3133

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

Katedra biochemie

Izolace a charakterizace fosfoenolpyruvátkarboxylasy ze semen *Zea mays*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Martin Černý

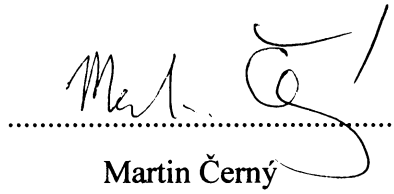
Školitelka: RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha 2007

Chtěl bych poděkovat všem, kteří mě podporovali a pomáhali mi během této práce. Děkuji své školitelce RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za její cenné rady a připomínky, Mgr. Veronice Doubnerové a Ing. Karlu Müllerovi za jejich laskavou asistenci a milou pomoc při zvládání laboratorních postupů. Také děkuji své rodině a přátelům za povzbuzování a pomoc při překonání méně úspěšných experimentů. Děkuji Vám!

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval sám pod vedením své školitelky RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a veškerou použitou literaturu řádně citoval.

Praha 2007



Martin Černý

OBSAH

OBSAH **4**

PŘEDMLUVA **7**

Teoretická část 8

1. ÚVOD **8**

1.1 FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASA 8

1.1.1 ZÁKLADNÍ INFORMACE *8*

1.1.2 REAKČNÍ MECHANISMUS PEPC *9*

1.1.3 ÚLOHA PEPC V PŘÍRODĚ *10*

1.1.4 REGULACE AKTIVITY PEPC *13*

1.1.5 GENOVÉ RODINY PEPC *14*

1.2 FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASAKINASA 14

1.3 SEMENA A VÝVOJ ROSTLIN 15

1.3.1 PEPC V SEMENECH *16*

1.4 CÍLE TÉTO PRÁCE 17

2. MATERIÁL A METODY **17**

2.1 MATERIÁL 17

2.2 CHEMIKÁLIE A ENZYMY 18

2.3 PŘÍSTROJE 19

Praktická část 20

2.4 METODY 20

2.4.1 MĚŘENÍ AKTIVITY PEPC *20*

Izolace a chromatografické metody 20

2.4.2 IZOLACE PEPC *20*

2.4.2.1 Homogenizace *20*

2.4.2.2 Extrakce a frakcionace síranem amonným *20*

2.4.2.3 Chromatografie na iontoměniči *20*

2.4.2.4 Gelová chromatografie *21*

2.4.2.5 Chromatografie na koloně hydroxyapatitu *21*

Elektroforetické metody 22

2.4.3 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU V PŘÍTOMNOSTI SDS (SDS – PAGE) *22*

2.4.3.1 Příprava vzorku pro elektroforetickou separaci ... 22
2.4.3.2 Provedení SDS-PAGE ... 22
2.4.3.3 Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu ... 22
2.4.4 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU V NATIVNÍM PROSTŘEDÍ ... 23
2.4.5 DETEKCE AKTIVITY PEPC V GELU ... 23
2.4.6 PŘENOS PROTEINU NA PVDF MEMBRÁNU ... 23

Kinetické studie ... 24
2.4.7 MĚŘENÍ AKTIVITY PEPC V KINETICKÝCH STUDIÍCH ... 24
2.4.8 STANOVENÍ KINETICKÝCH PARAMETRŮ PEPC V ZÁVISLOSTI NA TEPLOTĚ ... 24
2.4.9 STUDIE VLIVU ALOSTERICKÝCH EFEKTORŮ NA AKTIVITU PEPC ... 24
2.4.10 STUDIUM FOSFORYLACE PEPC ... 25
2.4.11 URČENÍ KINETICKÝCH KONSTANT PEPC ... 25

Chemické metody ... 26
2.4.12 STANOVENÍ ROZPUSTNÝCH PROTEINŮ DLE BRADFORDOVÉ ... 26
2.4.13 STANOVENÍ FOSFÁTU ... 26

3. VÝSLEDKY ... **27**

3.1 IZOLACE PEPC ... 27

3.2 IDENTIFIKACE ISOFORMY PEPC ... 31
3.2.1 GENOM KUKUŘICE ... 31
3.2.2 DETEKCE AKTIVITY PEPC V GELU ... 31

3.3 VLIV TEPLOTY NA RYCHLOST REAKCE KATALYZOVANÉ PEPC ... 32

3.4 VLIV ALOSTERICKÝCH EFEKTORŮ NA AKTIVITU PEPC IZOLOVANÉ ZE SEMEN KUKUŘICE ... 33
3.4.1 VLIV ACETYL-KOENZYMU A AND KOENZYMU A NA AKTIVITU PEPC ... 33
3.4.2 VLIV L-ASPARTÁTU NA AKTIVITU PEPC ... 34
3.4.3 VLIV CITRÁTU NA AKTIVITU PEPC ... 34
3.4.4 VLIV D-GLUKOSA-6-FOSFÁTU NA AKTIVITU PEPC ... 35
3.4.5 VLIV GLYCINU NA AKTIVITU PEPC ... 36
3.4.6 VLIV L-MALÁTU NA AKTIVITU PEPC ... 37
3.4.7 VLIV PYRUVÁTU NA AKTIVITU PEPC ... 39

3.5 STUDIUM FOSFORYLACE PEPC ... 39
3.5.1 KINETICKÉ PARAMETRY DEFOSFORYLOVANÉ PEPC ... 41

3.8 STANOVENÍ FOSFÁTU ... 47

4. DISKUSE ... **48**

4.1 MĚŘENÍ AKTIVITY PEPC 48

4.2 IZOLACE 48

4.3 IDENTIFIKACE ISOFORMY PEPC 49

4.4 VLIV TEPLOTY NA AKTIVITU PEPC 50

4.5 ALOSTERICKÉ EFEKTORY A JEJICH VLIV NA AKTIVITU PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE 51

4.5.1 L-ASPARTÁT NEMÁ VLIV NA AKTIVITU PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE *51*

4.5.2 D-GLUKOSA-6-FOSFÁT VYKAZUJE POUZE SLABOU AKTIVACI PEPC *52*

4.5.3 L-MALÁT INHIBUJE AKTIVITU PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE *53*

4.5.4 GLYCIN NENÍ SILNÝM MODULÁTOREM PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE *54*

4.5.5 CITRÁT INHIBUJE PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE *54*

4.5.6 PYRUVÁT INHIBUJE PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE *55*

4.5.7 ACETYL-KOENZYM A, KOENZYM A NEVYKAZUJÍ ŽÁDNÝ VLIV NA AKTIVITU PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE *55*

4.6 FOSFORYLACE A VLIV FOSFÁTU NA AKTIVITU PEPC IZOLOVANÉ ZE SEMEN KUKUŘICE 56

4.6.1 STUDIUM FOSFORYLACE NATIVNÍ PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE *56*

4.6.2 KOMBINACE RŮZNÝCH VLIVŮ NA AKTIVITU PEPC *57*

4.6.3 FOSFÁT A MECHANISMUS ÚČINKU FOSFORYLACE PEPC *58*

4.7 METODA STANOVENÍ FOSFÁTU 59

4.8 PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE 62

5. SOUHRN **63**

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK **65**

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **67**

PŘEDMLUVA

Tato práce se snaží rozšířit znalosti o významném enzymu kukuřice. I když je tento příspěvek malý, každý kousek by se měl započíst, jelikož napomáhá postupně porozumět živému světu kolem nás, což je jedním z hlavních cílů přírodních věd.

Teoretická část

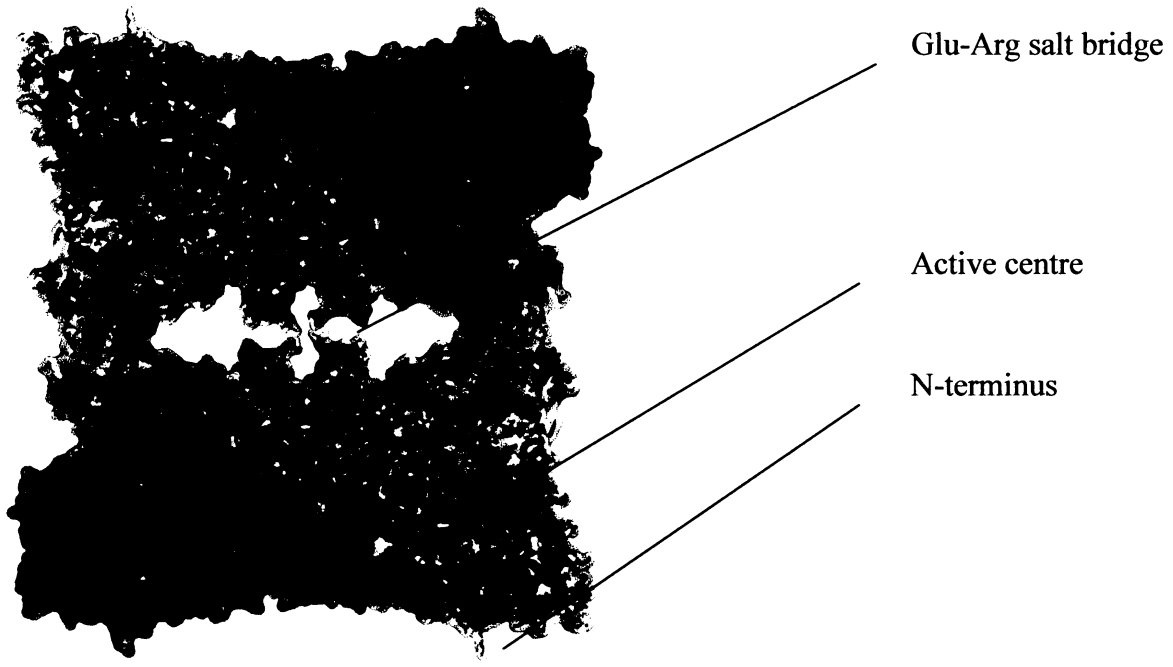
1. ÚVOD

1.1 FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASA

1.1.1 ZÁKLADNÍ INFORMACE

Tématem této práce je enzym fosfoenolpyruvátkarboxylasa (EC 4.1.1.31, dále jen PEPC), objevený roku 1953 (Bandurski a Greiner) v listech špenátu.[1] Tento enzym byl dříve intenzivně studován především ve spojitosti se svoji rolí v C_4 a CAM rostlinách. Nyní je zkoumána především jeho regulace pomocí specifické PEPC-kinasy.[2]

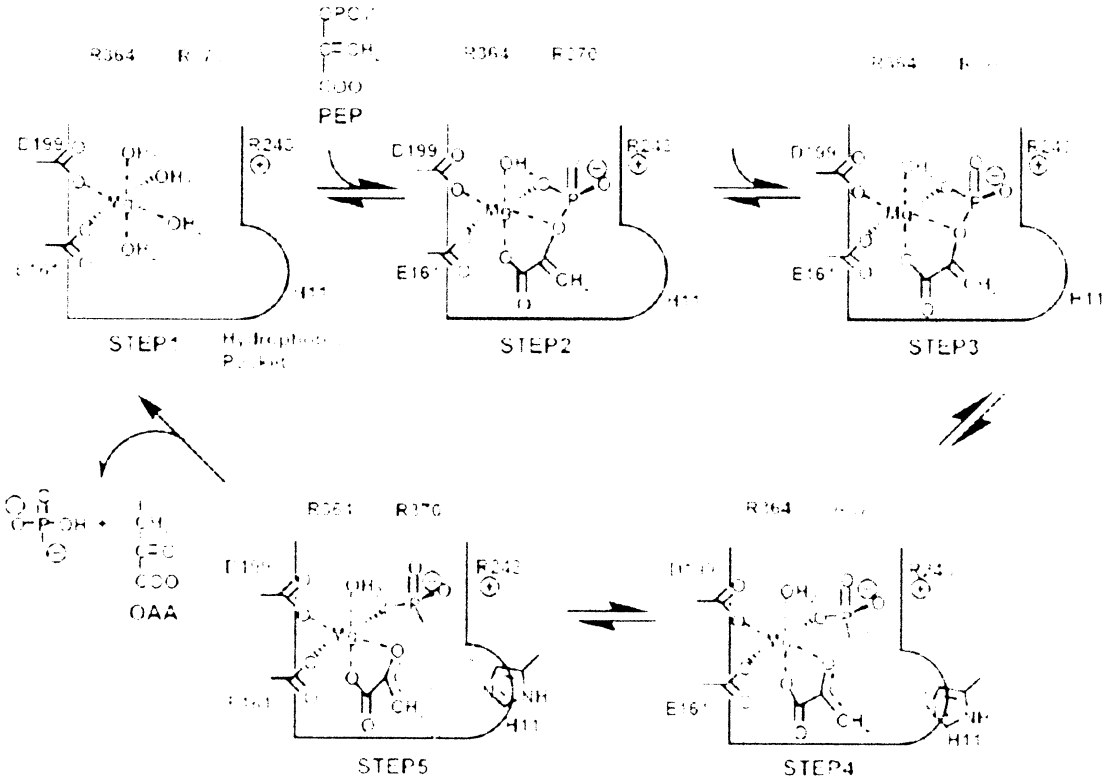
PEPC se nejčastěji vyskytuje jako homotetramer, skládající se ze 4 identických podjednotek.[3] Tyto podjednotky tvoří dimery, takže výsledná tetrametrická struktura je dimer dimerů (Obr. 1). PEPC je široce zastoupena v přírodě a exprimována v organismech od bakterií po vyšší rostliny. Avšak žádný protein s PEPC aktivitou nebyl identifikován v houbách, kvasinkách, či živočiších.[2] Velikost polypeptidu PEPC se liší v závislosti na svém původu: přibližná molekulová hmotnost je 60 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 116 kDa a 134 kDa pro PEPC archebakterií, bakterií, cévnatých rostlin, sinic a prvoků, respektive.[3][4] Katalytická aktivita monomeru nebyla prokázána. Tetrametrická struktura je stabilizována solnými můstky mezi COO^- skupinou kyseliny glutamové a NH_3^+ skupinou argininu.[3]



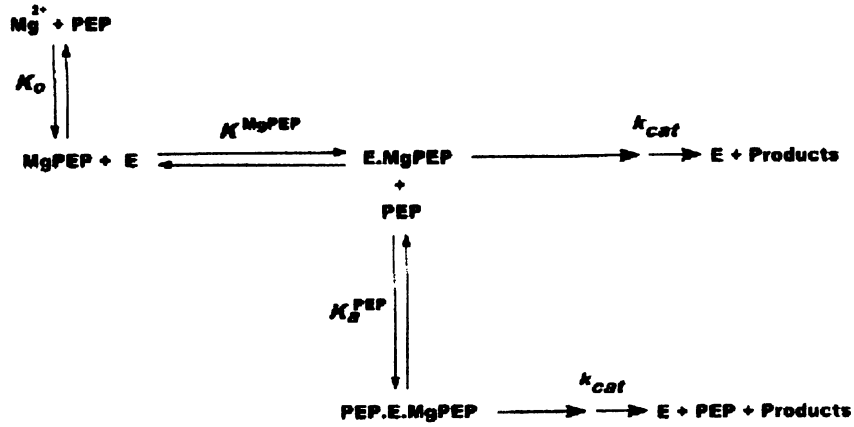
Obr. 1: Homotetramerická struktura PEPC modelovaná v PyMOL v0.99. (Data z 1JQO PDB database)[5]

1.1.2 REAKČNÍ MECHANISMUS PEPC

PEPC katalyzuje ireversibilní fixaci hydrogenuhličitanu na fosfoenolpyruvát za vzniku oxaloacetátu a volného fosfátu. Pro průběh této reakce jsou nezbytné dvojmocné ionty, kterými jsou nejčastěji ionty manganaté, či hořečnaté. Přesný mechanizmus reakce je dnes určen z krystalografických studií.[6][7] Hlavní roli mají postranní skupiny His, Glu, Asp a Arg v aktivním centru. Reakce je uspořádaná: v prvním kroku zbytky aspartátu a glutamátu váží v aktivním centru dvojmocný kation kovu Me^{2+}, v druhém kroku PEP interaguje s Me^{2+} a tvoří PEP.Me^{2+} komplex. Pro třetí krok jsou nezbytné zbytky argininu: tvoří se enolátový anion pyruvátu v komplexu s Me^{2+} a karboxyfosfát z PEP a hydrogenuhličitanu. Ve čtvrtém kroku zbytky histidinu katalyzují štěpení karboxyfosfátu na volný fosfát a oxid uhličitý, který následně elektrofilně napadá komplex pyruvát.Me^{2+}. Ve finálním kroku je uvolněn produkt oxaloacetát a volný fosfát (Obr. 2). Navržený mechanismus předpokládá vazbu PEP na Me^{2+}, který již byl v molekule PEPC přítomen při krystalizaci. Nezohledňuje tedy možnost vazby přímo komplexu PEP.Me^{2+}. Z tohoto důvodu je zde uvedena také složitější reakční rovnováha, která byla používána pro vysvětlení reakčního mechanismu dříve.[8] (Obr. 3).



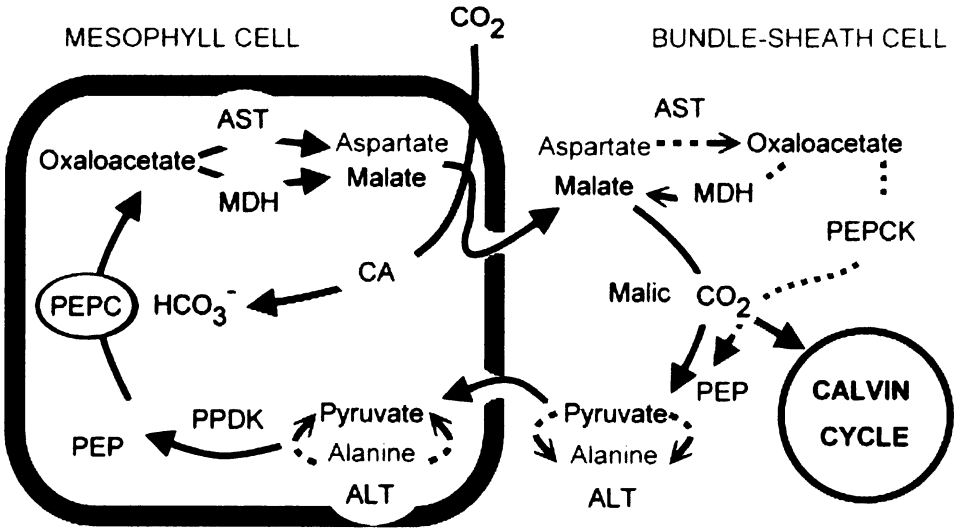
Obr. 2: Reakční mechanismus PEPC dle krystalografických studií. (*E.coli*)[6]



Obr. 3: Komplexní reakční schéma ukazující různé možnosti pro interakci enzym - substrát. (*K* – konstanta pro danou rovnováhu)[8]

1.1.3 ÚLOHA PEPC V PŘÍRODĚ

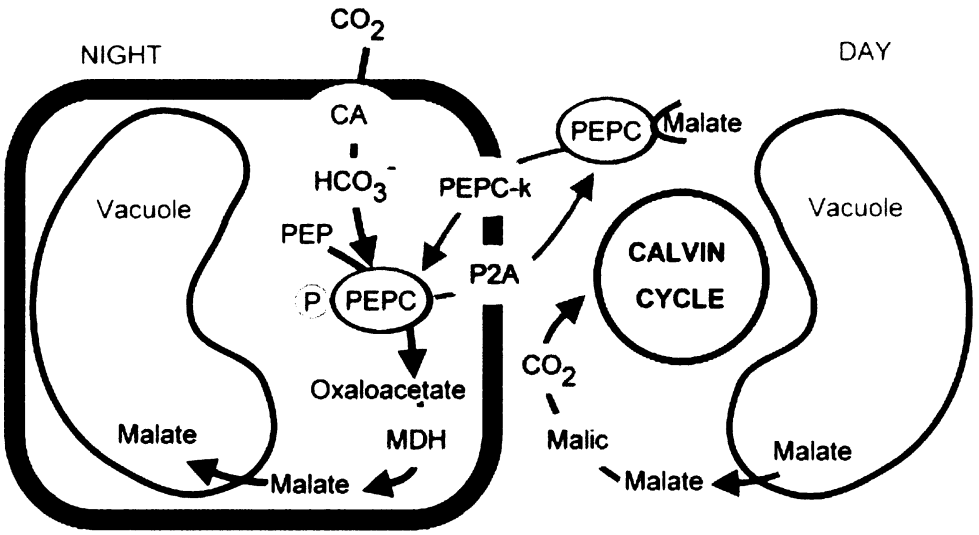
I když byla první PEPC nalezena v rostlině C_3 špenátu,[1] byl tento enzym dlouho studován téměř výhradně ve spojitosti se svojí fotosyntetickou rolí v rostlinách C_4 a CAM. Důvodem byla mnohem vyšší aktivita PEPC v těchto rostlinách. PEPC plní v obou případech stejnou úlohu - zvyšuje koncentraci oxidu uhličitého v chloroplastu, kde je fixován v Calvinově cyklu. V C_4 rostlinách (Obr. 4) probíhá primární karboxylace v mezofylových buňkách, dekarobxylace a Calvinův cyklus v buňkách pochev svazků cévních, oba procesy jsou tak odděleny prostorově.



Obr. 4: Různé mechanizmy asimilace CO_2 v C_4 rostlinách. (*PEPC* – fosfoenolpyruvátkarboxylasa, *CA* – karbonátanhydrasa, *AST* – aspartát aminotransferasa, *MDH* – malátdehydrogenasa, *PPDK* – pyruvát, orthofosfátdikinasa, *ALT* – alaninaminotransferasa, *PEPCK* – carboxykinase, *Malic* – NAD(P) – malátdehydrogenasa)[9][10]

Byl popsán i speciální případ C_4 fotosyntézy v rámci jedné buňky; i tady jsou procesy separovány do dvou prostorů.[11] CAM rostliny (Obr. 5) oddělují asimilaci CO_2 v čase: fixují CO_2 v noci a čtyřuhlíkatá sloučenina (malát) je skladována. Ve dne probíhá dekarboxylace a Calvinův cyklus.[10]

Oba dva typy (C_4 a CAM) jsou výsledkem adaptace rostlin na vysoké sluneční intenzity, sucho a horko. PEPC plní v tomto procesu významnou roli. Zatímco v běžné C_3 dráze jsou třeba 3 molekuly ATP pro asimilaci jedné molekuly CO_2 karboxylasovou aktivitou enzymu Rubisco, C_4/CAM rostliny potřebují další 2 molekuly ATP na regeneraci PEP. Tento vklad vynaložený na zajištění vysoké koncentrace CO_2 přímo v místě jeho fixace Calvinovým cyklem se však mnohonásobně vyplácí s rostoucí teplotou, kdy jednak klesá koncentrace CO_2 a kdy se také snižuje afinita Rubisco k CO_2 více než k O_2, čímž u C_3 rostlin začne převažovat oxygenázová aktivita Rubisco, dochází k zvýšené fotorespiraci a výtěžek fotosyntézy se významně snižuje. [9] Výhodou PEPC je vysoká afinita pro CO_2, který váže ve formě HCO_3^- a nepřítomnost oxygenazové aktivity.



Obr. 5: PEPC je hlavním enzymem CAM rostlin. (*PEPC* – fosfoenolpyruvátkarboxylasa, *PEPC-k* – specifická PEPC-kinasa, *P2A* – proteinphosphatasa 2A, *P-* fosforylace, Malic – NADP malátdehydrogenasa oxalacetát dekarboxylační)[10][12]

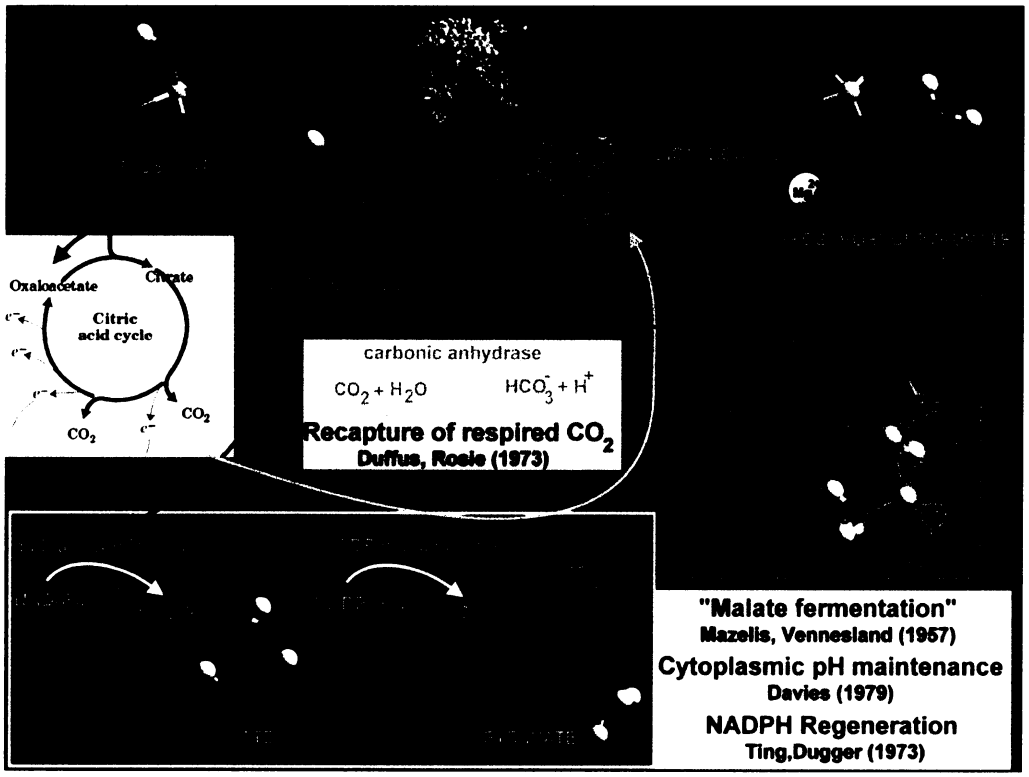
CAM je metabolickou adaptací na aridní prostředí, kdy stomata jsou zavřena během dne a otevírají se až v noci, čímž je zabráněno nadměrné ztrátě vody transpirací. Tyto rostliny jsou schopné mít menší spotřebou vody než rostliny C_4 (až 5×), či C_3 (až 10×) respektive. PEPC umožňuje CAM rostlinám funkční Calvinův cyklus během dne díky noční akumulaci CO_2 ve formě malátu.

Specifická kinasa PEPC-k je v CAM rostlinách zodpovědná za aktivaci PEPC během noci a inaktivaci během dne a také odpovídá za zvýšenou aktivitu v osvětlených listech rostlin C_4. Její

role je nejvíce patrná u CAM rostlin. Defosforylovaná PEPC je mnohem více senzitivní k inhibici malátem, který je během dne transportován z vakuoly.[12]

Úlohy takzvaných „nefotosyntetických" PEPC v C_4 rostlinách, PEPC v C_3 rostlinách, archaebakteriích a bakteriích jsou odlišné (Obr. 6). Různorodost v organismech koreluje s různorodostí hlavních funkcí a také s jejich regulacemi, které budou shrnuty v následující kapitole (1.1.4).

Společnou rolí PEPC je produkce oxaloacetátu pro citrátový cyklus anaplerotickou reakcí.[3] Kooperace mezi PEPC, malátdehydrogenasou a NADP-ME (NADP-malátdehydrogenasou oxalacetát dekarboxylační) udržuje stálou hodnotu intracelulárního pH v cytoplazmě. Tato kooperace také slouží při regeneraci NAD^+ v procesu tzv. „malátové fermentace", která se uplatňuje například v ponořených částech těla bažinných rostlin, či v raných stádiích klíčení semen po inbibici.[13] PEPC také hraje roli v tkáních asimilujících dusík,[14] ve kterých může být aspartát (produkt transaminace oxaloacetátu) využit vedlejší reakcí asimilace dusíku. Důležitou úlohou je také fixace respirovaného CO_2, která se uplatňuje například v zrajícím ovoci.[13] PEPC je také zkoumána ve spojitosti s reakcí na stres. Oxaloacetát a malát mohou být použity pro chelataci těžkých kovů a jejich následné uložení ve vakuole.[15] Také stres ozonem vyvolal zvýšenou aktivitu PEPC.[16] Zvýšená aktivita PEPC je studována i v souvislosti s biotickým stresem.[17]



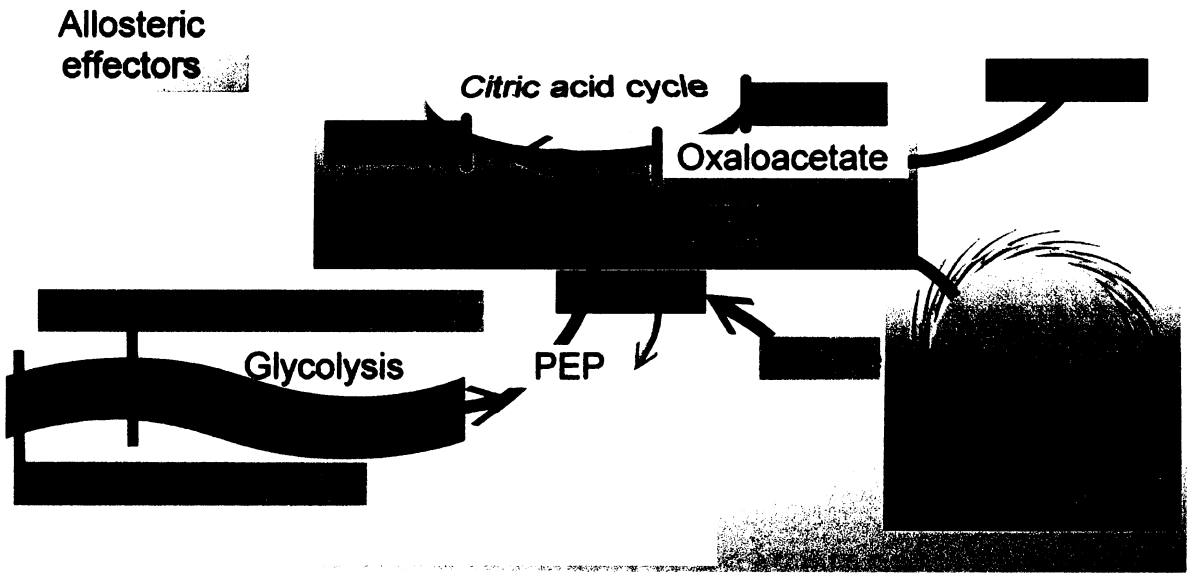
Obr. 6: Významné role PEPC v rostlinách C_3 a nefotosyntetických organismech. (V závorkách rok a jména objevitelů)[13]

1.1.4 REGULACE AKTIVITY PEPC

PEPC se účastní významných metabolických drah, a tak je velmi důležitá její regulace. Enzym je regulován na úrovni exprese.[3]

Teplota i pH ovlivňují aktivitu PEPC. Dle nedávné studie zde mají úlohu mobilní smyčky (Obr. 49, s.62) interagující s aktivním centrem.[18] PEPC C_4 rostlin má většinou teplotní optimum okolo 35°C a pH optimum 8.1. Nižší pH může ovlivňovat jak aktivitu enzymu, tak jeho senzitivitu k modulátorům, např. inhibice L-malátem.[19]

L-malát je jeden z nejběžnějších inhibitorů PEPC (Obr. 7). Je přímým produktem redukce oxaloacetátu a inhibuje PEPC bakterií, rostlin a také některých archebakterií.[20] Inhibice zpětná vazbou pomocí malátu je důležitá především v kombinaci s aktivitou PEPC-k, jak bylo zmíněno ve spojitosti s rostlinami CAM (1.1.4). Druhý běžný inhibitor je L-aspartát, rovněž přímý produkt metabolismu oxaloacetátu. Některé rostlinné typy PEPC jsou také senzitivní k citrátu a pyruvátu (např. C_4 isoforma kukuřice) a PEPC z *E. coli* je inhibována sukcinátem.[20]



Obr. 7: Důležité alosterické modulátory. (*Zelená* – aktivátory, *Červená* – inhibitory, *Žlutá* – substrát a produkt reakce PEPC)

Allosterické aktivátory jsou více závislé na zdroji PEPC. PEPC rostlin (C_4 isoforma) je většinou modulována metabolity glykolýzy, jako jsou glukosa-6-fosfát, či fruktosa-1,6-bisfosfát a také glycinem. [8] Bakterialní PEPC je modulována metabolity β-oxidace mastných kyselin - acetyl-koenzymem A a samotnými mastnými kyselinami.[21] Propojení mezi metabolickými dráhami může v některých organismech posunout PEPC na úroveň spínače mezi katabolickými a anabolickými pochody.[20]

Velmi důležitá je regulace PEPC fosforylací (Obr. 9, str.15). Je zajišťována specifickou PEPC-kinasou (PEPC-k), která fosforyluje serinový zbytek v sekvenci blízko N-terminálního konce. Tato sekvence vyskytující se pouze u rostlinných PEPC je vysoce konzervovaná.[9] Druhou složkou této regulace je proteinfosfatasa 2A, která katalyzuje zpětnou reakci. Proteinfosfatasa 2A (P2A, EC 3.1.1.16) z C_4 rostlin je podobná ostatním eukaryotickým P2A. Je to heterodimer složený z ~103 kDa a ~74 kDa podjednotek.[22] PEPC-k byla intenzivně studována a bude blíže rozebrána v následující kapitole (1.4). Mechanismus interakce fosforylovaného serinu v N-terminální sekvenci s vlastní molekulou PEPC bude rozebrán v praktické části (4.6.3). Nejčastějším důsledkem fosforylace je zvýšení aktivity PEPC, nebo změna afinity enzymu k substrátu PEP. Obojí je většinou také spojeno se sníženou citlivostí k inhibici malátem.[3]

Je jen málo informací o regulaci PEPC proteolýzou. Odštěpení 20 C-terminálních aminokyselin trypsinem *in vitro* způsobuje ztrátu regulace enzymu malátem.[23] Ztráta N-terminalní regulační sekvence je spojována se stárnutím proteinu a znamená ztrátu regulace fosforylací.[7]

1.1.5 GENOVÉ RODINY PEPC

Dokončení genomových studií odhalilo mnoho zajímavých informací, mimo jiné také ve výzkumu PEPC. Geny pro PEPC byly identifikovány v rostlinách, bakteriích a nedávno také v archebakteriích.[20] Bakterie a *archaea* mají pouze jeden gen kódující PEPC, avšak u rostlin byly nalezeny celé malé genové rodiny PEPC.[24] Několik isoforem těchto rodin vykazuje vysokou podobnost (84-91% homologie u *Arabidopsis Atppc1,2,3* s molekulovou hmotností 110,3, 109,7 a 110,2 kDa respektive). U obou sekvenovaných rostlin *Arabidopsis thaliana* a *Oryza sativa* byla nalezena isoforma PEPC s nízkou podobností k rostlinnému typu PEPC (39-40% u *Arabidopsis Atppc4*, molekulová hmotnost 116,6 kDa), ale vysokou podobností k PEPC bakteriálním (*Atppc4* 42% k *E.coli* PEPC). Tato isoforma také postrádá fosforylovatelnou N-terminální sekvenci.[25]

1.2 FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASAKINASA

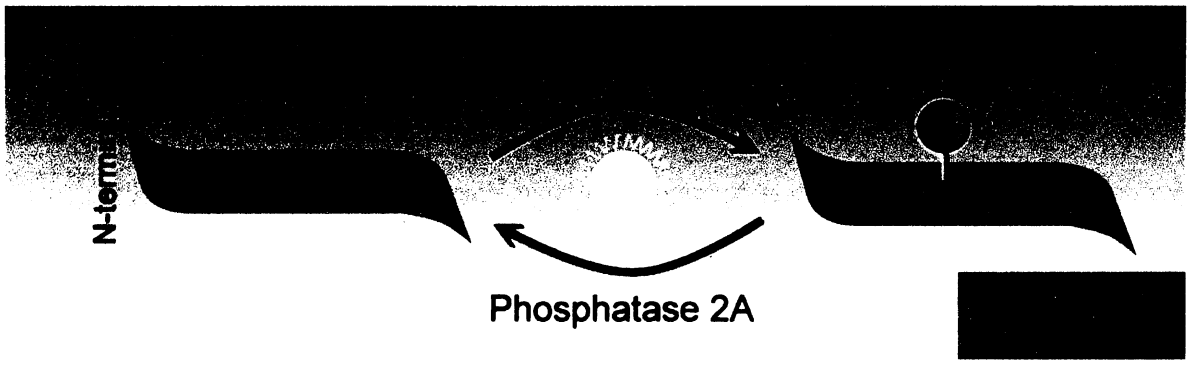
Specifická fosfoenolpyruvátkarboxylasa-kinasa (PEPC-k) je důležitým objevem ve studiu regulací PEPC a je stále intenzivně studována. Je to protein přítomný ve velmi malém množství a první úspěšné klonování jeho cDNA z *Bryophyllum fedtschenkoi* bylo publikováno v roce 1999.[3] PEPC-k je nejmenší známá proteinkinasa, s molekulovou hmotou přibližně 30 kDa. Patří do rodiny Ser/Thr kinas (Obr. 8) a je nejevíce příbuzná k Ca^{2+}/kalmodulín-regulované skupině proteinkinas. Postrádá však N-terminální část a C-terminální regulační oblast, takže jí tvoří pouze katalytická doména, je nezávislá na přítomnosti Ca^{2+} ionty.[26]

N-terminální sekvence PEPC (E/D)(K/R)XX**S**IDAQLR se **Ser** zbytkem, který může být fosforylován, je vysoce konzervovaná ve všech zkoumaných rostlinných typech PEPC.[3] Samotný

proces fosforylace je regulován především expresí PEPC-k. Tato exprese je aktivována světlem u rostlin typu C_4 a cirkadiáním rytmem u rostlin typu CAM.

Obr. 8: Fosforylasakinasa. (Přiklad katalytické podjednotky γ serin/threonin proteinkinasy s vázaným ATP (oranžová) a substrátem (modrá), modelováno v PyMOL v0.99, data z 1PHK PDB database)[9]

Regulace exprese PEPC-k v C_3 rostlinách je složitější. Je známo, že vedle regulace světlem je také důležitá dostupnost dusíkatých látek.[26] Oxidační a solný stres rovněž mohou ovlivnit její expresi.[3][27]



Obr. 9: PEPC je regulována fosforylací na konzervovaném Ser zbytku v N-terminální sekvenci

Aktivace světlem je prostudována nejvíce. Tato dráha začíná v chloroplastu a zahrnuje inositol-1,4,5-trifosfát, uvolnění vakuolárního Ca^{2+}, aktivaci Ca^{2+}/kalmodulinové proteinkinasy a konečně syntézu PEPC-k mRNA.[3][28]

1.3 SEMENA A VÝVOJ ROSTLIN

Produkce semen a jejich následná dormance je důležitým příkladem adaptace rostlin na život na souši a sezónní změny. Dormance zajišťuje ochranu před nepříznivými podmínkami a

způsob pro rozšíření v přírodě. Pro dosažení dormance je třeba dehydratace semen. V kukuřice je pouze 10% z hmoty semen tvořeno vodou a tento podíl může být snížen dokonce až na 3,3% bez viditelného poškození funkce semen.[29] Zbylá hmota je rozdělena mezi proteiny, oleje a polysacharidy v poměru 2:1:16.[15] Proteiny slouží vedle strukturních a metabolických funkcí také jako nutriční zásoba především dusíku a síry. Tyto zásobní proteiny mohou tvořit až 50% všech přítomných proteinů semen a jsou uloženy ve formě jednomembránových tělísek.[30] V semenech jsou také uloženy inhibitory proteas, toxiny (např. abrin, ricin), antimikrobiální, anti-fungální a anti-herbivorní látky, které zajišťují semenům ochranu.[30]

Dormance může být způsobena souhrou fytohormonů abscisové kyseliny a kyseliny giberelinové, nebo přítomností inhibitorů růstu. Také obal semen je důležitý. Brání růstu a rehydrataci, která by mohla plně aktivovat uložené enzymy, či odplavit inhibitory růstu. Odstranění, či porušení obalu, světlo, chlad, či stimulace teplotou mohou přerušit dormanci a zahájit germinaci.[31]

Během germinace jsou mobilizovány všechny energetické zásoby a také využity specifické rostlinné metabolické dráhy jako je např. glyoxylátový cyklus. Voda o nízké teplotě obsahuje pouze 0,8% O_2 a rozpustnost kyslíku dále klesá s rostoucí teplotou.[30] Mezi těsně uskupenými buňkami semen je téměř nemožný přísun kyslíku v jiné formě, a tak germinace probíhá v počátečních fázích v hypoxii či dokonce při zcela anaerobních podmínkách. Fotosyntéza je tak v počátcích určena nikoliv jako zdroj energie, ale jako zdroj kyslíku. V období nedostatku kyslíku využívají rostliny tři běžné fermentační dráhy pro regeneraci NAD^+: laktátové kvašení produkující laktát, alkoholové kvašení produkující ethanol a malátové kvašení produkující L-malát.[30]

1.3.1 PEPC V SEMENECH

PEPC v semenech rostlin nepatří mezi prozkoumané isoformy tohoto enzymu. Poměrně vysoká aktivita PEPC byla nalezena v semenech kukuřice (Ryšlavá, 1989)[32] a také v několika dalších pracích byla nelezena aktivita PEPC v semenech [33][34][35] ječmene,[36] pšenice,[37][38] fazole,[39] vojtěšky[40] a révy.[41] Aktivita PEPC byla také pozorována při imbibici semen čiroku,[42] cDNA pro PEPC byla izolována z vyvíjejících se semen sóji[43] a nedávno byla také publikována práce studující korelace mezi obsahem lipidů v semenech řepky a aktivitou PEPC.[44] Většina těchto prací se zabývala pouze aktivitou PEPC či dokonce pouze její immunodetekcí. Skutečné kinetické charakterizace byly provedeny pouze v první studii PEPC ze semen kukuřice, PEPC ze semen [illegible] a fazole. Studie semen [illegible] ječmene a pšenice se také zabývaly PEPC-k a fosforylací. Mimo prací studujících dozrávající semena [illegible] nebyla do dnešního dne publikována významná studie zabývající se jak kovalentní, tak allosterickou regulace PEPC. Žádná práce nebyla publikována o regulaci fosforylací PEPC ze semen rostliny C_4 a ani žádná jiná studie týkající se této isoformy od práce publikované roku 1989.[32]

V semenech kukuřice byla nalezena pouze jedna isoforma.[32] Dvě isoformy PEPC byly detekovány specifickými PEPC protilátkami v extraktech z aleruon-endospermu klíčících semen ječmene. První (103 kDa podjednotka) byla již přítomna v suchých semenech, druhá (108 kDa podjednotka) byla indukována po 24 hodinách imbibice.[36] Podobný závěr přinesla i studie semen [illegible].[34] Suchá semena pšenice obsahují 2 isoformy PEPC, třetí je opět indukována imbibicí.[38] Jedna z isoform [illegible] vykazuje neobvyklou kompozici. Jedná se o heterooktamer, který je složen z 4 podjednotek 107 kDa (totožné s druhou charakterizovanou isoformou ze semen [illegible]) a 4 podjednotek o 64 kDa.[34]

PEPC je ve všech třech posledních případech (ječmen,[36] pšenice,[38] ricinus[34]) uložena v suchých semenech defosforylovaná. Fosforylovaný enzym má vyšší aktivitu a je méně citlivý vůči inhibici malátem. Pouze neobvyklá heterooktamerní isoforma z [illegible] vykazuje přesně opačnou charakteristiku.[35] PEPC v semenech ječmene je fosforylovaná během prvních 24 hodin imbibice.[36] PEPC-k aktivita je detekovatelná i v suchých semenech a není ovlivněna signální kaskádou závisející na světle, která je popisována v listech rostlin C_4.[36]

1.4 CÍLE TÉTO PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo doplnit informace o nefotosyntetické formě fosfoenolpyruvátkarboxylasy (PEPC) ze semen a poskytnout nové údaje ohledně regulace tohoto enzymu fosforylací. Pro studii byla vybrána semena C_4 rostliny kukuřice, protože doposud nebyla zveřejněna žádná práce zabývající se fosforylací PEPC v semenech rostlin tohoto typu a také proto, že fotosyntetický protějšek této isoformy patří dnes mezi jednu z nejlépe prozkoumaných PEPC.

- Izolace PEPC ze semen kukuřice
- Studium fosforylace PEPC pomocí enzymů alkalické fosfatasy a proteinkinasy A
- Stanovení kinetických parametrů fosforylované a defosforylované formy PEPC za různých podmínek (pH, teplota)
- Určení vlivu malátu na aktivitu fosforylované a defosforylované formy PEPC

2. MATERIÁL A METODY

2.1 MATERIÁL

Semena *Zea mays* L. kultivar cv. CE 205 S

2.2 CHEMIKÁLIE A ENZYMY

Acetyl-CoA – Sigma, USA

Akrylamid – Sigma, USA

Alkalická fosfatasa (P6774-10KU; 2,000-4,000 U/mg) – Sigma, USA

L-Aspartát – Sigma, USA (sodná sůl)

ATP – Sigma, USA (disodná sůl)

Bio-Gel HTP Hydroxyapatit – Bio-Rad, USA

Bradfordovo činidlo– Sigma, USA

Citrát – Sigma, USA (sodná sůl)

Koenzym A – Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R, G – Sigma, USA

DEAE-Celulosa – Whatman, USA

Dithiothreitol (DTT) – Sigma, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS) – Serva, Německo

Fast Violet B – Sigma, USA

Fosfoenolpyruvát – Sigma, USA (sodná sůl)

Glycin – Sigma, USA

Glukosa-6-fosfát – Sigma, USA

Inhibitory fosfatas - Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (P5726) – Sigma, USA

- Orthovanadát sodný - množství ATPas, proteintyrosinfosfatasy a další fosfát-přenášející enzymy
- Molybdenan sodný – kyselé a fosfoproteinfosfatasy
- Vinan sodný– kyselé fosfatasy
- Imidazol – alkalické fosfatasy

Inhibitory rostlinných proteas - Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts (P9599) – Sigma, USA

- AEBSF – [4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluorid hydrochlorid] – serinové proteasy
- Bestatin hydrochlorid– aminopeptidasy
- E-64 – [N-(trans-Epoxysuccinyl)-L-leucin 4-guanidinobutylamid] – cysteinové proteasy
- Leupeptin hemisulfátová sůl –serinové a cysteinové proteasy
- Pepstatin A – kyselé proteasy
- 1,10-Fenantrolin - metaloproteasy

L-Malát – Sigma, USA (sodná sůl)

Malátdehydrogenasa (M2634-5KU; ~700U/mg) – Sigma, USA

N, N´ - methylenbisakrylamid – Serva, Německo

NADH – Sigma, USA

Oxaloacetát – Sigma, USA (sodná sůl)

Proteinkinasa A – Sigma, USA; Promega, USA

Pyruvát – Sigma, USA (sodná sůl)

Sephacryl S-300 – Sigma, USA

Standardní proteiny pro elektroforetickou separaci v prostředí SDS – Serva, Německo

TEMED – Serva, Německo

Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Serva, Německo

Další běžné chemikálie – Lachema, Česká republika

2.3 PŘÍSTROJE

ABI Procise Protein Sequencer - ABI, USA

Centrifuga – Hettich, Německo

Elektroforetická souprava – Biometra, Německo

Elektromagnetické míchadlo KMO 2 basic – Labortechnik, Německo

Fastblot B33 – Biometra, Německo

Homogenizer – ETA, Česká republika

Spektrofotometr Helios α - Thermo Spectronic, USA

Spektrofotometr Ultrospec 2100 – Amersham, UK

Vortex KMO – Labortechnik, Německo

Praktická část

2.4 METODY

2.4.1 MĚŘENÍ AKTIVITY PEPC

Aktivita PEPC byla měřena spřaženou reakcí s malátdehydrogenasou (MDH) jako pokles absorbance při 340 nm. Reakční směs pro detekci aktivity obsahovala 100 mM Tris-HCl pH 8,1; 5 mM $NaHCO_3$; 2 mM $MgCl_2$; 0,2 mM NADH; 2 mM PEP; ~4 U MDH (komerční enzym ve vodném roztoku pufru s příměsí glycerolu, SIGMA) v celkovém objemu 1 ml. Výsledná rychlost reakce byla získána lineární regresí 10 měření absorbance v průběhu 3 minut (Ultrospec 2100).

Izolace a chromatografické metody

2.4.2 IZOLACE PEPC

Izolační postup vychází z klasických postupů pro práci s rostlinnými enzymy. Inhibitory proteas (Inhibitor Cocktail) byly přidávány v poměru 1:1000 v časově náročných krocích (dialýza) a k finálnímu produktu purifikace. Inhibitory proteas byly vynechány pouze v experimentu s chráněním enzymu volným fosfátem před proteolýzou.

2.4.2.1 Homogenizace

Prvním krokem byla příprava rostlinného materiálu. 100-200g suchých celých neporušených semen kukuřice (*Zea mays*) bylo po částech jemně umleto pomocí homogenizátoru bez použití pufru. Získaná kukuřičná mouka byla ihned uzavřena do nádoby a uchovávána při teplotě 8-10°C.

2.4.2.2 Extrakce a frakcionace síranem amonným

200 ml pufru A (100 mM Tris-HCl pH 7,8; 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 5 mM $MgCl_2$; 5% glycerol) bylo přidáno ke 100 g homogenizovaných semen. Vše bylo lehce mícháno 30 min při teplotě 8-10°C a po přefiltrování přes dvě vrstvy gázy centrifugováno 45 min při 9600×g a 4°C.

Supernatant byl precipitován pevným síranem amonným v 30-60% intervalu nasycení, po každém srážení centrifugován 45 min při 9600×g a 4°C. Precipitát získaný po 60% nasycení síranem amonným byl resuspendován v přibližně 10 ml pufru B (25 mM Tris-HCl pH 7,8; 0,5 mM DTT; 5 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA; 5% glycerol) a dialyzován proti pufru B přes noc.

2.4.2.3 Chromatografie na iontoměniči

Pro výchozí množství 200 g semen kukuřice byla použita kolona obsahující 20 ml DEAE celulosy. Dialyzovaný preparát získaný po 2.4.2.2 byl centrifugován, aby se odstranily

precipitované proteiny (2500×g; 5 min). Vzorek byl poté aplikován na kolonu DEAE-celulosy ekvilibrovanou pufrem B. Kolona byla promyta 100 ml pufru B. Enzym PEPC byl eluován 140 ml lineárního gradientu (0-300 mM) NaCl v pufru B.

2.4.2.4 Gelová chromatografie

Frakce po ionexové chromatografii, ve kterých byla zjištěna aktivita PEPC, byly slity a sraženy síranem amonným v 0-60% intervalu nasycení a centrifugovány 45 min při 9600×g při 4°C. Sediment byl resuspendován v minimálním objemu pufru B a aplikován na 200 ml sloupec Sephacrylu S-300 ekvilibrovaným pufrem B. Sloupec byl poté promýván pufrem B, frakce s aktivitou PEPC slity. Hlavním důvodem tohoto kroku je odsolení vzorku. Experimenty prokázaly, že NaCl přítomné ve vzorku po ionexové chromatografii nesnižuje účinnost chromatografie na hydroxyapatitu. Z tohoto důvodu může být gelová chromatografie zařazena až jako poslední krok, či vynechána zcela.

Byly používány dvě kolony: 20 ml kolona sloužící výhradně pro odsolování eluátu po chromatografii na hydroxyapatitu, a 200 ml kolona se schopností dělit proteiny dle molekulové hmotnosti. Vzorek bylo nutné aplikovat v co nejmenším objemu, a proto byla nezbytná precipitace síranem amonným do 60% nasycení. Peleta po centrifugaci (45 min, 9600×g, 4°C) byla resuspendována v minimálním objemu pufru B (do 0,5 ml pro 200 ml kolonu a do 200 µl pro 20 ml kolonu) a nanesena na kolonu ekvilibrovanou pufrem B. Tento pufr sloužil také pro následnou eluci.

2.4.2.5 Chromatografie na koloně hydroxyapatitu

Příprava kolony: k 7 g suchého Bio-Gel HTP hydroxyapatitu bylo přidáno do 42 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 7,0 a jemně promícháno. Po 10 minutách sedimentace byla dekantována jemná neusazená vrstva. Kolona byla naplněna startovacím pufrem (0,01 M fosfátový pufr, pH 7,0; 5 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 5% glycerol) a poté jemně přidávány 2-3 ml rehydratovaného hydroxyapatitu. Celý postup poskytl přibližně 20 ml kolonu hydroxyapatitu. Před použitím bylo nutné kolonu promýt nejméně trojnásobkem jejího objemu startovacím pufrem.

Vzorek byl nanesen na kolonu a promyt dvojnásobkem objemu kolony startovacím pufrem. Protein byl eluován zvyšující se koncentrací fosfátu ve startovacím pufru. Pro recyklaci kolony byl užit 0,2 M fosfátový pufr pH 7,0. Dodatečné vyčištění může být dosaženo pomocí 0,4 M fosfátového pufru, či 1 M NaCl.

Elektroforetické metody

2.4.3 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU V PŘÍTOMNOSTI SDS (SDS – PAGE)

SDS-PAGE je zkratkou pro elektroforézu v prostředí polyakrylamidového gelu (PAGE) v přítomnosti SDS. Je to metoda, která dělí proteiny dle jejich velikosti. Detergent SDS redukuje proteiny na jejich primární (linearizovanou) strukturu a obalí je s uniformním negativním nábojem. Dále je užit DTT, který přeruší případné disulfidické můstky.[45]

2.4.3.1 Příprava vzorku pro elektroforetickou separaci

Vzorek pro SDS-PAGE byl smíchán s SDS vzorkovým pufrem (130 mM Tris-HCl pufr pH 6,8; 100 mM DTT; 69 mM SDS; 20% glycerol; 0.005% bromfenolová modř) v poměru 1:1. Vzorky s nízkým obsahem proteinu po chromatografii na hydroxyapatitu byly koncentrovány pomocí ethanolu následujícím způsobem. 200 µl vzorku s nízkým obsahem proteinu bylo precipitováno etanolem v celkovém objemu 1 ml 24 hodin při -20°C, centrifugováno (15 min, 4°C, 16600×g) a resuspendováno v 20 µl SDS vzorkového pufru a 20 µl destilované vody. Vzorky v SDS vzorkovém pufru byly před aplikací na gel přivedeny na 3 minuty k varu.

2.4.3.2 Provedení SDS-PAGE

SDS polyakrylamidový gel byl připraven metodou dle Leammliho.[46] Byly použity 8% nebo 10% koncentrace separačního gelu a 3% nebo 5% koncentrace zaostřovacích gelů. Separace byla provedena pomocí elektroforetické soupravy Multigel Biometra s SDS elektrodovým pufrem (25 mM Tris-HCl pufr pH 8,3; 250 mM glycin; 3,5 mM SDS) při napětí 70 V pro gel zaostřovací a 140 V pro gel separační.

2.4.3.3 Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu

Zaostřovací gel byl před barvením opatrně odstraněn. Proteiny separačního gelu byly buď 15 minut detekovány barvicí lázní obsahující Coomassie brilliant blue (2 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250; 425 ml etanol; 100 ml kyselina octová; 50 ml metanol a 425 ml H_2O) a pozadí následně odbarveno roztokem obsahujícím ethanol, kyselinu octovou a H_2O v poměru 25 : 10 : 65, nebo byly proteiny vizualizovány metodou detekce proteinu dusičnanem stříbrným, která je asi 10× citlivější (2-10 ng).

Postup metody vizualizace proteinů pomocí dusičnanu stříbrného:

- Gely před barvením byly fixovány 20 min v 50% methanol, 12% trichloroctové kyselině, 2% $CuCl_2$
- 10 min promývány promývacím pufrem (10% etanol, 5% kyselina octová)

- 10 min s oxidačním činidlem 0.01% $KMnO_4$
- 10 min promývací pufr
- 10 min promývání 10% etanolem
- Promytí destilovanou vodou, barveno s čerstvě připraveným 0,1% $AgNO_3$ po dobu 10 min
- Alkalizace 1 min v 10% K_2CO_3
- 3-4 min vyvíjení v 0,1% formaldehydu v 20% K_2CO_3
- Zastavení pomocí promývacího pufru
- Promyto 3× destilovanou vodou

2.4.4 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU V NATIVNÍM PROSTŘEDÍ

Elektroforetická separace v nativním prostředí byla provedena dle Lee a Lee.[47] Jedná se o metodu podobnou SDS-PAGE (2.4.3), pouze SDS je nahrazeno ve všech krocích glycerolem. Proteiny jsou separovány především dle svého isoelektrického bodu a molekulová hmotnost ovlivňuje mobilitu pouze částečně. Vzorek pro nativní elektroforézu byl nedenaturovaný – k vzorku byla přidána pouze sacharosa (w10%). Do elektrodového pufru (25 mM Tris-HCl pufr pH 8,3; 250 mM glycin; 10% glycerol) bylo přidáno 100 µl 0,1% bromfenolové modři pro vizualizaci mobility čela. Pro separaci byl užit 10% separační gel a 5% zaostřovací gel. Napětí bylo stejné jako při SDS-PAGE (70 V pro zaostřovací gel a 140 V pro gel separační), ale celá aparatura byla chlazena. Je vhodné provádět celou proceduru v chladové místnosti.

2.4.5 DETEKCE AKTIVITY PEPC V GELU

Pro tuto práci byla modifikována metoda dle Karn et al.[48] Detekce aktivity PEPC je založena na kolorimetrickém stanovení produktu oxaloacetátu v reakci s Fast Violet B (6-benzamido-4-metoxy-*m*-toluidin diazonium chlorid), absorbční maximum pro vzniklý komplex ve vodném prostředí je okolo 450 nm.

Rostlinný extrakt byl separován nativní elektroforézou (2.4.4) a celý gel rychle pokryt smíchaným roztokem z čerstvého činidla A (12,5 ml 100 mM Tris pufr pH 7,5; 7 mM Fast Violet B; 13 mM $MgCl_2$; 30 mM $NaHCO_3$; před použitím uchováván při 4°C) a z činidla B (12,5 ml 100 mM Tris pufru pH 7,5; 250 mg agarosy, zahřáté na 100°C, aby se rozpustila veškerá agarosa, před použitím udržované při 50°C). Po 60-90 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla agarosa odstraněna z povrchu gelu. Přítomnost PEPC se projevila jako výrazné červené proužky.

2.4.6 PŘENOS PROTEINU NA PVDF MEMBRÁNU

PVDF membrána a 10 filtračních papírů (0,35 mm silné) bylo nastříháno podle velikosti gelu. Membrána byla promyta methanolem a následně redestilovanou vodou. Membrána, filtrační

papíry a gel byly ekvilibrovány v přenosovém pufru (80% SDS elektroforetický pufr + 20% methanol). Vše bylo umístěno na přenosové zařízení Fastblot B33 v následujícím pořadí: [anoda (+)] – [5× filtrační papír] – [membrána] – [gel] – [5× filtrační papír] – [katoda (-)]. Přenos proteinů probíhal při elektrickém proudu 5 mA na cm^2 po dobu 30 minut.

Membrána byla 3× po 5 minutách promyta redestilovanou vodou, barvena Coomassie Brilliant Blue (5 min), odbarvena v odbarvovacím roztoku (50% metanol, 10% kyselina octová), znovu promyta destilovanou vodou a vysušena. Protein přenesený na PVDF membránu je takto připraven pro N-terminální sekvenaci.

Kinetické studie

2.4.7 MĚŘENÍ AKTIVITY PEPC V KINETICKÝCH STUDIÍCH

Aktivita PEPC v kinetických studiích byla měřena podobně jako v 2.4.1 pomocí spřažené reakce s malátdehydrogenasou (MDH) jako pokles absorbance při 340 nm. Reakční směs pro určení aktivity vzorku obsahovala 250 mM HEPES-KOH pufr pH 8,1 či 7,3; 5 mM $NaHCO_3$; 2 mM $MgCl_2$; 0,2 mM NADH; ~4 U MDH v celkovém objemu 1 ml. Substrát PEP byl použit v koncentracích od 0 mM po saturační 2 mM či 4 mM. Výsledná rychlost reakce byla získána lineární regresí 10 měření absorbance v průběhu 3 minut (Ultrospec 2100) a dále zpracována (2.4.11).

2.4.8 STANOVENÍ KINETICKÝCH PARAMETRŮ PEPC V ZÁVISLOSTI NA TEPLOTĚ

Všechny studie byly provedeny v reakční směsi pro měření aktivity PEPC (2.4.7). Koncentrace substrátu byla v rozmezí od 0 mM do 2 mM. Reakční směs byla inkubována 5 min při požadované teplotě ve spektrofotometru Helios α–Thermo Spectronic. Reakce byla spuštěna přidáním enzymu.

2.4.9 STUDIE VLIVU ALOSTERICKÝCH EFEKTORŮ NA AKTIVITU PEPC

Pro počáteční experimenty byla použita reakční směs pro stanovení aktivity PEPC obsahující HEPES-KOH pH 7,3 (2.4.7) a saturační koncentrace substrátu 2 mM PEP. V podrobnějších studiích určených k zjištění inhibiční konstanty I_{50} byla použita koncentrační řada modulátoru při saturační koncentraci PEP 2 mM. Pro určení dalších kinetických parametrů PEPC byly kromě koncentrační řady modulátoru (nejméně 4 různé koncentrace včetně nulové) měřeny i koncentrační řady substrátu PEP (řada od 0 do 4 mM). Pro měření v pH optimu enzymu byl použit HEPES-KOH pH 8,1.

2.4.10 STUDIUM FOSFORYLACE PEPC

Stupeň fosforylace PEPC byl určen pomocí metody dle Terada et al. (1990),[49] optimalizované pro účely této práce. Byly použity dva komerčně dostupné enzymy: alkalická fosfatasa a proteinkinasa A (pouze její katalytická podjednotka Mg.ATP dependentní). Vliv fosforylace se projevil změnou v kinetických parametrech enzymu a byl snadno detekován jako změna aktivity při nasycení substrátem (2.4.7).

1) Vzorek pro defosforylaci:

- Odsolený enzym v Tris-HCl pufru pH 7,8; inhibitory proteas 1:100 (Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts)
- 100 U alkalické fosfatasy na přibližně 0,14 U PEPC; laboratorní teplota; 120 min

2) Vzorek pro fosforylaci/refosforylaci

- Odsolený enzym v Tris-HCl pufru pH 7,8; inhibitory proteas (1:100); nebo vzorek po defosforylaci s přídavkem inhibitorů fosfatas 1:50 (Phosphatase Inhibitor Cocktail)
- 350 u proteinkinasy A (1 u je definována firmou Promega jako množství enzymu, které je potřeba pro inkorporaci 1 pmol fosfátu do kaseinu za jednu minutu při 30°C) pro přibližně 0,14 U PEPC; 40 mM HEPES pH 7,3 (snížení pH roztoku, aby se přiblížilo optimu pro proteinkinasu A, ale zároveň nepoškodilo PEPC); 2 mM ATP; 20 mM $MgCl_2$; 30°C; 120 min

Ve všech případech byl užit kontrolní vzorek, kde jsou enzymy fosfatasa a proteinkinasa A nahrazeny destilovanou vodou.

2.4.11 URČENÍ KINETICKÝCH KONSTANT PEPC

Kinetické parametry: maximální rychlost (V_{max}), Michaelis-Mentenova konstanta (K_m) a inhibiční konstanty (K_{ic}, K_{iu}) byly vypočteny nelineární regresí v programu MS Excel proložením experimentálních dat vypočtenými hodnotami z příslušných rovnic (rovnice Michaelis-Mentenové, rovnice enzymové inhibice (Obr. 10)). Statistický soubor obsahoval nejméně 2-3 sady měření minimálně 7 různých koncentrací substrátu PEP pro nejméně 4 koncentrace studovaného efektoru. Koncentrace PEP byla vybrána tak, aby pokrývala koncentrace od 0 mM po saturační.

$$v = \frac{V_{max}.[S]}{K_m.(1+\frac{[I]}{K_{ic}})+[S].(1+\frac{[I]}{K_{iu}})}$$

v.....reakční rychlost

V_{max}.....maximální reakční rychlost

[S].....koncentrace substrátu

K_m.....Michaelis-Menten konstanta

[I].....koncentrace inhibitoru

K_{ic}...kompetitivní inhibiční konstanta pro inhibitor

K_{iu}...nekompetitivní inhibiční konstanta pro inhibitor

Obr. 10: Rovnice enzymové inhibice. [50][51]

Pro odhad typu inhibice byly také použity vynesení dle Lineweaver-Burka, Hofsteeho, Dixona a Hanese. Konstanta I_{50} byla odhadnuta z grafů inhibice.[50][52]

Hillův koeficient (Obr. 11) je určen proložením experimentálních hodnot nelineární regresní křivky pomocí programu Origin 7.5.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^h}{K' + [S]^h}$$

v.....reakční rychlost

V_{max}.....maximální reakční rychlost

[S].....koncentrace substrátu

K'.....konstanta vztahující se k jednotlivým interakcím a vnitřní disociační konstantě

h.....Hillův koeficient

Obr. 11: Hillova rovnice.[50]

Chemické metody

2.4.12 STANOVENÍ ROZPUSTNÝCH PROTEINŮ DLE BRADFORDOVÉ

Metoda pro stanovení obsahu proteinů dle Marion Bradfordové[53] využívá posunu maxima absorbance barvy Coomassie Brilliant Blue G-250 z 465 nm na 595 nm, který je způsoben vazbou argininu a hydrofobních aminokyselin na barvivo. Závislost absorbance při 595 nm na množství proteinu je lineární v rozsahu od 2 μg/ml do 120 μg/ml. Pro kalibraci se užívá hovězí sérový albumin.[45]

33 μl vzorku pro stanovení obsahu proteinů bylo 15 min inkubováno s 1 ml Bradfordové činidla (Sigma). Poté se měřila absorbance při 595 nm. Jako referenční vzorek se použilo 33 μl destilované vody inkubované po stejnou dobu s 1 ml Bradfordové činidla..

2.4.13 STANOVENÍ FOSFÁTU

Modifikovaná metoda založená na reakci fosfátu a $(NH_4)_2MoO_4$ byla v této práci testována jako možná alternativa ke kinetickým měřením stupně fosforylace PEPC. Jednotlivé látky byly přidávány v následujícím pořadí:

- 200 μl vzorku pro stanovení fosfátu
- 100 μl 5M H_2SO_4
- 200 μl $(NH_4)_2MoO_4$
- 10 μl čerstvě připraveného redukčního agens (2% 1-amino-2-naftol-4-sulfonová kyselina; 1,2 g $NaHCO_3$; 1,2 g Na_2SO_3; 0,25g/10 ml H_2O)
- 490 μl H_2O

Absorbance je měřena při 660 nm.

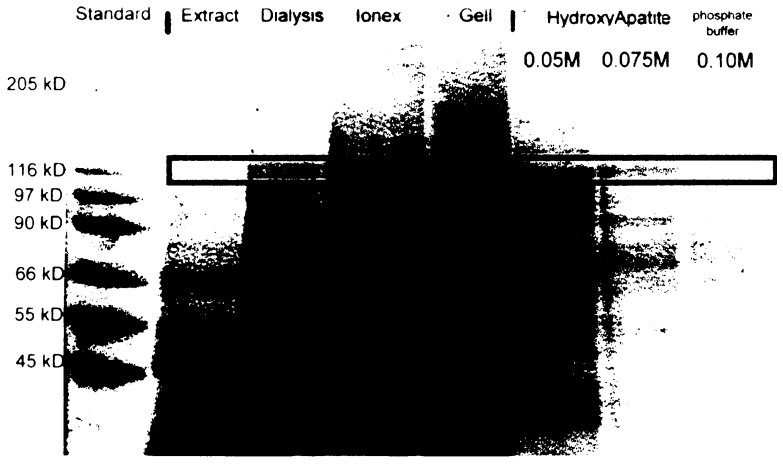
3. VÝSLEDKY

3.1 IZOLACE PEPC

PEPC byla izolována ze suchých semen kukuřice postupem zahrnujícím extrakci, precipitaci síranem amonným, dialýzu, chromatografii na koloně DEAE-celulosy, gelovou chromatografii a chromatografii na hydroxyapatitu podle metod uvedených v kapitole 2.4. Celý postup byl optimalizován. Jako nejvhodnější poměr výchozího materiálu a extrakčního pufru byl zvolen 1:2; interval pro srážení síranem amonným byl ponechán (30-60% nasycení)[32] Celý isolační proces dokumentuje tabulka (Tab. 1), SDS-PAGE (Obr. 12) a odpovídající grafy (Obr. 13, Obr. 14, Obr. 15).

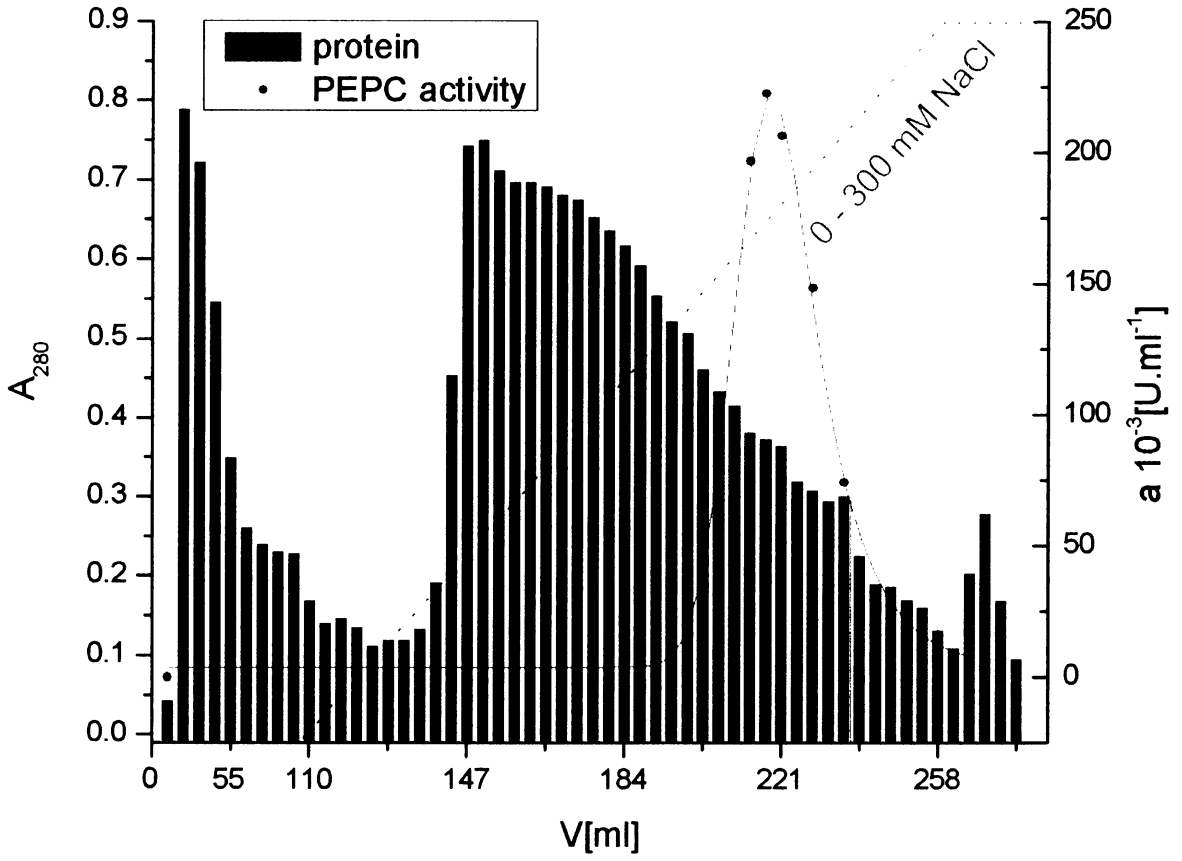
			Souhrn				Výtěžek
IZOLAČNÍ TABULKA		V	$m_{protein}$	aktivita PEPC	celková aktivita PEPC	specifická activita PEPC	
100g semen		[ml]	[mg]	[U]	[μmol.min^{-1}]	10^{-3}[U.mg^{-1}]	[%]
Extrakce		291,0	317,2	0,07	19,71	62,1	100
60% $(NH_4)_2SO_4$		7,2	92,2	2,34	16,84	182,7	85
Dialýza		11,5	78,1	0,94	10,76	137,7	55
Ionex		62,0	11,3	0,14	8,40	745,8	43
Gel		26,9	8,8	0,19	5,12	582,6	26
HydroxyApatit Fosfát [M]	0	20,0	-	-	-	-	-
	0,050	16,8	-	-	-	-	-
	0,075	20,8	1,4	0,09	1,95	1385,9	10
	0,100	16,2	0,7	0,11	1,72	2554,8	9
	0,200	20,0	-	0,04	-	-	-

Tab. 1: Reprezentační purifikační postup PEPC ze semen kukuřice. Množství odpovídá 100 g suchých semen.



Obr. 12: Separace proteinů v průběhu izolace PEPC (Tab. 1), elektroforéza v prostředí SDS. Obdélník označuje přítomnost PEPC.. 20 µl vzorku bylo aplikováno na jamku, vzorek po dialýze je 5× zředěn destilovanou vodou, vzorky po chromatografii na hydroxyapatitu jsou 10× koncentrovány etanolem. 18 µg, 21 µg, 19 µg, 23 µg, 14 µg, ~ 10 µg, ~ 10 µg proteinu ve vzorku z extrakce, dialýzy, ionexu, gelové chromatografie a chromatografie na hydroxyapatitu

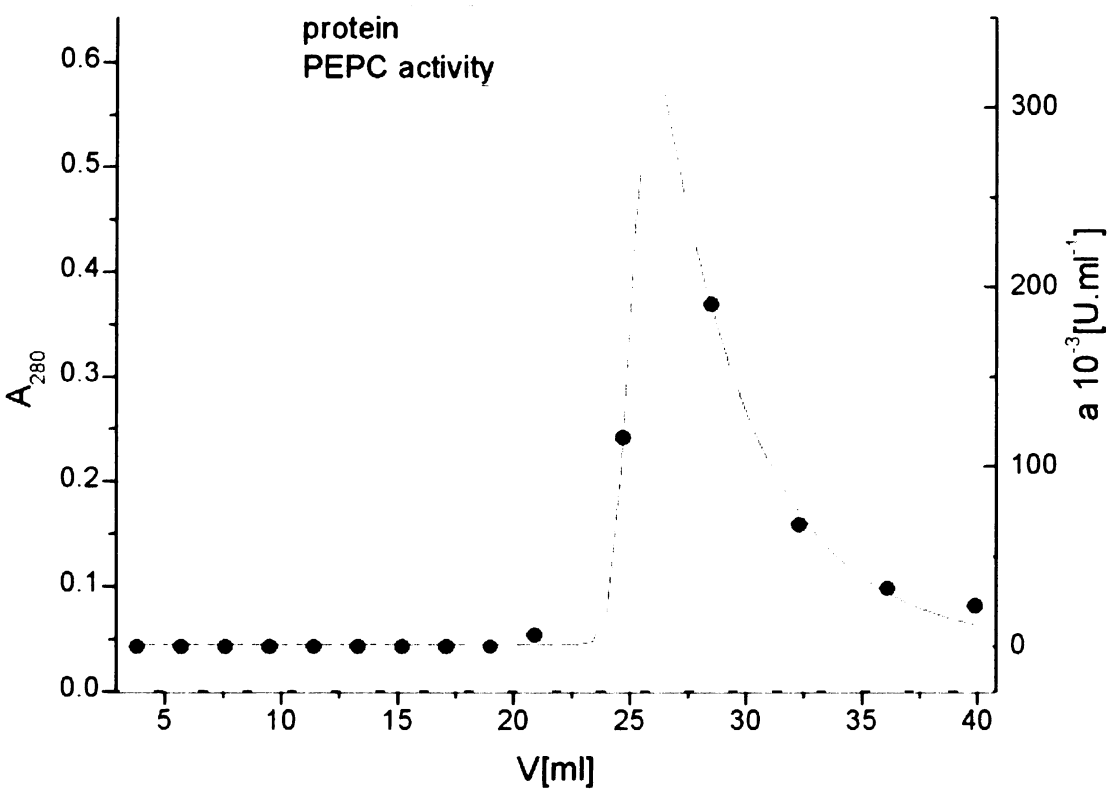
Iontově výměnná chromatografie na DEAE celulose byla klíčovým krokem v purifikaci PEPC. Měla nejlepší poměr stupeň načištění:výtěžek. Separace byla kontrolována pomocí měření aktivity PEPC a detekce obsahu proteinů při A_{280}. Enzym byl eluován při přibližně 240 mM koncentraci NaCl. Frakce s aktivitou přesahující 0,02 $U.ml^{-1}$ byly sebrány. Finální výtěžek byl 62 ml eluátu s aktivitou 8,4 U a načištění bylo asi dvanáctinásobné. (Obr. 13, Tab. 1)



Obr. 13: Separace PEPC na koloně DEAE celulosy. PEPC byla eluována lineárním gradientem (0-300 mM) NaCl.

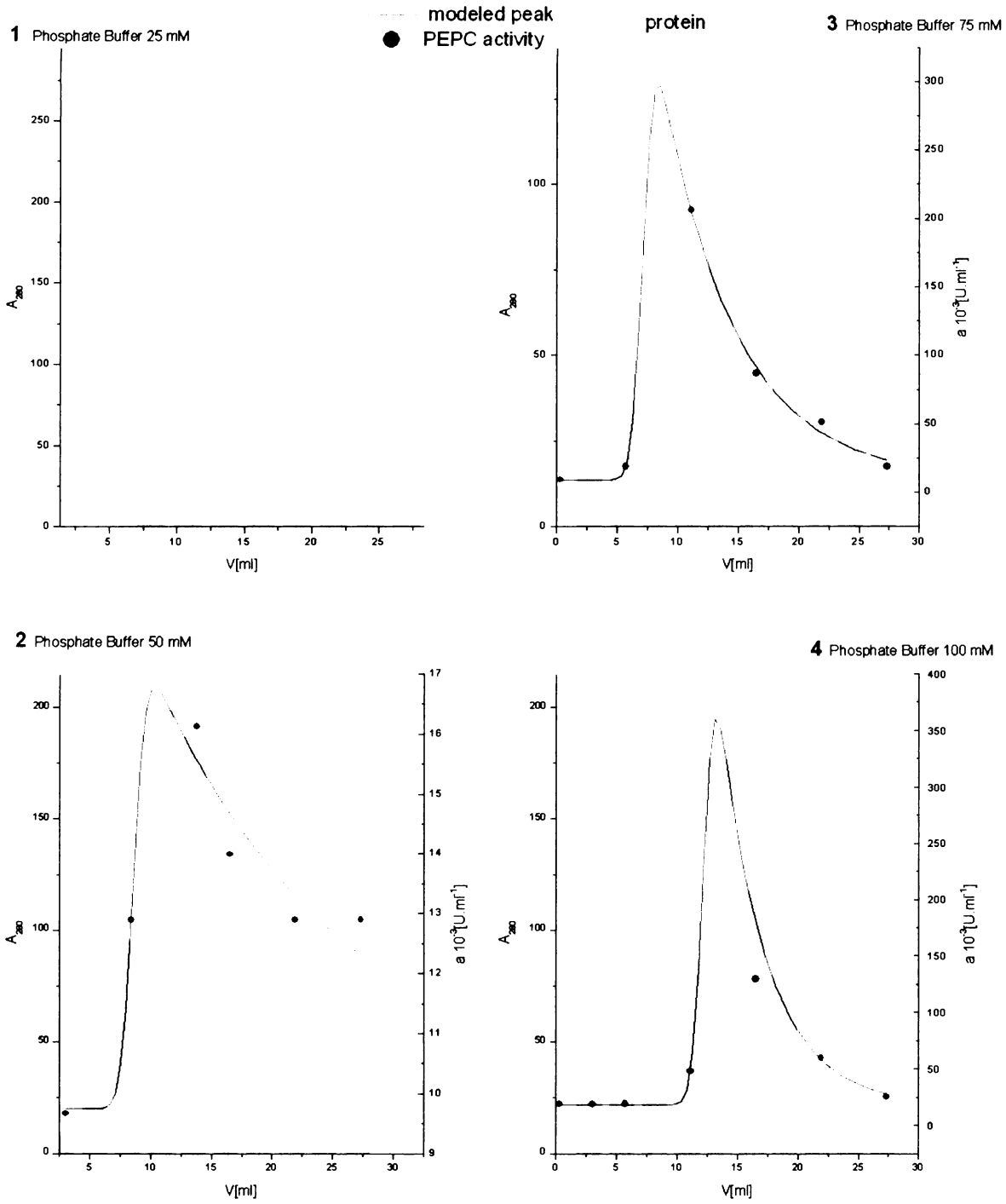
Dalším krokem v izolaci byla gelová chromatografie (Obr. 14). Tabulka shrnující průběh izolace (Tab. 1, str. 27) ukazuje, že tato chromatografie není příliš vhodná, jelikož dochází k poměrně vysokým ztrátám. Další experimenty prokázaly, že tento krok není nutný a že 0,250 M NaCl nesnižuje schopnosti vazby na hydroxyapatit.

Separace byla sledována pomocí detekce proteinů při A_{280} a měření aktivity PEPC. Frakce s aktivitou nad 0,02 $U.ml^{-1}$ byly sebrány. Výsledný objem zachyceného eluát byl 26,9 ml s aktivitou 5,6 U.



Obr. 14: Separace PEPC na gelové chromatografii. Eluát po ionexové chromatografii byl precipitován (60% síran amonný), resuspendován v 400 µl pufru B a nanesen na kolonu s nosičem Sephacryl S-300.

Hydroxyapatit byl finálním krokem purifikace. (Obr. 15, Tab. 1, str. 27) Jedná se o velmi efektivní chromatografii pro separaci PEPC. Hydroxyapatit má vysokou vazebnou kapacitu a PEPC je eluována homogenní. Separace byla sledována pomocí detekce proteinů při A_{280} a měření aktivity PEPC. Tato metoda byla dále optimalizována a aby se zabránilo ztrácení aktivity, byly použity k promytí pouze 25 mM a 50 mM fosfátové pufry a PEPC byla eluována 100 mM fosfátovým pufrem. 200 mM fosfátový pufr byl použit pro promývání kolony, ale žádná další aktivita PEPC již v tomto eluátu nebyla naměřena (neuvedeno). Purifikace enzymu po optimalizaci metody je asi 32×.



Obr. 15: Purifikace PEPC pomocí chromatografie na hydroxyapatitu. PEPC je eluována zvyšující se koncentrací fosfátu v pufru. Byl užit 25 mM (1), 50 mM (2). 75 mM (3) a 100 mM (4) fosfátový pufr. Sebrané frakce mají aktivitu PEPC 1,95 U v 20,8 ml a 1,7 v 16,2 ml po kroku (3) a (4) c. Chromatografické křivky (červená) jsou modelovány na základě celkové aktivity sebraných frakcí.

3.2 IDENTIFIKACE ISOFORMY PEPC

3.2.1 GENOM KUKUŘICE

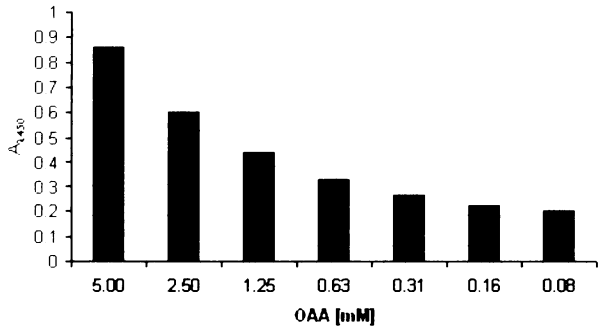
Dnes jsou známe 3 geny kódující PEPC v kukuřici a je možné, že dokončení projektu sekvenace genomu kukuřice[54] odhalí i nějaké další doposud neznámé isoformy PEPC. Bylo provedeno srovnání těchto tří známých isoform na aminokyselinové úrovni: C_4 isoforma (970 aminokyselin), C_3 isoforma (967 aminokyselin) a kořenová isoforma (960 aminokyselin) (Tab. 2).

		C4	Root form
Identity	C3	77	85
	C4		81
Divergence	C3	88	93
	C4		90

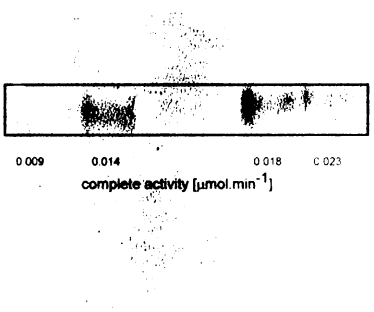
Tab. 2: Porovnání tří známých isoforem PEPC z kukuřice. Tabulka identity na aminokyselinové úrovni byla získána pomocí metody ClustalW a dat z Maize GDB,[54] data v procentech.

3.2.2 DETEKCE AKTIVITY PEPC V GELU

Metoda 2.4.5 byla použita za účelem získání informace o počtu detekovatelných isoforem v extraktu ze semen kukuřice. Nejdříve byl proveden test senzitivity této detekční metody pomocí spektrofotometrické detekce barevného komplexu oxaloacetátu s Fast Violet B, který je ve vodném roztoku oranžový až červený $A_\lambda 450$) (Obr. 16).



Obr. 16: Spektrofotometrický test detekce komplexu oxaloacetátu (OAA) s 7 mM Fast Violet B. Test potvrdil vysokou senzitivitu této metody a i 0,08 mM OAA je stále detekovatelný při A_{450}.

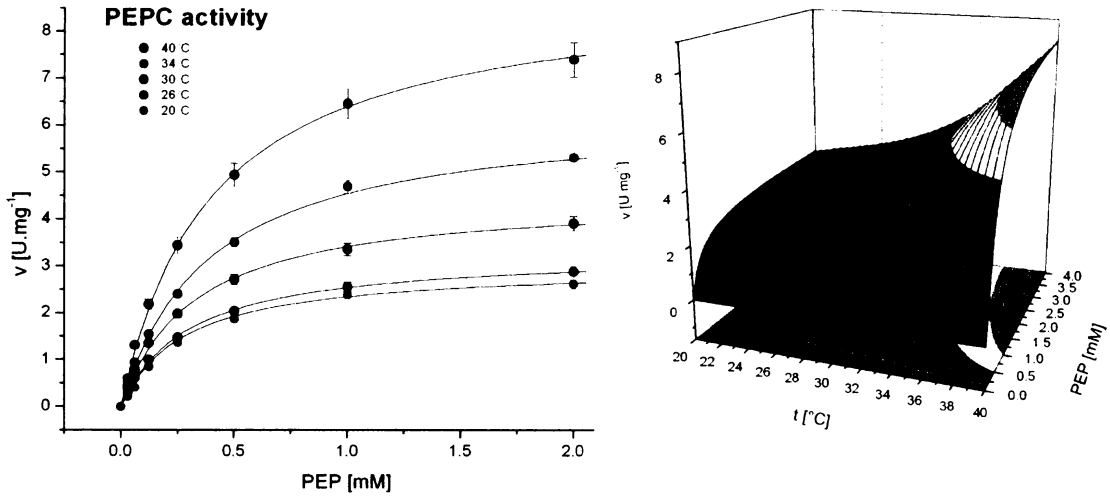


Obr. 17: Detekce aktivity PEPC v gelu. PEPC byla aplikována na gel v následujících aktivitách: 0,009 U; 0,014 U; 0,018 U and 0,023 U. Všechny aktivity byly viditelné, nejnižší hodnota je ale již na hranici detekce.

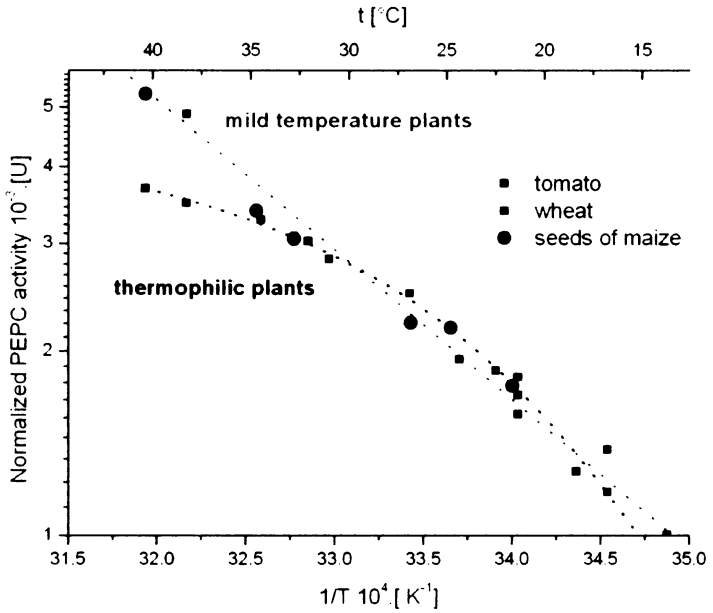
Metoda byla optimalizována a bylo určeno limitní detekovatelné množství aktivní PEPC. Obdobné výsledky byly získány pro enzym načištěný pouze precipitací síranem amonným, i pro purifikovaný enzym po chromatografii na hydroxyapatitu. (Obr. 17).

3.3 VLIV TEPLOTY NA RYCHLOST REAKCE KATALYZOVANÉ PEPC

Byl sledován vliv teploty na kinetické parametry PEPC ze semen kukuřice. Se zvyšující se teplotou se zvyšovala rychlost reakce. Při teplotě 40°C a 2 mM koncentraci PEP (7,4 $U.mg^{-1}$) byla přibližně 3× vyšší než aktivita naměřená při laboratorní teplotě (2,4 $U.mg^{-1}$). Měření bylo prováděno při pH optimu PEPC 8,1 v pufru HEPES-KOH (Obr. 18 a Obr. 19).



Obr. 18: Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu PEP při různých teplotách. Teplotní závislost byla měřena při pH optimu 8,1 a následujících teplotách: 20°C, 26°C, 30°C, 34°C a 40°C. (Výsledky jsou průměrem vždy nejméně dvou měření; 3D prostorový graf modeluje pravděpodobný průběh závislosti)



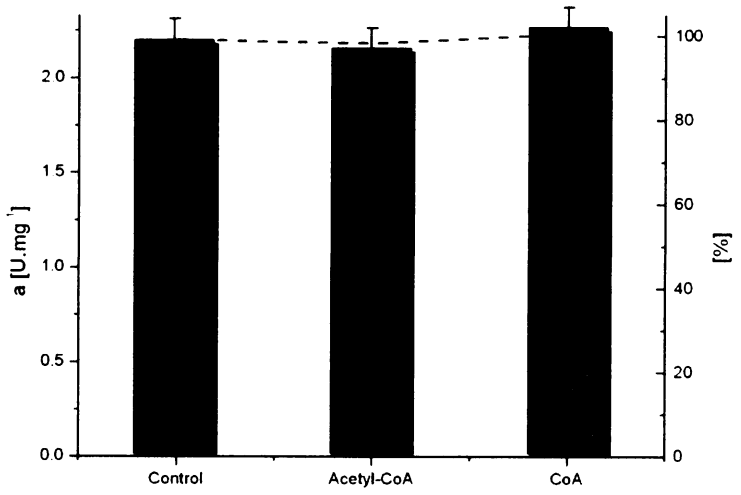
Obr. 19: Určení teplotního typu isoformy PEPC ze semen kukuřice. Arheniovo vynesení aktivit PEPC z pšenice,* rajčete,* a semen kukuřice. Experimentální data byla normalizována k aktivitě při 20°C a 2 mM PEP, hodnoty PEPC z pšenice a rajčete(*) převzaty z Latzko, Kelly, 1983.[13]

Arheniovo vynesení, které se běžně používá pro určování aktivační energie, vykazuje rozdílné empirické charakteristiky pro PEPC izolované z rostlin termofilních (hyperbolická závislost) a z rostlin mírného pásu (lineární).[13] Průměrné hodnoty aktivit PEPC při 2 mM koncentraci substrátu PEP byly vyneseny v Arheniově grafu a porovnány s hodnotami aktivit PEPC z termofilní rostliny (rajčete) a rostliny mírného pásu (pšenice). Z obrázku je patrno (Obr. 19), že PEPC ze semen kukuřice má obdobný průběh závislosti, jako PEPC rostlin mírného pásu.

3.4 VLIV ALOSTERICKÝCH EFEKTORŮ NA AKTIVITU PEPC IZOLOVANÉ ZE SEMEN KUKUŘICE

Vliv modulátorů aktivity PEPC byl studován v závislosti na koncentraci substrátu PEP. Základní test inhibice byl prováděn při saturační koncentraci PEP (2 mM) při laboratorní, či zvýšené teplotě a pH 7,3, protože za těchto podmínek většinou PEPC vykazuje zvýšenou citlivost k modulátorům.[32] Detailní kinetické studie byly provedeny pouze v případě modulátorů, které vykazovali významný efekt na aktivitu PEPC. Aktivita PEPC z rozdílných izolací byla pro přehlednost a lepší porovnání výsledků normalizována k aktivitě při 20°C a pH 8,1. V případě experimentů, které byly prováděny déle jak 12 hodin po dialýze, bylo vždy provedeno kontrolní měření závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP při pH 8,1. Důvodem tohoto kroku byla snížená stabilita purifikované PEPC po dialýze z fosfátového pufru. Zkoumané alosterické efektory jsou řazeny v abecedním pořadí.

3.4.1 VLIV ACETYL-KOENZYMU A KOENZYMU A NA AKTIVITU PEPC

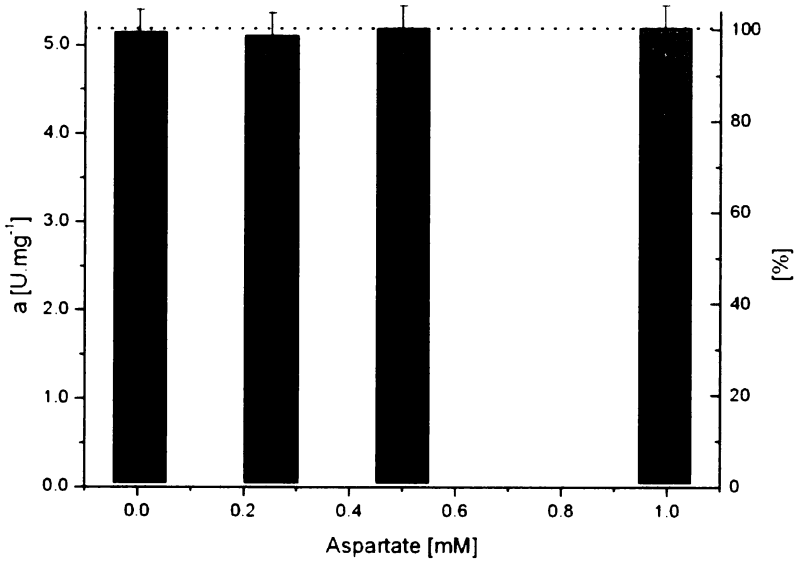


Obr. 20: Vliv Acetyl-CoA a CoA na aktivitu PEPC ze semen kukuřice. Test byl proveden při pH 7,3 a 22°C, 2 mM koncentraci substrátu PEP. Acetyl-CoA v 0,02 mM koncentraci způsobil průměrný 2% pokles aktivity PEPC. Přídavek 0,02 mM CoA zvýšil v průměru aktivitu PEPC o 3%. Obě hodnoty se pohybují v rámci chyby měření.

Není známo, že by acetyl-koenzym A, či koenzym A měli nějaký efekt na aktivitu běžných rostlinných PEPC, ale jsou modulátory PEPC bakterií.[21] Nicméně doposud nejsou známé žádné informace o efektu těchto látek na aktivitu tzv. rostlinné PEPC bakteriálního typu nalezené v genomu *Arabidopsis thaliana* a *Oryza sativa*.[25] Doposud nebyla dokončena sekvenace genomu kukuřice, a tak je možné, že by acetyl-koenzym A, či koenzym A mohly být modulátory některé z forem PEPC. Účinek byl měřen 2× při pH 7,3 a laboratorní teplotě (22°C), při saturační koncentraci PEP 2 mM. Koncentrace koenzymu A a acetyl-koenzymu A byla zvolena 0,02 mM (Obr. 20) a 0,05 mM (neuvedeno). V žádném z případů nebyl patrný vliv na aktivitu PEPC a tyto látky již nebyly dále zkoumány.

3.4.2 VLIV L-ASPARTÁTU NA AKTIVITU PEPC

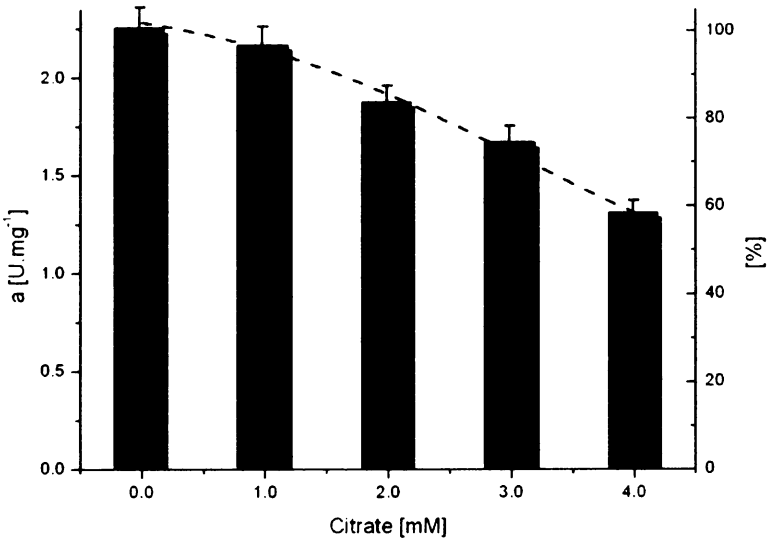
Byl zkoumán vliv L-aspartátu na aktivitu PEPC izolované ze semen kukuřice. Aspartát vzniká transaminací oxaloacetátu, a tak je možným inhibitorem PEPC. Přídavek L-aspartátu do reakční směsi při pH 7,3 a laboratorní, či zvýšené teplotě se neprojevil ve změně aktivity PEPC. Experiment byl prováděn v dvojích, ukázáno je jen měření při 34°C (Obr. 21). Aktivita PEPC se nezměnila, odchylka jednotlivých měření ± 1% je zcela v rámci experimentální chyby 5%.



Obr. 21: Vliv L-aspartátu na aktivitu PEPC ze semen kukuřice. Aspartát byl použit v následujících koncentracích: 0 (kontrolní), 0,25 mM; 0,5 mM; 1,0 mM při teplotě 34°C, saturační koncentraci substrátu PEP (2 mM) a pH 7,3.

3.4.3 VLIV CITRÁTU NA AKTIVITU PEPC

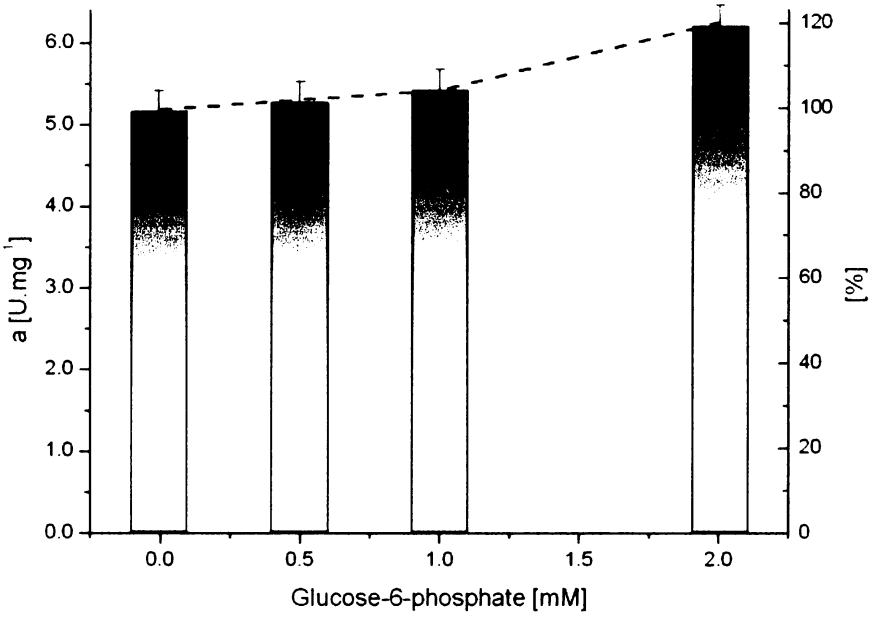
PEPC poskytuje oxaloacetát do citrátového cyklu a může být jeho metabolity rovněž regulována (1.1.4). Byl proveden test vlivu citrátu na aktivitu PEPC ze semen kukuřice. Citrát se zdál být silným inhibitorem s hodnotou I_{50} přibližně 5 mM při teplotě 20°C a pH 7,3 (Obr. 22). Výsledky jsou průměrem dvou měření.



Obr. 22: Vliv citrátu na aktivitu PEPC ze semen kukuřice. Měření bylo provedeno v saturační koncentraci substrátu PEP 2 mM, teplotě 20°C a pH 7,3. Byla naměřena následující inhibice aktivity PEPC: 0 mM – 100% (kontrola), 1 mM – 99%, 2 mM – 81%, 3 mM – 74% a 4 mM – 58%.

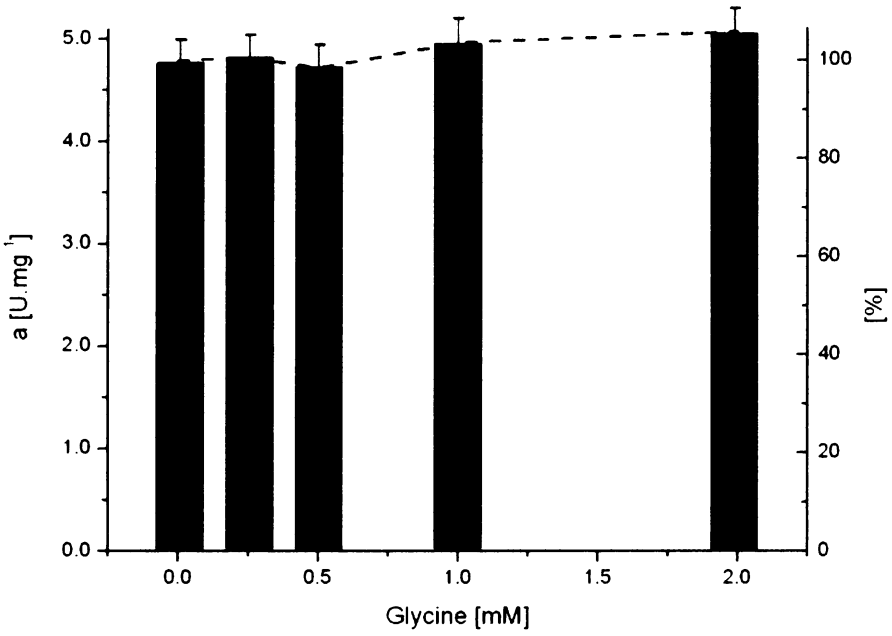
3.4.4 VLIV D-GLUKOSA-6-FOSFÁTU NA AKTIVITU PEPC

Byl zkoumán vliv D-glukosa-6-fosfátu na aktivitu PEPC ze semen kukuřice. Přídavek D-glukosa-6-fosfátu k reakční směsi se projevil pouze slabou aktivací PEPC. Při laboratorní teplotě a pH optimu téměř nebyl tento efekt pozorovatelný. Až snížení pH na 7,3 a zvýšení teploty na 34°C vedlo k zvýšení aktivity PEPC. Uvedeny jsou pouze výsledky měření při pH 7,3 a vyšší teplotě. Získané hodnoty jsou průměrem tří měření. (Obr. 23).



Obr. 23: Vliv glukosa-6-fosfátu na aktivitu PEPC ze semen kukuřice. Optimální aktivační podmínky byly při saturační koncentraci PEP (2 mM) 34°C a pH 7,3. Byla pozorována následující aktivace PEPC: 0 mM (kontrolní) – 0%; 0,5 mM – 2%; 1,0 mM – 6%; 2,0 mM – 20%.

3.4.5 VLIV GLYCINU NA AKTIVITU PEPC

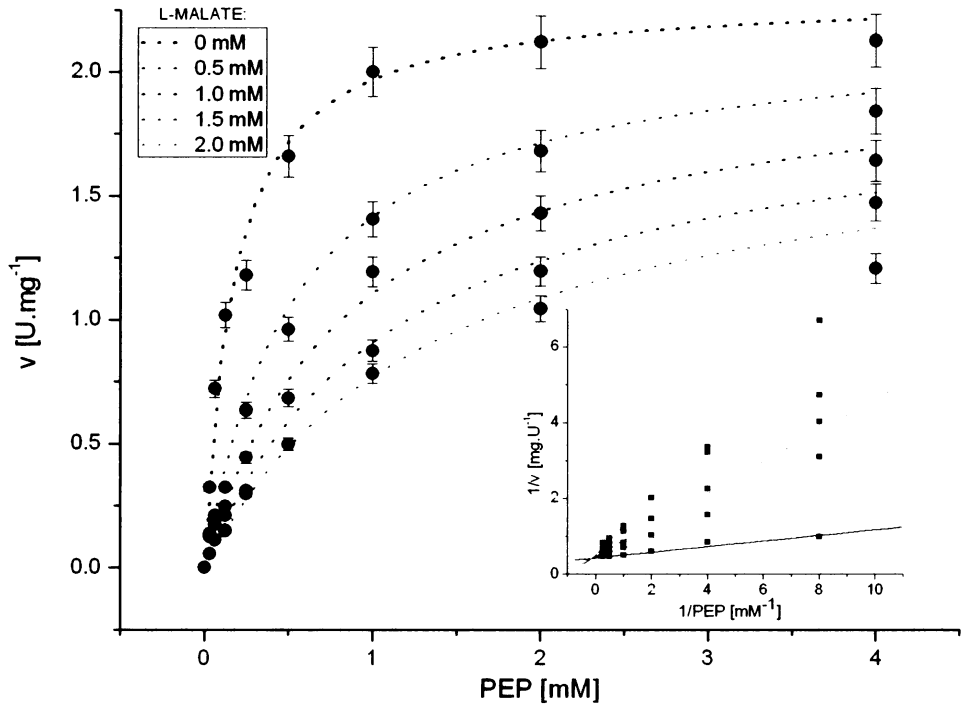


Obr. 24: Vliv glicinu na aktivitu PEPC ze semen kukuřice. Byla pozorována jen velmi nízká aktivace, pohybující se blízko chybě měření. Podmínky měření: pH 7,3; 34°C; 2 mM PEP. 0 mM glycin (kontrol) – 100%; 0,25 mM – 101%; 0,5 mM – 99%; 1,0 mM – 104%; 2,0 mM – 106 %. Hodnoty jsou průměrem dvou měření.

Glycin je známým aktivátorem C_4 PEPC isoformy z listů kukuřice.[32] Jeho efekt na PEPC izolovanou ze semen této rostliny však nebyl patrný. Při saturační koncentraci PEP (2 mM), laboratorní teplotě a pH 7,3 nebyla pozorována žádná změna aktivity PEPC. Po zvýšení teploty na 34°C byl zaznamenán nepatrný nárůst aktivity PEPC, pohybující se na okraji chyby měření (Obr. 24).

3.4.6 VLIV L-MALÁTU NA AKTIVITU PEPC

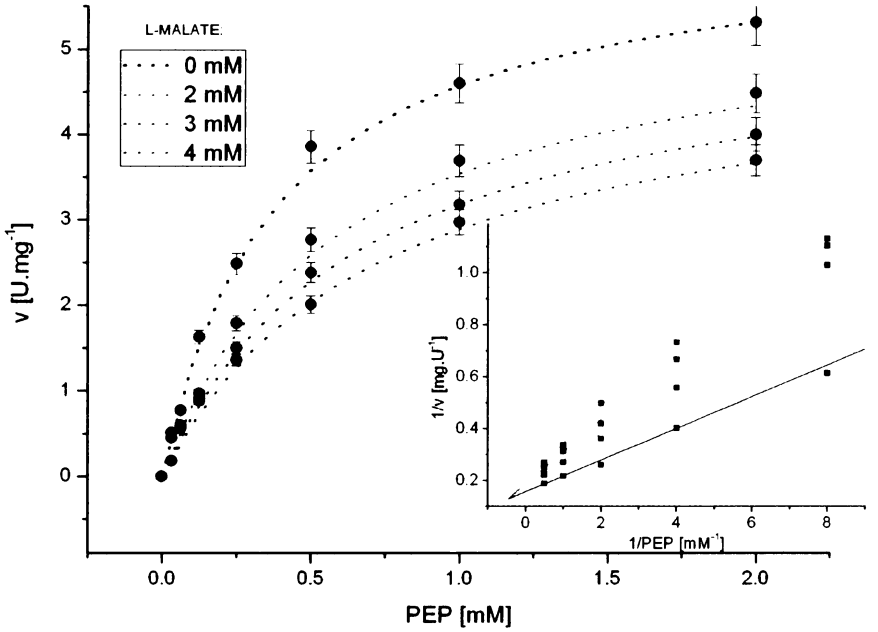
Byl detailně zkoumán vliv L-malátu na aktivitu PEPC. Při laboratorní teplotě a pH optimu 8,1 nebyl nalezen žádný vliv na aktivitu PEPC ze semen kukuřice a to ani při koncentraci malátu 4 mM. Při zvýšení teploty se začala slabě projevovat inhibice. Při 24°C způsobil 4 mM malát pokles aktivity PEPC o 10% při saturační koncentraci PEP 2 mM. Snižování pH a zvyšování teploty vedlo k výrazné inhibici aktivity PEPC.Výsledky jsou průměry nejméně dvou experimentů (Obr. 25-27, Tab. 3).



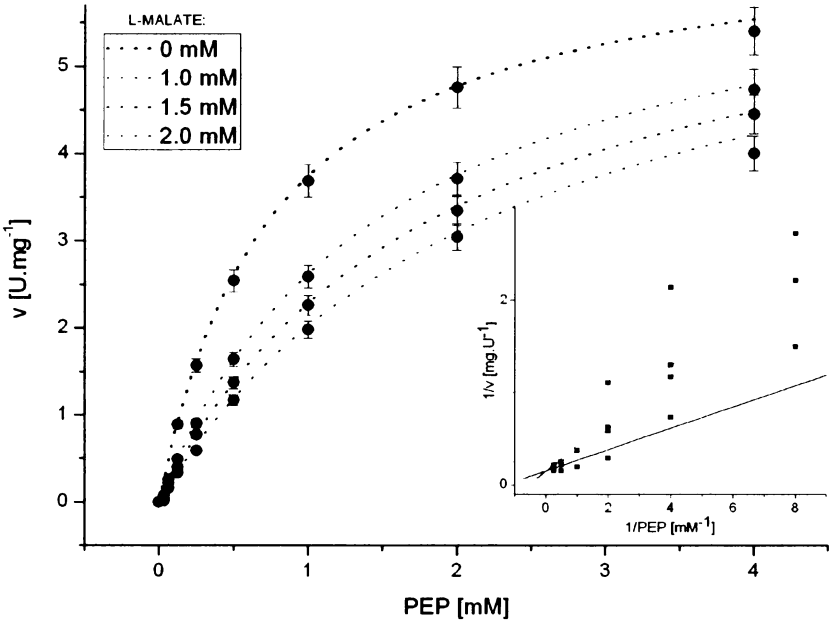
Obr. 25: Vliv malátu na kinetické parametry PEPC ze semen kukuřice při 20°C a pH 7,3. Závislost rychlosti reakce PEPC na koncentraci substrátu PEP. Vložené dvojnásobně reciproké vynesení. Byly použity tyto koncentrace inhibitoru L-malátu: 0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; a následující řada koncentrací PEP: 4,0 mM; 2,0 mM; 1,0 mM; 0,5 mM; 0,25 mM; 0,13 mM; 0,06 mM.

20°C; pH 8,1	20°C; pH 7,3	34°C; pH 8,1	34°C; pH 7,3
Žádná	**Smíšená**	**Smíšená**	**Kompetitivní**
V_{max}: 2,80 U.mg^{-1}	V_{max}: 2,31 U.mg^{-1}	V_{max}: 6,35 U.mg^{-1}	V_{max}: 6,59 U.mg^{-1}
(50±3) %	(37±2) %	(100±5) %	(104±5) %
K_m: (0,3±0,02)mM	K_m: (0,2±0,01)mM	K_m: (0,4±0,02)mM	K_m: (0,8±0,04)mM
	K_{ic}: (0,2±0,01)mM	K_{ic}: (2,9±0,01)mM	K_{ic}: (2,9±0,02)mM
	K_{iu}: (8,1±0,4)mM	K_{iu}: (14,8±0,01)mM	

Tab. 3: Inhibiční konstanty PEPC pro malát. Výpočet nelineární regresí, dle kapitoly 2.4.11.



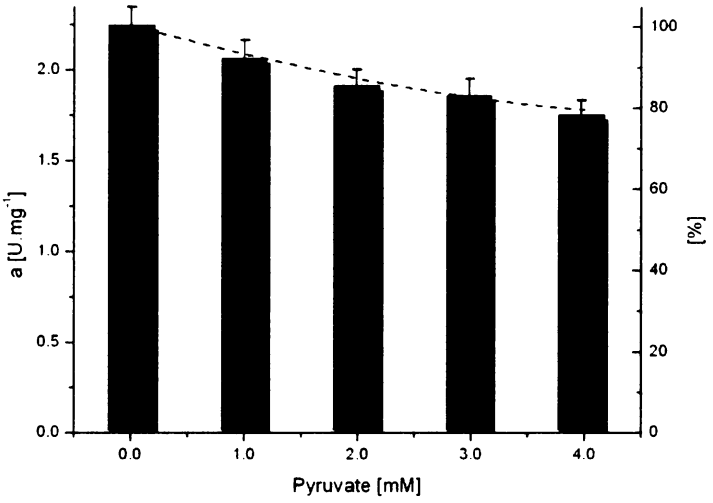
Obr. 26: Vliv malátu na kinetické parametry PEPC ze semen kukuřice při 34°C a pH 8,1. Závislost rychlosti reakce PEPC na koncentraci substrátu PEP. Vložené dvojnásobně reciproké vynesení. Byly použity tyto koncentrace inhibitoru L-malátu: 2 mM; 3 mM; 4 mM; a následující řada koncentrací PEP: 2,0 mM; 1,0 mM; 0,5 mM; 0,25 mM; 0,13 mM; 0,06 mM.



Obr. 27: Vliv malátu na kinetické parametry PEPC ze semen kukuřice při 34°C a pH 7,3. Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu PEP. Vložené dvojnásobně reciproké vynesení. Byly použity tyto koncentrace inhibitoru L-malátu: 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; a následující řada koncentrací PEP: 2,0 mM; 1,0 mM; 0,5 mM; 0,25 mM; 0,13 mM; 0,06 mM; 0,03 mM.

3.4.7 VLIV PYRUVÁTU NA AKTIVITU PEPC

Byl zkoumán vliv pyruvátu na aktivitu PEPC. Po přidání pyruvátu do reakční směsi byla pozorováno snížení aktivity PEPC. Zkouška byla provedena při 20°C a pH 7,3 (Obr. 28). Měření proběhlo 2× při saturační koncentraci PEP (2 mM). Detailní studium inhibice PEPC pyruvátem nebylo provedeno.

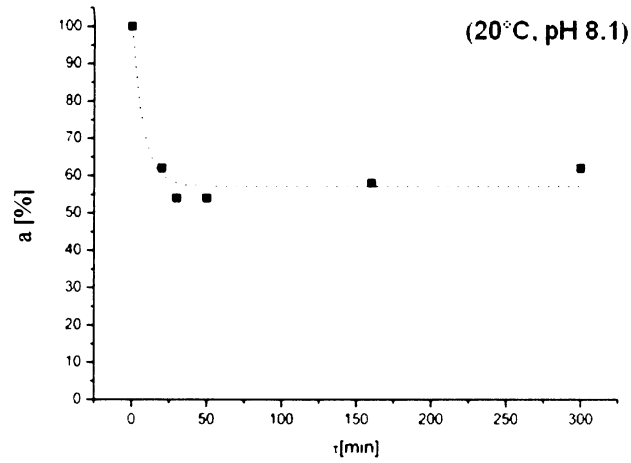


Obr. 28: Vliv pyruvátu na aktivitu PEPC ze semen kukuřice. Byly použity následující koncentrace pyruvátu: 0 mM (kontrolní) – 100%; 1,0 mM – 92%; 2,0 mM – 85%; 3 mM – 83%; 4 mM - 78% při saturační koncentraci PEP(2 mM) a pH 7,3.

3.5 STUDIUM FOSFORYLACE PEPC

Studium fosforylace PEPC bylo provedeno pomocí enzymů alkalické fosfatasy (AP) a protein kinasy (PKA). Tyto enzymy mohou být schopny defosforylovat (AP) a fosforylovat (PKA) PEPC, podobně jako *in vivo* specifické PEPC-k a proteinfosfatasa 2A (2.4.10). Fosforylovaná PEPC má odlišné kinetické parametry než PEPC defosforylovaná (1.1.4). Kinetické vlastnosti byly zkoumány ve vzorcích nativních, vzorcích defosforylovaných alkalickou fosfatasou a vzorcích inkubovaných s proteinkanasou A. Tyto experimenty byly navrženy tak, aby bylo možné určit úroveň fosforylace v nativní PEPC uložené v semenech kukuřice.

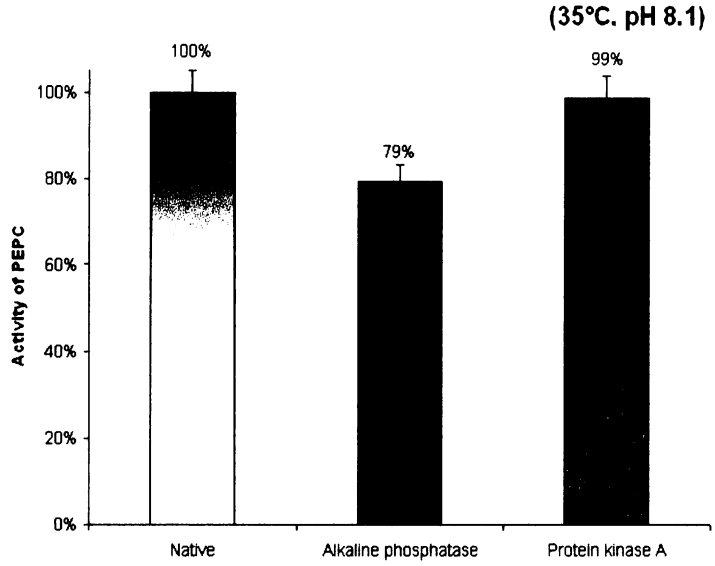
V první studii byla odsolená homogenní PEPC po chromatografii na hydroxyapatitu inkubována s alkalickou fosfatasou. Přídavek AP se projevil poklesem aktivity PEPC. Aktivita zpočátku rychle klesala a během první hodiny dosáhla 60% své počáteční hodnoty a dále se již neměnila. Žádný pokles aktivity PEPC již nebyl pozorován, ani po přidání další AP. 200 U alkalické fosfatasy bylo dostačujících pro plnou defosforylaci 0,15 U PEPC během jedné hodiny. Aktivita byla měřena při laboratorní teplotě, saturační koncentraci PEP (2 mM) v HEPES-KOH pufru pH 8,1. Pokles aktivity PEPC byl přibližně 40% (Obr. 29).



Obr. 29: Pokles aktivity PEPC izolované ze semen kukuřice při inkubaci s alkalickou fosfatasou. Měření bylo provedeno při laboratorní teplotě, saturaci substrátem PEP (2 mM) a pH 8,1. K PEPC o celkové aktivitě 0,15 U bylo v čase 0 přidáno 200 U alkalické fosfatasy a inhibitory proteas.

Pokles aktivity po přidání fosfatasy byl pozorován pouze u enzymu převedeného do Tris-HCl pufru. Žádná změna nebyla patrna při inkubaci AP s PEPC ve fosfátovém pufru (není ukázáno).

Další pokus ukázal, že defosforylovaná forma PEPC může být znovu fosforylována. Defosforylovaný enzym po inkubaci s alkalickou fosfatasou je pomocí kinasy reaktivován na svoji původní aktivitu (Obr. 30)



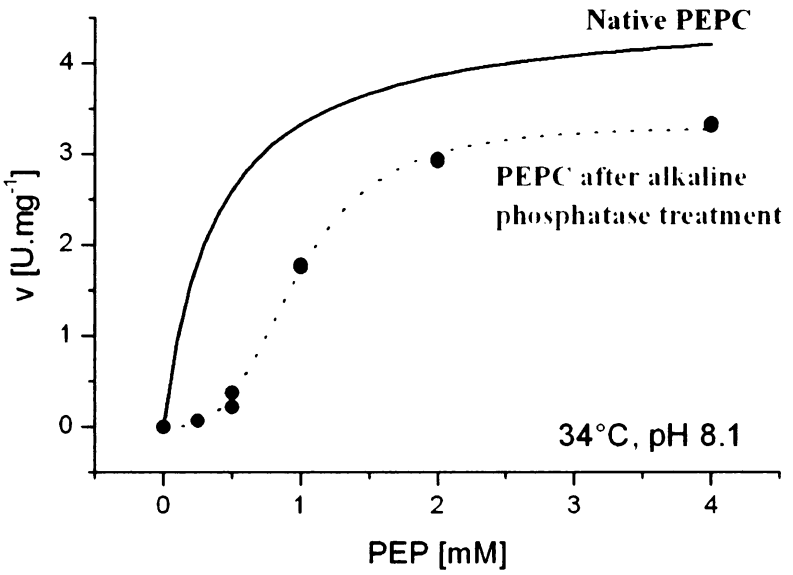
Obr. 30: Změny aktivity PEPC způsobené fosforylaci. Nativní enzym (šedá - aktivita 100%) PEPC inkubovaná s alkalickou fosfatasou (červená – aktivita 79%), refosforylovaná PEPC (zelená - aktivita 99% aktivity nativní formy).

Nativní enzym přítomný v aktivitě 0,14 U byl inkubován s 200 U alkalické fosfatasy v přítomnosti inhibitorů proteas (Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts 1:100). Aktivita PEPC byla měřena po 120 min při pH 8,1; 34°C. Poté byly k vzorku přidány inhibitory fosfatas v poměru 1:50 (Phosphatase Inhibitor Cocktail) a defosforylovaný enzym byl inkubován 120 min s 350 u proteinkinasy A v 40 mM HEPES pufru pH 7,3; 2 mM ATP; 20 mM $MgCl_2$ při 30°C. Refosforylovaná PEPC dosáhla 99% aktivity nativní formy. Výsledky jsou průměrem dvou nezávislých experimentů měřených 2× (Obr. 30).

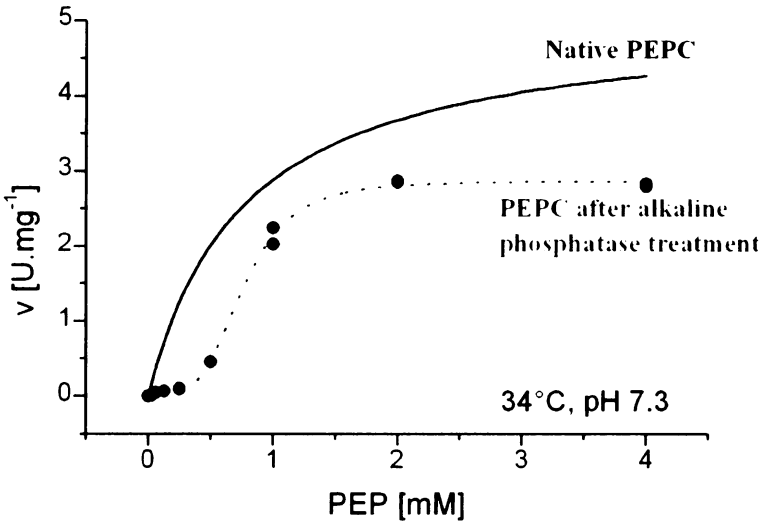
Proteinkinasa A nemá žádný efekt na aktivitu nativního izolovaného enzymu ze semen kukuřice v Tris-HCl pufru, ani v pufru fosfátovém.

3.5.1 KINETICKÉ PARAMETRY DEFOSFORYLOVANÉ PEPC

Pro defosforylovanou formu PEPC byly zjištěny základní kinetické parametry. Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu PEP je sigmoidální a to jak při pH 7,3, tak pH 8,1. Uvedeny jsou pouze výsledky z měření při 34°C (Obr. 31, Obr. 32). Jelikož se jedná o měření ze dvou odlišných izolací, jsou výsledky porovnány v procentech v Tab. 4 (str. 42). Pro porovnání jsou ukázány křivky pro nativní PEPC odvozené z naměřených kinetických hodnot (3.4.6).



Obr. 31: Závislost reakční rychlosti PEPC na koncentraci substrátu PEP po defosforylaci enzymu při pH 8,1 a 34°C. Nativní PEPC (modrá) V_{max}: 4,6 $U.mg^{-1}$ (100%); h: 1; defosforylovaná PEPC (červená): sigmoidální průběh, V_{max}: 3,3 $U.mg^{-1}$ (70%); h: 3,2. Měřeno v [illegible] (červená), PEP koncentrační řada: 4,0 mM; 2,0 mM; 1,0 mM; 0,5 mM; 0,25 mM a 0 mM; modrá – simulace průběhu závislosti pro nativní (fosforylovaný) enzym odvozená z kontrolní aktivity při 2 mM PEP a vypočtených kinetických konstant (Tab. 3, str. 37).



Obr. 32: Závislost reakční rychlosti PEPC na koncentraci substrátu PEP po defosforylaci enzymu při pH 7,3 a 34°C. Nativní PEPC (modrá) V_{max}: 5,1 $U.mg^{-1}$ (100%); h: 1; defosforylovaná PEPC (červená): sigmoidální průběh, V_{max}: 2,9 $U.mg^{-1}$ (60%); h: 3,9. Měřeno v [illegible] (červená), PEP koncentrační řada: 4,0 mM; 2,0 mM; 1,0 mM; 0,5 mM; 0,25 mM; 0,12 mM; 0,06 mM a 0 mM; modrá – simulace průběhu závislosti pro nativní (fosforylovaný) enzym odvozená z konrolní aktivity při 2 mM PEP a vypočtených kinetických konstant (Tab. 3, str. 37).

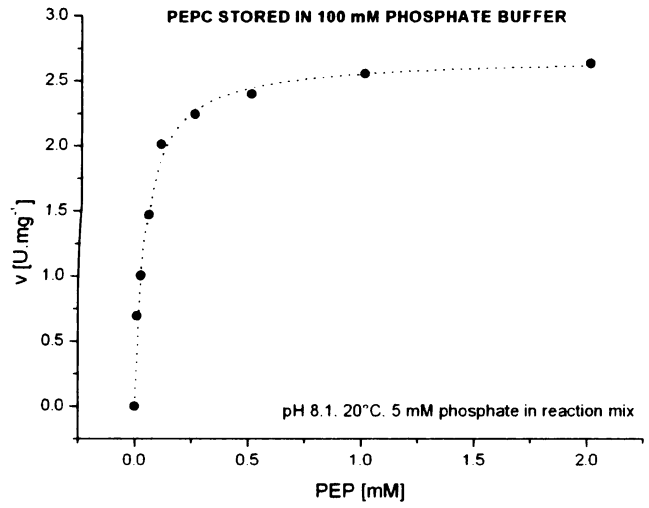
Následující tabulka (Tab. 4) shrnuje naměřené efekty defosforylace na základní kinetické parametry PEPC izolované ze semen kukuřice při různé teplotě a pH.

Teplota	20°C	20°C	34°C	34°C
pH	8,1	7,3	8,1	7,3
Hillův koeficient	1,7±0,3	1,8±0,3	3,2±0,2	3,9±0,3
aktivita (2 mM PEP) ± 5%	60%	75%	80%	70%
V_{max} ± 5%	50%	65%	70%	60%

Tab. 4: Porovnání základních kinetických parametrů PEPC ze semen kukuřice po defosforylaci. Procenta vyjadřují pokles vůči hodnotě naměřené pro fosforylovaný enzym.

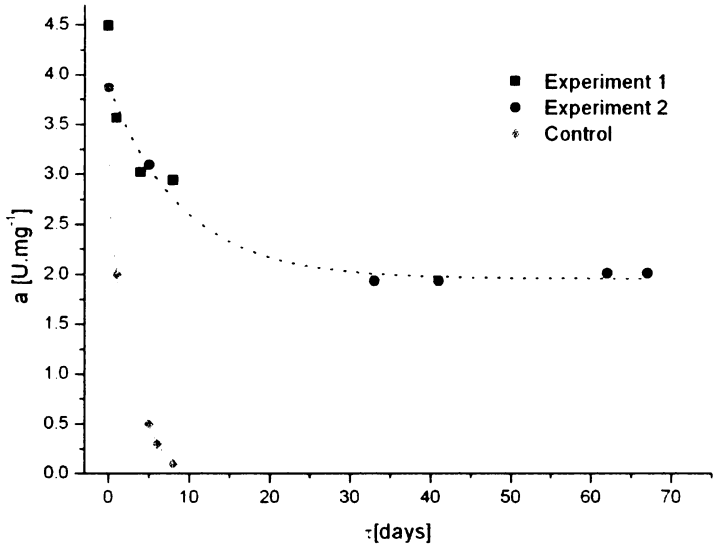
3.6 VLIV FOSFÁTU NA VLASTNOSTI PEPC

Byl studován vliv volného fosfátu na aktivitu PEPC. Přidání fosfátu do reakční směsi vedlo u nativního enzymu pouze k slabé aktivaci enzymu, velmi podobné té naměřené s glukosa-6-fosfátem (3.7). Avšak enzym uchovávaný v 100 mM fosfátovém pufru (eluce z hydroxyapatitu – viz 3.1) vykazoval velmi odlišnou závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP, i když v reakční směsi byl fosfát přítomen pouze v koncentraci 5 mM (50 µl enzymu/1 ml reakční směsi). Výsledky jsou průměrem 3 měření (Obr. 33).



Obr. 33: Závislost reakční rychlosti PEPC na koncentraci substrátu PEP enzymu uchovávaného v 100 mM fosfátovém pufru. K_m: 0,04 mM; V_{max}: 2,6 U.mg^{-1} při pH 8,1; 20°C. Koncentrační řada PEP: 2,0 mM; 1,0 mM; 0,5 mM; 0,25 mM; 0,12 mM; 0,06 mM; 0,03 mM a 0 mM.

Enzym uchovávaný ve fosfátovém pufru vykazoval zvýšenou afinitu k substrátu PEP (K_m: 0,04 mM), která byla asi 7× vyšší než afinita PEPC z Tris-HCl pufru (K_m: 0,3 mM). Maximální rychlost PEPC přitom nebyla znatelně ovlivněna (V_{max} : 2,6 U.mg^{-1}). Aktivita při měření s 2 mM PEP se u PEPC uchovávané ve fosfátovém pufru díky změně v K_m zvýšila o přibližně 13% (2,56 U.mg^{-1}).



Obr. 34: Stabilita PEPC v 100 mM fosfátovém pufru pH 7,0 bez přídavku inhibitorů proteas. Počáteční aktivita PEPC 3,9 U.mg^{-1} (100%) ve fosfátovém pufru (červená) klesala během prvního měsíce po izolaci až dosáhla hodnoty 2,0 U.mg^{-1} (51%), která se již dále neměnila. Kontrolní experiment s PEPC uchovávanou v Tris-HCl pufru (oranžová) ukázal plnou inaktivaci enzymu během prvního týdne. (Aktivita byla měřena při pH 8,1; 2 mM PEP; dva odlišné experimenty, první (černá) byl ukončen pro nedostatek enzymu.

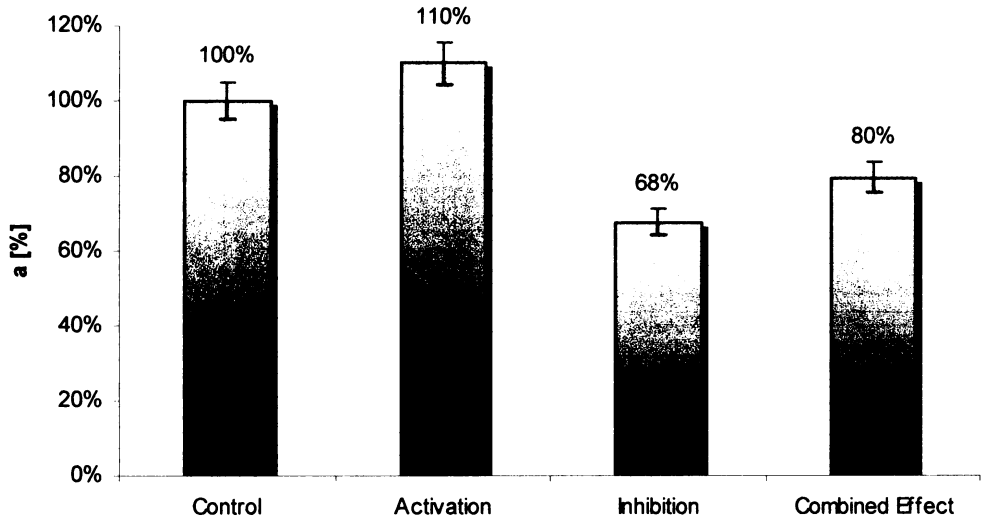
Také stabilita enzymu ve fosfátovém pufru je značně vyšší (Obr. 34). Stabilita enzymu v pufru B byla bez přídavku inhibitorů proteas méně než týden. Aktivita enzymu uchovávaného ve fosfátovém pufru klesala během prvního měsíce po izolaci až dosáhla hodnoty 51% původní aktivity. Tato hodnota se již do konce experimentu nezměnila.

3.7 KOMBINOVANÝ ÚČINEK NĚKOLIKA EFEKTORŮ NA AKTIVITU PEPC IZOLOVANÉ Z SEMEN KUKUŘICE

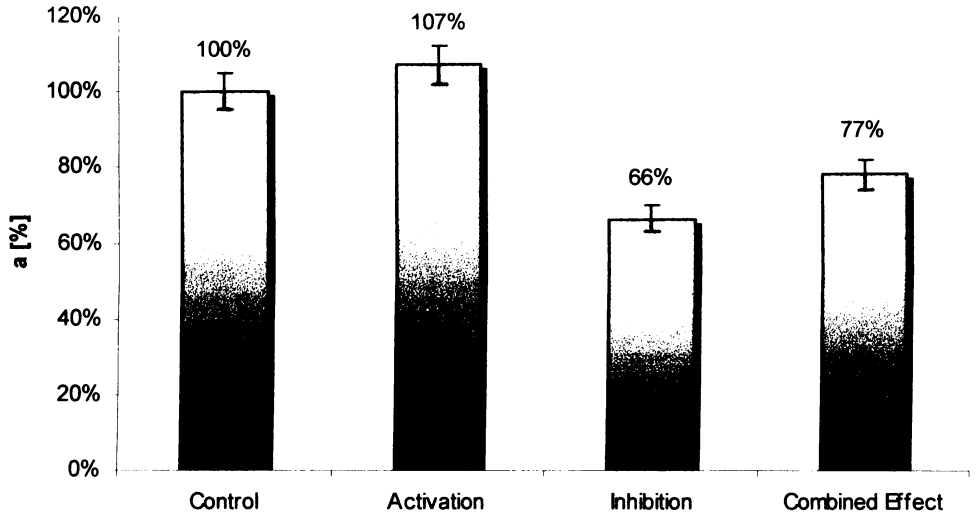
Přímý účinek alosterických efektorů a fosforylace na aktivitu PEPC byl již naměřen, ale je to právě kombinace těchto regulací, která má význam v živé buňce. Nejdříve byl prozkoumán účinek aktivátorů PEPC na citlivost k inhibici malátem. (Obr. 35, Obr. 36).

Je známo, že fosforylace PEPC vede k změně citlivosti enzymu na regulace alosterickými modulátory.[55] Defosforylace PEPC ze semen kukuřice neměla žádný průkazný vliv na účinek D-glukosa-6-fosfátu, či glycinu a ani změna v citlivosti na L-aspartát nebyla u defosforylovaného enzymu pozorována (data nejsou uvedena).

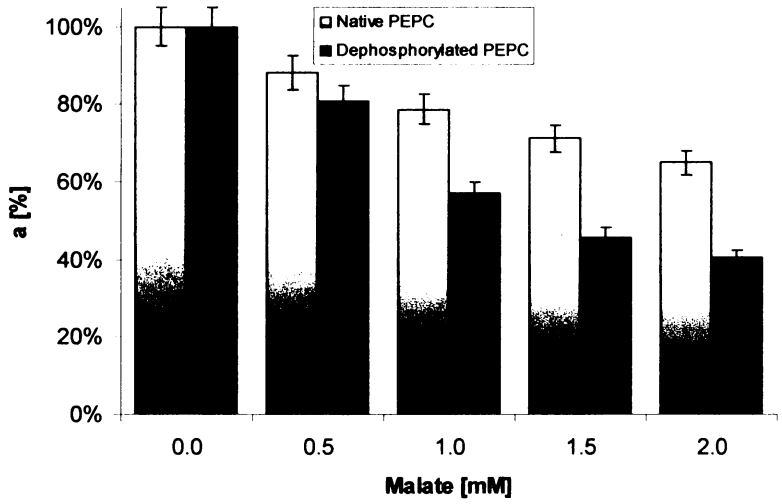
Citlivost k L-malátu se však defosforylací značně zvýšila – inhibiční konstanta I_{50} při pH 7,3; 34°C; 2 mM PEP je 2,5× nižší pro defosforylovanou PEPC (Obr. 37). Také je u defosforylovaného enzymu pozorována inhibice při pH 8,1 a laboratorní teplotě, která u fosforylovaného enzymu není patrná (10% snížení aktivity PEPC při použití 3 mM malátu).



Obr. 35: Vliv glukosa-6-fosfátu (G6P) na inhibici aktivity PEPC malátem. Byla použita 2 mM glukosa-6-fosfát při saturační koncentraci PEP (2 mM), teplotě 20°C a pH 7,3. **Kontrola** – 0 mM G6P, 0 mM malát (100%), **Aktivace** - 2 mM G6P, 0 mM malát (110%), **Inhibice** – 0 mM G6P, 1 mM malát (68%), **Kombinovaný vliv** – 2 mM G6P, 1 mM malát (80% kontrolní aktivity, 73% aktivity aktivovaného enzymu). Výsledky jsou průměrem dvou experimentů.

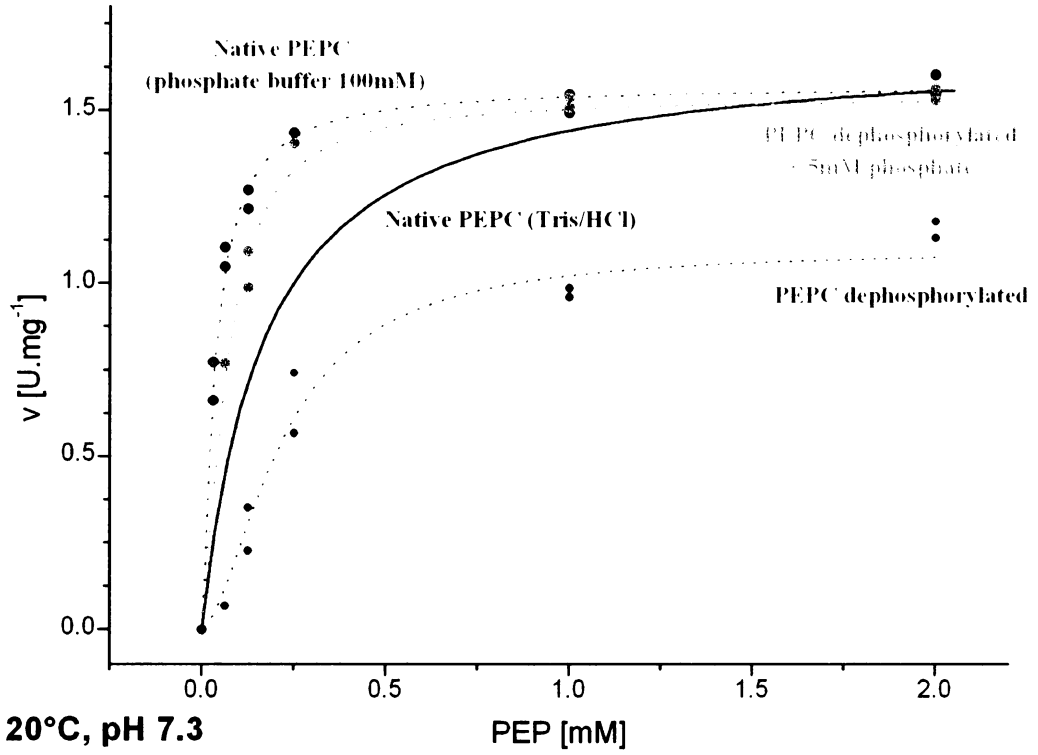


Obr. 36: Vliv fosfátu na inhibici aktivity PEPC malátem. Byl užit 2 mM fosfát (P) při saturační koncentraci PEP (2 mM), 20°C a pH 7,3. **Kontrola** – 0 mM P, 0 mM malát (100%), **Aktivace** - 2 mM P, 0 mM malate (107%), **Inhibice** – 0 mM P, 1 mM malát (66%), **Kombinovaný vliv** – 2 mM P, 1 mM malát (77% kontrolní aktivity, 72% aktivity aktivovaného enzymu). Výsledky jsou průměrem dvou experimentů.



Obr. 37: Vliv fosforylace na inhibici aktivity PEPC malátem. Byl studován inhibiční efekt malátu na nativní fosforylovaný enzym (zelená) a defosforylovaný enzym (fialová). Porovnání bylo provedeno při teplotě 34°C, 2 mM koncentraci PEP a pH 7,3. Byly použity následující koncentrace malátu s uvedeným efektem na aktivitu PEPC (hodnoty v závorce odpovídají fosforylované nativní formě): 0 mM – kontrola – 100% (100%); 0,5 mM – 81% (88%); 1,0 mM – 57% (79%); 1,5 mM – 46% (71%); 2,0 mM – 41% (65%). Výsledky jsou průměrem tří měření.

Přídavek 5 mM fosfátu (fosfátový pufr pH 7,0) k defosforylovanému enzymu vyvolalo změnu v závislosti reakční rychlosti PEPC na koncentraci substrátu PEP. Sigmoidální závislost defosforyloavného enzymu byla nahrazena hyperbolickou. Tato závislost reakční rychlosti PEPC byla velmi podobná té, která byla pozorována u nativního fosforylovaného enzymu uchovávaného v 100 mM fosfátovém pufru (Obr. 38).

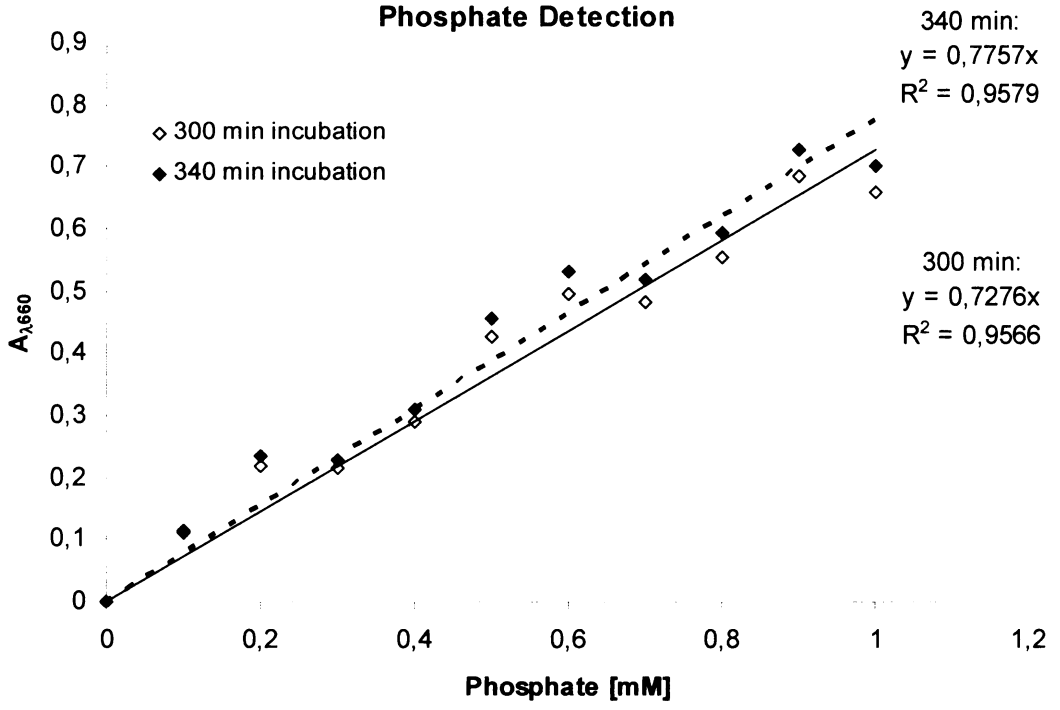


Obr. 38: Vliv fosfátu na průběh závislosti reakční rychlosti PEPC na koncentraci substrátu PEP. Měření bylo prováděno při pH 7,3 a 20°C. Byly užity následující koncentrace PEP: 2,0 mM; 1,0 mM; 0,25 mM; 0,12 mM; 0,06 mM a 0 mM. **Zelená** – nativní fosforylovaný enzym uchovávaný v 100 mM fosfátovém pufru (K_m: 0,03 mM; V_{max}: 1,6 $U.mg^{-1}$; h: 1,0) **oranžová** – defosforylovaná PEPC aktivovaná 5 mM fosfátem (K_m: 0,07 mM; V_{max}: 1,7 $U.mg^{-1}$; h: 1,0); **modrá** – nativní PEPC (K_m: 0,2 mM; V_{max}: 1,8±0,3 $U.mg^{-1}$; h: 1,0±0,2) simulace průběhu závislosti pro nativní (fosforylovaný) enzym odvozená z kontrolní aktivity při 2 mM PEP a vypočtených kinetických konstant (Tab. 3, str. 37); **červená** – defosforylovaná PEPC (K': 0,2 mM; V_{max}: 1,2 $U.mg^{-1}$; h: 1,7±0,3). Hodnoty v grafu jsou průměry dvou nezávislých experimentů.

Pro základní porovnání kinetik defosforylované PEPC byly nejvhodnější podmínky pH 7,3 a 34°C. Za těchto podmínek stačí použít menší množství enzymu a také Hillův koeficient je mnohem výraznější. Reaktivace enzymu byla nejlépe pozorovatelná při pH 7,3 a 20°C. Při pH optimu PEPC nebyl efekt fosfátu tak výrazný, ale Hillův koeficient se i za těchto podmínek snížil zpět téměř na 1. Zvýšená teplota značně snížila efekt volného fosfátu na defosforylovaný enzym, ale výsledky těchto měření nebyly natolik jednoznačné.

3.8 STANOVENÍ FOSFÁTU

Pro tuto metodu byla provedena kalibrace (Obr. 39). Závislost je lineární v celém rozsahu použitých koncentrací od 0 do 1,0 mM koncentrace fosfátu. Jako standard byl použit fosfátový pufr pH 7,0. Doba inkubace byla velmi důležitá, jelikož změna směrnice byla přibližně 10% za hodinu.



Obr. 39: Citlivost metody pro stanovení fosfátu. Byla použita řada 0-1,0 mM koncentrací fosfátu. V grafu jsou uvedeny rovnice kalibračních křivek získané lineární regresí.

Tato metoda byla vyzkoušena se 100 µl PEPC inkubované s alkalickou fosfatasou (0,097 $U.ml^{-1}$; 1,1 $U.mg^{-1}$ nativní PEPC):

100 µl PEPC (AP) ~ (2,3±0,1) mM volného fosfátu
(koncentrace je měřena v celkovém objemu 1 ml)

4. DISKUSE

4.1 MĚŘENÍ AKTIVITY PEPC

Metoda pro měření aktivity PEPC pomocí spřažené reakce s malátdehydrogenasou používaná v této práci je poměrně přesná.[50] Maximální experimentální chyba je při použití optimálního množství enzymu ± 5% (Optimální množství PEPC způsobí změnu A_{340} 0,030 – 0,050 za minutu a odpovídá 0,1 – 0,16 $U.ml^{-1}$). PEPC ze semen kukuřice má široké pH optimum[32] a její aktivita není pH příliš ovlivněna. Aktivita při pH 7,3 je asi jen o 10% nižší než maximální aktivita při pH 8,1 (Tab. 3, str. 37). Avšak pH má velký vliv na citlivost PEPC vůči alosterickým efektorům: za laboratorní teploty není při pH 8,1 pozorována žádná inhibice PEPC malátem, ale při pH 7,3 je již inhibiční konstanta pro malát I_{50} 2 mM (3.4.6). Podobná závislost byla nalezena i pro isoformu PEPC z kořenů kukuřice.[55] Hodnota pH i zde ovlivňuje více citlivost vůči modulátorům, než samotnou aktivitu kořenové PEPC. U isoforem PEPC C_4 a C_3 z listů kukuřice bylo pozorováno, že snížení pH vedlo k změně závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP z hyperbolické (pH 8,0; 20°C) na sigmoidální (pH 7,0; 20°C) s Hillovými koeficienty 1,9 (C_4) a 1,6 (C_3).[32] Aktivita těchto dvou isoforem je také více závislá na pH: C_4 má při pH 7,0 pouze 40% aktivity pozorované v optimálním pH 8,0.[55] Tyto výsledky indikují důležitost pufru schopného udržet stálé pH v reakční směsi.

Kontrolní měření pH ukázala, že přidání 2 mM PEP do reakční směsi se 100 mM Tris-HCl pufrem sníží původní hodnotu pH 8,07 na 7,97. Přidání 2 mM malátu posune pH ještě níže. Z tohoto vyplývá, že tento pufr není vhodný pro měření inhibičních závislostí PEPC. Přesto lze v literatuře nalézt inhibiční studie prováděné v 50 mM Tris-HCl pufru.[56] Ani 100 mM HEPES-KOH pufr nebyl schopen kompenzovat změnu pH reakční směsi po přídavku 4 mM malátu a až teprve 250 mM HEPES-KOH pufr utlumil dostatečně změny pH spojené s přidáním 4 mM malátu a 4 mM PEP.

4.2 IZOLACE

Tabulka shrnující průběh izolace (Tab. 1, str. 27) ukazuje velké zvýšení specifické aktivity enzymu (více než 40×). Skutečná hodnota je však o něco nižší, jelikož fosfátový pufr aktivuje PEPC (Obr. 33, str. 43) a výtěžek je tedy přibližně o 10% menší. Další snížení čistoty je způsobeno vynecháním 0,075 M fosfátového pufru při eluci na hydroxyapatitové koloně. Snížená čistota enzymu je však kompenzována dvojnásobným zvýšením aktivity. PEPC po chromatografii na hydroxyapatitu není vhodná pro studie nativního enzymu. Fosfát přítomný v preparátu nejen PEPC aktivuje, ale také interferuje s účinky fosforylace a defosforylace a má vliv na účinek alosterických modulátorů (3.6). Proto je nutné enzym před měřením převést do pufru B, což je provedeno buď gelovou chromatografií (2.4.2.4), nebo dialýzou (2.4.2.2).

4.3 IDENTIFIKACE ISOFORMY PEPC

Jsou známé tři geny kódující PEPC v kukuřici, které mají poměrně vysokou homologii 77-85% (Tab. 2, str. 31). Fotosyntetická C_4 isoforma (970 aminokyselin) je zodpovědná za asimilaci CO_2 v C_4 cyklu. Druhý gen kóduje C_3 isoformu (967 aminokyselin), označovanou též jako housekeeping PEPC. Třetí kóduje isoformu vyskytující se v kořenech (960 aminokyselin), která obdobně jako isoforma C_3 hraje roli v různých metabolických dějích (Obr. 6, str. 12).[13][55]

Výsledky z elektroforetických metod naznačují, že semena kukuřice obsahují pouze jednu isoformu PEPC. Detekcí aktivity PEPC v gelu po nativní elektroforéze (3.2.2) byla nalezena pouze jedna isoforma. Její molekulová hmotnost je okolo 110 kDa (SDS-PAGE - Obr. 12, str. 27). Rovněž eluční profil enzymové aktivity z ionexové chromatografii na DEAE celulose tovří pouze jeden symetrický vrchol PEPC (Obr. 13, str. 28).

Výsledky MALDI-MS tohoto proteinu (Tab. 5) poskytnuté RNDr. Petrem Pompachem Ph.D vykazují nejvyšší shodu s isoformou PEPC z kořenů kukuřice, která již byla klonována a charakterizována (Dong et al., 1998).[55]

PROFOUND

Protein Candidates

Tab. 5: Vyhodnocení výsledků z MALDI-MS. (Získáno pomocí programu Profound a dat z naměřených hmotnostních spekter poskytnutých RNDr. Petrem Pompachem, Ph.D).[57]

Z těchto výsledků lze shrnout, že ze semen je izolována pouze jedna isoforma. Nelze vyloučit, že během izolace ztratí některé molekuly PEPC svojí aktivitu, či jsou částečně štěpeny proteasami. Jejich příspěvek k celkovému chování PEPC je však zanedbatelný.

Připravená N-terminální sekvenace izolované PEPC ze semen kukuřice by mohla přinést větší jistotu a potvrdit, či vyvrátit výsledky z MALDI-MS. Z porovnání výsledků kinetických parametrů a alosterických regulací kořenové isoformy a PEPC ze semen je však patrné, že mají mnoho společného (Tab. 6). Glukosa-6-fosfát a glycin nemají žádný, či nepatrný vliv na kořenovou isoformu PEPC,[32][55] ani na PEPC ze semen (3.4.4). Navíc glukosa-6-fosfát a fosforylace enzymu

v obou případech snižuje sensitivitu k inhibici L-malátem(3.7; [55]). Také pH optimum je obdobně u kořenové isoformy široké s maximem okolo pH 8,0 a poklesem aktivity jen o 10% při pH 7,0.[32][55] Malát je z výsledků silnějším inhibitorem u kořenové isoformy PEPC, avšak rozdíl by mohl být způsoben použitím 50 mM HEPES-KOH pufru. Takto nízká koncentrace není schopná dostatečně pufrovat reakční směs (4.1) a také je v práci[55] uvedeno, že kinetické konstanty byly „získány za předpokladem, že inhibice L-malátem je vůči PEP kompetitivní".

	Kořenová isoforma (nefosforylovaná)	Isoforma ze semen (defosforylovaná)
K_m (PEP) pH 7,3; 30°C	**0,05 mM***	**Sigmoidální průběh**
pH optimum	8,0*	8,1
Glycin	Žádný efekt, či malá inaktivace*	Velmi slabá aktivace na hranici chyby měření
D-Glukosa-6-fosfát pH 7,3, 30°C	Velmi malá aktivace*	Velmi malá aktivace
L-malát I_{50} pH 7,3; 30°C	0,24 mM*	1,5 mM

Tab. 6: Porovnání kořenové isoformy PEPC* a PEPC isolované ze semen kukuřice. Tabulka obsahuje data z této práce naměřená s defosforylovanou PEPC ze semen kukuřice a data o kořenové isoformě (*) získaná Dong et al. (1998)[55] pocházející z klonovaného enzymu, který není fosforylován. Nejdůležitější rozdíl je zvýrazněn tučně.

Jestliže defosforylovaná forma PEPC z kořenů kukuřice má hyperbolickou závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu PEP,[55] pak by isoforma PEPC izolovaná ze semen kukuřice nemusela být totožná s isoformou kořenovou. Odpověď na tuto otázku může dát pouze podrobnější zkoumání primární struktury molekuly PEPC ze semen kukuřice. Kinetické parametry ukazují, že se svým chováním řadí na pomezí mezi kořenovou isoformou (alosterické regulace) a C_4 isoformou (sigmoidální závislost reakční rychlosti na koncentraci PEP defosforylovaného enzymu).

4.4 VLIV TEPLOTY NA AKTIVITU PEPC

PEPC rostlin C_4 jsou známé tím, že mají teplotní optima při 45°C s přibližně dvojnásobným zvýšením aktivity proti aktivitě pozorované při tzv. suboptimální teplotě 15°C.[58] Teploty nad 35°C však mají negativní vliv na stabilitu PEPC ze semen kukuřice a teplota 40°C se ukázala být horní hranicí, kdy enzym není ještě narušen během 350 s měření aktivity (data nejsou uvedena). Změna teploty z 20°C na 35°C však vyvolává víc jak dvojnásobné zvýšení aktivity (Obr. 18, str. 32). Teplota má obecně vliv na rychlost reakce, jelikož poskytuje dodatečnou energii.[50] V tomto

případě je však patrný i vliv změny struktury enzymu. Tato změna se projevuje v poklesu afinity enzymu k substrátu PEP. Při optimálním pH 8,1 je změna K_m v rámci experimentální chyby (0,3 mM při 20°C a 0,4 mM při 34°C), avšak při pH 7,3 je již změna z 0,2 mM (20°C) na 0,8 mM (34°C) jasným důkazem, že ke změně struktury dochází. To se projeví i při účincích L-malátu (Tab. 3, str. 37).

Arheniovo vynesení (Obr. 19, str. 32) – závislost $\log_{10}$(aktivity PEPC) na reciproké hodnotě absolutní teploty – vykazuje lineární závislost pro PEPC izolovanou z rostlin mírného pásu a závislost hyperbolickou pro PEPC rostlin termofilních. Izolovaná PEPC ze semen kukuřice má závislost lineární, a tudíž splňuje charakteristiku pro enzym z rostlin adaptovaných na mírné teploty. I když je to empirická charakteristika,[13] může se zdát nepravděpodobné, že by PEPC z typické rostliny C_4 měla patřit k typu PEPC rostlin mírného pásu. Kukuřice však klíčí při teplotách výrazně nižších, než jsou optimální teploty rostlin C_4.[59] Laboratorní experimenty prokázaly, že pokud mají semena dostatečný přísun vody, mohou klíčit již při 5°C. V půdě je klíčení většinou pozorovatelná až od 8°C, nepřerušený růst pak při teplotách 11-12°C.[59] Toto vysvětluje, proč PEPC ze semen kukuřice má charakteristiku typickou pro isoformy PEPC z C_3 rostlin.

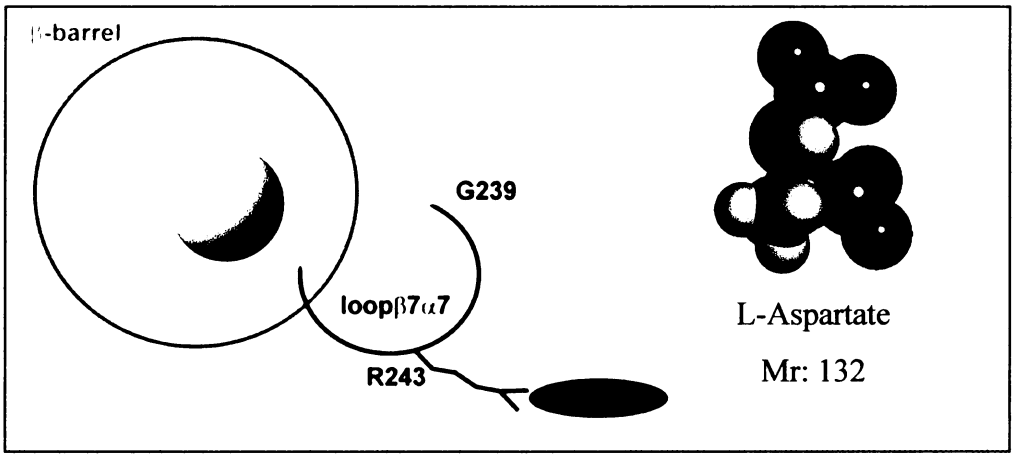
4.5 ALOSTERICKÉ EFEKTORY A JEJICH VLIV NA AKTIVITU PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE

Nejvíce studovanými modulátory PEPC jsou L-malát, L-aspartát, glycin a glukosa-6-fosfát. Vazebné místo pro aspartát bylo nalezeno z krystalové struktury PEPC *E. coli*.[60] Vazebné místo pro glukosa-6-fosfát bylo přiřazeno skupinám vázajícím sulfát v krystalu PEPC z fotosyntetické isoformy.[7] Tyto aminokyselinové zbytky byly již potvrzeny mutační studií.[61] Toto místo se pravděpodobně podílí i na změnách chování fosforylované PEPC a na interakci mezi podjednotkami.[61]

Alosterické modulátory následují v pořadí dle své důležitosti. Nejdříve jsou uvedeny efektory, u kterých již je zcela či částečně objasněn mechanismus účinku. Vliv volného fosfátu a kombinované účinky regulátorů jsou diskutovány odděleně v podkapitole 4.6.

4.5.1 L-ASPARTÁT NEMÁ VLIV NA AKTIVITU PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE

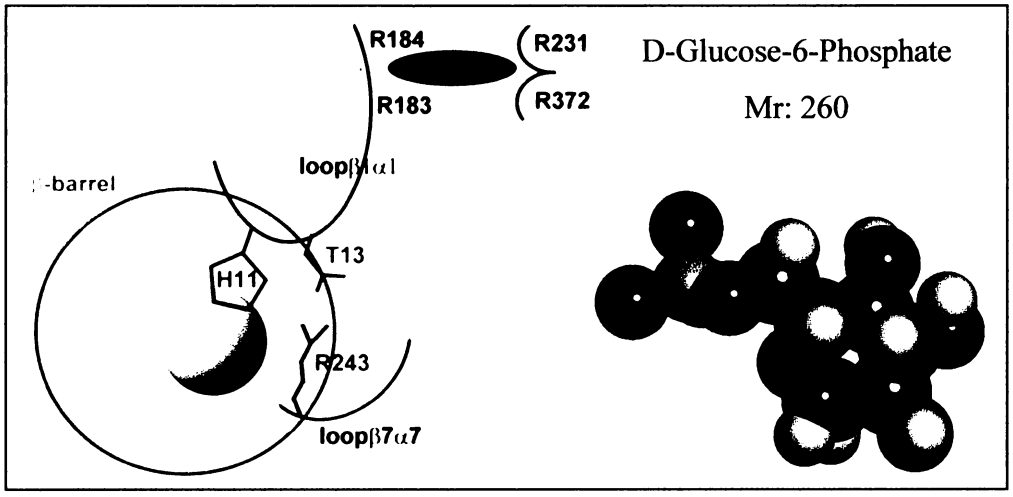
Asparát (Asp, Obr. 40) se podílí na primární fixaci CO_2 v malát/aspartátovém článku a mimo jiné může být také meziproduktem při fixaci dusíku. Je známo, že je to silný inhibitor PEPC rostlin C_4, schopný inhibovat jejich aktivitu na 20-70% již při 1 mM koncentraci.[56] Při jeho interakci s molekulou PEPC hrají hlavní roli zbytky argininu (Obr. 46).[4]



Obr. 40: L-Aspartát (Asp) a mechanismus inhibice PEPC. Vazba L-aspartát oddálí mobilní smyčku ß7α7 od aktivního centra a inhibuje tak PEPC (*E.coli* číslování aminokyselinových zbytků)[4]

Přidání L-aspartátu do reakční směsi o pH 7,3 nemělo žádný efekt na aktivitu PEPC izolované ze semen kukuřice. To se nezměnilo ani při zvýšení teploty (Obr. 21, str. 34). Vysvětlení může být ve skutečnosti, že je tato isoforma přítomná v pletivech asimilujících dusík a tudíž by jí citlivost na L-aspartát značně limitovala. Aminokyseliny podílející se na vazbě aspartátu v C_4 isoformě (R647, K835, R894 a N968)[3] jsou přítomné i v ostatních PEPC z kukuřice. Je tedy pravděpodobné, že jsou tyto aminokyselinové zbytky strukturálně blokovány a není umožněna buď vazba L-Asp, či pohyb mobilní smyčky z aktivního centra.

4.5.2 D-GLUKOSA-6-FOSFÁT VYKAZUJE POUZE SLABOU AKTIVACI PEPC



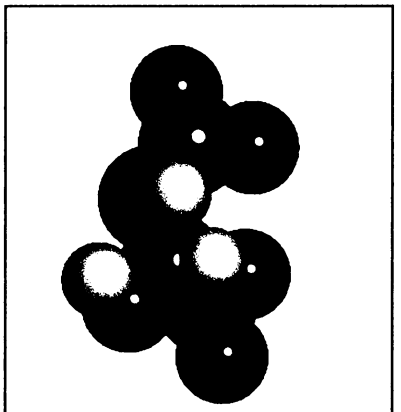
Obr. 41: D-Glukosa-6-fosfát (G6P) a mechanismus aktivace PEPC.[4] G6P interaguje s argininovymi zbytky a přesune mobilní smyčku ß1α1 do více vhodné pozice pro její funkci v aktivním centru. (Arg183, Arg184, Arg231 a Arg372 v číslování C_4 isoformy z kukuřice, ostatní v číslování *E.coli*)

D-glukosa-6-fosfát (Obr. 41) je velmi důležitý metabolit v bioenergetických reakcích buňky. Je významným metabolitem při syntéze zásobních polysacharidů na jedné straně a glykolýze a penotosafosfátové dráze na straně druhé. Má také velkou roli při regulaci některých rostlinných PEPC. 10 mM glukosa-6-fosfát způsobí při laboratorní teplotě zvýšení aktivity C_4 isoformy PEPC kukuřice na 250%, ale pro kořenovou isoformu je zvýšení aktivity jen 8%.[55] Aktivace PEPC ze semen kukuřice glukosa-6-fosfátem při laboratorní teplotě nebyla téměř zjistitelná. Při vyšší teplotě se již aktivace projevuje (Obr. 23, str. 35) a aktivita PEPC vzrůstá na 120% (34°C; pH 7,3; 2 mM glukosa-6-fosfát).

Čtyři argininové zbytky (Obr. 41) zodpovědné za vazbu glukosa-6-fosfátu jsou konzervované ve všech známých isoformách PEPC kukuřice. Tyto aminokyseliny se také uplatňují při interakci podjednotek a účincích fosforylace molekuly PEPC.[61] Je tedy možné, že PEPC ze semen kukuřice blokuje svoji strukturou vazbu glukosa-6-fosfátu, či brání pohybu mobilní smyčky ß1α1.

4.5.3 L-MALÁT INHIBUJE AKTIVITU PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE

Malát (Obr. 42) je jedním z nejčastějších produktů metabolismu oxaloacetátu a souhra mezi PEPC a malátdehydrogenasou plní řadu důležitých rolí v buňce (Obr. 6, str. 12). Malát je metabolitem citrátového cyklu, produktem malátové fermentace a také hlavní součást C_4 a CAM asimilace uhlíku. Všechny tyto reakce jsou také úzce spjaty s úlohou PEPC (1.1.4). Malát je taky produkován při snižování pH v buňkách otevírajících stomata.[15] L-Malát je nejčastější inhibitor aktivity PEPC, částečně pro svoji podobnost s oxaloacetátem.[3][32] Z tohoto důvodu byla inhibice malátem zkoumána detailně jak u nativní fosforylované PEPC ze semen kukuřice, tak u PEPC defosforylované (3.5.1). C_4 isoforma z listů kukuřice má hodnotu konstanty I_{50} pro malát 1,0 mM (fosforylovaná forma) a 0,3 mM (defosforylovaná forma).[62] Obdobný efekt byl pozorován i u PEPC ze semen kukuřice (viz 4.6.2).



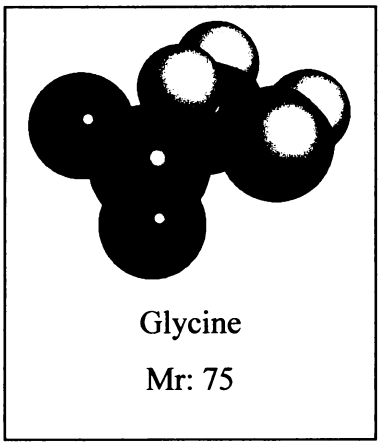
Obr. 42: Malát

Souhrn výsledků z měření inhibice malátem nativní PEPC ze semen kukuřice v Tab. 3 (st. 39) ukazuje, že na vazbu inhibitoru má vliv jak teplota, tak pH. Při pH 8,1 a laboratroní teplotě není inhibice fosforylovaného enzymu patrná. Při poklesu pH na 7,3 je již inhibiční konstanta I_{50} 2 mM. Při 34°C je I_{50}~10 mM (pH 8,1) a 4 mM (pH 7,3). Inhibice je určena jako smíšená, mimo teploty 34°C a pH 7,3. Zde byla inhibice určena jako kompetitivní. Z dvojnásobně reciprokého vynesení (Obr. 25-27, str. 37, 38) je patrno, že při nízkých koncentracích substrátu PEP se s rostoucí

teplotou, koncentrací malátu a klesajícím pH zvyšuje odchylka od lineární závislosti. Kombinace těchto tří jevů evidentně vede k destabilizaci struktury enzymu a začíná se zde projevovat jeho alosterický charakter v podobě mírně sigmoidální závislostí reakční rychlosti PEPC na koncentraci substrátu PEP.

4.5.4 GLYCIN NENÍ SILNÝM MODULÁTOREM PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE

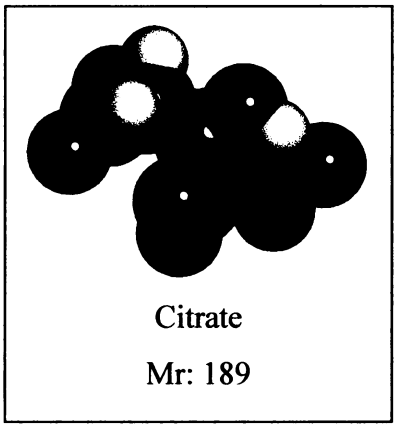
Glycin je nejjednodušší aminokyselina (Obr. 43) a také důležitý metabolit v základní biosyntézy. Je známo, že je silným aktivátorem C_4 PEPC isoformy z kukuřice. 10 mM glycin aktivuje tuto isoformu 2,3× při pH 7,3 a laboratorní teplotě.[55] Pro vazbu glycinu se zdají být důležité stejné aminokyselinové zbytky, jako u vazby glukosa-6-fosfátu, jak bylo ukázáno modifikací R226, D228, E229, R232.[63] Nebyl pozorován žádný vliv glycinu na aktivitu PEPC ze semen kukuřice při laboratorní teplotě,[32] což bylo potvrzeno i v této práci. Malá aktivace je patrná při zvýšené teplotě a pH 7,3, ale ta není příliš významná (Obr. 24, str. 36). Ve studii PEPC z kořenů kukuřice byla dokonce nalezena slabá inhibice glycinem při pH 7,3 a laboratorní teplotě.[55] Předpokládané aminokyselinové zbytky působící při aktivaci glycinem[63] jsou přítomny ve všech známých isoformách PEPC z kukuřice, což znamená, že jsou buď blokovány, nebo se ve skutečnosti na vazbě nepodílí a jejich modifikace[63] vedla k blokování skutečného vazebného místa pro glycin.



Obr. 44: Glycin

4.5.5 CITRÁT INHIBUJE PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE

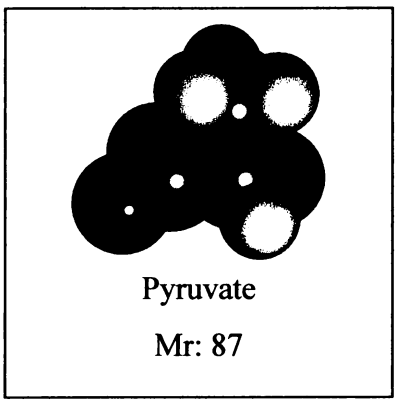
Citrát (Obr. 45) je základní intermediát Krebsova a glyoxylátového cyklu (Obr. 22, str. 35). Jedná se o známý inhibitor rosltinných PEPC.[64] Inhibiční konstanta pro citrát I_{50} je 12 mM pro nefotosyntentickou PEPC z gumovníku[64] a přibližně 3 mM byla nalezena pro PEPC ze semen kukuřice při pH 7,3 a laboratorní teplotě.[32] V této práci byla nalezena vyšší hodnota 5 mM, což lze vysvětlit použitím vhodnějšího pufru 250 mM HEPES, který lépe tlumí změny v pH způsobené přidáním citrátu. Bylo by zajímavé prozkoumat účinky citrátu hlouběji, ale jelikož tento modulátor není běžně studován, získaná data by se dala jen obtížně porovnávat, a proto od tohoto bylo upuštěno.



Obr. 45: Citrát

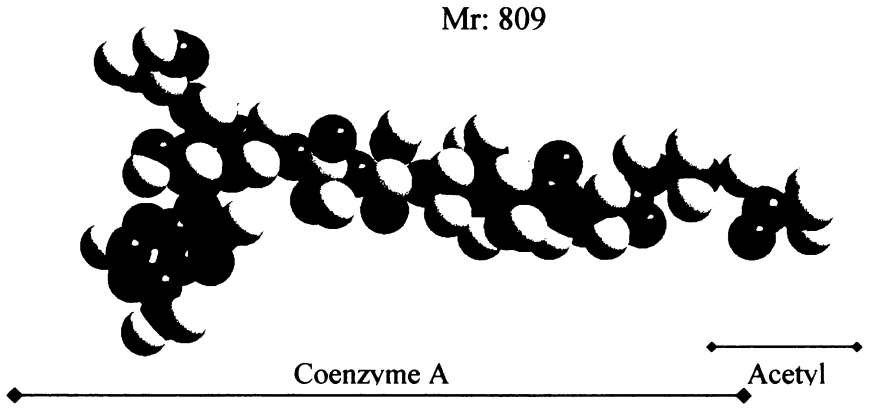
4.5.6 PYRUVÁT INHIBUJE PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE

Pyruvát (Obr. 46) je klíčovým metabolitem, který spojuje různé metabolické dráhy buňky. Je produktem glykolýzy, prekursor acetyl-CoA, výchozí metabolit fermentace a glukoneogenese, či intermediát transaminace alaninu. I když se pyruvát běžně počítá mezi obecné inhibitory rostlinných PEPC, některé isoformy PEPC jsou vůči němu necitlivé, např. PEPC z listu ječmene.[65] PEPC ze semen kukuřice je inhibována 4 mM pyruvátem při laboratorní teplotě, 2 mM koncentraci PEP a pH 7,3 na 80% své původní aktivity (Obr. 28, str. 39). Není to silný inhibitor jakým je např. malát, či citrát, ale jeho inhibiční vliv je průkazný.



Obr. 46: Pyurvát

4.5.7 ACETYL-KOENZYM A, KOENZYM A NEVYKAZUJÍ ŽÁDNÝ VLIV NA AKTIVITU PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE



Obr. 47: Acetyl-CoA model

Acetyl-CoA (Obr. 47) má důležitou roli v energetickém metabolismu buňky a je nezbytný pro biosyntézu isoprenoidů. CoA a Acetyl-CoA ovlivňují bakteriální PEPC, ale nemají většinou podobnou roli v rostlinných PEPC.[20] Nebylo tedy překvapením, že se jejich přídavek do reakční směsi nějak neprojevil na aktivitě PEPC ze semen kukuřice (Obr. 20, str. 33). Tento pokus byl přesto důležitý, protože vyvrátil možnost, že by se v bioenergicky velmi aktivních pletivech vyvíjejících se semen vyskytovala vazba acetyl-CoA/CoA na aktivitu PEPC. Nejen přítomnost fosforylačního místa, ale také absence vlivu CoA a acetyl-CoA prokázaly, že PEPC ze semen kukuřice nepatří mezi bakteriální typ PEPC, který se rovněž vyskytuje v rostlinách. Byl zjištěn v *Arabidopsis thaliana* a *Oryza sativa*.[25]

4.6 FOSFORYLACE A VLIV FOSFÁTU NA AKTIVITU PEPC IZOLOVANÉ ZE SEMEN KUKUŘICE

Jedním z hlavních cílů této práce bylo určit úroveň fosforylace v nativní PEPC uložené v semenech kukuřice. Ukázalo, že defosforylovaná forma má výrazně odlišný průběh závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP. Naskytla se tak příležitost pokusit se ověřit navržený mechanismus způsobu účinku fosforylace na molekulu PEPC,[3] který nebyl doposud prokázán žádnou jinou prací.

4.6.1 STUDIUM FOSFORYLACE NATIVNÍ PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE

Fotosyntetická C_4 isoforma kukuřice, která je exprimována v listech, je regulována světlem indukovanou fosforylací pomocí specifické PEPC-kinasy (PEPC-k) (1.4). Jak C_3 isoforma, tak PEPC isoforma exprimovaná v kořenech kukuřice také obsahují koncovou N-terminální sekvenci fosforylovatelnou PEPC-k.[54] Experimenty prokázaly, že i PEPC izolovaná ze semen kukuřice má pravděpodobně tuto sekvenci (3.5).

Fosforylace PEPC ze semen byla detailně studována pouze u tří rostlin typu C_3. Ve všech třech případech ricinus,[35] pšenice,[38] ječmen[36] byla PEPC v suchých semenech přítomna defosforylovaná. Fosforylace probíhá až po imbibici. PEPC ječmene zvyšuje fosforylací svoji aktivitu a během dvou dnů klíčení dosahuje maxima s aktivitou 3× vyšší než je počáteční aktivita defosforylovaného enzymu.[36] Obdobný průběh je pozorován v klíčící pšenici, kdy je PEPC také plně fosforylována v průběhu dvou dnů a dosahuje 1,5× vyšší aktivity.[38] Detailní studie fosforylace PEPC ze semen byla provedena na zrajících semenech . Fosforylace PEPC je nejvyšší v posledních etapách vývoje, ale ve finální maturační fázi je PEPC velmi rychle zcela defosforylována.[35] Defosforylovaná homotetramerická isoforma PEPC ze semen má v porovnání s fosforylovanou formou nižší aktivitu, téměř 2× vyšší K_m a poloviční inhibiční konstantu pro malát I_{50}.[35] Heterooktamerická PEPC ze semen má závislost opačnou: aktivita defosforylací vzroste, K_m klesne o asi 30% a inhibiční konstanta pro malát I_{50} je vyšší asi 2,5×.[35] Tato PEPC má však velmi zvláštní strukturu, která nebyla jinde prokázána.[33]

Pokusy v této práci prokázaly, že PEPC uložená v suchých semenech C_4 rostliny kukuřice je fosforylovaná. Další práce by měla potvrdit, zda se jedná o výjimku, či je to charakteristická vlastnost pro PEPC ze semen rostlin C_4. Defosforylace PEPC isoformy C_4 z listů kukuřice nemá vliv na její maximální rychlost, ani Hillův koeficient.[49] Je však snížena konstanta poloviční saturace (PEP) S_{50} z 2,0 mM na 1,2 mM (pH 7,0) a také je snížena hodnota inhibiční konstanty pro malát I_{50}.[49] Defosforylace PEPC izolované ze semen kukuřice pomocí alkalické fosfatasy se projeví poklesem aktivity PEPC a snížením inhibiční konstanty pro malát I_{50}, jak je pozorováno u ostatních PEPC izolovaných ze semen rostlin. Avšak změní se i závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP z hyperbolické na sigmoidální (Tab. 4, str. 42).

Působením proteinkinasy A (PKA) na nativní formu izolované PEPC ze semen kukuřice in vitro se neprojevila žádnou změnou v aktivitě PEPC. Refosforylace PEPC ze semen kukuřice po předchozí inkubaci s alkalickou fosfatasou vedla k opětovnému nárůstu aktivity na původní hodnotu plně fosforylované formy (Obr. 30, str. 40). Z tohoto experimentu lze usuzovat, že je PEPC uložena v semenech plně fosforylovaná. Podobný experiment byl proveden i s PEPC ze semen . Zde PKA obnovila původní aktivitu PEPC pouze na 80%,[35] ale z prezentovaného časového průběhu lze usuzovat, že refosforylace nebyla pravděpodobně v tomto případě dokončena. Experiment s defosforylovanou PEPC ze semen kukuřice prokázal, že proteinkinasa A je schopná v tomto případě plně refosforylovat PEPC a potvrdil její schopnost nahradit specifickou PEPC-kinasu.

Defosforylovaná PEPC ze semen kukuřice mění závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP z hyperbolické podle Michaelise-Mentenové na sigmoidální. Je to podobný efekt, jaký má na C_4 isoformu[32][66] z listů snížení pH. Oligomerický enzym, jakým je PEPC, obsahuje více míst pro vazbu substrátu. Pokud se tato místa chovají identicky a vykazují shodné hodnoty K_m and k_{cat} pro substrát, průběh závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu odpovídá rovnici popsané Michaelisem a Mentenovou pro enzym s jedním aktivním centrem. Toto je případ fosforylované formy PEPC ze semen kukuřice. Defosforylace vede k ztrátě tohoto identického chování všech vazebných míst a vazba substrátu na jednu podjednotku vyvolává zvýšenou afinitu k substrátu u ostatních podjednotek. Tato kooperace je charakterizována Hillovou rovnicí (Obr. 11, str. 26).

Hodnota Hillova koeficientu reprezentuje minimální počet vazebných míst oligomerního enzymu. Srovnání vypočtených Hillových koeficientů defosforylované PEPC ze semen kukuřice (Tab. 4, str. 42) ukazuje, že nejvyšší kooperace podjednotek je dosaženo při pH 7,3 a 34°C, kde je Hillův koeficient 4. Ve zbývajících případech je kooperace slabší.[50]

Zajímavé je porovnání vlivu teploty a pH na defosforylovanou PEPC ze semen kukuřice (Tab. 4, str. 42). Aktivita defosforylovaného enzymu při laboratorní teplotě je více ovlivněna při pH optimu 8,1. Při pH 7,3, které ve všech ostatních studiích s regulací PEPC bylo mnohem citlivější, je pokles aktivity nižší. Také zvýšení teploty vede k menšímu poklesu aktivity PEPC po defosforylaci. To vše opět prokazuje velký vliv teploty a pH na změny ve struktuře PEPC.

4.6.2 KOMBINACE RŮZNÝCH VLIVŮ NA AKTIVITU PEPC

I když je přímý efekt D-glukosa-6-fosfátu na aktivitu PEPC malý, je známo z mnoha případů, že snižuje citlivost enzymu na inhibici L-malátem. 10 mM glukosa-6-fosfát zvýšila inhibiční konstantu pro malát I_{50} kořenové PEPC isoforma z kukuřice více jak 2×.[55] Fosforylovaná PEPC ze semen kukuřice je méně ovlivněna tímto efektem. Ale jak glukosa-6-fosfát (Obr. 35, str.

44) tak samotný volný fosfát (Obr. 36, str. 45) snížili téměř shodně v 2 mM koncentraci inhibici malátem o 10% při pH 7,3. Samotný aktivační efekt byl přitom asi jen 5%.

Defosforylace PEPC ze semen kukuřice měla podobný efekt na citlivost vůči inhibici malátem, jaký je pozorován u jiných rostlinných PEPC (Obr. 37, str. 45). Defosforylovaný enzym je slabě inhibován malátem již při pH 8,1 za laboratorní teploty. Znatelný je rozdíl při 34°C, 2 mM PEP a pH 7,3: inhibiční konstanta pro malát I_{50} je 1,5 mM pro defosforylovaný enzym a 3.8 mM pro enzym plně fosforylovaný. Defosforylace neměla vliv na regulaci aspartátem, glukosa-6-fosfátem, ani glycinem.

4.6.3 FOSFÁT A MECHANISMUS ÚČINKU FOSFORYLACE PEPC

Fosfát je produktem reakce katalyzované PEPC, ale hraje také důležitou roli v metabolismu. Je nejen potřebný pro syntézu ATP, ale moduluje také aktivitu důležitých enzymů, např. ribulose-1,5-bisfosfátekrboxylasy.[67] Nedostatek fosfátu snižuje aktivitu PEPC v listech kukuřice během 24 dnu na 30%.[67] Defosforylovaná PEPC z listů C_4 rostliny laskavce adaptovaných na tmu je aktivována 30 mM fosfátem na dvojnásobek své počáteční aktivity. Zároveň je zvýšena inhibiční konstanta pro malát I_{50} a také enzym aktivovaný glukosa-6-fosfátem je dále stimulován.[68] Podobný efekt je pozorován i u fosforylovaného enzymu z osvětlených listů, pouze změny jsou nižší.[68] Fosfát také chrání PEPC před poškozením během teplotního šoku (změna z 15 na 45°C).[68] Experimenty v této práci ukázaly, že fosfát ve vyšší koncentraci pravděpodobně chrání PEPC před kompletní degradací proteasami (Obr. 34, str. 43). Enzym je však jistě částečně štěpen, jelikož jeho aktivita během prvních dnů po izolaci klesá.

Některé studie uvádí, že účinek volného fosfátu nezávisí na fosforylaci a že změna v inhibiční konstantě pro malát I_{50} není spojena s úrovní fosforylace, protože bylo pozorována podobná aktivace u fosforylovaného i defosforylovaného enzymu.[68] Jiné vysvětlení je prezentováno v této práci.

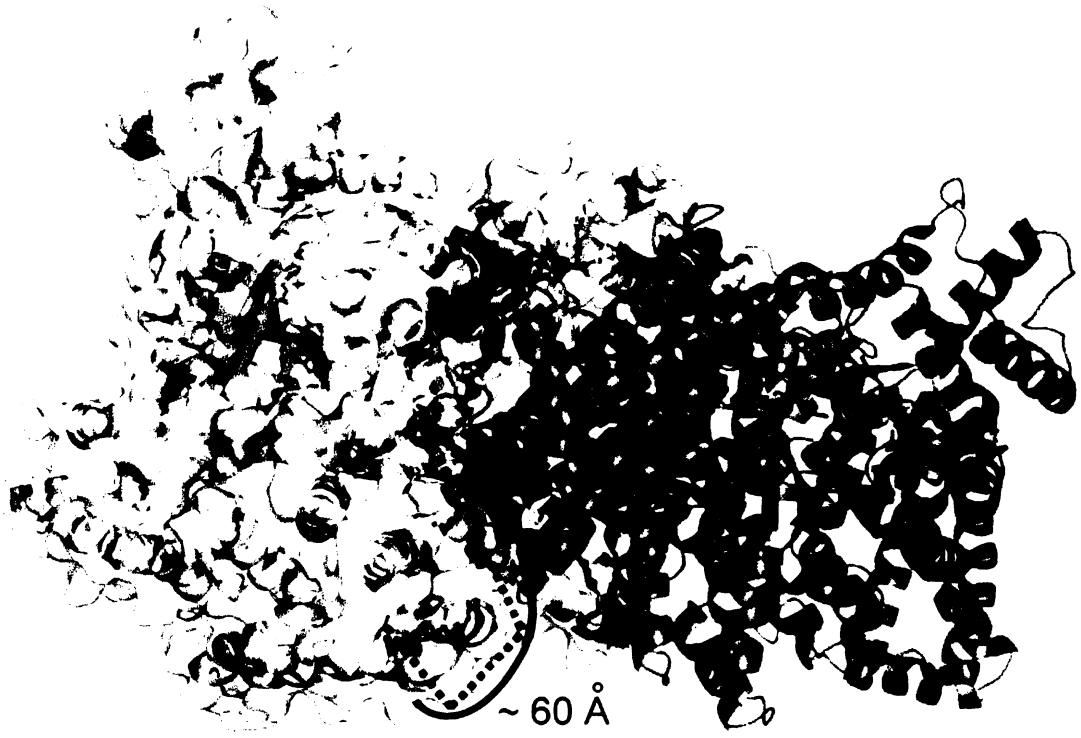
V krystalu PEPC jsou vázány 4 molekuly sulfátu – 1 na podjednotku (Obr. 48, str. 60). Aminokyselinové zbytky vázající tyto molekuly byla označena jako místo vázající alosterický aktivátor glukosa-6-fosfát[7] (4.5.2). Nicméně podobnost sulfátu a fosfátu naznačuje, že je to také místo pro vazbu volného fosfátu. Z toho vyplývá, že by to mohlo být i místo pro vazbu fosforylovaného serinu ze sekvence na N-terminálním konci PEPC. Pravda je, že již bylo potvrzeno pomocí mutační studie, že tyto aminokyselinové zbytky mají podíl na regulaci fosforylací.[61] To znamená, že buď skutečně jsou vazebným místem pro fosforylovaný serin, nebo že jsou vazebnému místu blízká. Byl navržen mechanismus, který je založen na již rozřešeném podobném případu glykogenfosforylasy kvasinek. Fosforylovaná N-terminální smyčka se dle tohoto návrhu váže v blízkosti aktivního centra enzymu a tak ovlivňuje jeho kinetické parametry.[3]

Doposud nebyly publikovány žádné další výsledky, které by tuto teorii potvrdily. PEPC izolovaná ze semen kukuřice se zdá být ideální volbou pro studium tohoto mechanismu. Její fosforylovaná forma má hyperbolický průběh závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP, kdežto její defosforylovaná forma má průběh sigmoidální. Možné vysvětlení pozorovaných změn v chování enzymu pozorované v této práci je shrnuto zde. Vychází z navrženého mechanismu, kdy se mobilní koncová N-terminální smyčka (Obr. 49, str. 60) váže po fosforylaci serinu přímo k enzymu. Z modelu (Obr. 48, str. 60) je patrné, že vzdálenost mezi Ile35 (poslední aminokyselinový zbytek krystalové struktuře) a vázaným sulfátem je asi 60Å, což přibližně odpovídá řetězci 20 aminokyselin Ser15 (místo fosforylace). Molekula sulfátu je v enzymu vázána v místech, kde se dotýkají jednotlivé podjednotky. Proto je pravděpodobné, že vazba do tohoto místa ovlivní interakci mezi podjednotkami. To by mohlo vysvětlit změnu v závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu po defosforylaci na sigmoidální.

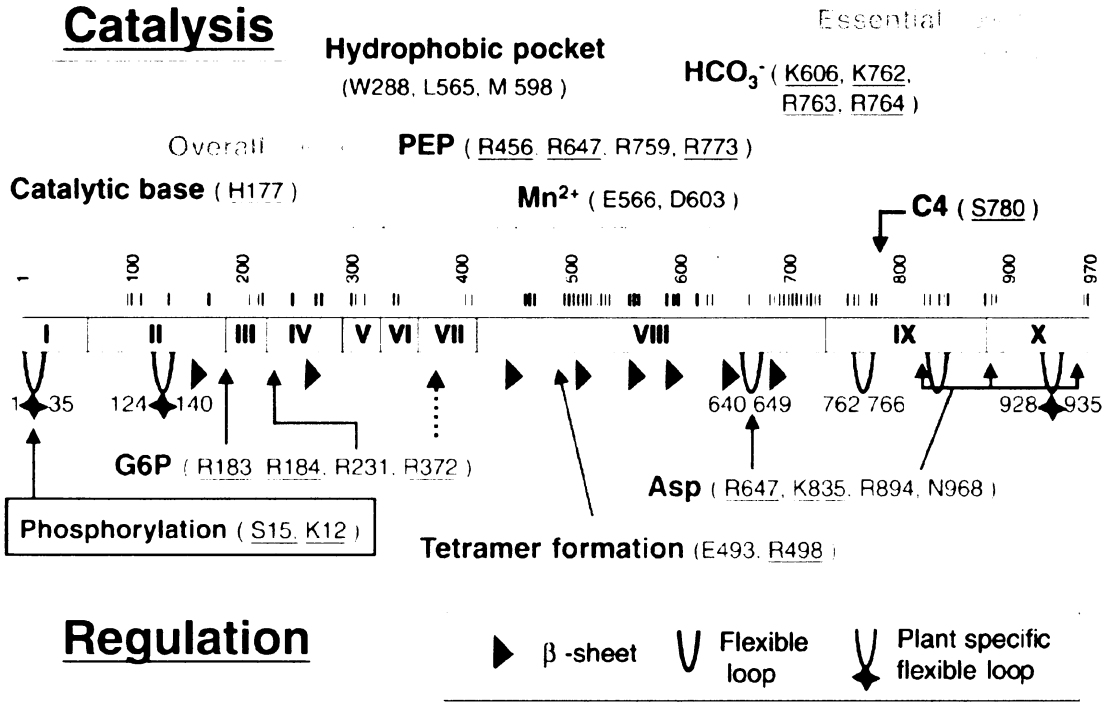
Je pravděpodobné, že volný fosfát se bude vázat na stejné místo jako sulfát, jelikož jsou si tyto molekuly chemicky i velikostí podobné. Nelze také popřít, že volný fosfát by mohl soutěžit o vazebné místo s fosforylovaným Ser15 a ve vysoké koncentraci ho vytěsnit. Vazba fosfátu povede k přesunu mobilní smyčky a tedy i k změně v některých kinetických parametrech, ale kooperativita mezi podjednotkami zůstane zachována. Toto soutěžení o vazebné místo lze pozorovat pouze při vysoké koncentraci fosfátu, jaká je třeba v 100 mM fosfátovém pufru (Obr. 33, str. 43). Defosforylovaný enzym má vazebné místo pro fosforylovaný serin volné, a tak je mnohem náchylnější k aktivaci fosfátem i při nízkých koncentracích (Obr. 38, str. 46). Celý navržený model je ukázán na Obr. 50 (str. 61).

4.7 METODA STANOVENÍ FOSFÁTU

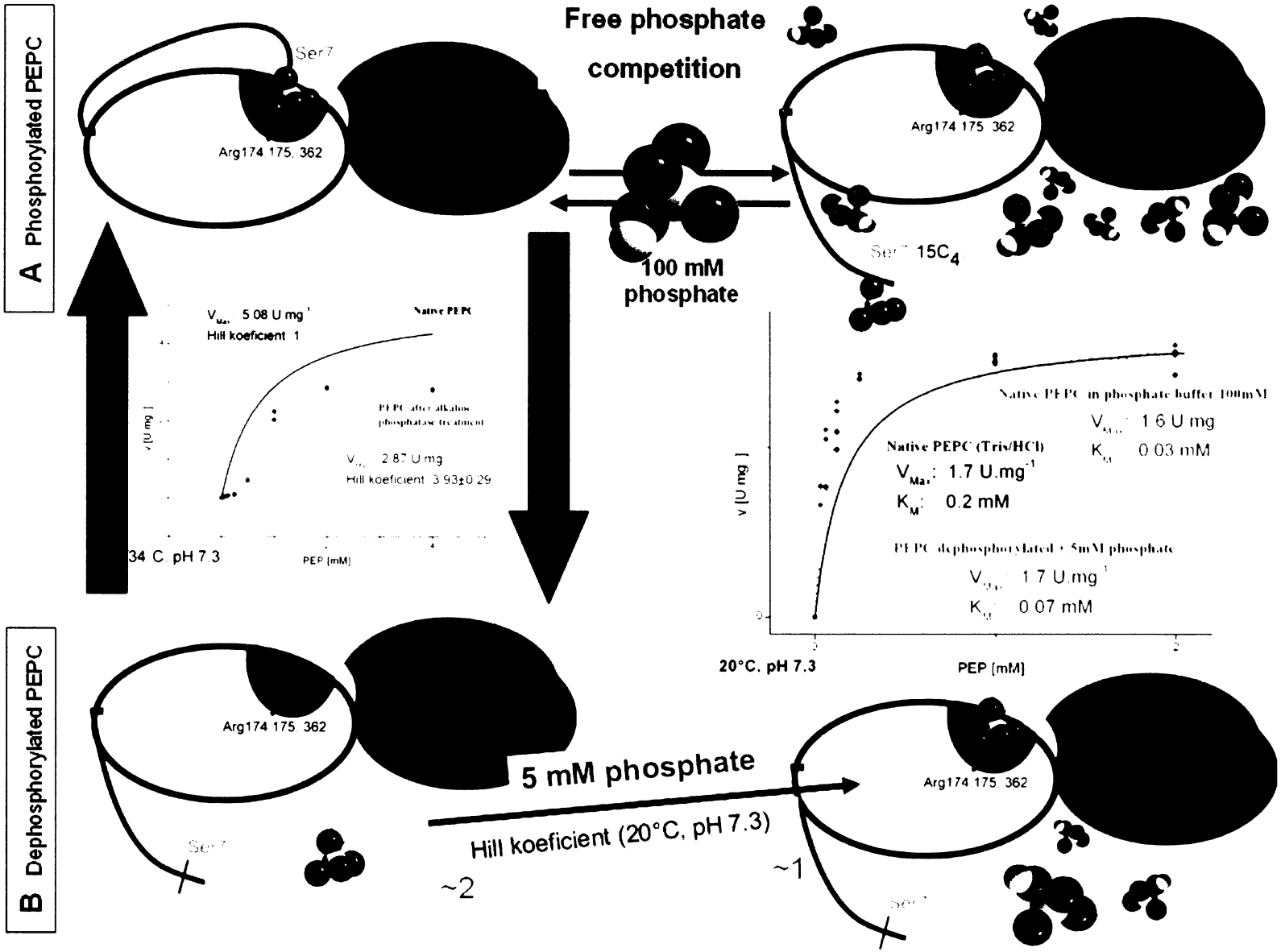
Klasické metody, které se již běžně nepoužívají mohou stále překvapit svojí efektivitou i v dnešní biochemii. Tato metoda má v sobě jistě ještě velký potenciál, který nebyl doposud využit. Zkušební experimenty v této práci (3.8) ukázaly, že je to citlivá metoda schopná detekovat 10^{-4} M koncentraci volného fosfátu ve vzorku. Silná anorganická činidla jsou navíc alespoň částečně schopná odštěpit vázaný fosfát i z nativní fosforylované molekuly PEPC (není uvedeno). Toto bylo potvrzeno experimentem s kaseinem (protein s vysokým stupněm Ser/Thr fosforylace) kdy nárůst absorbance při 660 nm koreloval s koncentrací kaseinu ve vzorku. Pokud by byla tato relativně jednoduchá metoda dále optimalizována, mohla by v budoucnu nahradit drahé a často i méně přesné metody pro detekci fosforylace purifikované PEPC, ale i jiných proteinů s Ser/Thr fosforylací.



Obr. 48: PEPC dimer: mechanismus fosforylace – schéma. (*zelená* – aktivní centrum, *žlutá* – vázebné místo pro glukosa-6-fosfát, *oranžová* – aminokyselinové zbytky druhé podjednotky interagující s vazebným místem pro glukosa-6-fosfát, *modrá* – vzdálenost mobilní smyčky k vázanému sulfátu, modelováno v PyMOL v0.99 pomocí dat z 1JQO PDB database[5])



Obr. 49: Analýza sekvence C_4 PEPC isoformy z kukuřice. (Kai et al., 2003) [19]



Obr. 50: Navržený model vysvětlující vliv volného fosfátu na kinetiku PEPC. **A**: Volný fosfát soutěží o vazebné místo s fosforylovaným serinem z na N-terminální smyčce. Pouze vyšší koncentrace vede k změně kinetiky. **B**: Defosforylovaný enzym má neobsazené vazebné místo, a tak je více náchylný k účinkům volného fosfátu

4.8 PEPC ZE SEMEN KUKUŘICE

Genetické experimenty prokázaly, že aktivita PEPC souvisí s množstvím proteinů uloženém v semenech. Zvýšený obsah proteinů byl pozorován u geneticky modifikovaného hrachu, kterému byla vložena sekvence kódující bakteriální PEPC.[69] Jsou tu i další důvody, proč je PEPC v semenech rostlin poměrně značně aktivní. Může se totiž podílet na řadě důležitých dějů při zrání, ale i klíčení semen (1.1.4). Jedním z důvodů může být pomoc při syntéze zásobních látek, kde se uplatní schopnost PEPC zachytávat respirovaný CO_2. Také se podílí na syntéze kyselin (oxaloacetát, malát), které jsou využity pro chelataci důležitých iontů a jejich uskladnění ve vakuole. Ve vyvíjejícím se semeni [illegible] bylo dále zjištěno, že malát podporuje zvýšenou syntézu mastných kyselin v leukoplastech.[34] Při klíčení semen se uplatní především anaplerotická role PEPC a její úloha při regeneraci koenzymů pomocí malátového kvašení. Oxaloacetát může být také využit pro syntézu potřebných aminokyselin.

Kinetické studie s alkalickou fosfatasou a proteinkinasou A ukázaly, že PEPC v semenech kukuřice je fosforylovaná (Obr. 30, str. 40). Z velmi výrazné změny závislosti reakční rychlosti PEPC na koncentraci substrátu PEP po defosforylaci (Obr. 31 and Obr. 32, str. 42) lze usuzovat, že skladovaný enzym je zcela fosforylovaný. Tyto výsledky naznačují existenci nové, dosud nepopsané regulace PEPC-k v semenech kukuřice. Je nepravděpodobné, že by byla aktivována světlem, či cyrkadiáním rytmem. Možná by byla aktivace závislá na dostupnosti dusíkatých látek, či aktivace solným stresem, která je popisována v některých případech,[70] jelikož zrající semena jsou dehydratována.

Důvod skladování fosforylované formy enzymu v semenech kukuřice není zcela jasný, jelikož u studovaných rostlin C_3 k stejnému jevu nedochází.[35][36][38] Je však velmi nepravděpodobné, že by to bylo způsobeno jen jako vedlejší efekt dehydratace semen. Jedním z důvodů může být inhibice aktivity PEPC L-malátem. Fosforylovaná forma je k této inhibici méně citlivá (3.7) a hladina malátu může být vysoká jak v počátku klíčení, kdy se uplatňuje malátové kvašení, tak během poslední etapy zrání, kdy malát zvyšuje syntézu mastných kyselin.[34] Druhým možným důvodem je sigmoidální průběh závislost reakční rychlosti PEPC na koncentraci substrátu PEP (3.5.1). Při nízkých koncentracích substrátu by pak byl defosforylovaný enzym téměř neaktivní. Třetím důvodem může být vliv fosfátu na defosforylovanou formu PEPC (Obr. 38, str. 46). Dramatické zvýšení afinity defosforylované formy PEPC k substrátu PEP již při 5 mM koncentraci fosfátu by mohlo vážně narušit metabolickou rovnováhu v buňce. Čtvrtým možným důvodem je ochrana proti proteolyse, jak je naznačeno z výsledků zvýšené stability enzymu ve fosfátovém pufru (Obr. 34, str. 43). Podobný efekt byl zjištěn například u hlavních proteinů fotosystému II, kdy fosforylace na N-terminálním konci proteinů brání jejich degradaci.[71]

5. SOUHRN

Byl optimalizován postup pro purifikaci PEPC ze semen C_4 rostliny kukuřice (*Zea mays*). Pouze jedna isoforma PEPC o molekulové hmotnosti jedné podjednotky přibližně 110 kDa byla přítomna v detekovatelném množství. Tato semenná isoforma není identická s žádnou ze tří známých isoforem PEPC kukuřice, ale vykazuje podobnost k C_4 isoformě z listů a isoformě kořenové. Aktivita PEPC ze semen kukuřice je velmi závislá na teplotě. Při teplotě 35°C byla aktivita více jak dvojnásobná oproti měření při teplotě 20°C. Empirická Arheniova charakteristika přiřazuje tuto isoformu mezi PEPC „rostlin mírného pásu", což může souviset s její rolí během nízkých teplot při klíčení semen. Bylo zjištěno, že nativní forma PEPC uložená v semenech je plně fosforylovaná. Tato skutečnost naznačuje existenci nového, dosud nepopsaného způsobu regulace specifické PEPC-kinasy. Defosforylovaný enzym má nižší hodnotu V_{max} a vykazuje sigmoidální průběh závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP. Hillův koeficient se pohybuje v závislosti na pH a teplotě mezi hodnotou 2-4 (Tab. 4, str. 42).

Byl studován vliv běžných alosterických modulátorů PEPC s následujícími výsledky:

- L-Aspartát, ani glycin nemají žádný efekt na fosforylovaný, či defosforylovaný enzym.
- Glukosa-6-fosfát a volný fosfát působí pouze mírnou aktivaci PEPC, ale stimulují nativní PEPC a snižují tak účinky inhibice malátem.
- L-Malát je silný inhibitor defosforylované formy PEPC (I_{50} 1,5 mM at pH 7,3; 34°C), ale i její formy fosforylované. Účinky inhibice závisí na teplotě a pH. Nejvyšší inhibice je pozorována při pH 7,3 a 34°C, při pH 8,1 a laboratorní teplotě u fosforylované formy k inhibici nedochází vůbec. Inhibice byla pro nativní fosforylovanou formu určena jako smíšená (34°C; pH 8,1; a 20°C; pH 7,3) a kompetitivní blízká smíšené (pH 7,3; 34°C). Inhibiční konstanty jsou shrnuty v tabulce 3 (Tab. 3, str. 37).
- Zvýšená teplota kombinovaná s nízkým pH, či zvýšenou koncentrací inhibitoru ovlivňovala kooperaci mezi podjednotkami homotetrameru PEPC.
- Citrát i pyruvát působí jako inhibitory nativní PEPC. Citrát byl silnější inhibitor s inhibiční konstantou I_{50} 5 mM (pH 7,3 a 20°C).
- Nebyl pozorován žádný efekt Acetyl-CoA, či CoA na aktivitu PEPC.

Bylo zjištěno, že vysoká koncentrace fosfátu stimuluje aktivitu PEPC a zvyšuje její stabilitu. Pravděpodobně jí také chrání před úplnou proteolysou. Kinetické studie s volným fosfátem se pokusily potvrdit navržený mechanismus regulace PEPC fosforylací. Získané údaje z kinetických studií defosforylované a fosforylované formy PEPC společně s výsledky měření kombinovaného vlivu několika regulátorů naznačují důvod, proč je PEPC uložena v semenech kukuřice ve fosforylovaném stavu. Byla nalezena metoda pro snadnou detekci volného fosfátu s vysokou citlivostí 0,1 mM.

Další práce by měla být namířena na identifikaci genu kódujícího PEPC v semenech kukuřice. První krok je již připraven ve formě enzymu přeneseného na PVDF membránu připraveného pro N-terminální sekvenaci. Také by měla být provedena další měření účinku volného fosfátu na molekulu PEPC. Vhodné by bylo využít infračervenou spektroskopii, která by potvrdila pohyb mobilní smyčky v důsledku kompetice mezi volným fosfátem a vázaným fosforylovaným serinem. Také by bylo velmi zajímavé pokusit se krystalizovat isoformu ze semen kukuřice v přítomnosti fosfátového pufru na místo síranu amonného, který byl použit v současných krystalografických studiích.[71]

Části této práce již byly prezentovány 31.1. 2007 v rámci XI. Pracovního setkání biochemiků a molekulárních biologů v Brně jako „Characterization of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Seeds of *Zea Mays*" Martin Černý, Helena Ryšlavá.

Této práci byl přidělen grant GAUK 2007: Charakterizace fosfoenolpyruvátkarboxylasy v semenech kukuřice (M. Černý, číslo projektu 80907)

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Pro názvy aminokyselin je užito standardní 1-písmenná či 3-písmenná nomenklatura.

Symboly a terminologie enzymové kinetiky je použita v souladu s doporučením NC-IUB (1983).[51]

a	- aktivita
ALT	- alaninaminotransferasa
AST	- aspartátaminotransferasa
AP	- alkalická fosfatasa
C_3 plant	- rostlina produkující 3-fosfoglycerát jako první krok asimilace CO_2
C_4 plant	- rostlina produkující oxaloacetát jako první krok asimilace CO_2
CA	- carbonátanhydrasa
CAM	- crassulacean acid metabolism
ClustalW	- metoda srovnávání sekvence DNA či proteinu
DEAE	- dietylaminoetyl
DTT	- dithiothreitol
EDTA	- kyselina ethylenediaminetetraoctová
G6P	- glukosa-6-fosfát
h	- Hillův koeficient
HEPES	- 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetanesulfonová kyselina
I_{50}	- koncentrace inhibitoru způsobující 50% pokles aktivity
k_{cat}	- katalytická konstanta
K_{ic}	- kompetitivní inhibiční konstanta inhibitoru
K_m	- Michaelis-Menten (Michaelis-Menten-Henry) konstanta
K_{iu}	- nekompetitivní inhibiční konstanta inhibitoru
MALDI	- matrix-assisted laser desorption/ionization
MALIC	- malic enzym, malátdehydrogenasa dekarboxylační
MDH	- malátdehydrogenasa
MS	- hmotnostní spektrometrie
MW	- molekulová hmotnost
OAA	- oxaloacetát
P	- fosfát
P2A	- proteinfosfatasa 2 A
PDB	- Protein Data Bank
PEP	- fosfoenolpyruvát
PEPC	- fosfoenolpyruvátkarboxylasa

PEPC-k	- fosfoenolpyruvátkarboxylasakinasa
PEPCK	- fosfoenolpyruvátkarboxykinasa
PKA	- proteinkinasa A
PPDK	- pyruvát, ortofosfátdikinasa
PVDF	- polyvinyliden fluorid
Rubisco	- ribulosa 1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
S_{50}	- konstanta poloviční nasycení
SDS	- dodecyl sulfát sodný
SDS-PAGE	- elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TEMED	- N,N,N',N'- tetrametyletylenediamin
Tris	- 2-amino-2-hydroxymetyl-1,3-propanediol
u	- 1 u je definována firmou Promega jako množství PKA potřebné pro zabudování 1 pmol fosfátu do molekuly kaseinu za minutu při 30°C
U	- 1 unit [U] = $\mu mol.min^{-1}$
v	- reakční rychlost
V_{max}	- maximální reakční rychlost
Volný fosfát	- fosfátový pufr pH 7,0

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Bandurski R & Ggreiner. CM (1953): *J Biol Chem, 204*, 781-6.

[2] Chollet R, Vidal J & O'Leary M (1996): *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 47*, 273-298.

[3] Izui K, Matsumura H, Furumoto T & Kai Y (2004): *Annu Rev Plant Biol, 55*, 69-84.

[4] Matsumura H, Izui K & Mizuguchi K (2006): *Protein Eng Des Sel, 19*, 409-19.

[5] *Protein Data Bank* (2007): http://www.pdb.org.

[6] Matsumura H, Terada M, Shirakata S, Inoue T, Yoshinaga T, Izui K & Kai Y (1999): *FEBS Lett, 458*, 93-6.

[7] Matsumura H, Xie Y, Shirakata S, Inoue T, Yoshinaga T, Ueno Y, Izui K & Kai Y (2002): *Structure, 10*, 1721-30.

[8] Tovar-Méndez A & Muñoz-Clares RA (2001): *Biochim Biophys Acta, 1546*, 242-52.

[9] Nelson D & Cox M (2004): *Lehninger Principles of Biochemistry 4th Edition*. WH Freeman.

[10] Šetlík, Seidlová, Šantrůček (unpublished): *Fyziologie rostlin - 5. Enzymové reakce fotosyntézy.*

.

[11] Lara M V, Chuong SDX, Akhani H, Andreo CS & Edwards GE (2006): *Plant Physiol, 142*, 673-84.

[12] Nimmo H G (2003): *Biochem Soc Trans, 31*, 728-30.

[13] Latzko E & Kelly J (1983): *Physiol. Veg., 21(5)*, 805-815.

[14] Nomura M, Mai HT, Fujii M, Hata S, Izui K & Tajima S (2006): *Plant Cell Physiol, 47*, 613-21.

[15] Buchanan B, Gruissem W & Jones R (2002): *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* . Wiley.

[16] Inclan R, Gimeno BS, Dizengremel P & Sanchez M (2005): *Environ Pollut, 137*, 517-24.

[17] Ryšlavá H, Müller K, Semorádová Š, Synková H, Čeřovská N (2003): *Photosynthetica, 41(3)*, 357-363.

[18] Matsumura H, Ogawa T, Furumoto T, Inoue T, Mihara Y, Izui K, Kai Y (2006): , , .

[19] Kai Y, Matsumura H & Izui K (2003): *Arch Biochem Biophys, 414*, 170-9.

[20] Ettema T J G, Makarova KS, Jellema GL, Gierman HJ, Koonin EV, Huynen MA, de Vos WM & van der Oost J (2004): *J Bacteriol, 186*, 7754-62.

[21] Ettema T J G, Makarova KS, Jellema GL, Gierman HJ, Koonin EV, Huynen MA, de Vos WM & van der Oost J (2004): *J Bacteriol, 186*, 7754-62.

[22] Dong L, Ermolova NV & Chollet R (2001): *Planta, 213*, 379-89.

[23] Maralihalli G & Bhagwat AS (2001): *Indian J Biochem Biophys, 38*, 361-7.

[24] Sanchez R, Flores A & Cejudo FJ (2006): *Planta, 223*, 901-9.

[25] Sanchez R & Cejudo FJ (2003): *Plant Physiol, 132*, 949-57.

[26] Nimmo H G (2003): *Arch Biochem Biophys, 414*, 189-96.

[27] Garcia-Maurino S, Monreal JA, Alvarez R, Vidal J & Echevarria C (2003): *Planta, 216*, 648-55.

[28] Agetsuma M, Furumoto T, Yanagisawa S & Izui K (2005): *Plant Cell Physiol, 46*, 389-98.

[29] Wang X, Jing X & Lin J (2005): *JIPB, 47 (4)*, 443–451.

[30] Öpik H & Rolfe S (2005): *The Physiology of Flowering Plants*. Cambridge.

[31] Pavlová L (2006): *Fyziologie rostlin*. Karolinum.

[32] Ryšlavá H (1989): *Kandidátksá disertační práce*. PřF UK.

[33] Blonde J D & Plaxton WC (2003): *J Biol Chem, 278*, 11867-73.

[34] Sangwan R, Singh N & Plaxton W (1992): *Plant Physiol, 99*, 445-449.

[35] Tripodi K E, Turner WL, Gennidakis S & Plaxton WC (2005): *Plant Physiol, 139*, 969-78.

[36] Osuna L, Pierre J, Gonzalez M, Alvarez R, Cejudo F, Echevarria C & Vidal J (1999): *Plant Physiol, 119*, 511-20.

[37] Gonzalez M C, Osuna L, Echevarria C, Vidal J & Cejudo FJ (1998): *Plant Physiol, 116*, 1249-58.

[38] Osuna L, Gonzalez M, Cejudo F, Vidal J & Echevarria C (1996): *Plant Physiol, 111*, 551-558.

[39] Golombek S, Heim U, Horstmann C, Wobus U & Weber H (1999): *Planta, 208*, 66-72.

[40] Aivalakis G, Dimou M, Flemetakis E, Plati F, Katinakis P & Drossopoulos JB (2004): *Plant Physiol Biochem, 42*, 181-6.

[41] Famiani F, Walker RP, Tecsi L, Chen ZH, Proietti P & Leegood RC (2000): *J Exp Bot, 51*, 675-83.

[42] Khayat E, Dumbroff EB & Glick BR (1991): *Biochem Cell Biol, 69*, 141-5.

[43] Sugimoto T, Kawasaki T, Kato T, Whittier RF, Shibata D & Kawamura Y (1992): *Plant Mol Biol, 20*, 743-7.

[44] Sebei K, Ouerghi Z, Kallel H & Boukhchina S (2006): *C R Biol, 329*, 719-25.

[45] *Protocol Online* (2007): http://www.protocol-online.org/.

[46] Leammli U (1970): *Nature, 227*, 680-685.

[47] Lee D & Lee C (2000): *PLANT SCIENCE, 159*, 75-85.

[48] Karn R, Kivic P & Hudock GA (1973): *Biochim Biophys Acta., 293*, 567-569.

[49] Terada K, Kai T, Okuno S, Fujisawa H, Izui K (1990): *FEB, 259 (2)*, 241-244.

[50] Copeland RA (2000): *ENZYMES A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Wiley-VCH, Inc..

[51] NC-IUB (1983): *Biochem J, 213*, 561-71.

[52] Metzler DE (2003): *Biochemistry:The Chemical Reactions of Living Cells*. Academic Press.

[53] Bradford M M (1976): *Anal Biochem, 72*, 248-54.

[54] *Maize Genetics and Genomics Database* (2007): http://www.maizegdb.org.

[55] Dong L Y, Masuda T, Kawamura T, Hata S & Izui K (1998): *Plant Cell Physiol, 39*, 865-73.

[56] Huber S & Edwards G (1975): *Plant Physiol, 56*, 324-331.

[57] *ProFound* (2007): http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe.

[58] Chinthapalli B, Murmu J & Raghavendra AS (2003): *J Exp Bot, 54*, 707-14.

[59] Špaldon E (1982): *Rastlinná výroba*. Bratislava: Priroda.

[60] Kai Y, Matsumura H, Inoue T, Terada K, Nagara Y, Yoshinaga T, Kihara A, Tsumura K & Izui K (1999): *Proc Natl Acad Sci U S A, 96*, 823-8.

[61] Takahashi-Terada A, Kotera M, Ohshima K, Furumoto T, Matsumura H, Kai Y & Izui K (2005): *J Biol Chem, 280*, 11798-806.

[62] McNaughton G A, Fewson CA, Wilkins MB & Nimmo HG (1989): *Biochem J, 261*, 349-55.

[63] Yuan J, Sayegh J, Mendez J, Sward L, Sanchez N, Sanchez S, Waldrop G & Grover S (2006): *Photosynth Res, 88*, 73-81.

[64] Jacob J, Prévot J, d'Auzac J (1983): *Physiol. Vég., 21*, 1013-1019.

[65] Kromer S, Gardestrom P & Samuelsson G (1996): *Biochim Biophys Acta, 1289*, 351-61.

[66] Doncaster H & Leegood R (1987): *Plant Physiol, 84*, 82-87.

[67] Usuda H & Shimogawara K (1992): *Plant Physiol, 99*, 1680-1685.

[68] Murmu J, Chinthapalli B & Raghavendra AS (2003): *J Exp Bot, 54*, 2661-8.

[69] Rolletschek H, Borisjuk L, Radchuk R, Miranda M, Heim U, Wobus U & Weber H (2004): *Plant Biotechnol J, 2*, 211-9.

[70] Li B & Chollet R (1994): *Arch Biochem Biophys, 314*, 247-54.

[71] Nixon P J, Barker M, Boehm M, de Vries R & Komenda J (2005): *J Exp Bot, 56*, 357-63.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka