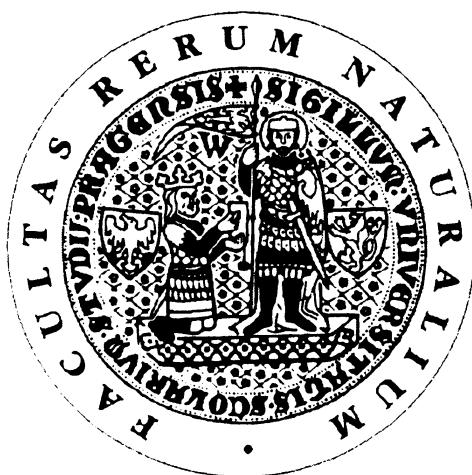


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Bakalářská práce
Praha 2008



Aktivita a množství proteinu NADP-malátdehydrogenasy
dekarboxylační v rostlinách tabáku v podmínkách
biotického stresu

Kateřina Minářů

Školitel: RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.
Konzultant: Mgr. Veronika Doubnerová

Přírodovědecká fakulta UK

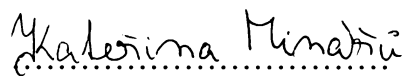
KNIHOVNA CHEMIE



3233218457

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

V Praze dne 2.6.2008


Kateřina Minářů

Touto cestou bych ráda vyjádřila poděkování své školitelce RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za rady a odborné vedení při psaní mé bakalářské práce.

Dále chci poděkovat Ing. Karlu Müllerovi za pomoc při inokulaci a odběru vzorků a úvodním seznámení s danou problematikou.

Především bych ale chtěla poděkovat Mgr. Veronice Doubnerové za její trpělivost a rady, praktické i teoretické, které mi ochotně poskytovala během celé mé práce.

Seznam použitých zkratk

| | |
|-------------------------|--|
| AMP | adenosinmonofosfát |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BSA | hovězí sérový albumin |
| C ₃ rostlina | rostlina, u které je první fotosyntetický produkt tříuhlíkatá sloučenina (3-fosfoglycerát) |
| C ₄ rostlina | rostlina, u které je první fotosyntetický produkt čtyřuhlíkatá sloučenina (oxalacetát) |
| DTT | dithiothreitol |
| EDTA | ethylendiamintetraacetát |
| g | tíhové zrychlení (g = 9,80665) |
| mRNA | informační ribonukleová kyselina |
| NAD (NADH) | nikotinamidadenindinukleotid |
| NADP (NADPH) | nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný) |
| NADP-ME | NADP dependentní malátdehydrogenasa |
| NBT | nitroblue tetrazolium chlorid |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PEP | fosfoenolpyruvát |
| PEPC | fosfoenolpyruvátkarboxylasa |
| P _i | anorganický fosfát |
| PPDK | pyruvát fosfátdikinasa |
| PVP | polyvinylpolypyrrolidin |
| PVY | Y virus brambor |
| PVY ^{NTN} | Y virus brambor kmen způsobující nekrotické změny na hlízách některých brambor |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| SR1 | kultivar Petit Havana SR1 |
| TEMED | N, N, N', N'- tetramethylethylendiamin |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. ÚVOD | 1 |
| 1.1 STRES ROSTLIN..... | 1 |
| 1.2 BIOTICKÝ STRES ROSTLIN | 2 |
| 1.3 BIOCHEMIE OBRANNÝCH REAKCÍ..... | 3 |
| 1.4 POTYVIRIDAE..... | 4 |
| 1.5 NICOTIANA TABACUM L..... | 5 |
| 1.6 PŘEHLED ROSTLINNÝCH ENZYMŮ | 5 |
| 1.6.1 FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASA (PEPC, EC 4.1.1.31)..... | 5 |
| 1.6.2 NADP-MALÁTDEHYDROGENASA (NADP-ME, EC 1.1.1.40) | 6 |
| 1.6.3 PYRUVÁT, FOSFÁTDIKINASA (PPDK, EC 2.7.9.1) | 7 |
| 2. CÍL PRÁCE | 8 |
| 3. METODY | 9 |
| 3.1 POUŽITÝ MATERIÁL..... | 9 |
| 3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE | 9 |
| 3.3 POUŽITÉ LABORATORNÍ PŘÍSTROJE..... | 10 |
| 3.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU | 10 |
| 3.4.1 PĚSTOVÁNÍ ROSTLIN TABÁKU A INOKULACE PVY ^{NTN} | 10 |
| 3.4.2 ODBĚR VZORKŮ | 10 |
| 3.4.3 PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO EXTRAKTU PRO STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ | 11 |
| 3.4.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO ELEKTROFORETICKÉ SEPARACE A PŘENOS PROTEINŮ..... | 11 |
| 3.5 METODY STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY | 11 |
| 3.5.1 STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY NADP-ME..... | 11 |
| 3.5.2 STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY PEPC | 11 |
| 3.5.3 STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY PPK..... | 12 |
| 3.6 ELEKTROFORETICKÉ METODY | 12 |
| 3.6.1 ELEKTROFORÉZA V PROSTŘEDÍ SDS..... | 12 |
| 3.6.2 NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA | 13 |
| 3.6.3 PŘENOS PROTEINŮ NA NITROCELULOISOVOU MEMBRÁNU | 13 |
| 3.7 STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN..... | 15 |
| 4. VÝSLEDKY | 16 |
| 4.1 AKTIVITA NADP-ME V PRŮBĚHU VIROVÉ INFEKCE ROSTLIN TABÁKU..... | 18 |
| 4.2 AKTIVITA PEPC V PRŮBĚHU VIROVÉ INFEKCE ROSTLIN TABÁKU..... | 19 |
| 4.3 AKTIVITA PPK V PRŮBĚHU VIROVÉ INFEKCE ROSTLIN TABÁKU..... | 21 |
| 4.4 OBSAH BÍLKOVIN V PRŮBĚHU VIROVÉ INFEKCE..... | 22 |
| 4.5 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE V PROSTŘEDÍ SDS A PŘENOS NA NITROCELULOISOVOU MEMBRÁNU | 24 |
| 4.6 NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA | 27 |
| 5. DISKUSE | 28 |
| 6. SOUHRN | 31 |
| 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 32 |

1. ÚVOD

1.1 STRES ROSTLIN

Stres rostlin je stav fyziologické zátěže organismu vyvolaný jedním nebo několika mimořádně nepříznivými vnějšími vlivy, tzv. stresovými faktory neboli stresory [1]. Ty mohou nejen zpomalovat životní funkce rostlin, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést i k jejich uhynutí. Fyziologie stresu u rostlin je daleko komplikovanější než u živočichů. Je to dáno nejen přisedlým způsobem života, který neumožňuje únik před působením stresorů, ale také tím, že u rostlin je mnohem větší mezidruhová variabilita i heterogenita vnitřního prostředí (buněk, pletiv) [2]. Proto se u rostlin vyvinuly specifické způsoby rezistence (odolnosti) proti stresovým faktorům a proti stresu.

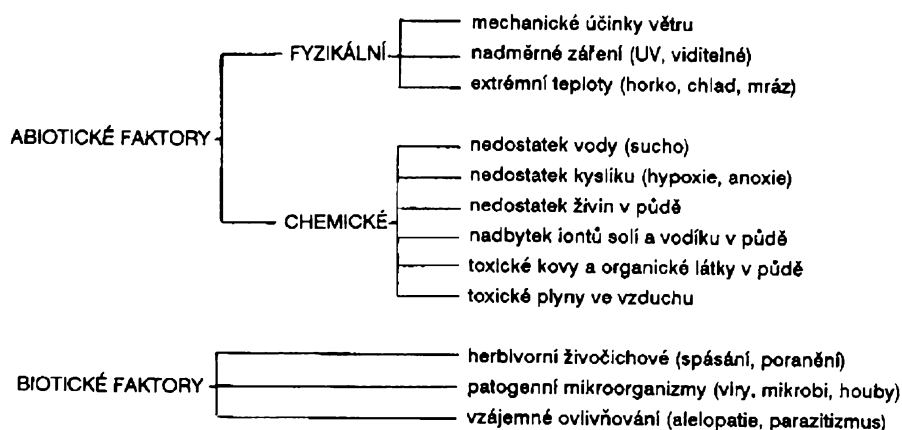
Těmito způsoby jsou :

1. Tolerance (rostlina působení stresového faktoru snáší aniž by utrpěla větší poškození)
2. Ochrana (před stresovými faktory)
3. Odstranění (nebo zmírnění následků stresu)

Každý z těchto tří způsobů rezistence může být :

- a) Konstitutivní, tzn. existující nezávisle na působení stresu
- b) Adaptivní neboli aklimatizační, tzn. jestliže se rezistence vyvíjí teprve pod vlivem stresových nebo jiných faktorů prostředí [1].

Stresové faktory jsou biotické nebo abiotické, obr. 1 (str. 2) [2].



Obr. 1 Přehled nejdůležitějších stresových faktorů, se kterými se rostliny setkávají v přírodě [2].

1.2 BIOTICKÝ STRES ROSTLIN

Rostliny se musí neustále bránit proti napadení bakteriemi , viry, houbami, živočichy a dokonce i před ostatními rostlinami [3].

Průnik patogenních organismů do buněk je ztížen pevnou buněčnou stěnou , avšak ani ta není nepřekonatelnou překážkou. Často již kontakt s patogenními organismy vyvolá celou řadu koordinovaných vnitrobuněčných procesů, jejichž cílem je eliminovat jeho působení a šíření dalších buněk. Na počátku všech obranných reakcí musí být podnět k jejich spuštění, kterým obvykle bývá specifický metabolit – elicitor – uvolňovaný při počáteční interakci buňky s patogenem a identifikovaný vhodným receptorem hostitelské rostliny [2].

Každý patogen má vyvinutou specifickou cestu napadení rostliny. Některé druhy přímo porušují povrchové vrstvy použitím mechanického tlaku nebo enzymatického napadení. Jiné procházejí skrz přírodní otvory (např. průduchy). Třetí skupina poškozují jen tkáň, které byly poraněny již dříve [3].

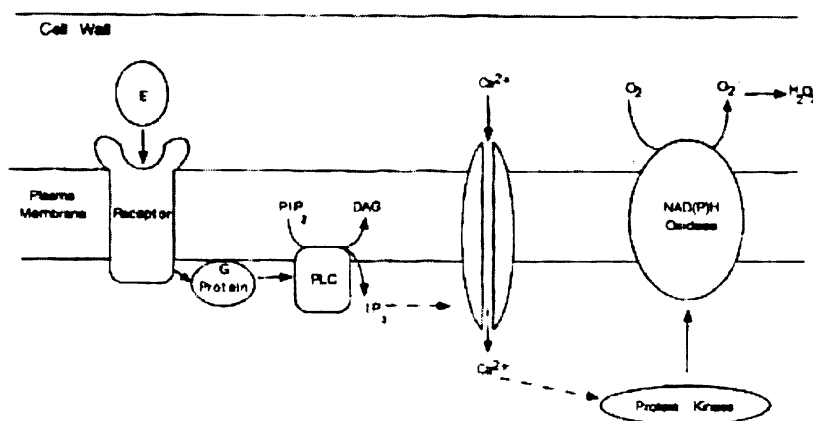
Virová infekce rostlin často ukazuje výrazné morfologické a fyziologické změny s příznaky chlorózy a nekrózy [4].

1.3 BIOCHEMIE OBRANNÝCH REAKCÍ

Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu [2]. Velmi častým a neobyčejně rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese je produkce aktivních forem kyslíku. Je to rychlá odpověď rostlinných buněk na elicitory nebo patogeny [5].

Singletový kyslík a superoxidový anion O_2^- nebo silně oxidační sloučeniny (hydroxylový radikál $OH\cdot$, peroxid vodíku H_2O_2) jsou tvořeny v některých organelách (chloroplasty, mitochondrie) a na membránových systémech a podílejí se na řadě rozmanitých pochodů [23].

Další signální molekulou je oxid dusný (NO) využívaný savci k regulaci různých biologických procesů imunitních, nervových a vaskulárních (cévních) systémů. NO posiluje účinky aktivních forem kyslíku [3].



Obr. 2 Model tvorby aktivních forem kyslíku v rostlinách. Elicitor se váže na receptor spojený s G proteinem, který stimuluje fosfolipasu C. IP₃ způsobí otevření kanálů pro Ca²⁺ ionty a zvýšení jejich intracelulární koncentrace. Aktivovaná proteinkinasa fosforyluje membránově vázanou NADPH oxidasu [5].

1.4 POTYVIRIDAE

Čeď Potyviridae je největší skupinou rostlinných virů, kterou lze dále dělit na tyto rody [13]:

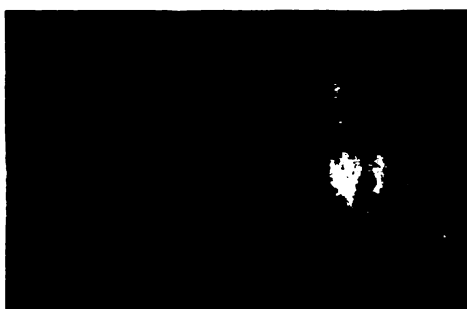
- Potyvirus
- Bymovirus
- Rymovirus
- Ipomovirus

Potyviridy jsou neobalené rostlinné viry s genetickou informací v lineární jednovláknité RNA [6]. Vyvolávají například prosvětlení žilek, chlorózy, nekrózy, kadeřavost, zakrsllost, deformace plodů, semen a listů [24].

Mezi nejtěžší virové onemocnění brambor patří PVY. Na základě příznaků, které jednotlivé kmeny PVY vyvolávají na bramborách a indikátorových rostlinách, byly tyto kmeny rozděleny do tří hlavních kmenových skupin :

- PVY⁰ – obecný kmen
- PVY^C – virus bramboru způsobující proužkovitost bramboru
- PVY^N – nekrotický kmen způsobující nekrózy žilek tabáku

Izoláty PVY^N, vyvolávající nekrotické změny též na hlízách některých odrůd brambor, byly zařazeny do skupiny nového kmene PVY^{NTN} (obr. 3) [7].

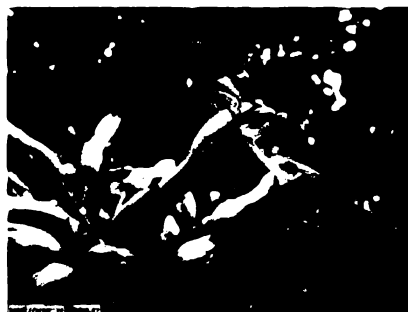


Obr. 3 Typické kruhové nekrózy na hlízách bramboru způsobené virem PVY^{NTN} [7].

1.5 NICOTIANA TABACUM L.

Nicotiana tabacum L. (obr. 4), tabák obecný (viržinský), je jednoletá (v tropech i víceletá), 80 až 300 cm vysoká, chlupatá bylina, která patří do čeledi Solanaceae - lilkovité [9].

Má listy široce kopinaté, řapík křídlatě rozšířený, květy s trubkovitými až nálevkovitými korunami, růžovými až červenými [8].



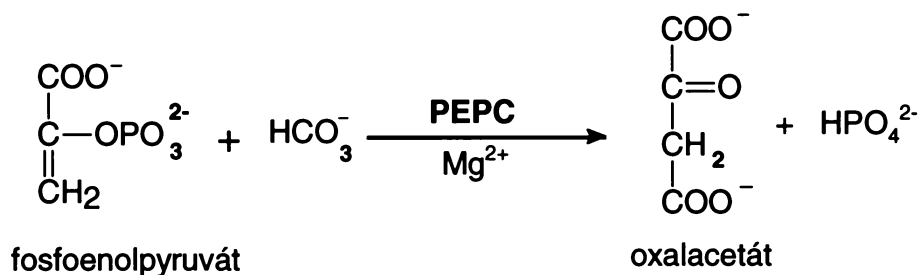
Obr. 4 *Nicotiana tabacum* L. [8], [9].

1.6 PŘEHLED ROSTLINNÝCH ENZYMŮ

1.6.1 FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASA (PEPC, EC 4.1.1.31)

Systematický název je fosfát : oxalacetát karboxylasa (fosforylační).

PEPC katalyzuje v přítomnosti HCO_3^- ireverzibilní karboxylaci fosfoenolpyruvátu (PEP) na oxalacetát a P_i s využitím Mg^{2+} nebo Mn^{2+} jako kofaktorů [14]:

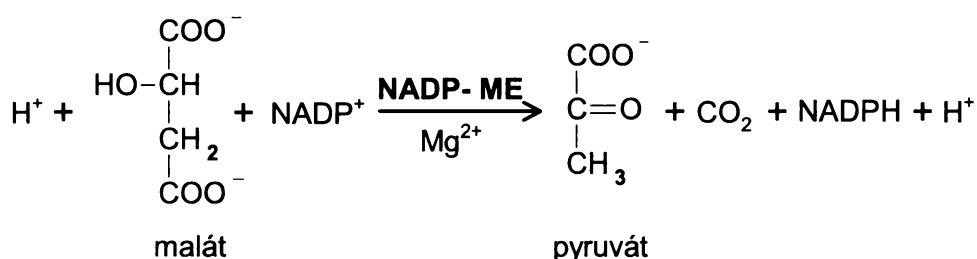


PEPC je enzym přítomný ve vyšších rostlinách, řasách, sinicích, bakteriích a prvocích, avšak nepřítomný u živočichů, hub a kvasinek [14].

1.6.2 NADP-MALÁTDEHYDROGENASA (NADP-ME, EC 1.1.1.40)

Systematický název je L-malát : NADP⁺ oxidoreduktasa.

V přítomnosti koenzymu NADP⁺ a kofaktorů Mg²⁺ nebo Mn²⁺ katalyzuje dekarboxylaci L-malátu za vzniku pyruvátu, CO₂ a NADPH [15]:



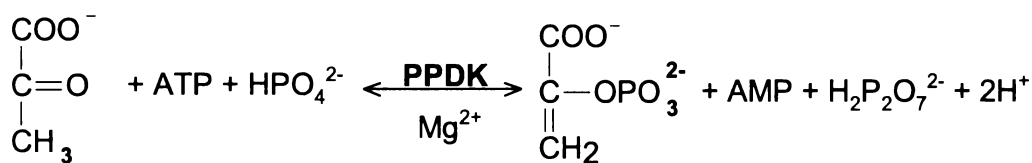
Na základě funkce a výskytu bylo klasifikováno 7 isoform :

- C₄₍₁₎ – NADP-ME je fotosyntetická isoforma chloroplastů buněk pochev cévních svazků některých C₄ rostlin.
- C₄₍₂₎ – NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP-ME nalezená v plastidech C₄ rostlin.
- C₄₍₃₎ – NADP-ME je cytosolová NADP-ME nalezená v C₄ rostlinách.
- CAM₍₁₎ – NADP-ME je fotosyntetická isoforma NADP-ME nalezená v cytosolu některých CAM rostlin.
- CAM₍₂₎ – NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP-ME nalezená v cytosolu některých CAM rostlin.
- C₃₍₁₎ – NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP-ME nalezená v cytosolu některých C₃ rostlin.
- C₃₍₂₎ – NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP-ME přítomná v plastidech některých C₃ rostlin [21].

1.6.3 PYRUVÁT, FOSFÁTDIKINASA (PPDK, EC 2.7.9.1)

Systematický název je ATP : pyruvát, fosfát fosfotransferasa.

PPDK katalyzuje reakci přeměny pyruvátu na fosfoenolpyruvát (PEP) v přítomnosti ATP a Mg^{2+} jako kofaktoru:



pyruvát

fosfoenolpyruvát

PPDK se hojně vyskytuje v listech C_4 a CAM rostlin, kde je zodpovědná za produkci PEP - primárního akceptoru CO_2 [16]. Je také přítomna v C_3 rostlinách, i když zde její funkce není dosud známá [17].

2. CÍL PRÁCE

1. Sledování vlivu infekce *Y viru bramboru*, kmene NTN (PVY^{NTN}), na aktivitu enzymů anaplerotických metabolických drah (PEPC, PPDK a NADP-ME) a množství rozpustných proteinů v listech rostlin *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 nad a pod místem inokulace.
2. Studium vlivu infekce PVY^{NTN} na expresi proteinu NADP-ME v listech tabáku metodou „Western blot“.

3. METODY

3.1 POUŽITÝ MATERIÁL

Rostlinný materiál:

Rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1- poskytnuté Ústavem experimentální botaniky AV ČR (ÚEB AV ČR)

Infekční materiál:

Y virus bramboru, kmen NTN (PVY^{NTN}) - poskytnutý RNDr. Noemi Čerovskou, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR (ÚEB AV ČR)

Protilátky:

Králičí polyklonální protilátka třídy Ig G připravená proti NADP-ME - poskytnuté Ústavem sér a očkovacích látek, ČR

3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Akrylamid, Sigma, USA

ATP, Sigma, USA

Bradfordovo činidlo, Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R 250, G 250, Sigma, USA

DTT, Sigma, USA

Fosfoenolpyruvát sodný, Sigma, USA

Kaleidoskopické standardní proteiny, Biorad, USA

L-malát sodný, Sigma, USA

NADH, Sigma, USA

NADPH, Sigma, USA

NAD⁺, Sigma, USA

Nitroblue tetrazolium chlorid, Sigma, USA

Oxaloacetát sodný, Sigma, USA

Phenazin methosulfát, Sigma, USA

Pyruvát sodný, Sigma, USA

PVP, Sigma, USA

SDS, Serva, Německo

TEMED, Serva, Německo

Tris (hydroxymethyl) aminomethan, Serva, Německo

Ostatní chemikálie, Lachema, ČR

3.3 POUŽITÉ LABORATORNÍ PŘÍSTROJE

Analytické váhy 100 A, Denver Instrument Company, USA

Centrifuga, Jetřich Universal 32 R, Německo

Elektroforetická souprava, Biometra, Německo

pH metr, Denver instrument Company, USA

Spektrofotometr Helios α , Thermo Spectronic, USA

Spektrofotometr Ultrospec 2 100, Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

3.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

3.4.1 PĚSTOVÁNÍ ROSTLIN TABÁKU A INOKULACE PVY^{NTN}

Šedesát rostlin *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana bylo pěstováno ve skleníku při přirozeném osvětlení a teplotě přes den 20 °C a v noci 18 °C. Polovinu z nich jsem očkovala virem PVY^{NTN} a druhou polovinu jsem použila jako kontrolu. Kontrolní a infikované rostliny byly pěstovány odděleně. Při očkování virem jsem listy potřela směsí vody a karbidu křemíku, aby virus mohl proniknout do rostliny.

3.4.2 ODBĚR VZORKŮ

Odebrala jsem vzorky ze 6., 10., 14. a 17. dne po inokulaci virem z listů kontrolních a infikovaných rostlin. Vzorky jsem připravila jako směsné z několika rostlin o hmotnosti 0,5 g. Vzorky jsem rozdělila podle druhu na horní a spodní listy. Po odebrání a navážení jsem je ihned zmrazila v tekutém dusíku a poté uchovávala v mrazícím boxu při - 80 °C.

3.4.3 PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO EXTRAKTU PRO STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ

Vzorek (0,5 g) jsem homogenizovala ve třecí misce s 1,5 ml extrakčního pufru A, který obsahoval 100 mM Tris HCl (pH = 7,8), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 20 % (v/v) glycerolu. K 1 ml zhomogenizovaného vzorku jsem přidala 0,02 g PVP a nechala centrifugovat 15 minut při 16 600 x g a 4°C.

3.4.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO ELEKTROFORETICKÉ SEPARACE A PŘENOS PROTEINŮ

Pro SDS elektroforézu se použily stejně připravené vzorky jako v 3.4.3. Rostlinné extrakty jsem smísila v poměru 1 : 1 se vzorkovým pufrem, který obsahoval 0,5 M Tris-HCl pufr pH 6,8, 100 mM DTT, 70 mM SDS, 20 % glycerol, 0,005 % bromfenolovou modř. Takto připravenou směs jsem povařila 5 minut na vodní lázni.

Pro nativní elektroforézu jsem opět použila extrakty jako v 3.4.3 a přidala 20 % (w/v) sacharosu.

3.5 METODY STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY

3.5.1 STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY NADP-ME

Aktivitu NADP-ME jsem měřila na spektrofotometru při 340 nm po dobu 5 minut v 1 ml reakční směsi. 1 ml reakční směsi obsahoval 100 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM malát; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP. Reakci takto připravené reakční směsi jsem startovala 50 µl vzorku.

3.5.2 STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY PEPC

Aktivitu PEPC jsem měřila na spektrofotometru při 340 nm po dobu 5 minut v 1 ml reakční směsi. 1 ml reakční směsi obsahoval 100 M Tris-HCl pH 8,1; 5 mM NaHCO₃; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADH; 2 mM PEP. Reakci takto připravené reakční směsi jsem iniciovala 20 µl vzorku.

3.5.3 STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY PPK

Aktivitu PPK jsem měřila na spektrofotometru při 340 nm po dobu 5 minut v 1 ml reakční směsi. 1 ml reakční směsi obsahoval 100 mM Tris-HCl pH 8,1; 10 mM MgCl₂; 5 mM NaHCO₃; 2 mM pyruvát; 1 mM ATP; 2 mM K₂HPO₄; 0,2 mM NADH. Reakci takto připravené reakční směsi jsem startovala 50 µl vzorku.

3.6 ELEKTROFORETICKÉ METODY

Elektroforéza je separační metoda, která využívá k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli. V současné době je nejrozšířenější elektroforetickou metodou tzv. gelová elektroforéza, při níž se látky rozdělují na základě pohyblivosti v gelu [10].

Při gelové elektroforéze se velké molekuly zpožďují proti malým molekulám. Běžně používaným nosičem je polyakrylamidový gel, který je inertní, mechanicky pevný a průhledný. Polyakrylamidový gel se připravuje kopolymerací dvou monomerů, akrylamidu a N,N'-metylen-bis(akrylamidu) [11].

Jako katalyzátor se nejčastěji používá N,N,N',N'-tetramethyldiamin (TEMED) [12].

3.6.1 ELEKTROFORÉZA V PROSTŘEDÍ SDS

SDS elektroforézu jsem provedla podle Laemmliho [18]. Pro gelovou elektroforézu v SDS prostředí jsem použila polyakrylamidový gel, 10 % gel jako separační a 5 % zaostřovací gel.

Separací gel obsahoval 5 ml 30% akrylamidu, 3,8 ml 1,5M Tris-HCl pufru pH 8,8, 0,15 ml 10% SDS, 0,15 ml 10% persíranu amonného, 0,006 ml TEMED a 5,9 ml destilované vody.

Zaostřovací gel jsem připravila z 0,83 ml 30% akrylamidu, 0,63 ml 1M Tris-HCl pufru pH 6,8, 0,05 ml 10% SDS, 0,05 ml 10% persíranu amonného, 0,005 ml TEMED a 3,4 ml destilované vody.

Elektrodový pufr obsahoval 18,8 g glycinu, 3 g Tris-HCl a 1 g SDS v 1000 ml destilované vody.

Počáteční napětí bylo 70 V a po dosažení rozhraní mezi gely 140 V.

3.6.2 NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA

Nativní elektroforézu jsem provedla podle Lee a Lee [19]. Pro nativní elektroforézu jsem použila polyakrylamidový gel, 6 % gel jako separační a 3 % zaostřovací gel.

Separací gel jsem připravila z 3 ml 30% akrylamidu, 3,8 ml 1,5 M Tris-HCl pufru pH 8,8, 0,15 ml 10% glycerolu, 0,15 ml 10% persíranu amonného, 0,012 ml TEMED a 7,9 ml destilované vody.

Zaostřovací gel obsahoval 0,4 ml 30% akrylamidu, 0,5 ml 1M Tris-HCl pufru pH 6,8, 0,04 ml 10% glycerolu, 0,04 ml 10% persíranu amonného, 0,008 ml TEMED a 3 ml destilované vody.

Elektrodový pufr obsahoval 18,8 g glycinu a 3 g Tris-HCl a 10 ml 10 % glycerolu v 1000 ml destilované vody. Do něj jsem před spuštěním elektroforézy přidala několik kapek Bromfenolové modře.

Počáteční napětí bylo 70 V a po dosažení rozhraní mezi gely 140 V.

3.6.3 PŘENOS PROTEINŮ NA NITROCELULOVOU MEMBRÁNU

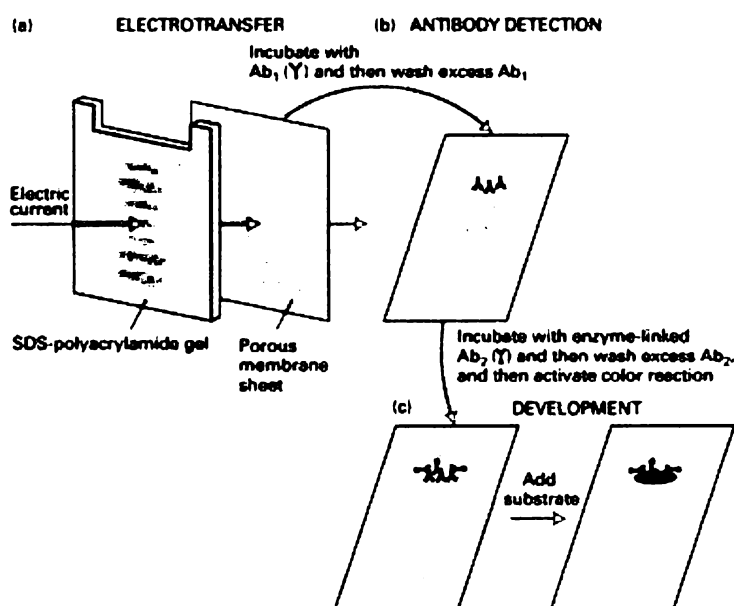
Po SDS-elektroforetické separaci v 10% separačním (a 5% zaostřovacím) polyakrylamidovém gelu jsem provedla přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu metodou Western blot. Pracovala jsem se soupravou Biometra, na kterou se postupně umístí: 5 vrstev filtračního papíru, nitrocelulosová membrána, polyakrylamidový gel a opět 5 vrstev filtračního papíru vše smočené v přenosovém pufru (25 mM Tris-HCl pH 8,3 s 150 mM glycinem a 10% (v/v) methanolem). Po uzavření soupravy a zapojení elektrického proudu 5 mA na 1 cm² membrány přenos probíhal 30 minut.

Poté následovala jedna hodina blokování v 1 % BSA v pufru PBS (pH 7,4 obsahuje 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 3 mM NaN₃) a 3x po 5 minutách promytí v PBS+0,05 % Tweenu 20 (PBS+T). Následovala specifická detekce NADP-ME pomocí králičí protilátky připravené v naší laboratoři [40], jejíž koncentrace byla 1,8 mg/ml. Inkubace v této protilátce ředěné s konjugačním pufrům (PBS+T pufr pH 7,4 s 2 % (w/v) PVP a 0,2 % BSA)

na výslednou koncentraci 5 µg/ml jsem nechala působit při 4°C v lednici přes noc. Poté jsem 3x po 5 minutách promyla pomocí PBS+T. Přidala jsem sekundární protilátku proti králičí protilátce značenou alkalickou fosfatou ředěnou 1:30000 konjugačním pufrem. Následovalo další trojnásobné promývání po 5 minutách v PBS+T.

Dále jsem nitroceluloseovou membránu nechala inkubovat v 10 ml destilované vody s rozpuštěnou tabletou NBT, dokud se neobjevily proužky. Intenzita proužků byla vyhodnocena programem Elfoman 2.0 pomocí horizontálního nastavení umístěného přes všechny vzorky najednou.

Při metodě „Western blot“ jsem použila barevné standardní proteiny (modrý myosin o relativní molekulové hmotnosti 216 000, růžová β-galaktosidasa o relativní molekulové hmotnosti 132 000, zelené BSA o relativní molekulové hmotnosti 78 000, fialová karboanhydrasa o relativní molekulové hmotnosti 45 700, oranžový soybean trypsin inhibitor o relativní molekulové hmotnosti 32 500, červený lysozym o relativní molekulové hmotnosti 18 400, modrý aprotinin o relativní molekulové hmotnosti 7 600).



Obr. 5 Western blot [22].

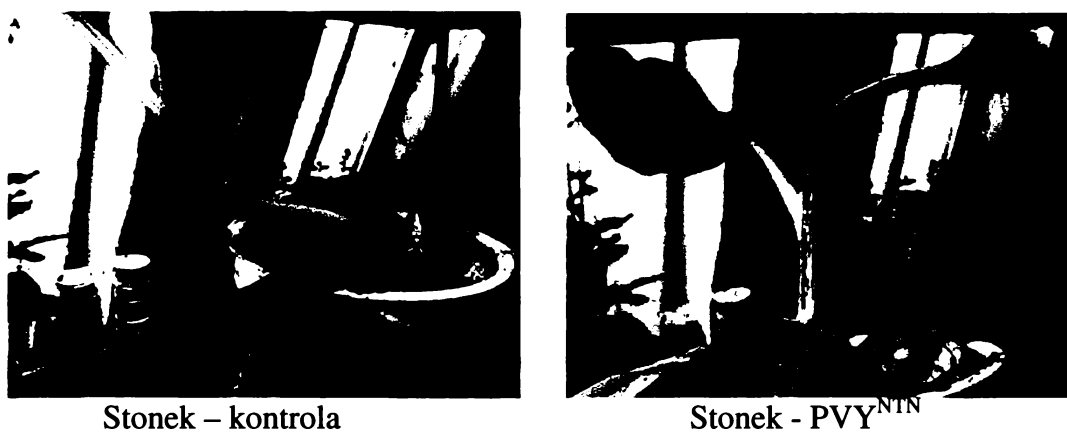
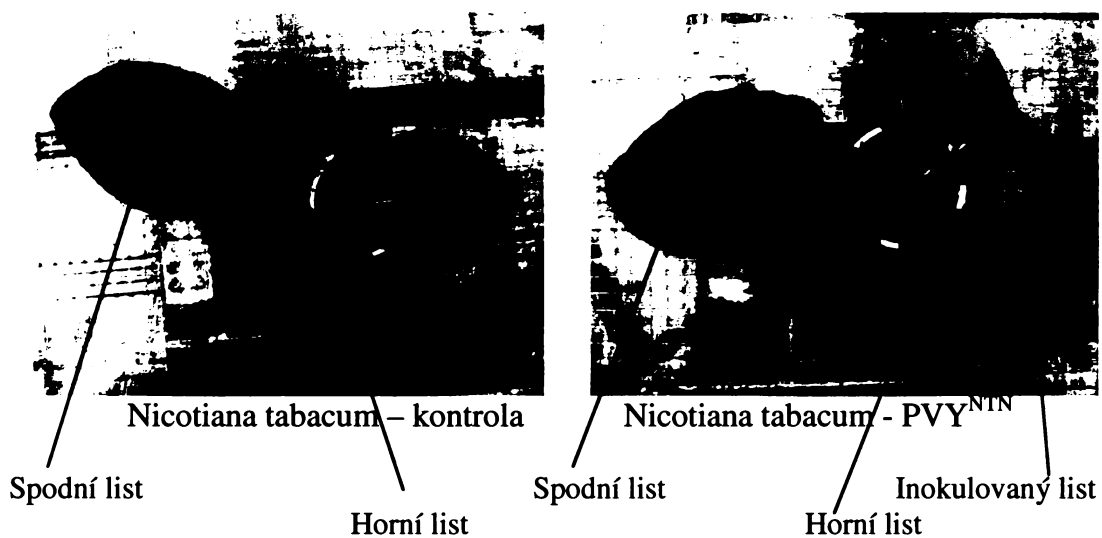
3.7 STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN

Koncentraci bílkovin jsem určila pomocí metody podle Bradfordové [20]. Je založena na změně absorpčního maxima ze 465 nm na 595 nm barvy Coomassie Brilliant Blue G 250 po vytvoření komplexu s proteinem.

K 10 μ l rostlinného extraktu jsem přidala 23,3 μ l destilované vody a 1 ml Bradfordova činidla. Takto připravenou a promíchanou směs jsem nechala 20 minut reagovat a poté jsem proti slepému vzorku (destilované vodě) měřila absorbanci při 595 nm. Jako standard jsem použila hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 1,4; 1; 0,5 a 0,25 mg/ml.

4.VÝSLEDKY

Experimentální rostliny tabáku byly inokulovány *Y virem bramboru* (PVY^{NTN}). V průběhu virové infekce byly odebírány vzorky horních a spodních listů, které byly infikované systémově. To znamená, že virus se do těchto listů dostal vodivými pletivy. Současně byly odebírány vzorky z kontrolních, neinfikovaných rostlin tabáku. Na obr. 6 str. 17 jsou viditelné rozdíly ve zdravých a infikovaných rostlinách. Ze vzorků listů byly připraveny extrakty postupem uvedeným v kapitole 3.4.3 a změřena aktivita NADP-ME, PEPC a PPDK (podle kapitol 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3). Aktivita enzymů byla vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.



Obr. 6 Srovnání příznaků způsobených virem PVY^{NTN} na rostlinách *Nicotina tabacum* L. a na jejich stoncích, které se projevují čtnými nekrosami.

4.1 AKTIVITA NADP-ME V PRŮBĚHU VIROVÉ INFEKCE ROSTLIN TABÁKU

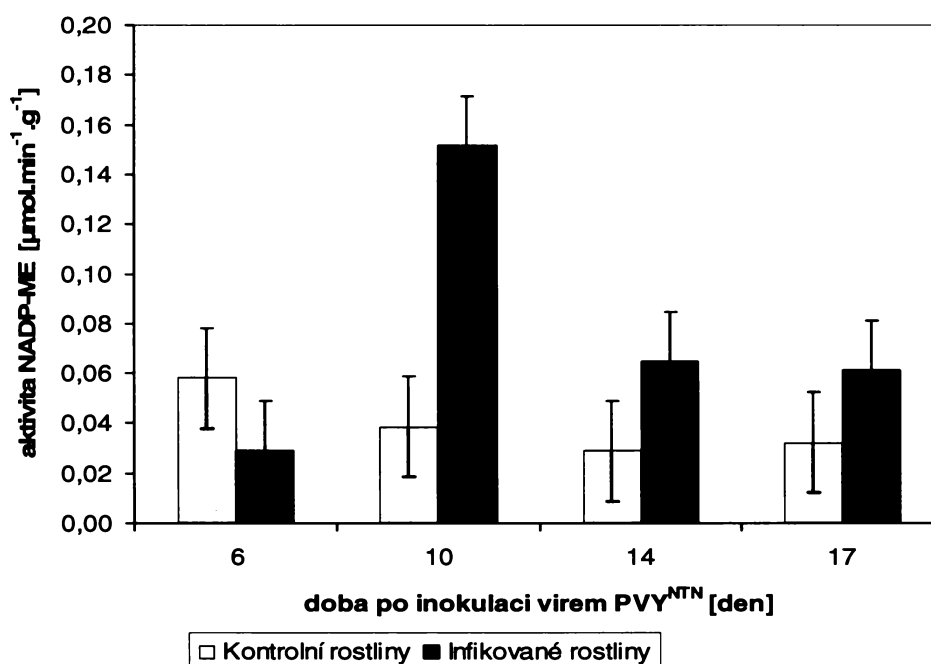
Aktivita NADP-ME v 6., 10., 14. a 17. dni po inokulaci rostlin tabáku zjištěná v horních a spodních listech je uvedena na obrázku 7 a 8 (str. 18, 19).

Výsledky

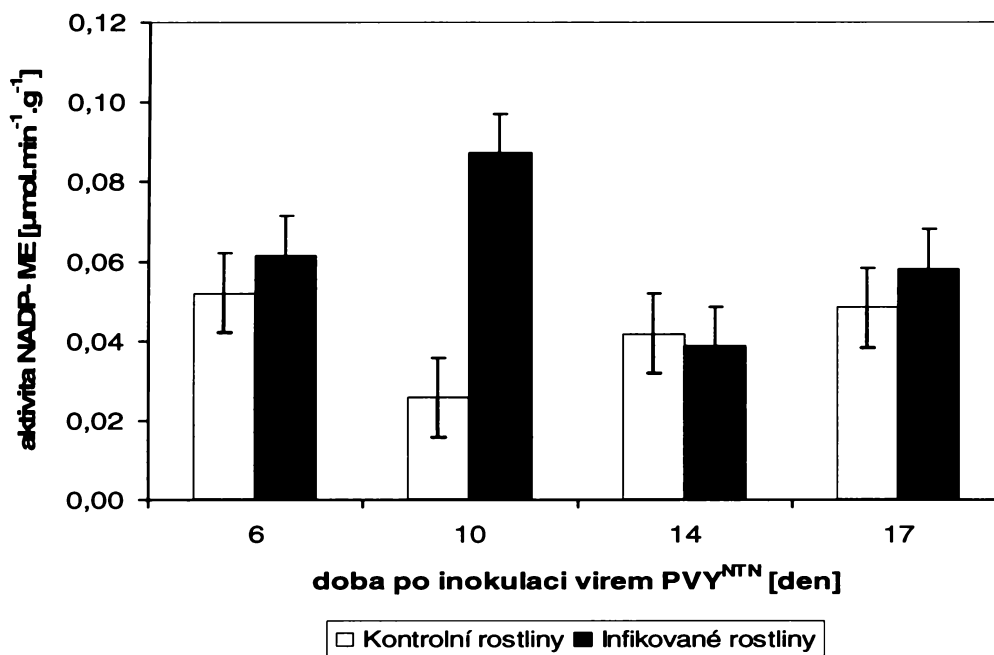
jsou vztaženy na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu a jsou uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Z obrázků 7 a 8 (str. 18, 19) je patrné, že ke zvýšení aktivity NADP-ME dochází v 10. dni od počátku infekce, aktivita je v horních listech 4x vyšší než v kontrolních rostlinách. 14. a 17. den po inokulaci aktivita NADP-ME klesá, ale i 17. den zůstává dvojnásobná oproti aktivitě NADP-ME ve zdravých rostlinách.

Obdobná závislost platí i pro spodní listy, nejvyšší aktivita byla zjištěna rovněž 10. den po inokulaci, zvýšení bylo 3,5x, pak se aktivita snižovala, téměř na úroveň kontrolních rostlin.



Obr. 7 Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v horních listech rostliny *Nicotiana tabacum* L. v průběhu virové infekce.



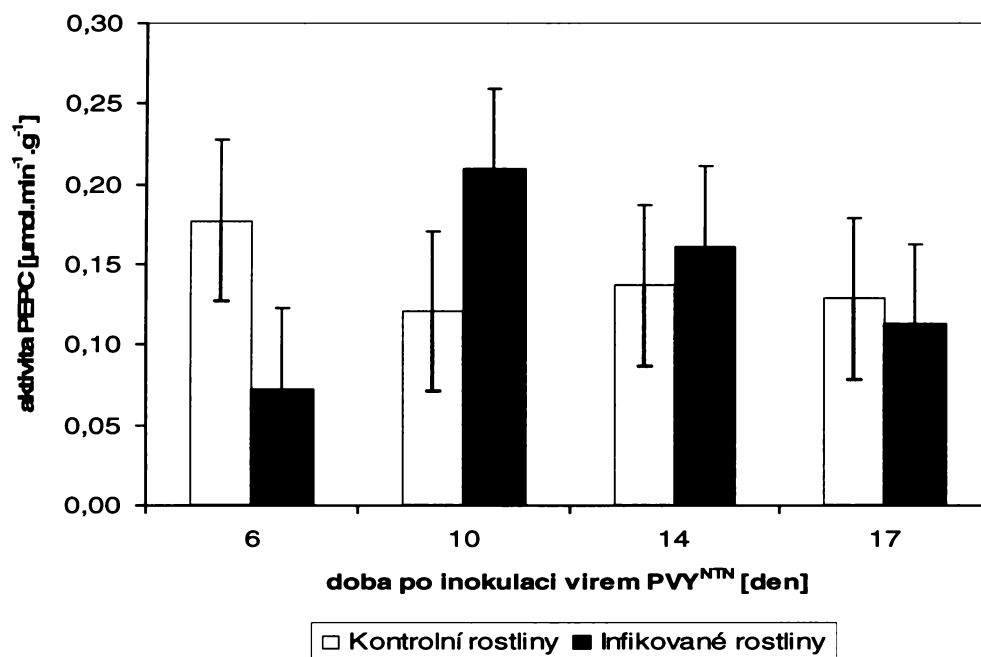
Obr. 8 Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu ve spodních listech rostliny *Nicotiana tabacum* L. v průběhu virové infekce.

4.2 AKTIVITA PEPC V PRŮBĚHU VIROVÉ INFEKCE ROSTLIN TABÁKU

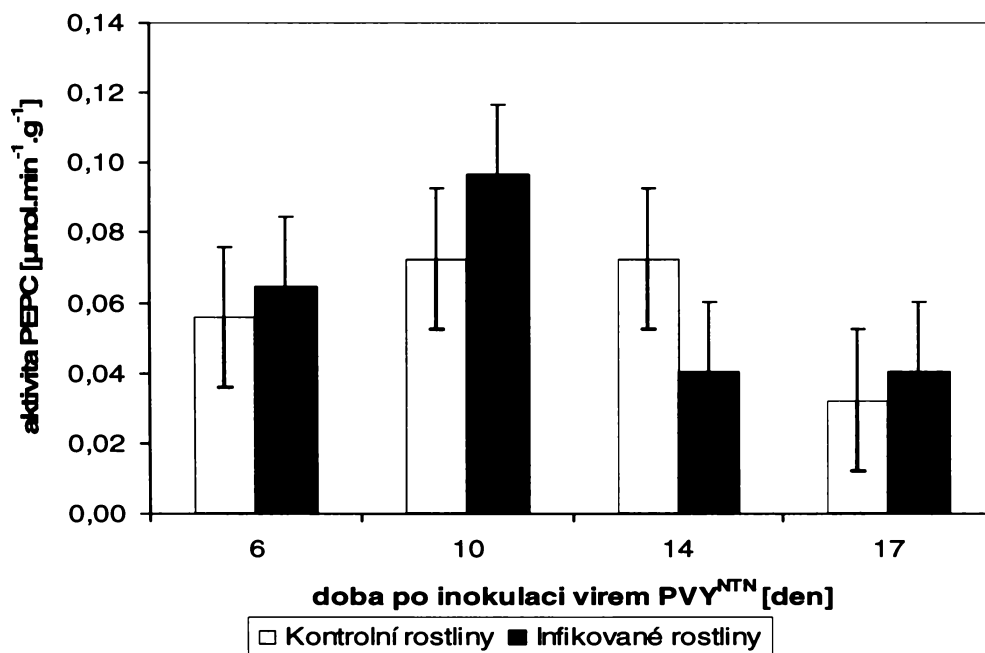
V extraktech z horních a spodních listů tabáku odebraných v průběhu virové infekce byla změřena aktivita PEPC. Hodnoty jsou uvedeny na obrázku 9 a 10 (str. 20). Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu a jsou uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

V horních listech bylo nejvyšší aktivity dosaženo 10. den po inokulaci v listech infikovaných rostlin, zvýšení bylo 1,75x. V dalších odběrových dnech se aktivita již snižovala až na úroveň zdravých kontrolních rostlin (obr. 9).

Ve spodních listech nebyly nalezeny výrazné rozdíly mezi aktivitou PEPC ve zdravých a infikovaných rostlinách (obr. 10).



Obr. 9 Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v horních listech rostliny *Nicotiana tabacum* L. v průběhu virové infekce.



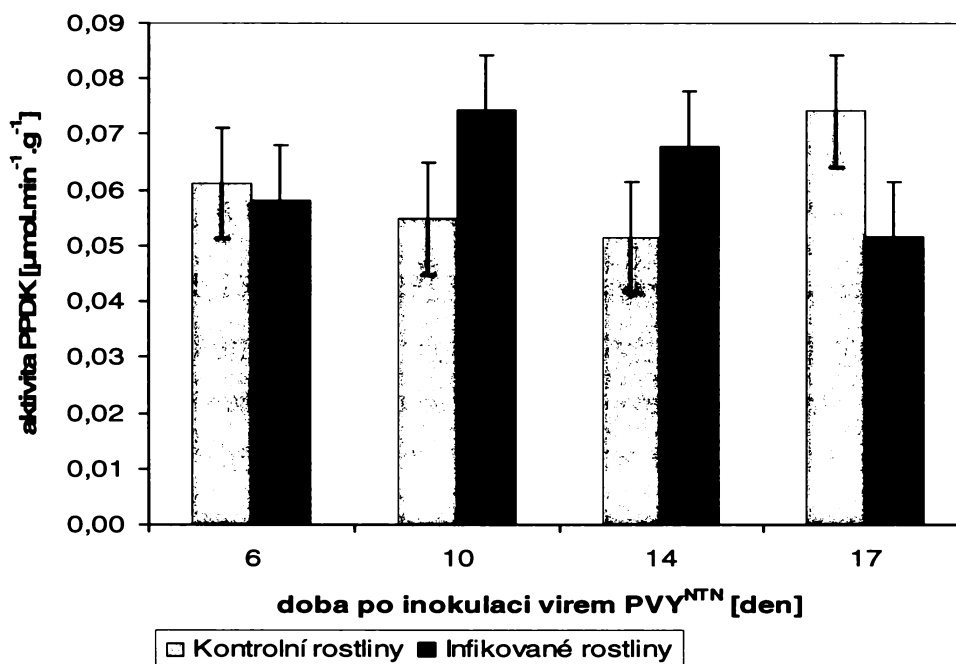
Obr. 10 Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu ve spodních listech rostliny *Nicotiana tabacum* L. v průběhu virové infekce.

4.3 AKTIVITA PPK V PRŮBĚHU VIROVÉ INFEKCE ROSTLIN TABÁKU

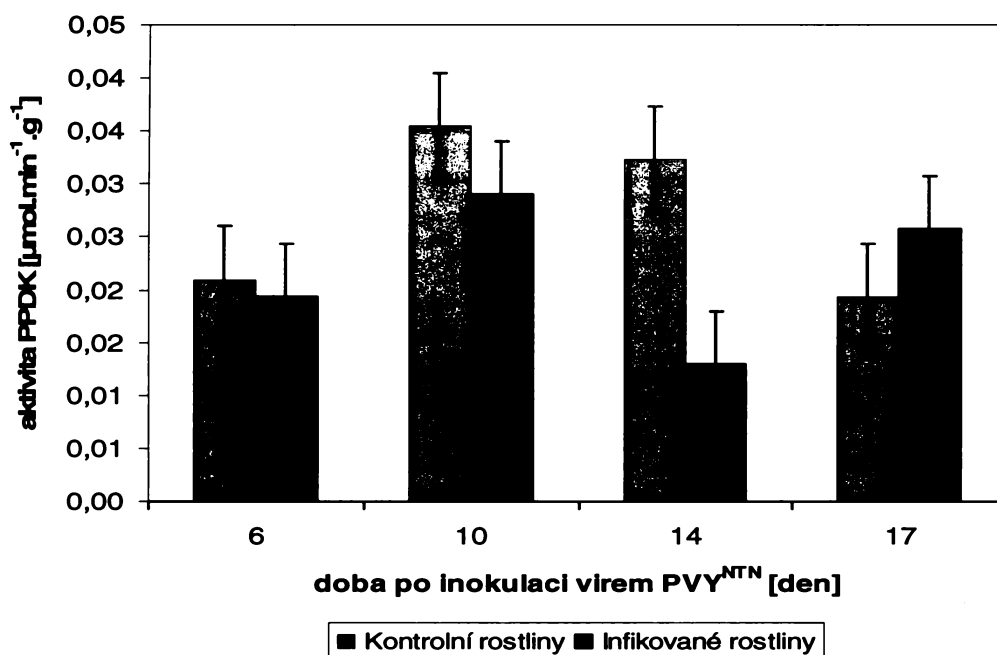
Na obrázcích 11 a 12 (str. 21, 22). je uvedena aktivita PPK v 6., 10., 14. a 17. dni po inokulaci rostlin tabáku v horních a spodních listech. Výsledky jsou vztaženy na čerstvou hmotnost a jsou uvedeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

V horních listech bylo dosaženo nejvyšší aktivity 10. den od počátku infekce, zvýšení bylo 1,35x. Další zvýšení bylo dosaženo i 14. den po inokulaci v listech infikovaných rostlin, toto zvýšení bylo 1,3x. 6. a 17. den byla aktivita infikovaných a zdravých téměř srovnatelná (obr. 11, str. 21).

Ve spodních listech nebyly nalezeny významné rozdíly mezi aktivitou PPK ve zdravých a infikovaných rostlinách (obr. 12, str. 22).



Obr. 11 Aktivita PPK vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu v horních listech rostliny *Nicotiana tabacum* L. v průběhu virové infekce.

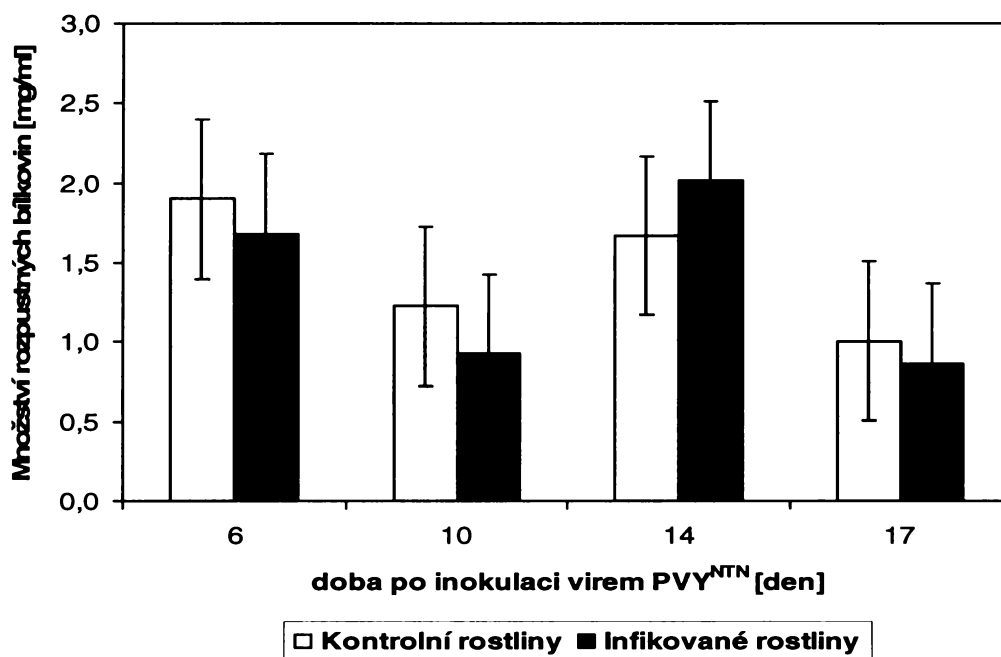


Obr. 12 Aktivita PPDK vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu ve spodních listech rostliny *Nicotiana tabacum* L. v průběhu virové infekce.

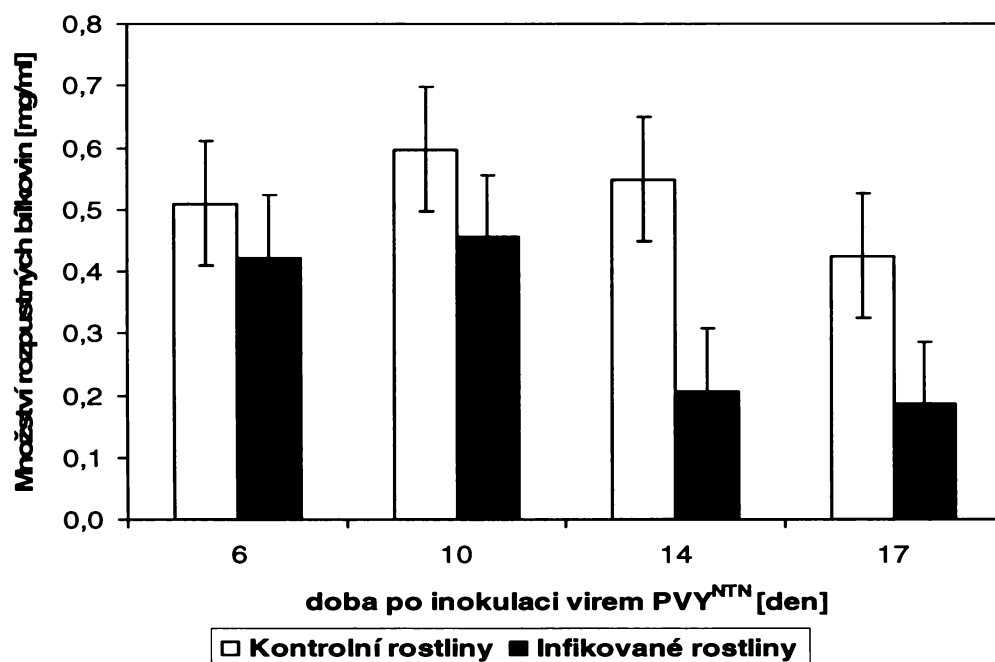
4.4 OBSAH BÍLKOVIN V PRŮBĚHU VIROVÉ INFEKCE

Na obrázcích 13 a 14 (str. 23) je změna koncentrace bílkovin vlivem infekce virem PVY^{NTN} u horních a spodních listů tabáku stanovením dle Bradfordové. Obsah bílkovin je vztažen na čerstvou hmotnost a uveden v mg/ml.

U horních listů i spodních listů nedošlo k významným rozdílům mezi množstvím rozpustných bílkovin u zdravých a infikovaných rostlin (obr. 13 a 14, str. 23).



Obr. 13 Změna koncentrace bílkovin vlivem infekce virem PVY^{NTN} u horních listů tabáku v závislosti na době inokulace virem PVY^{NTN}.

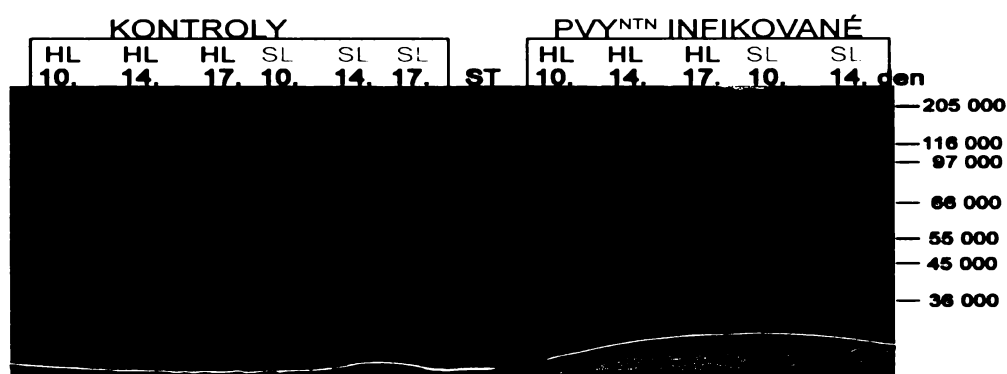


Obr. 14 Změna koncentrace bílkovin vlivem infekce virem PVY^{NTN} u spodních listů tabáku v závislosti na době inokulace virem PVY^{NTN}.

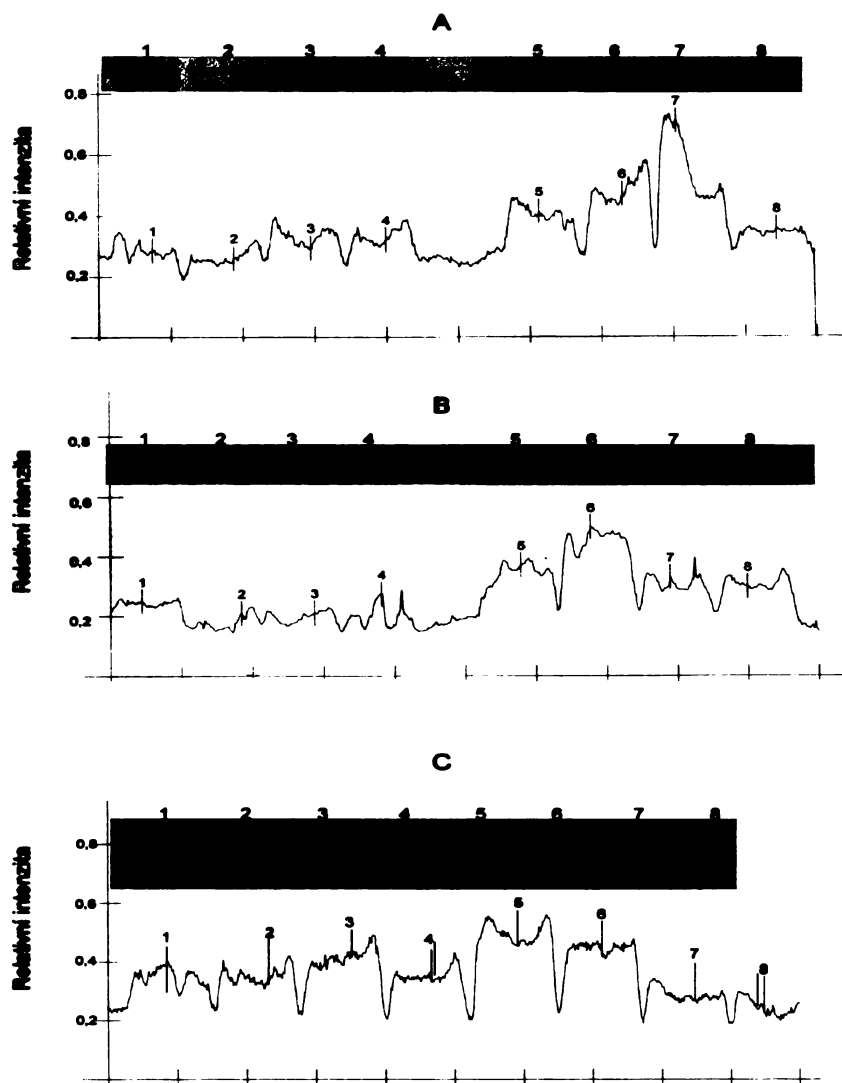
4.5 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE V PROSTŘEDÍ SDS A PŘENOS NA NITROCELULOISOVOU MEMBRANU

Extrakty z horních i spodních listů kontrolních a infikovaných rostlin byly elektroforeticky separovány v prostředí SDS. V polyakrylamidovém gelu byly detekovány jednak proteiny pomocí barvy Coomassie Briliante Blue G 250 (obr. 15) a jednak imunochemicky NADP-ME (obr. 16, str.25). Na obrázku 15 je vidět, že zastoupení jednotlivých proteinů v kontrolních a infikovaných rostlinách se liší. Výrazný pruh odpovídající molekulové hmotnosti 55 000 je pravděpodobně velká podjednotka Rubisko, tento protein je však v extraktech z infikovaných rostlin zastoupen méně (obr. 15). Toto zjištění může souviset se snížením fotosyntézy a degradací Rubisko. V infikovaných rostlinách je protein s relativní molekulovou hmotností přibližně 35 000, což odpovídá plášťovému proteinu viru.

Imunochemická detekce NADP-ME v listech infikovaných a kontrolních rostlin byla provedena na nitrocelulosové membráně (obr. 16, str. 25). Vyhodnocení bylo provedeno denzitometricky pomocí programu Elfoman a to ve třech nezávislých pokusech (obr. 16 A, B, C, str. 25). Obrázek 17 (str. 26) shrnuje výsledky denzitometrického vyhodnocení. V infikovaných rostlinách je množství proteinu NADP-ME v jednotlivých dnech po inokulaci uvedeno v %. 100 % znamená vždy množství proteinu NADP-ME ve zdravých kontrolních rostlinách. Nejvíce proteinu NADP-ME bylo zjištěno 10. den po inokulaci, bylo přibližně dvojnásobné oproti kontrolním rostlinám.

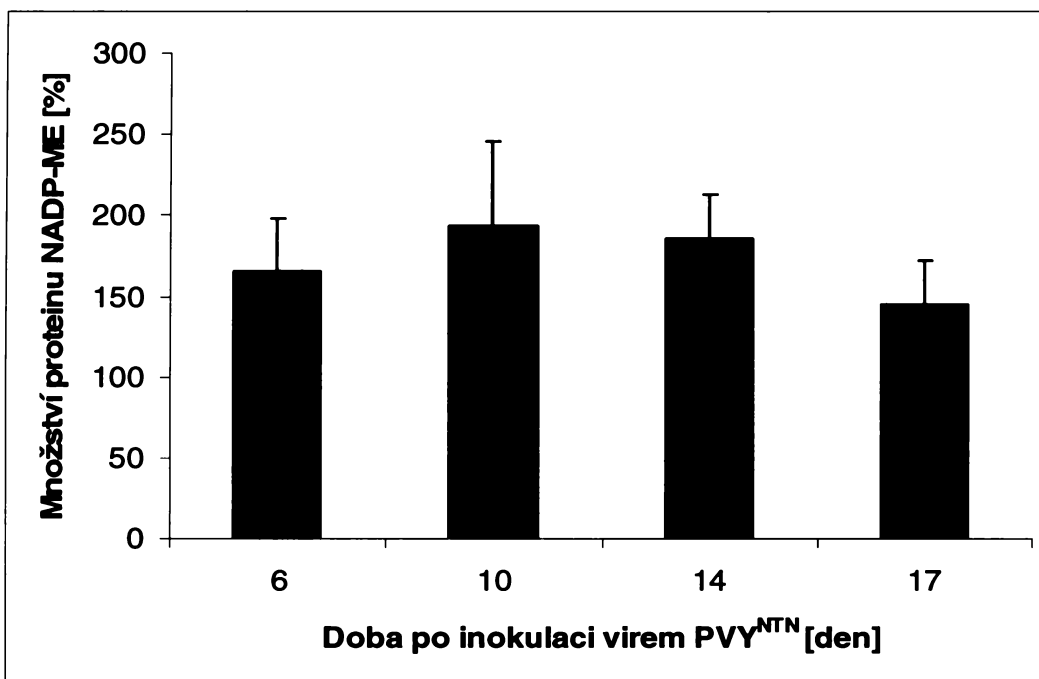


Obr. 15 Elektroforetická separace v SDS prostředí a v 10 % polyakrylamidovém gelu. Porovnání kontrolních a infikovaných rostlin 10., 14. a 17. den horních listů (HL) a 10. a 14. den spodních listů (SL).



Obr. 16 Výřezy z nitrocelulosových membrán a závislost relativní intenzity na dnech po inokulaci virem PVY^{NTN} (pomocí vyhodnocovacího programu Elfoman 2.0).

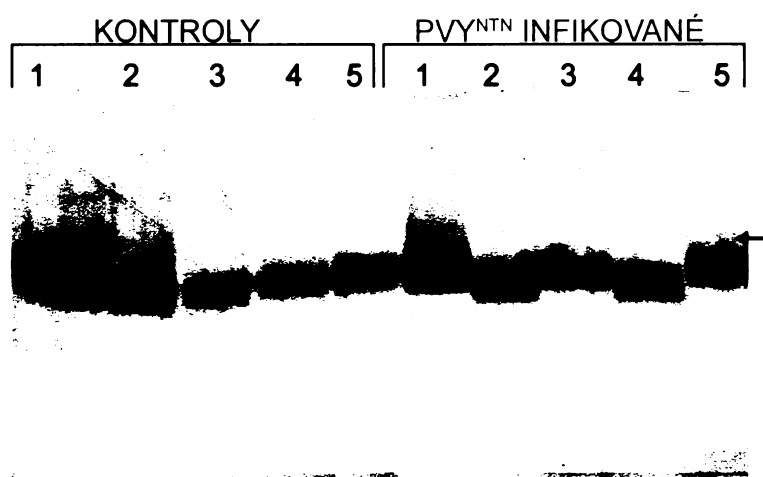
- A – Relativní intenzita v horních listech
- B – Relativní intenzita v horních listech
- C – Relativní intenzita v horních listech
- 1 – Kontrolní rostlina, 6. den
- 2 – Kontrolní rostlina, 10. den
- 3 – Kontrolní rostlina, 14. den
- 4 – Kontrolní rostlina, 17. den
- 5 – Infikovaná rostlina, 6. den
- 6 – Infikovaná rostlina, 10. den
- 7 – Infikovaná rostlina, 14. den
- 8 – Infikovaná rostlina, 17. den



Obr. 17 Množství proteinu NADP-ME [%] v závislosti na době po inokulaci virem PVY^{NTN} [den] v horních listech.

4.6 NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA

Extrakty z horních i spodních listů infikovaných i kontrolních rostlin byly elektroforeticky separovány za nedenedaturujících podmínek. Na obrázku 18 je uveden polyakrylamidový gel, ve kterém je detekována aktivita NADP-ME. Nejvyšší aktivita byla zjištěna v horních listech infikovaných rostlin, v horních listech kontrolních rostlin byla také vysoká (obr. 18).



Obr.18 Nativní elektroforéza – porovnání kontrolních a infikovaných rostlin na základě polohy od místa inokulace.

- Dráha č.1 – Kontrolní rostlina, extrakt z vrcholových listů
- Dráha č.2 – Kontrolní rostlina, extrakt z horních listů
- Dráha č.3 – Kontrolní rostlina, extrakt ze spodních listů
- Dráha č.4 – Kontrolní rostlina, extrakt ze stonku
- Dráha č.5 – Kontrolní rostlina, extrakt z kořene
- Dráha č.6 – Infikovaná rostlina, extrakt z vrcholových listů
- Dráha č.7 – Infikovaná rostlina, extrakt z horních listů
- Dráha č.8 – Infikovaná rostlina, extrakt ze spodních listů
- Dráha č.9 – Infikovaná rostlina, extrakt ze stonku
- Dráha č.10 – Infikovaná rostlina, extrakt z kořene

5. DISKUSE

Biotický stres způsobený rostlinnými viry představuje ekonomicky závažné ztráty hospodářských plodin. Po stresu vyvolaném houbami a hád'átky jsou viry třetí nejzávažnější skupinou [25]. V této bakalářské práci jsem se zabývala vlivem *Y viru bramboru*, kmene NTN, izolátu Lebanon na biochemické změny v modelových rostlinách *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1. Příznaky, které tento izolát vyvolává v rostlinách bramboru a v indikátorových rostlinách tabáku, se projevují četnými nekrosami především na listech a stoncích [26]. Tato poškození jsou spojena s negativním vlivem na fyziologické funkce (především fotosyntézu, respiraci, reprodukci, transpiraci, transport živin a asimilátů a příjem živin kořeny) a na změny metabolismu rostliny. V nepříznivých podmínkách vnějšího prostředí závažně ohrožujících rostlinu, dochází k aktivaci celé řady genů, což se projeví zvýšenou hladinou některých metabolitů a proteinů, z nichž některé mohou být zodpovědné za určitý stupeň ochrany vůči danému stresu [27].

Dále dochází k přesměrování, zintenzivnění či naopak zeslabení toku metabolitů určitými primárními a sekundárními drahami. Anaplerotické enzymy tak mohou nabývat většího významu. Takovými enzymy jsou v C_3 rostlinách, kde fotosyntéza probíhá přímo pomocí enzymu Rubisco, NADP-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační) (NADP-ME), fosfoenolpyruvátkarboxylasa (PEPC) a pyruvát, fosfátdikinasa (PPDK). Funkce nefotosyntetických isoformů těchto enzymů stále stojí v popředí zájmu mnoha vědců. V C_4 rostlinách je jejich úloha objasněna, podílejí se na fotosyntetické fixaci CO_2 v mesofylových buňkách a buňkách pochev cévních svazků.

Aktivitu NADP-ME, PEPC a PPDK jsem sledovala v horních systémově infikovaných listech (nad místech inokulace) a v listech spodních, do kterých se virus šíří později. Všechny sledované enzymy byly vůči virové infekci citlivé: nejvíce se zvýšila aktivita NADP-ME v horních listech, a to 10. den infekce čtyřikrát oproti zdravým kontrolním rostlinám (obr. 7, str. 18). Také PEPC a PPDK byla zvýšena, nejvíce 10. den (obr. 9 a 11, str. 20 a 21). Obdobnou situaci jsem pozorovala ve spodních listech, ve kterých však byly aktivity enzymů nižší,

pravděpodobně vzhledem k jejich senescenci. Přítomnost viru v horních listech byla ověřena imunochemickou metodou DAS-ELISA a metodou „real time“-PCR [28].

V jiných studiích byla zvýšená aktivita NADP-ME zjištěná především působením abiotických stresorů: v rostlině fazole po působení kadmia [29], v hyperhydrických výhonicích hvozdíku zahradního po 14 a 28 dnech kultivace *in vitro* [30], v listech vodní rostliny *Egeria densa* po přenosu z podmínek nízké teploty a světla do podmínek vysoké teploty a světla [31], v ozimém žitě (*Secale cereale* L.) po vystavení chladu [32], v listech olivovníků vystavených solnému stresu [33], podobně jako solný stres v listech rostliny *Aloe vera* L. [34], solný a osmotický stres v listech a kořenech semenáčků rýže [35], [36]. V kořenech kukuřice byla zvýšená aktivita NADP-ME nalezena po působení celulasy, jasmonátu a houbového elicitoru [37].

Významně zvýšená aktivita NADP-ME vlivem biotického stresu, která byla v naší laboratoři už vícekrát potvrzena [4], [38], [39] evokovala otázku, zda toto zvýšení souvisí s regulací proteinu v buňce (např. pomocí pH, postranlační modifikace či aktivace dalšími metabolity) nebo, je-li protein NADP-ME syntetizován. *de novo*, to znamená na transkripční a translační úrovni. Proto byla v naší laboratoři připravena králičí protilátka proti antigenu NADP-ME ze semen kukuřice [40]. Imunochemicky byla na nitrocelulosové membráně identifikována NADP-ME odpovídající relativní molekulové hmotnosti 66 000. Nedávno byla stanovena relativní molekulová hmotnost isoform rekombinantních proteinů *Nicotiana tabacum* L.: 63 000 pro chloroplastovou a 65 000 pro cytosolovou isoforma [41]. Nativní elektroforetická separace ukázala v listech přítomnost jednoho proužku (obr. 18, str. 27), což naznačuje majoritní přítomnost jedné z isoform, pravděpodobně cytosolové [42].

Protein NADP-ME byl detekován na nitrocelulosové membráně v průběhu 6.-17. dne infekce PVY^{NTN}. Ve srovnání s kontrolními rostlinami byl denzitometrickým vyhodnocením programem Elfoman 2.0 stanoven přibližně dvakrát vyšší obsah NADP-ME. Zdá se tedy, že zvýšená aktivita NADP-ME zřejmě souvisí se syntézou proteinu *de novo*. Tuto hypotézu podpořily také výsledky

bakalářské práce Michaely Šumpelové, která zjistila 17. den experimentu až trojnásobné zvýšení mRNA cytosolové isoformy NADP-ME metodou „real-time“ PCR [28].

Zvýšená aktivita NADP-ME spolu se zvýšenou expresí a transkripcí proteinu NADP-ME byla zjištěna také v kořenech kukuřice po působení celulasy, jasmonátu a houbového elicitoru [37]. Zvýšená aktivita NADP-ME v listech olivovníku vystavených solnému stresu byla rovněž doprovázena zvýšenou expresí NADP-ME [33]. Podobně, solný stres v rostlinách aloe způsobil nejen zvýšení aktivity, ale i transkripce NADP-ME [34].

Ačkoliv v mé bakalářské práci byla zjištěna souvislost mezi zvýšenou aktivitou a zvýšenou expresí NADP-ME, stále nejsou vyloučeny další možnosti regulace tohoto proteinu; v naší laboratoři je studována rovněž regulace aktivity tohoto enzymu buněčnými metabolity.

6. SOUHRN

1. Byla ověřena souvislost mezi biotickým stresem (*Y virem bramboru*, kmenem NTN; PVY^{NTN}) a zvýšenou aktivitou enzymů anaplerotických metabolických drah (PEPC, PPK a NADP-ME) u rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1
2. Čtyřnásobné zvýšení aktivity NADP-ME v PVY^{NTN} infikovaných listech bylo doprovázeno přibližně dvojnásobně zvýšeným obsahem proteinu NADP-ME.
3. Aktivita enzymů (PEPC, PPK a NADP-ME) a množství proteinů ve spodních listech byly nižší než v horních.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Luštěnec, J., Žárský, V.: Úvod do fyziologie vyšších rostlin, nakladatelství Karolinum, Praha (2005)
- [2] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha (1998)
- [3] Kosack, K.H., Jones, J.D.G.: Responses to Plant Pathogens, Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists, Maryland (2000)
- [4] Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H., Čeřovská, N.: *Photosynthetica* **41**, 357 – 363 (2003)
- [5] Mehdy, M.C., Sharma, Y.K., Sathasivan, K., Bays, N.W.: *Physiol.Plant* **98**, 365 – 374 (1996)
- [6] <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/84439-potyviry>
- [7] http://www.ueb.cas.cz/laboratory_of_virology/potyviry4.htm
- [8] <http://www.biotox.cz/enpsyro/pj3mic.html>
- [9] <http://botanika.wendys.cz/kytky/K387.php>
- [10] Kodíček, M.: Biochemické pojmy – výkladový slovník, skriptum VŠCHT Praha (2004)
- [11] Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O.: Laboratorní cvičení z biochemie, nakladatelství Olomouc (2000)
- [12] Krajhanzl, A., Hladík, J. a kol: Biochemické metody – návody k pokročilým praktickým cvičením, skriptum PřF UK Praha (1991)
- [13] http://www.ueb.cas.cz/laboratory_of_virology/potyviry1.htm
- [14] Kai, Y.; Matsumura, H.; Izui, K.: *Arch.Biochem.Biophys.* **414**, 170 – 179 (2003)
- [15] Edwards, G.E., Andreo, C.S.: *Phytochem.* **31**, 1845 – 1857 (1992)
- [16] Moons, A., Valcke, R., Van Montagu, M.: *Plant. J.* **15**, 89 – 98 (1998)
- [17] Chastain, Ch.J., Fries, J.P., Vogel, J.A., Randklev, Ch.L., Vossen, A.P., Dittmer, S.K., Watkins, E.E., Fiedler, L.J., Wacker, S.A., Meinhover, K.C., Sarath, G., Chollet, R.: *Plant.Physiol.* **128**, 1368 – 1378 (2002)

- [18] Laemmli, U.K.: *Nature*. 227, 680 - 685 (1970)
- [19] Lee, D.H., Lee, Ch.B.: *Plant Science* 159, 75 - 85 (2000)
- [20] Bradford, M.M.: *Anal.Biochem.* 72, 248 – 254 (1976)
- [21] Drincovich, M.F.; Casati, P.; Andreo, C.S.: *FEBS Lett.*490, 1 – 6 (2001)
- [22] Boneslab.bio.ntnu.no/BI211/Western.jpg
- [23] Sedlářová, M.; Lebeda, A.: *Bio. listy* 67, 59 – 73 (2002)
- [24] http://www.ueb.cas.cz/laboratory_of_virology/potyviry2.htm
- [25] Burketová, L.: Přednáška PřF UK Praha
- [26] Shukla, D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A.: *The potyviridae*. CAB International, Wallingford, Oxon (1994)
- [27] Bathnagar-Mathur, P., Devi, M.J., Reddy, D.S., Lavanya, M., Vadez, V., Serraj, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Sharma, K.K.: *Plant Cell Rep.* 26, 2071 – 2082 (2007)
- [28] Šumpelová, M.: Transkripce NADP-malátdehydrogenasy (dekarboxylační) v rostlinách tabáku. Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2007)
- [29] Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J.: *Plant Physiol. Biochem.* 43, 437 – 444 (2005)
- [30] Saher, S., Fernández-García, N., Piqueras, A., Hellín, E., Olmos, E.: *Plant Physiol. Biochem.* 43, 573 – 582 (2005)
- [31] Casati, P., Lara, M.V., Andreo, C.S.: *Plant Physiol.* 123, 1611 – 1621 (2001)
- [32] Crecelius, F., Streb, P., Feierabend, J.: *J. Exp. Bot.* 54, 1075 – 1083 (2003)
- [33] Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M.V., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Fernández-Ocana, A., Del Río, L.A., Barroso, J.B.: *Plant, Cell Environ.* 29, 1449 – 1459 (2006)
- [34] Sun, S.B., Shen, Q.R., Wan, J.M., Liu, Z.P.: *Acta Biochim. et Biophys. Sinica* 35, 423 – 429 (2003)
- [35] Chi, W., Yang, J., Wu, N., Zhang, F.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1865 – 1874 (2004)
- [36] Liu, S., Cheng, Y., Zhang, X., Guang, Q., Nishiuchi, S., Hase, K., Takano, T.: *Plant Mol. Biol.* 64, 49 – 58 (2007)

- [37] Maurino, V.G., Saigo, M., Andreo, C.S., Drincovich, M.F.: *Plant. Mol. Biol.* **45**, 409 – 420 (2001)
- [38] Doubnerová, V.: Biochemické změny v rostlinách tabáku způsobené biotickým stresem. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2004)
- [39] Janošková, M.: Vliv virové infekce na transgenní rostliny nesoucí geny pro nestrukturní proteiny potyvirů. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2005)
- [40] Potůčková, L.: Studium NADP-dependentní malátdehydrogenasy dekarboxylační. Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2006)
- [41] Müller, G.L., Drincovich, M.F., Andreo, C.S., Lara, M.V.: *Plant Cell Physiol.* **49**, 469 – 480 (2008)
- [42] Potůčková, L.: Regulace NADP-dependentní malátdehydrogenasy dekarboxylační v listech tabáku. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2008)

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

| Jméno a příjmení s adresou | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|----------------------------|----------|-----------------|----------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |