

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**Studium peroxidace komponent
chloroplastových membrán *in vitro* a srovnání
s oxidačním poškozením *in vivo***

Helena Horáková



Diplomová práce

Praha, 2009

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Nad'a Wilhelmová, CSc.

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
RNDr. Nadi Wilhelmové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

Podpis: Helena Horáková
Helena Horáková

Praha, 28.4.2009

Ráda bych poděkovala RNDr. Nadě Wilhelmové, CSc. za vstřícné odborné vedení, velmi užitečné připomínky a trpělivost během vypracovávání této práce. Všem spolupracovníkům z Ústavu Experimentální botaniky děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Poděkování patří také rodině a všem blízkým, kteří mě ve studiu podporovali.

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
1. Literární úvod	8
1.1 Stárnutí a senescence rostlin	8
1.2 Zdroje ROS v rostlinách	11
1.3 Oxidační poškození jako důsledek působení ROS	15
1.3.1 Peroxidace lipidů	16
1.3.2 Fluorescenční produkty a lipofuscinoidní pigmenty	20
1.3.3 Oxidační poškození proteinů	21
1.4 Peroxidace <i>in vitro</i>	24
1.5 Antioxidační mechanismy rostlin	26
2. Cíl práce	29
3. Materiál	30
4. Metody	31
4.1 Pokusný materiál a jeho kultivace	31
4.2 Izolace chloroplastů	33
4.3 Stanovení obsahu membránových proteinů	34
4.4 Peroxidace komponent chloroplastových membrán <i>in vitro</i>	36
4.5 Studium oxidačního poškození lipidů	37
4.5.1 Stanovení obsahu malondialdehydu	37
4.5.2 Stanovení obsahu konjugovaných dienu	38
4.6 Studium oxidačního poškození proteinů	39
4.6.1 Stanovení obsahu karbonylových skupin	39
5. Výsledky	41
5.1 Vliv peroxidace <i>in vitro</i> na obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolu	41
5.1.1 Vliv koncentrace Fe^{2+} a kyseliny askorbové	41
5.1.2 Vliv stáří primárních listů	42
5.1.3 Vliv pufru a jeho pH	43
5.1.4 Vliv přítomnosti EDTA	43
5.1.5 Vliv podmínek kultivace rostlin	44

5.2 Vliv peroxidace <i>in vitro</i> na obsah oxidačně poškozených proteinů v thylakoidních membránách fazolu	51
5.3 Vliv stárnutí na obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolu	54
5.4 Vliv stárnutí na obsah proteinů v thylakoidních membránách fazolu	54
5.5 Vliv stárnutí na obsah oxidačně poškozených proteinů v thylakoidních membránách fazolu	55
6. Diskuze	59
7. Závěr	64
8. Seznam použité literatury	65

Seznam použitých zkratek

- APX – askorbátperoxidasa
AsA – kyselina askorbová
ATP – adenosintrifosfát
BSA – hovězí sérový albumin (z anglického bovine serum albumin)
CAT – katalasa
C=O – karbonylové skupiny
DHA – dehydroaskorbát
DHAR – dehydroaskorbátreduktasa
DNA – deoxyribonukleová kyselina
DNPH – 2, 4-dinitrofenylhydrazin
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
Fd – ferredoxin
GR – glutathionreduktasa
GSH – redukovaný glutathion
GSSG – oxidovaný glutathion
HNE – hydroxynonenal
H₂O₂ – peroxid vodíku
HOTE – hydroperoxyoktadekatrienová kyselina
HR – hypersenzitivní reakce
Hsp70 – protein tepelného šoku o velikosti 70 kDa (z anglického heat shock protein)
LFP – lipofuscinoidní pigmenty (z anglického lipofuscin-like pigments)
LO· – alkoxylový radikál
LOO· – peroxylový radikál
LOOH – hydroperoxydy lipidů
LOX – lipoxygenasa
MDA – malondialdehyd
MDHA – monodehydroaskorbát
MDHAR – monodehydroaskorbátreduktasa
NADP⁺ – nikotinamidadeninukleotidfosfát
NO – oxid dusnatý

NOS – synthasa oxidu dusnatého

$^1\text{O}_2$ – singletový kyslík

$\text{O}_2^{\cdot-}$ – superoxid anion-radikál

OH^{\cdot} – hydroxylový radikál

$^{\cdot}\text{O}_2\text{H}$ – perhydroxylový radikál

ONOO^- – peroxyinitrit

PgA – 3-fosfoglycerát

PS I – fotosystém 1

PS II – fotosystém 2

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny (z anglického polyunsaturated fatty acids)

ROS – reaktivní formy kyslíku (z anglického reactive oxygen species)

RuBP – ribulosa-1,5-bisfosfát

RuBPCO – ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa-oxygenasa

SAG – senescenčně spicifické geny (z anglického senescence associated genes)

SOD – superoxiddismutasa

TBA – kyselina thiobarbiturová

TCA – kyselina trichloroctová

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1 Stárnutí a senescence rostlin

Stárnutí je definováno jako akumulace změn doprovázející organismus při svém vývoji před smrtí. Nejvíce přijímána je radikálová teorie stárnutí navržená roku 1956 Denham Harmanem, podle níž je příčinou stárnutí a smrti akumulace reaktivních forem kyslíku (ROS z anglického reactive oxygen species) produkovaných při aerobní respiraci [1]. Radikálová teorie stárnutí je v souladu s hypotézou o rychlosti života, podle níž organismy s vyšším metabolickým obratem a vyšší spotřebou energie, stárnou rychleji. Vysvětlením je, že produkují více ROS, a proto mají kratší dobu života. Délka života organismu závisí rovněž na antioxidačních mechanismech, kterými jsou ROS zneškodňovány. Podle somatické mutační teorie stárnutí je příčinou stárnutí akumulace mutací DNA. Délka života organismu závisí na jeho schopnosti reparovat poškození DNA [2]. Další hypotéza stárnutí zabývající se výhradně stárnutím rostlin tvrdí, že příčinou stárnutí rostlin je akumulace iontů toxických kovů [3].

Molekulární mechanismy stárnutí živočichů a rostlin jsou podobné. Jelikož stárnutí je geneticky řízené, změna v jedné mutaci může ovlivnit délku života. K projevům stárnutí patří pokles syntézy proteinů ve prospěch zvyšující se degradace proteinů, akumulace oxidačně modifikovaných proteinů a fluorescenčních produktů, poruchy přenosu signálu v buňce a ztráta schopnosti buňky udržovat rovnováhu [4]. Rostliny se od živočichů liší především délkou života. *Sequoia gigantea* dožívající se 3200 let a *Pinus aristata* dožívající se 4600 let v pohoří Sierra Nevada v Kalifornii patří k nejdéle žijícím organismům na Zemi. U jednoletých rostlin je smrt úzce spjata s rozmnožováním a pokles vegetativního růstu je rychlý. U rostlin víceletých je smrt daleko více kontrolována environmentálními faktory a pokles růstu je pozvolný. Dalším významným rozdílem je délka života rostlinných orgánů, která se může velmi lišit od délky života rostliny [5]. Rostliny a živočichové se také liší způsobem regulace stárnutí. Zatímco u živočichů se na regulaci stárnutí podílí reparace DNA, aktivita telomeras a histonová acetylace; u rostlin senescenci regulují fytohormony, fotosyntetická aktivita a odbourávání proteinů [6].

Se zvláštním typem senescence se setkáváme výhradně u rostlin, které senescenci orgánů využívají ve prospěch zbytku organismu. Senescence je poslední vývojová fáze

rostlinného orgánu (listu, květu, plodu) před smrtí doprovázená degradací makromolekul a jejich translokací do rostoucích orgánů nebo semen. Proteiny jsou během senescence v listech degradovány a jejich metabolity jsou využívány pro syntézu makromolekul ve stonku nebo v reprodukčních orgánech [7]. Tento geneticky řízený proces koordinovaných změn v buněčné struktuře, metabolismu a genové expresi představuje typ programované buněčné smrti [8].

Nejběžnějším projevem senescence u rostlin je žloutnutí listů. Projevy senescence na buněčné úrovni se označují jako senescenční syndrom. Počátky senescence se projevují v chloroplastech. Snižuje se obsah zejména chlorofylu, cytosolických proteinů, membránových lipidů a zvyšuje se počet plastoglobulí [9]. Ztráta chlorofylu se projevuje nejprve na okraji listu a směřuje k listové čepeli. Pletiva cévních svazků podléhají senescenci jako poslední, protože jsou potřebná k translokaci živin. Senescence je doprovázena vzrůstem hladiny ROS a produktů peroxidace lipidů. V pokročilé fázi senescence dochází k zániku vakuol a uvolnění proteolytických enzymů do cytosolu. Mitochondrie produkující ATP a jádro potřebné pro realizaci senescenčního syndromu jsou zasaženy jako poslední. Kondenzace chromatinu a porušení struktury membrán vede k buněčné smrti [10].

Při senescenci dochází ke změnám v genové expresi. Identifikováno bylo přes 800 senescenčně specifických genů (SAG z anglického senescence associated genes), jejichž exprese se při senescenci zvyšuje nebo iniciuje. Patří mezi ně geny kódující cysteinové proteasy, regulátory proteas, lipasy, nukleasy a proteiny podílející se na translokaci živin. Rozlišují se dvě třídy SAG. První třída je specifická pouze pro senescenci. Druhá třída se exprimuje i v raných fázích vývoje rostliny, ale při senescenci dochází k její expresi ve zvýšené míře [11]. Při regulaci exprese SAG se uplatňuje odbourávání proteinů. Zatímco selektivní odbourávání proteinů je zprostředkováno proteolýzou v proteasomu, neselektivní odbourávání proteinů probíhá ve vakuole [12].

Iniciaci senescence charakterizuje pokles vegetativního růstu a fotosyntetické aktivity, který je důsledkem poklesu aktivity ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy-oxygenasy (RuBPCO) [13]. Existují rozpory v tom, zda je příčinou poklesu fotosyntetické aktivity zvýšená nebo snížená hladina sacharidů. U transgenních rostlin zvýšeně exprimujících hexokinasy byla senescence listů iniciována dříve než u kontrol prostřednictvím negativní zpětné regulace fotosyntetické aktivity zvýšenou hladinou sacharidů. Naopak u transgenních rostlin se sníženou expresí hexokinasy byla senescence listů oddálena při

nižší koncentraci sacharidů. Vysoká koncentrace sacharidů hromadících se ve starých listech pravděpodobně potlačuje geny odpovědné za fotosyntézu a tím spouští senescenci. Tuto hypotézu potvrzuje i to, že pokud jsou mladé listy zastíněny, dochází k transportu sacharidů ze starých listů do mladých listů a senescence se ve starých listech neinicuje [14; 15]. Tato hypotéza však nevysvětluje senescenci ve fotosynteticky aktivních listech během kvetení a tvorby semen. Listová senescence se v tomto případě inicuje při snížené koncentraci sacharidů kvůli požadavku dusíku v reprodukčních orgánech. Jiné vysvětlení předpokládá, že z reprodukčních orgánů je během reprodukce transportován tzv. senescenční signál do listů, ve kterých inicuje senescenci [16]. Význam funkce sacharidů při regulaci senescence není zatím zcela objasněn [14].

Iniciace senescence je řízena věkem; abiotickými faktory (sucho, teplo, chlad, vodní deficit, UV záření, ozon, ionty toxických kovů); biotickými faktory (napadení patogeny, stárnutí) a hladinou fytohormonů. Působení nepříznivých environmentálních podmínek senescenci urychluje. Etylen, kyselina abscisová, kyselina jasmonová, kyselina salicylová a brassinosteroidy senescenci urychlují; naopak cytokininy, auxiny a gibereliny senescenci oddalují. U transgenních tabáků zvýšeně exprimujících isopentenyltransferasu (klíčový enzym pro biosyntézu cytokininů) při použití senescenčně specifického promotoru byla iniciace senescence listů oddálena o pět až šest týdnů [17]. Pokud by nedocházelo k odbourávání cytokininů vlivem cytokininoxidasy, teoreticky by tyto transgenní rostliny měly být nesmrtelné. Oddálení senescence listů bylo dosaženo rovněž u transgenních rajčat a *Arabidopsis thaliana*, ve kterých byl inhibován klíčový enzym pro biosyntézu ethylenu [16]. Senescenci listů lze také oddálit odstraňováním reprodukčních orgánů nebo dekapitací epikotyly, ve kterém probíhá syntéza fytohormonů. Senescence fazolových děložních listů byla dekapitací epikotyly oddálena až o 12 dnů [18].

Cílem výzkumu senescence je objasnit molekulární mechanismus senescence a produkovat transgenní ekonomicky významné plodiny za účelem zvýšení zemědělských výnosů, snížení ztrát během skladování a zvýšení odolnosti plodin vůči stresovým podmínkám [19].

1.2 Zdroje ROS v rostlinách

Díky nepárovým elektronům jsou ROS velmi reaktivní a iniciují nespecifické vedlejší reakce. Mezi ROS patří singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), superoxid anion-radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) a peroxid vodíku (H_2O_2), který však není radikálové povahy. ROS vznikají neustále jako meziproducty různých metabolických drah v rozdílných buněčných kompartmentech. U živočichů ROS vznikají především v mitochondriích při aerobní respiraci a při aktivaci NADPHoxidasy ve fagocytech. U živočišných neutrofilů byla endogenní produkce ROS vůbec poprvé popsána [20]. U rostlin vznikají ROS především v chloroplastech. Příspěvek mitochondrií je u rostlin k celkové produkci ROS zanedbatelný díky přítomnosti alternativních oxidas [21].

$^1\text{O}_2$ vzniká v chloroplastech ve fotosystému 2 (PS II) přenosem energie z tripletového chlorofylu na kyslík a napadá především dvojné vazby v polynenasycených mastných kyselinách (PUFA z anglického polyunsaturated fatty acids). Zbývající ROS se tvoří jedoelektronovými redukcemi kyslíku (obr. 1, str. 13) a rovněž rozkladem ozonu [22]. Charakterizaci jednotlivých ROS popisuje tabulka 1 (str. 13). $\text{O}_2^{\cdot-}$ se tvoří Mehlerovou reakcí při fotosyntéze při nedostatku akceptoru elektronů z fotosystému 1 (PSI) NADP^+ . $\text{O}_2^{\cdot-}$ se uvolňuje rovněž při oxidaci xanthinu na kyselinu močovou katalyzované xanthinoxidasou v peroxisomech a při odbourávání xenobiotik cytochromem P450 v endoplasmatickém retikulu. $\text{O}_2^{\cdot-}$ s poločasem života 2-4 μs je reaktivní a napadá především proteiny. V buňkách existuje v rovnováze se svou protonovou formou perhydroxylovým radikálem ($^{\cdot}\text{O}_2\text{H}$) [23]. H_2O_2 vzniká v peroxisomech při fotorespiraci odbouráváním glykolátu, metabolismu xenobiotik účinkem superoxidodismutasy a při β -oxidaci mastných kyselin (obr. 2, str. 14). H_2O_2 s poločasem života 1 ms je relativně stabilní molekula. H_2O_2 je schopen procházet přes plasmatickou membránu a difundovat mezi buňkami, a proto plní funkci signální molekuly. Oxidační poškození H_2O_2 působí při koncentraci větší než 50 μM [24].

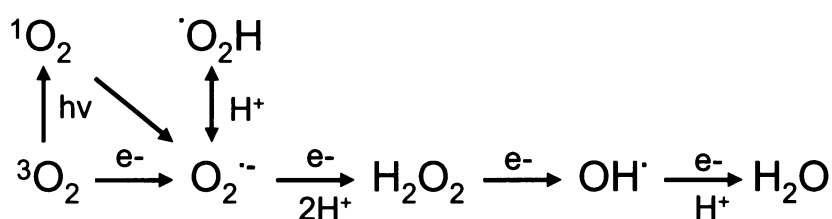
ROS vznikají u rostlin rovněž aktivací aminoxidas v apoplastu a peroxidas v buněčné stěně. Peroxidasy buněčné stěny produkují H_2O_2 , který se podílí na tvorbě prekurzorů ligninu a tím buněčné stěny. Kořenová peroxidasa má navíc schopnost redukovat H_2O_2 na OH^{\cdot} [25]. ROS mohou vznikat i bez působení enzymů. Při Fentonově reakci Fe^{2+} redukuje H_2O_2 za vzniku OH^{\cdot} a Fe^{3+} se zpětně redukuje oxidací $\text{O}_2^{\cdot-}$ (obr. 3, str. 14). Haber-Weissova reakce je kombinací obou rovnic a probíhá při katalýze iontů přechodných kovů (obr. 4,

str. 14). OH[•] s poločasem života kratším než 1 μs je ze všech ROS nejreaktivnější. Napadá proteiny, sacharidy, lipidy i DNA [23].

Za běžných fyziologických podmínek jsou ROS v buňce zneškodněny antioxidačními systémy. Rovnováha mezi produkcí a odbouráváním ROS se však narušuje působením řady environmentálních faktorů, čímž dochází k rychlému zvýšení intracelulární koncentrace ROS a snížení antioxidačních schopností. Rozhodující je délka a intenzita působení stresového faktoru, vývojová fáze rostliny, její genotyp a adaptační schopnosti [20]. První studie nárůstu hladiny ROS při působení stresových podmínek se zabývaly napadením rostliny patogeny. Bylo zjištěno, že zvýšená produkce ROS je součástí rychlé obranné reakce, tzv. hypersenzitivní reakce (HR), jejímž cílem je vyvolat v místě infekce buněčnou smrt, která by zabránila šíření patogenů. V první fázi HR (1-2 h po infekci) došlo k velmi rychlé akumulaci H₂O₂. Druhá fáze HR (3-6 h po infekci) byla doprovázená pozvolnou a méně intenzivní produkcí H₂O₂. Předpokládalo se, že ROS působí na patogeny přímo svou toxicitou. Nejnovější studie však ukázaly, že aktivaci NADPHoxidasy v plasmatické membráně dochází vlivem odčerpání elektronů z cytosolu a jejich přenosu na kyslík ke zvýšení cytosolického pH, které aktivuje proteasy odpovědné za zničení patogenů. H₂O₂ rovněž stimuluje otevření vápníkových kanálů, což aktivuje další složky signální dráhy při HR [19].

Díky schopnosti kontrolovaně vznikat a zanikat, vysoké reaktivitě a krátkému poločasu života, ROS plní funkci signálních molekul. ROS mají schopnost reverzibilně oxidovat sulfhydrylové skupiny proteinů. Oxidované proteiny jsou zpětně redukovány řadou redukčních sloučenin tímto způsobem, čímž je modifikována aktivita enzymů. Změna redoxního stavu transkripčních faktorů a s nimi asociovaných molekul vyvolává změny na úrovni exprese genů [21]. ROS působí jako indikátory stresových podmínek a aktivují geny odpovědné za spuštění stresové odpovědi. ROS aktivují geny odpovědné za spuštění senescence a podílí se tak na její iniciaci. Určitá koncentrace ROS se podílí na spuštění programované buněčné smrti a je-li koncentrace ROS vyšší, buňka hyne nekroticky [26]. Redoxní regulace se uplatňuje také při biosyntéze proteinů a jejich skládání [27]. Molekuly představující cíle působení ROS však nejsou dosud známy. Uvažuje se o thioředoxinech, heterotrimerických G-proteinech a histidinkinásách. Stejně tak nejsou známy ani geny, které jsou jimi regulovány. Ukazuje se, že oscilace v intracelulárních a extracelulárních hladinách ROS jsou klíčové pro pohyb buněk a jejich růst [28].

Kromě ROS vznikají v peroxisomech rovněž reaktivní formy dusíku. Oxid dusnatý (NO) se u živočichů účastní přenosu nervového vzruchu, regulace krevního tlaku a imunitní odpovědi. NO reaguje s $O_2^{\cdot-}$ za vzniku peroxynitritu ($ONOO^{\cdot-}$), který se u živočichů účastní zánětlivých procesů, ischemie a aterosklerosy [29]. Produkci NO z argininu v přítomnosti molekulárního kyslíku katalyzuje syntasa oxidu dusnatého (NOS). Inducibilní forma NOS byla potvrzena i v rostlinách. NO se podílí na regulaci stresové odpovědi rostlin, senescenci, růstu a zrání plodů [30]. NO se účastní rovněž programované buněčné smrti a HR [31].



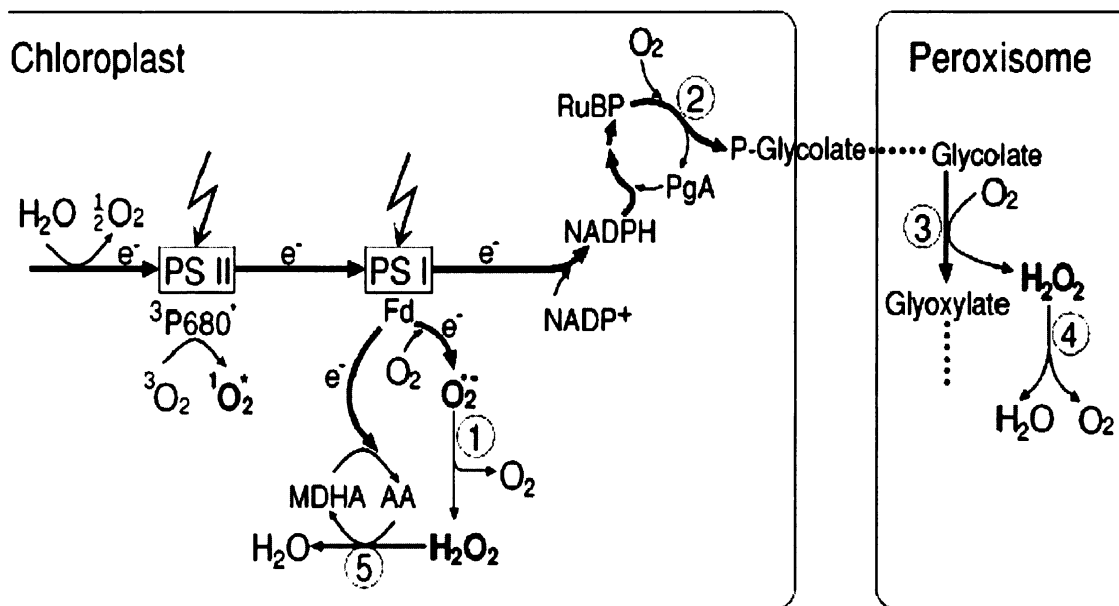
Obr. 1 – Vznik jednotlivých typů ROS

Superoxid anion-radikál ($O_2^{\cdot-}$), který je v rovnováze se svou protonovou formou perhydroxylovým radikálem (O_2H^{\cdot}), vzniká jednoelektronovou redukcí tripletového kyslíku. Přejme-li $O_2^{\cdot-}$ dva protony a jeden elektron, vzniká peroxid vodíku (H_2O_2). Hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) vzniká jednoelektronovou redukcí H_2O_2 . Přejme-li OH^{\cdot} jeden elektron a jeden proton vzniká voda. 1O_2 vzniká přenosem energie na tripletový kyslík z excitovaného tripletového chlorofylu.

	Singletový kyslík	Superoxid anion-radikál	Peroxid vodíku	Hydroxylový radikál
Poločas života	1 μ s	1 μ s	1 ms	1 ns
Vzdálenost působení	30 nm	30 nm	1 μ m	1 nm
Koncentrace v buňce	?	?	μ M-mM	?
Reaguje s:				
Lipidy	PUFA	Obtížně	Obtížně	Rychle
DNA	Především guanin	Ne	Ne	Rychle
Sacharidy	Ne	Ne	Ne	Rychle
Proteiny	Trp, His, Tyr, Met, Cys	Fe-S centra	Cysteiny	Rychle

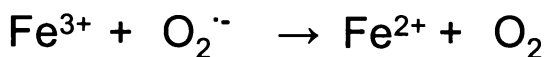
Tabulka 1 – Charakterizace jednotlivých typů ROS

Tabulka shrnuje poločas života, vzdálenost působení a reaktivitu ROS k buněčným složkám. Upraveno podle Møllera [23].



Obr. 2 – Zdroje ROS v rostlinných chloroplastech a peroxisomech

Superoxid anion-radikál ($O_2^{\cdot -}$) vzniká v chloroplastech ve fotosystému 1 (PSI) při nedostatku $NADP^+$. $O_2^{\cdot -}$ se může přeměnit na peroxid vodíku (H_2O_2), který je dále přeměňován askorbát-glutathionovým cyklem na vodu. H_2O_2 se tvoří při fotorespiraci v peroxisomech. Oxygenací ribulosa-1,5-bisfosfátu (RuBP) vzniká v chloroplastech 3-fosfoglycerát (PgA) a fosfoglykolát, který je transportován do peroxisomu. H_2O_2 je v peroxisomech přeměňován na vodu a kyslík. Klíčové enzymy jsou označeny čísly v kroužku: 1. superoxid-dismutasa, 2. ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa-oxygenasa, 3. glykolát oxidasa, 4. katalasa, 5. askorbátperoxidasa. AA – kyselina askorbová, Fd – ferredoxin, MDHA – monodehydroaskorát reduktasa. Upraveno podle Apela [25].



Obr. 3 – Fentonova reakce



Obr. 4 – Haber-Weissova reakce

1.3 Oxidační poškození jako důsledek působení ROS

Pokud nejsou ROS rychle zneškodněny složkami antioxidační ochrany; mohou oxidačně modifikovat proteiny, lipidy i nukleové kyseliny v bezprostředním okolí svého vzniku, čímž mohou způsobit oxidační poškození buněčných složek.

Reakcí ROS s PUFA dochází k peroxidaci membránových lipidů, což vede ke zvýšení propustnosti membrán pro ionty, poklesu jejich fluidity a inaktivaci membránových receptorů a enzymů [32]. Nejčastějšími projevy reakce ROS s proteiny jsou modifikace postranních řetězců aminokyselin (zavádění karbonylových a hydroxylových skupin, oxidace sulfhydrylových skupin), síťování a fragmentace proteinů. Důsledkem oxidačního poškození proteinů jsou změny v aktivitě enzymů a změny v transportu iontů. Vlivem reakce ROS s nukleovými kyselinami vznikají řetězcové zlomy, příčné vazby mezi basemi a mezi aminoskupinami a karbonyly nukleových kyselin dochází ke vzniku Schiffových basí. Hydroxylované deriváty 8-hydroxyguanin a thimidinglykolu se používají jako indikátory oxidačního poškození DNA [23]. Nejvýrazněji se oxidační poškození nukleových kyselin projevuje u mitochondriální DNA, která je blízko zdroje ROS. Důsledkem oxidačního poškození DNA jsou mutace, translační chyby a inhibice proteosyntézy.

Oxidační poškození buněčných složek vede k nevratnému poškození metabolických funkcí a končí buněčnou smrtí. Ke stanovení oxidačního poškození vlivem ROS se používá stanovení obsahu oxidačně modifikovaných molekul, jelikož detekce ROS je obtížná kvůli jejich vysoké reaktivitě a krátkému poločasu života [4].

1.3.1 Peroxidace lipidů

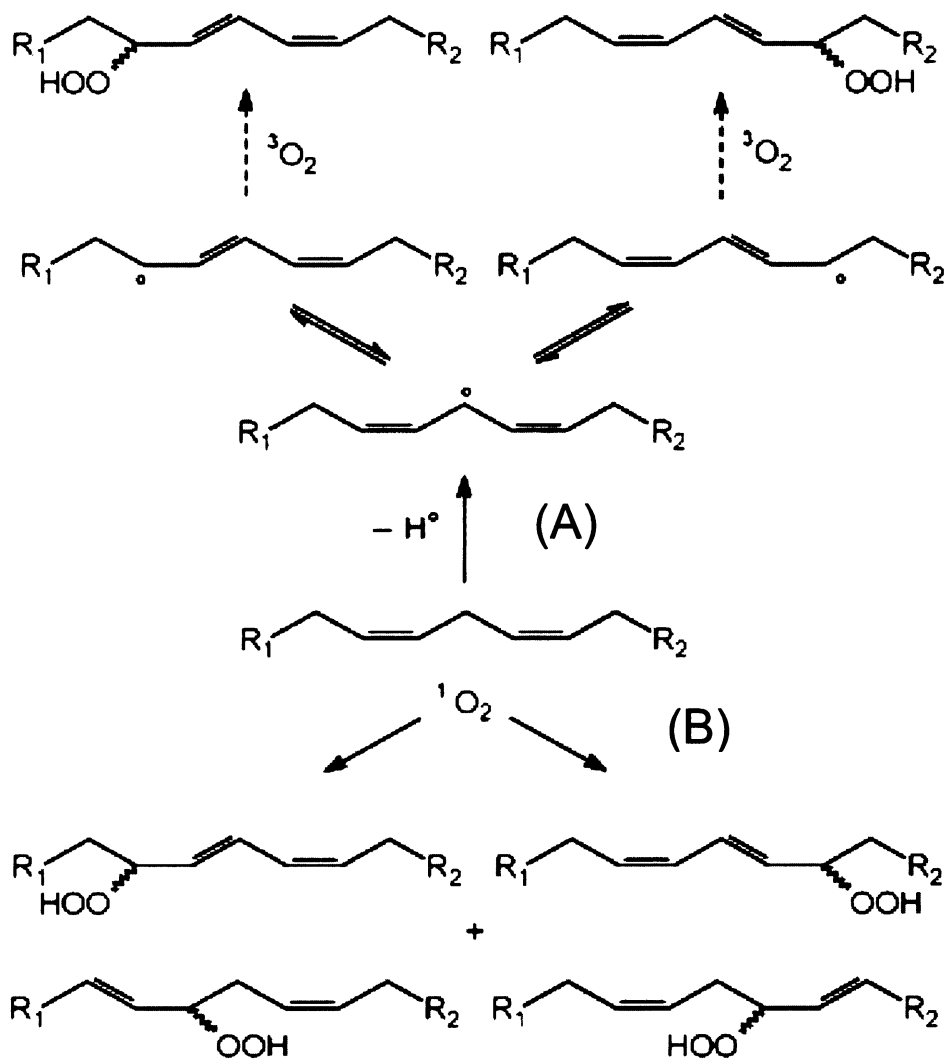
Mechanismus peroxidace lipidů byl objeven ve 40. letech 20. století X. Farmerem a jeho kolegy v továrně na výrobu kaučuku ve Velké Británii. Peroxidace lipidů vlivem působení ROS probíhá jako řetězová reakce na PUFA, které jsou k oxidaci zvláště citlivé. PUFA se uvolňují z lipidové membrány aktivací fosfolipas, které štěpí esterovou vazbu mezi PUFA a glycerolem [33]. V iniciační fázi dojde k odtržení vodíku z methylenového uhlíku v řetězci PUFA obklopeného dvěma dvojnými vazbami. Na uhlíku tak vznikne radikál s nepárovým elektronem, který po přemístění na druhý vedlejší uhlíkový atom umožní vznik konjugovaného dienu (tzv. primární produkt peroxidace lipidů). Reakcí radikálu s kyslíkem vzniká peroxylový radikál (LOO^\cdot). Při propagaci se LOO^\cdot odtržením vodíku ze sousedního uhlíku řetězce PUFA a přijmutím elektronu přeměňuje na hydroperoxylovou skupinu a vzniká tak hydroperoxid PUFA (LOOH). K terminaci řetězové reakce dochází setkáním dvou radikálů nebo radikálu s antioxidační sloučeninou [34].

Peroxidace lipidů probíhá rovněž působením enzymu lipoxygenasa (LOX). Při enzymatické peroxidaci jsou LOO^\cdot převedeny na LOO^- , čímž ztrácejí svou reaktivitu a vznik produktů peroxidace je tak kontrolovaný [7]. Zatímco vlivem ROS dochází ke vzniku racemické směsi nestereospecifických LOOH , působením enzymu lipoxygenasa (LOX) vznikají stereospecifické LOOH (obr. 5, str. 18). LOX existuje několik typů. Některé zavádějí hydroperoxylové skupiny na 9. uhlík, jiné na 13. uhlík od karboxylového konce PUFA [33]. Kyselina linolová a linolenová jsou nejčastěji zastoupené mastné kyseliny v thylakoidních membránách rostlin. Z kyseliny linolové vznikají působením LOX kyseliny 13(*S*)-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-oktadekadienová a 9(*S*)-hydroperoxy-*trans*-10, *cis*-12-oktadekadienová. Z kyseliny linolenové vznikají kyseliny 13(*S*)-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11, *cis*-15-oktadekatrienová (13-HOTE) a 9(*S*)-hydroperoxy-*trans*-10, *cis*-12, *cis*-15-oktadekatrienová [34]. Peroxidace lipidů iniciovaná LOX může pokračovat jako řetězová reakce vlivem alkoxylových radikálů (LO^\cdot). Při vysoké hladině volných PUFA je LOX rozložena a z aktivních center LOX se uvolňuje Fe^{2+} , které katalyzuje rozklad LOOH na LO^\cdot [32].

Nestereospecifické LOOH jsou nestabilní a rozpadají se na aldehydicke produkty, nejčastější jsou 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) a malondialdehyd (MDA), epoxidační sloučeniny a cyklické oxylipiny (tzv. sekundární produkty peroxidace lipidů) (obr. 6, str. 19) [23]. Tyto sloučeniny se podílejí na tvorbě charakteristické vůně rostlin a chuti

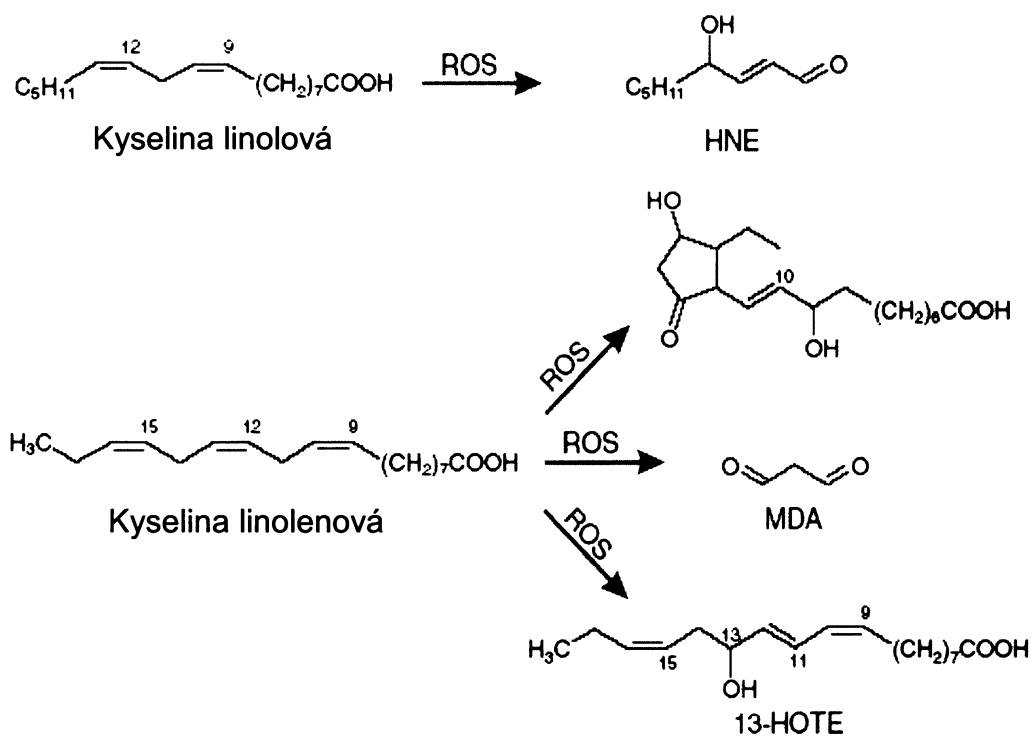
zeleniny a ovoce. V některých případech jsou sekundární produkty peroxidace lipidů toxické. Jelikož mohou tyto sloučeniny způsobit inhibici proteosyntézy, glykolýzy či respiračního řetězce, jsou příčinou fungicidních a antimikrobiálních vlastností rostlin [35]. Stereospecifické LOOH kyseliny linolenové jsou v rostlinách dále metabolizovány na kyselinu jasmonovou, která plní funkci signální molekuly při poranění rostliny patogenem. S podobným příkladem se setkáváme i u živočichů, ve kterých peroxidací kyseliny arachidonové vlivem LOX vznikají prostaglandiny podílející se na zánětlivé odpovědi [34].

Radikálovou teorii stárnutí potvrzuje s věkem se zvyšující oxidační poškození lipidů u živočichů a rostlin. V mitochondriích z varlat krys starých 3 měsíce byla koncentrace MDA dvojnásobná vůči mitochondriím z varlat krys starých 21 dní. V mitochondriích z varlat krys starých 18 měsíců byla koncentrace MDA již pětinásobná [36]. Nárůst koncentrace MDA a konjugovaných dienů byl potvrzen rovněž v mozkové tkáni z krys starých 16-18 měsíců vůči mozkové tkáni z krys starých 3 měsíce [37]. Akumulace produktů peroxidace lipidů byla potvrzena rovněž během stárnutí lidí v lipoproteinové frakci krve o nízké hustotě [32]. Co se týče rostlin, v sedmiletých skalničkách devaterníku *Cistus clusii* vzrostla koncentrace MDA vůči tříletým rostlinám v listech 2,7x a v chloroplastech 2,8x; přičemž mezi tříletými a jednoletými rostlinami nebyly v koncentraci MDA zaznamenány rozdíly [38]. Ve slupkách senescentních jablek vzrostla koncentrace MDA dvojnásobně a koncentrace LOOH trojnásobně vůči slupkám zdravých jablek po 24 týdnech skladování při 0 °C [39]. Nárůst koncentrace MDA byl potvrzen rovněž při senescenci listů kukuřice [40]. Strukturální analýza LOOH umožňuje určit, zda je příčinou peroxidace lipidů LOX nebo ROS. Z racemické směsi nestereospecifických LOOH v pokročilé fázi senescence listů *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že příčinou senescence listů je působení ROS pravděpodobně kvůli snížené schopnosti je zneškodňovat. Tyto výsledky podpořila snižující se aktivita LOX, jejíž funkce spočívá především v obranných reakcích rostliny na napadení patogeny a poranění škůdci [41].



Obr. 5 – Mechanismus peroxidace lipidů

Peroxidace lipidů indukovaná lipoxygenasou vede ke vzniku stereospecifických hydroperoxidů lipidů s konjugovanými dvojnými vazbami (A). Peroxidace lipidů vyvolaná singletovým kyslíkem vede ke vzniku nestereospecifických hydroperoxidů lipidů s konjugovanými i nekonjugovanými dvojnými vazbami (B). Upraveno podle Montilleta [42].



Obr. 6 – Peroxidace kyseliny linolové a linolenové vlivem působení ROS

V rostlinných buňkách vznikají 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) a malondialdehyd (MDA) jako peroxidací kyseliny linolové, tak peroxidací kyseliny linolenové. Cyklický oxylipin a 13-hydroperoxyoktadekatrienová kyselina (13-HOTE) zde znázorněné vznikají peroxidací kyseliny linolenové. Podobné produkty vznikají rovněž peroxidací kyseliny linolové (zde neuvedeno). Upraveno podle Møllera [23].

1.3.2 Fluorescenční produkty a lipofuscinoidní pigmenty

Produkty peroxidace lipidů mohou dále reagovat s buněčnými složkami za vzniku konečných fluorescenčních produktů označovaných lipofilní fluorescenční produkty nebo lipofuscinoidní pigmenty (LFP) podle podobnosti jejich fluorescenčních vlastností s lipofuscinem. Analýzou složení LFP bylo zjištěno; že obsahuje lipidy, proteiny, sacharidy a ionty kovů. Přesné složení LFP však není stále známo, protože jeho separace a analýza je obtížná. Jedná se především o reakce aldehydů s aminoskupinami proteinů za vzniku Schiffových basí. Na aminoskupiny proteinů se dále mohou vázat podobným mechanismem sacharidy. Akumulace LFP byla potvrzena při stárnutí živočichů [43]. Akumulace LFP doprovází rovněž řadu onemocnění, např. Alzheimerovu a Creutzfeld-Jakobovu chorobu. U rostlin bylo zvýšení obsahu LFP poprvé zjištěno u dozrávajících hrušek a banánů [44]. Později bylo zvýšení obsahu LFP pozorováno v chloroplastech stárnoucích listů fazolu [45]. Zatímco u živočichů se LFP akumuluje v lyzosomech nedělících se buněk (neurony, epitel očních čoček, kardiální myocyty); u rostlin se LFP akumuluje v mikrosomálních membránách a chloroplastech [4].

V senescentních děložních listech fazolu starých 14 dní vzrostla koncentrace LFP 9x vůči děložním listům starým 8 dní. Bylo zjištěno, že složení LFP se liší nejen mezi rostlinami a živočichy, ale rovněž se u rostlin mění s věkem [46]. Obsah LFP vzrostl ve fazolových děložních listech při působení oxidačního stresu vlivem UV záření [47]. Hudak ve studii [48] potvrdila, že LFP se akumuluje v membránách endoplasmatického retikula senescentních děložních listů fazolu z důvodu s věkem se snižujícího odbourávání peroxidovaných lipidů. V mladých děložních listech fazolu byly peroxidované lipidy selektivně odbourávány z membrán v lipoproteinových těliscích (deteriosomech). S postupující senescencí však docházelo k poruchám v tomto procesu, což vedlo k narušení celistvosti membrán a ztrátě jejich funkce. Dobře popsány jsou produkty *in vitro* reakce MDA s aminoskupinami proteinů (excitační maximum 260-280 nm a 350-390 nm a emisní maximum 450-470 nm). Cílem dalšího výzkumu LFP je pokračovat v jeho syntézách *in vitro* a studovat možnosti, jak jeho akumulaci v buňkách zabránit [49].

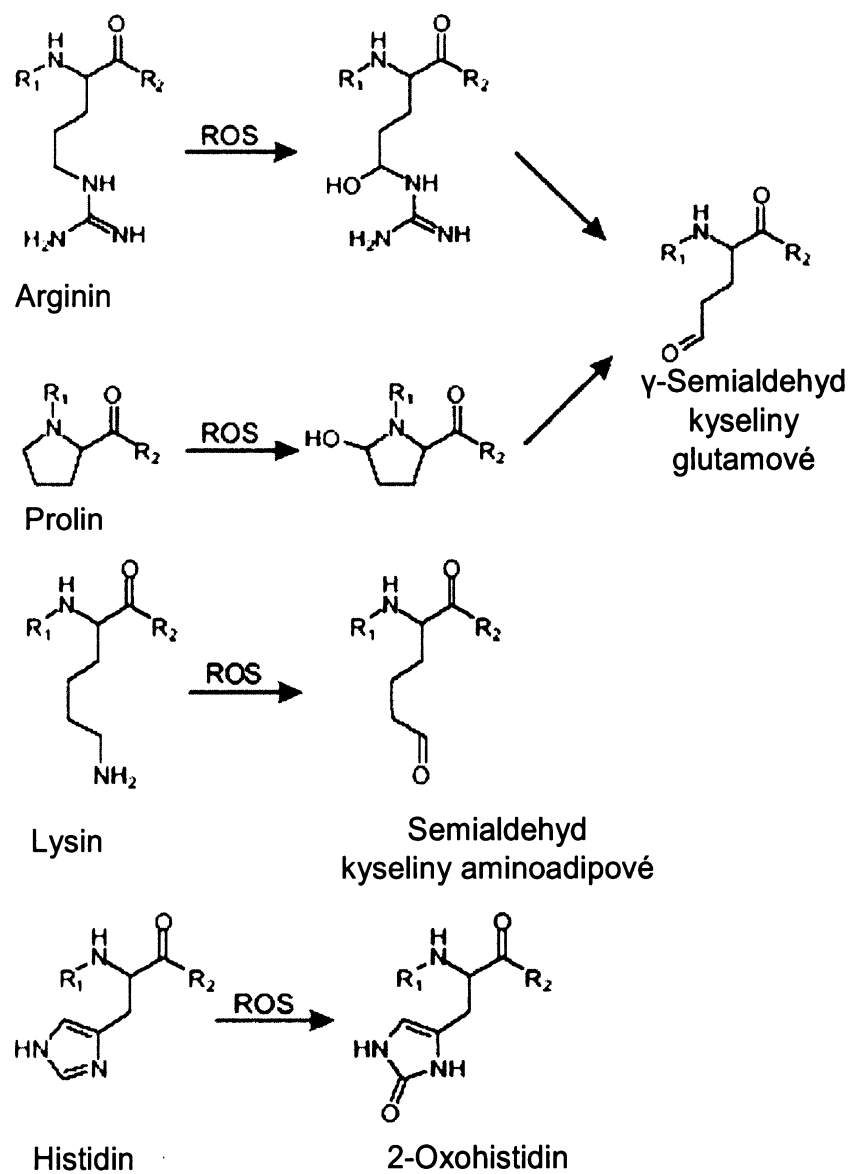
1.3.3 Oxidační poškození proteinů

Přesný mechanismus řetězové oxidace proteinů není doposud znám. Na iniciaci se podílejí především OH^\cdot a O_2^\cdot . Na propagaci oxidace proteinů se podílejí především LO^\cdot . Oxidací aminokyselinových zbytků (valin, leucin, tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin) vznikají hydroxylované deriváty, z nichž *o*-tyrosin vznikající oxidací fenylalaninu a dityrosin slouží jako indikátory oxidačního poškození proteinů. Nejčastějším projevem oxidace proteinů je zavádění karbonylových skupin ($\text{C}=\text{O}$) do aminokyselinových zbytků (histidin, prolin, arginin, lysin, threonin, tryptofan), což je irreverzibilní proces vedoucí ke ztrátě katalytické a strukturní funkce proteinů (obr. 7, str. 23) [23]. Karbonylace proteinů probíhá třemi různými mechanismy: 1. oxidací katalyzovanou ionty přechodných kovů; 2. reakcí s peroxidačními produkty lipidů obsahujícími aldehydickou funkční skupinu (MDA, HNE) a 3. interakcí glycinových zbytků proteinů se sacharidy (tzv. glykace) [50].

Oxidace proteinů se může rovněž projevit reverzibilní oxidací sulfhydrylových skupin cysteinu a methioninu [51]. Redukce disulfidických můstků cystinu se účastní thioredoxiny a glutaredoxiny, na redukci methioninsulfoxidu se podílí methioninsulfoxidreduktasa [52]. Dalším projevem oxidace proteinů je nitrosylace cysteinu a tyrosinu důsledkem působení NO. Nitrotyrosin slouží jako indikátor oxidace proteinů účinkem reaktivních forem dusíku [23]. Běžně jsou oxidované proteiny odbourávány proteasami přítomnými ve všech buněčných kompartmentech. S věkem se však schopnost odbourávat oxidované proteiny snižuje. Akumulace oxidovaných proteinů je příčinou řady onemocnění u lidí, např. Alzheimerovy, Parkinsonovy, Huntingtonovy choroby, aterosklerosy a diabetu [53].

U savců oxidace proteinů probíhá specificky u mitochondriálních enzymů Krebsova cyklu a stresových proteinů. Levine ve studii [54] zjistil, že obsah $\text{C}=\text{O}$ v proteinech vzrůstá exponenciálně v poslední třetině životního cyklu v různých tkání mnoha živočišných druhů (lidské čočky, lidský mozek, lidská kůže, krysí játra) a způsobuje poruchy buněčných funkcí. V případě, že krysám a myším byly omezeny kalorie v potravě, délka jejich života se prodloužila a obsah $\text{C}=\text{O}$ v proteinech se snížil. Exponenciální nárůst $\text{C}=\text{O}$ v proteinech s věkem byl zaznamenán rovněž v mitochondriích svalové tkáně *Drosophily melanogaster* [50]. U rostlin není oxidace proteinů zdaleka tolik prozkoumána. Nárůst oxidace proteinů s věkem byl pozorován v listech *Arabidopsis thaliana*. S přechodem ke kvetení došlo u listů k výraznému poklesu obsahu $\text{C}=\text{O}$ v proteinech. Oxidace proteinů probíhala specificky u chloroplastových proteinů (ATPsynthasa, Hsp70,

RuBPCO a centra vyvíjejícího kyslík PS II). Průběh oxidace proteinů se u rostlin a živočichů liší. U rostlin nesouvisí s věkem tak jako v případě živočichů [55]. Zvýšený obsah C=O v proteinech byl pozorován u semen kukuřice při působení mrazu, u senescentních plodů hrachu a fazolí, u chloroplastů pšenice při vodním deficitu a u listů hrachu pěstovaného na půdě s výskytem Cd^{2+} [56].



Obr. 7 – Zavádění karbonylových skupin do aminokyselin proteinů vlivem působení ROS

Oxidací argininu, lysinu a prolinu vznikají semialdehydy. Oxidací histidinu vzniká 2-oxohistidin. Oxidací tryptofanu vzniká kynurenin (zde neuvedeno). Upraveno podle Møllera [23].

1.4 Peroxidace *in vitro*

Peroxidaci *in vitro* lze vyvolat Fentonovou a Haber-Weissovou reakcí za účasti iontů přechodných kovů [57]. V biologickém materiálu navíc ionty přechodných kovů katalyzují rozklad LOOH na $\text{LO}\cdot$ a $\text{LOO}\cdot$, čímž umožňují propagaci řetězové reakce oxidace lipidů a proteinů [58]. Aby nedošlo k vyčerpání Fe^{2+} , přidává se do inkubační směsi kyselina askorbová (AsA). AsA plní funkci $\cdot\text{O}_2^-$ při Fentonově reakci a zpětně redukuje Fe^{3+} za vzniku dehydroaskorbátu (DHA). Tento systém produkce $\text{OH}\cdot$ *in vitro* byl navržen v roce 1954 Udenfriendem za účelem hydroxylace organických sloučenin a označuje se „Udenfriendův systém“ [59]. Existují však i další způsoby iniciace peroxidace *in vitro*, např. iniciace azosloučeninami, flavinoxidase nebo LOX [58]. Fotochemická peroxidace se iniciuje např. tetrafenylporfinem [60] nebo methylviologenem [57; 61]. Tadolini ve studii [62] zjistil, že peroxidace lipidů v přítomnosti Fe^{2+} byla iniciována Fe^{3+} katalyzovaným rozkladem LOOH.

Ve většině studií se k indukci peroxidace *in vitro* používá poměr koncentrace Fe^{2+} a AsA 1:5-1:1000. Zvýšená peroxidace lipidů zjištěná chemiluminiscenční analýzou emitovaného světla byla potvrzena v mikrosomech a mitochondriích peroxidovaných 0,4 mM AsA a 2,15 μM Fe^{2+} z varlat krys. Maximální nárůst peroxidace lipidů byl v mikrosomech z varlat krys dosažen po 60 min peroxidace a v mitochondriích po 150 min [63]. V mitochondriích peroxidovaných 10 μM Fe^{2+} a 0,5 mM AsA z varlat krys starých 21 dní byl zaznamenán dvojnásobný nárůst peroxidace lipidů vůči neperoxidovanému vzorku. V mitochondriích z varlat dospělých krys starých 3 měsíce byl nárůst čtyřnásobný a v mitochondriích z varlat krys starých 18 měsíců dokonce pětinašobný [36]. Ke zvýšení peroxidace lipidů rovněž došlo v lidské plasmě peroxidované 2,5 μM Cu^{2+} a 10 μM AsA [64]. Současné podávání Fe^{2+} a AsA mělo za následek zvýšení peroxidace lipidů v gastrointestinálním traktu u zdravých osob [65]. U rostlin bylo prokázáno, že v chloroplastech špenátu peroxidovaných 1 μM Fe^{3+} -EDTA a 1 mM AsA vzrostla peroxidace lipidů 15x. Pokud byl přítomen pouze AsA, vzrostla peroxidace lipidů pouze 3x [57].

Tyto výsledky popírají antioxidační funkci AsA v biologických systémech a potvrzují i jeho pro-oxidační funkci při peroxidaci *in vitro*. Oxidační poškození proteinů nebylo ve výše uvedených případech zkoumáno. Z těchto zjištění vyplynuly obavy týkající se požívání vitamínu C u pacientů s vysokou hladinou Fe^{2+} . Jsou proto vypracovávány

další studie peroxidace *in vitro* probíhající za fyziologických podmínek v lidské plasmě. Ze studie [66] vyplývá, že AsA působí v lidské plasmě v přítomnosti Fe^{2+} antioxidantně.

Ferrari-Iliou se ve studii [60] zabývala časovým průběhem fotochemicky indukované peroxidace kyseliny linolenové a lipofilních extraktů fazolu. V případě kyseliny linolenové se peroxidace lipidů projevila nárůstem obsahu konjugovaných dienů po 135 min peroxidace, konjugovaných trienů po 180 min a MDA po 195 min. U lipofilních extraktů listů fazolu nebylo nárůstu obsahu konjugovaných dienů a trienů dosaženo ani po 360 min peroxidace, což poukazuje na vysoký obsah antioxidantních sloučenin v membránách fazolu.

1.5 Antioxidační mechanismy rostlin

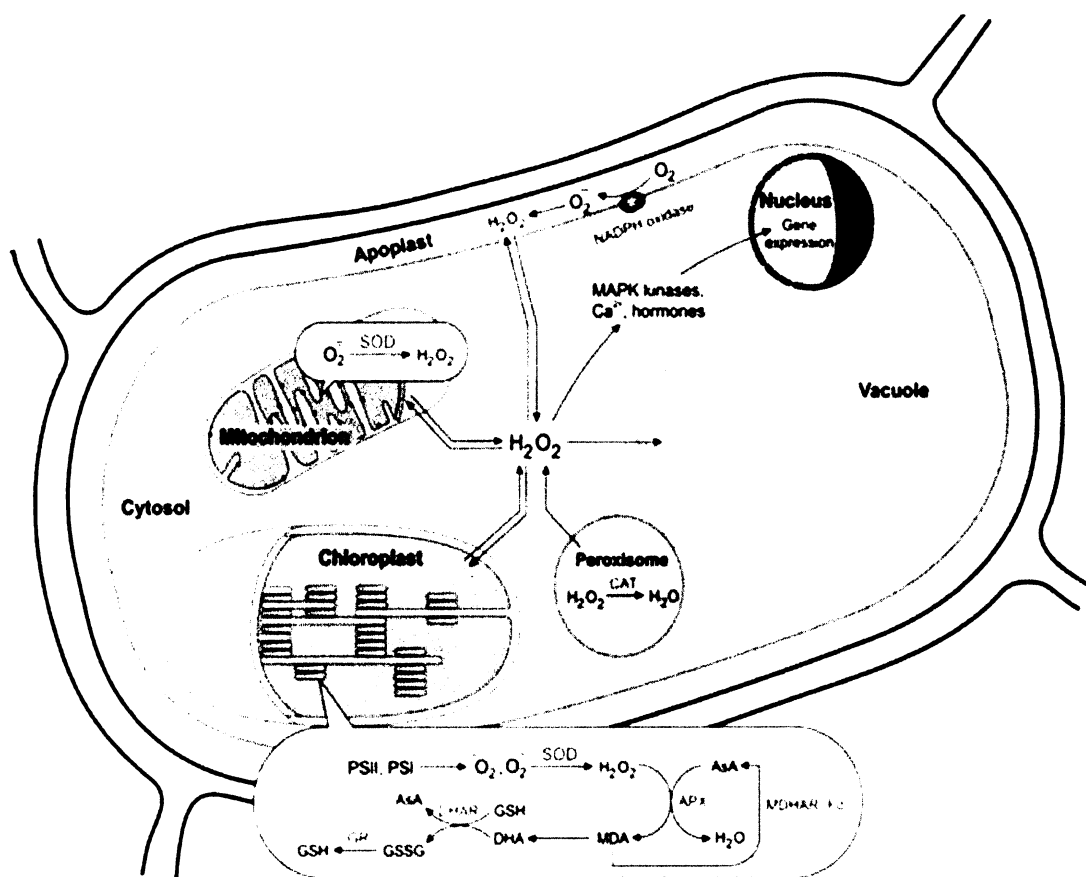
Rozdíly v délce života biologických druhů mohou souviset nejen s rozdíly v produkci ROS, ale také s rozdíly v jejich odstraňování. U rostlin se vyvinuly účinné obranné mechanismy, které odstraňují ROS v místě jejich vzniku a chrání tak buňky před oxidačním poškozením. Účinnost antioxidačních mechanismů závisí na druhu, vývojové fázi rostlin a environmentálních faktorech [20]. Neenzymové antioxidační sloučeniny mají schopnost detoxikovat radikály přímou deaktivací. Enzymové antioxidační sloučeniny jsou výjimečné v tom, že jsou schopné ROS zneškodňovat, aniž by se samy poškodily.

K neenzymovým antioxidantům patří: α -tokoferol (vitamín E), karotenoidy, β -karoten, AsA (vitamín C), cystein, ubichinon, alkaloidy, flavonoidy a metalochaperony. α -Tokoferol je součástí buněčných membrán a podílí se na odstraňování LOO^\cdot , čímž chrání PUFA před oxidací. Karotenoidy odstraňují $^1\text{O}_2$ z protein-pigmentových komplexů chloroplastů svou schopností snadno se vracet z excitovaného tripletového stavu do základního stavu za uvolnění tepla. Významným ochranným mechanismem karotenoidů je také přeměna violaxanthinu na zeaxanthin v tzv. xanthofylovém cyklu. β -karoten se podílí na odstraňování LOOH . AsA (vitamín C) a redukovaný glutathion (GSH) se vyskytují v plastidech, cytosolu, mitochondriích a peroxisomech. GSH chrání sulfhydrylové skupiny proteinů před oxidací a zabraňuje peroxidaci lipidů odstraňováním LO^\cdot [4]. AsA se podílí na odstraňování $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$ a OH^\cdot . Podílí se rovněž na regeneraci α -tokoferolu, čímž chrání membrány před oxidačním poškozením [67]. Metalochaperony (ceruloplasmin, ferritin, fytochelatiny, metalothioneiny, transferrin) chrání rostliny před ROS tím, že vycytávají ionty kovů a udržují tak jejich hladinu nízkou [23].

K enzymové výbavě rostlin patří katalasa (CAT), superoxiddismutasa (SOD), glutathionperoxidasa a enzymy glutathion-askorbátového cyklu jako askorbátperoxidasa (APX) a glutathionreduktasa (GR) (obr. 8, str. 28). SOD přeměňuje $\text{O}_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 a kyslík. V rostlinách se vyskytuje v několika izoformách, které jsou specificky cílené do místa vzniku $\text{O}_2^{\cdot-}$. V rostlinných chloroplastech se vyskytuje Fe-SOD, v mitochondriích a peroxisomech Mn-SOD a v cytosolu Cu/Zn-SOD. CAT přeměňuje H_2O_2 na vodu a kyslík v peroxisomech a mitochondriích [22]. Glutathionperoxidasy se selenem v aktivním centru a glutathion-*s*-transferasy odstraňují LOOH [20]. H_2O_2 se rovněž odbourává Halliwell-Ashadovou cestou nebo-li askorbát-glutathionovým cyklem v chloroplastech, peroxisomech, cytosolu, mitochondriích a apoplastu. APX přeměňuje H_2O_2 na vodu a z

donoru elektronů AsA vzniká monodehydroaskorbát (MDHA), který může dismutovat na dehydroaskorbát (DHA) a AsA. Monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR) a dehydroaskorbátreduktasa (DHAR) redukují tyto molekuly zpět na AsA. Donorem protonů MDHAR je NADPH a donorem protonů DHAR je GSH. GR pak zpětně redukuje oxidovaný glutathion (GSSG) a jako zdroj elektronů využívá NADPH [25]. Při krátkodobém vystavení stresovým podmínkám rostlina syntetizuje antioxidační enzymy ve zvýšené míře. Naopak dlouhodobá nebo velká stresová zátěž vede ke snížení aktivity antioxidačních enzymů, zvýšení oxidačního stresu a poškození rostliny.

Aktivita antioxidačních enzymů a pokles obsahu neenzymových antioxidantů se snižuje při stárnutí a senescenci rostlin [19; 40; 68] a působení stresových podmínek, což je příčinou akumulace ROS. U rostlin s dokonalejší antioxidační výbavou je spuštění senescenčního syndromu v listech oddáleno. Snížení aktivity APX, CAT a Mn-SOD během senescence bylo potvrzeno u listů kukuřice [40]. Pokles v obsahu β -karotenu, α -tokoferolu a deepoxidačního stavu xanthofylu byl zaznamenán u stárnoucích *Cistus clusii* [38]. Snížený obsah APX, AsA, CAT, GSH a Cu/Zn-SOD byl zjištěn při působení oxidačního stresu v listech tabáku [61].



Obr. 8 – Schematické znázornění rostlinné buňky s lokalizací vzniku ROS a antioxidantních enzymů

V chloroplastech vzniká singletový kyslík (1O_2) a superoxid anion-radikál (O_2^-). V mitochondriích vzniká O_2^- v respiračním řetězci přenosem elektronů na kyslík. O_2^- jsou přeměňovány superoxididismutasou (SOD) na peroxid vodíku (H_2O_2), který je dále přeměňován askorbátperoxidásou (APX) v askorbát-glutathionovém cyklu. Donorem elektronů je kyselina askorbová (AsA), která se oxiduje na monodehydroaskorbát (MDHA) a dehydroaskorbát (DHA). Zpětnou redukci AsA zajišťují monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR) a dehydroaskorbátreduktasa (DHAR). Donorem protonů DHAR je glutathion (GSH), který je zpětně redukován glutathionreduktasou (GR). V peroxisomech vzniká při fotorespiraci a β -oxidaci mastných kyselin H_2O_2 , který je přeměňován katalasou (CAT) na vodu. NADPHoxidasy v plasmatické membráně produkují do apoplastu O_2^- , který se redukuje na H_2O_2 . H_2O_2 difunduje plasmatickou membránou do cytosolu, odkud se může transportovat do jednotlivých buněčných kompartmentů včetně vakuoly. Upraveno podle Gecheva [69].

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je studovat oxidační poškození lipidů a proteinů v thylakoidních membránách izolovaných chloroplastů z primárních listů fazolu při peroxidaci *in vitro* a porovnat tyto výsledky s oxidačním poškozením při peroxidaci *in vivo* během přirozeného stárnutí. Tato práce se pokusí odpovědět na otázku: Jakým způsobem se liší průběh oxidačního poškození peroxidace *in vivo* a peroxidace *in vitro* v chloroplastech fazolu? Cílem je také zjistit, jak se mění oxidační poškození lipidů a proteinů v thylakoidních membránách fazolu při stárnutí a s nástupem senescence v primárních listech.

3. MATERIÁL

BSA (Sigma-Aldrich, Německo)
CuSO₄ (Lachema, Česká republika)
DNPH (Fluka, Švýcarsko)
EDTA (Lachema, Česká republika)
Ethanol (P-Lab, Česká republika)
Ethylester kyseliny octové (Penta, Česká republika)
FeSO₄ (Lachema, Česká republika)
Folinovo-Ciocalteuovo činidlo (Penta, Česká republika)
Guanidin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Německo)
HCl (Penta, Česká republika)
Chloroform (Lachema, Česká republika)
KH₂PO₄ (Lachema, Česká republika)
Kyselina askorbová (Sigma, USA)
Kyselina citronová (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina trifluorooctová (Sigma-Aldrich, Německo)
Methanol (Lachema, Česká republika)
MgCl₂ (Lachema, Česká republika)
NaCl (Lach-Ner, Česká republika)
Na₂CO₃ (Lachema, Česká republika)
Na₂HPO₄ (Lachema, Česká republika)
NaH₂PO₄ (Lach-Ner, Česká republika)
NaOH (Litolab, Česká republika)
NH₄Cl (Lachema, Česká republika)
Semena fazolu (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Jantar – získáno ze zdrojů ÚEB AVČR
TBA (Fluka, Švýcarsko)
TCA (Fluka, Švýcarsko)
Vínan draselno-sodný (Lachema, Česká republika)

4. METODY

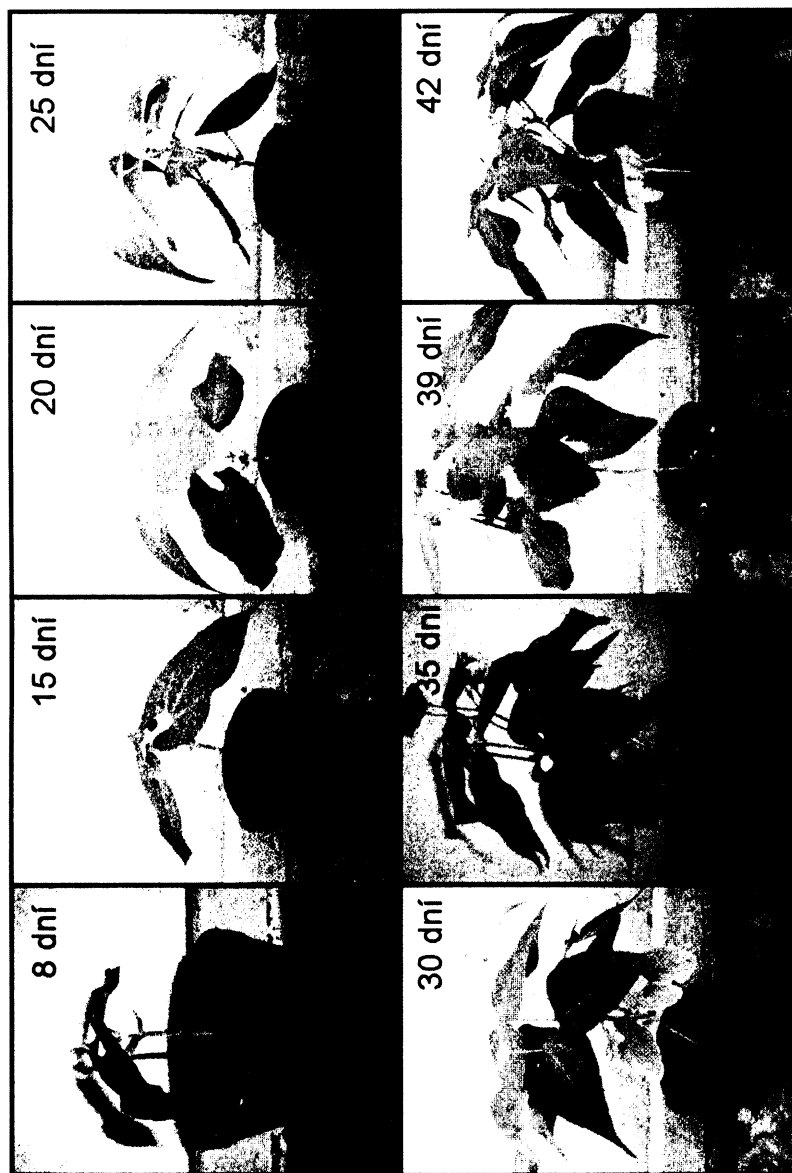
4.1 Pokusný materiál a jeho kultivace

Ke studiu peroxidace *in vitro* byly použity primární listy dekapitovaného fazolu (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Jantar 16 dní staré vypěstované v Ústavu Experimentální botaniky AVČR. Vzhled těchto pokusných rostlin je zachycen na obrázku 9. Ke studiu peroxidace *in vivo* byly použity primární listy nedekapitovaného fazolu (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Jantar 8, 15, 20, 25, 29, 32, 35, 39 a 42 dní staré (obr. 10, str. 32). Semena byla ponechána klíčit dva dny při laboratorní teplotě na filtračním papíru vlhčeném v pravidelných intervalech na Petriho misce. Poté byla klíčící semena přesazena do půdního substrátu v květináčích o průměru 10 cm. Rostliny byly pěstovány v kultivační místnosti při ozáření 30-70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ s fotoperiodou 16 h při teplotě 25 °C. V noci teplota klesala na 18 °C. Od osmého dne přesazení byly rostliny dvakrát týdně zalévány Hewittovým živným roztokem a průběžně byly zalévány destilovanou vodou. U dekapitovaných rostlin byl od osmého dne po přesazení odstraňován vzrostný vrchol pokaždé, když se objevil.

Složení Hewittova živného roztoku: 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,5 μM CuSO_4 ; 0,5 mM FeNa_2EDTA ; 0,03 mM H_3BO_3 ; 4 mM KNO_3 ; 1,5 mM MgSO_4 ; 0,01 mM MnSO_4 ; 0,1 mM NaCl ; 1,33 mM NaH_2PO_4 ; 0,5 μM Na_2MoO_4 a 1 μM ZnSO_4



Obr. 9 – Pokusný materiál ke studiu peroxidace *in vitro*
Primární listy dekapitovaného fazolu 16 dní staré.



Obr. 10 – Pokusný materiál ke studiu peroxidace *in vivo*
Životní cyklus primárních listů fazolu bez dekapitace vzrostného vrcholu.

4.2 Izolace chloroplastů

K izolaci chloroplastů byla využita diferenční centrifugace podle Reevese [70]. Tato metoda umožňuje oddělit jednotlivé buněčné orgány podle jejich velikosti a hustoty centrifugací při zvyšujících se otáčkách. Izolační postup byl prováděn na ledu a listy byly chráněny před světlem. Zvážené listy s odstraněnými cévními svazky byly homogenizovány na homogenizátoru Turrax (Ika, Německo) v 0,05 M izolačním pufru pH 6,5 při 100 otáčkách/min, čímž došlo k rozrušení buněk. Na 1 g listu bylo použito 5 ml izolačního pufru. Homogenizát byl přefiltrován přes 10 vrstev gázy a odstředěn na centrifuze 3K30 (Sigma, Německo) (90 s, 500 g, 4 °C). Sediment byl zlikvidován a supernatant byl znovu odstředěn na centrifuze 3K30 (5 min, 1000 g, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v izolačním pufru pomocí štětečku. Na 2 g listů bylo použito 0,5 ml izolačního pufru. Chloroplastová suspenze byla homogenizována ve skleněném homogenizátoru, protřepána na vortexu, zamražena v tekutém dusíku a uchovávána při -70 °C. Předem bylo odebráno 60 µl chloroplastové suspenze na stanovení obsahu proteinů. Izolační pufr byl uchováván při -20 °C.

Složení 0,05 M izolačního pufru pH 6,5:

2 mM MgCl₂ x 6H₂O

20 mM NaCl

0,05 M NaH₂PO₄

0,05 M Na₂HPO₄

2,5 mM NH₄Cl

4.3 Stanovení obsahu membránových proteinů

Ke stanovení obsahu proteinů v chloroplastové suspenzi byla použita Lowryho metoda modifikovaná podle Millera [71]. Tato metoda je založena na chelataci měďnatých iontů peptidovou vazbou a redukcí kyseliny fosfowolframové a fosfomolybdenové tyrosinovými a tryptofanovými zbytky proteinů. Modře zbarvené reakční produkty se stanovují spektrofotometricky při 750 nm. Kalibrační přímka byla sestavena pro standard hovězího sérového albuminu (BSA) podle tabulky 2. Použit byl zásobní roztok BSA o koncentraci 1 mg/ml. Chloroplastová suspenze (kap. 4.2, str. 33) byla ředěna 50x do 0,5 ml 0,5 M NaOH. Obsah zkumavek byl inkubován 10 min při laboratorní teplotě s 0,5 ml Fehlingova roztoku (roztok A smíchaný s roztokem B v poměru 1:10). Následně probíhala inkubace při 50 °C na termostatu Dri Block DB.3 (Techne, Velká Británie) s 1,5 ml Folinova-Ciocalteuova činidla ředěným destilovanou vodou v poměru 1:6. Zkumavky byly ponechány vychladnout na laboratorní teplotu a poté byla změřena absorbance při 750 nm na spektrofotometru U-3300 (Hitachi, Japonsko) (obr. 11, str. 35). Referenční květa byla naplněna destilovanou vodou. Spektrofotometr byl vynulován na slepý pokus bez obsahu BSA. Měření probíhalo v triplicátech. Koncentrace proteinů byla stanovena z rovnice regrese lineární přímky sestavené pro kalibrační přímku (obr. 12, str. 35). Fehlingův roztok byl připraven pokaždé čerstvý a roztok A byl před jeho přípravou rozpuštěn mírným zahřátím. Ostatní roztoky byly uchovávány při 4 °C.

Příprava Fehlingova roztoku:

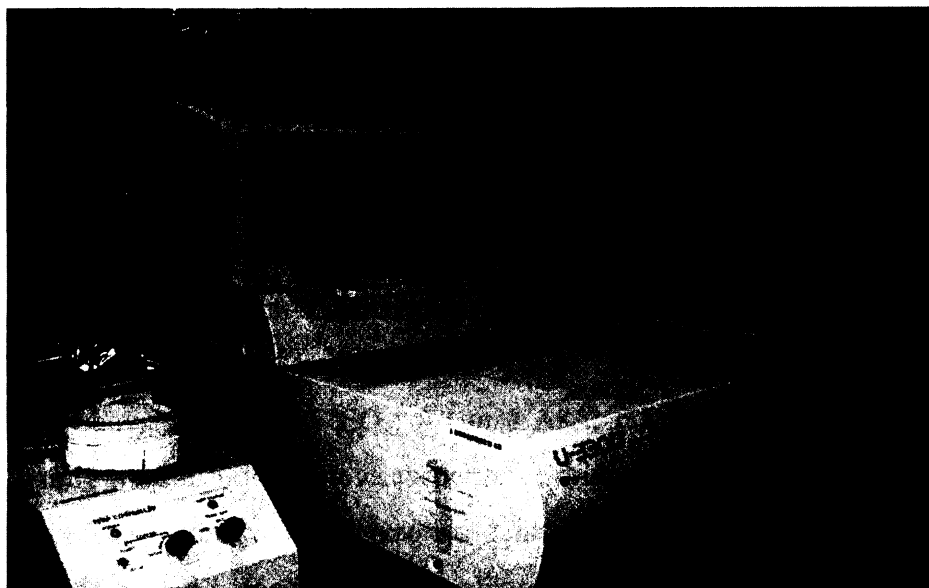
Složení roztoku A: 0,5% CuSO₄ (w/v)
1% vlnan draselno-sodný (w/v)

Složení roztoku B: 10% Na₂CO₃ (w/v)

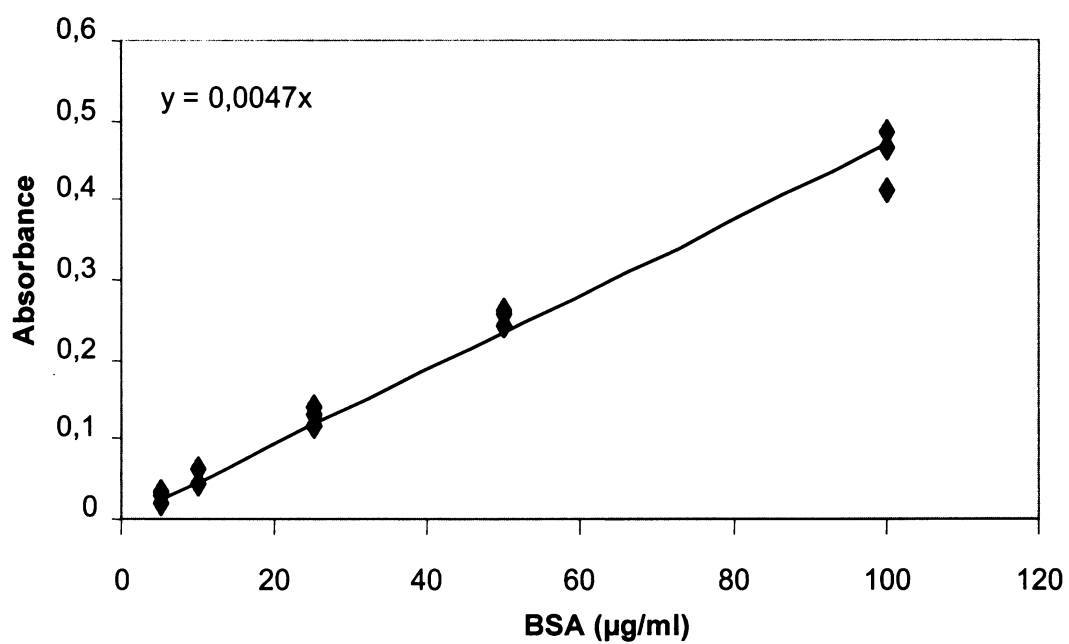
BSA (μg/ml)	0	5	10	25	50	100
BSA (μl)	–	10 (4x ředěný)	10 (2x ředěný)	25 (2x ředěný)	25 (neředěný)	50 (neředěný)
0,5 M NaOH (ml)	0,5	0,49	0,49	0,475	0,475	0,45

Tabulka 2 – Příprava kalibrační křivky pro stanovení bílkovin podle Millera [71]

Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA).



Obr. 11 – Spektrofotometr U-3300 (Hitachi, Japonsko)



Obr. 12 – Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů v thylakoidních membránách fazolu s různými koncentracemi hovězího sérového albuminu (BSA)

4.4 Peroxidace komponent chloroplastových membrán in vitro

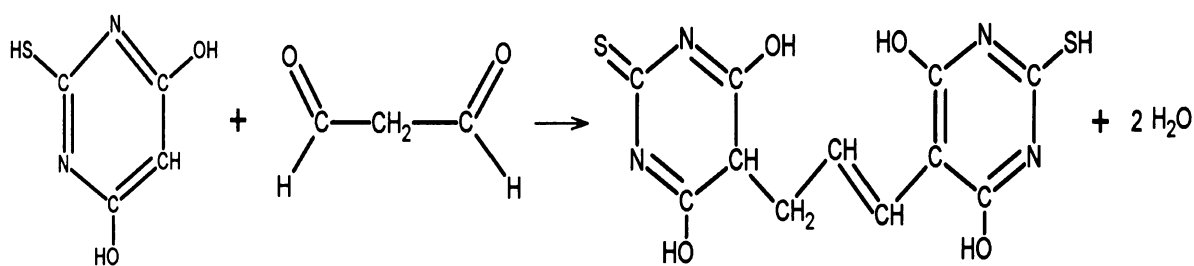
Rozmražená chloroplastová suspenze (kap. 4.2, str. 33) byla důkladně zhomogenizována protřepáním na vortexu a doplněna pufrem na koncentraci proteinů 3 mg/ml ve dvou skleněných zkumavkách. Použit byl 0,05 M fosfátový pufr pH 6,5 stejného složení jako izolační pufr; případně 0,1 M citrátový pufr o různém pH. Jedna zkumavka obsahovala 0,3 mM FeSO₄; 0,3 mM AsA; případně 1 μM EDTA; aby došlo k iniciaci tvorby ROS. Chloroplastová suspenze ve druhé zkumavce bez přítomnosti Fe²⁺ a AsA byla vedena jako kontrolní vzorek. Chloroplastová suspenze byla standardně inkubována 6-48 h při 37 °C s přístupem kyslíku v inkubátoru Plus II (Gallenkamp, Velká Británie) při mírném třepání. Po 0, 2, 4, 6; případně 24 a 48 h inkubace byla stanovena koncentrace MDA, konjugovaných dienů a C=O v proteinech. Před odběrem byl obsah zkumavek důkladně protřepán na vortexu. Odebíráno bylo 150 μl chloroplastové suspenze na stanovení obsahu MDA, 300 μl na stanovení obsahu konjugovaných dienů a 100 μl na stanovení obsahu C=O v proteinech. Odebrané vzorky na stanovení obsahu konjugovaných dienů a C=O v proteinech byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -70 °C. Zásobní roztoky FeSO₄ a AsA byly připraveny vždy čerstvé. Zásobní roztok AsA byl uchováván na ledu a chráněn před světlem. Zásobní roztok EDTA byl uchováván při 4 °C.

4.5 Studium oxidačního poškození lipidů

Peroxidaci lipidů lze studovat ze stanovení obsahu peroxidačních produktů (konjugovaných dienů, LOOH, LFP, MDA) nebo ze stanovení úbytku PUFA v membránách.

4.5.1 Stanovení obsahu malondialdehydu

Stanovení obsahu MDA je nejběžnější metodou detekce rozsahu peroxidace lipidů. Kondenzací dvou molekul kyseliny thiobarbiturové (TBA) s jednou molekulou MDA katalyzovanou kyselým prostředím a vysokou teplotou vzniká růžově zbarvený produkt, který se stanovuje spektrofotometricky při 532 nm (obr. 13). Pro vyloučení možného vlivu interferujících sacharidů a antokyaninů přítomných v rostlinných extraktech byla měřena absorbance při 440 nm podle metody popsané Hodgesem [72]. K vyloučení vlivu nespecifické turbidity byla absorbance rovněž měřena při 600 nm.



Obr. 13 – Schematické znázornění reakce dvou molekul kyseliny thiobarbiturové s jednou molekulou malondialdehydu

Upraveno podle Graye [73]

K 500 μ l směsi 20% kyseliny trichloroctové (TCA) (w/v) a 1% TBA (w/v) v 2,5 M HCl bylo přidáno 150 μ l chloroplastové suspenze o koncentraci proteinů 3 mg/ml (kap. 4.4, str. 36); případně 200 μ l supernatantu po odstředění chloroplastové suspenze s 40% TCA (kap. 4.6.1, str. 39). Po protřepání na vortexu byly vzorky inkubovány 10 min při 95 $^{\circ}$ C na termostatu Dri Block DB.3 a poté umístěny na led. Vzorky byly odstředěny na centrifuzě 3K30 (5 min, 3000 g, 4 $^{\circ}$ C). V supernatantech byla proměřena absorpční spektra při 500-600 nm na spektrofotometru U-3300. Absorbance byla odečtena při 440, 532 a 600 nm. V referenční kyvetě byla umístěna destilovaná voda. Spektrofotometr byl rovněž vynulován na destilovanou vodu. Měření probíhalo v triplicátech. Pro výpočet koncentrace

MDA byl použit molární absorpční koeficient $\epsilon = 157\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Koncentrace MDA v nmol/ml byla vypočtena podle vzorce:

$$c = (A - B / \epsilon) 10^6$$

kde $A = \text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}$ a $B = (\text{Abs}_{440} - \text{Abs}_{600}) 0,0571$

Výsledná koncentrace MDA byla vyjádřena v nmol/mg proteinu. Nárůst koncentrace MDA při peroxidaci *in vitro* byl stanoven jako rozdíl koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku. Roztok směsi TCA-TBA byl uchováván při 4 °C a před stanovením byl rozpuštěn mírným zahřátím.

4.5.2 Stanovení obsahu konjugovaných dienů

Tato metoda je založena na měření absorpce konjugovaných dienů v UV oblasti. Peroxidaci lipidů lze stanovit z rozdílu absorbance peroxidovaného a kontrolního vzorku při 233 nm. Nevýhoda této metody spočívá ve vysoké absorpci dalších složek v lipidových extraktech, které toto měření ovlivňují [73-76].

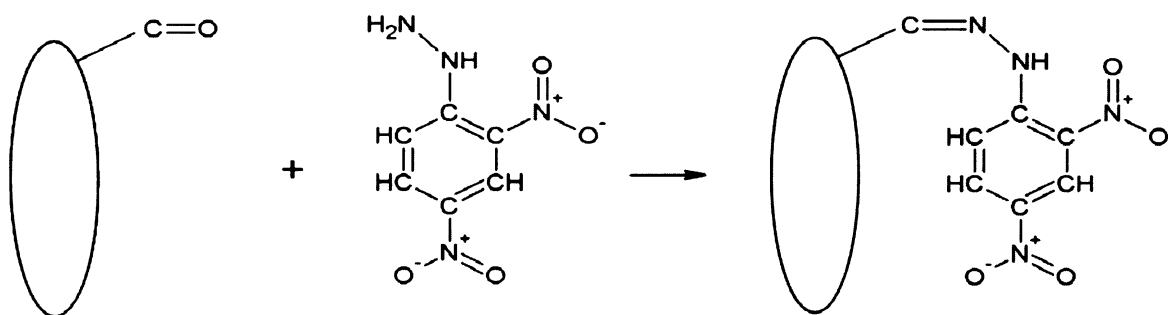
Zkumavky byly nejprve vysušeny v proudu dusíku, aby byl vyloučen přístup kyslíku. K 1,2 ml směsi chloroform-methanol (2:1) bylo přidáno 300 μl chloroplastové suspenze o koncentraci proteinů 3 mg/ml (kap. 4.4, str. 36). Extrakce lipidů probíhala 30 min na třepačce KS250 (Ika, Německo). Poté byl obsah zkumavek doplněn 2 ml destilované vody a opakovaným převrácením zkumavek byla směs promíchána, aniž by došlo ke vzniku lipidových emulzí. Vzorky byly odstředěny na centrifuze 3K30 (10 min, 2000 g, 20 °C), čímž došlo k oddělení polárního a nepolárního rozpouštědla. Skleněnou pipetou bylo 500 μl spodní chloroformové vrstvy přemístěno do čistých zkumavek. Chloroform byl odstraněn vysušením v proudu dusíku. Extrahované lipidy byly rozpuštěny v 600 μl 100% ethanolu a poté byla proměřena absorpční spektra při 200-300 nm na spektrofotometru U-3300. Referenční kyveta byla naplněna ethanolem. Spektrofotometr byl vynulován na destilovanou vodu. Měření probíhalo v duplikátech. Z absorpčních spekter byly získány 2. derivace a byl stanoven rozdíl absorbance v absorpčním maximu při 250 nm a absorpčním minimu při 233 nm. Nárůst koncentrace konjugovaných dienů při peroxidaci *in vitro* byl stanoven odečtením rozdílu absorbance v absorpčním maximu a minimu v kontrolním vzorku od rozdílu absorbance v absorpčním maximu a minimu v peroxidovaném vzorku.

4.6 Studium oxidačního poškození proteinů

Oxidaci proteinů lze studovat ze stanovení obsahu C=O a nitrotyrosinu v oxidačně modifikovaných proteinech spektrofotometrickou analýzou. Zavádění C=O a nitrosylových skupin do proteinů lze studovat rovněž imunodetekcí po elektroforetickém rozdělení proteinů a jejich přenosu na membránu.

4.6.1 Stanovení obsahu karbonylových skupin

Ke stanovení obsahu C=O v oxidačně modifikovaných proteinech byla použita metoda podle Levine [77] založená na reakci C=O v oxidačně modifikovaných proteinech s 2, 4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH). Žlutě zbarvený produkt dinitrofenylhydrazon se stanovuje spektrofotometricky při 365 nm (obr. 14).



Obr. 14 – Schematické znázornění reakce karbonylových skupin v oxidačně modifikovaných proteinech s DNPH

Modře je znázorněn protein s navázanou karbonylovou skupinou. Upraveno podle Franka [78].

K 100 μ l chloroplastové suspenze o koncentraci proteinů 3 mg/ml (kap. 4.4, str. 36) bylo přidáno 100 μ l 40% TCA (w/v), aby došlo k vysrážení proteinů obsažených v thylakoidních membránách. Vzorky byly odstředěny na centrifuze 3K30 (15 min, 22 130 g, 4 °C). Supernatant byl zamražen v tekutém dusíku pro případné stanovení obsahu MDA (kap. 4.5.1, str. 37). Sedimenty byly inkubovány 1 h při laboratorní teplotě s 1 ml 30 mM DNPH v 2M HCl. Sediment vedený jako kontrolní vzorek byl inkubován s 1 ml 2 M HCl. Pelety byly během inkubace důkladně rozetřeny. Poté bylo ke vzorkům přidáno 0,5 ml 20% TCA (w/v) k dosrážení proteinů a vzorky byly odstředěny na centrifuze 3K30 (5 min, 22 130 g, 10 °C). Supernatant byl odstraněn a pelety se

zbývající DNPH byly následně inkubovány 10 min při laboratorní teplotě s 1 ml směsí ethanol-ethylester kyseliny octové (1:1). Vzorky byly odstředěny na centrifuze 3K30 (5 min, 22 130 g, 10 °C) a postup byl 3x opakován. Poté byly pelety rozpouštěny 15 min při 37 °C na termostatu Dri Block DB.3 v 0,6 ml 6 M guanidinu v 20 mM KH₂PO₄ (pH 2,3 bylo upraveno kyselinou trifluoroctovou). Vzorky byly odstředěny na centrifuze 3K30 (5 min, 22 130 g, 10 °C) a poté byla proměřena absorpční spektra při 300-400 nm na spektrofotometru U-3300. Absorbance byla odečtena při 365 nm. V referenční kyvetě byl umístěn kontrolní vzorek. Spektrofotometr byl vynulován na destilovanou vodu. Měření probíhalo v triplikátech. Kyveta byla plněna pipetou, aby nedošlo k rozvíření částic sraženiny. Pro výpočet koncentrace C=O byl použit molární absorpční koeficient $\epsilon = 22\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Koncentrace C=O v nmol/ml byla vypočtena podle vzorce:

$$c = (\text{Abs}_{365} / \epsilon) 10^6$$

Výsledná koncentrace C=O byla vyjádřena v nmol/mg proteinu. Nárůst koncentrace C=O při peroxidaci *in vitro* byl stanoven jako rozdíl koncentrace C=O v peroxidovaném a v kontrolním vzorku. Roztoky na stanovení C=O byly uchovávány při 4 °C a před stanovením byl roztok DNPH rozpuštěn mírným zahřátím.

5. VÝSLEDKY

Cílem této práce bylo sledovat rozsah oxidačního poškození v thylakoidních membránách izolovaných chloroplastů fazolu v závislosti na délce peroxidace *in vitro* a zjistit, do jaké míry se liší od oxidačního poškození při peroxidaci *in vivo* během přirozeného stárnutí. Jako indikátory oxidačního poškození byly sledovány produkty radikálových reakcí MDA, konjugované dieny v lipidech thylakoidních membrán a C=O v membránových proteinech spektrofotometrickou analýzou.

5.1 Vliv peroxidace in vitro na obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolu

V chloroplastové suspenzi izolované postupem uvedeným v kapitole 4.2 (str. 33) a peroxidované postupem uvedeným v kapitole 4.4 (str. 36) bylo sledováno, k jakým změnám v obsahu oxidačně poškozených lipidů dochází během peroxidace *in vitro*. O peroxidaci *in vitro* v rostlinách existuje velmi málo studií, proto bylo nejprve nutné stanovit optimální podmínky peroxidace *in vitro* v thylakoidních membránách fazolu. Optimalizace podmínek inkubace chloroplastové suspenze byla stanovena zaměřením na oxidační poškození lipidů. Nejprve bylo zjištěno, jakým způsobem ovlivňuje koncentrace Fe^{2+} a AsA peroxidaci lipidů *in vitro*. Dále byl studován vliv pufru a jeho pH, přítomnosti EDTA, různého stáří primárních listů a podmínek kultivace při pěstování fazolu na peroxidaci lipidů *in vitro*. Pokusy byly prováděny na primárních listech dekapitovaného fazolu. Senescence se začala projevovat v těchto listech 90 dní starých a listy se dožívaly 120 dnů. Koncentrace MDA je vztažena na celkové množství proteinů v thylakoidních membránách.

5.1.1 Vliv koncentrace Fe^{2+} a kyseliny askorbové

V tomto pokusu byly srovnány *in vitro* peroxidace chloroplastů probíhající při různých koncentracích Fe^{2+} a AsA. Inkubace chloroplastů probíhala ve fosfátovém pufru pH 6,5 při poměru koncentrace Fe^{2+} a AsA 1:1; 1:1,5 a 1:2 při 37 °C. Vliv koncentrace Fe^{2+} a AsA na

časový průběh peroxidace lipidů *in vitro* znázorňuje obázek 15 (str. 45). Zobrazené křivky představují rozdíl koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku chloroplastů. Ve všech třech případech došlo k velmi podobnému nárůstu peroxidace lipidů v přítomnosti Fe^{2+} a AsA. Nejvyšší nárůst MDA byl zaznamenán ve 2. h inkubace. Ve 4. a 6. h inkubace se obsah MDA postupně snižoval, ale neklesl pod počáteční hodnotu. Při použití 0,3 mM Fe^{2+} + 0,3 mM AsA se zvýšil obsah MDA ve 2. h inkubace 2,3x. V případě 0,3 mM Fe^{2+} + 0,6 mM AsA se zvýšil obsah MDA 2,1x a při inkubaci s 1 mM Fe^{2+} + 1,5 mM AsA 1,7x. K iniciaci peroxidace lipidů *in vitro* bylo vybráno 0,3 mM Fe^{2+} + 0,3 mM AsA; jelikož při této koncentraci byl zaznamenán nejvyšší nárůst peroxidace lipidů.

5.1.2 Vliv stáří primárních listů

V tomto pokusu byly srovnány *in vitro* peroxidace chloroplastů izolovaných z různých starých primárních listů. Chloroplasty byly inkubovány s 0,3 mM Fe^{2+} a 0,3 mM AsA ve fosfátovém pufru pH 6,5 při teplotě 37 °C. Časový průběh peroxidace lipidů *in vitro* v chloroplastech izolovaných z 16 dní starých listů popisuje obrázek 16 (str. 46). Vybrána byla reprezentativní série ze tří nezávisle opakovaných pokusů. Časový průběh peroxidace lipidů *in vitro* v chloroplastech izolovaných z 36 dní starých listů popisuje obrázek 17 (str. 47). Primární listy se nacházely v první třetině svého životního cyklu a v obou případech došlo k nárůstu peroxidace lipidů s maximem ve 2. h inkubace. Obsah MDA v kontrolním vzorku chloroplastů v obou případech klesal. Koncentrace MDA v kontrolním vzorku chloroplastů z 36 dní starých listů dosahovala až dvojnásobku koncentrace MDA v kontrolním vzorku chloroplastů z 16 dní starých listů. Obsah MDA v peroxidovaných chloroplastech z 16 dní starých listů dosahoval až dvojnásobku obsahu MDA v peroxidovaných chloroplastech z 36 dní starých listů. Rozdíl koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku chloroplastů z 16 dní starých listů představoval až sedminásobek rozdílu koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku chloroplastů z 36 dní starých listů. Pro další pokusy byly použity chloroplasty z 16 dní starých primárních listů, jelikož v nich byl zaznamenán vyšší nárůst peroxidace lipidů.

5.1.3 Vliv pufru a jeho pH

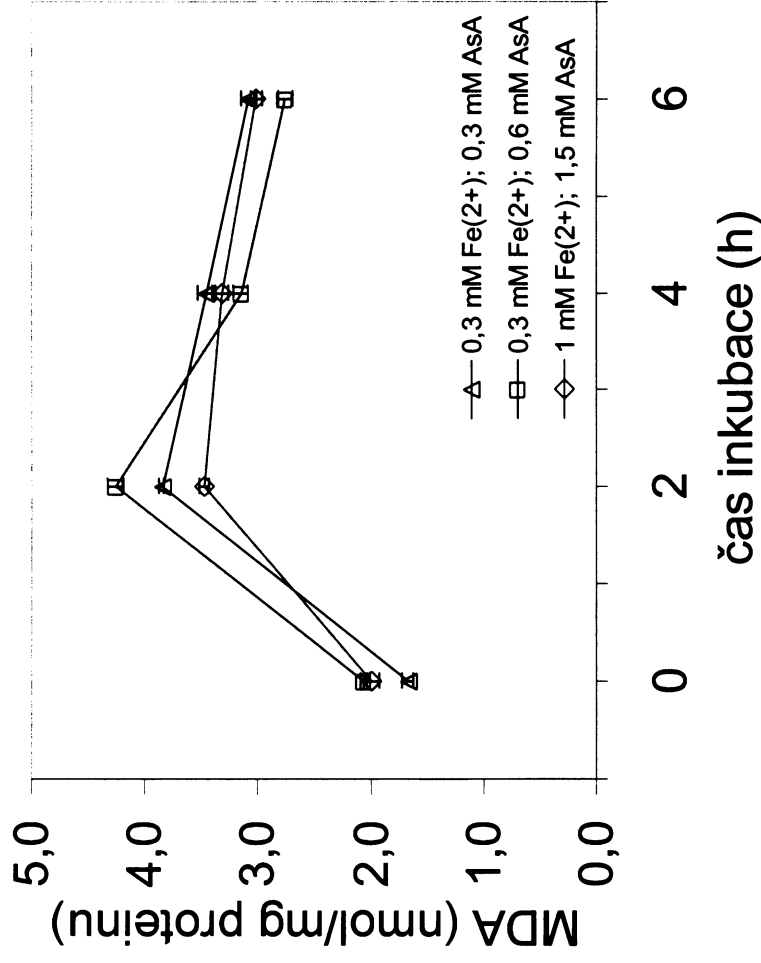
V tomto pokusu byly srovnány *in vitro* peroxidace chloroplastů probíhající v různých pufrch o různém pH. Inkubace chloroplastů v citrátovém pufru pH 6,0; 6,8 a 7,4 probíhala za stejných podmínek jako v kap. 5.1.2 (str. 42). Vliv citrátového pufru a jeho pH na časový průběh peroxidace lipidů *in vitro* popisuje obrázek 18 (str. 48). Zobrazené křivky představují rozdíl koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku chloroplastů. Vliv fosfátového pufru pH 6,5 na časový průběh peroxidace lipidů *in vitro* za stejných podmínek popisuje obrázek 16 (str. 46). V obou pufrch byl zaznamenán nejvyšší nárůst peroxidace lipidů ve 2. h inkubace. Zatímco ve fosfátovém pufru se obsah MDA postupně snižoval a ve 48. h inkubace klesl pod počáteční hodnotu; v citrátovém pufru pH 6,8 a 7,4 k poklesu pod počáteční hodnotu v 48. h inkubace nedošlo. Naopak v citrátovém pufru pH 6,0 došlo k poklesu MDA pod počáteční hodnotu jak ve 48. h, tak ve 24. h inkubace. Hodnoty MDA v peroxidovaném vzorku chloroplastů ve fosfátovém pufru představovaly čtyřnásobek hodnot MDA v peroxidovaném vzorku chloroplastů v pufru citrátovém. K dalším pokusům byl vybrán fosfátový pufr pH 6,5; jelikož v něm byl zaznamenán vyšší nárůst peroxidace lipidů.

5.1.4 Vliv přítomnosti EDTA

V tomto pokusu byl studován vliv přítomnosti EDTA na *in vitro* peroxidaci chloroplastů probíhající ve fosfátovém pufru pH 6,5. Inkubace chloroplastů s přítomností 1 μ M EDTA probíhala za stejných podmínek jako v kap. 5.1.2 (str. 42). Vliv přítomnosti EDTA na peroxidaci lipidů *in vitro* popisuje obrázek 19 (str. 49). Pro srovnání je zde znázorněna peroxidace lipidů *in vitro* probíhající za stejných podmínek bez přítomnosti EDTA z obrázku 16 (str. 46). Zobrazené křivky představují rozdíl koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku chloroplastů. V přítomnosti EDTA se obsah MDA zvýšil ve 2. h inkubace 3,3x a do 24. h inkubace docházelo k jeho pozvolnému snižování. Bez přítomnosti EDTA se obsah MDA ve 2. h inkubace zvýšil 2x a v průběhu inkubace docházelo k jeho výraznějšímu snižování. V dalších pokusech byl použit fosfátový pufr pH 6,5 s 1 μ M EDTA; jelikož v této kombinaci došlo k pozvolnějšímu snižování obsahu MDA.

5.1.5 Vliv podmínek kultivace rostlin

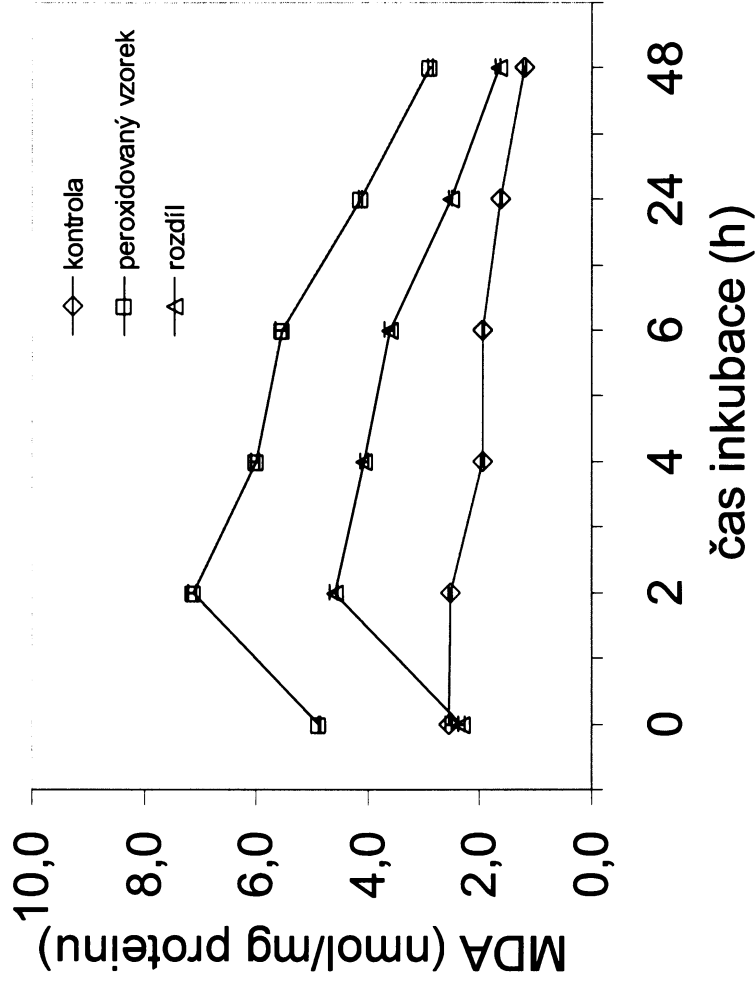
V tomto pokusu byly srovnány *in vitro* peroxidace chloroplastů izolovaných z primárních listů pěstovaných při dvou různých podmínkách: a) při ozáření 90-140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě 21,5 °C a b) při ozáření 30-70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě 25 °C. Primární listy pěstované při ozáření 90-140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě 21,5 °C začínaly žloutnout v 30 dní starých listech a dožívaly se 60 dnů; zatímco primární listy pěstované při ozáření 30-70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě 25 °C začínaly žloutnout v 90 dní starých listech a dožívaly se 120 dnů. Chloroplasty z primárních listů obou typů kultivace byly inkubovány za stejných podmínek jako v kap. 5.1.2 (str. 42). Časový průběh *in vitro* peroxidace chloroplastů z listů pěstovaných při ozáření 90-140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě 21,5 °C popisuje obrázek 20 (str. 50). Zobrazená křivka představuje rozdíl koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku chloroplastů. Časový průběh peroxidace chloroplastů z listů pěstovaných při standardní ozáření 30-70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a standardní teplotě 25 °C popisuje obrázek 16 (str. 46). Při ozáření 30-70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě 25 °C vzrostl obsah MDA nejvíce v 6. h inkubace 4,3x a dále se snižoval. Při standardních podmínkách kultivace vzrostl obsah MDA nejvíce ve 2. h inkubace 2,0x. K dalším pokusům byly fazole pěstovány nadále při ozáření 30-70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě 25 °C.



Obr. 15 – Vliv koncentrace Fe^{2+} a AsA na obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolu během peroxidace *in vitro*

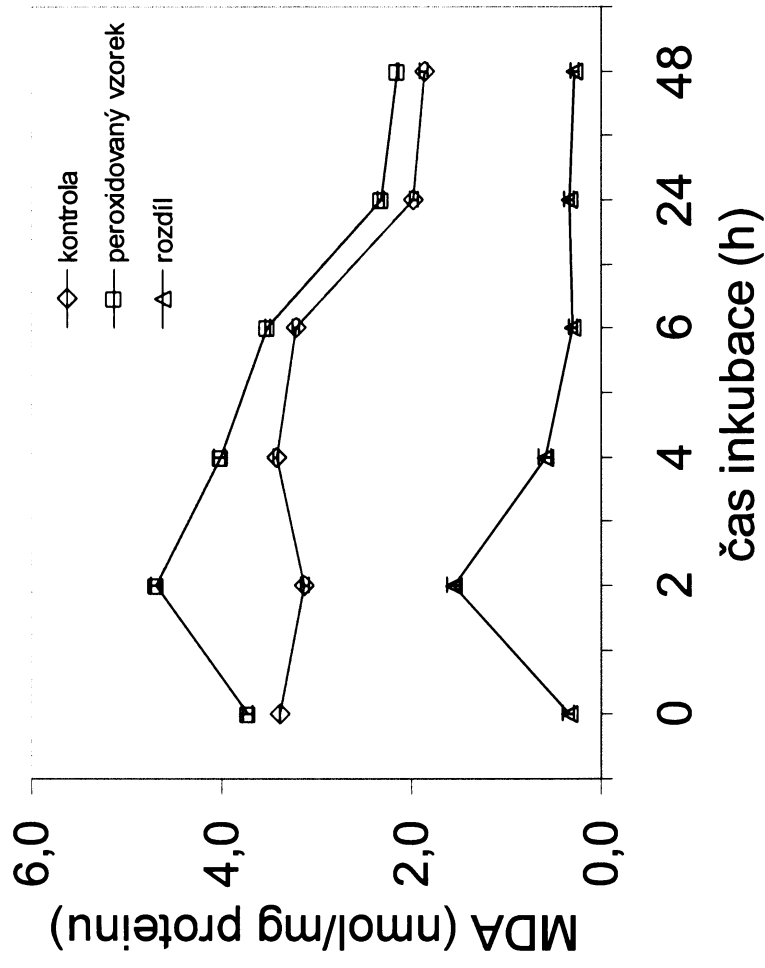
Zobrazené hodnoty představují rozdíly koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba.

Podmínky inkubace: primární listy dekapitovaného fazolu 16 dní staré; fosfátový pufr pH 6,5; 37 °C.

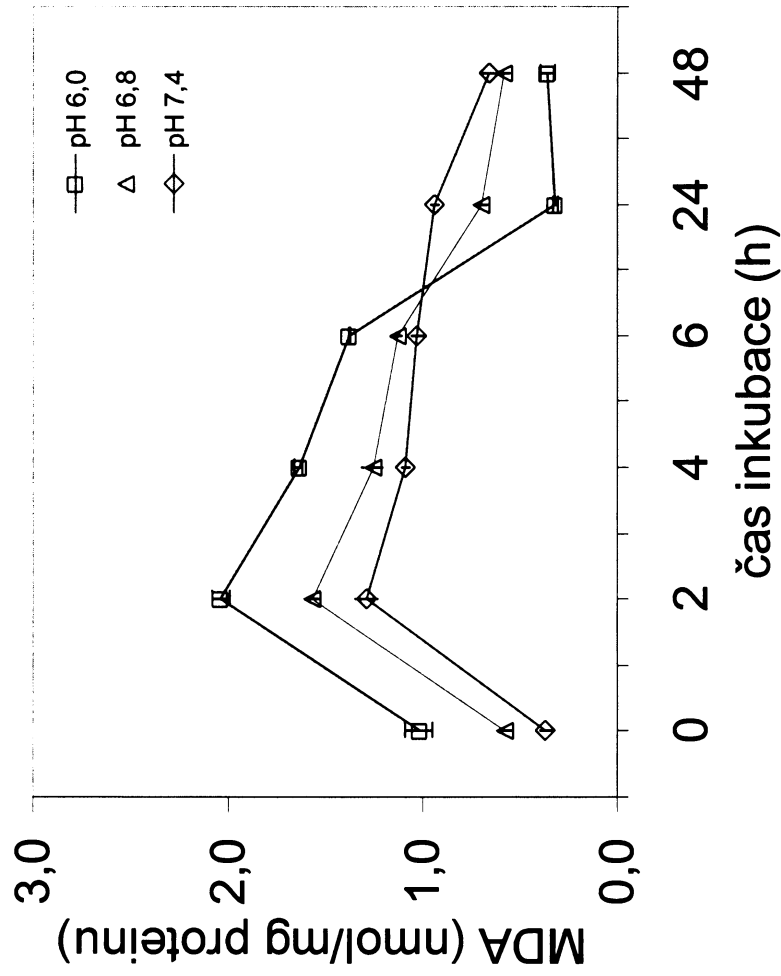


Obr. 16 – Obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolu izolovaných z 16 dní starých listů během peroxidace *in vitro*
 Zobrazené hodnoty jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba.

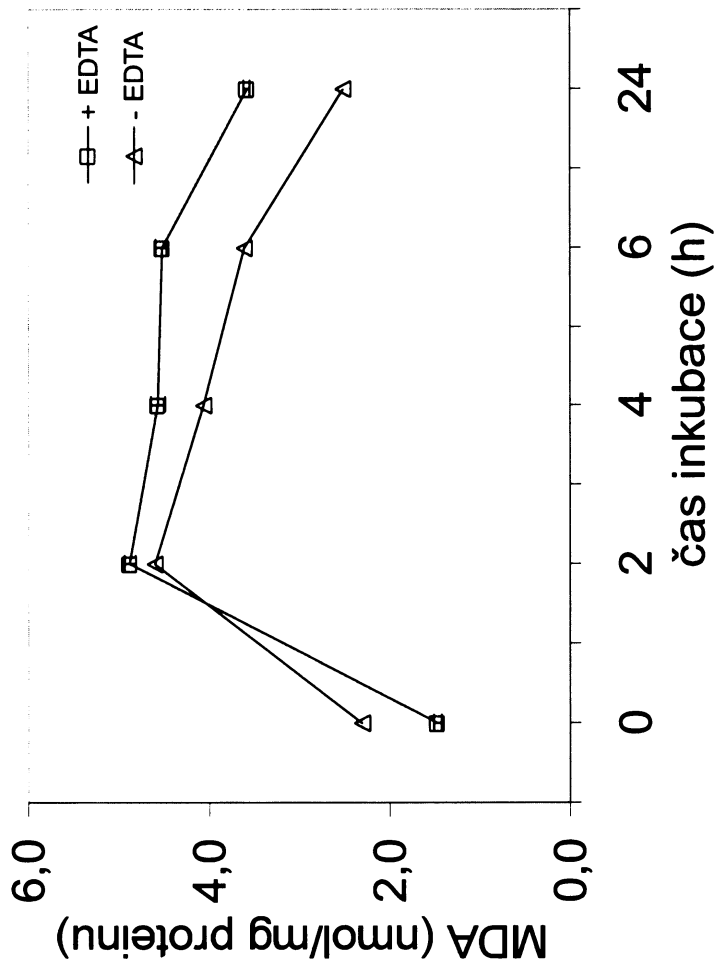
Podmínky inkubace: primární listy dekapitovaného fazolu 16 dní staré; fosfátový pufr pH 6,5; 0,3 mM Fe²⁺; 0,3 mM AsA; 37 °C.



Obr. 17 – Obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolů izolovaných z 36 dní starých listů během peroxidace *in vitro*
 Zobrazené hodnoty jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba. Podmínky inkubace byly stejné jako pro obrázek 16 (str. 46).

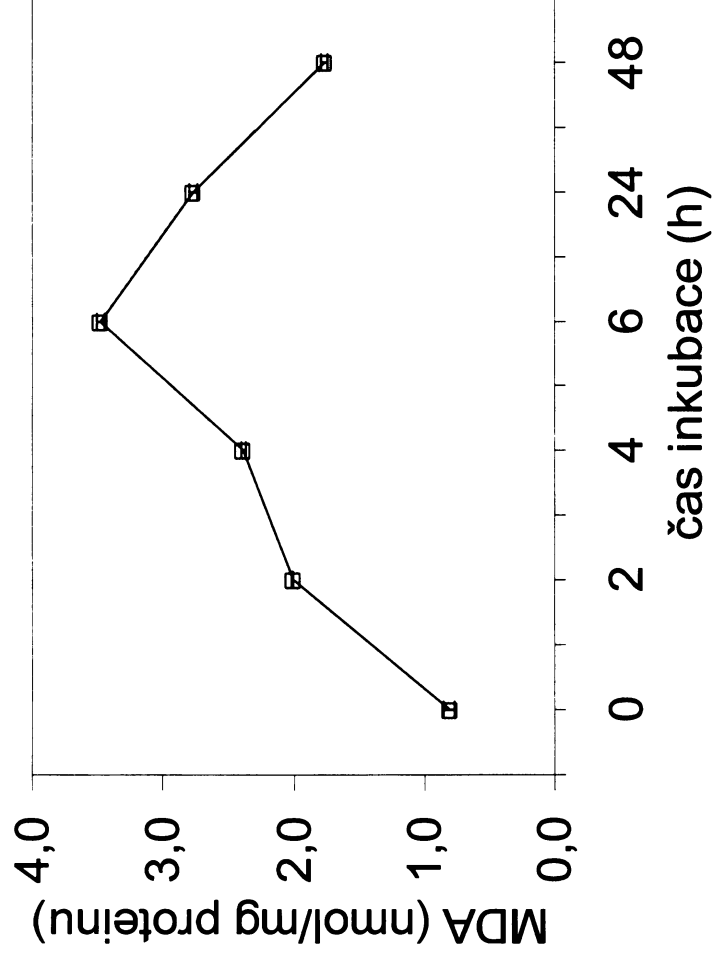


Obr. 18 – Vliv citrátového pufru a jeho pH na obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolu během peroxidace *in vitro*
 Zobrazené hodnoty představující rozdíl koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba.
 Podmínky inkubace byly stejné jako pro obrázek 16 (str. 46).



Obr. 19 – Vliv přítomnosti EDTA na obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolu během peroxidace *in vitro* ve fosfátovém pufru pH 6,5

Zobrazené hodnoty představující rozdíl koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba. Podmínky inkubace byly stejné jako pro obrázek 16 (str. 46).



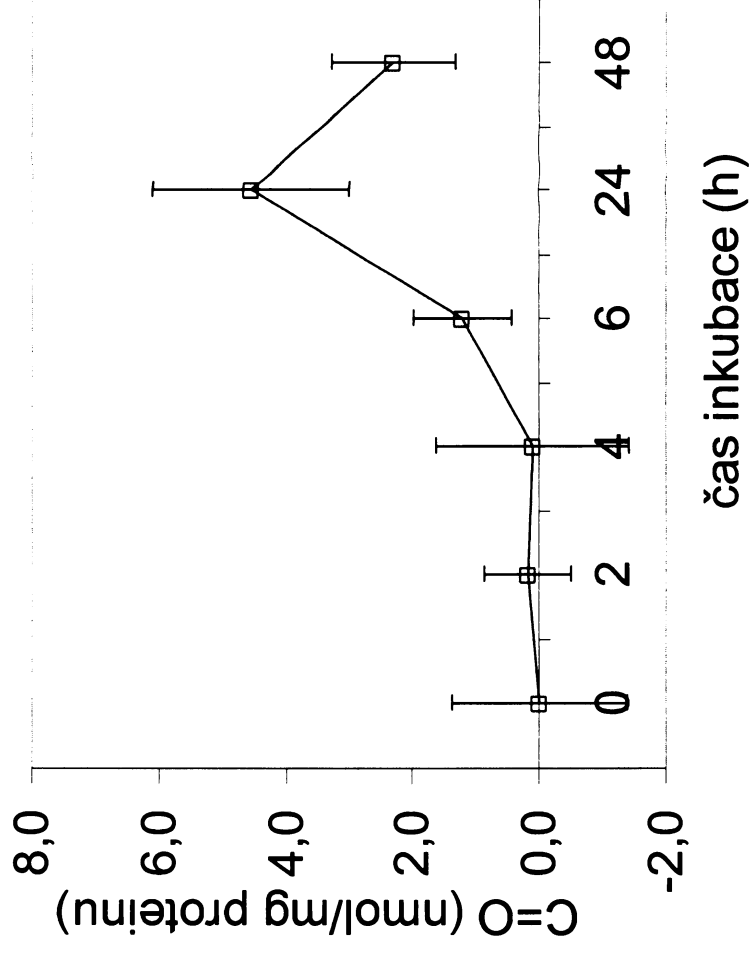
Obr. 20 – Obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolu pěstovaného při ozáření 90-140 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě 21,5 °C během peroxidace *in vitro*

Zobrazené hodnoty představující rozdíl koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba. Podmínky inkubace byly stejné jako pro obrázek 16 (str. 46).

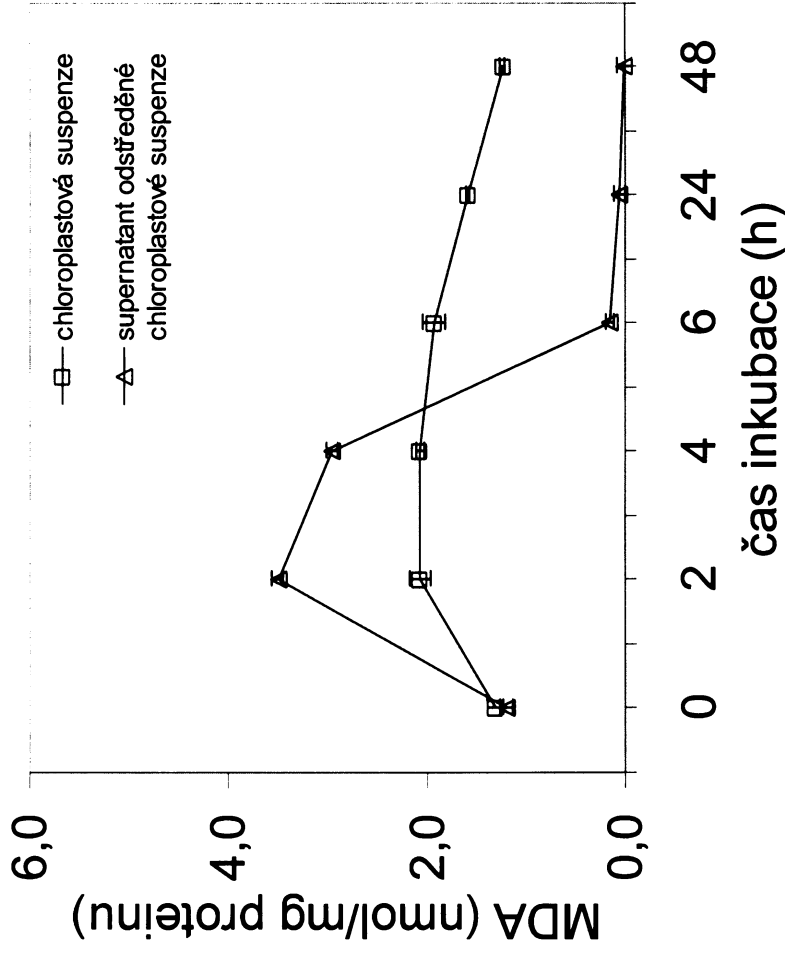
5.2 Vliv peroxidace in vitro na obsah oxidačně poškozených proteinů v thylakoidních membránách fazolu

V chloroplastové suspenzi izolované postupem uvedeným v kapitole 4.2 (str. 33) a peroxidované postupem uvedeným v kapitole 4.4 (str. 36) bylo sledováno, k jakým změnám v obsahu oxidačně poškozených proteinů dochází během peroxidace *in vitro*. Koncentrace C=O v proteinech je vztažena na celkové množství proteinů v thylakoidních membránách.

Chloroplasty byly inkubovány ve fosfátovém pufru pH 6,5 s 0,3 mM Fe²⁺; 0,3 mM AsA a 1 μM EDTA při 25 °C. Obsah oxidačně poškozených proteinů během peroxidace *in vitro* znázorňuje obrázek 21 (str. 52). Do 4. h inkubace nebyly v oxidačním poškození proteinů zaznamenány žádné statisticky průkazné změny. V 6. h inkubace vzrostl obsah C=O v proteinech na 1,2 nmol/mg proteinu. Maximálního nárůstu bylo dosaženo v 24. h inkubace, kdy se obsah C=O v proteinech zvýšil na 4,5 nmol/mg proteinu. V 48. h inkubace došlo k jeho snížení na 2,3 nmol/mg proteinu. K ověření iniciace peroxidace *in vitro* byl ve stejném vzorku chloroplastů paralelně stanoven obsah MDA jak v izolovaných chloroplastech, tak ve frakci po vysrážení proteinů (obr. 22, str. 53). V izolovaných chloroplastech bylo potvrzena maximální hladina MDA ve 2. h inkubace. Podobný výsledek byl zjištěn i pro supernatant odstředěných chloroplastů s 40% TCA připravený postupem uvedeným v kapitole 4.6.1 (str. 39).



Obr. 21 – Vliv peroxidace *in vitro* na obsah oxidačně poškozených proteinů vyjádřený jako obsah C=O v thylakoidních membránách fazolu
 Zobrazené hodnoty představují rozdíl koncentrace C=O v peroxidovaném a v kontrolním vzorku jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba.
Podmínky inkubace: primární listy dekapitovaného fazolu 16 dní staré; fosfátový pufr pH 6,5; 0,3 mM Fe²⁺; 0,3 mM AsA; 1 μM EDTA; 25 °C.



Obr. 22 – Vliv peroxidace *in vitro* na obsah oxidačně poškozených lipidů vyjádřený jako obsah MDA v thylakoidních membránách fazolu
 Zobrazené hodnoty představující rozdíl koncentrace MDA v peroxidovaném a v kontrolním vzorku jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba.
 Podmínky inkubace byly stejné jako pro obrázek 21 (str. 52).

5.3 Vliv stárnutí na obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolu

Z chloroplastové suspenze izolované postupem uvedeným v kapitole 4.2 (str. 33) byla získána postupem uvedeným v kapitole 4.6.1. (str. 39) frakce sražených proteinů. V supernatantu odstředěných chloroplastů s 40% TCA jsme zjišťovaly, jak se mění obsah oxidačně poškozených lipidů během stárnutí a senescence listů. K pokusům byly použity primární listy nedekapitovaného fazolu. Ty jsme zvolily na rozdíl od předešlých studií *in vitro*, protože dosahovaly 3x kratší doby života vůči primárním listům dekapitovaného fazolu. Senescence se začala projevovat v těchto listech 30 dní starých v souvislosti s přechodem fazolu do fáze kvetení a listy se dožívaly 42 dnů. Listy během stárnutí ztrácely pevnost a pružnost, byly světlejší, postupně žloutly a sesychaly. Koncentrace MDA je vztažena na celkové množství proteinů v thylakoidních membránách.

Časový průběh peroxidace lipidů *in vivo* v thylakoidních membránách fazolu během stárnutí znázorňuje obrázek 23 (str. 56). Vybrány byly reprezentativní výsledky jedné ze dvou nezávisle opakovaných pokusných sérií. Obsah MDA se během stárnutí snižoval. K nejvýraznějšímu poklesu došlo mezi 15.-20. dnem, kdy se obsah MDA snížil 1,5x. Celkově se obsah MDA v thylakoidních membránách stárnoucích primárních listů fazolu snížil 2,5x.

5.4 Vliv stárnutí na obsah proteinů v thylakoidních membránách fazolu

Syntéza proteinů a jejich metabolický obrát je parametr charakterizující vývoj listu. Úbytek obsahu proteinů se používá jako indikátor senescence nebo působení stresu. V chloroplastové suspenzi izolované postupem uvedeným v kapitole 4.2 (str. 33) bylo paralelně se stanovením obsahu MDA zjištěno, k jakým změnám v obsahu membránových proteinů dochází během stárnutí. Koncentrace membránových proteinů je vztažena na čerstvou hmotnost listů.

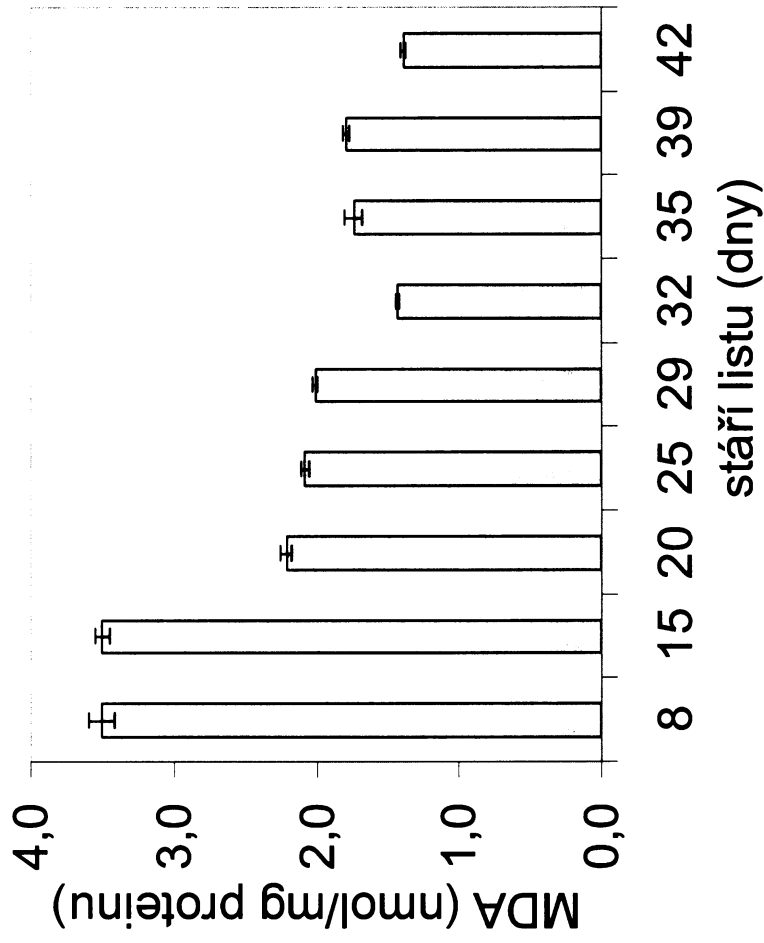
Vliv stárnutí na obsah proteinů v thylakoidních membránách fazolu popisuje obrázek 24 (str. 57). Vybrány byly reprezentativní výsledky jedné ze dvou nezávisle opakovaných pokusných sérií. Obsah membránových proteinů se do 29. dne pravidelně přibližně 1,5x snižoval. Celkově se obsah membránových proteinů v 29. dni snížil vůči počáteční hodnotě

3x. Poté se obsah membránových proteinů s věkem mírně zvyšoval a ustálil se na hladině membránových proteinů odpovídající 20 dní starému listu.

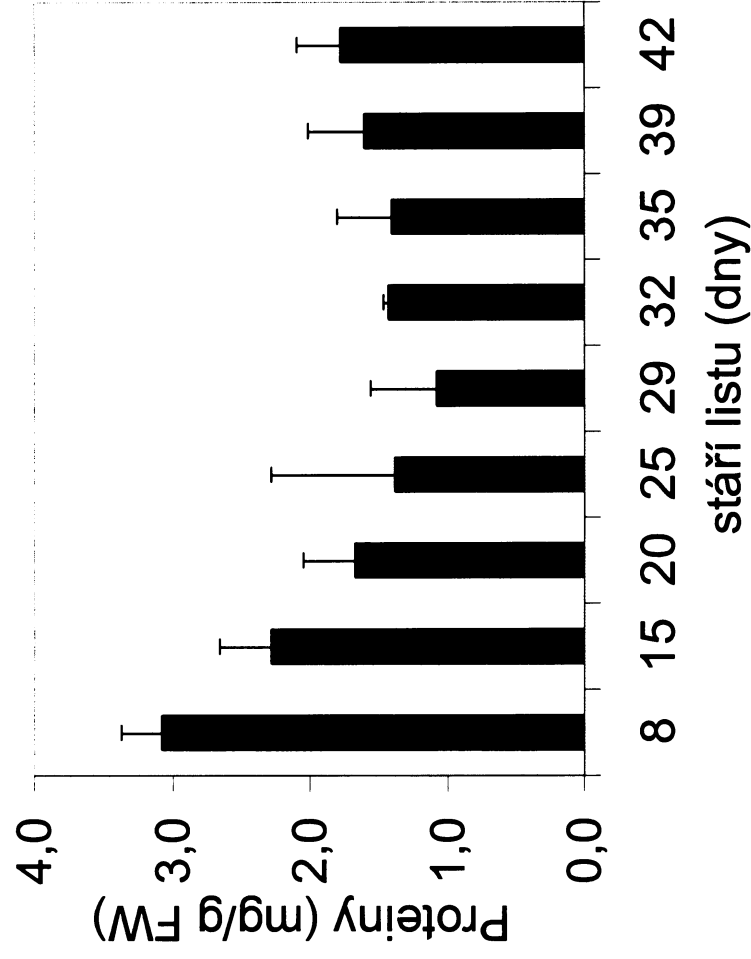
5.5 Vliv stárnutí na obsah oxidačně poškozených proteinů v thylakoidních membránách fazolu

V chloroplastové suspenzi izolované postupem uvedeným v kapitole 4.2 (str. 33) bylo paralelně se stanovením obsahu MDA a membránových proteinů zjištěno, k jakým změnám v oxidačním poškození proteinů dochází během stárnutí. Koncentrace C=O je vztažena na celkové množství membránových proteinů.

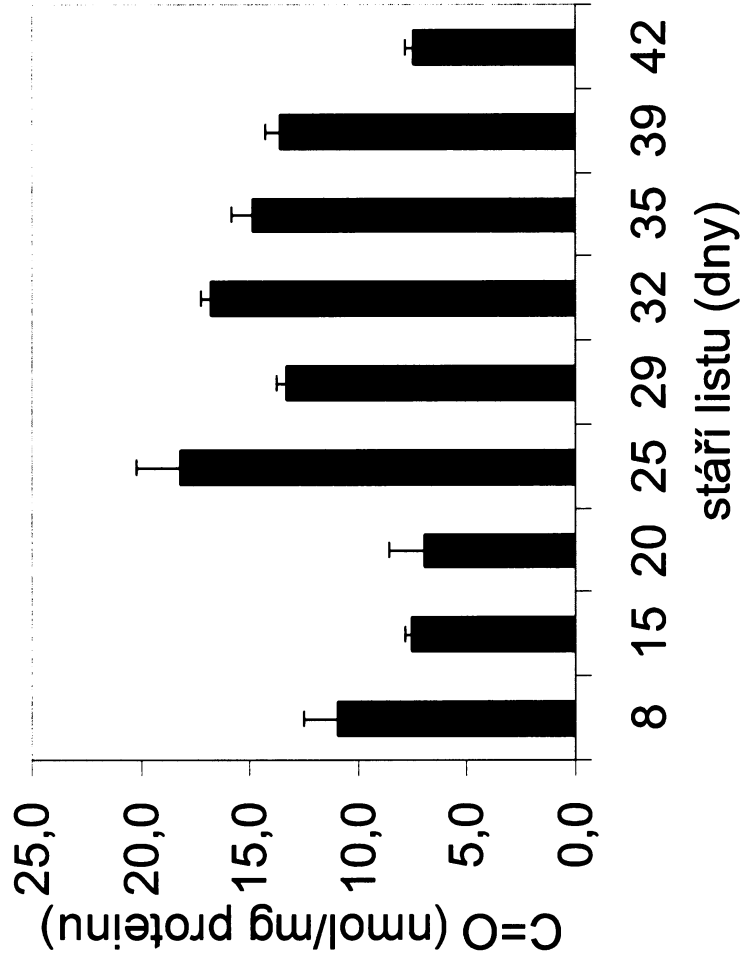
Časový průběh oxidace proteinů *in vivo* v thylakoidních membránách fazolu během stárnutí znázorňuje obrázek 25 (str. 58). Vybrány byly reprezentativní výsledky jedné ze dvou nezávisle opakovaných pokusných sérií. Do 20. dne obsah C=O v proteinech klesal. Maxima bylo dosaženo v 25. dni, kdy se obsah C=O v proteinech zvýšil 2,6x vůči hladině odpovídající 20 dní starému listu. Poté se obsah C=O v proteinech mírně snižoval a ustálil se na hladině odpovídající 15 dní starému listu.



Obr. 23 – Vliv stárnutí na obsah oxidačně poškozených lipidů v thylakoidních membránách fazolu
 Zobrazené hodnoty jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba.



Obr. 24 – Vliv stárnutí na obsah proteinů v thylakoidních membránách fazolu
 Zobrazené hodnoty jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba.



Obr. 25 – Vliv stárnutí na obsah oxidačně poškozených proteinů v thylakoidních membránách fazolu
 Zobrazené hodnoty jsou průměrem ze tří měření +/- střední chyba.

6. DISKUZE

Peroxidace *in vitro* představuje model studia metabolismu ROS a oxidačně modifikovaných molekul v různých kompartmentech rostlinných a živočišných buněk, jejíž molekulární mechanismus není doposud přesně znám. Většina studií peroxidace *in vitro* byla vypracována na živočišných modelech a zabývá se studiem peroxidace lipidů. Zajímalo nás tedy vypracovat studii peroxidace *in vitro* v rostlinách, která by se věnovala oxidačnímu poškození jak lipidů, tak proteinů. Jelikož bylo prokázáno, že na stárnutí živočichů a rostlin se podílejí ROS, zajímalo nás studovat peroxidaci *in vitro* a porovnat ji s peroxidací *in vivo*. Iniciovali jsme proto v chloroplastech izolovaných z mladých primárních listů fazolu peroxidaci *in vitro* v systému s přítomností Fe^{2+} a AsA a současně jsme sledovali peroxidaci chloroplastů z primárních listů fazolu *in vivo* během přirozeného stárnutí.

Jelikož detekce ROS je kvůli jejich krátkému poločasu života velmi obtížná, množství ROS bylo měřeno nepřímo stanovením obsahu oxidačně modifikovaných makromolekul. Peroxidace lipidů byla měřena thiobarbiturovým testem a určována z derivačních UV spekter. Oxidační poškození proteinů bylo měřeno jako koncentrace dinitrofenylhydrazonu vznikajícího při vazbě DNPH na karbonylové skupiny v proteinech, které jsou indikátorem oxidace proteinů.

Peroxidace in vitro

ROS nepůsobily při peroxidaci *in vitro* na různé složky thylakoidních membrán fazolu současně. Nejprve došlo k peroxidaci lipidů a posléze k oxidaci proteinů. Po dosažení maximální hladiny MDA docházelo ke snižování jeho obsahu. Studie [4; 49] potvrzují, že MDA reaguje s aminoskupinami proteinů za vzniku konečných fluorescenčních produktů LFP. Peroxidaci lipidů v thylakoidních membránách fazolu se nám bohužel nepodařilo ověřit stanovením obsahu konjugovaných dienů z derivačních UV spekter. Důvodem byla nereprodukovatelnost této metody způsobená pravděpodobně přítomností interferujících složek, které nebyly s dostatečnou účinností odseparovány.

Ve studiích vypracovaných na živočišných modelech a špenátu byl k iniciaci peroxidace *in vitro* použit poměr koncentrace Fe^{2+} a AsA 1:5-1:1000 [36; 57; 63-65].

V této práci se peroxidaci *in vitro* v thylakoidních membránách fazolu podařilo iniciovat již při poměru koncentrace Fe^{2+} a AsA 1:1.

Chloroplasty z mladých listů fazolu byly náchylnější k indukci peroxidace lipidů *in vitro* než chloroplasty z dospělých listů. To bylo dáno jednak tím, že koncentrace MDA v kontrolním vzorku chloroplastů z dospělých listů dosahovala až dvojnásobku koncentrace MDA v kontrolním vzorku chloroplastů z mladých listů. Jiné práce z naší laboratoře [68; 79] prokázaly, že v chloroplastech izolovaných z mladých listů nebyly dostatečně vyvinuté antioxidační mechanismy, kterými by se bránily působení ROS. Lze usuzovat, že v chloroplastech z dospělých listů byla kapacita antioxidačních sloučenin na dostatečně výši, což se projevilo nižším nárůstem koncentrace MDA v peroxidovaném vzorku chloroplastů. V kontrolním vzorku chloroplastů docházelo během peroxidace *in vitro* ke snižování obsahu MDA. Vysvětlením by mohl být vznik LOOH při izolaci chloroplastů během homogenizace listů, které se mohou rozpadat na MDA a další sekundární produkty peroxidace lipidů. Snižování obsahu MDA mohlo probíhat v důsledku rychlejší reakce MDA s dalšími složkami chloroplastů.

Během peroxidace *in vitro* probíhající ve fosfátovém pufru bylo zjištěno, že dochází k výraznému snižování obsahu MDA, který dokonce po 48 h peroxidace klesl pod počáteční hodnotu. Příčinou bylo pravděpodobně snižování obsahu Fe^{2+} vlivem srážení Fe^{3+} s fosfáty. Tomuto jevu zabránila chelatice Fe^{2+} kyselinou citronovou v citrátovém pufru nebo přítomnost EDTA ve fosfátovém pufru [80]. Výsledkem bylo pozvolnější snižování obsahu MDA, který neklesl pod počáteční hodnotu.

Ukázalo se, že ozáření při kultivaci fazolu ovlivňuje iniciaci senescence a délku života primárních listů dekapitovaného fazolu. Při 2-3x vyšší ozáření byla doba života primárních listů zkrácena až o 50%. Peroxidace lipidů *in vitro* měla při rozdílné ozáření odlišný průběh, což bylo pravděpodobně způsobeno rozdílným složením PUFA v thylakoidních membránách fazolu.

Rovněž v případě oxidačně poškozených proteinů došlo po dosažení maximální hladiny ke snížení jejich obsahu v chloroplastech fazolu. Jelikož nárůst karbonylace membránových proteinů probíhal současně s úbytkem MDA, lze usuzovat, že na nárůstu obsahu $\text{C}=\text{O}$ v proteinech se podílela reakce MDA s aminoskupinami proteinů [50]. Úbytek oxidačně modifikovaných proteinů mohl být způsoben selektivním proteolytickým odbouráváním vlivem proteas asociovaných na thylakoidních membránách. Odbourávání

oxidačně modifikovaných proteinů vlivem proteas bylo potvrzeno v chloroplastech, vakuolách, mikrosomech, mitochondriích i cytosolu [56; 81].

Peroxidace in vivo

Stárnutí živočichů a rostlin je podle radikálové teorie stárnutí doprovázeno akumulací ROS. Důkazem pro tuto teorii je zvyšující se peroxidace lipidů u stárnoucích živočichů a rostlin [32; 36-40]. V této práci bylo v thylakoidních membránách fazolu zjištěno, že peroxidace lipidů byla nejvyšší v chloroplastech izolovaných z mladých listů. Během přirozeného stárnutí peroxidace lipidů nevzrůstala, ale byla udržována na přibližně stejné úrovni. V oxidačním poškození lipidů nebyly zjištěny změny spojené výhradně se senescencí. V tom se chloroplasty liší od celých listů, kde je pozorován nárůst oxidačního poškození s věkem [40]. Zdá se, že v chloroplastech z mladých listů fazolu nebyly zpočátku vyvinuté antioxidační mechanismy, kterými by se bránily působení ROS. Vysokou produkci ROS rovněž může vysvětlovat vysoký obrat v metabolismu v počáteční fázi vývoje fazolu. Lze usuzovat, že v chloroplastech z dospělých listů došlo k syntéze antioxidačních sloučenin a díky funkčním antioxidačním mechanismům chloroplasty zůstaly během stárnutí a senescence listů nezasázeny vlivem ROS, čímž mohly plnit svou funkci až do úplného konce. Naše výsledky jsou v souladu se studií [60], ve které nebylo peroxidace lipidů v lipofilních extraktech fazolu dosaženo ani po 6 h fotochemicky indukované peroxidace v důsledku vysoké odolnosti membrán vůči působení ROS. Další výsledky z naší laboratoře potvrzují, že aktivita antioxidačních enzymů v chloroplastech senescentních listů tabáku zůstává vysoká i během pokročilé fáze senescence [79]. Zdá se, že chloroplasty jsou před oxidačním poškozením chráněny lépe než jiné buněčné kompartmenty a udržují si vyšší antioxidační kapacitu. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že vysoká antioxidační ochrana v pokročilé fázi senescence listů souvisí se snahou rostliny zajistit co nejefektivnější transport živin z chloroplastů do reprodukčních orgánů.

Celkový obsah cytosolických proteinů se v listech s věkem zvyšuje. Při vstupu listu do fáze senescence však dochází k jeho poklesu. Stanovení obsahu cytosolických proteinů se proto využívá jako indikátor senescence [9]. V této práci jsme se zabývali stanovením obsahu membránových proteinů. Celkový obsah membránových proteinů se v chloroplastech fazolu během stárnutí snižoval. Se vstupem listu do fáze senescence

docházelo k jeho mírnému zvyšování, což mohlo souviset se syntézou senescenčně specifických proteinů (např. proteas) či se sesycháním listů. Naše výsledky potvrzují, že senescence listů je geneticky řízený proces. Horváth ve studii [82] potvrdil, že dočasná asociace stresových proteinů na membránách zvyšuje jejich stabilitu a zajišťuje tak jejich funkci při působení stresových podmínek. Zdá se, že chloroplasty udržují obsah membránových proteinů na přibližně stejné úrovni, aby mohly rostlině zajistit zdroj energie až do úplného konce.

Co se týče oxidačního poškození proteinů, byly mezi rostlinami a živočichy zaznamenány rozdíly. U živočichů se oxidační poškození proteinů zvyšovalo s věkem [50; 54]. U rostlin nebylo oxidační poškození proteinů zdaleka tolik zkoumáno jako u živočichů. Johansson ve studii [55] zjistil, že obsah oxidačně poškozených proteinů *Arabidopsis thaliana* vzrůstal s věkem, ovšem ve fázi senescence se snižoval. Stejně výsledky byly potvrzeny v naší laboratoři v thylakoidních membránách fazolu. Senescence listu představuje poslední fázi ve vývoji listu, během níž dochází k řízenému odbourávání buněčných složek [10]. U živočichů bylo zjištěno, že oxidačně modifikované proteiny se odbourávají v proteasomu, který se při zvýšení oxidačního stresu nevratně inhibuje. Důsledkem je rychlý nárůst oxidačně modifikovaných proteinů [83]. Z našich výsledků je patrné, že v chloroplastech z mladých listů fazolu je obsah oxidačně modifikovaných proteinů nízký, což naznačuje také přítomnost specifických proteas. V chloroplastech z dospělých listů však dochází k rychlému nárůstu v obsahu oxidačně modifikovaných proteinů, což může poukazovat na inhibici proteasomového komplexu rovněž u rostlin. Ukazuje se, že vysoká hladina oxidačně modifikovaných proteinů v rostlinách je signálem pro spuštění senescence, která je příčinou řízeného selektivního odbourávání oxidačně modifikovaných proteinů [55].

Srovnání peroxidace in vitro a peroxidace in vivo

V obou typech peroxidace nepůsobily ROS na složky thylakoidních membrán současně. Během peroxidace *in vivo* ROS přednostně napadaly proteiny v chloroplastech izolovaných z dospělých listů, zatímco lipidy thylakoidních membrán byly vůči působení ROS poměrně odolné. Naopak během peroxidace *in vitro* ROS přednostně napadaly lipidy v chloroplastech izolovaných z mladých listů a teprve posléze proteiny. Peroxidace *in vitro* byla optimalizována na oxidační poškození lipidů. Otázkou tedy zůstává, zda by stejné

výsledky byly dosaženy i v případě optimalizace peroxidace *in vitro* na oxidační poškození proteinů. Ukázalo se, že studium molekulárních mechanismů stárnutí nelze studiem peroxidace *in vitro* nahradit kvůli odlišnému metabolismu sekundárních produktů peroxidace lipidů. Vysvětlením může být nízká kapacita antioxidantních systémů v *in vitro* peroxidovaných chloroplastech izolovaných z mladých listů, zatímco při peroxidaci *in vivo* během přirozeného stárnutí je kapacita antioxidantních systémů na plné výši.

Otázkou zůstává, co bylo příčinou iniciace *in vitro* peroxidace lipidů a oxidace proteinů. Byly to skutečně OH \cdot produkované Udenfriendovým systémem, nebo LO \cdot a LOO \cdot vznikající Fe $^{3+}$ katalyzovaným rozkladem LOOH, nebo kombinace všech těchto ROS? Otázkou rovněž zůstává, do jaké míry byla naše měření ovlivněna LOOH vznikajícími při homogenizaci biologického materiálu.

Předmětem dalšího studia peroxidace *in vitro* v laboratoři RNDr. Wilhelmové, CSc. bude stanovení kvalitativních a kvantitativních změn ve složení PUFA a fluorescenčních produktů LFP v thylakoidních membránách fazolu. Ke zjištění kvalitativních změn při oxidaci proteinů během peroxidace *in vitro* bude provedena imunochemická detekce C=O s protilátkou po elektroforetickém rozdělení proteinů podle velikosti a jejich přenesení na membránu.

7. ZÁVĚR

V thylakoidních membránách izolovaných z mladých primárních listů dekapitovaného fazolu jsme při peroxidaci *in vitro* iniciované Fe^{2+} a AsA zjistili nárůst jak peroxidace lipidů, tak oxidace proteinů. Nárůst karbonylace membránových proteinů probíhal současně s úbytkem MDA. Potvrdili jsme účast ROS v systému navrženém Udenfriendem.

V chloroplastech izolovaných z primárních listů nedekapitovaného fazolu jsme zjistili, že během přirozeného stárnutí vzrůstá oxidační poškození proteinů. Nárůst oxidačně modifikovaných proteinů byl signálem pro spuštění senescence, čímž došlo k jejich řízenému odbourávání. Obsah membránových proteinů a oxidačně poškozených lipidů byl v chloroplastech fazolu udržovaný na přibližně stejné úrovni. Prokázali jsme, že senescence listů fazolu je geneticky řízený proces.

Peroxidace *in vitro* se ukázala jako vhodný model ke studiu metabolismu ROS a oxidačně modifikovaných molekul. Studium molekulárních mechanismů stárnutí však nelze studiem peroxidace *in vitro* nahradit. Důvodem je odlišný metabolismus sekundárních produktů peroxidace lipidů, který je způsoben rozdílnou kapacitou antioxidačních mechanismů v obou systémech.

8. Seznam použité literatury

1. Harman D. (1956) *J. Gerontol* 2, 298
2. Vijg J. & Gossen J.A. (1993) *Biochem. Mol. Bio.* 104, 129
3. Kučera T., Horáková H. & Šonská A. (2008) *Photosynthetica* 46, 481-484
4. Srbová M., Wilhelmová N. & Wilhelm J. (2001) *Biol. Listy* 66, 203-220
5. Krupinska K., Falk J. & Humbeck K. (2003) in: *Aging of Organisms, Kluwer Academic Publishers*, pp. 55-78
6. Jing H.C., Hille J. & Dijkwel P.P. (2003) *Plant. Biol.* 5, 455-464
7. Beck E. & Scheibe R. (2003) *Physiol. Plant.* 119, 1-4
8. Yen Ch.H. & Yang Ch.H. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39, 922-927
9. Inada N. (1999) *Protoplasma* 207, 222-232
10. Weaver L., Amasino R. & Himelblau E. (1997) *Genetic Engineering* 19, 215-233
11. Lim P.O., Nam H.G. & Kim H.J. (2007) *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 115-136
12. Nam H.G. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 200-207
13. Chiba A., Ishida H., Nishizawa N.K., Makino A. & Mae T. (2003) *Plant Cell Physiol.* 44, 914-921
14. Quirino B., Noh Y.S., Himelblau E. & Amasino R. (2000) *Trends Plant. Sci.* 5, 278-282
15. Yoshida S. (2003) *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 79-84
16. Gan S. & Amasino R.M. (1997) *Plant Physiol.* 113, 313-319
17. Gan S. & Amasino R.M. (1999) *Science* 270, 1986-1988
18. Wilhelmová N., Wilhelm J., Kutík J. & Haisel D. (1997) *Photosynthetica* 34, 377-391
19. Zimmermann P. & Zentgraf U. (2005) *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10, 515-534
20. Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M. & Peč P. (2005)

Chem. Listy 99, 455-466

21. Mittler R. (2002) *Trends Plant Sci.* 7, 405-410
22. Scandalios J.G. (2002) *Trends Biochem. Sci.* 27, 483-486
23. Møller I. (2007) *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 459-481
24. Cheeseman J.M. (2006) *J. Exp. Bot.* 57, 2435-2444
25. Apel K. & Hirt H. (2004) *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399
26. Munné-Bosch S. & Alegre L. (2004) *Funct. Plant Biol.* 31, 203-216
27. Federoff N. (2006) *Ann. Bot.* 98, 289-300
28. Mahalingam R. & Federoff N. (2003) *Physiol. Plant.* 119, 56-68
29. Muijsers R.B.R., Folkerts G., Henricks P.A.J., Sadeghi-Hashjin G. & Nijkamp F.P. (1997) *Life Sci.* 60, 1833-1845
30. Lamattina L., García-Mata C., Graziano M. & Pagnussat G. (2003) *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 109-136
31. Concetta de Pinto M., De Gara L. & Tommasi F. (2002) *Plant Physiol.* 130, 698-708
32. Spiteller G. (2003) *Physiol. Plant.* 119, 5-18
33. Gutteridge J. & Halliwell B. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 129-135
34. Gardner H.W. (1995) *Hort Sci.* 30, 197-204
35. Anderson J.A. (1995) *Hort Sci.* 30, 196-197
36. Vazquez-Memije M.E., Capin R., Tolosa A. & El-Hafidi M. (2008) *Mol. Cell Biochem.* 307, 23-30
37. Alper G., Kulahcioglu G., Ozgonul M., Menten G. & Ersoz B. (1999) *Eur. Neuropsychopharmacol.* 9, 247-252
38. Munné-Bosch S. & Alegre L. (2002) *Planta* 214, 608-615
39. Du Z. & Bramlage W.J. (1995) *Hort Sci.* 30, 205-208
40. Procházková D., Sairam R.K., Srivastava G.C. & Singh D.V. (2001) *Plant Sci.* 161, 765-771

41. Berger S., Weichert H., Porzel A., Wasternack C., Kuhn H. & Feussner I. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1533, 266-276
42. Montillet J.L., Cacas J.L., Garnier L., Montané M.H., Douki T., Bessoule J.J., Polwkovska-Kowalczyk L., Maciejewska U., Agnel J.P., Vial A. & Triantaphylides C. (2004) *Plant J.* 40, 439-451
43. Chio S. & Tappel A.L. (1969) *Biochemistry* 8, 2823-2827
44. Maguire Y.P. & Haard N.F. (1975) *Nature* 258, 599-600
45. Wilhelm J. & Wilhelmová N. (1981) *Photosynthetica* 15, 55-60
46. Wilhelmová N., Domingues P.M.D.N., Srbová M., Fuksová H. & Wilhelm J. (2005) *Biol. Plant.* 20, 1-5
47. Wilhelmová N., Procházková D., Macháčková I., Vágner M., Srbová M. & Wilhelm J. (2004) *Biol. Plant.* 48, 523-529
48. Hudak K., Yao K. & Thompson J.E. (1995) *Hort Sci.* 30, 209-212
49. Chowdhury P.K., Halder M., Choudhury P.K., Kraus G.A., Desai M.J., Armstrong D.W., Casey T.A., Rasmussen M.A. & Petrich J.W. (2004) *Photochem. Photobiol.* 79, 21-25
50. Toroser D., Orr W.C. & Sohal R.S. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 418-424
51. Dean R.T., Fu S., Stocker R. & Davies M.J. (1997) *Biochem. J.* 324, 1-18
52. Foyer C.H. & Noctor G. (2005) *Plant Cell Environ.* 28, 1056-1071
53. Berlett B.S. & Stadtman E.R. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 20313-20316
54. Levine R.L. & Stadtman E.R. (2001) *Exp. Gerontol.* 36, 1495-1502
55. Johansson E., Olsson O. & Nystrom T. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 22204-22208
56. Palma J., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I. & Río L.A. (2002) *Plant Physiol. Biochem.* 40, 530
57. Upham B.L. & Jahnke L.S. (1986) *Photosynth. Res.* 8, 235-247
58. Lankin V.Z., Tikhaze A.K. & Osis Y.G. (2002) *Biochemistry (Mosc.)* 67, 566-574

59. Udenfriend S., Clark C.T., Axelrod J. & Brodie B.B. (1953) *J. Bio. Chem.* 208, 731-750
60. Ferrari-Iliou R., Darcy-Lameta A., Uliou J.P., Thu P.T., Monteiro de Paula F., Vieira Da Silva J. & Mazliak P. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1166, 48-54
61. Ohe M., Rapolu M., Mieda T., Miyagawa Y., Yabuta Y., Yoshimura K. & Shigeoka S. (2005) *Plant Sci.* 168, 1487-1493
62. Tadolini B. & Hakim G. (1996) *Free Rad. Res.* 25, 221-227
63. Gavazza M.B. & Catala A. (2004) *J. Pineal Res.* 37, 153-160
64. Das S. (2006) *Clin. Chim. Acta* 372, 202-205
65. Fisher A. & Naughton D. (2004) *Nutr. J.* 3, 1-5
66. Suh J., Zhu B. & Frei B. (2003) *Free Rad. Biol. Med.* 34, 1306-1314
67. Munné-Bosch S. & Alegre L. (2002) *FEBS Lett.* 524, 145-148
68. Procházková D. & Wilhelmová N. (2007) *Biol. Plant.* 51, 401-406
69. Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M., Denev I. & Laloi C. (2006) *Bio Essays* 28, 1091-1101
70. Reeves S.G. & Hall D.O. (1980) *Methods Enzymol.* 69, 85-94
71. Miller G.L. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254
72. Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F. & Prange R.K. (1999) *Planta* 207, 604-611
73. Gray J.I. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* 55, 539-546
74. Recknagel R.O. & Glende E.A. (1984) *Methods Enzymol.* 105, 331-337
75. Lezerovich A. (1986) *JAOCS* 63, 883-888
76. Corongiu F.P., Poli G., Dianzani M.U., Cheeseman K.H. & Slater T.F. (1986) *Chem.-Biol. Interactions* 59, 147-155-155
77. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S. & Stadtman E.R. (1990) *Methods Enzymol.* 186, 464-478
78. Frank J., Pompella A. & Biesalski H.K. (2000) *Free Rad. Biol. Med.* 29,

1096-1105

79. Procházková D., Haisel D. & Wilhelmová N. (2008) *Cell Biochem. Funct.* 26, 582-590
80. Halliwell B. & Gutteridge J.M. (1999) in: *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, pp. 64-65
81. Schaller A. (2004) *Planta* 220, 183-197
82. Horváth I., Multhoff G., Sonnleitner A. & Vigh L. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1653-1664
83. Cuervo A.M. & Dice J.F. (1998) *Front. Biosci.* 3, 25-43

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

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka