uhlíkatý skelet pro syntézu aminokyselin během asimilace dusíku. Další velmi důležitou funkcí je regulace pH cytoplasmy, kdy společně s NADP-malátdehydrogenasou (oxalacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40) kompenzuje okyselení cytoplasmy, ke kterému dochází především během redukce dusičnanů [7,9].

1.4.1.2 Regulace aktivity fosfoenolpyruvátkarboxylasy

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa je v buňce regulována dostupností substrátu PEP, fosforylací a přítomností alosterických efektorů v cytoplasmě.

Aktivita PEPC je také ovlivněna teplotou a pH. Optimální pH pro PEPC je 8,1. [10,13].

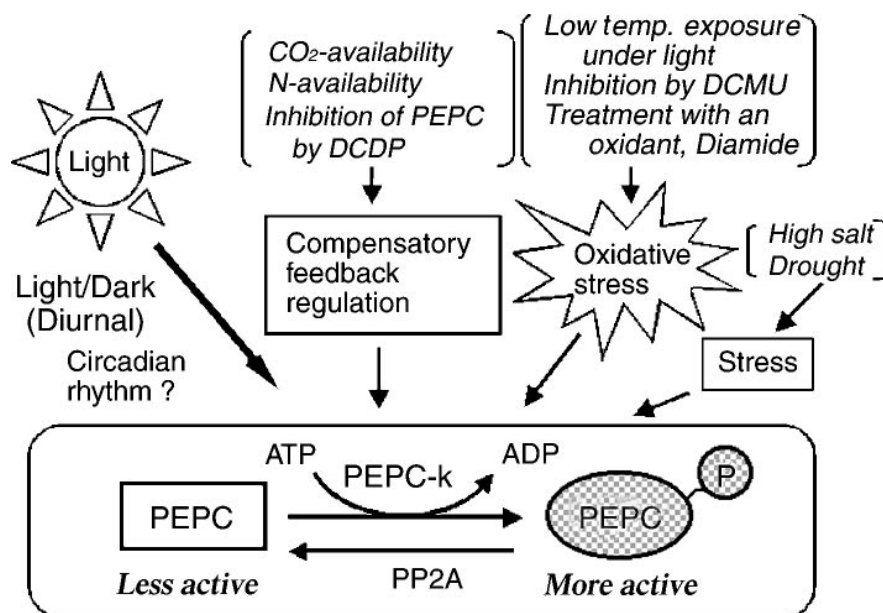
Mezi nejdůležitější alosterické efekторы, které se nacházejí v cytoplasmě, patří L-malát a D-glukosa-6-fosfát. L-malát, který vzniká z oxalacetátu (produktu PEPC) za katalýzy NAD-malátdehydrogenasou (EC 1.1.1.37), funguje jako zpětnovazebný inhibitor PEPC. D-glukosa-6-fosfát zvyšuje afinitu PEP k PEPC tím, že snižuje hodnotu K_m pro tento substrát [10,12].

V CAM rostlinách je aktivita PEPC regulována oligomerizací. Ve dne se enzym nachází ve formě dimeru, který není aktivní. V noci se tvoří aktivní tetrametr [10].

Aktivita PEPC je také regulována reverzibilní fosforylací serinu v blízkost N-koncové domény polypeptidu pomocí specifické PEPC kinasy. U rostlin tabáku se jedná o serin-11 [14].

Proces fosforylace je regulován především expresí PEPC kinasy, která je v C₄ rostlinách aktivována světlem a v CAM rostlinách je řízen cirkadiálním rytmem. Regulace exprese PEPC kinasy v C₃ rostlinách je složitější a je regulována světlem a dostupností dusíkatých a uhlíkatých látek [10]. Fosforylace PEPC je také ovlivněna stresem (Obr. 5) [10,15,16].

Fosforylace má vliv na změnu kinetických vlastností enzymu, především zvýšení maximální rychlosti reakce a zvýšení citlivosti vůči aktivátoru D-glukosa-6-fosfátu a její snížení vůči inhibici L-malátem. Defosforylaci provádí enzym proteinfosfatasa 2A [10,11,13,17].



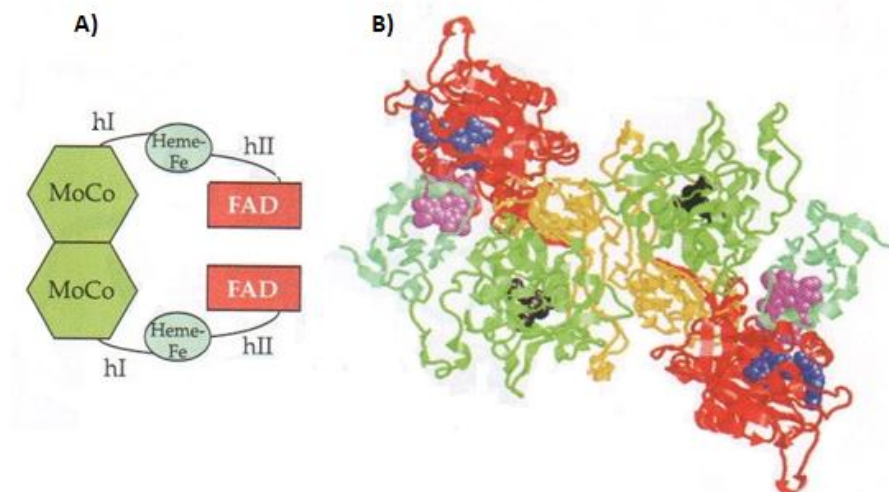
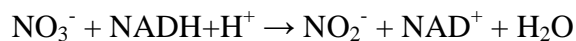
Obr. 5: Regulace aktivity PEPC. Aktivita PEPC je závislá fosforylací, kterou katalyzuje PEPC kinasa. Proces fosforylace je regulován expresí PEPC kinasy. Exprese je u C₄ rostlin řízena světlem a u CAM rostlin patrně cirkadiálním rytmem. Na expresi má také vliv stres rostliny, dostupnost dusíku a CO₂. Defosforylace provádí proteinfosfatasa 2A [10].

1.4.2 Nitrátreduktasa

1.4.2.1 Charakterizace nitrátreduktasy

Prvním krokem asimilace dusičnanů je redukce dusičnanů na dusitany. Tato reakce je katalyzována nitrátreduktasou (EC 1.7.1.1, NR). NR je cytosolový enzym o molekulové hmotnosti přibližně 200 kDa. V cytosolu je navázán na vnější stranu vnější membrány plastidů. Tento indukovaný komplexní enzym, vyskytující se ve formě dimeru, obsahuje tři kofaktory – flavinadeninindinukleotid, hem-Fe a molybdenový kofaktor (MoCo) (Obr. 6). Tyto kofaktory poskytují redoxní centra pro přenos elektronu z NADH na dusičnan [1,18,19].

Druhou reakcí, kterou katalyzuje NR, je vznik oxidu dusnatého z dusitanu. Tato reakce je však minoritní a využívá pouze jedno procento kapacity enzymu. Oxid dusnatý je velice důležitou látkou regulace rostlinného metabolismu, především za nefyziologických podmínek. [1,19].



Obr. 6: A) Schéma struktury NR B) Model struktury dimeru NR. Fialově je značená hemová prosthetická skupina, černě je vyznačen molybdenový kofaktor a modře FAD. Rozhraní mezi dimery je znázorněno žlutě [1].

1.4.2.2 Regulace aktivity nitrátreduktasy

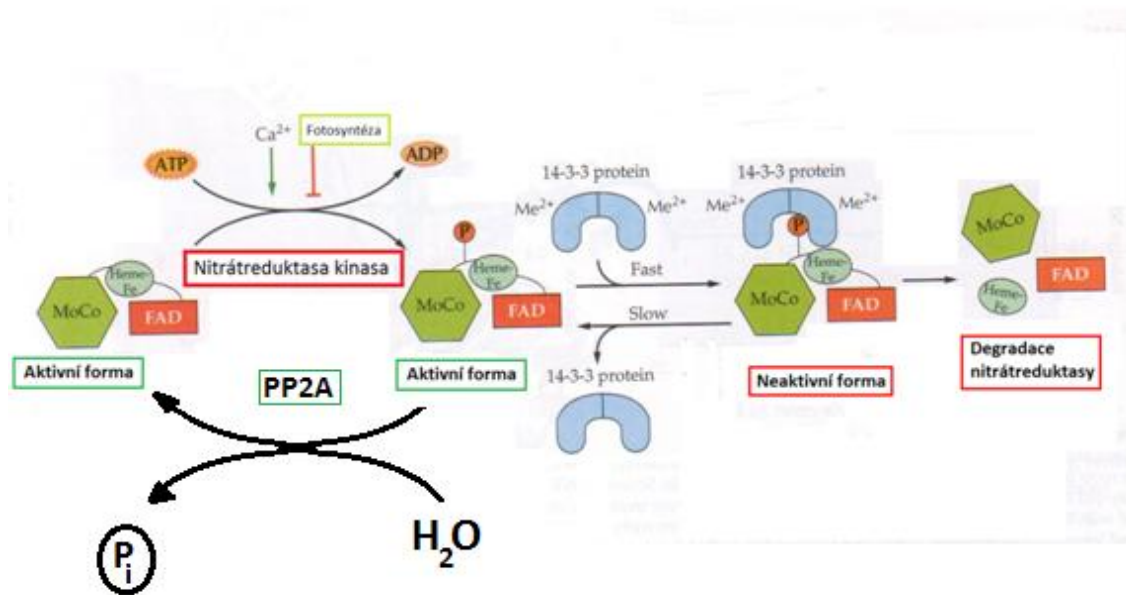
Aktivita nitrátreduktasy je vysoce regulována. Existují dva důvody, proč rostliny musejí regulovat aktivitu nitrátreduktasy. Zaprvé, protože redukce dusičnanů na dusitany je velmi energeticky náročný proces. Zadruhé, protože dusitany produkované nitrátreduktasou jsou cytotoxické. Aktivita nitrátreduktasy je regulována několika způsoby. [18,20]

Aktivita nitrátreduktasy je v první řadě regulována transkripcí mRNA genu pro nitrátreduktasu. K transkripci dochází pouze tehdy, pokud jsou v cytoplazmě přítomny dusičnany. Jedná se ovšem o velmi pomalou regulaci a syntéza NR trvá řádově hodiny. Pokud je množství nitrátů dostatečné, začíná syntéza mRNA nitrátreduktasy brzy ráno a svého vrcholu dosahuje v poledne. Aktivita nitrátreduktasy roste během první poloviny dne a maxima dosahuje v poledne. Poté pomalu klesá až do setmění [18,19].

Posttranslační modifikace umožňují regulaci aktivity nitrátreduktasy v řádu minut. Pokud je rostlina vystavena tmě nebo nízké koncentraci CO_2 , dojde k fosforylaci enzymu na 543 serinovém zbytku Ca^{2+} -dependentní proteinkinasy, následované Ca^{2+} a Mg^{2+} dependentní vazbou proteinu 14-3-3 na fosforylovaný serinový zbytek (Obr. 7). Tím dojde k přerušení přenosu elektronů a inhibice aktivity NR po dobu, kdy rostlina není osvětlena [18,19]. Přítomnosti kationtů Mg^{2+} je nezbytná pro zachování vazby nitrátreduktasy a proteinu 14-3-3. Koncentrace Mg^{2+} je velmi nízká během dne a tím umožňuje disociaci komplexu nitrátreduktasy a proteinu 14-3-3. Aktivita Ca^{2+} -dependentní kinasy je inhibována fyziologickou koncentrací glukosa-6-fosfátu. To značí potřebu koordinace metabolismu uhlíku a dusíku. Nedostatek dusičnanů nemá na fosforylaci nitrátreduktasy žádný vliv [1,18,20].

K reaktivaci fosforylované nitrátreduktasy dochází defosforylací serinu 543 proteinfosfatasou 2A. Tato defosforylace brání proteinu 14-3-3 ve vytvoření vazby s NR. Jako signál pro reaktivaci nitrátreduktasy slouží asimiláty fotosyntézy (Obr. 7) [18,20].

Množství nitrátreduktasy závisí také na rychlosti její degradace. NR je poměrně rychle po syntéze degradována, a to během několika hodin. NR v komplexu se 14-3-3 proteinem je výrazně rychleji degradována než NR volná [1,18,21].



Obr. 7: Předpokládaný model regulace aktivity NR fosforylací/defosforylací a vazbou proteinu 14-3-3. Aktivní NR je fosforylována NR kinasou. Na fosforylovanou NR se naváže dimer proteinu 14-3-3 a inaktivuje jí. Komplex NR a proteinu 14-3-3 je degradován. Pokud dojde k vyvázání proteinu 14-3-3 od NR, dojde k defosforylaci NR proteinfosfatasou 2A a enzym se vrátí opět do své aktivní formy [1].

2 Cíl práce

Přítomnost sacharosy v kultivačním médiu ovlivňuje metabolismus nejen sloučenin uhlíku, ale i dusíku.

Cílem této práce bylo zjistit, zda je ovlivněna aktivita PEPC, enzymu, který spojuje metabolismus sacharidů a aminokyselin.

Dalším cílem bylo zjistit, zda je ovlivněna aktivita NR, klíčového enzymu při asimilaci dusíku.

3 Materiál

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy 100 A	Denver instrument company, USA
Centrifuga	Hettich Universal 32R, Německo
Elektroforetická souprava	Biometra, Německo
Spektrofotometr Helios α	Thermo Spectronic, USA
Spektrofotometr Ultrospec 2 100	Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

3.2 Chemikálie

Akrylamid	Sigma, USA
Alkalická fosfatasa z hovězí střevní mukosy	Sigma, USA
Bradfordovo činidlo	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue G 250, R 250	Sigma, USA
D-glukosa-6-fosfát	Sigma, USA
Dodecylsírán sodný	Serva, Německo

DTT	Sigma, USA
EDTA	Sigma, USA
Ethanol	Lachema, ČR
PEP	Sigma, USA
HCl	Penta, ČR
KH ₂ PO ₄	Lachema, ČR
K ₂ HPO ₄	Lachema, ČR
Methanol	Lachema, ČR
MgCl ₂	Sigma, USA
N,N'-methylen-bis(akrylamid)	Sigma, USA
NADH	Sigma, USA
NAD ⁺	Sigma, USA
NNEDD	Sigma, USA
PEP	Sigma, USA
PVP	Sigma, USA
Sacharosa	Lachema, ČR
Sulfanilamid	Sigma, USA
TEMED	Serva, Německo
Tris	Sigma, USA

3.3 Rostlinný materiál

Rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 pasážované v uzavřených kultivačních nádobách s Marashige-Skoogovým agarem byly laskavě poskytnuty RNDr. Helenou Synkovou, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR.

4 Metody

4.1 Příprava vzorku z rostlinného materiálu

4.1.1 Pěstování rostlin tabáku

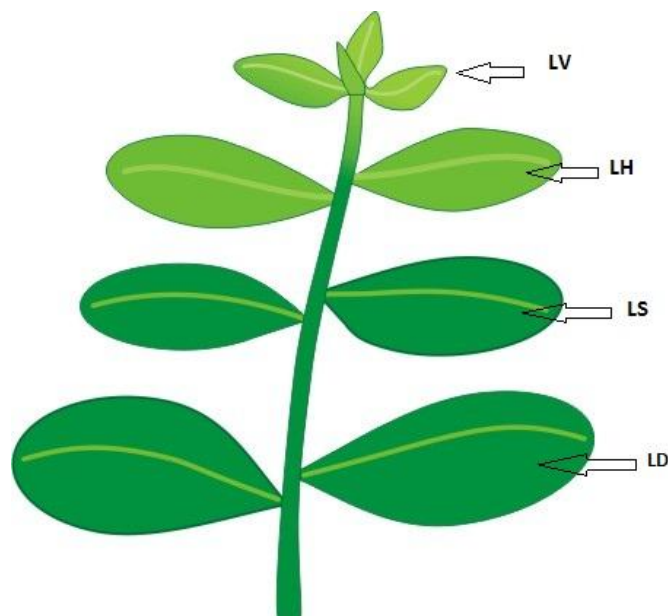
Rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 byly pasážovány do nádobky s kultivačním médiem čtyři týdnů po výsevu. Jako kultivační médium byl použit Marashige-Skoogův agar. Rostliny byly rozděleny do dvou skupin. První obsahovala 2% sacharosu v kultivačním médiu jako dodatečný zdroj uhlíku. Druhá skupina byla kontrolní a neobsahovala dodatečný zdroj uhlíku.



Obr. 8.: Kultivační nádoba, ve které byly pěstovány rostliny tabáku.

Rostliny byly zpracovávány tři týdny po pasážování. Rostlinný materiál byl rozdělen podle rostlinných částí na kořeny (K), listy dolní (LD), střední (LS) a horní plně vyvinuté (LH) a vrchní (LV). Z každé skupiny byly připraveny směsné vzorky.

Každý směsný vzorek obsahoval rostlinný materiál ze tří rostlin. Vzorky byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 9.: Schéma rostliny tabáku znázorňující rozdělení listů pro experiment.

4.1.2 Příprava rostlinného extraktu pro stanovení aktivity enzymů

Listy tabáku byly homogenizovány v třecí misce s trojnásobným množstvím extrakčního pufru A (100 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , 5% glycerol). K homogenátu bylo přidáno 0,03 g PVP na 1 ml homogenátu, který byl následně centrifugován při 16 600 g a teplotě 4°C po dobu 15 minut. Získaný supernatant byl použit jako extrakt pro stanovení aktivity enzymů.

4.2 Měření aktivity enzymů

4.2.1 Měření aktivity nitrátreduktasy

Stanovení aktivity nitrátreduktasy katalyzující přeměnu dusičnanu na dusitan je založeno na reakci dusitanu se sulfanilamidem, která poskytuje diazoniovou sůl. Ta reakcí se sloučeninou NNEDD tvoří fialové azobarvivo, jehož intenzita se stanovuje spektrofotometricky při 540 nm.

Reakční směs obsahovala 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 ; 10 mM EDTA; 0,15 mM NADH; 0,1 M KNO_3 . Reakce byla startována přidáním 100 μ l extraktu a probíhala 30 minut při teplotě 26 °C. Poté byl do reakční směsi přidán 5,8 mM sulfanilamid a 0,8 mM NNEDD. Referentní vzorek neobsahoval NADH a KNO_3 . Měření bylo provedeno na spektrofotometru *Ultrospec 2100* v kyvetě s optickou délkou 1 cm v reakčním objemu 1 ml [22]. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.2.2 Defosforylace nitrátreduktasy

Při studiu zdánlivé defosforylace nitrátreduktasy byla využita alkalická fosfatasa. K 50 μ l extraktu z vrchních listů bylo přidáno 15 U alkalické fosfatasy z hovězí střevní mukosy, zatímco kontrolní vzorek obsahoval 50 μ l extraktu a destilovanou vodu místo AP. Oba vzorky se nechaly inkubovat při 26 °C po dobu 60 min. Ke stanovení aktivity NR po působení AP bylo využito postupu 4.2.1 [23].

4.2.3 Měření aktivity fosfoenolpyruvátkarboxylasy

Pro měření aktivity fosfoenolpyruvátkarboxylasy bylo využito spřažené reakce, kdy v prvním kroku z fosfoenolpyruvátu vzniká OAA, jenž je následně za spotřeby NADH redukován pomocí NAD-dependentní malátdehydrogenasy na malát. Úbytek NADH byl měřen spektrofotometricky jako pokles absorbance při 340 nm po dobu 5

minut. Měření bylo provedeno na přístroji Helios α , v kyvetě s optickou délkou 1 cm. Reakce byla provedena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100mM Tris-HCl pufr (pH 8,1); 5mM NaHCO₃; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADH; 2 mM PEP.

Reakce byla startována přidáním 50 μ l extraktu [16]. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

4.2.4 Aktivace fosfoenolpyruvátkarboxylasy D-glukosa-6-fosfátem

Pro měření aktivace fosfoenolpyruvátkarboxylasy bylo využito postupu 4.2.3. Do reakční směsi byl přidán 5 mM D-glukosa-6-fosfát. Pro měření aktivity fosfoenolpyruvátkarboxylasy při subsaturační koncentraci fosfoenolpyruvátu byla výsledná koncentrace fosfoenolpyruvátu snížena na 0,2 mM.

4.2.5 Inhibice fosfoenolpyruvátkarboxylasy L-malátem

Pro měření inhibice fosfoenolpyruvátkarboxylasy bylo využito postupu 4.2.3. Do reakční směsi byl přidán 5 mM L-malát. Pro měření aktivity fosfoenolpyruvátkarboxylasy při subsaturační koncentraci fosfoenolpyruvátu byla výsledná koncentrace fosfoenolpyruvátu snížena na 0,2 mM.

4.2.6 Působení alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC

V rostlinách pěstovaných se sacharosou a v rostlinách pěstovaných bez sacharosy byl studován vliv alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC při pH 7,1 a 8,1. K 50 μ l extraktu z vrchních nebo horních listů bylo přidáno 15 U alkalické fosfatasy, zatímco kontrolní vzorek obsahoval 50 μ l extraktu a destilovanou vodu místo AP. Oba vzorky byly inkubovány při 26 °C po dobu 60 min. Pak byla u obou vzorků změřena aktivita PEPC podle postupu 4.2.3.

Optimalizace délky doby působení AP byla provedena po dobu dvou hodin s 30-ti minutovými intervaly měření aktivity PEPC, 500 μ l extraktu a 150 U AP (0,3 U AP na 1 μ l extraktu) [23].

4.3 Stanovení bílkovin metodou dle Bradfordové

Metoda stanovení množství bílkovin dle Bradfordové je založena na interakci Coomassie brilliant blue G 250 s aromatickými a bazickými aminokyselinami v bílkovině [24].

K 10 μ l rostlinného extraktu bylo přidáno 23,3 μ l destilované vody a 1 ml Bradfordova činidla. Po promíchání se nechala směs inkubovat 20 min. Poté byla změřena absorbance při 595 nm proti referentnímu vzorku obsahujícímu 33,3 μ l destilované vody a 1 ml Bradfordova činidla [24].

Hodnota absorbance při 595 nm byla pomocí kalibrační přímky přepočtena na množství bílkovin. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 0,25 – 1,4 mg.ml⁻¹.

4.4 Elektroforetické separace proteinů

Elektroforetická separace proteinů je metoda využívající skutečnosti, že nabitě molekuly se pohybují v elektrickém poli. Rychlost pohybu nabitě částice je dána její velikostí, vlastností jejího povrchu a jejím nábojem.

Jako nosič byl použit polyakrylamidový gel. Ten se připravoval kopolymerací akrylamidu a N,N-methylen-bis-akrylamidu v poměru 73:2. Elektroforetická separace proteinů byla provedena soupravou Biometra. Na začátku separace bylo napětí nastaveno na 70 V. Poté, co vzorek opustil zaostřovací gel, bylo napětí zvýšeno na 140 V.

4.4.1 Elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS

Elektroforetické separace proteinů v prostředí dodecylsulfátu sodného patří mezi separace denaturující. Dodecylsulfát sodný se váže na bílkoviny v poměru 1,4:1 a uděluje jim uniformní náboj a tvar. Jedná se o tyčinky konstantního průměru a délky odpovídající relativní molekulové hmotnosti. Díky tomu dochází během elektroforetické separace proteinů k dělení pouze na základě relativní molekulové hmotnosti proteinů [25,26].

4.4.1.1 Příprava gelu pro elektroforetickou separaci proteinů v denaturujícím prostředí

Pro elektroforetickou separaci proteinů v prostředí SDS byl pro lepší rozdělení použit polyakrylamidový gel s gradientem koncentrace gelu. Ten vznikl smísením 10 % a 15 % separačního gelu. Koncentrace zaostřovacího gelu byla 5%. Do každé ze dvou oddělených sekcí v mísiči gradientu byl nalit jeden ze separačních gelů. Z mísiče gradientů byl poté gel o měnícím se gradientu nalit mezi dvě skla určená k tuhnutí gelu. Tento gel byl po ztuhnutí převrstven zaostřovacím gelem.

10% separační gel o celkovém objemu 5 ml obsahoval 1,9 ml destilované vody; 1,7 ml 30% směsi akrylamid/BIS; 1,3 ml 1,5M Tris-HCl pufru, pH 8,8; 50 μ l 10% SDS; 2 μ l TEMED; 50 μ l 10 % peroxodisíranu amonného.

15% separační gel o celkovém objemu 5 ml obsahoval 1,1 ml destilované vody; 2,5 ml 30% směsi akrylamid/BIS; 1,3ml 1,5M Tris-HCl pufru, pH 8,8; 50 μ l 10% SDS; 2 μ l TEMED a 50 μ l 10 % peroxodisíranu amonného.

5% zaostřovací gel o celkovém objemu 6 ml obsahoval 4,1 ml destilované vody; 1 ml 30% směsi akrylamid/BIS; 750 μ l 1,0M Tris-HCl pufru, pH 6,8; 60 μ l 10% SDS; 6 μ l TEMED a 60 μ l 10 % peroxodisíranu amonného.

4.4.1.2 Příprava vzorku

Rostlinný extrakt byl smíchán 1:1 se vzorkovým pufrům, který obsahoval: 0,1542 g DTT, 0,5 ml 0,1% bromfenolové modře, 2 ml glycerolu, 2 ml 10% SDS, 2,6 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) a 2,9 ml destilované vody. Směs byla poté zahřáta k varu.

Takto připravený vzorek byl po zchladnutí aplikován do jamek v gelu po 25 μ l.

4.4.1.3 Detekce proteinů v gelu

Gel byl po separaci umístěn do barvicí lázně. Barvicí lázeň obsahovala v 1 litru 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250, 425 ml ethanolu, 50 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové a 425 ml destilované vody. Po obarvení byl gel umístěn do odbarvovací lázně, která obsahovala kyselinu octovou, etanol a destilovanou vodu v poměru 2:5:13.

4.4.2 Elektroforetická separace proteinů v nedenuřujícím prostředí

Při elektroforetické separaci proteinů v nedenuřujícím prostředí nedochází, na rozdíl od elektroforetické separace v prostředí SDS, k denuraci proteinů. SDS je nahrazeno glycerolem, vzorky jsou aplikovány v sacharose místo denurujícího vzorkového pufru a vzorky neprocházejí varem. Díky tomu je možné po separaci specificky detekovat aktivitu enzymu přímo v gelu. [26]

4.4.2.1 Příprava gelu pro elektroforetickou separaci proteinů v nedenuřujícím prostředí

Pro separaci byl použit 6% separační polyakrylamidový gel o celkovém objemu 10 ml obsahující 5,2 ml destilované vody; 2 ml 30% směsi akrylamid/BIS; 2,6 ml 1,5 M

Tris-HCl pufu, pH 8,8; 100 μ l 10% glycerolu; 8 μ l TEMED; 100 μ l 10 % peroxidisíranu amonného.

A dále pak 3% zaostřovací polyakrylamidový gel o celkovém objemu 4 ml obsahující 3 ml destilované vody; 400 μ l 30% směsi akrylamid/BIS; 500 μ l 1,0 M Tris-HCl pufu, pH 6,8; 40 μ l 10% glycerolu; 8 μ l TEMED; 40 μ l 10 % peroxidisíranu amonného.

4.4.2.2 Příprava vzorků pro elektroforetickou separaci proteinů v nedenaturujícím prostředí

K rostlinnému extraktu byla přidána sacharosa tak, aby její výsledná koncentrace byla 20 %. Takto připravené vzorky byly poté aplikovány do jamek v gelu v množství 25 μ l.

4.4.2.3 Detekce aktivity nitrátreduktasy v polyakrylamidovém gelu

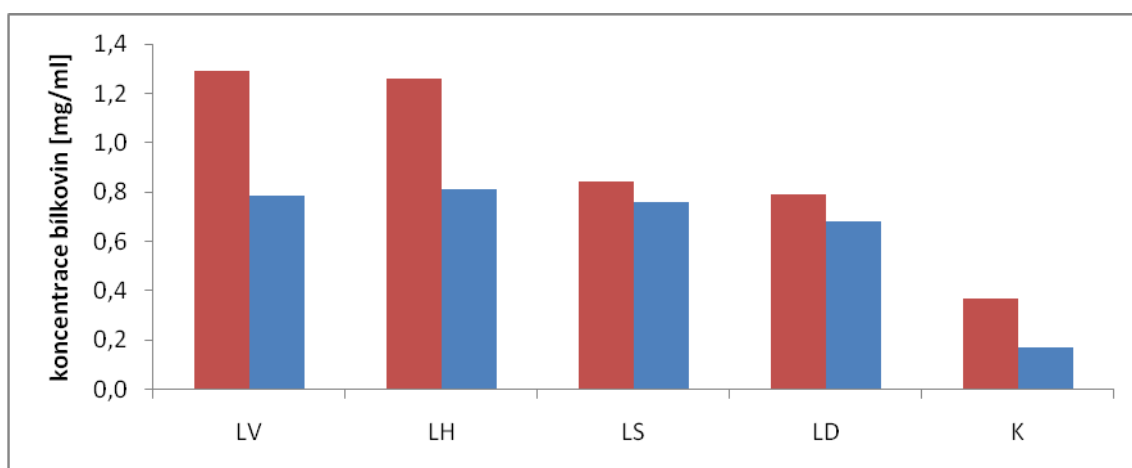
Po elektroforetické separaci proteinů byla provedena detekce aktivity NR v gelu. Gel byl umístěn do reakční směsi obsahující 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 ; 10 mM EDTA; 0,15 mM NADH; 0,1 M KNO_3 . Gel byl ponechán v reakční směsi přes noc a poté byl do reakční směsi přidán 5,8 mM sulfanilamid a 0,8 mM NNEDD. [22]

5 Výsledky

Ze dvou skupin rostlin pěstovaných *in vitro* v Marashige-Skoogově agaru v přítomnosti sacharosy a bez sacharosy byly odebrány směsné vzorky a připraveny rostlinné extrakty. V těchto extraktech byl stanoven obsah proteinů a aktivita PEPC a NR.

5.1 Stanovení množství bílkovin v rostlinném extraktu

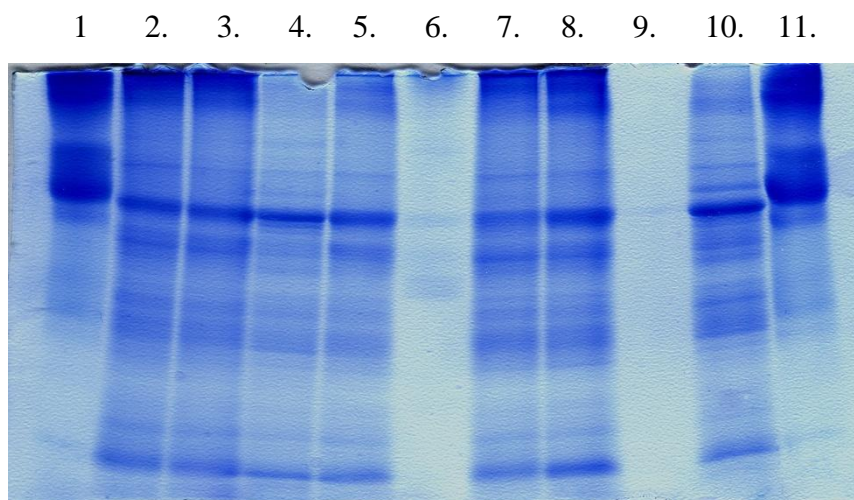
Bylo zjištěno, že rostliny pěstované v přítomnosti sacharosy obsahují více bílkovin než rostliny, u kterých sacharosa nebyla v kultivačním médiu přítomna. Dále bylo zjištěno, že nejméně bílkovin se nachází v kořenech rostlin. V rostlinách pěstovaných bez sacharosy v kultivačním médiu se ve všech listech rostlin tabáku nacházelo přibližně stejné množství bílkovin. V rostlinách pěstovaných se sacharosou bylo množství bílkovin v horních plně vyvinutých listech a vrchních listech výrazně vyšší než v ostatních částech rostliny (Obr. 10).



Obr. 10: Množství bílkovin v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu s přidavkem sacharosy (■) a bez sacharosy (■).

Zkratky: LV –vrchní listy, LH – horní plně vyvinuté listy, LS – střední listy, LD – dolní listy, K – kořeny

Pomocí elektroforetické separace proteinů v přítomnosti SDS bylo porovnáváno zastoupení proteinů v extraktech rostlin pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou a pěstovaných bez sacharosy v kultivačním médiu. Obrázek 11 dokumentuje, že mezi oběma skupinami nebyl zjištěn kvalitativní rozdíl v zastoupení proteinů.

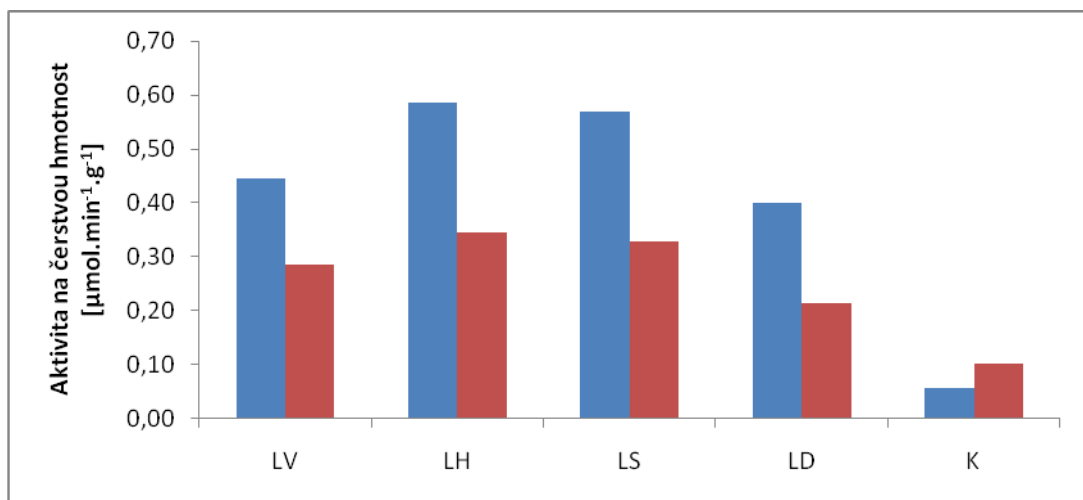


Obr. 11: Gel elektroforetické separace proteinů v prostředí SDS v gradientu 10 - 15 % polyakrylamidového gelu. V 1. a 11. jamce je standard BSA (50 μ g). V jamkách 2. a 3. je 25 μ l extraktu z horních plně vyvinutých listů pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou, v jamkách 4. a 5. je 25 μ l extraktu ze středních listů pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosy. V jamce číslo 6. je komerční standard Sigma obsahující 8 proteinů s relativní molekulovou hmotností od 36 000 do 205 000. V jamkách 7. a 8. je 25 μ l extraktu z horních plně vyvinutých listů pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou, v jamce 10. je 25 μ l extraktu ze středních listů pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosy.

5.2 Aktivita PEPC v rostlinách pěstovaných se sacharosou a bez sacharosy

V rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou a rostlin pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosy byla sledována aktivita PEPC. Aktivita PEPC byla v různých částech rostliny rozdílná. Nejvyšší aktivita byla zjištěna v listech horních a středních, nejnižší v kořenech (Obr. 12).

V rostlinách pěstovaných se sacharosou byla zjištěna výrazně vyšší aktivita PEPC než v rostlinách pěstovaných bez sacharosy (Obr. 12).



Obr. 12: Aktivita PEPC v různých částech rostlin tabáku pěstovaných se sacharosou (■) a bez sacharosy (■) v kultivačním médiu. Aktivita byla měřena při optimálním pH 8,1. Zkratky: LV –vrchní listy, LH – horní plně vyvinuté listy, LS – střední listy, LD – dolní listy, K – kořeny

5.3 Studium regulace PEPC

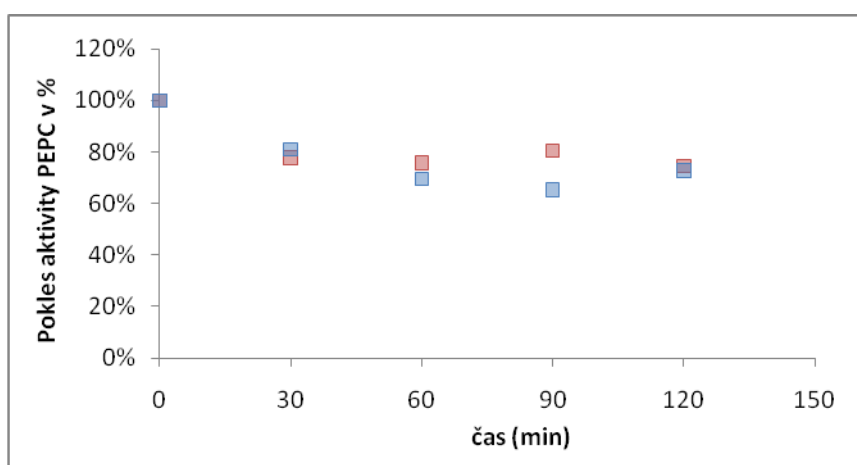
Aktivitu PEPC v buňce ovlivňuje fosforylace serinového zbytku. Tato fosforylace molekuly PEPC ovlivňuje působení alosterických modulátorů přítomných v buňce. V této práci bylo zjišťováno, zda se PEPC v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou a bez sacharosy liší v parametrech ovlivnitelných

fosforylací. Bylo sledováno působení alkalické fosfatasy na PEPC, inhibice L-malátem a aktivace D-glukosa-6-fosfátem.

5.3.1 Působení alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC

Z fosforylované formy PEPC může být fosfát hydrolyzován účinkem alkalické fosfatasy. V této práci byl sledován vliv alkalické fosfatasy na aktivitu fosfoenolpyruvátcarboxylasy u rostlin pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou a bez sacharosy.

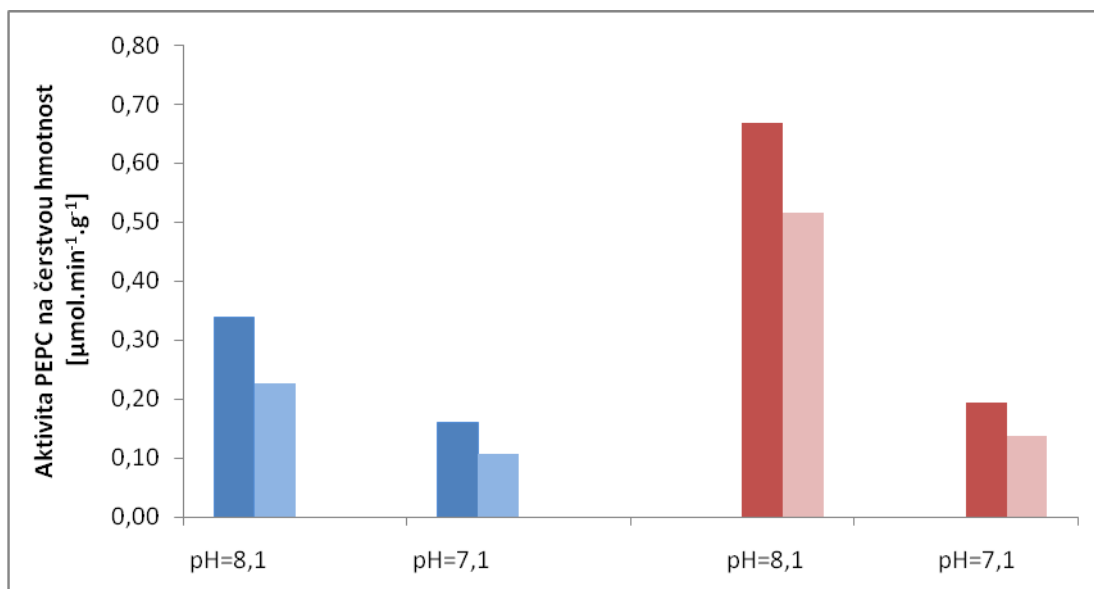
Nejprve byla provedena optimalizace délky doby působení AP na PEPC po dobu dvou hodin s 30-ti minutovými intervaly měření aktivity PEPC (Obr. 13). Po 30 minutách byl znatelný pokles aktivity PEPC u obou skupin rostlin. Po jedné hodině aktivita PEPC ještě mírně klesla, ale po další hodině již neklesala. Na základě tohoto experimentu byl vybrán jako optimální čas působení alkalické fosfatasy jedna hodina.



Obr. 13: Optimalizace působení alkalické fosfatasy pro rostliny pěstované se sacharosou (■) a bez sacharosy (■). V grafu je vynesena pokles aktivity PEPC po působení AP oproti kontrole bez AP.

V horních plně vyvinutých listech rostlin pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosy klesla po působení alkalické fosfatasy aktivita PEPC při pH 8,1 o 33 %. V rostlinách se sacharosou byl pokles o 23 %.

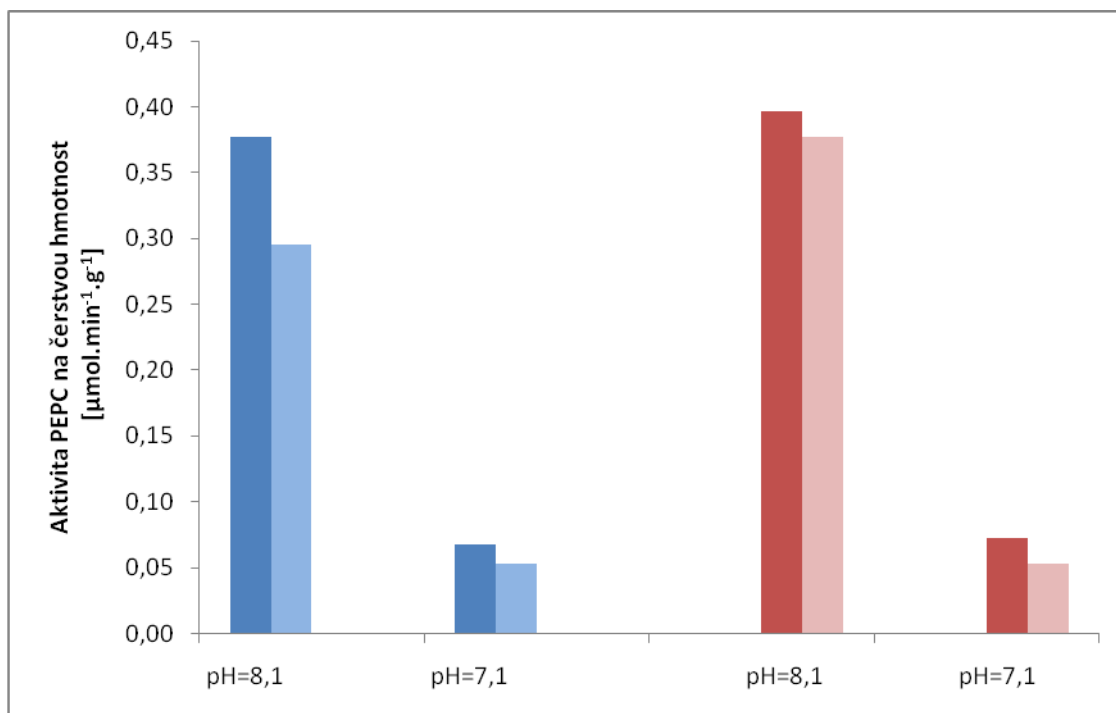
Stejný pokus byl proveden při pH 7,1. V horních listech rostlin pěstovaných v kultivačním médiu bez přídavku sacharosu činil pokles aktivity PEPC působením AP 33 %. Pro rostliny pěstované v kultivačním médiu s přídavkem sacharosu byl zaznamenán pokles aktivity o 29 % (Obr. 14).



Obr. 14: Srovnání aktivity PEPC při pH 7,1 a 8,1 v horních plně vyvinutých listech rostlin tabáku pěstovaných se sacharosou (■) a bez sacharosu (■) v kultivačním médiu, v extraktu po působení alkalické fosfatasy (■, ■) oproti kontrole bez působení AP (■, ■).

Při sledování vlivu alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC při pH 8,1 v horních listech byl zaznamenán v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez přídavku sacharosu pokles aktivity o 22 %. V rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu s přídavkem sacharosu činil tento pokles pouze 5 %.

Při sledování vlivu alkalické fosfatasy na aktivitu PEPC při pH 7,1 ve vrchních listech byl zaznamenán v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez přídavku sacharosu pokles o 21 %. V rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu s přídavkem sacharosu činil tento pokles 27 % (Obr. 15, str. 32).



Obr. 15: Srovnání aktivity PEPC při pH 7,1 a 8,1 ve vrchních listech rostlin tabáku pěstovaných se sacharosou (■) a bez sacharosu (■) v kultivačním médiu po působení alkalické fosfatasy (■, ■) v extraktu.

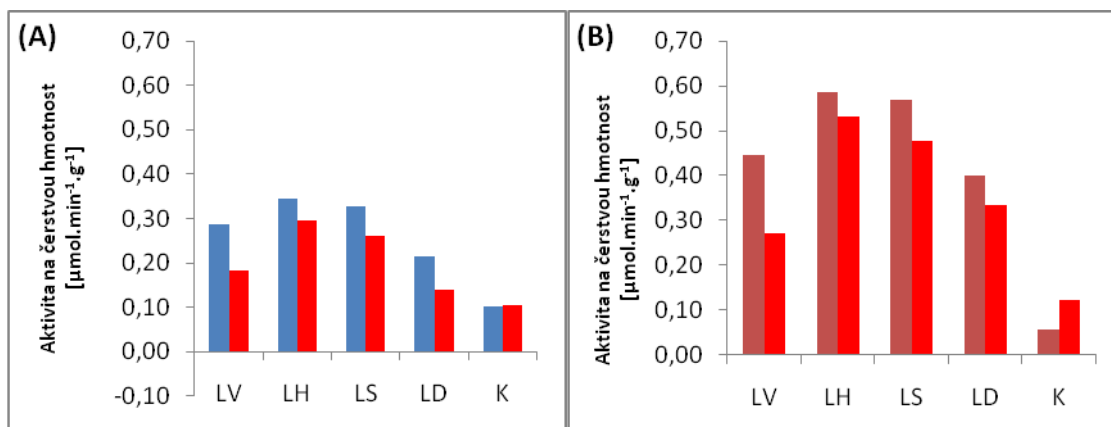
5.3.2 Vliv L-malátu na aktivitu PEPC

V rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez přítomnosti sacharosu a rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou byl sledován vliv L-malátu na aktivitu PEPC při pH 8,1.

Nejvyšší pokles aktivity PEPC vlivem L-malátu v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez přítomnosti sacharosu byl zaznamenán v listech vrchních. Zde pokles činil 36 %. Naopak v kořenech nebyla aktivita ovlivněna (Obr. 16 A, str. 34).

Také v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou byl sledován vliv L-malátu na aktivitu PEPC. Zde byl nejvyšší pokles zaznamenán v listech vrchních, a to o 39 %. Naopak v listech horních byl zaznamenán pokles pouze o 10 % (Obr. 16, B, str. 34).

Celkově byl pokles aktivity v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosu vyšší než v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou (Obr. 16 A,B, str. 34).



Obr. 16: Vliv L-malátu (■) na aktivitu PEPC v různých částech rostlin tabáku pěstovaných se sacharosou (■)(A) a bez sacharosy (■)(B) v kultivačním médiu při pH 8,1.

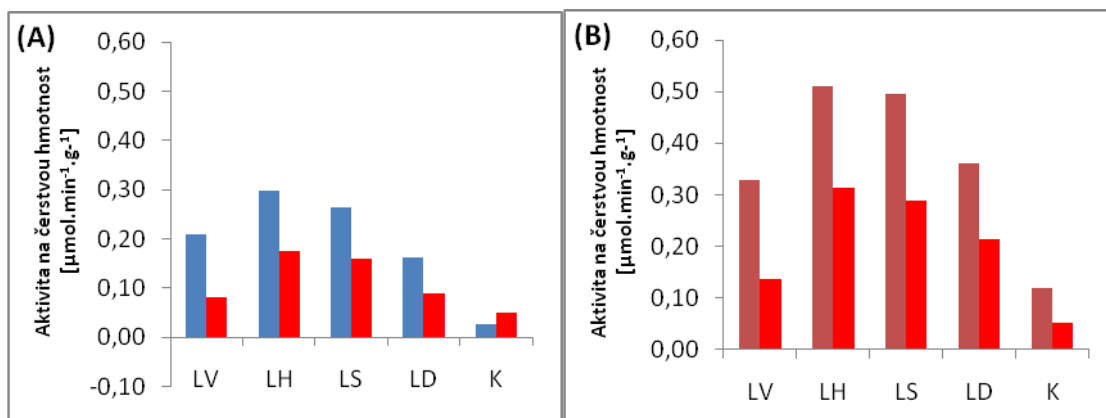
Zkratky: LV –vrchní listy, LH – horní plně vyvinuté listy, LS – střední listy, LD – dolní listy, K – kořeny

V listech rostlin pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosy a se sacharosou byl sledován vliv L-malátu na aktivitu PEPC za subsaturační koncentrace PEP při pH 8,1.

Nejvyšší pokles aktivity PEPC vlivem L-malátu v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosy byl zaznamenán v listech vrchních. Pokles zde činil 60 %. Naopak v kořenech došlo k poklesu pouze o 34 % (Obr. 17 A, str. 35).

V rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou byl sledován vliv L-malátu na aktivitu PEPC. Nejvyšší pokles aktivity PEPC byl zaznamenán v listech vrchních. Zde činil 59 %. Naopak nejnižší byl v listech horních, a to 39 % (Obr. 17 B, str. 35).

Celkově byl pokles aktivity PEPC působením L-malátu při subsaturační koncentraci PEP v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosy a rostlin pěstovaných v kultivačním se sacharosou velmi podobný (Obr. 17 A, B, str. 35).



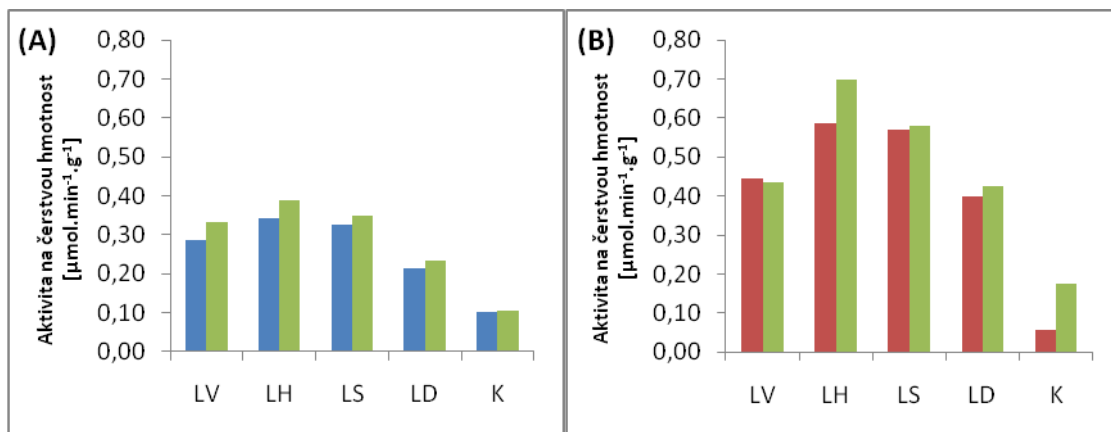
Obr. 17: Vliv L-malátu (■) na aktivitu PEPC v různých částech rostlin tabáku pěstovaných bez sacharosy (■)(A) a se sacharosou (■)(B) v kultivačním médiu a přítomností PEP v subsaturační koncentraci při pH 8,1.

Zkratky: LV –vrchní listy, LH – horní plně vyvinuté listy, LS – střední listy, LD – dolní listy, K – kořeny

5.3.3 Vliv D-glukosa-6-fosfátu na aktivitu PEPC

V rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosy a rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou byl sledován vliv D-glukosa-6-fosfátu na aktivitu PEPC při pH 8,1.

Při saturační koncentraci PEP a pH 8,1 byla aktivace ve všech případech nízká. Výsledky dokumentuje obrázek 18 A, B, str. 36. Nejvyšší nárůst aktivity PEPC vlivem D-glukosa-6-fosfátu v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez přítomnosti sacharosy byl zaznamenán v listech vrchních. Zde nárůst činil 16 %. Naopak v kořenech byl zaznamenán nárůst jen o 5 % (Obr. 18 A, str. 36). Podobných výsledků bylo dosaženo v případě vlivu glukosa-6-fosfátu na aktivitu PEPC v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu s přidavkem sacharosy. Zde byl nejvyšší nárůst aktivity zaznamenán v listech horních, a to 19 %. Naopak v listech vrchních nebyla zaznamenána žádná změna aktivity PEPC (Obr. 18 B, str. 36).



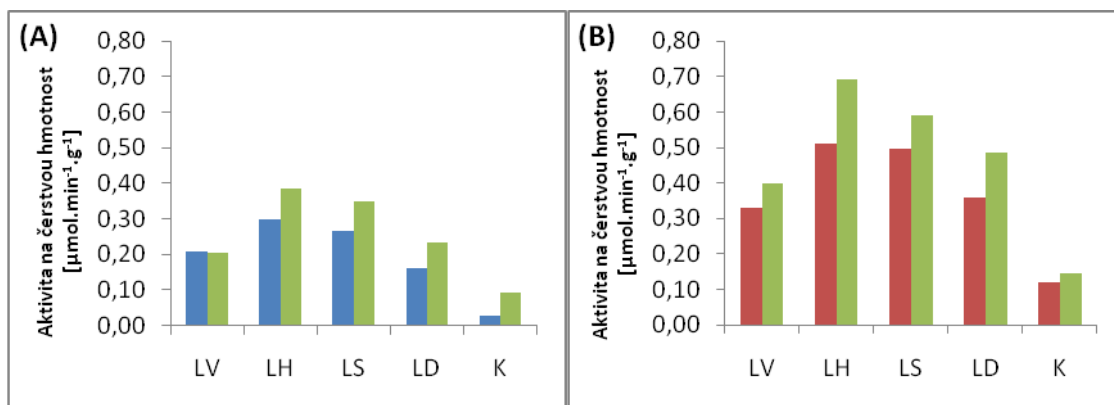
Obr. 18: Vliv D-glukosa-6-fosfátu (■) na aktivitu PEPC v různých částech rostlin tabáku pěstovaných bez sacharosu (■)(A) a se sacharosou (■)(B) v kultivačním médiu při pH 8,1.

Zkratky: LV –vrchní listy, LH – horní plně vyvinuté listy, LS – střední listy, LD – dolní listy, K – kořeny

Stejný pokus byl proveden při subsaturační koncentraci PEP. Výsledek dokumentuje obr. 19 A, B, str. 37.

V listech dolních v rostlinách pěstovaných bez sacharosu činil nárůst 43 %. V kořenech 18 % (Obr. 19 A, str. 37). V listech horních rostlin pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou byl zaznamenán nárůst aktivity PEPC o 35%. Nejnižší nárůst byl zaznamenán v listech středních a to o 19 % (Obr. 19 B, str. 37).

Celkově byl nárůst aktivity v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosu a rostlin pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou velmi podobný.

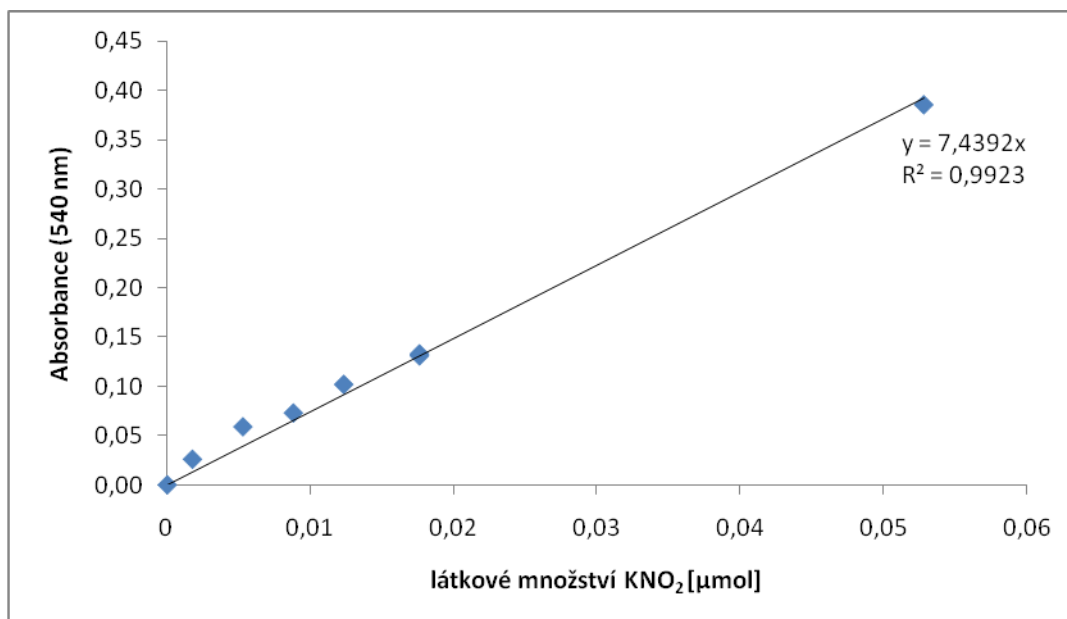


Obr. 19: Vliv D-glukosa-6-fosfátu (■) na aktivitu PEPC v různých částech rostlin tabáku pěstovaných bez sacharosy (■)(A) a se sacharosou (■)(B) v kultivačním médiu a přítomností PEP v subsaturační koncentraci při pH 8,1.

Zkratky: LV –vrchní listy, LH – horní plně vyvinuté listy, LS – střední listy, LD – dolní listy, K – kořeny

5.4 Aktivita NR v rostlinách pěstovaných se sacharosou a bez sacharosy

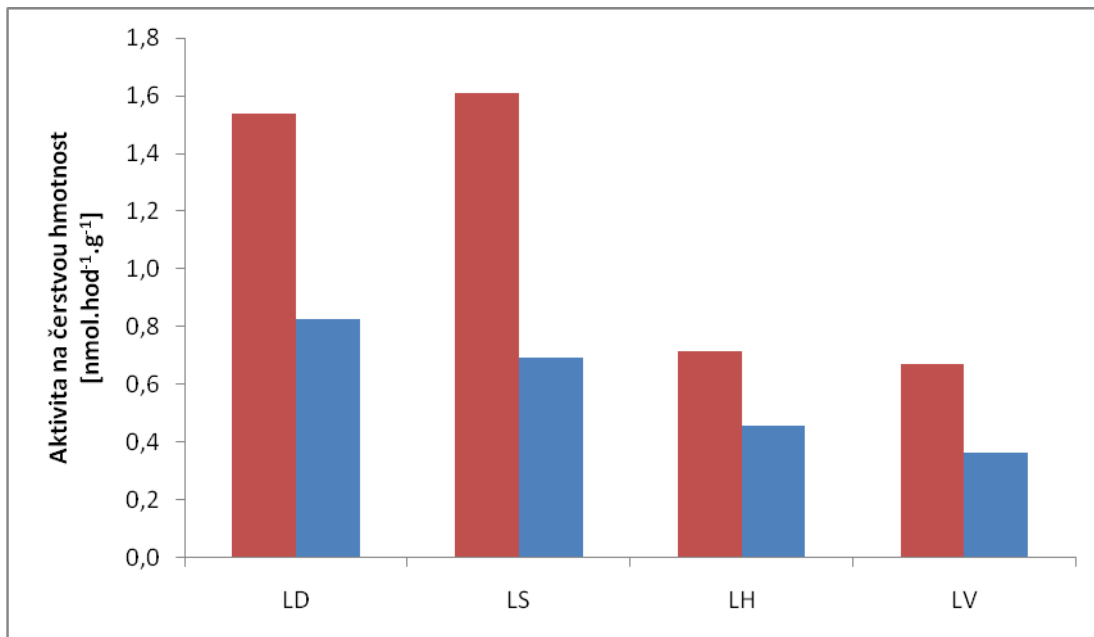
V rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou a rostlinách pěstovaných bez sacharosy byla sledována aktivita NR. Stanovení NR je založeno na sledování změny absorbance při 540 nm, ke které dochází reakcí produktu reakce katalyzované NR (dusitanem) se sulfanilamidem a NNEDD za vzniku azobarviva. Pro výpočet aktivity NR byla použita kalibrační přímka (Obr. 20, str. 38) sestavená pro látkové množství 0 až 52,8 nmol KNO_2 [22]



Obr. 20: Kalibrační přímka závislosti absorbance azobarviva na látkovém množství dusitanových anionů.

Sledovaná aktivita NR byla v různých částech rostliny velmi rozdílná. Nejvyšší byla v listech dolních a středních. Naopak nejnižší byla v listech horních a vrchních (Obr. 21).

V rostlinách pěstovaných se sacharosou byla zjištěna vyšší aktivita NR než v rostlinách pěstovaných bez sacharosy. U středních listů byl rozdíl více než dvojnásobný. Nejmenší rozdíl byl naměřen v horních listech (Obr. 21, str. 39).

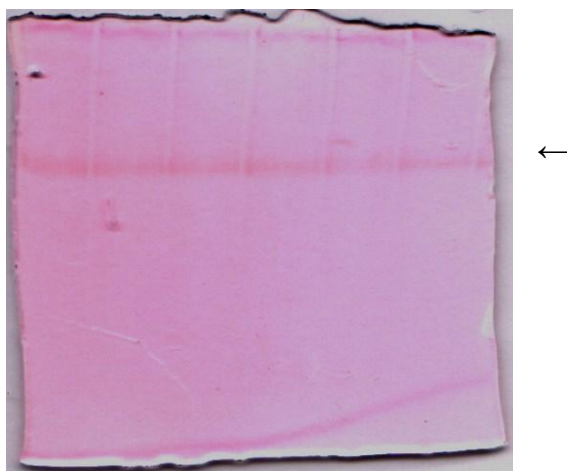


Obr. 21: Srovnání aktivity nitrátreduktasy v různých částech rostlin tabáku pěstovaných se sacharosou (■) a bez sacharosy (■) v kultivačním médiu.

Zkratky: LV –vrchní listy, LH – horní plně vyvinuté listy, LS – střední listy, LD – dolní listy

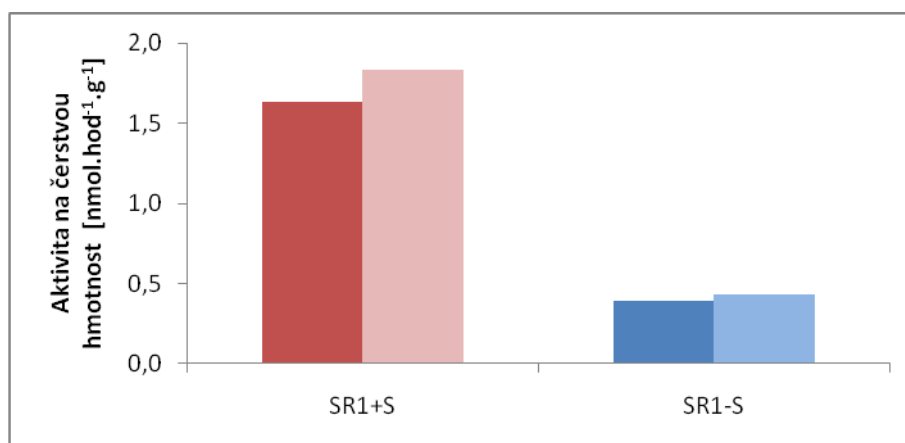
Byla provedena nativní elektroforetická separace proteinů z rostlinného extraktu a následná detekce aktivity nitrátreduktasy v gelu. Na obr. 22, str. 40 je detekována aktivita NR ve formě jednoho proužku, a to jak pro rostliny tabáku pěstované se sacharosou (obr. 22, dráha 1, 2, 3) tak i pro rostliny pěstované bez sacharosy (obr. 22, dráha 4, 5, 6, str. 40). Na tomto obrázku není patrný rozdíl v intenzitě proužků mezi oběma skupinami rostlin.

1. 2. 3. 4. 5. 6.



Obr. 22: Detekce aktivity nitrátreduktasy po nativní elektroforetické separaci proteinů v 6 % polyakrylamidovém gelu. V jamkách 1, 2 a 3 je 25 μ l extraktu z vrchních listů pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou. V jamkách 4, 5 a 6 je 25 μ l extraktu z horních listů pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosu.

Aktivita nitrátreduktasy je také ovlivňována fosforylací. Aktivní je defosforylovaný enzym. Byl sledován vliv alkalické fosfatasy na aktivitu NR. Výsledek dokumentuje (Obr. 23). Aktivita NR v rostlinách pěstovaných se sacharosou a bez sacharosu se po působení alkalické fosfatasy zvýšila jen velmi málo. Z tohoto výsledku nelze říct, zda jsou všechny molekuly v nefosforylovaném stavu, či zda NR není substrátem použité fosfatasy.



Obr. 23: Vliv působení alkalické fosfatasy (■, ■) na aktivitu nitrátreduktasy v horních plně vyvinutých listech rostlin pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou (■) a bez sacharosu (■).

6 Diskuze

Rostliny jsou za fyziologických podmínek autotrofní organismy, které využívají fotosyntetickou fixaci oxidu uhličitého pro syntézu sacharidů. V této práci bylo zkoumáno, zda přítomnost sacharosy v kultivačním médiu ovlivňuje aktivitu PEPC a NR. Rostliny *Nicotiana tabacum* L. byly pěstovány v kultivačních nádobách v Marashige-Skoogově agaru. K rostlinám označeným SR1+S byla do kultivačního média přidána sacharosa. Rostliny SR1-S sloužily jako kontrola.

Prvním sledovaným enzymem byla PEPC. Tento enzym plní řadu funkcí, jako je dodávání intermediátů do citrátového cyklu a vzhledem k tomu, že substrátem PEPC je PEP (intermediát glykolýzy) a produktem oxalacetát (který může být transaminován na aspartát) propojuje tento enzym metabolismus uhlíku a dusíku. [10,27].

Při sledování aktivity PEPC bylo zjištěno, že v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou byla aktivita PEPC vyšší o 55 až 86 % než v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu bez sacharosy v závislosti na části rostliny (Obr. 12, str. 30).

Aktivita PEPC je regulována fosforylací serinového zbytku blízko N-konce molekuly. Tato fosforylace znamená změnu kinetických vlastností PEPC, například maximální rychlosti reakce, aktivaci D-glukosa-6-fosfátem či inhibici L-malátem. V této práci bylo zjišťováno, zda se změní aktivita PEPC po působení alkalické fosfatasy. Obrázek 14 a 15 na str. 32 a 33 dokumentuje pokles aktivity PEPC v průměru o 27 % pro rostliny pěstované bez sacharosy a o 21 % pro rostliny pěstované se sacharosou. Domnívám se, že z těchto výsledků vyplývá, že není rozdíl ve fosforylaci PEPC v těchto dvou skupinách rostlin.

Ani aktivace D-glukosa-6-fosfátem neposkytla rozdílné výsledky pro rostliny pěstované se sacharosou a bez sacharosy. Aktivace PEPC je ovlivněna koncentrací substrátu PEP, v subsaturační koncentraci je aktivace vyšší (Obr. 18, 19, srov. 36, 37).

Inhibice L-malátem je mnohými autory používána ke studiu fosforylace PEPC [7,18]. Avšak v rostlinách tabáku bylo zjištěno, že defosforylovaná forma PEPC má nižší maximální rychlost, je méně aktivována D-glukosa-6-fosfátem, ale je stejně citlivá k L-malátu jako fosforylovaná forma PEPC [28]. V případě sledování tohoto parametru

v rostlinách tabáku pěstovaných se sacharosou a bez sacharosy nebyl zjištěn výrazný rozdíl v inhibici PEPC L-malátem v obou skupinách rostlin (Obr. 16, 17, str. 35, 36). Tento parametr je však právě v rostlinách tabáku nevhodný pro sledování.

Dalším sledovaným enzymem je NR. Tento enzym se podílí na příjmu dusíku, katalyzuje přeměnu dusičnanů na dusitany [1]. Bylo zjištěno, že vyšší aktivitu vykazují dolní a střední listy. Naopak v kořenech nebyla žádná aktivita NR (Obr. 21, str. 39). Z toho lze předpokládat, že námi sledované rostliny *Nicotiana tabacum* L. patří mezi rostliny, které redukují nitráty převážně v listech a ne v kořenech [2]. Dále bylo zjištěno, že rostliny pěstované v kultivačním médiu se sacharosou vykazují o 90 % vyšší aktivitu nitrátoreduktasy než rostliny pěstované v kultivačním médiu bez sacharosy (obr. 21, str. 39). To značí, že rostlina redukuje více nitrátů pro syntézu aminokyselin. To je patrně umožněno lepší dostupností intermediátů metabolismu uhlíku, které mohou být použity pro tvorbu skeletu aminokyseliny.

Při sledování působení alkalické fosfatasy na aktivity nitrátoreduktasy bylo zjištěno, že aktivita NR se působením alkalické fosfatasy zvyšuje (obr. 23, str. 40). Zvýšení aktivity NR bylo ovšem jen mírné. To pravděpodobně bylo způsobeno tím, že NR je aktivní hlavně ve dne a použité rostliny byly sklizeny během dne. Proto je enzym jen velmi málo fosforylován. Rozdíl v aktivitě NR po působení alkalické fosfatasy mezi rostlinami pěstovanými v kultivačním médiu se sacharosou a bez sacharosy byl velmi malý (obr. 23, str. 40). Zdá se, že rozdíl v míře fosforylace enzymu ve dne v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou a bez sacharosy není, ale zjištěná vyšší aktivita NR v rostlinách pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou by mohla souviset s vyšší expresí NR.

7 Závěr

- Rostliny tabáku pěstované *in vitro* v kultivačních nádobách v Marashige-Skoogově agaru se sacharosou obsahovaly více proteinů než rostliny pěstované bez sacharosy.
- V rostlinách tabáku pěstovaných *in vitro* v kultivačním médiu se sacharosou byla naměřena vyšší aktivita PEPC než v rostlinách bez sacharosy.
- Aktivace PEPC se po působení alkalické fosfatasy snižuje, pokles je přibližně stejný v rostlinách pěstovaných se sacharosou i bez sacharosy.
- Vliv D-glukosa-6-fosfátu i L-malátu na aktivitu PEPC je srovnatelný v rostlinách pěstovaných se sacharosou i bez sacharosy
- V rostlinách pěstovaných se sacharosou byla zjištěna vyšší aktivita NR

8 Seznam použité literatury

- [1] Buchanan B., Gruissem W., Jones R.: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plants Physiologists, Rockville, Maryland (2000)
- [2] Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J.: *Fyziologie rostlin*, Academia Praha (1998)
- [3] Kubišta V.: Fyziologie buňky z knihy *Nový přehled biologie* (Rozsypal S.), 58-68, Scientia Praha (2003)
- [4] Huber S., Huber J.: *Plant. Physiol.* **99**, 1275-1278 (1992)
- [5] Luštinec J., Žárský V.: *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*, Karolinum, Praha (2005)
- [6] Voet D., Voet J.: *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha (1995)
- [7] Stitt M., Muller C., Matt P.: *J. Exp. Bot.* **53**, (2001)
- [8] Yanagisawa et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7833-7838 (2004)
- [9] Kai Y., Matsumura H., Izui K.: *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 170–179 (2003)
- [10] Izui K., Matsumura, H., Furumoto, T., Kai, Y.: *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 69–84 (2004)
- [11] Leegood R., Walker R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 204–210 (2003)
- [12] Vidal J., Cholett R.: *Trends Plant Sci.* **2**, 230-237 (1997)
- [13] Lepiniec L., Vidal J., Cholett R.: *Plant Sci.* **99**, 111-124, (1994)
- [14] Nimmo H.: *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 189–196 (2003)
- [15] Müller K., at al.: *Biol. Chem.* **390**, 245-251 (2009)
- [16] Ryšlavá H. et al.: *Photosynthetica* **41**, 357-363 (2003)
- [17] Maurino G., Drincovich F., Andreo S.: *Plant Mol. Biol.* **45**, 409-420 (2001)
- [18] Kaiser W., Huber S.: *J. Exp. Bot.* **52**, 1981-1989 (2001)
- [19] Kaiser W., Huber S.: *Plant Physiol.* **106**, 817-821 (1994)
- [20] Huber S., MacKintosh C., Kaiser W.: *Plant. Mol. Biol.* **50**, 1053-1063 (2002)
- [21] Allegre A., Silvestre J., Morard P.: *J. Exp. Bot.* **55**, 2625–2634 (2004)
- [22] Debouba M., Gouia H., Valadier M.H.: *Plant. Physiol. Biochem.* **44**, 409-419 (2006)
- [23] Nimmo G.A., Nimmo H.G., Hamilton I.D.: *Biochem. J.* **238**, 213-220 (1986)
- [24] Bradford, M.: *Anal. Biochem.* **72**, 248 – 254 (1976)
- [25] Lee D.H., Lee C.B.: *Physiol. Veg.* **21**, 805-815 (1983)

- [26] Anzenbacher, P.: *Metody chemického výzkumu pro biochemiky*, 69 – 74, Karolinum, Praha (1986)
- [27] Gonzalez M.C., Rosario Sanchez R., Cejudo F.J.: *Planta* **216**, 985–992 (2003)
- [28] Müller K.: *Regulation of fosfoenolpyruvate carboxylase in tobacco plants during potyviral infection*. Disertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2008)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------