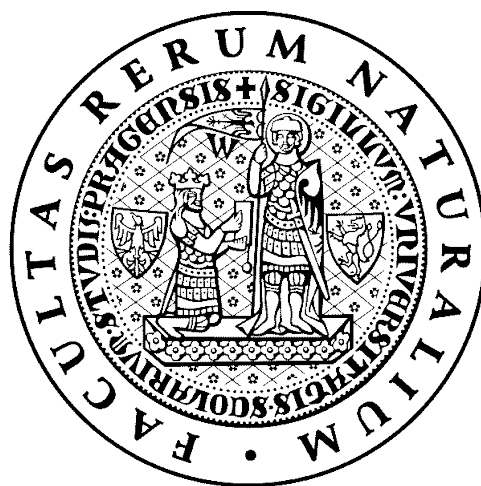


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



**Vliv virové infekce na aktivitu glykosidas  
rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)**

**The effect of viral infection on glycosidases activity in tobacco  
plants (*Nicotiana tabacum* L.)**

Bakalářská práce

Školitelka: Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

2010

Kateřina Kloudová

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením své školitelky doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne: \_\_\_\_\_

Podpis: \_\_\_\_\_

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji své školitelce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za ochotu, trpělivost a pomoc při řešení této bakalářské práce. Děkuji také RNDr. Veronice Doubnerové, PhD. za cenné rady, laskavý přístup a čas, který mi věnovala.

Dále děkuji RNDr. Heleně Synkové, CSc. za poskytnutí rostlinného materiálu a všem pracovníkům Ústavu experimentální botaniky AV ČR, kteří mi pomohli.

Děkuji také svým rodičům Marii a Pavlovi Kloudovým i prarodičům Miroslavě a Jiřímu Macounovým za péči a podporu při studiu.

## ABSTRAKT

Glykosidasy jsou enzymy hojně zastoupené v mikroorganismech, houbách, rostlinách i živočiších. Patří mezi hydrolasy, což znamená, že hydrolyticky štěpí glykosidické vazby v molekulách oligosacharidů, polysacharidů a dalších glykokonjugátů, jako jsou např. glykoproteiny, glykolipidy nebo různé alkaloidy. Funkce rostlinných glykosidas nebyla doposud zcela objasněna, proto je, stejně jako jejich charakterizace, předmětem mnoha studií. Mezi zkoumané funkce rostlinných glykosidas patří úloha při klíčení rostlin, při zrání a měknutí plodů nebo při obraně proti biotickému či abiotickému stresu.

Při biotickém stresu začíná rostlina ve zvýšené míře exprimovat specifické obranné proteiny (PRP, „pathogenesis-related proteins“). Bylo zjištěno, že v listech tabáku jako obranné proteiny působí chitinasy a  $\beta$ -1,3-glukanasy, tedy endolytické enzymy. Cílem mé práce proto bylo zjistit, zda se na obraně rostlin tabáku při biotickém stresu podílí i exolytické glykosidasy -  $\alpha$ -galaktosidasa,  $\beta$ -galaktosidasa,  $\alpha$ -glukosidasa,  $\beta$ -glukosidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa a  $\alpha$ -mannosidasa.

V listech tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana* SR1) jsem studovala vliv virové infekce na aktivitu glykosidas. Listy byly infikovány Y virem bramboru (PVY, „Potato virus Y“). Aktivitu glykosidas jsem sledovala v kontrolních a v infikovaných listech tabáku, v obou případech jsem měřila aktivitu rozpustných a membránově vázaných glykosidas. Dále jsem měřila aktivitu glykosidas také v exudátu, kapalině z žilek listů.

Ke zvýšení aktivity v infikovaných listech oproti listům kontrolním došlo u  $\alpha$ - a  $\beta$ -galaktosidas a u  $\beta$ -hexosaminidasy, což naznačuje, že by se tyto tři enzymy mohly podílet na obraně proti virové infekci. Podle získaných výsledků je pravděpodobné, že v případě  $\beta$ -hexosaminidasy se jedná o rozpustný protein a v případě  $\beta$ -galaktosidas se jedná o membránově vázaný protein. V případě  $\alpha$ -galaktosidas se na obraně pravděpodobně podílí volná i vázaná forma.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Glykosidasy; tabák; Y virus bramboru; stres.

## **ABSTRACT**

Glycosidases are widely distributed among microorganisms and fungi, in plants and animals, too. They belong to the hydrolase class, which means that they hydrolyze glycosidic linkages in oligosaccharides, polysaccharides and other glycoconjugates, as for example glycoproteins, glycolipids or some alkaloids. The role of plant glycosidases has not been made clear till now, so that it is a subject of many studies as well as their characterization. The studied functions are the role during seed germination, during fruit ripening and softening and in defence against biotic and abiotic stress, too.

Under biotic-stress, plants synthesize so-called pathogenesis-related proteins (PRP). It was found out that chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases, which are endoglycosidases, act as PRPs in tobacco leaves. The goal of my work was to find out whether exoglycosidases ( $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -hexosaminidase and  $\alpha$ -mannosidase) can also act in defence against biotic stress.

I studied the effect of infection in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana* SR1) leaves caused by *Potato virus Y* (PVY) on glycosidases activity. I examined the activity in control and infected tobacco leaves, in both cases the activity of soluble and membrane associated glycosidases was examined. I studied the glycosidase activity in exudate, too.

The activity in infected leaves was enhanced compared to the activity in control leaves in the case of  $\alpha$ - and  $\beta$ -mannosidase and  $\beta$ -hexosaminidase. It means that these three enzymes could be involved in plant defence against viral infection. According to the results, it is probable that  $\beta$ -hexosaminidase could be a soluble protein and  $\beta$ -galactosidase could be a membrane-associated protein. Both forms of  $\alpha$ -galactosidase, the soluble and the membrane-associated one, could be probably involved in the plant defence.

(In Czech)

## **KEYWORDS**

Glycosidases; tobacco; Potato virus Y; stress.

## SEZNAM ZKRATEK

a	aktivita
$A_{405}$	absorbance měřená při 405 nm
c	koncentrace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
K	kontrolní rostliny
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
PR proteiny	specifické obranné proteiny rostlin
PVP	polyvinylpyrrolidon
PVY	Y virus bramboru
SDS	dodecylsulfát sodný
ss-RNA	jednovláknová ribonukleová kyselina
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

**OBSAH**

1. Úvod .....	4
1.1. Glykosidasy .....	4
1.1.1. Funkce rostlinných glykosidas .....	4
1.1.2. Specifita rostlinných glykosidas .....	4
1.1.3. $\alpha$ -Galaktosidasa.....	5
1.1.3.1. Charakterizace rostlinných $\alpha$ -galaktosidas .....	5
1.1.3.2. Funkce rostlinných $\alpha$ -galaktosidas.....	6
1.1.4. $\beta$ -Galaktosidasa.....	8
1.1.4.1. Charakterizace rostlinných $\beta$ -galaktosidas .....	8
1.1.4.2. Funkce rostlinných $\beta$ -galaktosidas.....	9
1.1.5. $\alpha$ -Glukosidasa .....	11
1.1.5.1. Charakterizace rostlinných $\alpha$ -glukosidas.....	11
1.1.5.2. Funkce rostlinných $\alpha$ -glukosidas .....	12
1.1.6. $\beta$ -Glukosidasa .....	13
1.1.6.1. Charakterizace rostlinných $\beta$ -glukosidas.....	13
1.1.6.2. Funkce rostlinných $\beta$ -glukosidas .....	13
1.1.7. $\beta$ -Hexosaminidasa.....	16
1.1.7.1. Charakterizace rostlinných $\beta$ -hexosaminidas .....	16
1.1.7.2. Funkce rostlinných $\beta$ -hexosaminidas .....	17
1.1.8. $\alpha$ -Mannosidasa.....	19
1.1.8.1. Charakterizace rostlinných $\alpha$ -mannosidas .....	19
1.1.8.2. Funkce rostlinných $\alpha$ -mannosidas.....	20
1.2. Rostlinný stres .....	22
1.2.1. Druhy rostlinného stresu .....	22
1.2.2. Rostlinné viry .....	22

---

1.3. Tabák ( <i>Nicotiana</i> ).....	23
2. Cíl práce.....	24
3. Materiál a metody.....	25
3.1. Přístroje .....	25
3.2. Chemikálie a pufry .....	25
3.2.1. Chemikálie.....	25
3.2.2. Pufry .....	26
3.3. Rostlinný materiál.....	26
3.4. Metody .....	26
3.4.1. Kalibrační křivka pro koncentraci <i>p</i> -nitrofenolu.....	26
3.4.2. Extrakce rozpustných glykosidas z listů tabáku .....	27
3.4.3. Extrakce membránově vázaných glykosidas z listů tabáku .....	27
3.4.4. Příprava exudátu z listů tabáku.....	27
3.4.5. Stanovení aktivity glykosidas <i>in vitro</i> .....	28
3.4.6. Stanovení aktivity glykosidas .....	30
4. Výsledky .....	32
4.1. Kalibrační křivka závislosti absorpance roztoku na koncentraci <i>p</i> -nitrofenolu .....	32
4.2. Porovnání aktivit glykosidas v kontrolních a infikovaných listech tabáku.....	33
4.2.1. Porovnání aktivit rozpustných glykosidas z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku .....	33
4.2.2. Porovnání aktivit membránově vázaných glykosidas z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku.....	34
4.2.3. Porovnání aktivit glykosidas v exudátech z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku .....	35
4.2.4. Porovnání aktivit rozpustných glykosidas z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku použitých pro přípravu exudátu.....	36
4.2.5. Porovnání aktivit membránově vázaných glykosidas z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku použitých pro přípravu exudátu .....	37

---

5. Diskuse .....	38
6. Závěr .....	40
7. Reference .....	41

## 1. ÚVOD

### 1.1. GLYKOSIDASY

Glykosidasy jsou enzymy patřící do třídy hydrolas, což znamená, že hydrolyticky štěpí glykosidické vazby v molekulách oligosacharidů, polysacharidů a dalších glykokonjugátů, jako jsou např. glykoproteiny, glykolipidy nebo různé alkaloidy. Jsou to enzymy hojně zastoupené v mikroorganismech, houbách, rostlinách i živočiších.

#### 1.1.1. Funkce rostlinných glykosidas

Ačkoliv patří rostlinné glykosidasy, stejně jako glykosidasy živočišné a bakteriální, mezi významné hydrolytické enzymy, jejich funkce v rostlinných pletivech nebyla doposud zcela objasněna. Jednou z jejich mnoha funkcí je účast při zrání ovoce a dalších plodů. Tímto způsobem se uplatňuje např.  $\beta$ -galaktosidasa z plodů jabloně domácí (*Malus domestica* Borkh.) [12] nebo  $\beta$ -hexosaminidasa z plodů papriky roční (*Capsicum unnuum* L.) [35]. Jinou roli má  $\beta$ -hexosaminidasa ze semen kukuřice seté (*Zea mays* L.) [31], která - stejně jako  $\alpha$ -galaktosidasa ze semen kávovníku arabského (*Coffea arabica* L.) [17] - napomáhá klíčení. V neposlední řadě se rostlinné glykosidasy uplatňují také při obraně proti stresu. Příkladem je  $\beta$ -glukosidasa, která umožňuje rostlině vyrovnat se s nadměrným suchem [53], nebo  $\beta$ -hexosaminidasa, která pravděpodobně chrání rostlinu proti parazitickým houbám [34].

#### 1.1.2. Specifita rostlinných glykosidas

Glykosidasy, které jsem studovala v této práci, tedy  $\alpha$ -galaktosidasa,  $\beta$ -galaktosidasa,  $\alpha$ -glukosidasa,  $\beta$ -glukosidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa a  $\alpha$ -mannosidasa, patří mezi exolytické enzymy. Některé z nich odštěpují monosacharidové zbytky z konců oligosacharidových, jiné z konců polysacharidových řetězců. Např.  $\alpha$ -mannosidasa z kanaválie (*Canavalia ensiformis* L.) je schopná štěpit oligosacharidy i polysacharidy [38], stejný enzym z papáji melounovité (*Carica papaya* L.) štěpí pouze oligosacharidy [8]. Dále jsou rostlinné glykosidasy vysoce specifické vůči  $\alpha$ , resp.  $\beta$  konfiguraci a vůči typu molekuly, kterou

odštěpují;  $\alpha$ -mannosidasa tedy specificky štěpí  $\alpha$ -glykosidicky vázanou mannosu [38]. Glykosidasy jsou specifické také k typu vazby přítomné v molekule. Např.  $\beta$ -glukosidasa z ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) hydrolyzuje (1→2)-, (1→3)- a (1→4) $\beta$  vazby v molekulách oligosacharidů, vazbu (1→6) $\beta$  však štěpit nemůže [2].

### 1.1.3. $\alpha$ -Galaktosidasa

#### 1.1.3.1. Charakterizace rostlinných $\alpha$ -galaktosidas

Rostlinné  $\alpha$ -galaktosidasy ( $\alpha$ -galaktosid galaktohydrolasy, EC 3.2.1.22) patří mezi významné rostlinné enzymy. Podle jejich pH optima je můžeme rozdělit na kyselé a alkalické [15]. pH optimum enzymu odpovídá prostředí, v němž probíhá reakce, kterou katalyzuje, proto se předpokládá, že kyselé a alkalické  $\alpha$ -galaktosidasy mají v rostlinách odlišnou úlohu.

Dalším znakem typickým pro rostlinné  $\alpha$ -galaktosidasy je výskyt v několika izoformách, které se často liší právě svým pH optimem, ale také hodnotou pI nebo molekulovou hmotností. V klíčících semenech sóji luštinaté (*Glycine max* L.) byly nalezeny dvě izoformy  $\alpha$ -galaktosidasy. Jedná se o proteiny s molekulovou hmotností 31 a 33 kDa a pH optimem v kyselé oblasti (pH 5,0-5,5). Jsou to relativně termostabilní enzymy s teplotním optimem při 45-50 °C [14].

Dvě izoformy byly izolovány také ze semen kávovníku arabského (*Coffea arabica* L.). Obě mají molekulovou hmotnost přibližně 40 kDa, ovšem jejich pH optimum se liší (pH 5,3 a 6,3).  $\alpha$ -Galaktosidasa ze semen kávovníku je zajímavá přítomností signální sekvence v pre-proenzymu, což naznačuje, že by tento protein mohl být syntetizován do endoplazmatického retikula, odkud by mohl být dále transportován do proteinového tělíska, do extracelulárního prostoru nebo do buněčné stěny [17].

Také v listech okurky seté (*Cucumis sativus* L.) jsou přítomny dvě formy  $\alpha$ -galaktosidasy. Jejich vlastnosti jsou velmi podobné (např. jejich pH optimum se liší jen mírně – pH 5,2 a 5,5), avšak jejich molekulové hmotnosti jsou dvojnásobné (25 a 50 kDa). Proto je velmi pravděpodobné, že menší z těchto proteinů je podjednotkou většího, ne samostatnou izoformou. Menší z proteinů je navíc přítomen pouze v mladých listech, proto se předpokládá, že ve starších listech je málo stabilní a že v průběhu dalšího vývoje již není syntetizován [20].

V plodech melounu cukrového (*Cucumis melo* L.) byly nalezeny 3 izoformy  $\alpha$ -galaktosidasy. Jedná se o dvě alkalické a jednu kyselou izoformu. Kyselá  $\alpha$ -galaktosidasa je glykosylovaná, má molekulovou hmotnost 27 kDa a pH optimum 5,0-5,5. Nejvyšší aktivitu vykazuje při teplotě 50 °C. Alkalické izoformy jsou oproti tomu neglykosylované. Jejich molekulové hmotnosti jsou 84 a 102 kDa, optimální pH je 7,5 a optimální teplota je nižší než v případě kyselé formy; 30-40 °C [19]. Stejný počet izoform byl nalezen i v semenech brazilské rostliny *Tachigali multijuga* (Benth.). Jedná se o kyselou  $\alpha$ -galaktosidasy s pH optimumem 5,0-5,5 a teplotním optimumem 50 °C [15].

V semenech rajčete jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.) byly také charakterizovány tři izoformy  $\alpha$ -galaktosidasy. Tyto izoformy se, stejně jako izoformy  $\alpha$ -galaktosidasy ze semen kávovníku arabského, vyznačují přítomností signální sekvence v pre-proenzymu. I v tomto případě poskytuje signální sekvence několik možností lokalizace enzymu v buňce [16].

#### **1.1.3.2. Funkce rostlinných $\alpha$ -galaktosidas**

$\alpha$ -Galaktosidasy obecně katalyzují hydrolytické štěpení terminálních,  $\alpha$ -glykosidickou vazbou vázaných galaktosylů z oligosacharidů a polysacharidů, které galaktosu obsahují [19]. Některé enzymy jsou specifické pouze vůči nízkomolekulárním látkám, oligosacharidům, jako jsou trisacharid rafinosa, tetrasacharid stachyosa nebo disacharid melibiosa [14]. Jiné enzymy mají vyšší afinitu k vysokomolekulárním substrátům, většinou však jsou schopné štěpit i menší molekuly. Mezi polysacharidy degradované těmito  $\alpha$ -galaktosidasami patří především galaktomannany (obr. 1, s. 7), jedny ze základních stavebních složek rostlinných buněčných stěn, v nichž je poměr galaktosy a mannosy závislý, mimo jiné, na aktivitě  $\alpha$ -galaktosidasy [17]. Tento poměr se v různých rostlinách liší, což má za následek různou rozpustnost galaktomannanů z různých rostlinných zdrojů. Zároveň jsou takto ovlivňovány vlastnosti celé buněčné stěny [29].

Stejně jako řada dalších glykosidas, i  $\alpha$ -galaktosidasa je důležitá při klíčení semen různých rostlin. Tato spojitost je zřejmá z prudkého nárůstu aktivity  $\alpha$ -galaktosidasy během klíčení, jak bylo pozorováno v semenech kávovníku arabského (*Coffea arabica* L.). Substrátem tohoto enzymu jsou především galaktomannany. Je-li  $\alpha$ -galaktosidasa lokalizována v buněčné stěně, štěpí galaktomannany zde přítomné. Jestliže je však syntetizována do extracelulárního prostoru, ovlivňuje zde poměr galaktosy a mannosy v nově



Klíčovou roli v metabolismu sacharidů hraje také  $\alpha$ -galaktosidasa izolovaná z plodů melounu cukrového (*Cucumis melo* L.), jejímiž preferovanými substráty jsou oligosacharidy rafinosa, stachyosa a melibiosa. Předpokládá se, že  $\alpha$ -galaktosidasa je jedním z důležitých enzymů regulujících hydrolytické štěpení sacharidů při fotoasimilaci [19].

#### **1.1.4. $\beta$ -Galaktosidasa**

##### ***1.1.4.1. Charakterizace rostlinných $\beta$ -galaktosidas***

$\beta$ -Galaktosidasa ( $\beta$ -galaktosid galaktohydrolasa, EC 3.2.1.23) je enzym vyskytující se v mikroorganismech, houbách, živočiších i rostlinách [8, 10]. V rostlinách je přítomen v různých částech, v nichž je jeho aktivita spojena s mnoha procesy.

Izolována a charakterizována byla  $\beta$ -galaktosidasa např. z okurky seté (*Cucumis sativus* L.) [13], z plodů jabloně domácí (*Malus domestica* Borkh.) [12], z děložních lístků klíčícího stromu *Hymenaea courbaril* (L.) [10], z plodů karamboly (*Averrhoa carambola* L.) [9] nebo z papáji melounovité (*Carica papaya* L.) [8]. Charakteristiky  $\beta$ -galaktosidas z těchto zdrojů jsou uvedeny v tabulce 1 (s. 9).

Pro  $\beta$ -galaktosidasu je typický výskyt pouze v jedné izoformě. Většinou se jedná o relativně termostabilní enzymy s pH optimem v kyselé oblasti. Nejčastějšími substráty  $\beta$ -galaktosidas jsou galaktany, pektiny nebo xyloglukany, tedy polysacharidy přítomné v buněčných stěnách. Proto jsou zde lokalizovány i  $\beta$ -galaktosidasy. Předpokládá se, že se podílejí také na metabolismu membránově-asociovaných galaktolipidů [11]. Dalšími substráty  $\beta$ -galaktosidas jsou glykoproteiny, flavonoidy a alkaloidy [10].

**Tab. 1: Charakteristiky  $\beta$ -galaktosidas z vybraných rostlinných zdrojů.**

Název rostliny	Zdroj	Charakteristika $\beta$ -galaktosidasy				Ref.
		M* [kDa]	stupeň polymerace	teplotní optimum [°C]	pH optimum	
Okurka setá ( <i>Cucumis sativus</i> L.)	plody	–	–	58	4,9	13
Jabloň domácí ( <i>Malus domestica</i> Borkh.)	plody	32; 44	heterodimer	–	4,0	12
Karambola ( <i>Averrhoa carambola</i> L.)	plody	36; 48	heterodimer	–	–	9
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	děložní listky	52	polymer	50	3,0 - 4,0	10
Papája melounovitá ( <i>Carica papaya</i> L.)	semena	56	monomer	60	3,5 - 4,5	8

– daná charakteristika nebyla studována

\* M byla určena pomocí SDS-PAGE, hodnoty se vztahují k monomernímu enzymu nebo k monomerní podjednotce

#### 1.1.4.2. Funkce rostlinných $\beta$ -galaktosidas

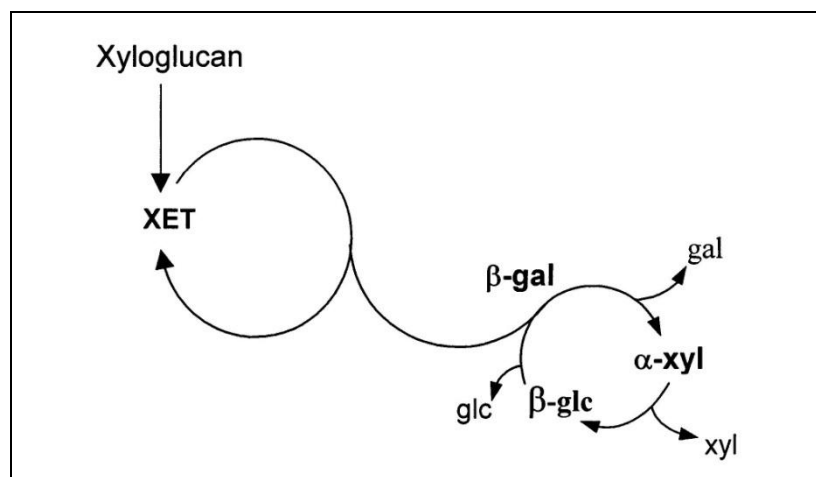
$\beta$ -Galaktosidasa se účastní mnoha důležitých procesů, uplatňuje se především při zrání ovoce [9, 12], klíčení semen [8] nebo vývoji výhonků, listů a květů [10, 11].

$\beta$ -Galaktosidasa je považována za jeden z hlavních faktorů působících při degradaci a modifikaci buněčných stěn při zrání ovoce. Při zrání často dochází ke ztrátě pevnosti plodu, což souvisí se zvýšenou aktivitou hydrolas vůči polysacharidům buněčné stěny a její modifikací.  $\beta$ -Galaktosidasa z plodů jabloně (*Malus domestica* Borkh.) štěpí monogalaktosylové zbytky z neredukujících konců polysacharidů přítomných v buněčné stěně jablek, jako jsou galaktany a pektiny. Při *in vitro* studiu hydrolytické aktivity  $\beta$ -galaktosidasy vůči těmto polysacharidům však bylo uvolněno jen malé množství galaktosy, které neodpovídalo úbytku galaktosy pozorovanému *in vivo*. Pravděpodobným vysvětlením je limitovaná aktivita  $\beta$ -galaktosidasy vůči postranním řetězcům pektinů, díky které se zvýší rozpustnost pektinů, jednotlivé molekuly ztrácí schopnost agregace a polysacharid je ve výsledku lepším substrátem pro další hydrolytické enzymy [12]. Enzym ze zrajících plodů karamboly (*Averrhoa carambola* L.) štěpí pektiny na menší

oligosacharidy a modifikuje také hemicelulosu, čímž zvyšuje rozpustnost složek buněčné stěny a umožňuje tak měknutí ovoce [9].

Podobnou funkci má i  $\beta$ -galaktosidasa izolovaná z výhonku chřestu lékařského (*Asparagus officinalis* L.). Předpokládá se, že hydrolytická aktivita  $\beta$ -galaktosidasy vůči polysacharidům buněčných stěn umožňuje rychlý růst vegetativních částí rostlin, v tomto případě výhonků [11].

Zcela jinou úlohu má  $\beta$ -galaktosidasa z děložních lístků rostliny *Hymenaea courbaril* (L.), která se během vývoje semen účastní mobilizace zásobních xyloglukanů přítomných v buněčných stěnách (obr. 2). Je zajímavé, že tento enzym štěpí galaktosu téměř výhradně z oligosacharidů, s polysacharidy téměř neinteraguje. Vzhledem k jeho vysoké afinitě ke xyloglukanům, nízkému pH optimu (tab. 1, s. 9) a faktu, že je inhibován galaktosou, tedy produktem jím katalyzované reakce, se předpokládá, že se  $\beta$ -galaktosidasa z děložních lístků *Hymenaea courbaril* podílí na řízení katabolismu xyloglukanů [10].



**Obr. 2:** Schéma štěpení zásobních xyloglukanů v *Hymenaea courbaril* L. *in vivo*.

Nejprve je polysacharid hydrolyzován xyloglukan-endo-transglykosylasou (XET), vzniklé oligosacharidy jsou poté degalaktosylovány  $\beta$ -galaktosidasou ( $\beta$ -gal) a konečného štěpení se účastní  $\alpha$ -xylosidasa ( $\alpha$ -xyl) a  $\beta$ -glukosidasa ( $\beta$ -glc). Výslednými produkty jsou volné monosacharidy galaktosa (gal), xylosa (xyl) a glukosa (glc) [48].

### 1.1.5. $\alpha$ -Glukosidasa

#### 1.1.5.1. Charakterizace rostlinných $\alpha$ -glukosidas

Funkce rostlinných  $\alpha$ -glukosidas ( $\alpha$ -glukosid glukohydrolas, EC 3.2.1.20) byly, stejně jako jejich vlastnosti, studovány u mnoha druhů, např. u prosa setého (*Panicum miliaceum* L.) [22], rýže seté (*Oryza sativa* L.) [23], banánovníku ovocného (*Musa sapientum* L.) [24], révy vinné (*Vitis vinifera* L.) [25], z hrachu setého (*Pisum sativum* L.) [26] nebo ze špenátu zeleného (*Spinacia oleracea* L.) [30]. Vlastnosti  $\alpha$ -glukosidas z vybraných zdrojů jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tab. 2: Charakteristiky  $\alpha$ -glukosidas z vybraných rostlinných zdrojů.**

Název rostliny	Zdroj	Charakteristika $\alpha$ -glukosidas			Ref.
		M [kDa]		pH optimum	
		gelová filtrace	SDS-PAGE		
Proso seté ( <i>Panicum miliaceum</i> L.)	semena	80	86	4,5-5,0	22
Rýže setá ( <i>Oryza sativa</i> L.)	semena	–	95	4,5	23
Špenát zelený ( <i>Spinacia oleracea</i> L.)	semena	62	78	4,5-5,5	30
		62	78		
		190	82	4,5-5,0	
		70	82		
Hrách setý ( <i>Pisum sativum</i> L.)	sazenice	125		4,5	26
		150	–	6,0	
		110		7,0	
Banánovník ovocný ( <i>Musa sapientum</i> L.)	plody	70		4,5	24
		42	–	6,5	
		42		6,5	
Réva vinná ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	plody	100	–	5,1	25
		100		5,1	

– daná charakteristika nebyla studována

### 1.1.5.2. Funkce rostlinných $\alpha$ -glukosidas

Rostlinné  $\alpha$ -glukosidasy katalyzují hydrolytické štěpení glukosylových zbytků z neredukujících konců substrátů. Mají širokou substrátovou specifitu. Jejich nejčastějšími substráty jsou škrob, který patří mezi významné zásobní polysacharidy rostlin, dále také maltosa a od ní odvozené oligosacharidy. Škrob je většinou uskladněn v chloroplastech nebo v amyloplastech ve formě škrobových zrn.

V sazenicích hrachu setého (*Pisum sativum* L.) byly v apoplastu nalezeny dvě kyselé a v chloroplastech jedna neutrální  $\alpha$ -glukosidasy. Všechny izoformy jsou typickými maltasami, tedy  $\alpha$ -glukosidasami štěpícími maltosu. U kyselých  $\alpha$ -glukosidas byla navíc zjištěna i transglykosylační aktivita. Neutrální enzym byl na rozdíl od kyselých izoform schopen štěpit amylosu, avšak jeho uplatnění při degradaci chloroplastového škrobu není známo [26]. Z dužiny plodů banánovníku ovocného (*Musa sapientum* L.) byly naopak izolovány jedna kyselá a dvě neutrální  $\alpha$ -galaktosidasy. Kyselá izoforma byla i v tomto případě zodpovědná za štěpení maltosy vzniklé jako štěpný produkt degradace škrobu, podíl neutrálních forem na metabolismu škrobu je však nepravděpodobný vzhledem k faktu, že jejich aktivita vůči maltose byla velice nízká [24].

$\alpha$ -Glukosidasa z ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) je jediným enzymem, který je v semenech, z nichž byl izolován, schopen štěpit maltosu. Dobrymi substráty jsou kromě maltosy také nigerosa a isomaltosa. Vzhledem k jeho široké substrátové specifitě je možné, že se podílí i na štěpení dalších  $\alpha$ -glukosidických vazeb [28]. Také enzym z révy vinné (*Vitis vinifera* L.) vykazoval nejvyšší aktivitu vůči maltose [25].

Enzym ze semen prosa setého (*Panicum miliaceum* L.) naopak vykazoval vyšší afinitu k substrátu s větší molekulovou hmotností. Ačkoliv již jeho aktivita vůči disacharidům maltose a nigerose byla relativně vysoká, ještě ochotněji štěpil oligosacharidy. Zdaleka nejpreferovanějším substrátem pak byl škrob; hydrolyza rozpustné amylosy navíc byla efektivnější než hydrolyza amylopektinu. Pravděpodobná funkce  $\alpha$ -glukosidasy ze semen prosa je tedy hydrolyza oligosacharidů uvolněných ze škrobu jinými enzymy, během raných fází klíčení však může přímo štěpit škrob [22].

Úlohu při hydrolyze škrobu má také  $\alpha$ -glukosidasa ze semen rýže seté (*Oryza sativa* L.). Její aktivita dramaticky rostla během zrání semen, v suchých i v klíčících zrnech pak zůstala na konstantní hodnotě, což značí, že byla syntetizována pouze během jejich zrání. V semenech rýže byly rozpoznány 3 izozymy  $\alpha$ -glukosidasy, které se navzájem lišily afinitou ke škrobovým zrnům. Jeden z těchto izozymů, který byl v semenech přítomen

převážně ve fázi klíčení semen, byl schopen přímo degradovat škrob. Další dva izozymy, které byly přítomny hlavně při zrání semen, měly pravděpodobně jinou funkci [27].

### 1.1.6. $\beta$ -Glukosidasa

#### 1.1.6.1. Charakterizace rostlinných $\beta$ -glukosidas

$\beta$ -Glukosidasy ( $\beta$ -glukosid glukohydrolasy, EC 3.2.1.21) jsou enzymy hojně se vyskytující v mikroorganismech, v houbách, v rostlinách i živočiších [1].

Byly purifikovány a charakterizovány  $\beta$ -glukosidasy z řady rostlin, např. z pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) [1], z ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) [2], z vanilovníku plocholitého (*Vanilla planifolia* Andrews) [3], z žita setého (*Secale cereale* L.) [4] z rýže seté (*Oryza sativa* L.) [5], ze sóji luštinaté (*Glycine max* L.) [6] nebo z manioku (*Manihot esculenta* Crantz) [21]. Základní charakteristiky  $\beta$ -glukosidas z vybraných zdrojů shrnuje tabulka 3 (s. 14).

#### 1.1.6.2. Funkce rostlinných $\beta$ -glukosidas

Základní charakteristikou  $\beta$ -glukosidas je schopnost katalyzovat hydrolytické štěpení  $\beta$ -glukosidických vazeb v molekulách oligosacharidů, polysacharidů a dalších glukosidů.

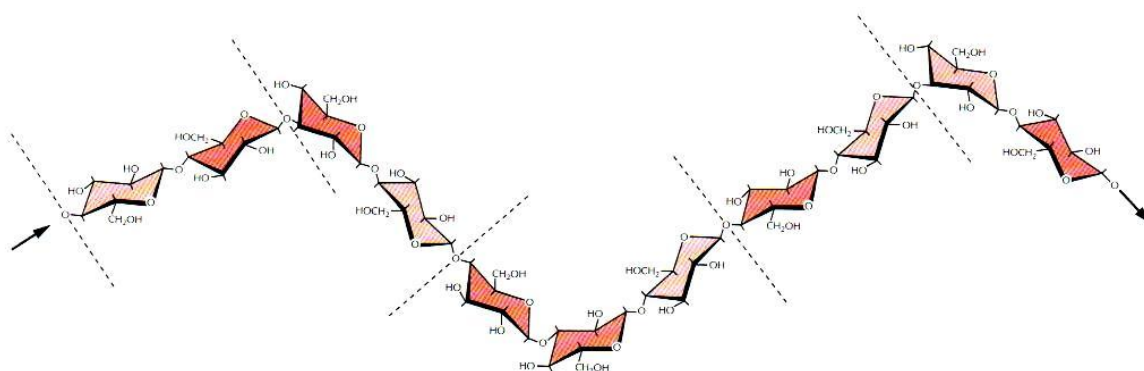
Jednou z významných funkcí  $\beta$ -glukosidas je jejich uplatnění při klíčení semen. V semenech ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) dochází během klíčení ke značnému nárůstu aktivity  $\beta$ -glukosidas. Bylo zjištěno, že  $\beta$ -glukosidasa spolupracuje s endo- $\beta$ -glukanasou, která štěpí  $\beta$ -glukany, polysacharidy buněčných stěn, na kratší oligosacharidové úseky. Ty jsou poté degradovány právě  $\beta$ -glukosidasou.  $\beta$ -Glukosidasa je tedy v tomto případě nezbytná pro kompletní hydrolýzu  $\beta$ -glukanů (obr. 3, s. 14), ačkoliv s polysacharidy sama neinteraguje. Hydrolytickým uvolněním glukosy a mannosy z oligosacharidů vzniklých štěpením  $\beta$ -glukanů se enzym pravděpodobně podílí na udržování stálé hladiny monosacharidů důležitých při klíčení jako zdroj energie [2]. Podobnou funkci zastává také  $\beta$ -glukosidasa z klíčících semen rýže (*Oryza sativa* L.). Neštěpí polysacharidy, pouze oligosacharidy z nich uvolněné jinými enzymy. Podílí se tak na degradaci oligosacharidů buněčných stěn a také na jejich modifikaci a regeneraci [5].

**Tab. 3: Charakteristiky  $\beta$ -glukosidas z vybraných rostlinných zdrojů.**

Název rostliny	Zdroj	Charakteristika $\beta$ -glukosidasy					Ref.
		M* [kDa]	stupeň polymerace	teplotní optimum [°C]	pH optimum	pI	
Rýže setá ( <i>Oryza sativa</i> L.)	semena	56	monomer	50	4,5	> 10	5
Ječmen setý ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	semena	60	monomer	60	5,0	9,0-9,5	2
Vanilovník plocholistý ( <i>Vanilla planifolia</i> Andrews)	semena	50	homotetramer	40	6,5	–	3
Žito seté ( <i>Secale cereale</i> L.)	sazenice	60	oligomer	25 - 30	5,5	4,9-5,1	4
Pšenice setá ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	sazenice	58; 60	oligomer	–	5,5	–	1
Sója luštinatá ( <i>Glycine max</i> L.)	kořeny	75; 80	heterodimer	30	6,0	–	6
Maniok ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz)	kořeny	63	oligomer	–	6 – 8	4,3	21
		63	oligomer	–	6 – 8	3,3	
		63	oligomer	–	6 - 8	2,9	

– daná charakteristika nebyla studována

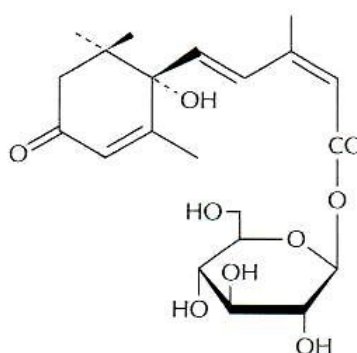
\* M byla určena pomocí SDS-PAGE, hodnoty se vztahují k monomernímu enzymu nebo k monomerní podjednotce


**Obr. 3: Schematické znázornění (1→3),(1→4) $\beta$ ,D-glukanu.**

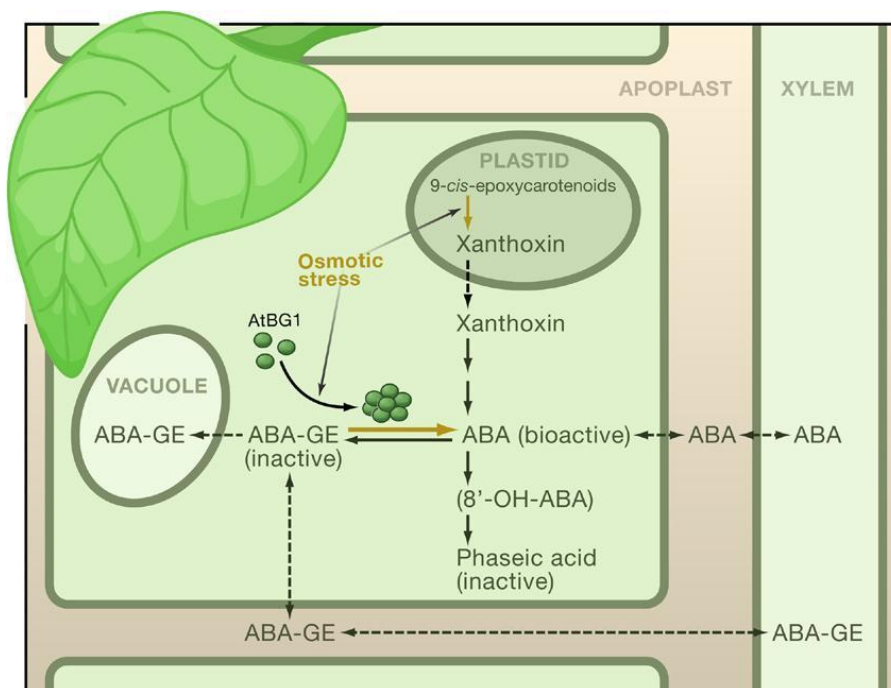
Řetězec je nevětvený a je tvořen vzájemně propojenými  $\beta$ ,D-glukosovými jednotkami [47].

$\beta$ -Glukosidasa z pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) se uplatňuje při obraně rostlin proti patogenům a herbivorům v neautotrofních fázích vývoje [1]. Hydrolýzou  $\beta$ -glukosidických vazeb uvolňuje obranné látky, např. hydroxamovou kyselinu. Stejně působí i enzym izolovaný z klíčících semen a ze sazenic žita setého (*Secale cereale* L.) [4]. Koncentrace obranných glukosidů vzrůstá v semenech žita krátce po ukončení klíčení, po začátku autotrofního vývoje opět klesá, až se ustálí na určité hodnotě. Hydrolýza toxických aglykonů je iniciována přímým kontaktem mezi enzymem a glukosidy, tedy v případě, je-li rostlinná tkáň mechanicky poškozena patogenem [1]. Uplatnění při obraně rostlin nacházejí také  $\beta$ -glukosidasy z manioku (*Manihot esculenta* Crantz) [21] a ze sóji luštinaté (*Glycine max* L.) [6].

$\beta$ -glukosidasa se podílí také na rostlinné hormonální regulaci a tím i na obraně proti abiotickému stresu. Jedním z významných rostlinných hormonů je kyselina abscisová, která umožňuje rostlině přežít i v suchém nebo chladném prostředí nebo v půdě s příliš vysokým obsahem solí [49]. Kyselina abscisová může být skladována ve formě glukosidu (obr. 4), který je v případě potřeby štěpen  $\beta$ -glukosidasou [50]. Bylo prokázáno, že sucho v rostlinách indukuje zvýšenou syntézu  $\beta$ -glukosidasy, jejíž monomerní jednotky vytvářejí dekamer. Agregace podjednotek zvýší aktivitu enzymu a výsledkem je rychlé uvolnění potřebného množství kyseliny abscisové, která uzavírá póry, a tak zabraňuje nadměrnému vypařování vody. Mechanismus syntézy a uvolnění kyseliny abscisové je znázorněn na obrázku 5 (s. 16).



**Obr. 4:** Kyselina abscisová ve formě  $\beta$ -glukosidu [52].



**Obr. 5: Metabolismus kyseliny abscisové.**

*De novo* syntéza kyseliny abscisové (ABA) je iniciována oxidativním štěpením xantofylu v plastidech. Odštěpený xanthoxin je transportován do cytoplazmy, kde je přeměněn na aktivní kyselinu abscisovou. ABA může být skladována ve vakuole ve formě inaktivního  $\beta$ -glukosidu. Sucho nebo osmotický stres indukují polymerizaci  $\beta$ -glukosidasy (AtBG1), která ve formě dekamery může zpět uvolnit aktivní kyselinu abscisovou [49].

### 1.1.7. $\beta$ -Hexosaminidasa

#### 1.1.7.1. Charakterizace rostlinných $\beta$ -hexosaminidas

$\beta$ -Hexosaminidasa ( $\beta$ -N-acetylhexosaminidasa, EC 3.2.1.52) je hojně rozšířeným enzymem. Byla izolována z mnoha rostlin a z jejich různých částí. Tabulka 4 (s. 17) shrnuje charakteristiky  $\beta$ -hexosaminidas ze sazenic kukuřice seté (*Zea mays* L.) [31], ze semen rýže seté (*Oryza sativa* L.) [32], z vodního melounu, tj. plodu lubenice obecné (*Citrullus lanatus* Thumb.) [33], ze semen pískavice řecké seno (*Trogonella foenum graecum* L.) [37] a ze sazenic vigny zlaté (*Vigna radiata* L.) [34].

V genomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) byly nalezeny tři geny pro  $\beta$ -hexosaminidasu. Proteiny kódované těmito geny byly exprimovány a charakterizovány. Bylo zjištěno, že jeden z nich, protein s molekulovou hmotností 68 kDa, je lokalizován ve vakuole, zatímco další dvě izoformy jsou lokalizované v cytoplazmatické membráně a

jejich molekulová hmotnost je 64 a 65 kDa. Všechny tři izoformy jsou *N*-glykosylované [55].

**Tab. 4: Charakteristiky  $\beta$ -hexosaminidas z vybraných rostlinných zdrojů.**

Název rostliny	Zdroj	Charakteristika $\beta$ -hexosaminidas					Ref.
		M* [kDa]	stupeň polymerace	teplotní optimum [°C]	pH optimum	pI	
Rýže setá ( <i>Oryza sativa</i> L. var. Dongjin)	semena	37,4	monomer	50	5,0	–	32
Pískavice řecké seno ( <i>Trogonella foenum graecum</i> L.)	semena	84 ± 10 72 ± 10 180 ± 10 150 ± 10	homotrimer homotrimer homohexamer homopentamer	40 – 45	6,0 5,0 4,0 4,8	6,78 6,3 4,9 4,65	37
Vigna zlatá ( <i>Vigna radiata</i> L.)	sazenice	135 127 110	homodimer heterodimer homodimer	65 65 50	5,4 4,7 5,7	6,3 6,1 5,9	34
Kukuřice setá ( <i>Zea mays</i> L.)	sazenice	66	monomer	55	4,5	6,75	31
Lubenice obecná ( <i>Citrullus lanatus</i> Thumb.)	plod	150	–	–	5,0 - 5,5	–	33

– daná charakteristika nebyla studována

\* molekulová hmotnost byla stanovena gelovou filtrací, vztahuje se k celému enzymu

#### 1.1.7.2. Funkce rostlinných $\beta$ -hexosaminidas

$\beta$ -Hexosaminidasa patří mezi glykosidasy štěpící jednotlivé monosacharidy od neredukujícího konce polysacharidového řetězce. Na rozdíl od jiných glykosidas je  $\beta$ -hexosaminidasa specifická vůči dvěma substrátům: *N*-acetylglukosaminu a *N*-acetylgalaktosaminu, které jsou složkami rostlinných polysacharidů, ale také glykoproteinů a glykolipidů [31]. *N*-Acetylglukosamin je však preferovanějším substrátem.

Jednou z možných úloh  $\beta$ -hexosaminidas je účast při zrání plodů. Důkazem pro toto tvrzení je pozorovaný mírný nárůst aktivity během vývoje plodu a především pak prudký nárůst aktivity při zrání plodu papriky roční (*Capsicum annuum* L.). V plodech papriky byly nalezeny tři izoformy  $\beta$ -hexosaminidas. Je zajímavé, že během zrání plodu měl

enzym charakter glykoproteinů, zatímco v jiných fázích vývoje nebyla sacharidová složka téměř pozorována. Poměr sacharidové a proteinové složky navíc v průběhu zrání postupně klesal v důsledku aktivity dalších glykosidas.  $\beta$ -Hexosaminidasa ve zrajících plodech pravděpodobně nepůsobí sama, ale spolupracuje s  $\alpha$ -mannosidasou. Předpokládá se, že jejich vztah je pro zrající plody klíčový [35].

V semenech a sazenicích kukuřice seté (*Zea mays* L.) byl pozorován nárůst aktivity  $\beta$ -hexoaminidasy během klíčení, což svědčí o jejím uplatnění při hydrolyze zásobních glykoproteinů [34] a uvolňování *N*-acetylglukosaminu v souvislosti s tímto procesem. Byly nalezeny nejméně tři izoformy, které se lišily v substrátové specifitě. Obecně však štěpily terminální *N*-acetylglukosamin z řetězců oligosacharidů, nejpreferovanějšími substráty byly molekuly s nižší molekulovou hmotností. Ukázalo se, že jsou velmi specifické vůči hydrolyze oligosacharidů s obecným vzorcem  $(\text{GlcNAc})_n$  na monosacharid  $(\text{GlcNAc})$  a oligosacharid  $(\text{GlcNAc})_{n-1}$  [31].

$\beta$ -Hexosaminidasa z kukuřice byla také schopná hydrolyzovat terminální *N*-acetylglukosamin z chitinu [31]. Oproti tomu  $\beta$ -hexosaminidasa ze semen rýže seté (*Oryza sativa* L.) štěpila pouze *N*-acetylglukosamin a *N*-acetylgalaktosamin z konců oligosacharidů, schopnost hydrolyzovat vazby v chitinu neměla [32]. Aktivita vůči chitinovým oligosacharidům byla studována také u dvou izoform  $\beta$ -hexosaminidasy izolovaných z listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.). Z oligosacharidů složených ze dvou až pěti *N*-acetyl- $\beta$ ,D-glukosidových jednotek byl nejrychleji štěpen oligosacharid  $(\text{GlcNAc})_5$  [36].

Všechny tři izoformy  $\beta$ -hexosaminidasy exprimované podle genové sekvence v genomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) byly schopné hydrolyzovat *N*-glykany. Z oligosacharidového řetězce odštěpovaly terminální *N*-acetylglukosamin  $(\text{GlcNAc})$  nebo chitobiosu  $(\text{GlcNAc})_2$ . Nejvyšší afinitu k tomuto substrátu vykazovala vakuolární izoforma  $\beta$ -hexosaminidasy. Její pravděpodobná funkce je tedy úprava *N*-glykanů před transportem glykoproteinů do jejich cílové lokalizace. Funkce membránově vázaných izoform je patrně spojena s glykoproteiny cytoplazmatické membrány a sekretovanými glykoproteiny. Jedna z těchto dvou izoform však efektivně štěpila především chitotriosu, proto se pravděpodobně podílí také na obraně rostlin proti patogenům [55].

Také u  $\beta$ -hexosaminidasy ze sazenic kukuřice byla diskutována možnost její spolupráce s endochitinasou při štěpení buněčných stěn některých patogenů, především parazitických hub, jejichž buněčná stěna je tvořena převážně chitinem [31]. Stejně tak se podílí na obraně

semen a mladých sazenic proti houbovým infekcím i  $\beta$ -hexosaminidasa z vigny zlaté (*Vigna radiata* L.) [34].

### 1.1.8. $\alpha$ -Mannosidasa

#### 1.1.8.1. Charakterizace rostlinných $\alpha$ -mannosidas

$\alpha$ -Mannosidasa ( $\alpha$ -mannosid mannohydrolasa, EC 3.2.1.24) je v rostlinné říši relativně hojně zastoupena. Byla nalezena v semenech [8, 41], v plodech [33, 39, 40] i v dalších částech rostlin. Z mnoha rostlinných zdrojů byla  $\alpha$ -mannosidasa izolována. Charakteristiky tohoto enzymu ze semen jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba* L.) [41] a papáji melounovité (*Carica papaya* L.) [8], ze sazenic vigny zlaté (*Vigna radiata* L.) [42], z plodů lubenice obecné (*Citrullus lanatus* Thumb.) [33], rajčete jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [40] a papriky roční (*Capsicum annuum* L.) [39] jsou uvedeny v tabulce 5 (s. 20).

Jak je vidět z tabulky 5 (s. 20), mnohé studované  $\alpha$ -mannosidasy fungují v oligomerním uspořádání. Např. enzym z jinanu dvoulaločného je pravděpodobně homotrimer [41],  $\alpha$ -mannosidasa z plodů papáji melounovité je homodimer [8]. Enzymy z jednotlivých zdrojů se liší také přítomností či nepřítomností sacharidové složky.  $\alpha$ -Mannosidasy z jinanu dvoulaločného [41] a z vigny zlaté [42] byly charakterizovány jako glykoproteiny, zatímco u enzymů z rajčete jedlého [40] a z papriky roční [39] sacharidová složka chybí. Jiná studie  $\alpha$ -mannosidasy z papriky roční ukázala, že během zrání plodů je tento enzym glykosylován, během vývoje plodů je však podíl sacharidové složky velmi malý [35].

**Tab. 5: Charakteristiky  $\alpha$ -mannosidas z vybraných rostlinných zdrojů.**

Název rostliny	Zdroj	Charakteristika $\alpha$ -mannosidasy				Ref.
		M [kDa]		teplotní optimum [°C]	pH optimum	
		gel. filtrace	SDS-PAGE			
Jinan dvoulaločný ( <i>Ginkgo biloba</i> L.)	semena	340	120	–	5,0	41
Papája melounovitá ( <i>Carica papaya</i> L.)	semena	156	78	55 - 60	3,5 - 4,5	8
Vigna zlatá ( <i>Vigna radiata</i> L.)	sazenice	–	125	–	6,0	42
Lubenice obecná ( <i>Citrullus lanatus</i> Thumb.)	plod	270	–	–	4,0 - 4,5	33
Rajče jedlé ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	plod	43 75	– 38	55 - 65 65	4,5 4,5	40
Paprika roční ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	plod	43	23	50	5,7	39

– daná charakteristika nebyla studována

### 1.1.8.2. Funkce rostlinných $\alpha$ -mannosidas

Jednou ze studovaných oblastí působení rostlinných  $\alpha$ -mannosidas je vývoj a zrání plodů. Předpokládá se, že díky hydrolytickému štěpení sacharidové části glykoproteinů  $\alpha$ -mannosidasou dochází k měknutí plodů. Ve shodě s tímto tvrzením byl u  $\alpha$ -mannosidasy z rajčete jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pozorován při zrání a měknutí nárůst aktivity [40], stejně tak byl nárůst pozorován i v plodech papriky roční (*Capsicum annuum* L.) [39]. V jiném experimentu vykazovala  $\alpha$ -mannosidasa z rajčete jedlého během vývoje plodu velký nárůst aktivity, po dokončení této fáze hodnota aktivity mírně klesla, při samotném zrání pak již stoupala jen nepatrně. Tyto výsledky naznačují, že  $\alpha$ -mannosidasa je přítomna především v aktivně rostoucích částech rostlin. (Vysoká aktivita byla naměřena také v koncích výhonků, v květech a v řapících listů.) Tento experiment také ve zrajících plodech papriky roční ukázal pravděpodobnou spolupráci mezi  $\alpha$ -mannosidasou a  $\beta$ -hexosaminidasou.

Předmětem výzkumu jsou také  $\alpha$ -mannosidasy ze semen různých rostlin.  $\alpha$ -Mannosidasa ze semen papáji melounovité (*Carica papaya* L.) je schopná štěpit  $\alpha$ -mannosu z  $\alpha$ ,D-

mannooligosacharidů a z dalších  $\alpha$ ,D-mannosidů, schopnost hydrolyzovat polysacharidy však nemá [8]. Pro  $\alpha$ -mannosidasu ze semen jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba* L.) se ukázaly být nejvýhodnějšími substráty volné oligomannany, které nesou jeden *N*-acetylglukosamin. Tyto *N*-glykany vznikají endolytickým štěpením glykoproteinů, které obsahují *N*-glykosidicky vázaný oligomannan, a předpokládá se, že hrají důležitou roli při vývoji a růstu rostlinných buněk jako signální molekuly.  $\alpha$ -Mannosidasa se tedy na tomto procesu pravděpodobně podílí [41].

Byla studována také substrátová specifita  $\alpha$ -mannosidasy z kanaválie (*Canavalia ensiformis* L.) [38]. Tento enzym štěpil řadu přírodních  $\alpha$ -mannooligosacharidů. Hydrolyzou mannotetraosy vznikla mannososa a mannotriosa, jako reakční meziproduct však byla pozorována i mannobiosa. Oproti tomu při degradaci kvasničného mannanu byla uvolňována pouze mannososa. Molekuly mannanu se zdají být tvořeny hlavním polysacharidovým řetězcem a postranními oligosacharidovými řetězci, degradovány jsou však pouze postranní řetězce. Hlavní řetězec je vůči působení  $\alpha$ -mannosidasy z kanaválie rezistentní.  $\alpha$ -Mannosidasa z kanaválie byla také schopná štěpit mannosu z různých glykoproteinů, ovšem pouze v tom případě, že byla mannososa na konci sacharidového řetězce. Kromě hydrolytické aktivity měl tento enzym také transglykosylační aktivitu.

## 1.2. ROSTLINNÝ STRES

Rostliny, stejně jako živočichové a další organismy, potřebují pro svůj růst a vývoj vhodné podmínky. Jsou-li tyto podmínky porušeny, vzniká pro rostlinu stresová situace.

Rostliny jsou nepohyblivé organismy, proto na stres reagují přizpůsobením svého metabolismu. Mechanismy obrany proti působení stresu jsou různé. Řada stresových situací je spojena s hormonální odpovědí [43], v mnoha případech se však uplatňují i glykosidasy, které mohou např. uvolňovat toxické aglykony vázané v glykosidech [1] nebo štěpit polysacharidy buněčných stěn parazitických hub [31].

### 1.2.1. Druhy rostlinného stresu

Stresové podmínky mohou být rozděleny do dvou kategorií podle toho, zda jsou životného či neživotného charakteru. Příkladem abiotického stresu je sucho, mráz nebo nadbytek solí v půdě. Biotický stres naopak představují bakterie, viry, houby, bezobratlí a parazitické rostliny [43].

### 1.2.2. Rostlinné viry

Rostlinné viry tvoří přibližně čtvrtinu všech dosud objevených virů. Většinou se jedná o pozitivní ss-RNA viry, jsou však známy i případy rostlinných DNA-virů, jedno- nebo dvouvláknových [45, 53].

Existují dva způsoby, jak může být rostlina infikována virem [43]. Zaprvé je to horizontální přenos, tedy přenos z vnějšího zdroje viru, zadruhé je to vertikální přenos, při němž dceřiná rostlina získá infekci od rostliny mateřské. Může k tomu dojít při pohlavním (jsou-li infikovaná semena) i při nepohlavním rozmnožování (např. při řízkování). K šíření infekce rostlinou poté dochází především přes plazmodezmata a floém [53]. Nejčastější projevy virové infekce jsou nekrosa, mosaika nebo žloutnutí pletiv, často také dochází k brzdění růstu rostliny.

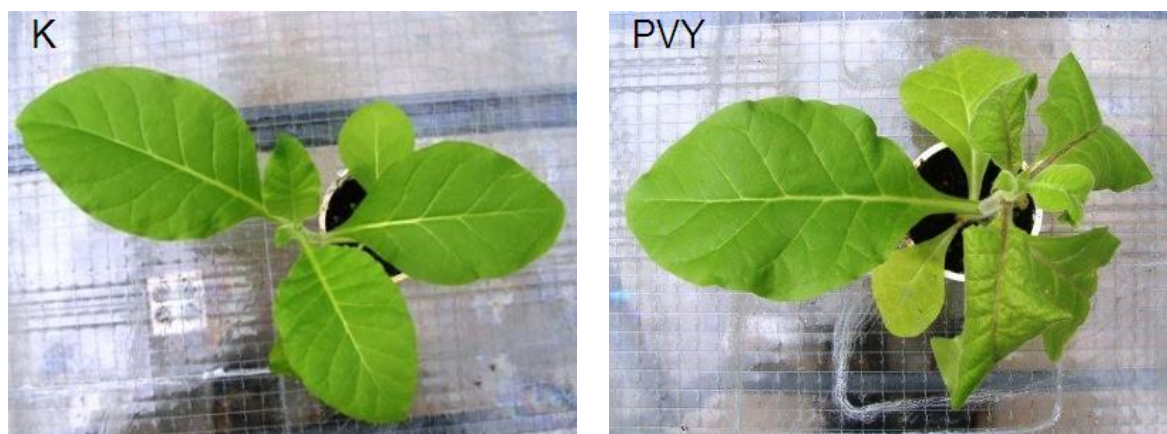
Rostlinné viry jsou podle kritérií určených Mezinárodní komisí pro taxonomii virů (The International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) rozděleny do více než čtyřiceti čeledí [45, 53]. Mezi pozitivní ss-RNA viry čeledi *Potyviridae* a rodu *Potyvirus* patří i druh Y virus bramboru (PVY, „Potato virus Y“), jehož vliv na aktivitu glykosidas v rostlinách tabáku jsem studovala ve své práci.

### 1.3. TABÁK (*NICOTIANA*)

Tabák (*Nicotiana*) je rod patřící do relativně široké čeledi lilkovitých (Solanaceae). Zahrnuje asi 14 druhů, které pocházejí převážně z Jižní Ameriky, a dále také ze Severní Ameriky, Austrálie a Jižního Pacifiku [47, 54]. Tabák viržinský (*Nicotiana tabacum* L.) pravděpodobně vznikl křížením druhu *Nicotiana silvestris*, který pochází z Argentiny, s druhem *Nicotiana otophora*, který je původem z Argentiny a Bolívie.

Tabák viržinský je jednoletá bylina dosahující výšky až 3 m. Její listy jsou téměř přisedlé, s čepelí podlouhlou a zašpičatělou. Povrch listů a lodyhy je porostlý krátkými žláznatými chloupky. Květy mají růžové až červené koruny s dlouhou trubkou a plody tabáku jsou mnohosemenné tobolky [47].

Tabák patří mezi užitkové rostliny; pěstuje se v četných odrůdách, především v Jižní Americe. Jeho listy se suší a používají jako kuřivo, vývar z listů se používá k hubení živočišných škůdců rostlin [54]. Z možných chorob tabáku jsou nejčastější padlí tabákové a padání rostlin způsobené hádětkem zhoubným [46]. V této práci jsem studovala vliv virové infekce způsobené PVY; na obrázku 6 jsou fotografie neinfikovaných, kontrolních rostlin a rostlin infikovaných Y virem bramboru (PVY).



**Obr. 6: Kontrolní (K) a infikované (PVY) rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit havana*).**

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit, zda infekce způsobená Y virem bramboru (PVY, „Potato virus Y“) ovlivňuje aktivitu exolytických glykosidas v listech tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana* SR1). Za tímto cílem bylo třeba:

1. Stanovit aktivitu rozpustných glykosidas v systémově infikovaných listech tabáku oproti rostlinám kontrolním.
2. Stanovit aktivitu membránově vázaných glykosidas v systémově infikovaných listech tabáku oproti rostlinám kontrolním.
3. Stanovit aktivitu glykosidas v exudátu systémově infikovaných listech tabáku oproti rostlinám kontrolním.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. PŘÍSTROJE

Analytické váhy 100A – Denver Instrument Company, USA

Centrifuga Sigma 3K30 – Sigma Laborzentrifugen, Německo

Centrifuga Universal 32 R – Hettich Zentrifugen, Německo

Inkubátor se suchou lázní EL-02 – Major Science, USA

Magnetická míchačka s ohřívačem RH basic – Labortechnik, Německo

pH/mV metr UB-10 – Denver Instrument Company, USA

Regulátor vakua V.A.R. – Van der Heijden, Německo

Rotační olejová vývěva VR 1,5-21 – P-LAB, ČR

Spektrofotometr Ultrospec 2100 Pro – Biochrom, Velká Británie

#### 3.2. CHEMIKÁLIE A PUFRY

##### 3.2.1. Chemikálie

Bradfordovo činidlo - Sigma, USA

Ethanol – Lachema, ČR

Fenylmethylsulfonylfluorid – Sigma, USA

Chlorid hořečnatý – Sigma, USA

Chlorid vápenatý – Lachema, ČR

Merkaptoethanol – Sigma, USA

*p*-nitrofenol – Sigma, USA

*p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-galaktopyranosid – Sigma, USA

*p*-nitrofenyl- $\beta$ ,D-galaktopyranosid – Sigma, USA

*p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-glukopyranosid – Sigma, USA

*p*-nitrofenyl- $\beta$ ,D-glukopyranosid – Sigma, USA

*p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-mannopyranosid – Sigma, USA

*p*-nitrofenyl-N-acetyl- $\beta$ ,D-glukosaminid – Sigma, USA

Polyvinylpyrrolidon – Sigma, USA

Sacharosa – Lach-Ner, ČR

Triton X-100 – Sigma, USA

### 3.2.2. Pufry

0,1M borátový pufr pH 9,0

0,1M citrátový pufr pH 4,5

0,1M citrátový pufr pH 6,0

0,25mM Tris-HCl pufr pH 7,8

## 3.3. ROSTLINNÝ MATERIÁL

Pro studium vlivu stresu na aktivitu glykosidas jsem použila rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana* SR1) laskavě poskytnuté RNDr. Helenou Synkovou, CSc., Ústav experimentální botaniky, AV ČR. Použila jsem kontrolní rostliny a rostliny infikované Y virem bramboru (PVY, „Potato virus Y“), kmenem NTN. Kontrolní i infikované rostliny byly 11. 12. 2009 vysety na živné médium, 18. 1. 2010 byly přesazeny do skleníku, kde byly 11. 2. 2010 znovu přesazeny. 19. 3. 2010 byla část rostlin infikována. Sběr listů jsem provedla 2. 3. 2010. Ke všem experimentům jsem využila vrchní, plně vyvinuté listy, které byly (v případě infikovaných rostlin) infikovány systémově. U všech listů jsem odstranila řapík. Pro jednotlivá měření jsem použila směsné vzorky listů tabáku.

## 3.4. METODY

### 3.4.1. Kalibrační křivka pro koncentraci *p*-nitrofenolu v roztoku

Rozpuštěním *p*-nitrofenolu v 0,1M borátovém pufru pH 9,0 jsem připravila roztoky o výsledné koncentraci *p*-nitrofenolu 0,02 mmol/l; 0,04 mmol/l; 0,06 mmol/l; 0,08 mmol/l a 0,1 mmol/l. Změřila jsem absorbanci těchto roztoků při vlnové délce 405 nm, což je absorpční maximum *p*-nitrofenolu, proti slepému vzorku. Ze získaných hodnot jsem

sestrojila kalibrační přímku závislosti absorbance roztoku na koncentraci *p*-nitrofenolu (kap. 4.1., s. 32).

#### **3.4.2. Extrakce rozpustných glykosidas z listů tabáku**

Navážku 1 g listů kontrolních rostlin jsem homogenizovala ve třecí misce v trojnásobném množství 0,1M citrátového pufru pH 6,0. Poté jsem do extrakční směsi přidala asi 0,2 mg PVP a extrahované listy jsem centrifugovala 15 min při 16600 x g a 4°C. Supernatant jsem odebrala pro stanovení aktivit glykosidas (kap. 3.4.6., s. 30), sediment jsem uchovala pro další použití (kap. 3.4.3). Stejně jsem postupovala i s navážkou 1 g listů infikovaných rostlin.

#### **3.4.3. Extrakce membránově vázaných glykosidas z listů tabáku**

Sediment získaný centrifugací listů kontrolních i infikovaných rostlin (kap. 3.4.2.) jsem resuspendovala ve směsi 0,1M citrátového pufru pH 6,0 a Tritonu X-100 (200 µl Tritonu X-100 v 1 ml 0,1M citrátového pufru pH 6,0). Směs 0,1M citrátového pufru pH 6,0 a Tritonu X-100 byla v trojnásobném množství proti čerstvé hmotnosti listů. Suspenzi jsem nechala 15 min stát a poté jsem ji centrifugovala 15 min při 16600 x g a 4°C. Supernatant jsem použila pro stanovení aktivit glykosidas (kap. 3.4.6, s. 30).

#### **3.4.4. Příprava exudátu z listů tabáku**

Z kontrolních rostlin tabáku jsem odebrala 20 g středních listů, z nichž jsem odstranila řapík a střední žilku, takže jsem je rozdělila na poloviny. Vždy čtvrtinu z celkové hmotnosti listů jsem stočila do ruličky a řeznou stranou dolů jsem je vložila do Erlenmayerovy baňky, kterou jsem naplnila roztokem pro vakuovou infiltraci tak, aby listy byly ponořené. Roztok pro vakuovou infiltraci obsahoval 0,5 l 25mM Tris-HCl pufru pH 7,8; 1,4104 g MgCl<sub>2</sub>; 1,0208 g CaCl<sub>2</sub>; 118,9 g sacharosu; 0,0604 g PMSF rozpuštěného v 1 ml čistého ethanolu a 225 µl 0,5M merkaptoethanolu. Erlenmayerovy baňky s vloženými listy jsem umístila do exsikátoru, v němž jsem pomocí vývěvy snížila tlak. Vakuovou infiltraci jsem nechala probíhat, dokud listy tabáku neztmavly. Poté jsem listy osušila mezi buničinou a po jednom jsem je stočila do ruliček, které jsem vložila řeznou stranou dolů do centrifugačních kyvet. Na dně kyvet byla přibližně lžička skleněných kuliček, aby mezi ně mohl vytéci exudát. Listy jsem poté centrifugovala 15 min při 7100 x g a 4°C. Po ukončení centrifugace jsem ze dna kyvet odebrala exudát, tj. kapalinu

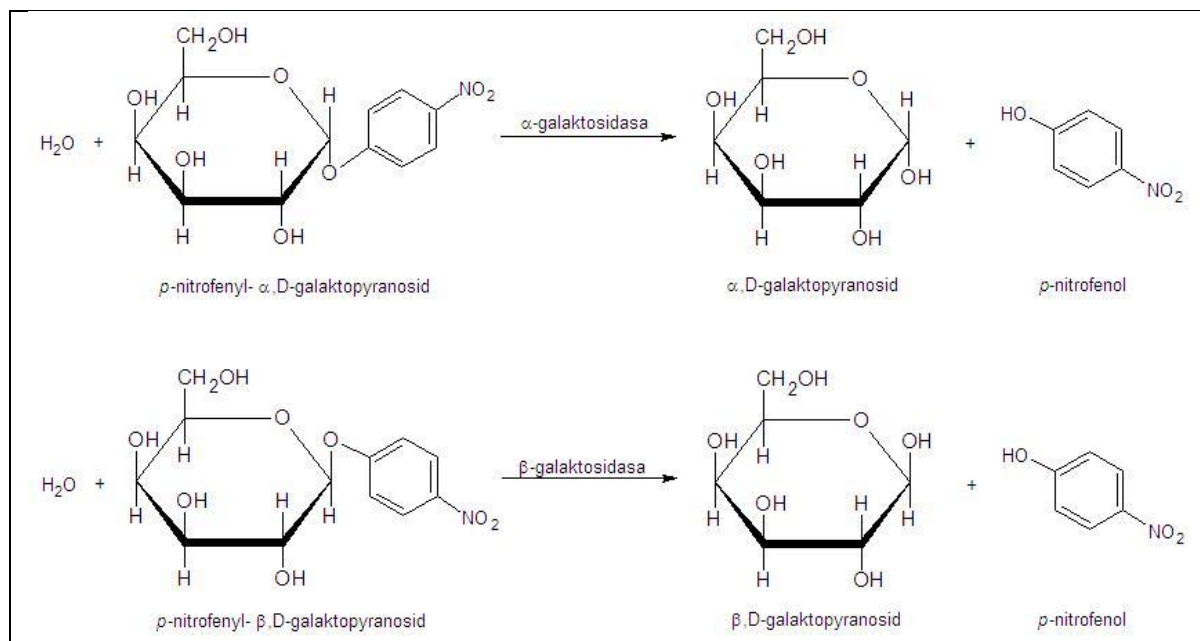
z žilek listů, v níž jsem stanovila aktivity glykosidas (kap. 3.4.6., s. 30). Stejně jsem postupovala i s navázkou 20 g listů infikovaných rostlin.

Kontrolní i infikované listy tabáku použité pro přípravu exudátu jsem zpracovala způsobem popsaným v kapitolách 3.4.2. a 3.4.3. (s. 27). Připravila jsem extrakty, v nichž jsem poté stanovila aktivitu glykosidas (kap. 3.4.6., s. 30).

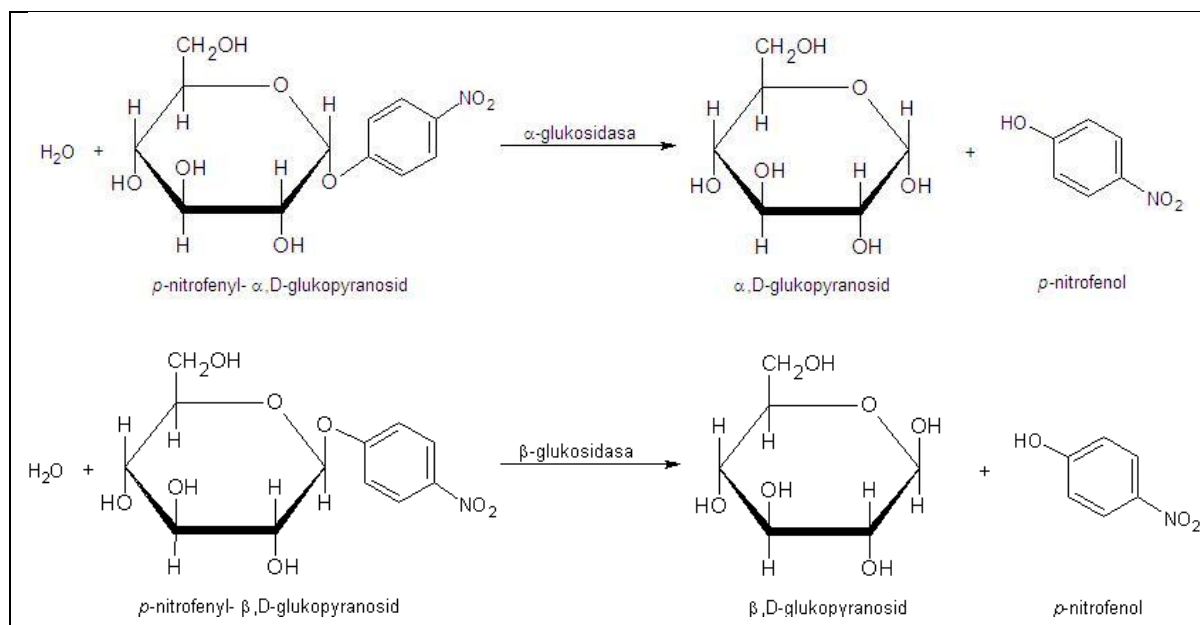
### 3.4.5. Stanovení aktivity glykosidas *in vitro*

Pro stanovení aktivity glykosidas *in vitro* se využívá jejich vysoké specifity. Používají se přirozené i umělé substráty, je však výhodné použít takový substrát, který po hydrolyze poskytne barevný produkt, jehož koncentraci v reakční směsi můžeme změřit spektrofotometricky. Nejčastěji používanými umělými substráty jsou *p*-nitrofenyl-glykosidy. Hydrolytickým štěpením glykosidické vazby v molekule *p*-nitrofenyl-glykosidu dojde k uvolnění *p*-nitrofenolu, který po zalkalizování roztoku poskytne žluté zbarvení. Absorbance roztoku se měří při 405 nm, což je absorpční maximum *p*-nitrofenolu. Dalšími umělými substráty používanými pro stanovení aktivit glykosidas jsou *p*-methylumbelliferyl- $\beta$ ,D-*N*-acetylglykosidy, které poskytují fluorescenci.

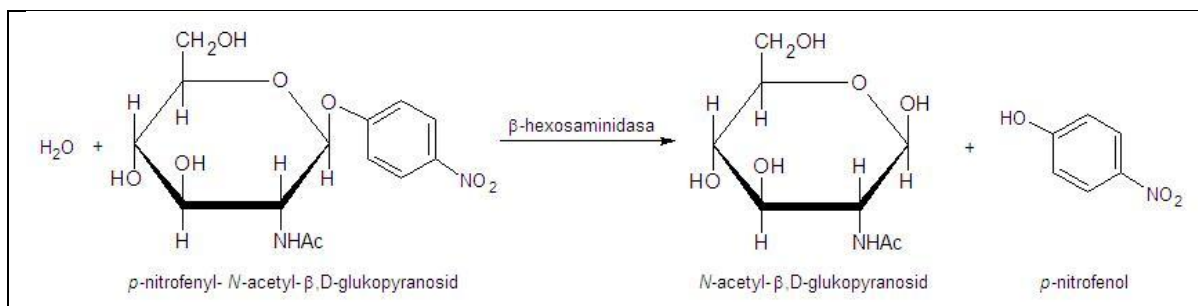
V této práci jsem studovala vliv virové infekce na aktivitu těchto glykosidas:  $\alpha$ -galaktosidasy,  $\beta$ -galaktosidasy,  $\alpha$ -glukosidasy,  $\beta$ -glukosidasy,  $\beta$ -hexosaminidasy a  $\alpha$ -mannosidasy. Pro stanovení aktivity  $\alpha$ -galaktosidasy, resp.  $\beta$ -galaktosidasy jsem využila reakci s *p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-galaktopyranosidem, resp. s *p*-nitrofenyl- $\beta$ ,D-galaktopyranosidem, jak je znázorněno na obrázku 7 (s. 29). Aktivitu  $\alpha$ -glukosidasy jsem stanovila pomocí reakce s *p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-glukopyranosidem a aktivitu  $\beta$ -glukosidasy jsem stanovila pomocí reakce s *p*-nitrofenyl- $\beta$ ,D-glukopyranosidem, jak znázorňuje obrázek 8 (s. 29). Na obrázku 9 (s. 30) je znázorněna hydrolytická reakce mezi *p*-nitrofenyl-*N*-acetyl- $\beta$ ,D-glukosaminidem a  $\beta$ -hexosaminidasou, kterou jsem využila pro stanovení aktivity  $\beta$ -hexosaminidasy a obrázek 10 (s. 30) znázorňuje reakci mezi *p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-mannopyranosidem a  $\alpha$ -mannosidasou, kterou jsem využila pro stanovení aktivity tohoto enzymu.



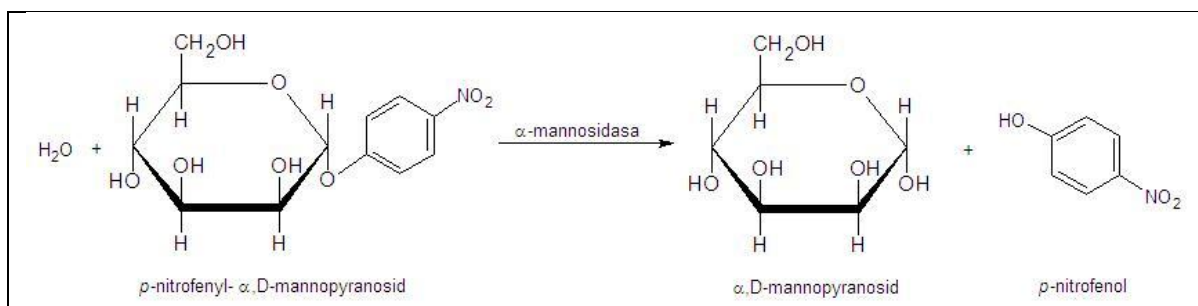
**Obr. 7: Hydrolytické štěpení *p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-galaktopyranosidu  $\alpha$ -galaktosidasou a *p*-nitrofenyl- $\beta$ ,D-galaktopyranosidu  $\beta$ -galaktosidasou.**



**Obr. 8: Hydrolytické štěpení *p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-glukopyranosidu  $\alpha$ -glukosidasou a *p*-nitrofenyl- $\beta$ ,D-glukopyranosidu  $\beta$ -glukosidasou.**



**Obr. 9:** Hydrolytické štěpení *p*-nitrofenyl-*N*-acetyl- $\beta$ ,D-glukosaminidu  $\beta$ -hexosaminidasou.



**Obr. 10:** Hydrolytické štěpení *p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-mannopyranosidu  $\alpha$ -mannosidasou.

### 3.4.6. Stanovení aktivity glykosidas

Reakční směs pro stanovení aktivit glykosidas z listů tabáku obsahovala 50  $\mu\text{l}$  0,1M citrátového pufru pH 4,5; 50  $\mu\text{l}$  2mM roztoku umělého substrátu (*p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-galaktopyranosid pro  $\alpha$ -galaktosidasu; *p*-nitrofenyl- $\beta$ ,D-galaktopyranosid pro  $\beta$ -galaktosidasu; *p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-glukopyranosid pro  $\alpha$ -glukosidasu; *p*-nitrofenyl- $\beta$ ,D-glukopyranosid pro  $\beta$ -glukosidasu; *p*-nitrofenyl-*N*-acetyl- $\beta$ ,D-glukosamin pro  $\beta$ -hexosaminidasu a *p*-nitrofenyl- $\alpha$ ,D-mannopyranosid pro  $\alpha$ -mannosidasu) a 100  $\mu\text{l}$  roztoku enzymu, což byl extrakt z rozpustných nebo membránově vázaných proteinů z čerstvých listů, a to z kontrolních a infikovaných rostlin, exudát nebo extrakt z rozpustných nebo membránově vázaných proteinů z listů použitých pro přípravu exudátu, a to z kontrolních a infikovaných rostlin. Reakční směs jsem nechala inkubovat 10 min v případě extraktu rozpustné  $\beta$ -hexosaminidasu, v případě ostatních enzymů 30 min, vždy při 25°C. Poté jsem reakci zastavila přidáním 800  $\mu\text{l}$  0,1M borátového pufru pH 9,0. Množství uvolněného *p*-nitrofenolu jsem stanovila spektrofotometricky měřením při 405 nm proti slepému pokusu. Měření aktivity rozpustných i membránově vázaných glykosidas v čerstvých listech i v listech použitých pro přípravu exudátu jsem opakovala pětkrát. Naměřená data jsem

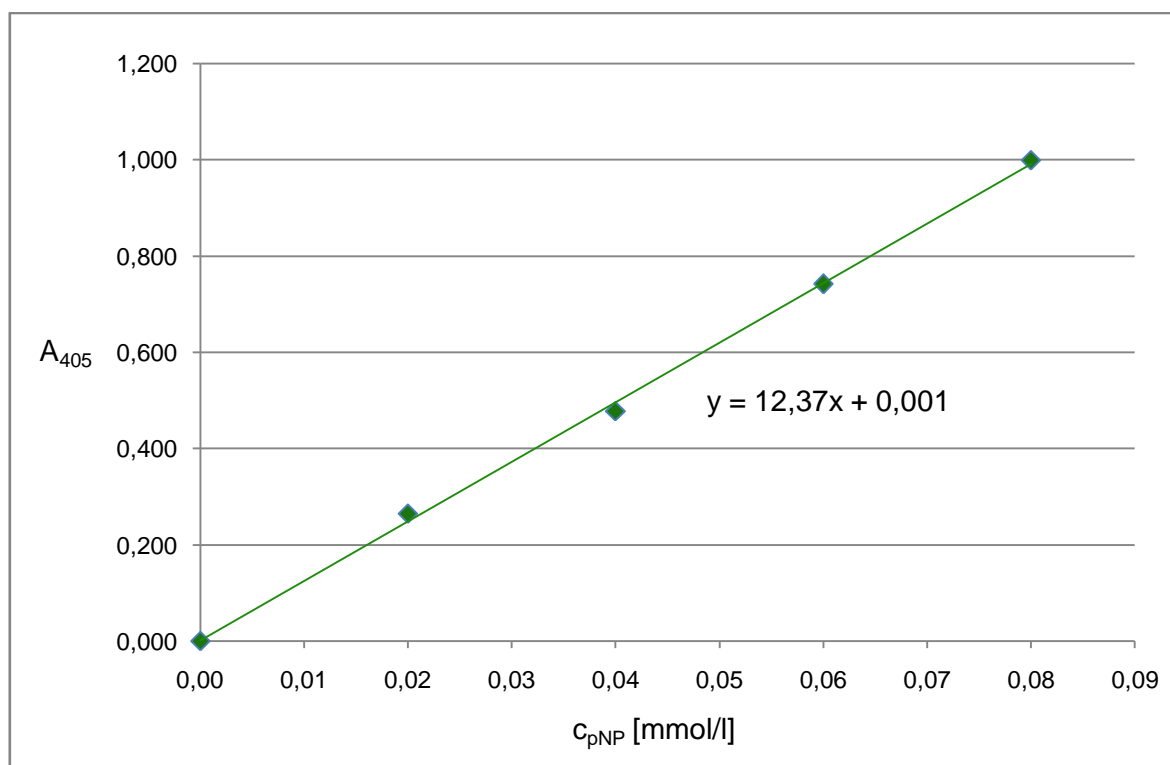
statisticky zpracovala a u hodnot aktivity rozpustných glykosidas jsem určila velikost směrodatné odchylky. Výsledné hodnoty jsem poté použila pro sestrojení grafů pro porovnání aktivit glykosidas v kontrolních a infikovaných rostlinách tabáku (kap. 4.2.1., s. 33; 4.2.2., s. 34; 4.2.4., s. 36 a 4.2.5., s. 37). Také hodnoty aktivity glykosidas v exudátu z kontrolních a infikovaných rostlin tabáku jsem použila pro sestrojení grafu (kap. 4.2.3., s. 35).

Množství enzymu jsem vyjádřila v jednotkách aktivity vztažené na 1 ml roztoku enzymu, tj. extraktu, resp. exudátu. Aktivita enzymu je jeho množství, které přemění 1  $\mu\text{mol}$  substrátu za minutu.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. KALIBRAČNÍ KŘIVKA ZÁVISLOSTI ABSORBANCE ROZTOKU NA KONCENTRACI *p*-NITROFENOLU

Z hodnot získaných postupem popsaným v kapitole 3.4.1. (s. 26) jsem sestrojila graf závislosti absorbance roztoku *p*-nitrofenolu při vlnové délce 405 nm na jeho koncentraci (obr. 11). Nejvyšší zvolená koncentrace roztoku *p*-nitrofenolu byla nižší než maximální možné množství této látky uvolněné při enzymatickém štěpení *p*-nitrofenylglykosidu. Tato závislost vykazovala lineární charakter. Získanou rovnici regrese jsem použila pro výpočet množství uvolněného *p*-nitrofenolu při stanovování aktivit glykosidas v kontrolních a infikovaných rostlinách.



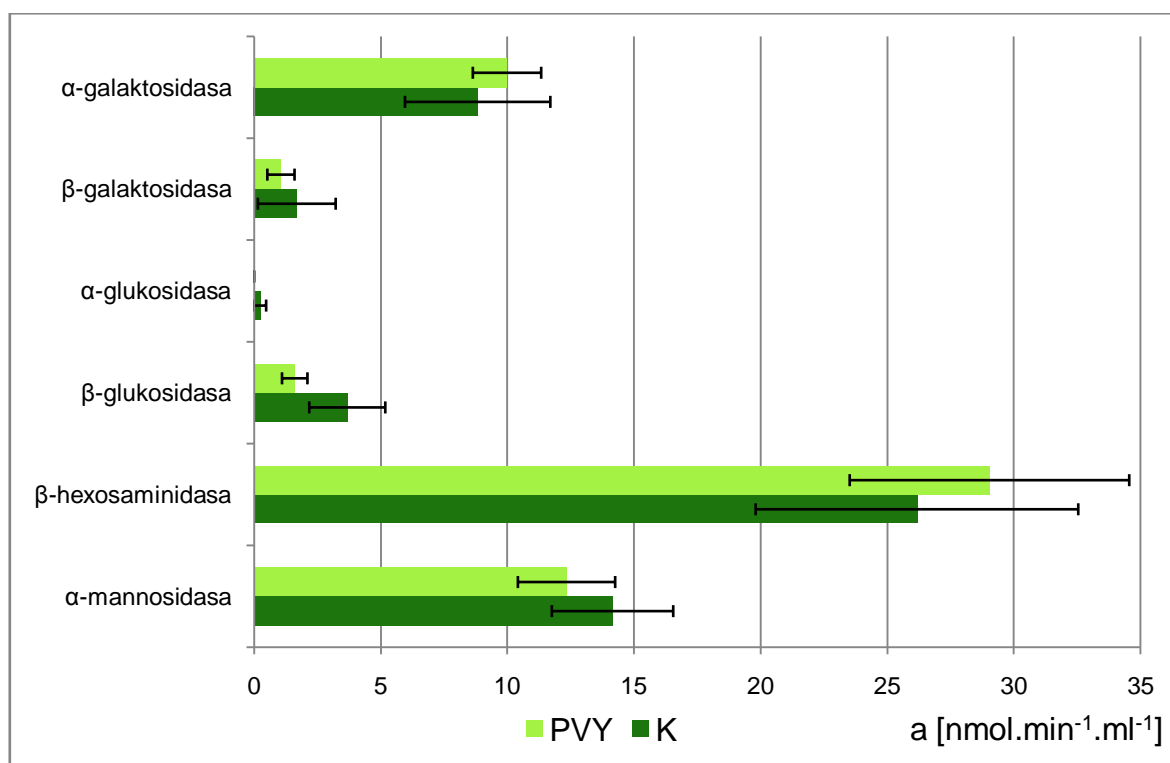
Obr. 11: Graf závislosti absorbance roztoku *p*-nitrofenolu na jeho koncentraci.

## 4.2. POROVNÁNÍ AKTIVIT GLYKOSIDAS V KONTROLNÍCH A INFIKOVANÝCH LISTECH TABÁKU.

### 4.2.1. Porovnání aktivit rozpustných glykosidas z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku

Z listů kontrolních a infikovaných listů tabáku jsem postupem popsáním v kapitole 3.4.2. (s. 27) připravila extrakt, v němž jsem zjišťovala přítomnost aktivity  $\alpha$ -galaktosidasy,  $\beta$ -galaktosidasy,  $\alpha$ -glukosidasy,  $\beta$ -glukosidasy,  $\beta$ -hexosaminidasy a  $\alpha$ -mannosidasy. Obrázek 12 dokumentuje, že v kontrolních rostlinách byla nejvyšší aktivita zjištěna pro  $\beta$ -hexosaminidasu a dále pak pro  $\alpha$ -mannosidasu a  $\alpha$ -galaktosidasu. V případě  $\alpha$ -glukosidasy nebyla aktivita téměř pozorována.

Hodnoty aktivity rozpustných glykosidas z kontrolních rostlin jsem porovnávala s hodnotami aktivit rozpustných glykosidas z rostlin infikovaných (obr. 12). V případě  $\beta$ -hexosaminidasy a  $\alpha$ -galaktosidasy jsem v extraktu z infikovaných rostlin zaznamenala nárůst aktivity proti kontrolním rostlinám, u ostatních sledovaných enzymů byla aktivita naopak menší.



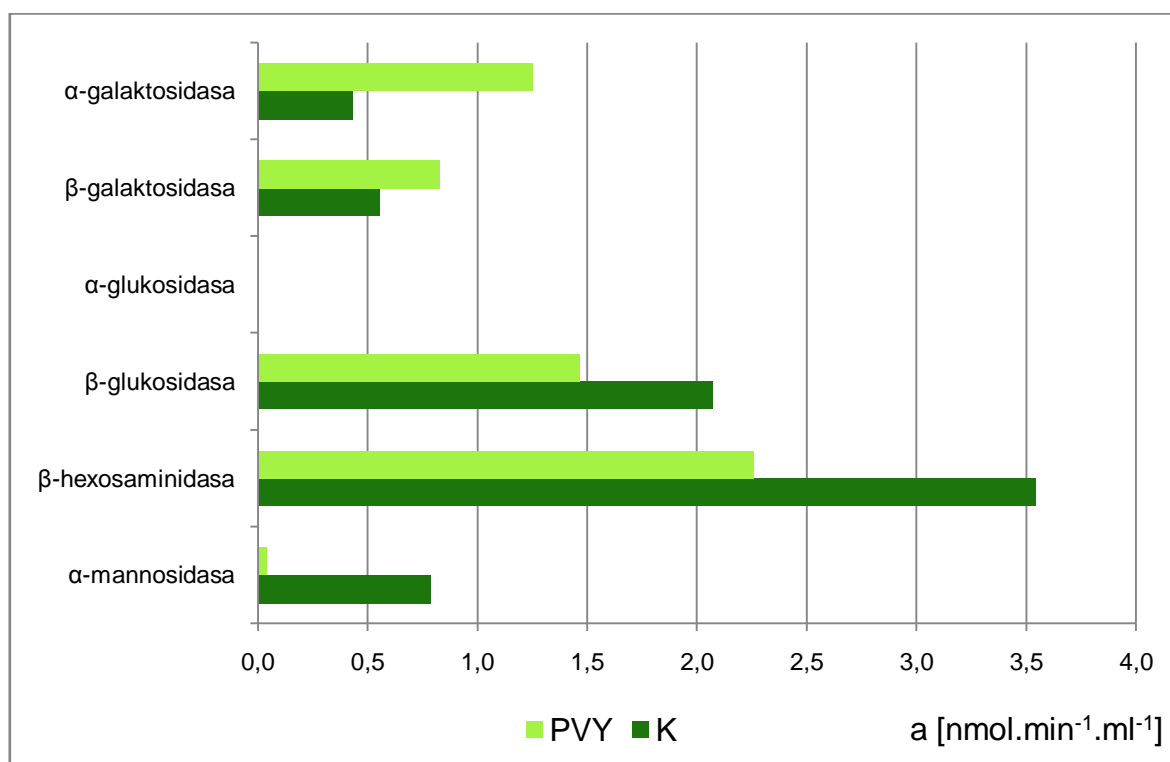
**Obr. 12: Porovnání aktivit rozpustných glykosidas z listů kontrolních (K) a infikovaných (PVY) rostlin tabáku.**

#### 4.2.2. Porovnání aktivit membránově vázaných glykosidas z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku

Postupem popsaným v kapitole 4.3.3. (s. 27) jsem z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku připravila extrakt, v němž jsem zjišťovala aktivitu membránově vázaných glykosidas ( $\alpha$ -galaktosidas,  $\beta$ -galaktosidas,  $\alpha$ -glukosidas,  $\beta$ -glukosidas,  $\beta$ -hexosaminidas a  $\alpha$ -mannosidas) (obr. 13).

Nejvyšší aktivitu z membránově vázaných glykosidas měla v extraktu z kontrolních listů  $\beta$ -hexosaminidasa, relativně velkou aktivitu měla také  $\beta$ -glukosidasa. Aktivitu  $\alpha$ -glukosidas jsem v tomto extraktu vůbec nezjistila.

Hodnoty aktivity glykosidas z kontrolních rostlin tabáku jsem porovnávala s hodnotami aktivit glykosidas z infikovaných rostlin (obr. 13). V případě  $\alpha$ - a  $\beta$ -galaktosidas jsem zaznamenala nárůst aktivity v infikovaných rostlinách, v případě  $\beta$ -glukosidas a  $\beta$ -hexosaminidas jsem naopak zaznamenala pokles aktivity. Aktivita  $\alpha$ -mannosidas rovněž klesla, avšak její hodnota byla na hranici měřitelnosti. V případě  $\alpha$ -glukosidas jsem nepozorovala žádnou aktivitu.

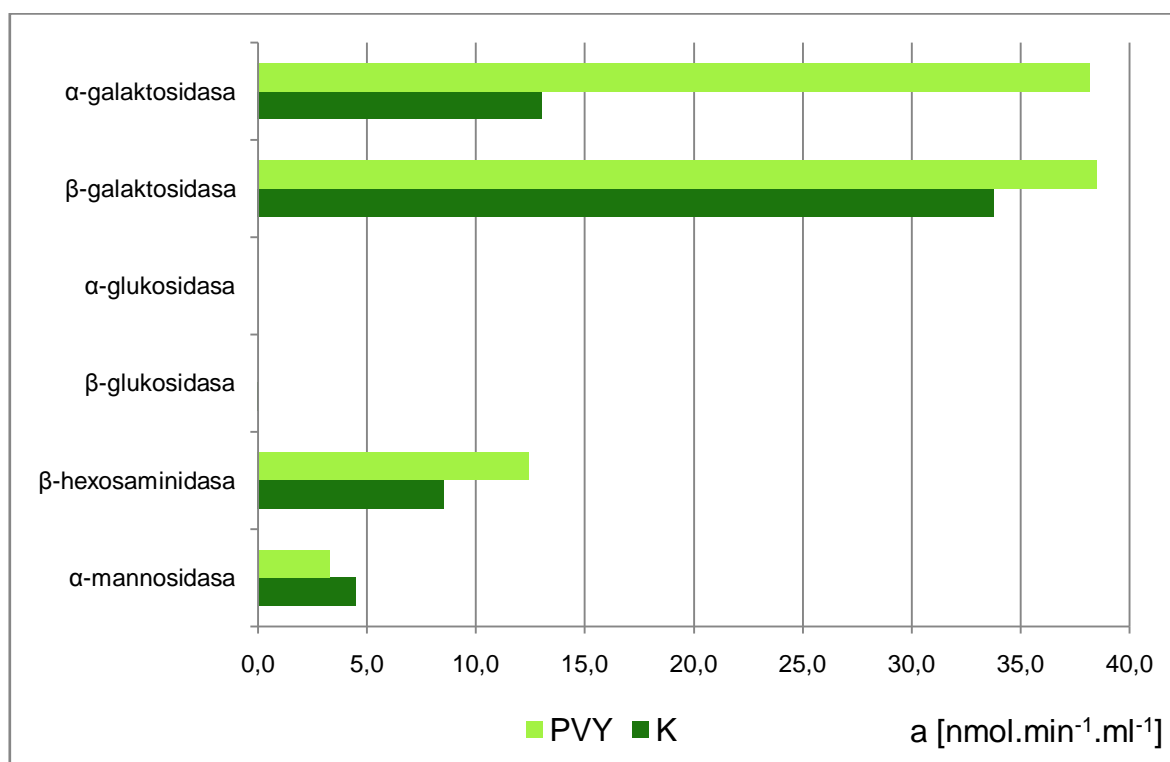


Obr. 13: Porovnání aktivit membránově vázaných glykosidas z listů kontrolních (K) a infikovaných (PVY) rostlin tabáku.

#### 4.2.3. Porovnání aktivit glykosidas v exudátech z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku

Z kontrolních a infikovaných rostlin tabáku jsem postupem popsáním v kapitole 3.4.4. (s. 27) připravila exudát, tedy kapalinu z žilek listů. V této kapalině jsem měřila aktivitu  $\alpha$ -galaktosidasy,  $\beta$ -galaktosidasy,  $\alpha$ -glukosidasy,  $\beta$ -glukosidasy,  $\beta$ -hexosaminidasy a  $\alpha$ -mannosidasy. Jak je vidět z obrázku 14, v exudátu z listů kontrolních rostlin měla nejvyšší aktivitu  $\beta$ -galaktosidasa, relativně velkou aktivitu měla také  $\alpha$ -galaktosidasa. Aktivita  $\beta$ -glukosidasy byla na hranici měřitelnosti a aktivitu  $\alpha$ -glukosidasy jsem v exudátu vůbec nestanovila.

Hodnoty aktivity glykosidas v exudátu z kontrolních rostlin jsem porovnávala s hodnotami aktivit v infikovaných rostlinách (obr. 14). U  $\alpha$ - a  $\beta$ -galaktosidasy a  $\beta$ -hexosaminidasy jsem v infikovaných rostlinách zaznamenala nárůst aktivity, v případě  $\alpha$ -galaktosidasy byl nárůst více než dvojnásobný. Aktivita  $\alpha$ -mannosidasy byla v infikovaných rostlinách naopak nižší než v rostlinách kontrolních a aktivitu  $\alpha$ - a  $\beta$ -glukosidasy jsem v exudátu z infikovaných rostlin vůbec nezjistila.

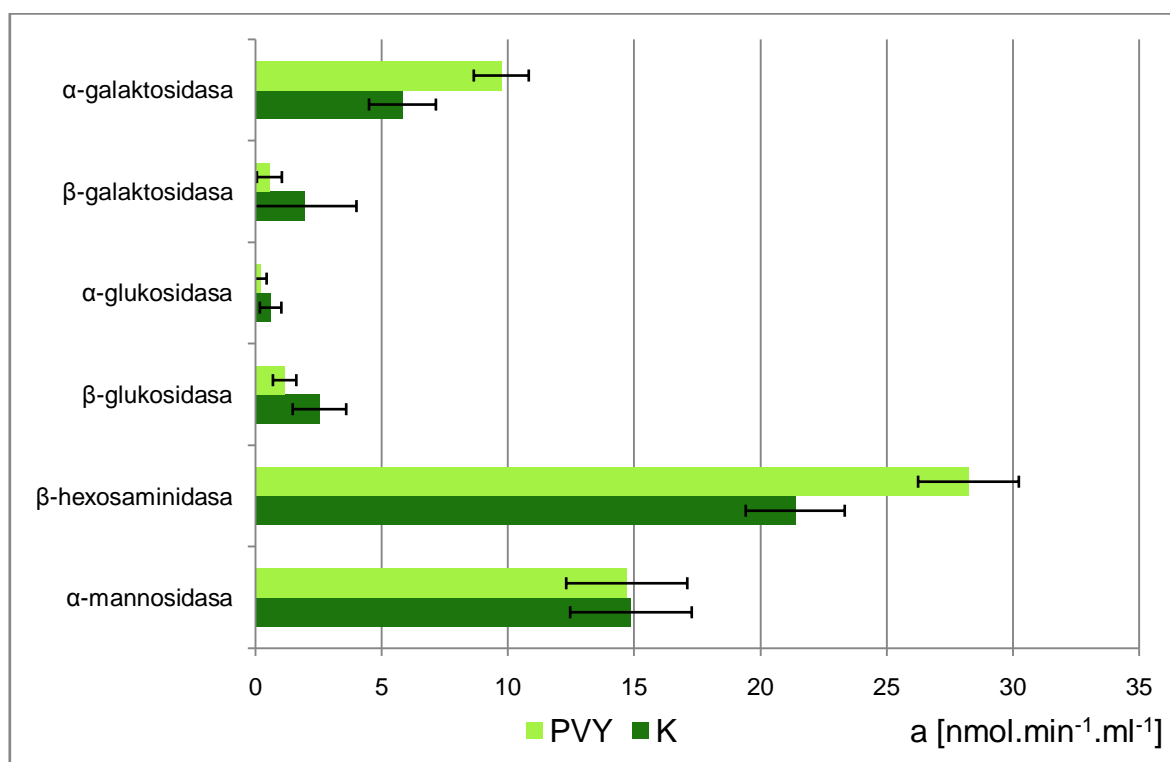


Obr. 14: Porovnání aktivit glykosidas v exudátech z listů kontrolních (K) a infikovaných (PVY) rostlin tabáku.

#### 4.2.4. Porovnání aktivit rozpustných glykosidas z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku použitých pro přípravu exudátu

Z kontrolních a infikovaných listů tabáku použitých pro přípravu exudátu jsem postupem popsaným v kapitole 3.4.2. (s. 27) extrahovala rozpustné glykosidasy ( $\alpha$ -galaktosidasu,  $\beta$ -galaktosidasu,  $\alpha$ -glukosidasu,  $\beta$ -glukosidasu,  $\beta$ -hexosaminidasu a  $\alpha$ -mannosidasu). V extraktu jsem poté sledovala aktivitu těchto glykosidas. Z obrázku 15 vyplývá, že v kontrolních rostlinách vykazovala nejvyšší aktivitu  $\beta$ -hexosaminidasa a dále také  $\alpha$ -mannosidasa a  $\alpha$ -galaktosidasa. Aktivity  $\beta$ -galaktosidasu a  $\alpha$ - a  $\beta$ -glukosidasu byly relativně nízké.

Porovnávala jsem hodnoty aktivity rozpustných glykosidas z kontrolních a infikovaných listů tabáku použitých pro přípravu exudátu (obr. 15). V případě  $\beta$ -hexosaminidasu jsem stejně jako u  $\alpha$ -galaktosidasu zaznamenala nárůst aktivity v infikovaných rostlinách oproti rostlinám kontrolním. Aktivita ostatních enzymů, tj.  $\beta$ -galaktosidasu,  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukosidasu a  $\alpha$ -mannosidasu byla v infikovaných rostlinách nižší než v kontrolních. U  $\alpha$ -mannosidasu se však jednalo pouze o slabý pokles.

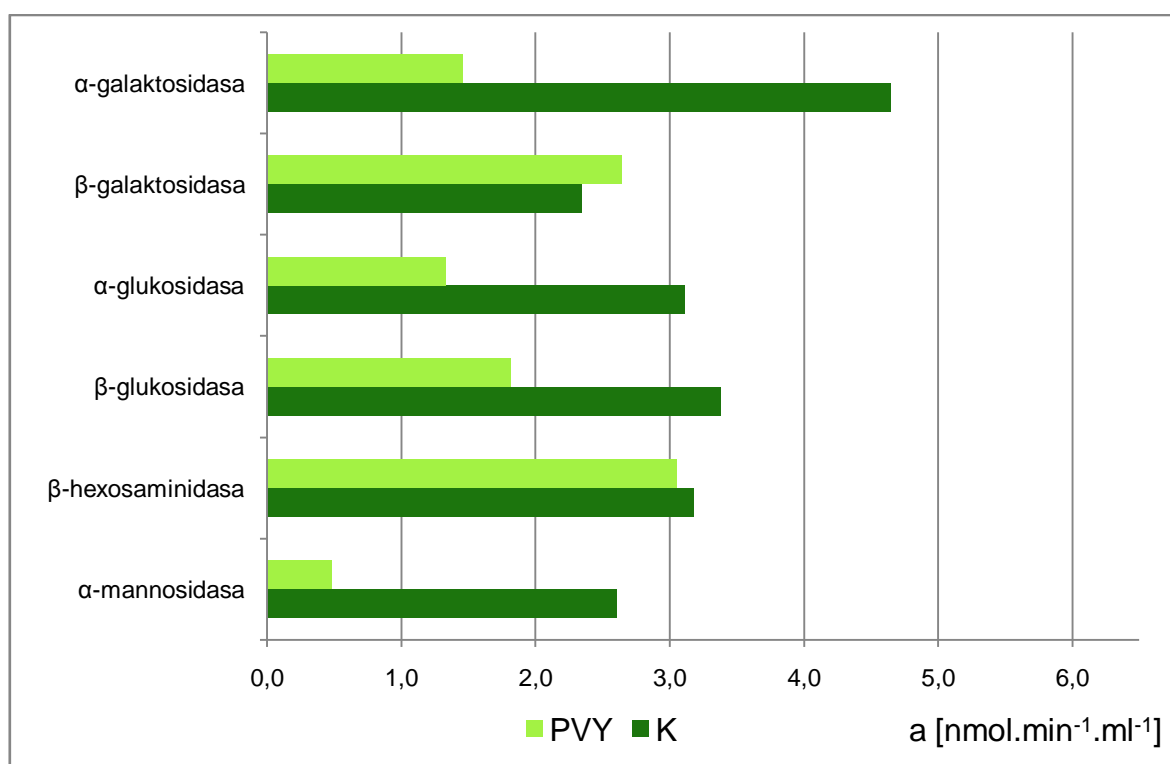


Obr. 15: Porovnání aktivit rozpustných glykosidas z listů kontrolních (K) a infikovaných (PVY) rostlin tabáku použitých pro přípravu exudátu.

#### 4.2.5. Porovnání aktivit membránově vázaných glykosidas z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku použitých pro přípravu exudátu

Z listů kontrolních a infikovaných rostlin tabáku použitých pro přípravu exudátu jsem postupem popsáním v kapitole 3.4.3. (s. 27) připravila extrakt, v němž jsem sledovala aktivitu těchto membránově vázaných glykosidas:  $\alpha$ -galaktosidasa,  $\beta$ -galaktosidasa,  $\alpha$ -glukosidasa,  $\beta$ -glukosidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa a  $\alpha$ -mannosidasa. V extraktu z kontrolních rostlin, který obsahoval membránově vázané glykosidasy, jsem naměřila největší aktivitu u  $\alpha$ -mannosidasy,  $\beta$ -glukosidasy a  $\alpha$ -galaktosidasy; jejich aktivita byla srovnatelná. Také aktivita  $\beta$ -galaktosidasy,  $\alpha$ -glukosidasy a  $\beta$ -hexosaminidasy byly v kontrolních rostlinách relativně vysoká, jak ukazuje obrázek 16.

Aktivitu glykosidas v kontrolních rostlinách jsem porovnávala s aktivitou glykosidas v rostlinách infikovaných PVY (obr. 16). V infikovaných rostlinách klesla aktivita u všech sledovaných glykosidas kromě  $\beta$ -galaktosidasy.



**Obr. 16:** Porovnání aktivit membránově vázaných glykosidas z listů kontrolních (K) a infikovaných (PVY) rostlin tabáku použitých pro přípravu exudátu.

## 5. DISKUSE

Rostlinné glykosidasy, stejně jako glykosidasy živočišné a mikrobiální, patří mezi významné enzymy. Podílí se na metabolismu oligosacharidů a polysacharidů, ale také glykolipidů, glykoproteinů a dalších glykosidů. Jednou z jejich funkcí je také účast při obraně rostlin proti biotickému či abiotickému stresu.

O rostlinných glykosidasách, především o jejich funkci a lokalizaci v buňce, bylo doposud zjištěno jen málo informací. Většina studií se zabývá glykosidasami ze semen [2, 8, 14, 27, 32, 41] nebo z plodů rostlin [5, 12, 16, 24, 33, 35], méně studovanými částmi jsou kořeny [6, 21] a listy [20, 36].

Studium funkce a lokalizace enzymů v buňce je usnadněno, je-li znám genom rostliny, jako je tomu u huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.). V genomu huseničku byly nalezeny tři geny pro  $\beta$ -hexosaminidasu. Bylo zjištěno, že jedna z izoform  $\beta$ -hexosaminidasy je lokalizována ve vakuolách, kde se účastní úpravy *N*-glykanů před transportem do jejich cílové lokalizace. Další dvě izoformy jsou vázány v cytoplazmatické membráně buněk. Jejich funkce zřejmě nesouvisí s glykoproteiny vázanými v cytoplazmatické membráně nebo s glykoproteiny sekretovanými do extracelulárního prostoru. Jedna z těchto dvou izoform se pravděpodobně podílí také na obraně rostliny proti patogenům [55].

Při biotickém stresu začíná rostlina ve zvýšené míře exprimovat specifické obranné proteiny (PRP, „pathogenesis-related proteins“). V listech tabáku byly některé z těchto proteinů charakterizovány. Jedná se o chitinasy [57] a  $\beta$ -1,3-glukanasy [56], tedy endolytické enzymy. Proto bylo cílem mé práce zjistit, zda se na obraně rostlin při biotickém stresu podílí i exolytické glykosidasy.

V této práci jsem se zaměřila na porovnání aktivit glykosidas ( $\alpha$ -galaktosidasy,  $\beta$ -galaktosidasy,  $\alpha$ -glukosidasy,  $\beta$ -glukosidasy,  $\beta$ -hexosaminidasy a  $\alpha$ -mannosidasy) v kontrolních listech tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana* SR1) a v listech infikovaných Y virem bramboru (PVY, „Potato virus Y“), kmenem NTN.

V infikovaných listech tabáku došlo k nárůstu aktivity rozpustných glykosidas u  $\alpha$ -galaktosidasy a  $\beta$ -hexosaminidasy (kap. 4.2.1., s. 33), z membránově vázaných enzymů vzrostla aktivita  $\alpha$ - a  $\beta$ -galaktosidasy (kap. 4.2.2., s. 34). V exudátu z infikovaných rostlin měly oproti kontrolním rostlinám vyšší aktivitu  $\alpha$ - a  $\beta$ -galaktosidasy a  $\beta$ -hexosaminidasy

(kap. 4.2.3., s. 35). V listech použitých pro přípravu exudátu jsem pozorovala nárůst aktivity u rozpustných enzymů z infikovaných rostlin u  $\alpha$ -galaktosidasy a  $\beta$ -hexosaminidasy (kap. 4.2.4., s. 36), u membránově vázaných enzymů u  $\beta$ -galaktosidasy (viz kapitola 4.2.5., s. 37). Z těchto výsledků usuzuji, že  $\alpha$ - a  $\beta$ -galaktosidasa a  $\beta$ -hexosaminidasa byly v souvislosti s virovou infekcí syntetizovány ve zvýšené míře a že se tedy určitým způsobem mohou podílet na obraně rostliny při biotickém stresu, konkrétně při virové infekci.

Ke zvýšení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy došlo pouze v případě membránově vázaného, ne rozpustného proteinu, proto je pravděpodobné, že by se na obraně proti virové infekci mohla podílet právě vázaná forma  $\beta$ -galaktosidasy.  $\beta$ -Hexosaminidasa z infikovaných rostlin měla naopak vyšší aktivitu pouze v rozpustné formě, proto předpokládám, že by se na obraně proti biotickému stresu mohla podílet právě volná forma  $\beta$ -hexosaminidasy. Tato forma by pravděpodobně mohla být lokalizována ve vakuole jako volná forma  $\beta$ -hexosaminidasy z huseníčku rolního [55]. V případě  $\alpha$ -galaktosidasy došlo k nárůstu aktivity v infikovaných rostlinách u rozpustné i membránově vázané formy. Na obraně proti patogenům by se proto pravděpodobně mohly podílet obě formy. V exudátu, kapalině z žilek listů, z infikovaných rostlin jsem pozorovala nárůst aktivity všech těchto tří enzymů, proto usuzuji, že i zde by mohly hrát určitou obrannou roli.

Bylo zjištěno, že na obraně proti rostlinnému stresu se podílí také  $\beta$ -glukosidasa [1, 4]. Proto jsem předpokládala, že i v infikovaných rostlinách tabáku bude mít tento enzym zvýšenou aktivitu, což se ovšem nepotvrdilo.

Výsledky již dříve provedené studie vlivu infekce PVY na aktivitu glykosidas v listech tabáku se od mých výsledků liší. V této práci bylo zjištěno, že v infikovaných listech i v exudátech z infikovaných listů došlo k nárůstu aktivity všech sledovaných enzymů, tedy  $\alpha$ -galaktosidasy,  $\beta$ -galaktosidasy,  $\alpha$ -glukosidasy,  $\beta$ -glukosidasy,  $\beta$ -hexosaminidasy a  $\alpha$ -mannosidasy [44].

## 6. ZÁVĚR

1. V kontrolních listech tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) a v listech infikovaných Y virem bramboru (PVY, „Potato virus Y“) jsem měřila aktivitu těchto glykosidas:  $\alpha$ -galaktosidas,  $\beta$ -galaktosidas,  $\alpha$ -glukosidas,  $\beta$ -glukosidas,  $\beta$ -hexosaminidas a  $\alpha$ -mannosidas.
2. V kontrolních a infikovaných listech tabáku jsem měřila aktivitu rozpustných a membránově vázaných glykosidas. Dále jsem měřila aktivitu glykosidas v exudátu, kapalině z žilek listů.
3. Ke zvýšení aktivity glykosidas v listech infikovaných rostlin oproti rostlinám kontrolním došlo u  $\alpha$ -galaktosidas,  $\beta$ -galaktosidas a  $\beta$ -hexosaminidas. Tyto enzymy by se tedy pravděpodobně mohly podílet na obraně rostlin proti virové infekci.

## 7. REFERENCE

1. Masayuki, S., Atsushi, I., Hajime, I.: *Planta* 210, 432-438 (2000)
2. Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I., Mundy, J.: *J. Biol. Chem.* 270, 15789-15797 (1995)
3. Odoux, E., Chauwin, A., Brillouet, J.-M.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 3168-3173 (2003)
4. Masayuki, S., Atsushi, I., Hajime, I.: *Plant Science* 155, 67-74 (2000)
5. Akiyama, T., Kaku, H., Shibuya, N.: *Phytochemistry* 48, 49-54 (1998)
6. Hsieh, M.-C., Graham, T.L.: *Phytochemistry* 58, 995-1005 (2001)
7. Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., Palme, K.: *Science* 262, 1051-1054 (1993)
8. Ohtani, K., Misaki, A.: *Agric. Biol. Chem.* 47, 2441-2451 (1983)
9. Balasubramaniam, S., Lee, H.C., Lazan, H., Othman, R., Ali, Z.M.: *Phytochemistry* 66, 153-163 (2005)
10. de Alcântara, P.H.N., Martim, L., Silva, C.O., Dietrich, S.M.C., Buckeridge, M.S.: *Plant Physiol. Biochem.* 44, 619-627 (2006)
11. O'Donoghue, E.M., Somerfield, S.D., Sinclair, B.K., King, G.A.: *Plant Physiol. Biochem.* 36, 721-729 (1998)
12. Ross, G.S., Wegrzyn, T., MacRae, E.A., Redgwell, R.J.: *Plant Physiol.* 106, 521-528 (1994)
13. Stano, J., Nemeč, P., Bezáková, L., Kákoniová, D., Kovács, P., Neubert, K., Lišková, D., Andriamainty, F., Mičieta, K.: *Acta Biochim. Pol.* 45, 621-626 (1998)
14. Guimarães, V.M., de Rezende, S.T., Moreira, M.A., de Barros, E.G., Felix, C.R.: *Phytochemistry* 58, 67-73 (2001)
15. da Silva Fialho, L., Guimarães, V.M., Callegari, C.M., Reis, A.P., Barbosa, D.S., de Lima Borges, E.E., Moreira, M.A., de Rezende, S.T.: *Phytochemistry* 69, 2579-2585 (2008)
16. Feurtado, J.A., Banik, M., Bewley, J.D.: *J. Exp. Bot.* 52, 1239-1249 (2001)
17. Marraccini, P., Rogers, W.J., Caillet, V., Deshayes, A., Granato, D., Lausanne, F., Lechat, S., Pridmore, D., Pétiard, V.: *Plant Physiol. Biochem.* 43, 909-920 (2005)
18. Poór, J.: *Biologia Plantarum* 40, 161-167 (1997/98)
19. Gao, Z., Schaffer, A.A.: *Plant Physiol.* 119, 979-987 (1999)
20. Smart, E.L., Pharr, D.M.: *Plant Physiol.* 66, 731-734 (1980)

21. Eksittikul, T., Chulavatnatol, M.: Arch. Biochem. Biophys. 266, 263-269 (1998)
22. Yamasaki, Y., Fujimoto, M., Kariya, J., Konno, H.: Phytochemistry 66, 851-857 (2005)
23. Iwata, H., Suzuki, T., Aramaki, I.: J. Biosci. Bioeng. 95, 106-108 (2003)
24. Kinishi, Y., Kitazato, S., Nakatani, N.: Biosci. Biotech. Biochem. 56, 2046-2051 (1992)
25. Peruffo, A.D.B., Renosto, F., Pallavicini, C.: Planta 142, 195-201 (1978)
26. Beers, E.P., Duke, S.H., Henson, C.A.: Plant Physiol. 94, 738-744 (1990)
27. Nakai, H., Tanizawa, S., Ito, T., Kamiya, K., Kim, Y.-M., Yamamoto, T., Matsubara, K., Sakai, M., Sato, H., Imbe, T., Okuyama, M., Mori, H., Chiba, S., Sano, Y., Kimura, A.: Biocatal. Biotransform. 26, 104-110 (2008)
28. Im, H., Henson, C.A. : Carbohydr. Res. 277, 145-159 (1995)
29. Buckeridge, M.S., dos Santos, H.P., Tiné, M.A.T.: Plant Physiol. Biochem. 38, 141-156 (2000)
30. Sugimoto, M., Furui, S., Suzuki, Y. : Biosci. Biotech. Biochem. 59, 673-677 (1995)
31. Oikawa, A., Itoh, E., Ishihara, A., Iwamura, H.: J. Plant Physiol. 160, 991-999 (2003)
32. Jin, Y.-L., Jo, Y.-Y., Kim, K.-Y., Shim, J.-H., Kim, Y.-W., Park, R.-D.: J. Biochem. Mol. Biol. 35, 313-319 (2002)
33. Nakagawa, H., Enomoto, N., Asakawa, M., Uda, Y.: Agric. Biol. Chem. 52, 2223-2230 (1988)
34. Chen, Y.-C., Liu, W.-L., Hsu, H.-C., Lee, Y.-A., Chen, C.-S.: Bot. Bull. Acad. Sin. 45, 275-283 (2004)
35. Jagadeesh, B. H., Prabha, T. N., Srinivasan, K.: Plant Science 167, 1263-1271 (2004)
36. Jordan, N.D., Barber, M.S.: Plant Science 107, 41-48 (1995)
37. Bouquelet, S., Spik, G. : Eur. J. Biochem. 84, 551-559 (1978)
38. Li, Y.-T.: J. Biol. Chem. 242, 5474-5480 (1967)
39. Pria Sethu, K.M., Prabha, T.N.: Phytochemistry 44, 383-387 (1997)
40. Suvarnalatha, G., Prabha, T.N. : Phytochemistry 50, 1111-1115 (1999)
41. Woo, K.K., Miyazaki, M., Hara, S., Kimura, M., Kimura, Y.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 2547-2556 (2004)
42. Kaushal, G.P., Szumilo, T., Pastuszak, I., Elbein, A.D.: Biochemistry 29, 2168-2176 (1990)
43. Campbell, N.A., Reece, J.B.: Biologie, Computer Press, a.s., Brno, 2006

44. Trefančová, J.: Studium  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L.): Diplomová práce PŘF UK Praha, Katedra biochemie, s. 65-66 (2009)
45. Chatterji, A., Fauquet, C.M.: Ecology of Plant Viruses, with Special Reference to Whitefly-Transmitted Geminiviruses (WTGs), v knize *Viral Ecology*, (Hurst C.J. ed.) Academic Press, San Diego, California, str. 321-351 (2000)
46. Steinbach, G.: *Lexikon užitečných rostlin*, Knížní klub, Praha (1997)
47. Novák, F.A.: *Velký obrazový atlas rostlin*, Artia, Praha (1970)
48. Tiné, M.A.S., Cortelazzo, A.L., Buckeridge, M.S.: *Plant Sci.* 154, 117–126 (2000)
49. Schroeder, J.I., Nambara, E.: *Cell* 126, 1023-1025 (2006)
50. Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H.-Y., Choi, S.-M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J.M., Lee, I.-J., Hwang, I.: *Cell* 126, 1109-1120 (2006)
51. Carpita N., McCann M.: The Cell Wall, v knize *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, (Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. ed.) American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, str. 52-109 (2000)
52. Crozier A., Kamiya Y., Bishop G., Yokota T.: Biosynthesis of Hormones and Elicitor Molecules, v knize *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, (Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. ed.) American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, str. 850-929 (2000)
53. Kosack K.H., Jones J.D.G.: Responses to Plant Pathogens, v knize *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, (Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. ed.) American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, str. 1102-1157 (2000)
54. Valíček P.: *Užitkové rostliny tropů a subtropů*, Academia, Praha (2002)
55. Strasser, R., Bondili, J.S., Schoberer, J., Svoboda, B., Liebinger, E., Glössl, J., Altmann, F., Steinkellner, H., Mach, L.: *Plant Physiol.* 145, 5-16 (2007)
56. Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Fritig, B.: *EMBO J.* 6, 3209-3212 (1987)
57. Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Fritig, B.: *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 84, 6750-6754 (1987)

