

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra biochemie**

---

**Regulace NADP-dependentní malátdehydrogenasy dekarboxylační  
v listech tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)**

**Diplomová práce**

**studijního programu Klinická a toxikologická analýza**

**Školitel: RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.**

**Konzultant: Mgr. Veronika Doubnerová**

**Praha 2008**

**Lucie Potůčková**

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2008.



Především bych chtěla poděkovat RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., která mě výborně vedla po celou dobu svou odbornou radou a pomocí.

Dále děkuji Mgr. Veronice Doubnerové za všestrannou pomoc při řešení problémů spjatých s experimentální částí práce.

<b>1</b>	<b>TEORETICKÝ ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Obecná charakteristika NADP-ME .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2</b>	<b>Výskyt NADP-ME.....</b>	<b>10</b>
1.2.1	Rostlinný NADP-ME .....	10
1.2.2	Živočišný NADP-ME.....	12
<b>1.3</b>	<b>Genová rodina NADP-ME .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4</b>	<b>Struktura NADP-ME.....</b>	<b>13</b>
1.4.1	Struktura živočišného NADP-ME .....	13
1.4.2	Charakteristika rostlinného NADP-ME .....	15
1.4.3	Charakteristika bakteriálního NADP-ME.....	16
<b>1.5</b>	<b>Reakční mechanismus katalýzy NADP-ME .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6</b>	<b>Regulace NADP-ME .....</b>	<b>17</b>
<b>1.7</b>	<b>Funkce NADP-ME .....</b>	<b>19</b>
1.7.1	Fotosyntetická funkce NADP-ME.....	19
1.7.1.1	C4 typ fixace oxidu uhličitého .....	19
1.7.1.2	CAM metabolismus.....	21
1.7.2	Obranná odpověď rostlin vůči stresu .....	22
1.7.3	Udržování pH a další anaplerotické role NADP-ME.....	22
1.7.4	Produkce NADPH pro biosyntetické pochody .....	23
1.7.5	Funkce NADP-ME v nádorových buňkách .....	24
1.7.6	Souvislost NADP-ME se stimulací sekrece insulinu a lipogenezí .....	26
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikálie.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Přístroje .....</b>	<b>30</b>

<b>3.3</b>	<b>Rostlinný materiál.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>Lokalizace NADP-ME <i>in vivo</i> .....</b>	<b>31</b>
3.4.1	Izolace chloroplastů z <i>Nicotina tabacum</i> L.....	31
3.4.2	Detekce aktivity NADP-ME v buněčných frakcích.....	32
<b>3.5</b>	<b>Purifikace NADP-ME z listů <i>Nicotina tabacum</i> L.....</b>	<b>32</b>
3.5.1	Příprava rostlinného extraktu.....	32
3.5.2	Srážení síranem amonným.....	32
3.5.3	Dialýza .....	33
3.5.4	Ionexová chromatografie .....	33
3.5.5	Gelová chromatografie.....	33
3.5.6	Afinitní chromatografie .....	34
<b>3.6</b>	<b>Stanovení množství bílkovin .....</b>	<b>34</b>
<b>3.7</b>	<b>Metody stanovení enzymové aktivity .....</b>	<b>34</b>
3.7.1	Stanovení aktivity NADP-ME .....	34
3.7.2	Stanovení aktivity MDH.....	35
3.7.3	Stanovení aktivity PEPC.....	35
<b>3.8</b>	<b>Kinetické metody .....</b>	<b>35</b>
3.8.1	Určení mechanismu dvousubstrátové reakce.....	35
3.8.2	Sledování vlivu metabolitů na aktivitu NADP-ME .....	37
3.8.3	Inhibiční studie.....	37
<b>3.9</b>	<b>Elektroforetické metody .....</b>	<b>39</b>
3.9.1	Příprava vzorků pro elektroforetické separace.....	39
3.9.2	Elektroforéza nativní.....	39
3.9.3	SDS - PAGE .....	39
3.9.4	Detekce aktivity NADP-ME v gelu.....	40
3.9.5	Detekce proteinů v gelu .....	40
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Buněčná lokalizace NADP-ME v listech tabáku .....</b>	<b>41</b>

<b>4.2</b>	<b>Izolace NADP-ME z listů tabáku (<i>Nicotina tabacum</i> L.).....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Sledování hodnot aktivity NADP-ME v průběhu izolačního postupu....	44
4.2.2	Sledování čistoty purifikovaného enzymového preparátu .....	47
<b>4.3</b>	<b>Kinetické metody .....</b>	<b>48</b>
4.3.1	Určení mechanismu reakce katalyzované NADP-ME.....	48
4.3.2	Sledování vlivu metabolitů na aktivitu NADP-ME .....	53
4.3.3	Inhibice NADP-ME makroergickými komponentami .....	56
<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>68</b>

## Seznam zkratek a symbolů

ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
acetyl-CoA	acetylkoenzym A
BSA	hovězí sérový albumin
C <sub>3</sub> rostliny	rostlina, u které je prvním fotosyntetickým produktem oxalacetát (čtyřuhlíkatá sloučenina)
C <sub>4</sub> rostliny	rostlina, u které je prvním fotosyntetickým produktem 3-fosfoglycerát (tříuhlíkatá sloučenina)
CAM	Crassulacean acid metabolism
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
c-NAD-ME	cytoplazmatická NAD-dependentní malátdehydrogenasa dekarboxylační
c-NADP-ME	cytoplazmatická NADP-dependentní malátdehydrogenasa dekarboxylační
CoA	koenzym A
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EDTA	ethylendiamintetraacetát
g	tíhové zrychlení (g = 9,80665)
GOT	glutamát-oxaloacetáttransaminasa
GTP	guanosintrifosfát
Hsp 70	protein indukovaný teplotním stresem (heat shock protein)
$K_{ic}$	inhibiční konstanta
$K_{iu}$	inhibiční konstanta
$K_m$	Michaelisova konstanta
$K_{mA}$	Michaelisova konstanta pro substrát A
$K_{mB}$	Michaelisova konstanta pro substrát B
MK	mastná kyselina
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
NAD <sup>+</sup> (NADH)	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NAD-MDH	NAD-dependentní malátdehydrogenasa

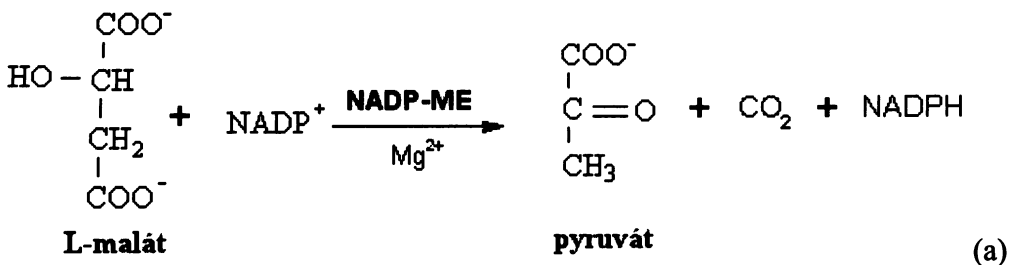
NAD-ME	NAD-dependentní malátdehydrogenasa dekarboxylační
NADP <sup>+</sup> (NADPH)	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaný)
NADP-ME	NADP-dependentní malát dehydrogenasa dekarboxylační
OAA	oxalacetát
palmitoyl-CoA	palmitoylkoenzym A
PEP	fosfoenolpyruvát
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
RPM	počet otáček za minutu
Rubisko	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SDS	dodecylsulfát sodný
SR1	kultivar Petit Havana
TEMED	N,N,N',N'-tetremethylenethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v	rychlost enzymové reakce
V <sub>lim</sub>	maximální rychlost enzymové reakce



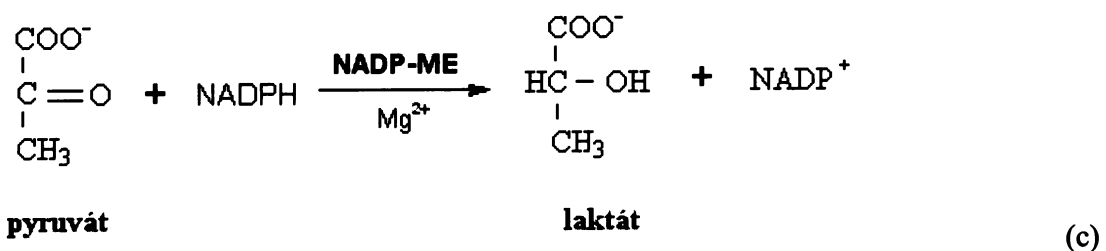
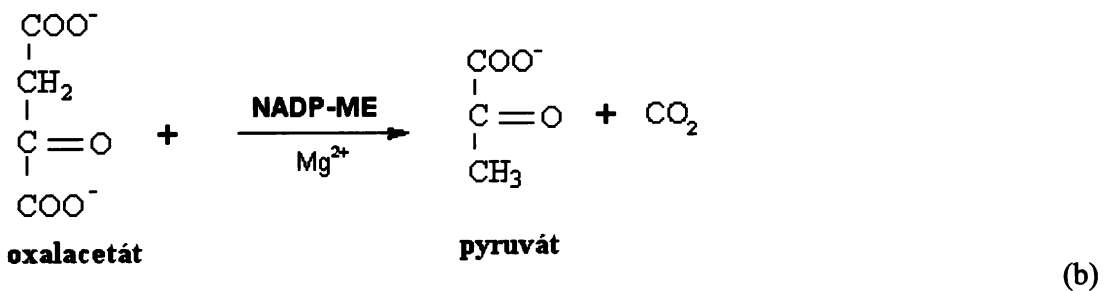
# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Obecná charakteristika NADP-ME

NADP-dependentní malát dehydrogenasa dekarboxylační EC 1.1.1.40, dále jen NADP-ME (z angl. malic enzyme), je velmi rozšířený enzym, přítomný jak v živočišných a rostlinných pletivech, tak v prokaryotických a eukaryotických mikroorganismech. Katalyzuje oxidativní dekarboxylaci L-malátu za vzniku pyruvátu a oxidu uhličitého za současné redukce koenzymu  $\text{NADP}^+$  na NADPH (a) [1, 2, 3]:



Enzym také může katalyzovat dekarboxylaci oxalacetátu (b) nebo redukovat  $\alpha$ -ketokarboxylové kyseliny (c) [2]:



Substrátem NADP-ME je malát, koenzymem je NADP<sup>+</sup> a kofaktory jsou dvojmocné kationy kovů, jejichž přítomnost je nezbytná. Účinnými kofaktory jsou Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>. Rovněž kationy Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> a Ca<sup>2+</sup> jsou účinné kofaktory NADP-ME z kukuřice, ale enzymová aktivita je s těmito ionty nižší než s ionty Mg<sup>2+</sup> nebo Mn<sup>2+</sup>. Řada dvojmocných kationů může působit jako inhibitor NADP-ME [2].

## 1.2 Výskyt NADP-ME

NADP-ME byl nalezen v mnoha organismech jako jsou bakterie, kvasinky, houby, rostliny, živočichové a také člověk [3].

### 1.2.1 Rostlinný NADP-ME

NADP-ME je rozšířený enzym, přítomný ve všech typech rostlin [1]. Distribuce NADP-ME v různých rostlinných orgánech je také velice rozmanitá. Tento enzym byl nalezen v květech, plodech, semenech, kořenech a speciálních zásobních orgánech, stejně tak v listech, kde vykonává specifické funkce. Relativní aktivita enzymu se značně liší v závislosti na typu rostlinného pletiva a druhu. Aktivita NADP-ME byla nalezena ve svěracích buňkách průduchů *Vicia faba*, kde byla mnohem větší než v parenchymálních buňkách listů [7]. Velmi vysoká aktivita chloroplastové isoformy byla nalezena v listech některých C<sub>4</sub> rostlin jako je kukuřice, cukrová třtina a čirok [1]. Vysoká aktivita NADP-ME byla zaznamenána také v čerstvém materiálu z palic kaly [7].

Fotosyntetické NADP-ME se nacházejí v C<sub>4</sub> rostlinách a to v chloroplastech v buňkách pochev cévních svazků a v cytoplazmě CAM rostlin, zatímco nefotosyntetické NADP-ME, se vyskytují ve všech rostlinách, a to jak v cytoplazmě, tak v chloroplastech. V rostlinách tedy existuje několik isoform, které lze dělit podle účasti ve fotosyntéze a lokalizaci v buňce [1]:

**1. C<sub>4(1)</sub>-NADP-ME:** Tato isoforma se nachází v některých C<sub>4</sub> rostlinách jako je například kukuřice, cukrová třtina a čirok, kde je využívána pro dekarboxylaci malátu v buňkách pochev cévních svazků v chloroplastech. Produkt CO<sub>2</sub> je fixován v Rubisko.

Tato isoforma byla nejvíce studována v kukuřičných listech.

**2.  $C_{4(2)}$ -NADP-ME:** Je nefotosyntetická isoforma NADP-ME vyskytující se v plastidech  $C_4$  rostlin. Byla identifikována v jednoděložné kukuřici a v dvouděložné rostlině *Flaveria bidentis*. V kukuřici byl  $C_{4(2)}$ -NADP-ME izolován z etiolovaných listů a kořenů. Tento enzym souvisí s obrannou odpovědí rostliny.

**3.  $C_{4(3)}$ -NADP-ME:** V  $C_4$  rostlinách se NADP-ME vyskytuje také v cytoplazmě.

**4.  $CAM_{(1)}$ -NADP-ME:** Některé CAM rostliny používají cytoplazmatický NADP-ME k dekarboxylaci malátu, který je uskladněn během noční fixace ve vakuolách. Uvolněný  $CO_2$  pak vstupuje do pentosofosfátového cyklu ve dne. Je fotosyntetickou formou NADP-ME. Přestože má tento enzym analogickou funkci jako  $C_{4(1)}$ -NADP-ME, tak se oba enzymy liší v buněčné lokalizaci.

**5.  $CAM_{(2)}$ -NADP-ME:** Je nefotosyntetická isoforma NADP-ME nalezená v některých fakultativních a obligátně fakultativních CAM rostlinách jako je kosmatec křišťálový (*Mesembryanthemum crystallinum*) nebo aloe (*Aloe arborescens*). Kosmatec křišťálový přechází z  $C_3$  metabolismu na CAM pouze v případě, je-li vystaven solnému stresu či stresu suchem.

**6.  $C_{3(1)}$ -NADP-ME:** Je nefotosyntetická isoforma NADP-ME nacházející se v cytoplazmě některých  $C_3$  rostlin jako jsou fazole, topol, grep, rajčata. NADP-ME v pletivech rajčat a grepu byl nalezen v respiračním řetězci během dozrávání plodů, kde je poskytuje pyruvát a/nebo NADPH jako substrátu pro respiraci.

**7.  $C_{3(2)}$ -NADP-ME:** Je plastidová isoforma NADP-ME vyskytující se v  $C_3$  rostlinách jako je rýže, rajčata a ovocné plody [1].

## 1.2.2 Živočišný NADP-ME

Ve tkáních savců byly popsány tři isoformy NADP-ME. Dvě isoformy jsou mitochondriální: NADP-dependentní isoforma (EC 1.1.1.40) a NAD(P)-dependentní mitochondriální isoenzym (EC 1.1.1.39), který může využívat jak  $\text{NADP}^+$  tak i  $\text{NAD}^+$ , ale efektivněji pracuje s  $\text{NAD}^+$ . Třetí isoforma je cytoplazmatická (EC 1.1.1.40) [10].

Mitochondriální NADP-ME (EC 1.1.1.40) se nachází ve tkáních s nízkou schopností dělení buněk např. v srdci, svalech a mozku. Cytoplazmatický NADP-ME je jeden z nejvíce zastoupených proteinů v jaterní tkáni holuba a tvoří 0,6% celkových cytoplazmatických proteinů. Pro cytosolovou isoformu NADP-ME z holubích jater je známa krystalová struktura [14].

## 1.3 Genová rodina NADP-ME

V rostlinách je NADP-ME kódována malými genovými rodinami. V dvouděložné  $\text{C}_3$  rostlině huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) je známa sekvence genomu. Genom huseníčku obsahuje čtyři geny kódující NADP-ME (At-NADP-ME1-ME4). Expres isoform NADP-ME se liší v jednotlivých rostlinných orgánech i v závislosti na ontogenezi. Isoforma (NADP-ME4) je pravděpodobně konstitutivní, je lokalizována v plastidech. Další tři isoformy jsou cytoplazmatické a vyskytují se jako hexamer nebo oktamer [8, 19]. První At-NADP-ME1 se vyskytuje výhradně v druhotných kořenech, At-NADP-ME3 je obsažena v pylu a chloupkách a třetí cytoplazmatická At-NADP-ME2 se nachází ve vyzrálých orgánech [19].

Rýže (*Oryza sativa*,  $\text{C}_3$  jednoděložná rostlina) má čtyři členy NADP-ME genové rodiny, jeden v plastidech a tři jsou cytoplazmatické. Obdobně jako v rostlině huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) jsou jednotlivé isoformy NADP-ME exprimovány specificky v jednotlivých pletivech i v různých fázích ontogeneze. Expres jednotlivé isoformy specificky odpovídá rovněž na jednotlivé typy stresu [8, 19]. Cytoplazmatické geny Oscyt ME1 jsou exprimovány v listech a kořenech. Gen Oscyt ME2 je exprimován pouze v kořenech a gen Oscyt ME2 se exprimuje ve všech typech pletiv,

avšak v malém množství. Gen pro chloroplastovou isoformu Oschl ME se stejně jako Oscyt ME1 exprimuje v listech a kořenech [11].

V rostlině tabáku (*Nicotiana tabacum*, C<sub>3</sub> rostlina) byly v letošním roce identifikovány tři transkripty NADP-ME, přičemž dva z nich kódují cytoplazmatickou isoformu (DQ923118 a EH663836) a třetí plastidovou isoformu (DQ923119). V cytoplazmě se vyskytuje Nt-NADP-ME2, Nt-NADP-ME1 je exprimován v chloroplastech a Nt-NADP-ME3 je exprimován ve vyzrálých orgánech [13].

## 1.4 Struktura NADP-ME

Struktura eukaryotických NADP-ME je více popsána než struktura prokaryotických NADP-ME. Nejlépe prozkoumaná je struktura živočišných NADP-ME, neboť byla krystalována struktura některých cytoplazmatických a mitochondriálních NADP-ME. Dle krystalové struktury jsou NADP-ME většinou homotetramery složené z monomerů o relativní molekulové hmotnosti mezi 64 000 – 67 000 [35].

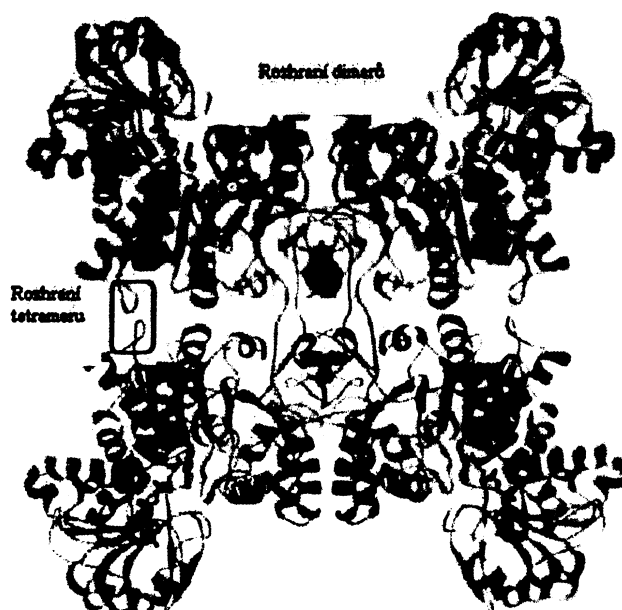
### 1.4.1 Struktura živočišného NADP-ME

Aktivita NADP-ME byla poprvé detekována v holubích játrech. První informace o krystalové struktuře cytoplazmatické NADP-dependentní malátdehydrogenasy dekarboxylační (c-NADP-ME, EC1.1.1.40) jsou staré více jak třicet let [14, 30]. Postupně byly získány krystalové struktury dalších NADP-ME např. cytoplazmatického NADP-ME z potkana, mitochondriálního NAD-ME z hlísta (*Ascaris suum*), z lidského mitochondriálního NAD-ME a nové krystalové struktury holubího cytoplazmatického NADP-ME [30].

Jaterní NADP-ME z holuba je tetramer (dimer dimerů) s čtvercově planárním uspořádáním monomerů. Tento NADP-ME obsahuje čtyři domény. Doména A je tvořena především helikální strukturou. Doména B obsahuje pět hlavních  $\beta$ -listů obklopených několika helixy po obou stranách. V doméně C je uloženo vazebné místo pro NADP<sup>+</sup>. Při uzavřené konformaci tohoto enzymu je nikotinamidová část v aktivním centru enzymu chráněna před uvolněním aminokyselinovými zbytky z domény B a C.

Doména D je C-terminálním koncem enzymu [14].

Podobně jako c-NADP-ME z holubích jater, může být lidský c-NAD-ME rozdělen na čtyři domény A, B, C a D, přičemž aktivní centrum enzymu je lokalizováno mezi doménami B a C. Dinukleotidový koenzym je asociován v Rossmannově žlábků v doméně C. Aminokyselinové zbytky v doménách A a D se většinou účastní uspořádání dimerů a tetrameru enzymu. Tetrametr lidského NAD-ME může být také popsán jako dimer dimerů [14].



Obr.1 Schéma struktury cytoplazmatického NADP-ME z holubích jater. Monomery jsou znázorněny různými barvami [17].

Porovnání struktur holubího a lidského enzymu naznačuje možný mechanismus kofaktorové specifity obou enzymů. Aminokyselina Lys362 má při tomto procesu velice důležitou funkci. Další aminokyselina jako je Ser346 může také pomáhat při určování kofaktorové specifity enzymu.

I přes vysokou homologii v sekvenci aminokyselin, má jaterní holubí c-NADP-ME v některých oblastech velké strukturální rozdíly ve srovnání s lidským mitochondriálním NAD-ME. Takovouto oblastí je například vazebné místo pro 2'-fosfátovou skupinu kofaktoru  $\text{NADP}^+$ , která určuje kofaktorovou specifitu enzymu [14]. U lidského mitochondriálního NAD-ME má vazebné místo pro adenin rozdílnou



rostlině doušku hustolistém (*Egeria densa*) [22], byl později identifikován jako Hsp 70 (heat shock protein), který interaguje s NADP-ME a byl mylně považován za isoformu [20]. Isoforma z listů *Flaveria trinervia* má relativní molekulovou hmotnost jedné podjednotky 61 700 [2]. V C<sub>4</sub> stromu *Haloxylon persicum* byla popsána chloroplastová isoforma NADP-ME o velikosti 67 000 a dále ve *Flaveria floridana* byl popsán NADP-ME o velikosti 62 000. Tyto isoformy byly nalezeny v chloroplastech buněk pochev cévních svazků C<sub>4</sub> rostlin [1]. V aloe (*Aloe arborescent*) byl popsán NADP-ME o velikosti 65 000 [4]. V kosmatci křišťálovém (*Mesembryanthemum crystallinum*), který je zástupce CAM rostlin, byla nalezena v listech po indukci solným stresem a suchem cytoplazmatická isoforma NADP-ME s molekulovou relativní hmotností 64 000 [1]. Fazole (*Phaseolus vulgaris*), zástupce C<sub>3</sub> rostlin, tvoří homotetramer NADP-ME s relativní molekulovou hmotností jedné podjednotky přibližně 70 000. Tento NADP-ME se nachází v cytoplasmě především listů [5].

### 1.4.3 Charakteristika bakteriálního NADP-ME

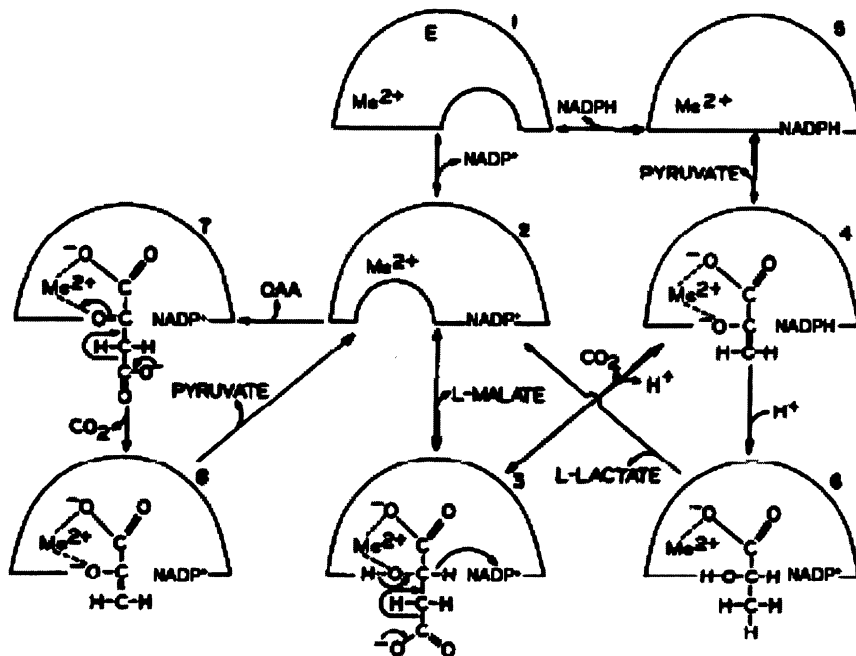
Molekulová hmotnost podjednotek bakteriálních NADP-ME je mnohem různorodější než rostlinných i živočišných NADP-ME. V archaebakterii *Sulfobolus solfaricus* byl izolován ME jako dimer, podobně jako v cukrové třtině [29]. Například NADP-ME s většími podjednotkami (přibližně 83 000), charakterizovaný delší C-terminální oblastí s homologií s fosfotransacetylase, byl objeven v bakterii *Sinorhizobium memiloti*. Na druhou stranu, NADP-ME s menší velikostí podjednotek byly nalezeny v různých gram pozitivních bakteriích jako je *Bacillus stearothermophilus* (50 000). Menší NADP-ME o relativní molekulové hmotnosti 40 000 byl také nalezen u *Corynebacterium glutamicum* a *Lactococcus lactis*, kde katalyzuje pouze dekarboxylaci oxalacetátu [35].

## 1.5 Reakční mechanismus katalýzy NADP-ME

Z kinetických studií mechanismu katalýzy cytoplazmatického NADP-ME (EC 1.1.1.40) z holubích jater [24] a mitochondriálního NADP-ME z lidských rakovinných buněk prsu vyplývá, že reakce katalyzovaná tímto enzymem probíhá následným uspořádaným mechanismem dvousubstrátové reakce binárním-terciárním (Bi-Ter) [25].



NADP-ME obsahuje nejméně dvě vazebná místa pro substrát, jedno pro  $\text{NADP}^+$  a druhé pro malát nebo oxalacetát. Volný NADP-ME se v buňkách vyskytuje pravděpodobně vázaný s iontem kovu (1) (Obr. 3). Nejprve se na enzym naváže první substrát  $\text{NADP}^+$  (2), který způsobí konformační změnu enzymu a poté se může vázat druhý substrát, malát. Vznikne kvarterní komplex složený z  $\text{NADP}^+$ -L-malátu-iontu kovu-enzymu (3). Deficit elektronu na  $\alpha$  atomu uhlíku malátu je vytvořen chelatací s iontem kovu a přesunem  $\text{H}^+$  iontu na  $\text{NADP}^+$ . Tento deficit způsobí přesun elektronu z  $\beta$  uhlíku a z karboxylové skupiny malátu za uvolnění prvního produktu,  $\text{CO}_2$ . Jako druhý produkt se uvolní pyruvát (4), pravděpodobně v enol formě. Nakonec se uvolní NADPH (5) a volný enzym se vrací do své původní konformace (1) [24].



Obr. 3 Navrhovaný kinetický mechanismus reakce katalyzované NADP-ME z holubích jater [24, upraveno]

## 1.6 Regulace NADP-ME

Rostlinný nefotosyntetický NADP-ME je významně regulován metabolity zapojenými do některých metabolických drah. NADP-ME z klíčící jednoděložné rostliny skočce obecného (*Ricinus communis*) je regulován vysokou hladinou intermediátů Krebsova cyklu a metabolity syntézy mastných kyselin. Acetyl-koenzym

A, palmitoyl-koenzym A, koenzym A a sukcinát silně aktivují tento NADP-ME. Aminokyseliny glutamát a glutamin, které se vyskytují v klíčícím skočci obecném (*Ricinus communis*) ve vysoké koncentraci, jsou také aktivátory NADP-ME [16].

Regulace fotosyntetických isoform NADP-ME se uskutečňuje inhibicí nadbytkem substrátu (L-malátu), ke které naopak u nefotosyntetických isoform nedochází [1]. Regulace NADP-ME byla popsána i u jiných druhů rostlin. Chloroplastová isoforma fotosyntetického NADP-ME z cukrové třtiny je aktivovaná sukcinátem při nízkých koncentracích malátu [2]. Mnoho organických kyselin je inhibítorem rostlinného NADP-ME, přičemž nejsilnější inhibiční vliv byl pozorován oxalátem a oxaloacetátem, které kompetují s malátem v aktivním centru enzymu. U chloroplastové isoformy NADP-ME z listů kukuřice byl popsán inhibiční vliv, a to především  $\alpha$ -ketoglutarátem a oxalacetátem, který je výraznější při pH 7,5 než při pH 8,4 [2]. Fruktosa-1,6-bisfosfát působí jako alosterický inhibitor C<sub>4</sub> isoformy NADP-ME z kukuřice, cukrové třtiny, čiroku a CAM rostliny *Bryophyllum tubiflorum*, zatímco u C<sub>3</sub> typu rostliny, rýže, se chová jako aktivátor. Koenzym A a thiaminpyrofosfát měly naopak inhibiční vliv na rostlinu *Bryophyllum tubiflorum*. NADP-ME z různých druhů ovoce a hlíz brambor vykazuje alosterické chování v přítomnosti organických kyselin, nejvíce v případě sukcinátu, kdy došlo k aktivaci tohoto enzymu a změně sigmoidální kinetiky na hyperbolickou [2]. Tento NADP-ME byl naopak inhibován anorganickým fosfátem a AMP. Sulfát je také inhibitor NADP-ME z kukuřice. Mnoho dvojmocných kationtů kovů se chová jako inhibitor NADP-ME. Ca<sup>2+</sup> se chová jako smíšený inhibitor v přítomnosti Mg<sup>2+</sup> jako kofaktoru. NADP-ME v cizrně s kofaktorem Mn<sup>2+</sup> je inhibován těžkými kovy Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> a Hg<sup>2+</sup> [2].

Inhibice živočišných NADP-ME jsou mnohem lépe prozkoumané než inhibice rostlinných NADP-ME [30].  $\alpha$ -ketoglutarát inhibuje jak cytoplazmatický, tak mitochondriální NADP-ME nekompetitivně. Citrát inhibuje cytoplazmatický ME kompetitivně a mitochondriální NADP-ME inhibuje jednak nekompetitivně při nízké koncentraci malátu a kompetitivně při vysoké koncentraci malátu. Z výsledků studií také vyplývá, že mitochondriální a cytoplazmatický NADP-ME v astrocytech jsou rozdílně regulovány endogenními látkami [48]. Regulace byla podrobně studována u živočišného mitochondriálního NAD-ME, který je kompetitivně inhibován ATP, a to jak vůči NAD<sup>+</sup>, tak vůči L-malátu a alostericky aktivován fumarátem [55, 56].

## 1.7 Funkce NADP-ME

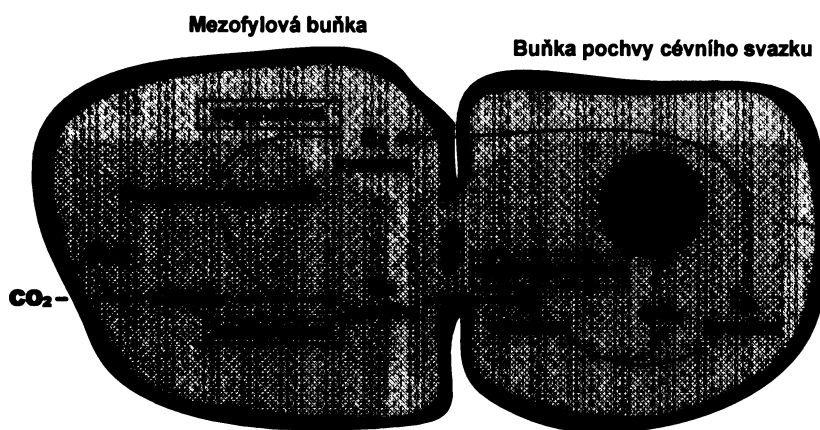
NADP-ME přítomný ve všech organismech plní řadu funkcí, neboť produkty reakce katalyzované tímto enzymem jsou zapojeny do různých metabolických drah. Je jak katalytickým enzymem (pyruvát je dále metabolizován pyruvátdehydrogenasou a je získávána energie), tak anabolickým enzymem (NADPH a pyruvát jsou využity pro biosyntetické účely) [35].

### 1.7.1 Fotosyntetická funkce NADP-ME

NADP-ME byl nalezen v mnoha rostlinách s  $C_4$  typem fixace  $CO_2$ , kde katalyzuje dekarboxylaci primárního fotosyntetického produktu – čtyřuhlíkaté karboxylové kyseliny [2].

#### 1.7.1.1 $C_4$ typ fixace oxidu uhličitého

$C_4$  rostliny jsou vhodně anatomicky uzpůsobeny ke své činnosti. Mezi povrchovými buňkami epidermu se nacházejí dvě vrstvy odlišných buněk – buňky mezofylové, kde se fixuje  $CO_2$   $C_4$  cestou a buňky pochvy cévních svazků, kde po dekarboxylaci probíhá Calvinův cyklus [9].



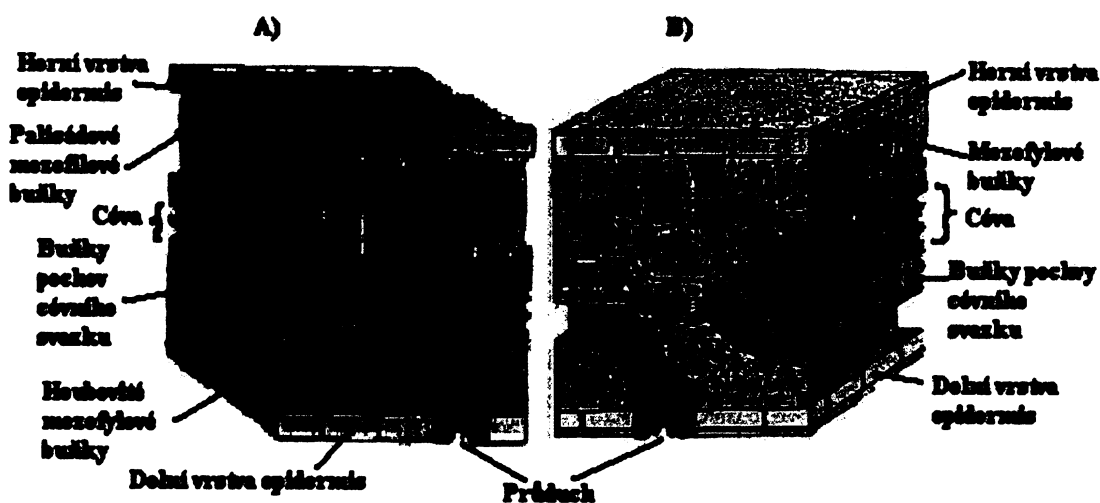
Obr. 4  $C_4$  typ fixace  $CO_2$

Rostliny tohoto typu fixují v mezofylových buňkách  $HCO_3^-$  na fosfoenolpyruvát (PEP) enzymem fosfoenolpyruvátkarboxylasou (PEPC), za vzniku oxalacetátu, tedy

čtyřuhlíkaté sloučeniny [32]. Oxalacetát může být metabolizován dvojím způsobem, buď na aspartát nebo na malát, podle čehož se  $C_4$  rostliny rozdělují na malátové a aspartátové. Dekarboxylace čtyřuhlíkatého intermediátu v buňkách pochev cévních svazků může být katalyzována NADP-dependentní malátdehydrogenasou dekarboxylační, NAD-dependentní malátdehydrogenasou dekarboxylační nebo fosfoenolpyruvátcarboxykinasou.  $CO_2$  pak vstupuje do Calvinova cyklu, který je lokalizován v buňkách pochev cévních svazků [32].

První reakcí Calvinova cyklu je zachycení anorganického  $CO_2$  a jeho vazba na ribulosu-1,5-bisfosfát (RuBP). Tato reakce je katalyzována ribulosu-1,5-bisfosfátcarboxylasou/oxygenasou (Rubisko) lokalizovanou v chloroplastech. Vzniká šestiuhlíkatý intermediát, který se velmi rychle přeměňuje na 3-fosfoglycerát. Rostliny, které využívají pouze mechanismus Calvinova cyklu se nazývají podle tohoto stabilního produktu, rostliny  $C_3$  typu. Fosfoglycerát se dále ve dvou krocích za spotřeby ATP a NADPH přeměňuje na glyceraldehyd-3-fosfát, což je klíčová sloučenina Calvinova cyklu [32].

Část trios (glyceraldehyd-3-fosfát) přechází vnější chloroplastovou membránou do cytosolu buňky, kde se přemění na fruktosu-1,6-bisfosfát. Po odštěpení fosfátu vzniká fruktosa-6-fosfát, která se řadou reakcí mění až na ribulosu-5-fosfát. K regeneraci ribulosy-5-fosfát dochází složitým procesem zahrnujícím řadu reakcí vzájemných přeměn cukrů [32].



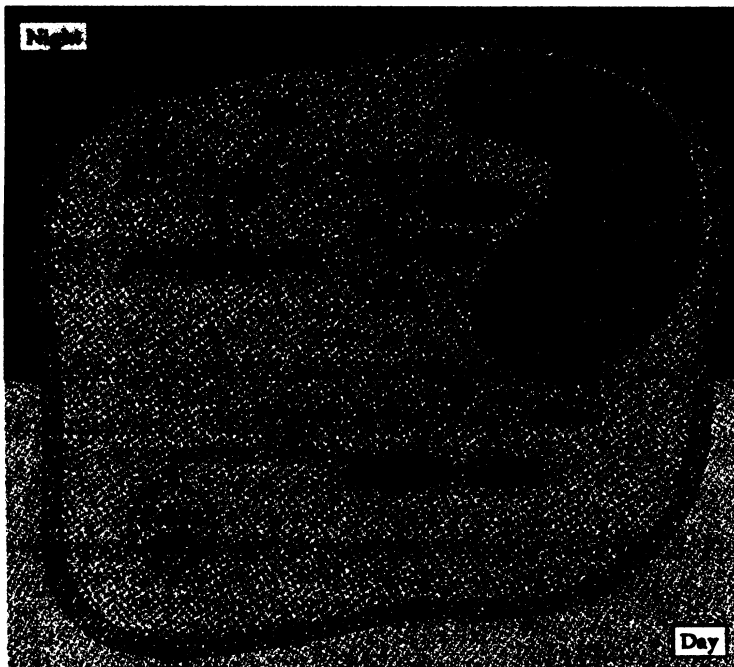
obr. 5 Porovnání anatomie listu  $C_3$  rostliny (A) a listu  $C_4$  rostliny (B), [54]

Dosud bylo objeveno velké množství rostlin využívajících  $C_4$  fixaci  $CO_2$ . Jedná se o rostliny žijící v oblastech s horkým klimatem - v tropech, pouštích. Jsou to především tropické trávy, cukrová třtina a kukuřice. Výhodou tohoto způsobu fixace  $CO_2$  je zvýšení účinnosti fixace  $CO_2$  v oblastech s vysokou sluneční radiací, s vysokými teplotami a omezenou dodávkou vody. V tropických oblastech je tento typ fotosyntézy výhodnější, i když uvedené přídatné metabolické cesty spotřebují více energie [9].

#### 1.7.1.2 CAM metabolismus

Stejně přídatné metabolické dráhy, které byly popsány u  $C_4$  typu rostlin se vyskytují také v rostlinách CAM (Crassulacean acid metabolism). Primární fixace  $CO_2$  a Calvinův cyklus zde nejsou odděleny prostorově, ale časově.

Pro rostliny z čeledi tučnolistých je charakteristický rytmus den/noc v obsahu  $C_4$ -karboxylových kyselin, zejména malátu. Přes noc se hromadí primární produkt fixace  $CO_2$  a malát se ukládá do vakuol. Ve dne dochází k jeho dekarboxylaci a uvolněný  $CO_2$  vstupuje do Calvinova cyklu [9].



obr. 6 CAM typ fixace  $CO_2$  [49]

NADP-ME může mít také funkci při fotosyntéze v některých pletivech spojených s reprodukčními orgány např. ve stěně lusku cizrny, kde je malát je hlavním produktem fixace CO<sub>2</sub>. Podobně NADP-ME v plevách pšenice by mohla hrát roli při fotosyntéze [2].

### 1.7.2 Obranná odpověď rostlin vůči stresu

Některé nefotosyntetické isoformy NADP-ME pravděpodobně hrají roli v metabolismu rostlin za stresových podmínek. Tato funkce byla zjištěna pro cytoplazmatické isoformy vyskytující se v C<sub>3</sub> rostlinách (C<sub>3(1)</sub>-NADP-ME) a pro plastidové isoformy rostlin (C<sub>4(2)</sub>-NADP-ME a C<sub>3(2)</sub>-NADP-ME) [1].

Rostliny jsou v přírodě vystaveny mnoho druhům stresu. Mezi ně patří například slané prostředí a sucho, které jsou největším problémem pro růst rostliny. Na rostlinu působí i biotické faktory – viry, bakterie, houby a jiné. Na druhou stranu si rostliny vyvinuly mnoho fyziologických a biochemických strategií, jak zvládnout tyto nepříznivé podmínky a bránit se účinkům patogenů [26]. Bylo zjištěno, že vlivem stresu aktivita NADP-ME stoupá. V kořenech sazenic kukuřice vystavených působení celulase, jasmonátu nebo houbovému elicitoru [60], které stimulují biotický stres byla dvojnásobně zvýšená aktivita NADP-ME [27]. Vzestup aktivity v rostlinách vystavených abiotickému stresu byl pozorován u fazole (*Phaseolus vulgaris*) po aplikaci kadmia [5], v listech vodních rostlin druhu *Egeria densa* po změně podmínek prostředí o nízké teplotě a světle na vysokou teplotu a osvětlení [22], v listech tabáku infikovaných viry [38], v listech oliv za podmínek solného stresu [44], taktéž v listech *Aloe vera* L. [26] a stejně tak solný a osmotický stres v listech a kořenech sazenic rýže zvyšuje aktivitu NADP-ME [11, 45].

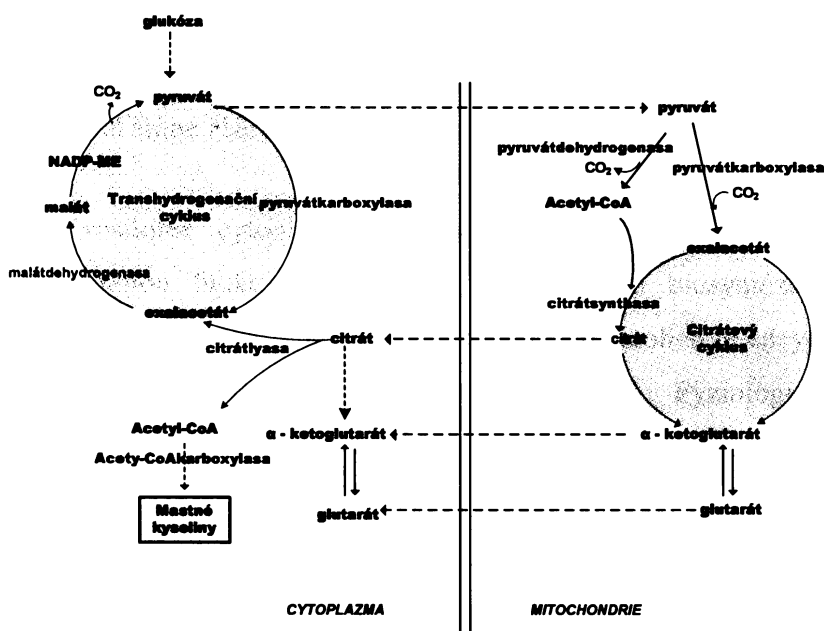
### 1.7.3 Udržování pH a další anaplerotické role NADP-ME

Cytoplazmatická isoforma NADP-ME ve spolupráci s fosfoenolpyruvátkarboxylasou reguluje intracelulární pH. NADP-ME a NAD-MDH dokáží přeměnit velké množství nahromaděných zásob karboxylových kyselin, především malátu a citrátu, čímž vyrovnávají jejich hladinu uvnitř mitochondrie

Metabolický obrat těchto karboxylových kyselin se zvyšuje v případech, kdy si stres působený vlivem životního prostředí nebo během vývoje rostliny vyžádá zvýšené množství energie nebo metabolitů na vyrovnání těchto nepříznivých stavů [2]. Při nahromadění oxalacetátu se pH uvnitř mitochondrií sníží a NAD-MDH jej začne přeměňovat na malát, čímž se může snížit nebo zcela zastavit citrátový cyklus. Malát je pak NADP-ME přeměněn na pyruvát a ten dále na oxalacetát, který vstupuje do citrátového cyklu. V případě, kdy je koncentrace oxalacetátu příliš nízká k zachování citrátového cyklu, začne se pyruvát vzniklý při glykolýze přeměňovat na oxalacetát [2].

### 1.7.4 Produkce NADPH pro biosyntetické pochody

V mnoha syntetických procesech buňky využívají redukční ekvivalenty NADPH. Příkladem je přeměna acetyl koenzymu A na mastné kyseliny, kde je právě využíván NADPH [37]. Obecně se v buňce za intenzivní syntézy mastných kyselin tvoří menší množství NADPH než je skutečná potřeba. Předpokládá se, že v tomto případě se při biosyntézách využívá NADH vytvořené v cytoplazmě buněk např. během glykolýzy. Má-li se využít NADH k syntézám, je třeba jeho transhydrogenace za vzniku NADPH [46].



Obr. 7 Vznik NADPH v transhydrogenačních reakcích [46]

Cytoplazmatický NADP-ME je zařazen do skupiny lipogenních enzymů, protože je zapojen do produkce NADPH pro biosyntézu mastných kyselin s dlouhým řetězcem [30]. Vysoká koncentrace NADP-ME byla nalezena u člověka na všech místech, kde dochází k aktivní syntéze triacylglyceridů, speciálně v jaterní a tukové tkáni [36]. NADP-ME v lidských a ptačích játrech a tukové tkáni je lokalizován téměř výhradně v cytoplazmě [37]. Lipogenní tkáně jako je bílá a hnědá tuková tkáň jsou bohatší na tento enzym než ledviny. Játra mají vyšší aktivitu NADP-ME než mozek, srdce nebo kosterní sval.

Roli NADP-ME naznačuje také změna doprovázená při dietním režimu. Aktivita NADP-ME se v játrech potkanů zvyšuje, jestliže jsou vystaveny vysoké glukosové nebo fruktosové dietě, snižuje se při hladovění a opět se zvyšuje při normálním stravování. Při diabetu stejně jako při hladovění byl zjištěn pokles rychlosti lipogeneze, jak v tukové tkáni tak i v játrech [33]. Kolísání rychlosti lipogeneze je paralelní ke změně aktivity NADP-ME. Buněčná hladina živočišných NADP-ME je udržována zejména regulací syntézy [36]. Kůra nadledvin, kde se NADP-ME účastní syntézy steroidů, je také bohatá na tento enzym [30]. NADP-ME je důležitý prostředník zapojený do transportu redukčních ekvivalentů (NADPH) z cytoplazmy do mitochondrií v kůře nadledvin [59], kde dochází k mitochondriální hydroxylaci steroidů [59]. Dále může hrát roli při mikrosomální detoxikaci xenobiotik [3]. Syntéza NADP-ME je stimulována vysokou koncentrací sacharidů, nízko - tukovou dietou, insulinem, hormony štítné žlázy a androgenem nadledvin, dehydroepiandrosteronem, zatímco syntéza je inhibována nedostatkem hormonů štítné žlázy, hladověním a glukagonem přes cAMP [36].

Ze studií rostlinné cytoplazmatické nefotosyntetické isoformy NADP-ME vyplývá, že významnou funkcí je produkce NADPH pro biosyntézu ligninu a flavonoidů [2]. Také v semenech řepky olejky a ricinových fazolích je enzym zahrnutý do biosyntézy lipidů za produkce pyruvátu a NADPH. Fyziologická funkce v dvouděložného skočce obecného (*R. communis*) je syntéza mastných kyselin [2].

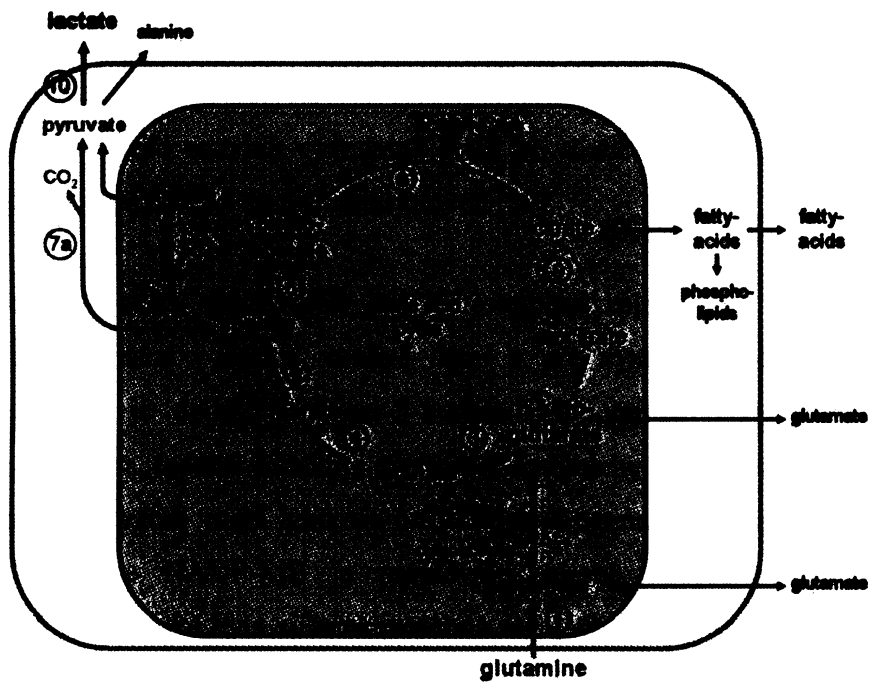
### 1.7.5 Funkce NADP-ME v nádorových buňkách

V normální tkáni NADP-ME produkuje NADPH pro biosyntézu mastných kyselin. V nádorových buňkách je ve srovnání s aktivitou NADP-ME vysoká aktivita



glukosa-6-fosfátdehydrogenasy nebo NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasy, které tvoří asi 50% cytoplazmatické aktivity. Cytoplazmatický NADP-ME je důležitý tím, že v nádorových buňkách produkuje pyruvát [12]. Nádorové buňky vykazují vyšší aktivitu NADP-ME než normální buňky [29].

Mitochondriální NAD-ME (EC 1.1.1.39) je v nádorových buňkách zapojen do glutaminolýzy, což je hlavní cesta produkce energie v těchto buňkách na místo glykolýzy [12, 47]. Hlavním zdrojem energie pro rakovinné buňky není glukosa, ale v krevní plazmě se hojně vyskytující aminokyselina glutamin, která se sledem reakcí přeměňuje až na laktát. Touto cestou dochází k produkci energie pro potřeby zkráceného citrátového cyklu (z  $\alpha$ -ketoglutarátu na malát) a k produkci intermediátů pro anabolické účely v nádorové buňce například aspartátu pro syntézu purinů - DNA [12].



Obr. 8 Glutaminolýza: reakce citrátového cyklu (znázorněny modrou barvou), reakce malát-aspartátového člunku (znázorněny hnědou barvou), enzymy silně exprimované v nádorových buňkách (znázorněny zeleno barvou). 1 - glutaminasa, 2 - GOT, 3 -  $\alpha$ -ketoglutarát dehydrogenasa, 4 - sukcinátdehydrogenasa, 5 - fumarasa, 6 - malátdehydrogenasa, 7a - cytoplazmatický NADP-ME, 7b - mitochondriální NAD-ME, 8 - citrátsynthasa, 9 - akonitasa, 10 - laktátdehydrogenasa [3]

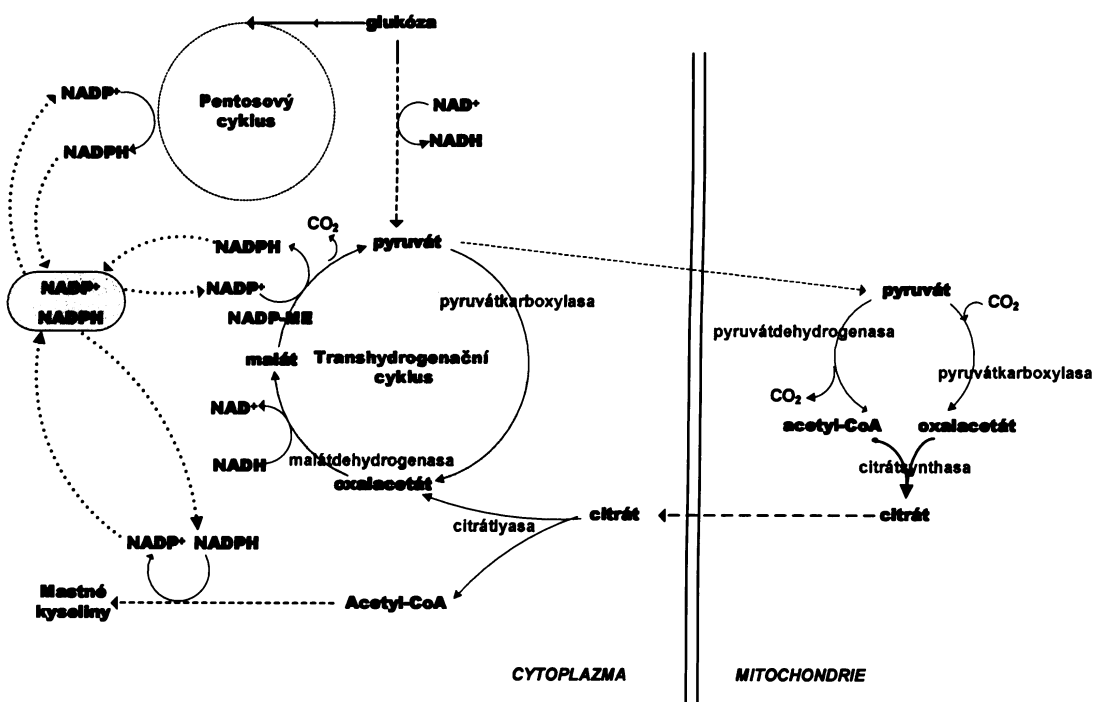
V mitochondrii může mít vzniklý malát několik možností. Přeměnu na oxalacetát za katalýzy mitochondriálního NADP-ME (EC 1.1.1.40) nebo dekarboxylaci na pyruvát pomocí mitochondriálního NAD-ME (EC 1.1.1.39) a nebo transport do cytoplazmy, kde jej cytoplazmatický NADP-ME (EC 1.1.1.40) přemění na pyruvát a následně pomocí laktátdehydrogenasy na laktát, který je vypuzen z nádorové buňky [12]. Jeden z důvodů, proč glukosa není hlavním zdrojem energie je, že pyruvát je pohotově přeměňován na laktát pomocí vysoké hladiny laktátdehydrogenasy, která je v cytosolu nádorových buněk [39].

### 1.7.6 Souvislost NADP-ME se stimulací sekrece insulinu a lipogenezi

Ukázalo se, že výrazný vliv na lipogenezi v játrech má dostupnost insulinu. Diabetes je spojován se zvýšenou schopností jater přeměňovat sacharidy na mastné kyseliny a triacylglyceridy, zatímco dostupností insulinu v pokusných diabetických zvířatech se tato porucha zvrátí. Za tyto změny odpovídá změna aktivity lipogenních enzymů. Aktivita těchto enzymů významně klesá při diabetu, zatímco při insulinové léčbě se hladina enzymů vrací na normální úroveň [39].

Pentozový cyklus může plnit dvě fyziologické role. První je poskytování NADPH pro lipogenezi v játrech, tukové tkáni a pro syntézu cholesterolu v kůře nadledvin a druhá je dodávání ribosa-5-fosfátu pro syntézu nukleových kyselin v rostoucích buňkách. Insulin indukuje glukosa-6-fosfátdehydrogenasu a NADP-ME. Byl objeven úzký vztah mezi glukosa-6-fosfátdehydrogenasou a lipogenezi. Bylo zjištěno, že indukce NADP-ME je regulována přesně opačně než glukosa-6-fosfátdehydrogenasa a také byla zjištěna podobná regulace mezi rostoucími buňkami a lipogenezi indukovanou různými hormony. Např.: epidermální růstový faktor (EGF) indukuje glukosa-6-fosfátdehydrogenasu, zatímco indukce NADP-ME, je potlačena [42].

V ptačích játrech je malá část NADPH dodávána pentozovým cyklem. Na rozdíl v játrech krys živých i hladovějících byla  $\frac{1}{2}$  -  $\frac{3}{4}$  celkového NADPH potřebného pro lipogenezi, produkována pentozovou cestou. V těchto krysích jaterních buňkách se zablokováním NADP-ME aktivity zvýšila závislost lipogeneze na pentosovém cyklu. [42].



obr. 9 Vztah mezi pentozovým cyklem, pyruvátovým cyklem a lipogenezí [46]

V kuřecích jaterních buňkách je NADPH pro lipogenezi dodáváno díky NADP-ME. Naopak v krysích játrech je NADPH dodáváno jak NADP-ME, tak i pentozovým cyklem. V hepatocytech je růst stimulován tvorbou ribosa-5-fosfátem a také zvýšením NADPH, přičemž je využití NADPH pro lipogenezi potlačeno. Tak může být NADPH využito pro růst a anabolické děje jako je syntéza membránového cholesterolu. Insulin i EGF podporují růst hepatocytů. Insulin stimuluje lipogenezi více než růst, zatímco EGF stimuluje pouze růst a potlačuje efekt insulínu na lipogenezi [42].

## 2 Cíl práce

1. Purifikace NADP-dependentní malátdehydrogenasy dekarboxylační (NADP-ME) z listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana, SR1).
2. Studium mechanismu dvousubstrátové reakce katalyzované NADP-ME.
3. Sledování vlivu různých metabolitů na aktivitu NADP-ME.
4. Určení typu inhibice a inhibičních konstant pro inhibitor GTP, a to vůči substrátům L-malátu a  $\text{NADP}^+$  v přítomnosti jak  $\text{Mg}^{2+}$ , tak  $\text{Mn}^{2+}$  iontů.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

2',5'-ADP-Sepharosa 4B – Amersham Pharmacia Biotech, Anglie  
3-fosfoglycerát sodný – Sigma, USA  
Acetyl-koenzym A – Sigma, USA  
ADP – Sigma, USA  
Akrylamid – Sigma, USA  
Aspartát sodný – Sigma, USA  
ATP – Sigma, USA  
Bradfordovo činidlo – Sigma, USA  
Coomassie Brilliant Blue R 250, G 250 – Sigma, USA  
DEAE-celulosa – Whatman, USA  
Dithiothreitol (DTT) – Sigma, USA  
Dodecylsulfát sodný (SDS) – Serva, Německo  
Fenazin methosulfát – Sigma, USA  
Fosfoenolpyruvát sodný – Sigma, USA  
Fumarát sodný – Sigma, USA  
Glukosa-6-fosfát – Sigma, USA  
Glutamát sodný – Sigma, USA  
Glutamin sodný – Sigma, USA  
GTP – Sigma, USA  
HEPES – Sigma, USA  
Koenzym A – Sigma, USA  
L-malát sodný – Sigma, USA  
MOPS – Sigma, USA  
N,N,N',N' – tetramethylenethylendiamin (TEMED) – Serva, Německo  
N,N'-methylenbisakrylamid – Serva, Německo  
NAD<sup>+</sup> - Sigma, USA  
NADH - Sigma, USA  
NADP<sup>+</sup> - Sigma, USA

NADPH - Sigma, USA  
Nitroblue tetrazolium chlorid – Sigma, USA  
Ostatní chemikálie – Lachema, ČR; Sigma, USA  
Oxalacetát - Sigma, USA  
Palmitoyl-koenzym A - Sigma, USA  
Percol - Sigma, USA  
Phenazin methosulfát - Sigma, USA  
Polyvinylpyrrolidon (PV P) - Sigma, USA  
Pyruvát sodný - Sigma, USA  
Sephacryl S300 – Pharmacia, Švédsko  
Sephadex G200 - Pharmacia, Švédsko  
Standardní proteiny o molekulové hmotnosti 29000-97000 – Serva, Německo  
Sukcinát sodný - Sigma, USA  
Tablety 5-bromo-4-chloro-3-indoylfosfát/nitroblue tetrazolium - Sigma, USA  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Serva, Německo  
 $\alpha$ -ketoglutarát sodný – Sigma, USA

## 3.2 Přístroje

Analytické váhy 100 A – Denver instrument Company, USA  
Centrifuga Jetřich Universal 32R – Hettich, Německo  
Elektroforetická souprava Multigel G-44 – Biometra, Německo  
Elektromagnetická míchačka KMO 2 basic – Labortechnik, Německo  
Homogenizátor Turrax DI18 – IKA, Německo  
Mikroskop Nikon eclipse TE2000-U - Japonsko  
Mísič gradientu GM-1 – Pharmacia, Švédsko  
Peristaltická pumpa P-1 – Pharmacia, Švédsko  
PH metr Ultrabasic UB 10 – Denver instrument Company, USA  
Sběrač frakcí FCC 61 – Laboratorní přístroje Praha, ČR  
Spektrofotometr Hélios  $\alpha$  – Hermo Spectronic, USA  
Spektrofotometr Ultrospec 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech, Anglie  
Vortex KMO – Labortechnik, Německo

### 3.3 Rostlinný materiál

Jako modelové rostliny byly použity rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1).



Obr. 10 Sedmítýdenní sazenice tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)

### 3.4 Lokalizace NADP-ME *in vivo*

#### 3.4.1 Izolace chloroplastů z *Nicotina tabacum* L.

Čerstvé horní listy tabáku (*Nicotina tabacum* L.) byly homogenizovány ve vychlazené třecí misce s pětinasobkem izolačního media obsahujícího 330 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitol, 50 mmol.l<sup>-1</sup> HEPES – KOH pufr (pH 7,5), 2 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA, 1 mmol.l<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>, 1 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 15 mM DTT a 0,5% BSA, předem vychlazeného na konzistenci tajícího ledu. Poté byl homogenát centrifugován při 1000 x g po dobu 2 minuty při teplotě 4°C. Supernatant (tj. rozpustná frakce) byl centrifugován při 16 600 x g po dobu 15 minut při teplotě 4°C a poté přefiltrován přes molekulové síto o velikosti pórů 80 μm. Sediment (tj. chloroplastová frakce) byl skleněnou tyčinkou obalenou vatou opatrně resuspendován asi v 1 ml resuspendačního media obsahujícího 330 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitol a 25 mmol.l<sup>-1</sup> HEPES – KOH pufr (pH 7,5). Dále byla na dno kyvety pipetována vrstva 80% roztoku Percol a na něj vrstva 40% roztoku Percol a poslední vrstvu tvořil resuspendovaný sediment. Následovala centrifugace při 1000 x g, po dobu 15 minut, při 4°C. Pasteurovou pipetou byla odsáta chloroplastová frakce, která během

centrifugace klesla na rozhraní roztoků Percol o rozdílných koncentracích. Chloroplastová frakce byla opět resuspendována v malém množství resuspendačního media a centrifugována při 1000 x g, po dobu 3 min, při 4°C. Intaktní chloroplasty byly resuspendovány v resuspendačním médiu. Rozpustné bílkoviny z chloroplastů byly získány resuspendací v pufru Tris-HCl (pH 7,4), popř. ultrazvukovou lázní, kdy došlo k vylití obsahu chloroplastů. Během celé izolace byl preparát uchovávan v chladu o teplotě 0 – 4°C.

### 3.4.2 Detekce aktivity NADP-ME v buněčných frakcích

Aktivita NADP-ME byla v chloroplastové i cytosolové frakci detekována v reakční směsi obsahující 100 mmol.l<sup>-1</sup> Tris – HCl pufr (pH 7,4), 10 mmol.l<sup>-1</sup> L-malát, 10 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol.l<sup>-1</sup> NADP a 0,1 mg/ml nitroblue tetrazolium (poskytuje modro-fialové zbarvení) s 5μg/ml fenazin methosulfátem [27] nebo 5,1 mg/ml jodonitrotetrazoliové violeti (poskytuje červené zbarvení) s 5μg/ml fenazin methosulfátem. Lokalizace NADP-ME byla pozorována mikroskopicky mikroskopem Nikon eclipse TE2000-U.

## 3.5 Purifikace NADP-ME z listů *Nicotina tabacum* L.

### 3.5.1 Příprava rostlinného extraktu

Horní listy tabáku (30 g) byly homogenizovány v třecí misce s tloučkem v trojnásobném množství vychlazeného extrakčního pufru A obsahujícího 100 mmol.l<sup>-1</sup> pufr Tris–HCl (pH 7,8), 1 mmol.l<sup>-1</sup> DTT, 1 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA, 5 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol. K homogenátu byl přidán 1g PVP a poté byl centrifugován při 9000 RPM (9400 x g) při 4°C po dobu 30 minut. Supernatant byl označen jako hrubý extrakt a byla v něm změřena aktivita NADP-ME a množství bílkovin.

### 3.5.2 Srážení síranem amonným

Hrubý extrakt byl sražen síranem amonným do 35% nasycení. Poté byla



provedena centrifugace při 9000 RPM (9400 x g) při 4°C po dobu 30 minut. Supernatant byl srážen do 55% nasycení a centrifugován za stejných podmínek. Po resuspendaci sedimentu v pufru B obsahujícího 25 mmol.l<sup>-1</sup> Tris – HCl pufr (pH 7,8), 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> DTT, 1 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA, 5 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol byla změřena aktivita NADP-ME a množství bílkovin.

### 3.5.3 Dialýza

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

### 3.5.4 Ionexová chromatografie

Odsolený enzymový preparát byl aplikován na kolonu DEAE - celulosy (o velikosti 1,5 x 10 cm) ekvilibrovanou pufrům B. Po promytí kolony pufrům B byly eluovány nezachycené bílkoviny, poté byla provedena eluce lineárním gradientem NaCl v pufru B (0-300 mmol.l<sup>-1</sup>) průtokovou rychlostí 1 ml/min. Ve všech frakcích byla změřena absorbance při 280 nm a aktivita NADP-ME. Slité aktivní frakce byly sraženy síranem amonným do 80% nasycení a poté byly centrifugovány při 9400 x g při 4°C po dobu 30 minut. Sediment byl resuspendován v minimálním množství pufru B (80 µl).

### 3.5.5 Gelová chromatografie

Gelová chromatografie byla provedena na koloně naplněné chromatografickým materiálem Sephacryl S 300 (velikost 1,5 x 65 cm). Eluce probíhala pufrům B průtokovou rychlostí 0,1 ml/min. V eluovaných frakcích byla změřena absorbance při 280 nm, stanovena aktivita NADP-ME a množství bílkovin.

Gelová filtrace byla také provedena na koloně Superdex 200 HR 10/300 GL (ÄKTA HPLC systém). Aktivní frakce NADP-ME po afinitní chromatografii byly koncentrovány na 200 µl pomocí kyvet Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (zachycující proteiny o velikosti větší jak 100 kDa) a aplikovány na předem

ekvilibrovanou kolonu pufrém B. NADP-ME byl eluován pufrém B průtokovou rychlostí 0.5 ml/min.

### 3.5.6 Afinitní chromatografie

Chromatografická kolona (1 x 8 cm) obsahující nosič 2',5'-ADP Sepharosa 4B byla ekvilibrována adsorpčním pufrém, který obsahoval pufrém B s obsahem 5 mmol.l<sup>-1</sup> malátu. Po aplikaci vzorku, do kterého byl přidán 5 mmol.l<sup>-1</sup> malát byla kolona opět promývána pufrém B s 5 mmol.l<sup>-1</sup> malátem. Eluce byla provedena pufrém C (tj. pufr B bez obsahu Mg<sup>2+</sup>) [50]. V eluovaných frakcích byla změřena absorbance při 280 nm a poté byla stanovena aktivita NADP-ME.

## 3.6 Stanovení množství bílkovin

Bílkoviny byly stanoveny metodou podle Bradfordové, která je založena na změně absorpčního maxima ze 465 nm na 595 nm barvy Coomassie Brilliant Blue R 250 a Coomassie Brilliant Blue G 250 po vytvoření komplexu s proteinem. Množství proteinů bylo stanoveno spektrofotometricky při 595 nm. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 0,25 - 1,4 mg.ml<sup>-1</sup> [22].

## 3.7 Metody stanovení enzymové aktivity

### 3.7.1 Stanovení aktivity NADP-ME

Enzymová aktivita NADP-ME byla stanovena spektrofotometricky, kdy vzestup absorbance při 340 nm za dobu 3min byl přímo úměrný koncentraci vzniklého redukovaného koenzymu NADPH. Bylo měřeno na spektrofotometru Ultrospec 2100 délka kyvety 1 cm, objem reakční směsi 1ml. Reakce byla vždy startována přidáním příslušného množství enzymu. Reakční směs pro stanovení aktivity NADP-ME obsahovala vždy 100 mmol l<sup>-1</sup> pufr Tris-HCl (pH 7,4), 10 mmol l<sup>-1</sup> L-malát, 2 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mmol l<sup>-1</sup> NADP<sup>+</sup> a 50 μl roztoku enzymu. Aktivita byla vyjadřována v mikromolech přeměněného substrátu za 1 minutu, ( $\epsilon = 6200 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.7.2 Stanovení aktivity MDH

Aktivita MDH byla měřena spektrofotometricky při 340 nm při 21°C po dobu 3 minut sledováním úbytku NADH spotřebovaného na redukci oxalacetátu na malát. 1 ml reakční směsi obsahoval 100 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufr (pH 8,1), 10 mmol.l<sup>-1</sup> oxalacetát, 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> NADH a 5 µl roztoku enzymu. Aktivita byla vyjadřována v mikromolech přeměněného substrátu za 1 minutu, ( $\epsilon = 6200 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.7.3 Stanovení aktivity PEPC

Aktivita PEPC byla stanovena v 1 ml reakční směsi obsahující 100 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufr (pH 8,1), 5 mmol.l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 2 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> NADH a 2 mmol.l<sup>-1</sup> PEP. Reakce byla startována 20 µl roztoku enzymu. Spektrofotometricky byl sledován úbytek NADH při 340 nm po dobu 3 minut při 21°C. Ke stanovení byla využita spřažená reakce, ve které je vznikající oxalacetát redukován pomocí NADH a NAD-MDH na malát, přičemž NAD-MDH je přítomna v dostatečném množství v extraktu. Aktivita byla vyjadřována v mikromolech přeměněného substrátu za 1 minutu, ( $\epsilon = 6200 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

## 3.8 Kinetické metody

### 3.8.1 Určení mechanismu dvousubstrátové reakce

Reakční směs pro určení mechanismu dvousubstrátové reakce katalyzované NADP-ME obsahovala 80 mmol.l<sup>-1</sup> MOPS-20 mmol.l<sup>-1</sup> octan sodný-NaOH pufr (pH 7,4), 1 - 16 mmol.l<sup>-1</sup> L-malát, 0,4 - 4 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> a 0,03 - 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> NADP<sup>+</sup> v 1 ml reakční směsi. Pro určení kinetických parametrů byla změřena rychlost reakce katalyzované NADP-ME v reakční směsi pro pět různých koncentrací substrátu (malátu) a pět různých koncentrací druhého substrátu (NADP<sup>+</sup>). V každé sérii měření byla zvolena jedna fixní koncentrace kofaktoru Mg<sup>2+</sup> (4; 2; 1; 0,5 a 0,4 mmol.l<sup>-1</sup>). Hodnoty volného L-malátu nebo volného NADP<sup>+</sup> byly vypočítány z hodnot asociačních konstant komplexu L-malát-Mg<sup>2+</sup> ( $\log \beta = 1,55$ ) a NADP<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> ( $\log \beta = 1,72$ ).

Mechanismus reakce katalyzované NADP-ME byl určen z primárních a sekundárních grafů a výpočtem z rovnic pro následný (sekvenční) kinetický mechanismus (1) a ping-pongový kinetický mechanismus (2) [51, 63]. Experimentální data byla zpracována nelineární regresí v programu MS Excel.

$$v_0 = \frac{V_{\text{lim}} \cdot [A] \cdot [B]}{[B] \cdot K_{mA} + [A] \cdot K_{mB} + [A] \cdot [B] + K_A \cdot K_{mB}} \quad (1)$$

$$v_0 = \frac{V_{\text{lim}} \cdot [A] \cdot [B]}{K_{mA} \cdot [B] + K_{mB} \cdot [A] + [A] \cdot [B]}, \quad (2)$$

kde  $v_0$  značí počáteční rychlost reakce,  $V_{\text{lim}}$  odpovídá maximální rychlosti reakce,  $K_{mA}$  je Michaelisova konstanta pro substrát A,  $K_{mB}$  je Michaelisova konstanta pro substrát B,  $[A]$  je koncentrace substrátu A (NADP<sup>+</sup>),  $[B]$  je koncentrace substrátu B (L-malátu) a  $K_A$  je disociační konstanta pro komplex enzym-substrát A.

Rozlišení následného uspořádaného a následného neuspořádaného mechanismu bylo určeno vnesením konstanty  $K'$  vůči koncentracím substrátu L-malátu nebo NADP. Konstanty  $K'$  byly vypočítány podle vzorců (3) a (4) [63].

$$K' = \frac{\alpha K_m^A [B]}{K_m^B + [B]} \quad (3)$$

$$K' = \frac{K_m^B [A]}{\alpha K_m^A + [A]}, \quad (4)$$

kde  $K_m^A$  je Michaelisova konstanta pro substrát A,  $K_m^B$  je Michaelisova konstanta pro substrát B,  $[A]$  je koncentrace substrátu A,  $[B]$  je koncentrace substrátu B.

### 3.8.2 Sledování vlivu metabolitů na aktivitu NADP-ME

Byl sledován vliv puruvátu,  $\alpha$ -ketoglutarátu, sukcinátu, fumarátu, fosfoenolpyruvátu, glukosa-6-fosfátu, 3-fosfoglycerátu, glutamátu, glutaminu, aspartátu, ATP, ADP a GTP, které byly testovány při 5 mmol.l<sup>-1</sup> koncentraci v reakční směsi. Dále byl testován koenzym A, acetyl-koenzym A a palmitoyl-koenzym při 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> koncentraci v reakční směsi. Vliv metabolitů na aktivitu NADP-ME byl měřen ve třech reakčních směsích. Saturační reakční směs pro stanovení vlivu látek na aktivitu NADP-ME obsahovala 80 mmol.l<sup>-1</sup> MOPS-20 mmol.l<sup>-1</sup> octan sodný-NaOH pufr (pH 7,4), 16 mmol.l<sup>-1</sup> L-malát, 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> NADP<sup>+</sup> a 4 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> na 1 ml reakční směsi. Reakční směs s nižší koncentrací malátu pro stanovení vlivu látek na aktivitu NADP-ME obsahovala 80 mmol.l<sup>-1</sup> MOPS-20 mmol.l<sup>-1</sup> octan sodný-NaOH pufr (pH 7.4), 2 mmol.l<sup>-1</sup> L-malát, 0.2 mmol.l<sup>-1</sup> NADP<sup>+</sup> a 4 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> na 1 ml reakční směsi. Reakční směs s nižším obsahem NADP<sup>+</sup> obsahovala 80 mmol.l<sup>-1</sup> MOPS-20 mmol.l<sup>-1</sup> octan sodný-NaOH pufr (pH 7.4), 16 mmol.l<sup>-1</sup> L-malát, 0.05 mmol.l<sup>-1</sup> NADP<sup>+</sup> a 4 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> na 1 ml reakční směsi. Reakce byla vždy startována přidavkem 50  $\mu$ l enzymu. Aktivita NADP-ME byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při 340 nm na přístroji Hellios  $\alpha$ , Thermo Spectronic při teplotě 21°C po dobu 5 minut. 100% odpovídá aktivitě NADP-ME bez přidavku metabolitu.

### 3.8.3 Inhibiční studie

Inhibiční konstanty a typ inhibice NADP-ME pro GTP byl určen vůči substrátům L-malátu nebo NADP<sup>+</sup> v přítomnosti dvojmocných kationtů kovů Mg<sup>2+</sup> nebo Mn<sup>2+</sup> jako kofaktorů enzymu.

Byla měřena závislost rychlosti reakce NADP-ME na koncentraci L-malátu (NADP<sup>+</sup>)v přítomnosti volného inhibitoru. Závislost rychlosti reakce NADP-ME byla měřena s pěti různými koncentracemi L-malátu (16, 8, 4, 2, 1 mmol.l<sup>-1</sup>) a s pěti různými koncentracemi NADP<sup>+</sup> (0,2; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02 mmol.l<sup>-1</sup>) v přítomnosti třech koncentrací GTP (3, 2, 1, 0 mmol.l<sup>-1</sup>). Reakční směs pro sledování inhibičních studií NADP-ME obsahovala 80 mmol.l<sup>-1</sup> MOPS-20 mmol.l<sup>-1</sup> octan sodný-NaOH pufr

(pH 7,4), 1 - 16 mmol.l<sup>-1</sup> L-malát, 2 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> (0,1 mmol.l<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>) a 0,02 - 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> NADP<sup>+</sup> na 1 ml reakční směsi.

Reakce byla vždy startována přidavkem 50 µl enzymu. Rychlost reakce NADP-ME byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance NADPH při 340 nm na přístroji Hellios α, Thermo Spectronic při teplotě 21°C. Hodnoty volného GTP byly vypočítány z hodnot asociačních konstant komplexu GTP-Mg<sup>2+</sup> (log β = 4,31), GTP-Mn<sup>2+</sup> (log β = 5,36). Grafická analýza určení typu inhibice a inhibičních konstant byla provedena vynesemím experimentálních dat dle Lineweavera - Burka, dle Dixona, dle Woolf - Augustinsson - Hoffsteeho, dle Hanese - Wolfa,. Hodnoty inhibičních konstant byly získány jednak ze sekundárních grafů vynesemím směrnic respektive úseků proti koncentracím inhibitoru a jednak výpočtem. Inhibiční konstanty byly vypočítány nelineární regresí proložemím experimentálních dat rovnicemi pro jednotlivé typy inhibic - rovnicí pro nekompetitivní inhibici (1), rovnicí pro kompetitivní inhibici (2) a rovnicí pro smíšenou inhibici (3) [51, 64].

$$v = \frac{V_{\text{lim}}[A]}{(K_m + [A])\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (1)$$

$$v = \frac{V_{\text{lim}}[A]}{K_m\left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [A]} \quad (2)$$

$$v = \frac{V_{\text{lim}}[A]}{K_m\left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)[A]}, \quad (3)$$

kde  $V_{\text{lim}}$  odpovídá maximální rychlosti reakce,  $[A]$  je koncentrace substrátu,  $[I]$  odpovídá koncentraci inhibitoru,  $K_m$  je Michaelisova konstanta pro substrát,  $K_{ic}$ ,  $K_{iu}$  jsou inhibiční konstanty. Zpracování experimentálních dat nelineární regresí bylo provedeno v programu MS Excel.

## 3.9 Elektroforetické metody

### 3.9.1 Příprava vzorků pro elektroforetické separace

Pro nativní elektroforézu byly připraveny extrakty z listů tabáku (*Nicotina tabacum* L.) a to cytosolové a chloroplastové frakce. Vzorky byly nanесeny po 25  $\mu\text{l}$  ve 20% sacharose pomocí Hamiltonovy stříkačky.

Pro elektroforézu v SDS prostředí bylo 300  $\mu\text{l}$  vzorku po afinitní chromatografii nejdříve sraženo trojnásobným objemem ethanolu, poté centrifugováno při 15 000 RPM (16 600 x g), 15 min při 4°C a sedimenty byly resuspendovány s 15  $\mu\text{l}$  destilované vody a s 15  $\mu\text{l}$  vzorkového pufru obsahujícího 0,5 mol  $\text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufr (pH 6,8), 100 mmol  $\text{l}^{-1}$  DTT, 70 mmol  $\text{l}^{-1}$  SDS, 20% glycerol, 0,005% bromfenolovou modř a poté kvantitativně aplikovány.

### 3.9.2 Elektroforéza nativní

Nativní elektroforéza byla provedena v 6% separačním gelu, který obsahoval 6% akrylamid a N,N'-metylenbisakrylamid; 3,8 ml 1,5 mmol  $\text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufru (pH 8,8); 0,15 ml 10% glycerolu; 0,15 ml 10% persíranu amonného a 0,012 ml roztoku TEMED. Dále byl použit 3% zaostřovací gel, který obsahoval 3% akrylamid a N,N'-metylen-bis (akrylamid); 0,5 ml 15 mmol  $\text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufru (pH 6,8); 0,04 ml 10% glycerolu; 0,008 ml roztoku TEMED a 0,04 ml 10% persíranu amonného. Použitý elektrodový pufr obsahoval 18,8 g glycinu; 3g Tris a 10 ml 10% glycerolu ve 1000 ml destilované vody. Před spuštěním elektroforézy bylo aplikováno do jamek 25  $\mu\text{l}$  vzorku ve 20% sacharose pomocí Hamiltonovy stříkačky. Elektroforetické dělení nejprve probíhalo při 70 V, po dosažení hranice separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 140 V [10].

### 3.9.3 SDS - PAGE

SDS elektroforéza byla provedena podle Laemmliho [14] v 10% separačním gelu, který obsahoval 10% akrylamid a N,N'-metylen-bis (akrylamid); 3,8 ml 1,5 mmol  $\text{l}^{-1}$  Tris-HCl pufru (pH 8,8), 10% persíran amonný, 0,006 ml roztoku TEMED,

0,15 ml 10% SDS. A v 5% zaostřovacím gelu obsahujícím 5% akrylamid a N,N'-metylen-bis (akrylamid); 0,63 ml 1 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufru (pH 6,8); 0,05 ml 10% SDS; 0,05 ml 10% persíranu amonného a 0,005 ml roztoku TEMED.

Rostlinné preparáty a standardní bílkoviny byly povařeny 5 min na vodní lázni, poté byly dávkovány po 10 µl pomocí Hamiltonovy stříkačky do elektroforetických jamek. Elektrodotový pufr obsahoval 18,8 g glycinu, 3 g Tris, 1g SDS v 1000 ml destilované vody. Elektroforetická separace probíhala při stejném napětí jako u nativní elektroforézy.

### 3.9.4 Detekce aktivity NADP–ME v gelu

Detekce aktivity NADP–ME probíhala za laboratorní teploty ve 20 ml inkubační lázni obsahující 8 ml 250 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufru (pH 7,4), 2 ml 100 mmol.l<sup>-1</sup> L-malátu, 2ml 100 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 30 mg NADP<sup>+</sup>, 2 ml 1 mg/ml nitroblue tetrazolium, 50 µl phenazin methosulfátu [24].

### 3.9.5 Detekce proteinů v gelu

Detekce proteinů probíhala v lázni obsahující 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250, 425 ml ethanolu, 50 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové a 425 ml destilované vody. Poté následovalo několikanásobné odbarvování roztokem obsahující methanol, kyselinu octovou a redestilovanou vodu v poměru 25 : 10 : 65.



## 4 Výsledky

### 4.1 Buněčná lokalizace NADP-ME v listech tabáku

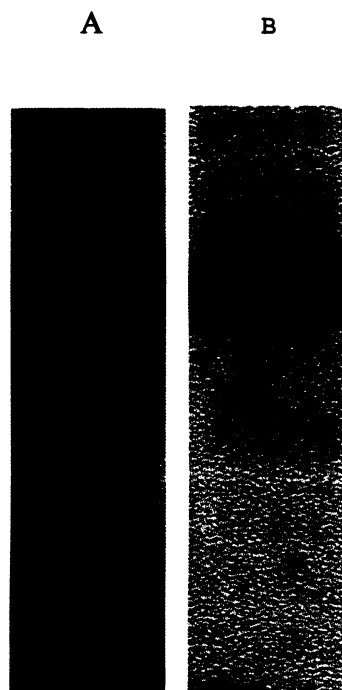
V buněčných frakcích se NADP-ME vyskytují v cytoplazmě a/nebo v chloroplastech [2]. Aby bylo zjištěno, jaká je situace v listech tabáku, byly separovány chloroplasty a rozpustná cytoplazmatická frakce postupem uvedeným v kapitole 1.2.1.

V chloroplastech i v cytoplazmatické frakci byla změřena aktivita PEPC, enzymu, který je cytoplazmatický a jeho aktivita může sloužit ke kontrole intaktnosti připravených chloroplastů. Z tabulky 1 je patrné, že aktivita PEPC v připravených chloroplastech byla velmi nízká, frakce chloroplastů nebyla tedy kontaminována cytoplazmatickými proteiny. V těchto frakcích byla také stanovena aktivita NADP-ME a NAD-MDH. Tabulka 1 dokumentuje, že vyšší aktivita NADP-ME je v cytoplazmě, zatímco tato enzymová aktivita přítomná také v chloroplastech je nejméně pětkrát nižší. V obou frakcích byla zjištěna i aktivita NAD-MDH. V porovnání s aktivitou NADP-ME a PEPC měla NAD-MDH asi pětkrát vyšší aktivitu v cytoplazmě a třikrát vyšší aktivitu v chloroplastech. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1.

**Tabulka 1** Distribuce aktivity některých enzymů v buněčných frakcích tabáku

Aktivita enzymu [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{ ml}^{-1}$ ]	NADP-ME	NAD-MHD	PEPC
Cytoplazma	0,010	0,049	0,011
Chloroplasty	0,002	0,006	0,001

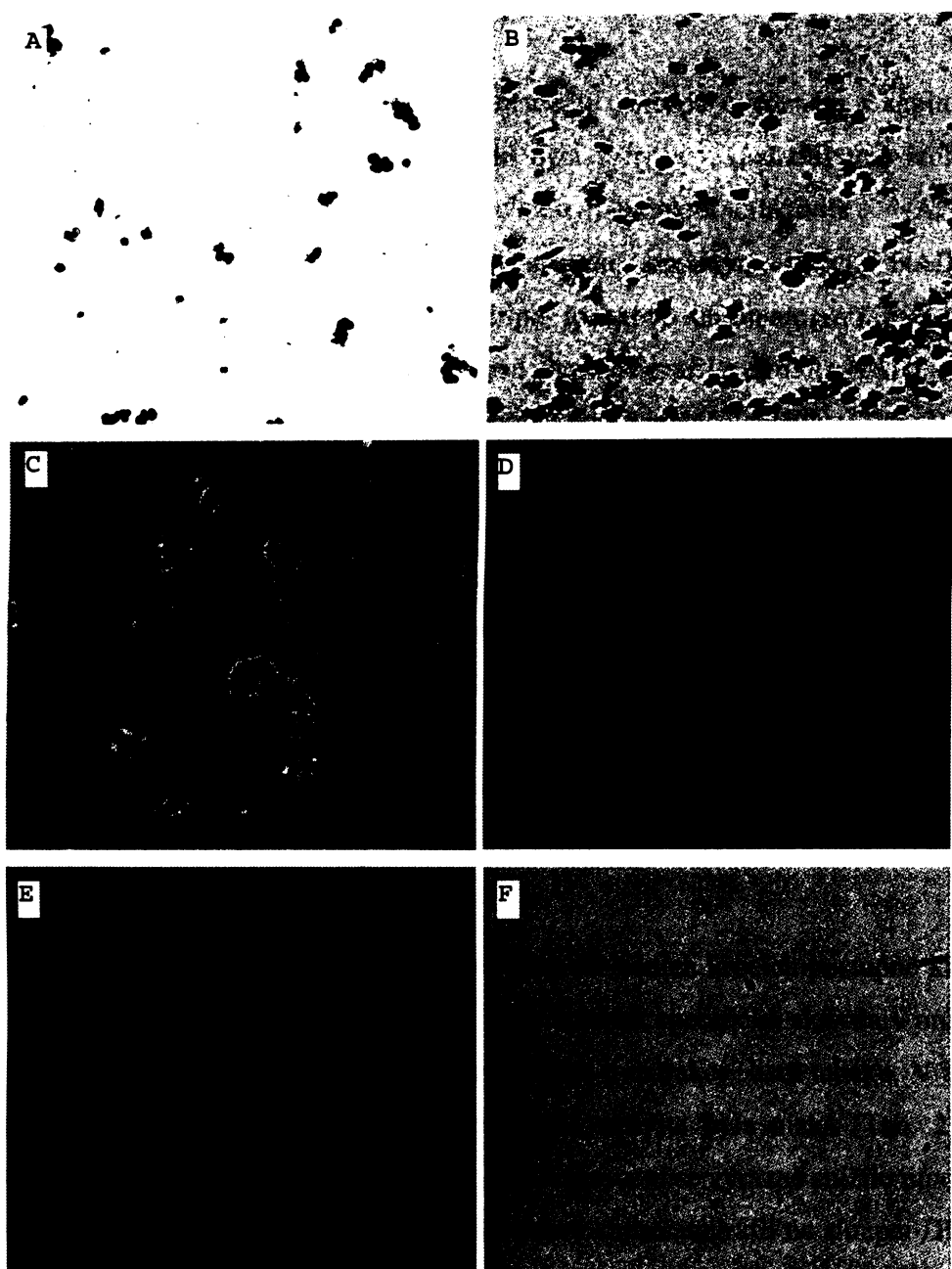
Aktivita NADP-ME byla také detekována v gelu po elektroforetické separaci za nedenaturujících podmínek. Na obrázku 11 je NADP-ME vizualizován v cytosolové frakci obarvené nitroblue tetrazolium s fenazin methosulfátem (11A) a jodonitrotetrazoliovou violetí s fenazin methosulfátem (11B). Chloroplastová frakce není uvedena, neboť enzymová aktivita je příliš nízká, je pod mezí detekce této metody.



Obr. 11 Detekce aktivity NADP-ME po nativní elektroforéze v 6% polyakrylamidovém gelu za nedenedaturujících podmínek. Detekce NADP-ME v cytoplazmatické frakci z listů tabáku pomocí jodonitrotetrazoliové violeti s fenazin methosulfátem (A) a pomocí barvy nitroblue tetrazolium s fenazin methosulfátem (B).

Intaktní chloroplasty i cytoplazmatická frakce byly barveny stejnou technikou jako při detekci aktivity NADP-ME v gelu po elektroforetické separaci a studovány mikroskopicky. Detekce NADP-ME v chloroplastech byla provedena pomocí barvy nitroblue tetrazolium s fenazin methosulfátem, přičemž tmavě modrá barva na obrázku (12A) odpovídá aktivitě NADP-ME v chloroplastech. Jako kontrola byly použity intaktní chloroplasty na obrázku (12B, C) a rozbité chloroplasty na obrázku (12D).

NADP-ME v cytoplazmě byl detekován pomocí jodonitrotetrazoliové violeti s fenazin methosulfátem, která poskytuje červené zbarvení odpovídající aktivitě NADP-ME, obrázek (12E). Jako kontrola byla použita cytoplazma na obrázku (12F).



Obr. 12 Fázový kontrast mikrosnímků (mikroskop Nikon eclipse TE2000-U). Zvětšení 400 x: detekce NADP-ME v chloroplastech barvou nitroblue tetrazolium s fenazin methosulfátem (A), intaktní chloroplasty (B), vylitý obsah chloroplastů (D), detekce NADP-ME v cytoplazmě jodonitrotetrazoliovou violetí s fenazin methosulfátem (E), cytoplazma (F). Zvětšení 1000x: intaktní chloroplasty (C)

## 4.2 Izolace NADP-ME z listů tabáku (*Nicotina tabacum* L.)

Z horních listů tabáku byl podle izolačního postupu uvedeném v kapitole 1.3 připraven enzym NADP-ME, jehož aktivita byla měřena po jednotlivých izolačních krocích. Byla změřena aktivita hrubého extraktu, aktivita NADP-ME v resuspendovaných sedimentech po srážení síranem amonným, aktivita NADP-ME ve vzorku po dialýze, aktivita NADP-ME po ionexové chromatografii na sloupci DEAE-celulosity, aktivita NADP-ME po gelové chromatografii a aktivita NADP-ME po afinitní chromatografii. Výsledky jsou uvedeny ve formě izolační tabulky (Tab. 2).

Aktivita sledovaného enzymu byla jednak vztažena na jednotku objemu a jednak na množství bílkovin přítomných v jednotlivých preparátech, tedy jako specifická aktivita. Množství bílkovin bylo stanoveno metodou podle Bradfordové. V každém kroku bylo vypočítáno celkové množství proteinu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

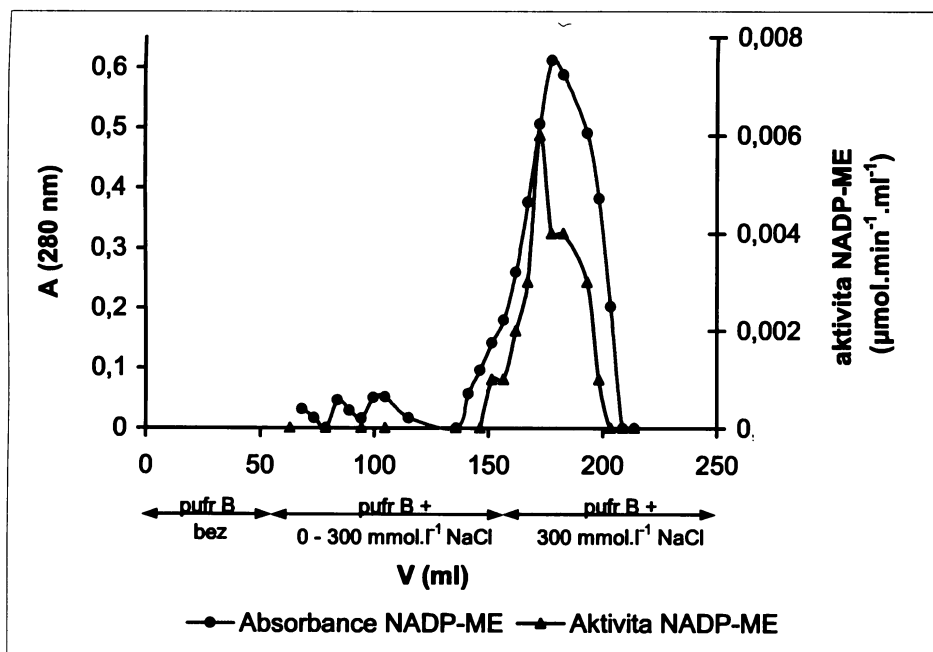
### 4.2.1 Sledování hodnot aktivity NADP-ME v průběhu izolačního postupu

Celkové množství proteinů po jednotlivých izolačních krocích postupně klesalo z 160 mg proteinu až na 2 mg proteinů (Tab. 2). Naopak specifická aktivita v průběhu izolace stoupala. Prvním krokem byla homogenizace a extrakce listů tabáku. V tomto vzorku bylo velké množství bílkovin a specifická aktivita byla nízká (Tab. 2). Po srážení síranem amonným ve frakci do 35% - 65% nasycení se výrazně snížilo množství celkových bílkovin ve vzorku (Tab. 2). Při ionexové chromatografii na sloupci DEAE-celulosity se enzym NADP-ME eluoval gradientem 0 - 0,3 mol. l<sup>-1</sup> NaCl. Po ionexové chromatografii byla změřena absorbance ve všech frakcích při 280 nm.

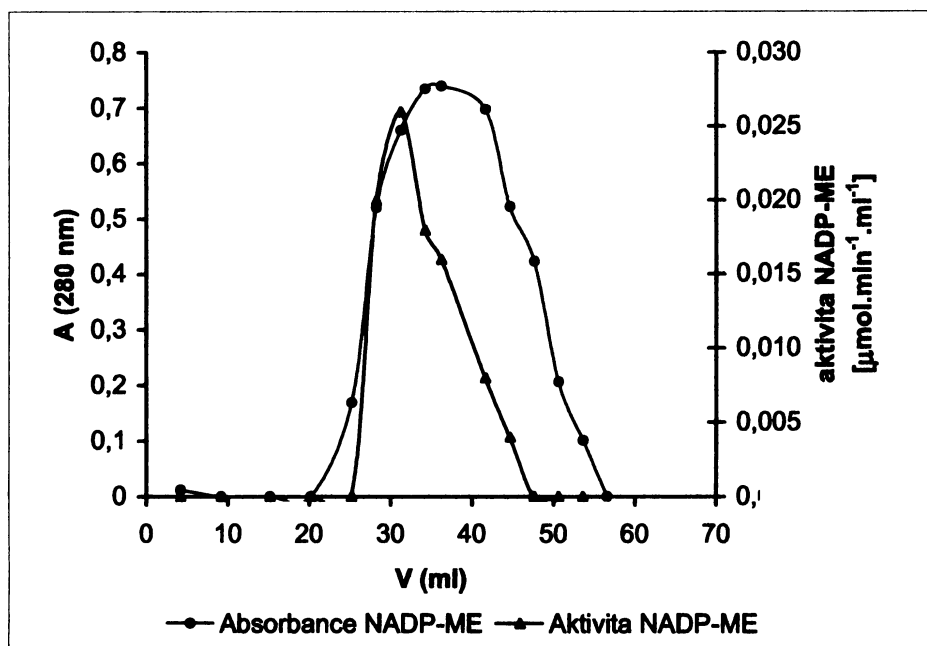
Ve frakcích, které vykazovaly vysokou absorbanci byla změřena aktivita NADP-ME při 340 nm. Závislost absorbance a aktivity NADP-ME na elučním objemu znázorňuje obrázek 13. Obrázek 14 dokumentuje průběh gelové chromatografie. Chromatografický vrchol má zde symetrický průběh, což naznačuje přítomnost molekul NADP-ME jedné velikosti, jedná se pravděpodobně o tetramer. Také při gelové chromatografii došlo k eluci NADP-ME v jedné frakci (Obr. 14).

Tabulka 2 Průběh purifikace NADP-ME z horních listů tabáku. Na jednu izolaci bylo použito 30 g listů tabáku.

Izolační krok	aktivita [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	V [ml]	celk. aktivita [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	množství bílkovin [mg/ml]	specifická aktivita [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]	Celkové množství proteinu [mg]
Hrubý extrakt	0,013	98	1,265	1,63	0,008	160
Síranová frakce	0,145	8	1,161	4,61	0,032	37
Dialýza	0,161	9,4	1,516	3,77	0,043	35
Ionexová chromatografie	0,019	69	1,335	0,39	0,050	27
Gelová chromatografie	0,077	9	0,697	1,27	0,061	11
Afinitní chromatografie	0,019	7,9	0,153	0,28	0,069	2

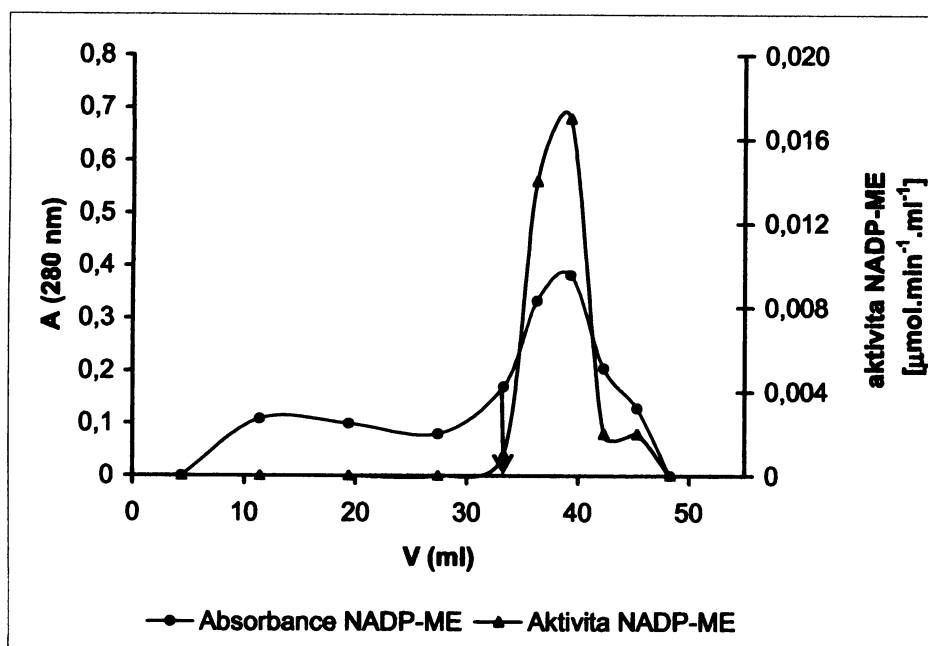


obr. 13 Separace NADP-ME ionexovou chromatografií na koloně DEAE-celulosy. NADP-ME byl eluován lineárním gradientem NaCl ( $0 - 300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v pufru B průtokovou rychlostí 1 ml/min.



Obr. 14 Separace NADP-ME gelovou chromatografií na koloně Sephacryl S 300.

NADP-ME byl eluován pufr B průtokovou rychlostí 0,1 ml/min.

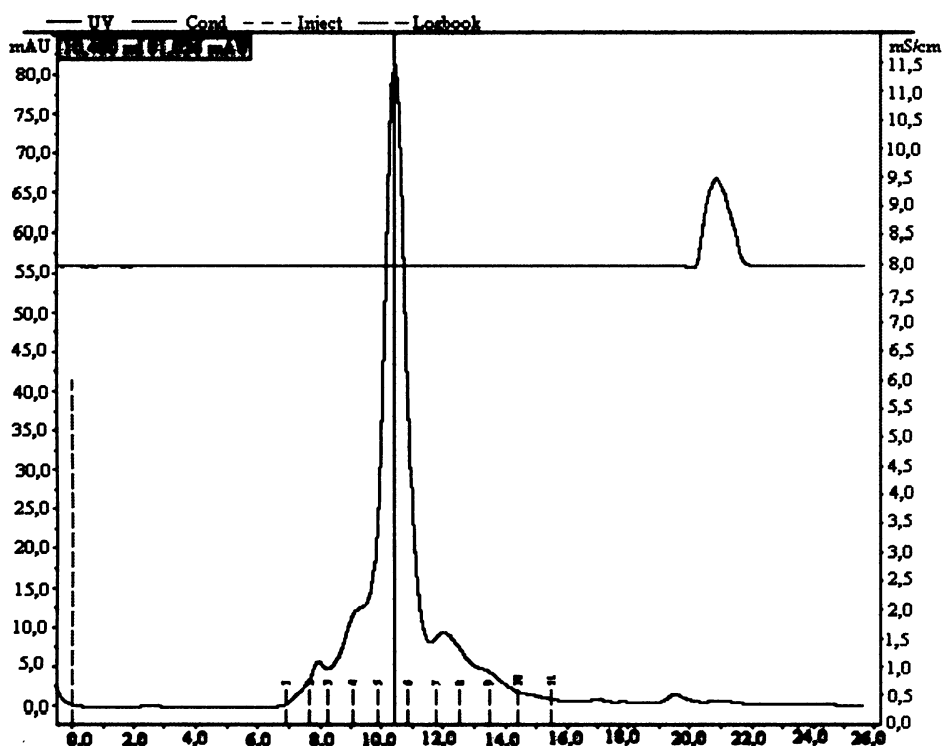


Obr. 15 Separace NADP-ME afinitní chromatografií na nosiči 2',5'-ADP-Sepharosy

4B. Eluce pufr C (tj. pufr bez obsahu  $Mg^{2+}$ ) je v grafu znázorněna šipkou.

Dalším izolačním krokem byla afinitní chromatografie na sloupci 2',5'-ADP Sepharosy 4B. Při tomto procesu došlo k výrazné purifikaci enzymového preparátu, množství celkových bílkovin značně kleslo (Obr. 15, Tab. 2).

Posledním izolačním krokem byla separace NADP-ME gelovou chromatografií na koloně Superdex 200 HR 10/300 GL (ÄKTA HPLC systém). Z obrázku chromatogramu je patrné, že NADP-ME byl eluován 9,5-11,5 ml pufru B průtokovou rychlostí 0,5 ml/min. jako jeden pík. Vrchol píku byl zaznamenán při eluci 10,4 ml pufru B (Obr. 16.).



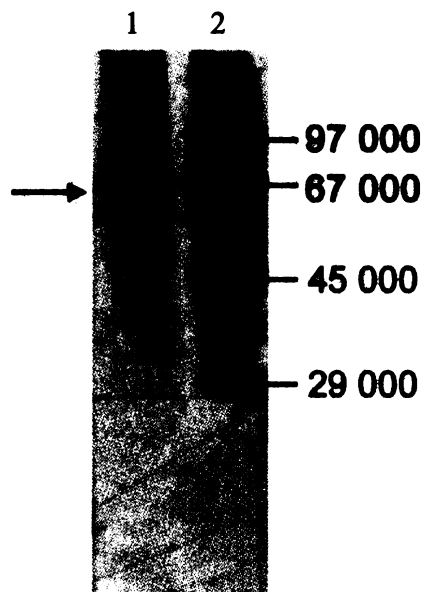
Obr. 16 Separace NADP-ME gelovou chromatografií na koloně Superdex 200 HR 10/300 GL (ÄKTA HPLC systém). NADP-ME byl eluován pufrům B průtokovou rychlostí 0,5 ml/min.

#### 4.2.2 Sledování čistoty purifikovaného enzymového preparátu

Se vzorkem získaným po afinitní chromatografii na sloupci 2',5'-ADP Sepharosy byla provedena elektroforetická separace v 10% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS. Po afinitní chromatografii došlo k velkému načištění vzorku. Vizualizace proteinů

byla provedena barvou Coomassie Brilliant Blue R 250 a G 250.

Silnější majoritní proužek v dráze 1 na obrázku 17 o relativní molekulové hmotnosti 67 000 odpovídá proteinu NADP-ME. Slabší proužek o nižší molekulové hmotnosti je pravděpodobně kontaminující protein nebo fragment NADP-ME po částečné degradaci. V dráze 2 na obrázku 17 jsou naneseny standardní proteiny o relativní molekulové hmotnosti 29 000 – 97 000.



Obr. 17 Elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS v 10% polyakrylamidovém gelu. Dráha 1: vzorek NADP-ME po afinitní chromatografii. Dráha 2: standardní proteiny o relativní molekulové hmotnosti 29 000-97 000

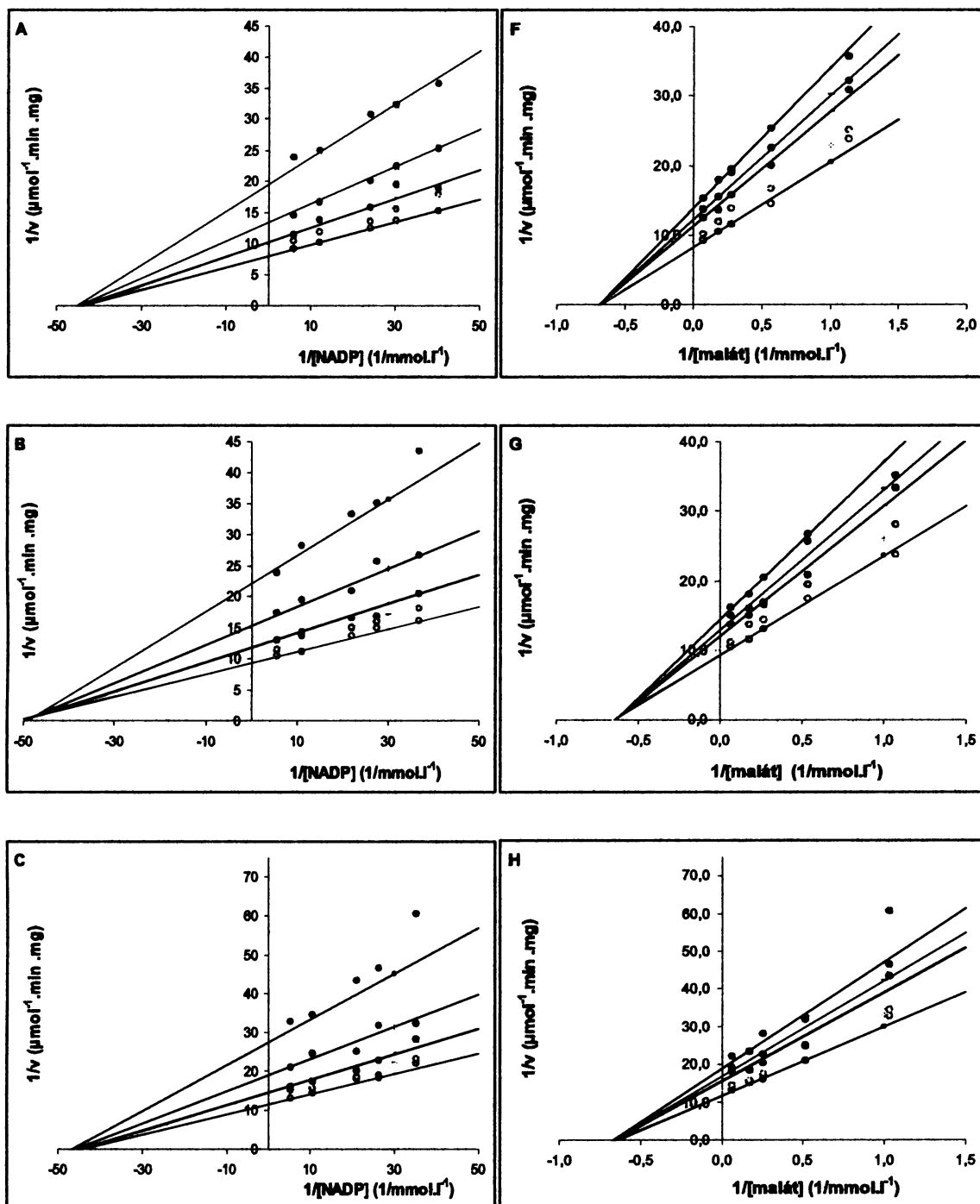
## 4.3 Kinetické metody

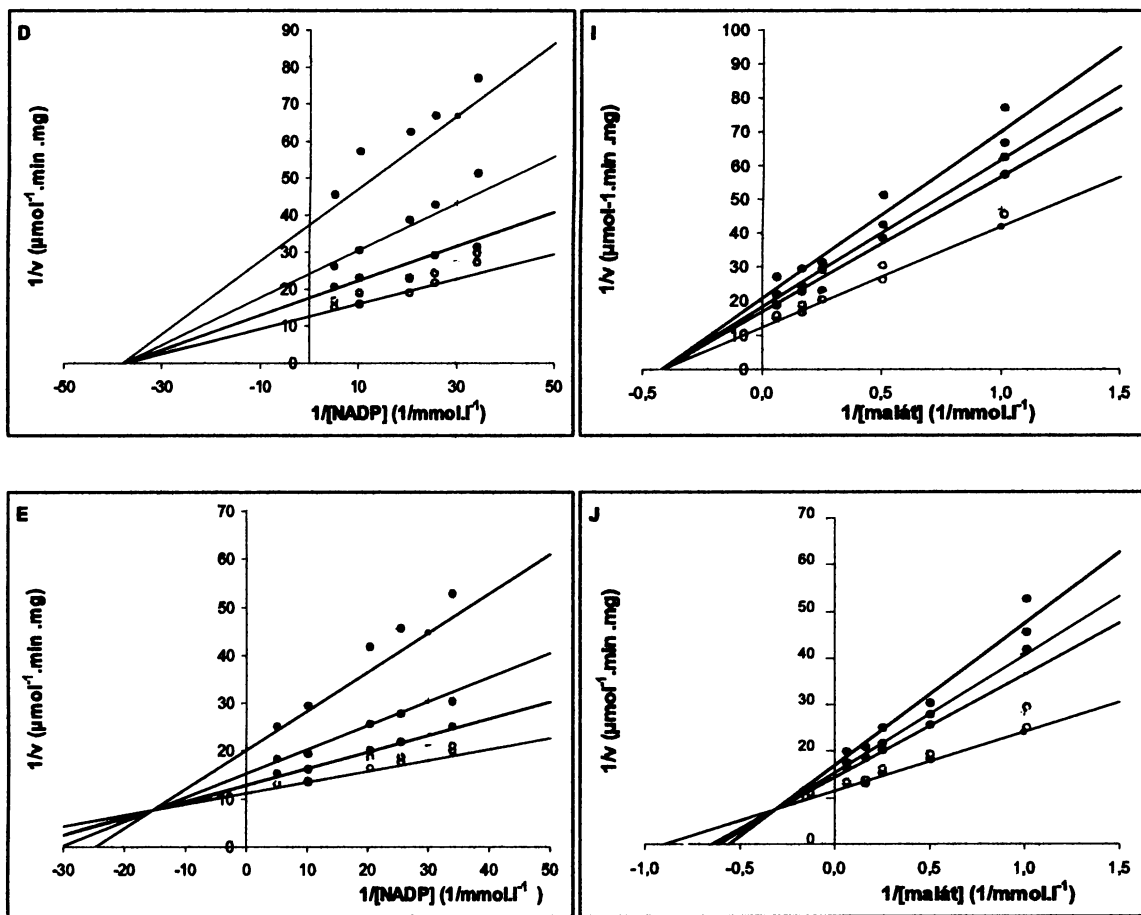
### 4.3.1 Určení mechanismu reakce katalyzované NADP-ME

Pro určení kinetických parametrů byla změřena aktivita NADP-ME v reakční směsi pro pět různých koncentrací substrátu (L-malátu) a pět různých koncentrací druhého substrátu ( $\text{NADP}^+$ ). V každé sérii měření byla zvolena jedna fixní koncentrace kofaktoru  $\text{Mg}^{2+}$  (4; 2; 1; 0,5 a 0,4  $\text{mmol.l}^{-1}$ ).



Mechanismus reakce katalyzované NADP-ME byl určen z primárních a sekundárních grafů pro jednotlivé kinetické mechanismy a výpočtem z rovnic pro následný kinetický mechanismus a ping-pongový kinetický mechanismus. Experimentální data byla zpracována nelineární regresí v programu MS Excel.





**Obr. 18** Studium mechanismu reakce katalyzované NADP-ME. Dvojitě reciproký graf závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu  $\text{NADP}^+$  (A, B, C, D a E) a L-malátu (F, G, H, I a J) při několika fixních koncentracích  $\text{Mg}^{2+}$ :  $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (A, F);  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (B, G);  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (C, H);  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (D, I) a  $0,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (E, J).

Legenda pro graf: A, B, C, D a E

○  $16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  malát ○  $6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  malát ●  $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  malát ●  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  malát  
 ●  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  malát

Legenda pro graf: F, G, H, I a J:

○  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADP ○  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADP ●  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADP ●  $0,04 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADP  
 ●  $0,03 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NADP

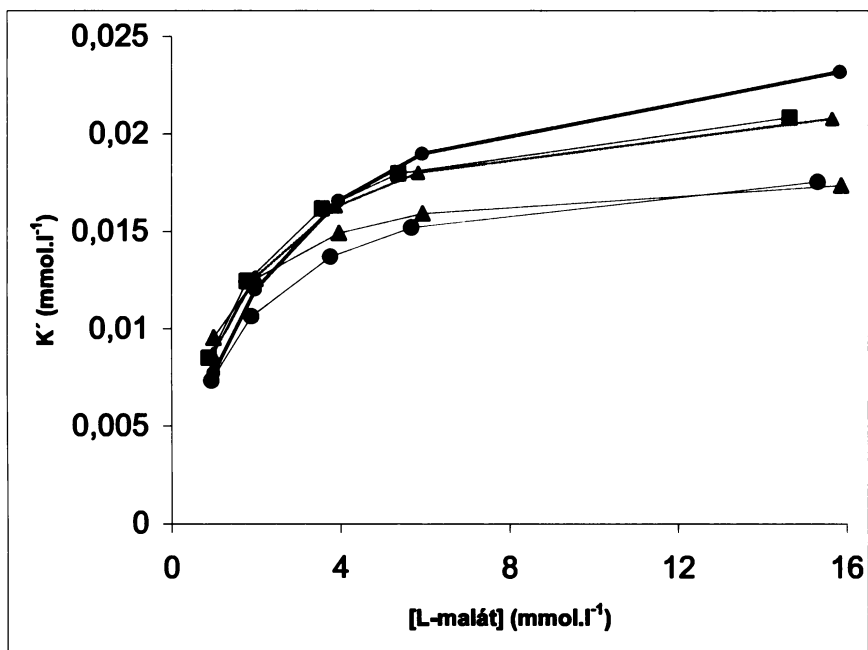
( uvedené koncentrace jsou analytické koncentrace, pro výpočet a vynesení do grafů byly použity volné koncentrace po korekci chelatace  $\text{Mg}^{2+}$  s L-malátem a  $\text{Mg}^{2+}$  s  $\text{NADP}^+$ )

Z primárních grafů na obrázku 18 je patrné, že se soustava přímek protíná v jednom bodě buď nad či přímo na horizontální ose, což je charakteristické pro následný mechanismus dvousubstrátové reakce. Charakteristický diagnostický rys pro ping-pongový mechanismus je série paralelních přímek, který bylo možné v tomto případě vyloučit. Z primárních grafů na obrázku 18 a výpočtem pomocí rovnice pro následný kinetický mechanismus dvousubstrátové reakce byly získány kinetické parametry  $V_{lim}$ ,  $K_{mA}$ ,  $K_{mB}$ ,  $K_A$ , jejichž hodnoty jsou sumarizovány v tabulce 3.

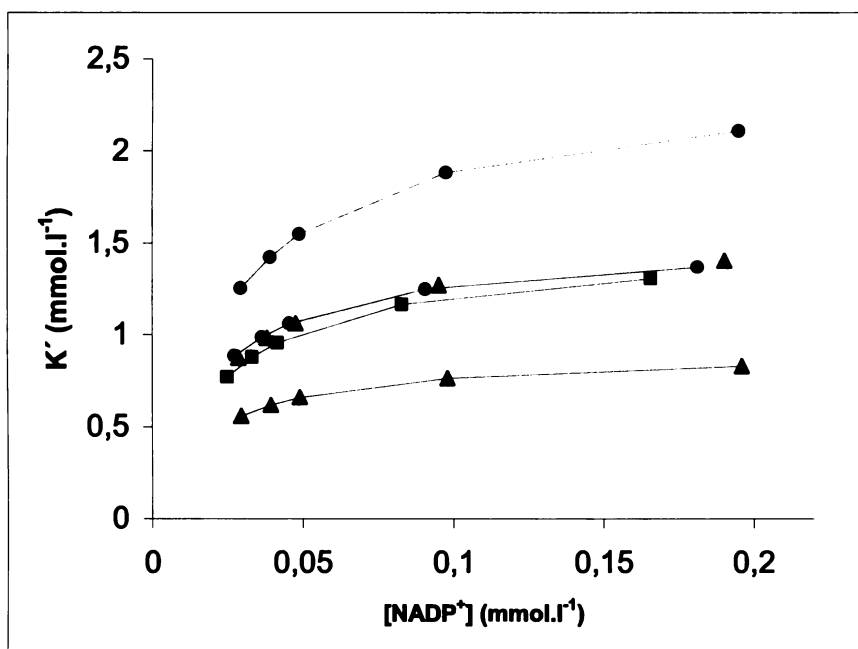
**Tab. 3** Hodnoty kinetických konstant v přítomnosti 4; 2; 1; 0,5 a 0,4 mmol.l<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>.  $K_{mA}$  je Michaelisova konstanta pro substrát NADP<sup>+</sup>,  $K_{mB}$  je Michaelisova konstanta pro substrát L-malát a  $K_A$  je disociační konstanta pro komplex enzym – substrát A.

Mg <sup>2+</sup> (mmol.l <sup>-1</sup> )		4	2	1	0,5	0,4
$V_{lim}$ (μmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )		0,180	0,118	0,096	0,092	0,096
$K_{mA}$ (mmol.l <sup>-1</sup> )		0,023	0,019	0,023	0,027	0,018
$K_{mB}$ (mmol.l <sup>-1</sup> )		1,490	1,516	1,576	2,400	0,909
$K_A$ (mmol.l <sup>-1</sup> )		0,022	0,021	0,021	0,026	0,065

Rozlišení uspořádaného následného a neuspořádaného následného mechanismu dvousubstrátové reakce katalyzované NADP-ME bylo určeno vynesemím konstant  $K'$  vůči koncentracím substrátu L-malátu (Obr.19) nebo NADP<sup>+</sup> (Obr. 20) při pěti různých koncentracích Mg<sup>2+</sup> iontů. Konstanty  $K'$  byly vypočteny podle vzorců (3), (4) na straně 36. Z charakteru křivek na obrázku 19 a 20 byl mechanismus reakce specifikován jako následný neuspořádaný.



obr. 19 Následný neuspořádaný mechanismus reakce katalyzované NADP-ME. Graf závislosti  $K'$  na koncentraci L-malátu (16, 8, 4, 2, 1 mmol.l<sup>-1</sup>) pro pět různých koncentrací kofaktoru Mg<sup>2+</sup>. Legenda grafu: —■— 4 mmol.l<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, —●— 2 mmol.l<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, —▲— 1 mmol.l<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, —◆— 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, —▲— 0,4 mmol.l<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>



obr. 20 Následný neuspořádaný mechanismus reakce katalyzované NADP-ME. Graf závislosti  $K'$  na koncentraci NADP<sup>+</sup> (0,2; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02 mmol.l<sup>-1</sup>) pro pět

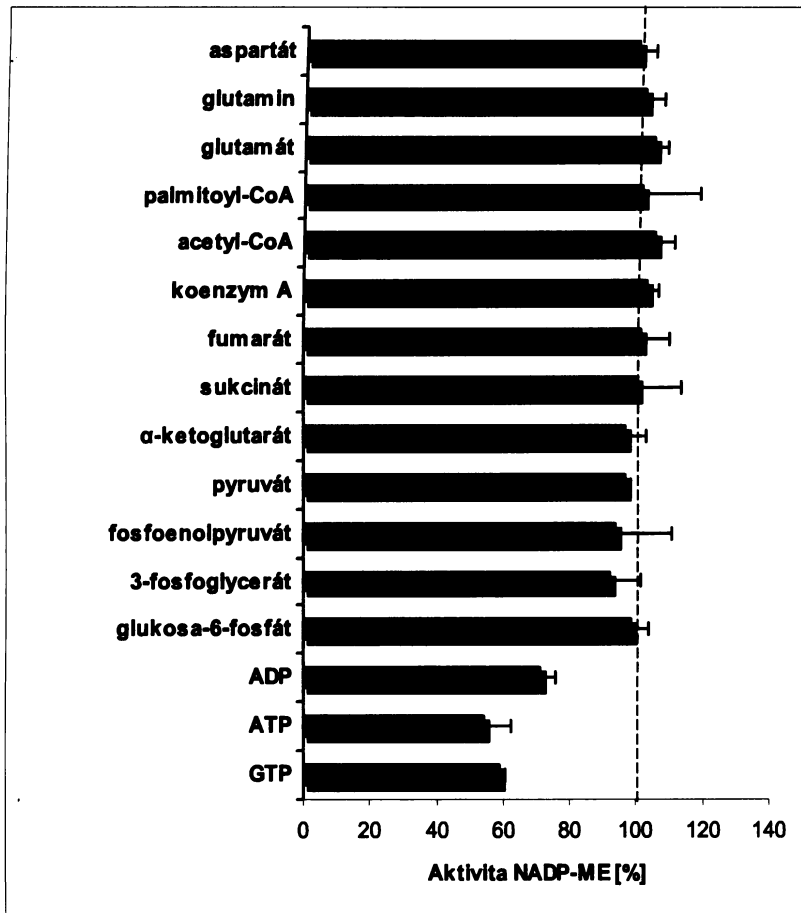
různých koncentrací kofaktoru  $Mg^{2+}$ . Legenda grafu:  $\blacksquare$  4  $mmol.l^{-1} Mg^{2+}$ ,  $\blacklozenge$  2  $mmol.l^{-1} Mg^{2+}$ ,  $\blacktriangle$  1  $mmol.l^{-1} Mg^{2+}$ ,  $\blacklozenge$  0,5  $mmol.l^{-1} Mg^{2+}$ ,  $\blacktriangleleft$  0,4  $mmol.l^{-1} Mg^{2+}$  (uvedené koncentrace jsou analytické koncentrace, pro výpočet a vynesení do grafů byly použity volné koncentrace po korekci chelatace  $Mg^{2+}$  s L-malátem a  $Mg^{2+}$  s  $NADP^+$ )

### 4.3.2 Sledování vlivu metabolitů na aktivitu NADP-ME

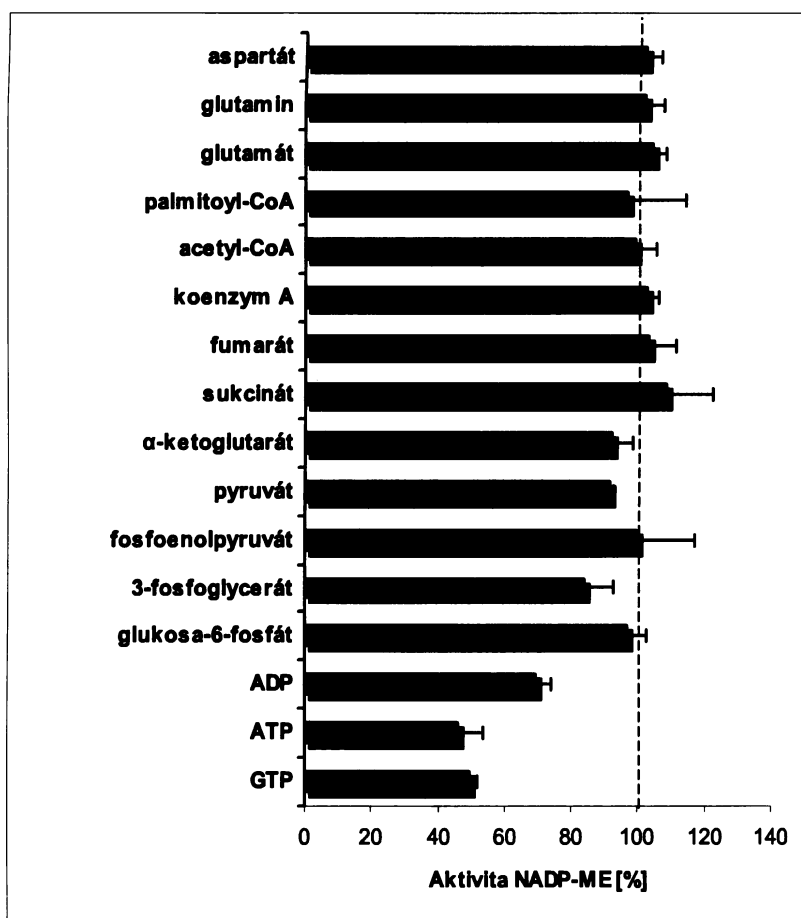
Pro studium vlivu metabolitů na aktivitu NADP-ME byly vybrány látky, které lze zařadit do několika metabolicky významných skupin. Byly testovány látky zapojené do citrátového cyklu ( $\alpha$ -ketoglutarát, sukcinát, fumarát), látky glykolýzy (fosfoenolpyruvát, glukosa-6-fosfát, 3-fosfoglycerát a pyruvát), některé aminokyseliny strukturně podobné malátu (glutamát, glutamin, aspartát), intermediáty metabolismu lipidů (koenzym A, acetyl-koenzym A, palmitoyl-koenzym A) a makroergické sloučeniny (ATP, ADP, GTP).

Z obrázku 21, 22, 23 je patrné, že makroergické látky ATP, ADP a GTP měly inhibiční vliv na aktivitu NADP-ME. Nejsilnějším inhibátorem rostlinného NADP-ME za podmínek nižší koncentrace L-malátu v reakční směsi (Obr. 22) je ATP a GTP s nimiž aktivita NADP-ME klesla na 50 % a 46 %. Aktivita rostlinného NADP-ME se v přítomnosti inhibátoru ADP snížila na 70 %.

Jako slabý inhibitor se choval 3-fosfoglycerát, pyruvát (Obr. 22) a  $\alpha$ -ketoglutarát (Obr. 23) s nimiž aktivita klesla na 84%, 91% a 95%. Jako slabé aktivátory NADP-ME působily glutamát - 107% (Obr.23) a sukcinát - 109% (Obr 22) Ostatní látky neměly výrazný vliv na aktivitu NADP-ME (Obr. 21, 22, 23).

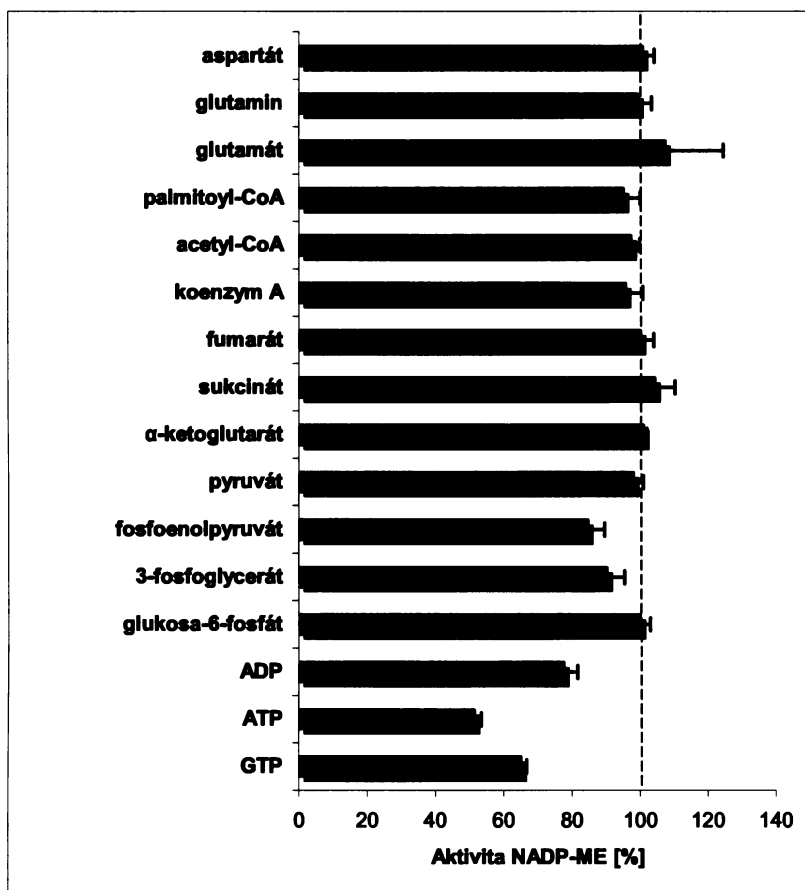


Obr. 21 Vliv vybraných metabolitů na aktivitu NADP-ME z listů tabáku. Metabolity  $\alpha$ -ketoglutarát, sukcinát, fumarát, pyruvát, fosfoenolpyruvát, glukosa-6-fosfát, glutamát, glutamin, aspartát, ATP, ADP, GTP byly testovány při  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$  koncentraci. Koenzym A, acetyl-koenzym A, palmitoyl-koenzym A byly testovány při  $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$  koncentraci. Reakční směs nasycena substráty obsahuje:  $80 \text{ mmol.l}^{-1}$  MOPS- $20 \text{ mmol.l}^{-1}$  octan sodný-NaOH pufr (pH 7,4),  $16 \text{ mmol.l}^{-1}$  L-malát,  $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$  NADP<sup>+</sup> a  $4 \text{ mmol.l}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub> na 1 ml reakční směsi. 100% odpovídá aktivitě NADP-ME bez přídavku metabolitu.



Obr. 22 Vliv vybraných metabolitů na aktivitu NADP-ME z listů tabáku. Metabolity  $\alpha$ -ketoglutarát, sukcinát, fumarát, pyruvát, fosfoenolpyruvát, glukosa-6-fosfát, glutamát, glutamin, aspartát, ATP, ADP, GTP byly testovány při  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$  koncentraci. Koenzym A, acetyl-koenzym A, palmitoyl-koenzym A byly testovány při  $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$  koncentraci. Reakční směs obsahující nižší koncentraci L-malátu:  $80 \text{ mmol.l}^{-1}$  MOPS- $20 \text{ mmol.l}^{-1}$  octan sodný-NaOH pufr (pH 7,4),  $2 \text{ mmol.l}^{-1}$  L-malát,  $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$   $\text{NADP}^+$  a  $4 \text{ mmol.l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  na 1 ml reakční směsi. 100% odpovídá aktivitě NADP-ME bez přídavku metabolitu.

Obdobné chování látek bylo naměřeno v reakční směsi za podmínek nižší koncentrace  $\text{NADP}^+$  (Obr. 23) Nejsilnějším inhibátorem NADP-ME je ATP, GTP a ADP. s nimiž aktivita NADP-ME klesla na 51 %, 65 % a 78 %.



Obr. 23 Vliv vybraných metabolitů na aktivitu NADP-ME z listů tabáku. Metabolity  $\alpha$ -ketoglutarát, sukcinát, fumarát, pyruvát, fosfoenolpyruvát, glukosa-6-fosfát, glutamát, glutamin, aspartát, ATP, ADP, GTP byly testovány při  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$  koncentraci. Koenzym A, acetyl-koenzym A, palmitoyl-koenzym A byly testovány při  $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$  koncentraci. Reakční směs obsahující nižší koncentraci  $\text{NADP}^+$ :  $80 \text{ mmol.l}^{-1}$  MOPS- $20 \text{ mmol.l}^{-1}$  octan sodný-NaOH pufr (pH 7,4),  $16 \text{ mmol.l}^{-1}$  L-malát,  $0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$   $\text{NADP}^+$  a  $4 \text{ mmol.l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  na 1 ml reakční směsi. 100% odpovídá aktivitě NADP-ME bez přidavku metabolitu.

### 4.3.3 Inhibice NADP-ME makroergickými komponentami

Výrazný vliv na aktivitu NADP-ME vykazovaly látky ze skupiny makroergických sloučenin ATP, ADP a GTP. Detailní inhibiční studie byla provedena s inhibitorem GTP.

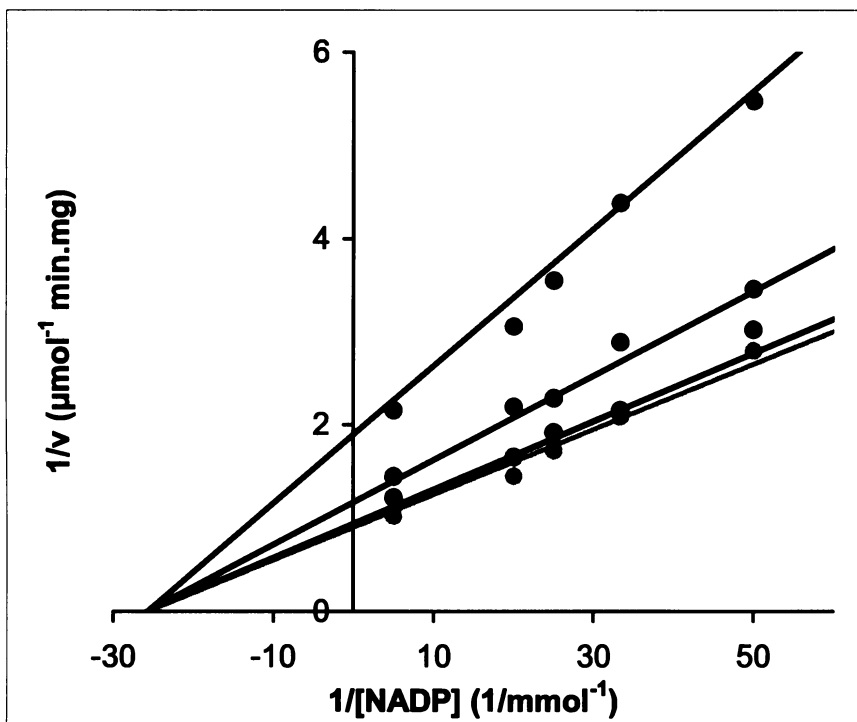


Inhibiční konstanty a typ inhibice NADP-ME pro GTP byl určen vůči substrátům L-malátu a NADP<sup>+</sup> v přítomnosti dvojmocných kationtů kovů Mg<sup>2+</sup> nebo Mn<sup>2+</sup> jako kofaktorů enzymu. Aktivita NADP-ME byla měřena s pěti různými koncentracemi substrátu (L-malát, NADP<sup>+</sup>) a třemi různými koncentracemi inhibitoru GTP.

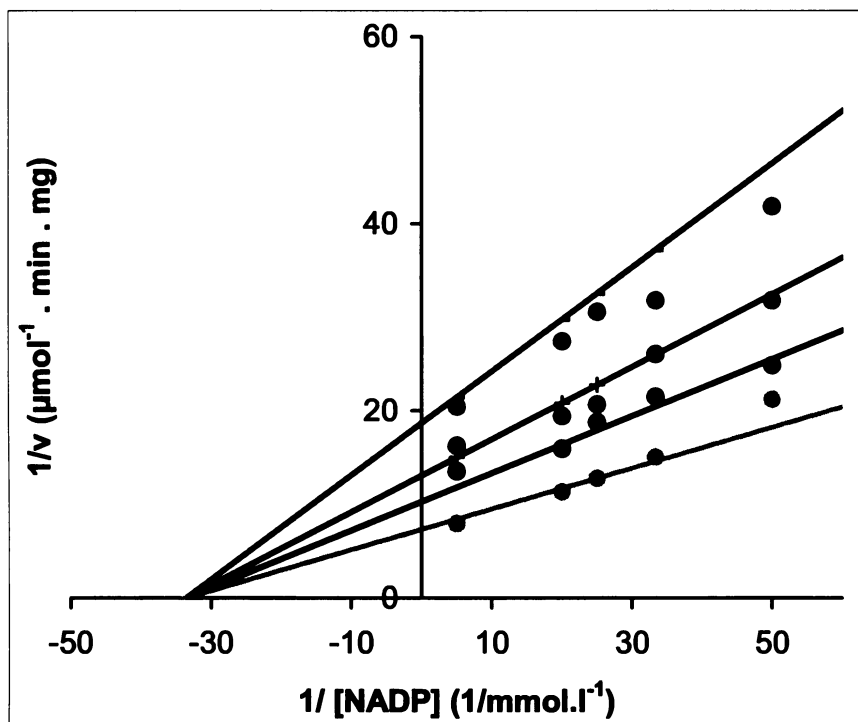
Grafická analýza typu inhibice a určení inhibičních konstant byla provedena vnesením experimentálních dat do dvojité reciprokého grafu dle Lineweavera-Burka, dle Dixona, dle Hanese-Wolfa, dle Wolfa-Augustinssona-Hoffsteeho. Vnesením podle Lineweavera – Burka nebylo lineární, koncentraci inhibitoru ovlivňovala tvorba komplexů mezi GTP a L-malátem a GTP a NADP<sup>+</sup>. Jestliže byly vypočítány koncentrace volného GTP pomocí asociačních konstant pro komplex GTP-L-malát a GTP-NADP<sup>+</sup> bylo vnesení podle Lineweavera –Burka lineární. Na molekulu NADP-ME se tedy vázal pouze volný GTP. Hodnoty inhibičních konstant byly získány jednak ze sekundárních grafů vnesením směrnic respektive úseků proti koncentracím inhibitoru a jednak proložení experimentálních dat rovnicemi pro jednotlivé typy inhibic.

Dvojitě reciprokým vnesením (Obr. 24, 25) závislosti reakční rychlosti na koncentraci NADP<sup>+</sup> v přítomnosti třech různých koncentrací volného GTP v přítomnosti iontů Mg<sup>2+</sup> (Obr. 24) nebo Mn<sup>2+</sup> (Obr. 25), došlo k protnutí všech křivek na ose x, což značí nekompetitivní inhibici. Inhibiční konstanty pro reakci v přítomnosti Mg<sup>2+</sup> iontů a Mn<sup>2+</sup> iontů jsou uvedeny v tabulce 4.

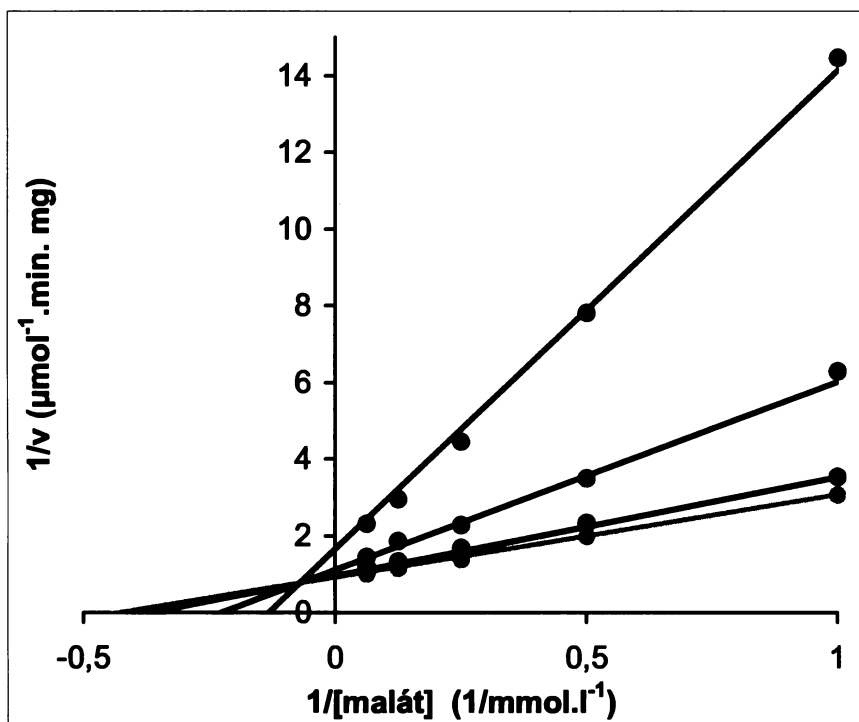
Detailní inhibiční studie NADP-ME volným GTP vůči L-malátu značí smíšenou inhibici v přítomnosti kofaktoru Mg<sup>2+</sup> (Obr. 26). a Mn<sup>2+</sup> iontů (Obr. 27). V dvojité reciprokém provedení grafu se všechny křivky střetly mimo osy grafu v druhém kvadrantu. Inhibiční konstanty  $K_{ic}$  a  $K_{iu}$  charakterizující tento typ inhibice jsou shrnuty v tabulce 4.



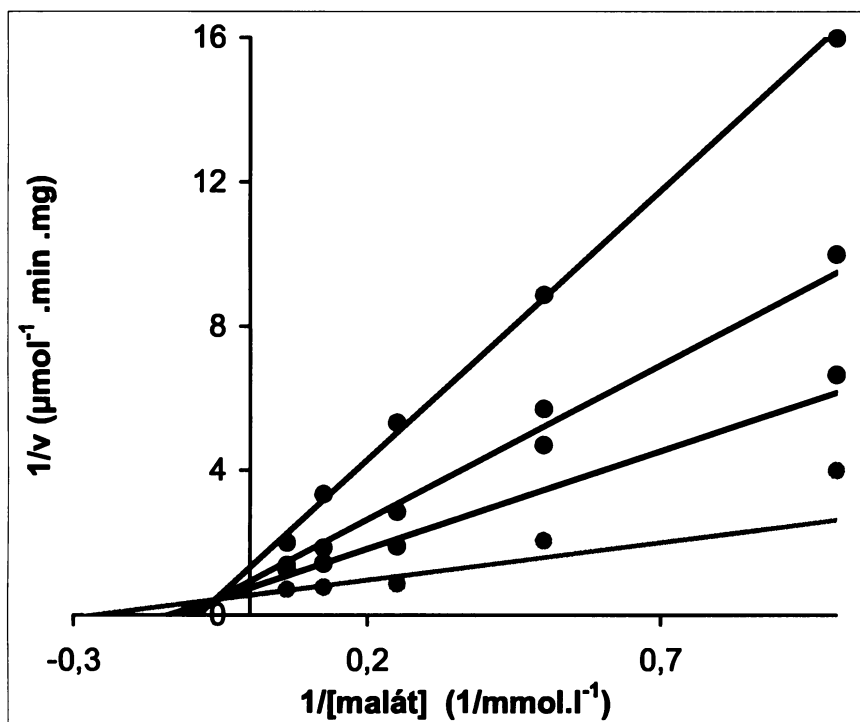
obr. 24 Dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera-Burka. Nekompetitivní inhibice rostlinného NADP-ME z listů tabáku GTP vůči  $\text{NADP}^+$  v přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  iontů. Aktivita byla měřena s pěti různými koncentracemi (0,2; 0,05; 0,04; 0,03 a 0,02  $\text{mmol.l}^{-1}$ )  $\text{NADP}^+$  a třemi různými koncentracemi volného GTP (přepočítané koncentrace volného GTP po korekci chelatace s kofaktorem: 1,086; 0,289; 0,045 a 0  $\text{mmol.l}^{-1}$ ). Legenda grafu: ● bez GTP ■ 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  ◆ 2  $\text{mmol.l}^{-1}$  ▲ 3  $\text{mmol.l}^{-1}$



obr. 25 Dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera-Burka. Nekompetitivní inhibice rostlinného NADP-ME z listů tabáku GTP vůči  $\text{NADP}^+$  v přítomnosti  $\text{Mn}^{2+}$  iontů. Aktivita byla měřena s pěti různými koncentracemi (0,2; 0,05; 0,04; 0,03 a 0,02  $\text{mmol.l}^{-1}$ )  $\text{NADP}^+$  a třemi různými koncentracemi volného GTP (přepočítaná koncentrace volného GTP po korelaci chelatace s kofaktorem: 0,401; 0,202; 0,104 a 0  $\text{mmol.l}^{-1}$ ) Legenda grafu: • bez GTP • 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  • 2  $\text{mmol.l}^{-1}$  • 3  $\text{mmol.l}^{-1}$



obr. 26 Dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera-Burka. Smíšená inhibice rostlinného NADP-ME z listů tabáku GTP vůči L-malátu v přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů. Aktivita byla měřena s pěti různými koncentracemi (16, 8, 4, 2, 1  $mmol.l^{-1}$ ) L-malátu a třemi různými koncentracemi volného GTP (přepočítaná koncentrace volného GTP po korekci chelatace s kofaktorem: 1,086; 0,289; 0,045 a 0  $mmol.l^{-1}$ ) Legenda grafu: \* bez GTP ♦ 1  $mmol.l^{-1}$  ♦ 2  $mmol.l^{-1}$  ♦ 3  $mmol.l^{-1}$



obr. 27 Dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera-Burka. Smíšená inhibice rostlinného NADP-ME z listů tabáku GTP vůči L-malátu v přítomnosti  $Mn^{2+}$  iontů. Aktivita byla měřena s pěti různými koncentracemi (16, 8, 4, 2, 1  $mmol.l^{-1}$ ) L-malátu a třemi různými koncentracemi volného GTP. (přepočítaná koncentrace volného GTP po korekci chelatace s kofaktorem: 0,401; 0,202; 0,104 a 0  $mmol.l^{-1}$ ) Legenda grafu: \* bez GTP ♦ 1  $mmol.l^{-1}$  ♦ 2  $mmol.l^{-1}$  ♦ 3  $mmol.l^{-1}$

Tabulka 4 Inhibiční konstanty a typ inhibice rostlinného NADP-ME z listů tabáku GTP vůči L-malátu nebo  $NADP^+$  v přítomnosti  $Mg^{2+}$  nebo  $Mn^{2+}$  iontů jako kofaktorů. Inhibiční konstanty jsou uvedeny se směrodatnými odchylkami.

	$Mg^{2+}$	$Mn^{2+}$
<b>GTP/L-malát</b>	SMÍŠENÁ	SMÍŠENÁ
$K_{ic}$ [ $mmol.l^{-1}$ ]	$0.23 \pm 0.08$	$0.047 \pm 0.025$
$K_{iu}$ [ $mmol.l^{-1}$ ]	$1.65 \pm 0.32$	$0.35 \pm 0.10$
<b>GTP/<math>NADP^+</math></b>	NEKOMPETITIVNÍ	NEKOMPETITIVNÍ
$K_i$ [ $mmol.l^{-1}$ ]	$0.70 \pm 0.20$	$0.23 \pm 0.03$

## 5 Diskuze

NADP-ME je v popředí zájmu již dlouhou dobu. Cytosolová isoforma tohoto enzymu byla krystalována již před třiceti lety a byla tedy poznána trojrozměrná struktura [30]. Rostlinný NADP-ME byl studován především v souvislosti s objevem  $C_4$  cesty fixace  $CO_2$ , kde je tento enzym zodpovědný za dekarboxylaci čtyřuhlíkaté sloučeniny malátu v chloroplastech buněk pochev svazků cévních [2, 7]. V posledních letech je NAD(P)-ME studován v rakovinných buňkách a to především s jeho klíčovou rolí v glutaminolýze a jsou navrhovány inhibitory tohoto enzymu jako možná léčiva [29]. Také rostlinný NADP-ME je v popředí zájmu, a to jako součást obranného systému rostlin proti stresu [8, 66, 52, 57, 61, 62]. Tuto roli pravděpodobně může plnit jak cytosolová, tak i chloroplastová isoforma, ale nikoliv fotosyntetická z  $C_4$  rostlin. Vlastnosti nefotosyntetických isoform tohoto enzymu však nejsou dosud dostatečně prozkoumány, aby mohly být porovnávány s vlastnostmi NADP-ME z živočišných zdrojů, pro které je známa trojrozměrná struktura a mechanismus katalýzy. Nefotosyntetická isoforma je zapojena do odpovědi rostlin na biotický stres způsobený virovou infekcí [8, 53]. Tato práce je příspěvkem k poznání lokalizace a vlastností NADP-ME z listů tabáku, tedy rostliny často využívané jako experimentální.

Informace o lokalizaci NADP-ME z rostlinných zdrojů jsou získány buď na základě genové sekvence a tedy přítomnosti příslušného transportního peptidu [2] nebo imunochemickou detekcí v histologických řezech. V tenkých řezech z listů tabáku byla zjištěna přítomnost NADP-ME v chloroplastech, avšak touto metodou nelze spolehlivě určit přítomnost v cytoplazmě [38].

V této práci byly separovány chloroplasty a v oddělených frakcích chloroplastové a rozpustné cytosolové byla zjištěna aktivita NADP-ME. Detekce NADP-ME v chloroplastech byla provedena barvou Nitroblue tetrazolium s fenazin methosulfátem, přičemž tmavě modrá barva na obrázku (12A) odpovídá aktivitě NADP-ME v chloroplastech. NADP-ME v cytoplazmě byl detekován pomocí jodonitrotetrazoliové violeti s fenazin methosulfátem, která poskytuje červené zbarvení odpovídající aktivitě NADP-ME, obrázek (12E). Měřením aktivit NADP-ME v jednotlivých buněčných frakcích byla zjištěna distribuce tohoto enzymu. Nejvyšší

aktivita NADP-ME byla naměřena v cytosolové frakci, zatímco v chloroplastech byla velmi nízká (Tab. 1, str.41).

Cílem předkládané diplomové práce bylo studovat reakční mechanismus a regulaci buněčnými metabolity cytosolové isoformy NADP-ME z listů tabáku. Enzym musel být nejdříve připraven v purifikované formě. Purifikace byla provedena postupem podle Ryšlavé a kol.[38]. Postup izolace NADP-ME se skládal ze čtyř separačních kroků zahrnujících precipitační metodu (srážení síranem amonným do 55% nasycení) jako první krok izolace, kterým se vzorek zbavil nerozpustných součástí a části bílkovin a ze čtyř chromatografických kroků (z ionexové na koloně DEAE-celulose, z gelové na nosiči Sephacryl S 300, z afinitní chromatografie s 2',5'-ADP-Sepharosy 4B a z gelové filtrace (s ÄKTA HPLC systémem). Z chromatogramů je patrné (Obr. 13, 14, 15, 16, str.45 - 47), že při všech chromatografických separacích se NADP-ME eluoval jako jeden vrchol, což naznačuje přítomnost jedné isoformy. Při jedné izolaci bylo získáno přibližně 8 ml enzymového preparátu o specifické aktivitě  $0,069 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Tato specifická aktivita je srovnatelná s nedávno publikovanou výslednou specifickou aktivitou rekombinantních NADP-ME izolovaných z listů *Nicotiana tabacum* L. [13], je však mnohem nižší než specifická aktivita fotosyntetického NADP-ME izolovaného z listů kukuřice ( $30,9 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) a nižší než specifická aktivita z etiolovaných listů kukuřice ( $1,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), z kořenů kukuřice ( $1,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) nebo pšenice ( $0,98 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) [1]. Specifická aktivita NADP-ME v hlízách brambor je  $0,026 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  a v listech kukuřice  $0,026 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  [7]. Purifikovaný enzym NADP-ME ze skočce obecného (*Ricinus communis*) měl specifickou aktivitu  $0,613 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  [15].

Elektroforetickou separací v přítomnosti SDS byla určena relativní molekulová hmotnost NADP-ME z listů tabáku odpovídající 67 000 [38]. Tato relativní molekulová hmotnost více odpovídá cytosolové isoformě (65 400) popsané u rekombinantního NADP-ME *Nicotiana tabacum* L. než rekombinantní chloroplastové isoformě (63 300). Měření aktivit NADP-ME v jednotlivých buněčných frakcích (v chloroplastové a rozpustné cytosolové frakci) byla nejvyšší aktivita zjištěna v cytosolové frakci, zatímco v chloroplastech byla aktivita velmi nízká (Tab. 1, str. 41). Nativní elektroforéza také ukazuje na přítomnost jedné isoformy projevující se jedním proužkem, zatímco

přítomnost další případné isoformy je pod hranicí detekovatelnosti této metody (Obr. 11, str. 42). Prací, ve kterých je rostlinný NADP-ME izolován a charakterizován kinetickými parametry včetně možností jeho regulace různými metabolity, je k dispozici velmi málo.

Kinetika reakce katalyzované NADP-ME byla studována metodou počátečních rychlostí. Vždy při jedné fixní koncentraci  $Mg^{2+}$  iontů byla sledována reakční rychlost pěti různých koncentrací prvního substrátu ( $NADP^+$ ) spolu s pěti různými koncentracemi druhého substrátu (L-malátu). Vzhledem k tomu, že  $Mg^{2+}$  ionty tvoří s  $NADP^+$  a L-malátem asociační komplexy, bylo nutné analytické koncentrace redukovat o koncentrace substrátů vázané v asociačních komplexech, neboť pouze volné  $NADP$  a volný L-malát jsou skutečnými substráty NADP-ME [25, 13, 27]. Nejdříve byla kinetika reakce katalyzované NADP-ME posuzována jako třísubstrátová ve třiceti dvojitych reciprokých vynesení (vždy 5 fixních koncentrací pro 3 substráty a vůči jak volnému, tak proměnnému substrátu), avšak jelikož kofaktor  $Mg^{2+}$  není enzymovou reakcí přeměňován, je v literatuře reakce katalyzovaná živočišným NADP-ME (NAD(P)-ME) klasifikována jako dvousubstrátová reakce Bi-Ter [25, 39, 58]. Tím bylo možné snížit počet diagnostických dvojitych reciprokých výnosů na deset (Obr. 18, str 49 - 50) a současně provést i výpočty podle rovnic charakterizující mechanismus dvousubstrátové reakce (mechanismus sekvenční (1) a ping-pong (2), str. 37). Nelineární regresí v programu Excel bylo možné mechanismus ping-pong vyloučit, neboť se naměřená data shodovala s mechanismem následným (Obr. 18, str 49 - 50).

Dalším diagnostickým výnosem (závislosti konstanty  $K'$  viz metody str. 36 na koncentraci  $NADP^+$  či L-malátu) byl sekvenční mechanismus specifikován na náhodný stejně jako u mitochondriálního NAD(P)-ME (EC 1.1.1.39) z hlísta *Ascaris suum* [65]. Naopak u NADP-ME (EC 1.1.1.40) z linií lidských nádorových buněk rakoviny prsu [25] a u mitochondriálního NAD(P)-ME (EC 1.1.1.39) z nádorových jaterních buněk byl určen sice sekvenční mechanismus, ale uspořádaný [39]. Z toho vyplývá, že u rostlinného NADP-ME z listů tabáku nezáleží na pořadí vazby substrátů ( $NADP^+$  a L-malátu) na enzym. Mohou se tvořit oba binární komplexy EA i EB (tzn. enzym- $NADP^+$  i enzym-L-malát) a ternární komplex může vznikat jak vazbou A na EB, tak vazbou B na EA [51]. Stanovený mechanismus pro NADP-ME z listů tabáku: náhodný sekvenční, by možná bylo vhodné ověřit studii inhibic produktem (pyruvát, NADPH a  $CO_2$ ).



Avšak např. pyruvát se neprojevil jako silný inhibitor NADP-ME (Obr. 21, 22, 23, str. 54 - 56).

Byl studován vliv různých látek na aktivitu NADP-ME, a to nejen v saturačních, ale i subsaturačních koncentracích obou substrátů (NADP<sup>+</sup> a L-malátu), aby bylo možné např. odhalit kompetici mezi substrátem a inhibitorem. Vzhledem k tomu, že NADP-ME je enzym, který může ovlivňovat jak anabolické procesy (např. poskytováním NADPH pro biosyntézu lipidů), tak procesy katabolické (spotřeba energie přeměnou pyruvátu citrátovým cyklem) byly testovány látky 5 základních skupin (meziprodukty citrátového cyklu, látky spojené s lipogenezí, metabolity glykolýzy, některé aminokyseliny a energeticky bohaté látky (Obr. 21, 22, 23, str. 54 - 56). Inhibice NADP-ME energeticky bohatými látkami (silná inhibice GTP, ATP, slabší ADP) a velmi slabá inhibice intermediáty glykolýzy naznačuje, že funkce rostlinného NADP-ME by mohla mít souvislost s energetickou bilancí rostliny. Ve studii publikované v letošním roce byla u dvou rekombinantních isoform z *Nicotiana tabacum* L., plastidové (Nt-NADP-ME1) a cytosolové (Nt-NADP-ME2), studována regulace sukcinátem, fumarátem, aspartátem, oxaloacetátem, pyruvátem, glukosa-6-fosfátem, ATP, CoA a acetyl-CoA. Rekombinantní plastidový Nt-NADP-ME1 byl aktivován aspartátem a inhibován fumarátem, oxaloacetátem, pyruvátem, glukosa-6-fosfátem, ATP, CoA a acetyl-CoA. Rekombinantní cytosolový Nt-NADP-ME2 byl aktivován CoA a inhibován všemi ostatními testovanými látkami kromě aspartátu [13]. U těchto rekombinantních proteinů však mohlo dojít k určitým strukturním, funkčním a regulačním změnám oproti nativnímu NADP-ME. Na rozdíl od živočišného NAD(P)-ME [55] nebyly pro NADP-ME rostlinného původu provedeny detailní inhibiční studie.

Poslední část diplomové práce tvoří detailní inhibiční studie NADP-ME, a to inhibitorem GTP vůči NADP<sup>+</sup> a L-malátu v přítomnosti jak Mg<sup>2+</sup> tak Mn<sup>2+</sup> iontů. Důvodem sledování obou iontů bylo, že jak Mg<sup>2+</sup> tak Mn<sup>2+</sup> ionty mohou sloužit jako kofaktory NADP-ME, avšak závislost rychlosti reakce na koncentraci jednotlivých iontů se liší. Zatímco u Mg<sup>2+</sup> byla pozorována závislost charakterizující dvě vazná místa pro Mg<sup>2+</sup>, u Mn<sup>2+</sup> iontů byla nalezena sigmoidální kinetika s Hillovým koeficientem přibližně 8, naznačujícím až 8 vazných míst pro Mn<sup>2+</sup> [38].

Naše výsledky ukazují, že regulace nefotosyntetického NADP-ME z listů tabáku

je odlišná od regulace lidského mitochondriálního NAD(P)-ME (EC 1.1.1.38). Zatímco inhibice u této isoformy inhibitorem ATP byla vůči jak  $\text{NADP}^+$  tak L-malátu kompetitivní [55, 56]. Výsledky této diplomové práce ukazují na nekompetitivní inhibici NADP-ME inhibitorem GTP vůči  $\text{NADP}^+$  a smíšenou inhibici vůči L-malátu, a to jak v přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  iontů tak  $\text{Mn}^{2+}$  iontů (Obr. 24, 25, 26, 27 str. 58 - 61). Nekompetitivní inhibice ukazuje na vazbu GTP do jiného místa na enzymu, než se váže  $\text{NADP}^+$ . Přítomnost dvojmocného iontu kovu ( $\text{Mg}^{2+}$  či  $\text{Mn}^{2+}$  iontu) neměla vliv na typ inhibice, pouze na její sílu. Nižší inhibiční konstanty byly nalezeny pro  $\text{Mn}^{2+}$  ionty (Tab. 4, str. 61), což možná souvisí i s vyšší hodnotou logaritmu asociační konstanty ( $\text{GTP-Mn}^{2+}$ ). Dalším rozdílem je, že zatímco NADP-ME z listů tabáku nebyl aktivován fumarátem, živočišný NAD(P)-ME jím byl aktivován allostericky [55, 56]. Zdá se tedy, že regulace rostlinného enzymu se liší od živočišného a obzvláště podrobným inhibičním studiím by měla být věnována větší pozornost.

## 6 Závěr

1. Nefotosyntetická NADP-dependentní maládehydogenasa dekarboxylační (NADP-ME) z listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana, SR1) byla purifikována třemi chromatografickými metodami na výslednou specifickou aktivitu  $0,069 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ .
2. Byl určen mechanismus dvousubstrátové reakce katalyzované NADP-ME jako sekvenční neuspořádaný.
3. Byl testován vliv různých metabolitů na aktivitu NADP-ME. Vybrány byly některé látky zapojené do citrátového cyklu, do glykolýzy, některé aminokyseliny, intermediáty metabolismu lipidů a makroergické sloučeniny. Jako inhibitory NADP-ME byly zjištěny makroergické látky (GTP, ATP a ADP), vliv ostatních látek na aktivitu NADP-ME nebyl významný.
4. Inhibice NADP-ME makroergickou sloučeninou GTP byla vůči substrátu L-malátu stanovena jako smíšená, vůči  $\text{NADP}^+$  jako nekompetitivní, a to jak v přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$ , tak  $\text{Mn}^{2+}$  iontů. Byly stanoveny inhibiční konstanty.
5. Vyšší aktivita NADP-ME byla zjištěna v rozpustné cytosolové frakci, nižší v chloroplastech.

## 7 Použitá literatura

- [1.] Drincovich, M. F.; Casati, P.; Andreo, C. S.: FEBS Lett. 490, 1-6 (2001)
- [2.] Edwards, G.E.; Andreo, C.S.: Phytochemistry 31, 1845-1857 (1992)
- [3.] Xu, Y.; Bhargava, G.; Wu, H.; Loeber, G.; Tong, L.: Structure 7, 877-889 (1999)
- [4.] Honda, H.; Akai, H.; Shimada, H.: Gene 243, 85-92 (2000)
- [5.] Smeets, K.; Cuypers, A.; Lambrechts, A.; Semane, B.; Hoet, P.; VanLaere, A.; Vangronsvelt, J.: Plant Physiol. Biochem. 43, 437-444, (2005)
- [6.] Maurino, V. G.; Drincovich, M.F.; Andreo, C. S.: Biochem. Mol. Biol. Int. 38, 239-250 (1996)
- [7.] Wedding, R. T.: Plant Physiol. 90, 367-371 (1989)
- [8.] Doubnerová, V.; Jirásková, A.; Janošková, M.; Miller, K.; Bařková, P.; Synková, H.; Čerovská, N.; Ryšlavá, H.: Gen. Physiol. Biophys., 26, 281-289 (2007)
- [9.] Barthová, J.: Biochemie základní kurz, Univerzita Karlova v Praze (1999)
- [10.] Bukato, G.; Kochan, Z.; Swierczynsky, J.: Int. J. Biochem.: Cell Biol., 27, 47-54 (1995)
- [11.] Chi, W.; Yang, J.; Wu, N.; Zhang, F.: Biosci. Biotechnik. Biochem., 68, 1865-1874, (2004)
- [12.] Loeber, G.; Dworkin, M.B.; Infante, A.; Ahorn, H.: FEBS Lett. 344, 181-186, (1994)
- [13.] Muller, L.G.; Drincovich, M. F.; Andreo, S. C.; Lara, M. V. Plant Cell Physiol. 49, 469-480 (2008)
- [14.] Yang, Z.; Zhang, H.; Hung, H.; Kuo, Ch.; Tsai, L.; Yuan, H.; Chou, W.; Chang, G.; Tong, L.: Protein Sci. 11, 332-341, (2002)
- [15.] Leammli, U.K.: Nature 227, 680 – 685 (1970)
- [16.] Colombo, S.L.; Andreo, C.S.; Podestá, F.E.: Physiol. Plant. 101, 821-826 (1997)
- [17.] Yang, Z.; Zhang, H.; Hung, H. Ch.; Kuo, Ch. Ch.; Tsai, L. Ch.; Yuan, H.S.; Chou, W. Y.; Chang, G. G.; Tong, L.: Prot. Sci. 11, 332-341, (2002)
- [18.] Yang, Z.; Lanks, W. Ch.; Tong, L. Structure 10, 951-960 (2002)
- [19.] Wheeler, M.C.G.; Tronconi, M.A.; Drincovich, M.F.; Andreo, C.S.; Flüge, U.I.; Maurino, V.G.: Plant. Physiol. 139, 39-51 (2005)
- [20.] Lara, M.V.; Drincovich, M.F.; Müller, G.L.; Maurino, V.G.; Andreo, C.S.: Plant Cell Physiol. 46, 997-1006 (2005)

- [21.] Iglesias, A.A.; Andreo, C.S.: *Plant Physiol.* 92, 66-72 (1990)
- [22.] Casati, P.; Lara, M.V.; Andreo, C.S.: *Plant. Physiol.* 123, 1611-1621 (2000)
- [23.] Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
- [24.] Hsu, Y. R.; Lardy, A. H.; Clealend, W. W.; *J. Biol. Chem.* 242, 5315-5322, (1967)
- [25.] Chang, G.G.; Juany, T. M.; Wang, J. K.; Lee, H. J.; Chou, W. Y. and Meng, CH. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 296, 468-473, (1992)
- [26.] Sun, S. B., Shen, Q. R., Wan, J.M., Liu, Z. P.: *Acta biochem. biophys* 35, 423-429 (2003)
- [27.] Maurino V.G., Saigo M., Andreo C.S., Drincovich M.F.: *Plant Mol. Biol.*, 45, 409 – 420 (2001)
- [28.] Rothermel, A. B.; Nelson, T.: *J. Biol. Chem.* 264 19587-19589 (1989)
- [29.] Chang, G.-G.; Wang, J.-K.; Juany, T.-M.; Lee, H.-J.; Chou, W.-Y.; Meng, Ch.-L.: *Eur. J. Biochem.* 202, 681-688 (1991)
- [30.] Chang, G. G.; Tong, L.: *Biochemistry* 42, 12722-12732 (2003)
- [31.] Vodrážka, Z.: *Biochemie* [3], Academia Praha (1993)
- [32.] Procházka, S., Macháčková, I., Krehule, J., Šebánek, J. a kol.: *Fyziologie rostlin*, Academia Praha (1998)
- [33.] Wise, M. E.; Ball, G. E.: *Biochemistry* 52, 1255-1263 (1964)
- [34.] Voet, D., Voetová J. G.: *Biochemie*, Victoria publishing Praha (1990)
- [35.] Bologna, P. F.; Andreo, S.C.; Drincovich, F. M.: *Jurnal of Bakteriology* 189, 5937-5946 (2007)
- [36.] Coleman, L. D.; Kuzava, E. J.: *J. Biol. Chem.* 266, 21997-22002 (2001)
- [37.] Lin, C. R.; Davis, J. E.: *J. Biol. Chem.* 249, 3867-3875 (1973)
- [38.] Ryšlavá H., Doubnerová, V., Muller, K., Bařková, P., Schnablová, R., Liberda, J., Synková, H., Čeřovská, N.. *Collect.* 72, 1420-1434 (2007)
- [39.] Teller, J. K.; Fahien, A. L.; Davis, W. J.: *J. Biol. Chem.* 267, 10423-10432 (1992)
- [40.] Pongratz, L. R.; Kibbey, G. R.; Shhulman, I. G.; Cline, W. G.: 282, 200-207 (2006)
- [41.] Drake, L. R.; Parks, C. W.; Thompson, W. E.: *J. Biol. Chem.* 258, 6008-6010 (1983)
- [42.] Yoshimoto, K.; Namakura, T.; Ichihara, A.: *The jurnal of Biolog. Chem.* 258, 12355-12360 (1983)
- [43.] Pongratz, L. R.; Kibbey, G. R.; Shulman, I. G.; Cline, W. G.: *The Jurnal of Biolog. Chem.* 282, 200-207 (2007)

- [44.] Valderama, R., Corpus, F.J., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, V. M., Chaki, M., Pedrajs, J.R., Fernández-Ocana, A., Río, L.A., Barroso, J.B.: *Plant Cell Environment* 29, 1449-1459 (2006)
- [45.] Liu, S., Chang, Y., Zhang, X., Guan, Q., Nishiuchi, S, Hase, K., Takano, T.: *Plant Mol. Biol.* 64, 49–58 (2007)
- [46.] Leblová, S.; Bartlová, J.: *Energetický metabolismus rostlin (Pokročilá přednáška z biochemie)*, Státní pedagogické nakladatelství Praha (1970)
- [47.] Moreadith, W. R.; Lehninger, L.A.; *The Journal of Biological Chemistry* 259, 6215-6221, (1984)
- [48.] McKenna, M. C., Tildon, J. T., Stevenson, J. H., Juany, X., Kingwell, K. G.: *Neurochem. Research* 20, 1491-1501, (1995)
- [49.] Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L.: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists (2002)
- [50.] Skorkowski, E. F., Storey, K. B.: *J. Chrom.* 389, 427-432 (1987)
- [51.] Macholán, L., Bartlová, J., Kučera, I., Zelinka, J.: *Enzymologie*, Státní pedagogické nakladatelství Praha (1983)
- [52.] Synková, H., Valcke, R.: *Physiol. Plant.* 112, 513-523 (2001)
- [53.] Ryšlavá, H., Muller K., Semorádová, Š., Synková, H., Čerovská, N.: *Photosynthetica* 41, 357-363? (2003)
- [54.] <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/Photosynthesis.htm> 55
- [55.] Hsu, W.-Ch., Hung, H.-Ch., Tong, L., Chang, G.-G.: *Biochemistry* 43, 7382-7390 (2004)
- [56.] Hsieh, J-Y; Liu, G-Y; Chang, G-G.; Hung, H-Ch: *J. Biol. Chem.* 281, 23237-45 (2006)
- [57.] Synková, H., Semorádová, Š., Burketová, L.: *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 79, 169- 176 (2004)
- [58.] Aktas, D.F., Cook, P.F.: *Biochemistry* 47, 2539-46 (2008)
- [59.] Frenkel, R.: *J. Biol. Chem.* 246, 3069-3074 (1971)
- [60.] Schaaf, J., Walter, M. H., Hess, D.: *Plant Physiol.* 108,
- [61.] Crecelius, F., Streb, P., Feierabend, J.: *J. Exp. Bot.* 54 1075-1083 (2003).
- [62.] Saher, S., Fernández-García N., Piqueras, A., Hellín, E., Olmos, E.: *Plant Physiol. Biochem.* 43 573-582 (2005)
- [63.] Marangoni, G. A.: *Enzyme kinetics*, Department of Food Science University of

Guelph (2003)

- [64.] Bischvanger, H.: Enzyme kinetice, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2002)
- [65.] Coleman, D.E., Rao, G.S., Goldsmith, E. J., Cook, P. F., Hartus, B. G.:  
Biochemistry 41, 6928-38 (2002)
- [66.] Doubnerová, V., Muller, K., Šumpelová, M., Čeřovská, N., Ryšlavá, H.: Plant Sci.  
v tisku