

Charles University in Prague
Faculty of Science, Department of Biochemistry



**Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in tobacco plants
during potyviral infection**

**Regulace fosfoenolpyruvátkarboxylasy v rostlinách tabáku během
virové infekce**

Karel Müller

Supervisor: RNDr. Helena Ryšlavá CSc.

Prague, 2008

Table of contents / Obsah

Introduction.....	3
Aim of the work.....	4
Results and discussion	5
Isolation of PEPC from tobacco leaves	5
Characterization of tobacco PEPC.....	5
Regulation of tobacco PEPC during viral infection.....	7
Effect of cytokinins in tobacco leaves during stress	10
Úvod.....	11
Cíle práce	12
Výsledky a diskuze	12
Isolace PEPC z listů tabáku	12
Charakterizace PEPC z listů tabáku.....	12
Regulace PEPC v rostlinách tabáku infikovaných PVY ^{NTN}	14
Vliv cytokininů na průběh virové infekce v rostlinách tabáku	15
Citovaná literatura.....	17
Přehled publikací	18
Původní vědecké práce	18
Přednášky a postery	18

Introduction

Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC; EC 4.1.1.31) catalyzes the carboxylation of PEP to yield oxaloacetate and inorganic phosphate. It is one of the CO₂-fixing enzymes, HCO₃⁻ acts as substrate and the presence of a divalent metal ion is required (Chollet et al., 1996; Izui et al., 2004; Lepiniec et al., 1994). PEPC is widespread not only in all photosynthetic organisms such as plants, algae, cyanobacteria, and photosynthetic bacteria, but also in most non-photosynthetic bacteria and protozoa. PEPC plays a key photosynthetic role in primary CO₂ fixation by C₄ and CAM plant leaves (Andreo et al., 1987; Ernst and Westhoff, 1997; Kawamura et al., 1990; Nimmo, 2000). In addition, PEPC produces oxaloacetate and malate that replenish the intermediates of the citric acid cycle and provides carbon skeletons to support nitrogen assimilation. PEPC is also involved in regulating the pH of cells (Huppe and Turpin, 1994; Latzko and Kelly, 1983; Miyao and Fukayama, 2003; Vance et al., 1994).

PEPC is usually composed of four identical subunits with molecular weight of about 95-110 kDa. Most PEPCs are allosteric enzymes and there exists a wide variety of allosteric effectors depending on the organism. Vascular plant PEPCs are typically inhibited by L-malate and activated by D-glucose-6-phosphate. In addition, L-aspartic and L-glutamic acids are allosteric inhibitors of PEPCs in plant tissues active in nitrogen assimilation and / or transamination reactions (Blonde and Plaxton, 2003). Vascular plant PEPCs are regulated by reversible phosphorylation of the conserved serine located near N terminus (Chollet et al., 1996). After the discovery, specific phosphoenolpyruvate carboxylase kinase (PPCK) was cloned and characterized for several plant species. Plants contain a *PPCK* gene family: *A. thaliana* has two *PPCK* genes, soybean at least three, and tomato at least two (Nimmo, 2003; Sullivan et al., 2004). Light and nitrate treatment favor the stimulation of PPCK activity *in vivo* in wheat leaves (Duff and Chollet, 1995).

Environmental stresses have also been shown to induce PEPC activity. Induction of PEPC expression by salt stress was documented in facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*, it is part of the switch from C₃ to CAM photosynthesis (Cushman and Bohnert, 1999). PEPC is less studied in C₃ plants. LiCl and NaCl induced expression of the PEPC in roots of wheat. Other types of stress affecting the water balance such as drought and cold also had a positive effect on the level of PEPC in various plants (Fedina and Popova, 1996; Gonzalez et al., 2003). Low oxygen stress induced an increase of PEPC activity in roots and etiolated leaves in rice seedlings (Moons et al., 1998). Another study was performed on *Pinus halepensis* exposed to ozone and drought. No change in PEPC activity was found during drought but ozone stress induced a dramatic increase of PEPC activity in pine needles (Fontaine et al., 2003). Increased

activity of PEPC was found in cucumber plants grown in the absence of Fe (De Nisi and Zocchi, 2000).

Aim of the work

Following aims were set to characterize and discuss the role and regulation of PEPC in tobacco during biotic stress caused by potyviral infection:

- Isolation and characterization of PEPC from tobacco leaves.
- Study of phosphorylation of tobacco leaf PEPC and the effect of phosphorylation on kinetic parameters.
- Study of the role of PEPC and related enzymes during potyviral infection in tobacco plants.
- Regulation of PEPC on transcriptional, translational and post-translational level during PVY^{NTN} infection.
- Study of the effect of enhanced level of endogenous cytokinins in tobacco plants during biotic stress.

Results and discussion

Isolation of PEPC from tobacco leaves

Phosphoenolpyruvate carboxylase was partially purified from tobacco leaves collected from 8-10 weeks old plants. Ammonium sulphate fractionation, ionex chromatography on DEAE cellulose, gel chromatography on Sephadex G200 and hydroxyapatite chromatography were the main steps of isolation. PEPC was purified to the final specific activity 0.8 U/mg. This low value corresponds to other reports on PEPC isolated from C₃ plant (e.g. 0.137 U/mg from *Cicer arietinum*, Singhal and Singh, 1986).

Characterization of tobacco PEPC

In vitro phosphorylation and dephosphorylation of PEPC

Phosphorylation of serine residue near N terminus of plant type PEPC plays an important role in activity regulation (Chollet et al., 1996). *In vivo* PEPC is phosphorylated by specific PEPC kinase and dephosphorylated by a protein phosphatase type 2A.

PEPC activity during the phosphatase treatment was monitored. Phosphatase inhibitors were added into control reaction. While no change in PEPC activity was estimated in the control reaction, dephosphorylation caused 40% decrease of PEPC activity after 4 hours. The enzyme becomes probably completely dephosphorylated.

Effect of protein kinase A (catalytic subunit) on PEPC activity at the presence of ATP was studied. No change in PEPC activity was visible during the whole experiment. Tobacco PEPC probably is not substrate of protein kinase used in our experiment, contrary to PEPC isolated from maize seeds as showed by Černý (2007).

Substrate affinity of tobacco PEPC

The kinetics of saturation of native and dephosphorylated PEPC isolated from tobacco leaves by PEP was studied. The measurements were carried out at optimal pH 8.1 and sub-optimal pH 7.3. In both cases reaction showed hyperbolic character described by Michaelis-Menten equation. Values of V_{max} and K_m are shown in Table 1.

	pH 7.3		pH 8.1	
	V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$]	K_m [mM]
native	0.5	0.45	0.8	0.25
dephosphorylated	0.37	0.47	0.45	0.21

Low value of K_m and thus high affinity to the substrate correspond to non-photosynthetic PEPC isoform (Svensson et al., 2003). On the contrary, C_4 photosynthetic isoform usually showed lower affinity to substrate (e.g. maize PEPC K_m 1.1 mM and 8.7 mM at pH 8.1 and 7.3, respectively; Frank et al., 1999).

Effect of L-malate on PEPC reaction rate

Effect of L-malate on dependence of reaction rate of native and dephosphorylated PEPC on substrate concentration was studied. The sensitivity to malate was affected by pH and concentration of PEP. L-malate caused decrease of tobacco PEPC activity at both optimal and sub-optimal pH conditions; however, the higher effect was monitored at pH 7.3. Data best fitted into equation of mixed inhibition:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{IC}}\right) + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{IU}}\right)}$$

Values of inhibition constants obtained by non-linear regression are shown in Table 2. No difference in malate sensitivity was found between native and dephosphorylated tobacco PEPC.

Table 2: Values of inhibition constants describing malate inhibition of tobacco PEPC.		
	K_{IU} [mM]	K_{IC} [mM]
native	1.3	0.2
dephosphorylated	1.7	0.5

Sensitivity of native and dephosphorylated tobacco PEPC to malate inhibition was similar. This was surprising result, because previous studies, although performed mostly on C_4 forms, showed higher sensitivity to malate in case of dephosphorylated PEPC (Tovar-Mendez et al., 2000; Černý, 2007). More detailed studies on other C_3 plants need to be done to confirm, if this behavior is common for C_3 PEPC.

Effect of L-aspartate on PEPC reaction rate

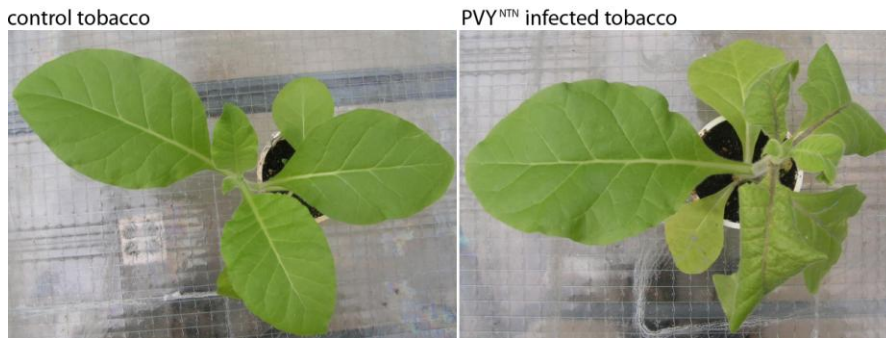
Aspartate was shown to be very weak inhibitor of tobacco PEPC; 2 mM aspartate caused 10% and 5% decrease of reaction rate of native and dephosphorylated PEPC, respectively. Inhibition constants calculated by non-linear regression indicated, that the inhibition corresponds to competitive one (native: $K_{IC} = 3$ mM, dephosphorylated: $K_{IC} = 10$ mM).

Effect of D-glucose-6-phosphate on PEPC reaction rate

The reaction rate of PEPC isolated from tobacco leaves increased at the presence of glucose-6-phosphate. Activating effect was higher with sub-optimal pH and lower concentration of PEP. 1 mM concentration of glucose-6-P caused nearly 100% increase of native PEPC reaction rate at pH 7.3. The sensitivity of dephosphorylated enzyme to glucose-6-P was lower. 1 mM concentration of glucose-6-P caused 40% increase of dephosphorylated PEPC reaction rate at pH 7.3.

Regulation of tobacco PEPC during viral infection

Several independent experiments were performed to study PEPC activity, its regulation and activity of enzymes functionally related to PEPC during potyviral infection in tobacco plants. In more detailed studies, PVY^{NTN} was chosen as source of biotic stress for its significant impact on infected plants.



The time course of viral infection of tobacco plants was monitored by immunochemical semi-quantitative method (ELISA) and by relative quantification of viral RNA in infected tobacco leaves.

Activity of PEPC during potyviral infection

The activity of PEPC was 2-3-fold elevated during PVY^{NTN} infection. In contrast to PVY^{NTN}, PVA infection affected enzyme activity insignificantly (Figure 1).

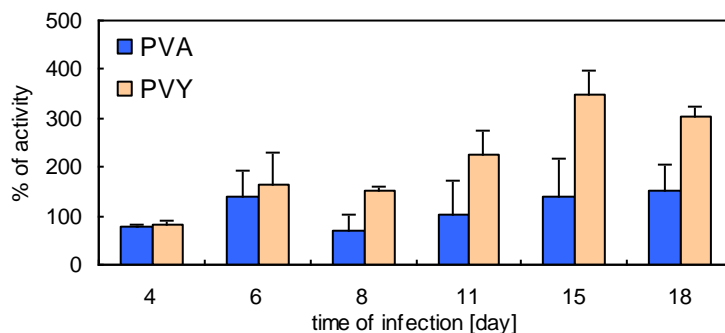


Figure 1: Activity of PEPC in tobacco leaves 4–18 days after inoculation by PVA and PVY^{NTN} calculated in percent per fresh weight. 100% corresponds to 0.1 U/g.

Increased PEPC activity in plants under stress condition was previously reported in case of abiotic stress (Thomas et al., 1992; Moons et al., 1998; Gonzales et al., 2003). We proved that biotic stress also affected PEPC activity; however, the mechanism of regulation still had to be determined.

PEPC protein and mRNA levels during potyviral infection

The amount of PEPC protein in tobacco leaves was determined by Western blot analysis using anti-PEPC antibodies. No significant change in PEPC protein amount was detected in PVY^{NTN} infected tobacco leaves compared to healthy control (Figure 2A).

Amount of PEPC mRNA was measured in tobacco leaves by real-time RT PCR. *Actin9* was used as reference gene. Figure 2B shows ratio of PEPC/*actin9* mRNA. No significant change in PEPC transcription was detected in infected tobacco leaves 17 days after virus inoculation (Figure 2B).

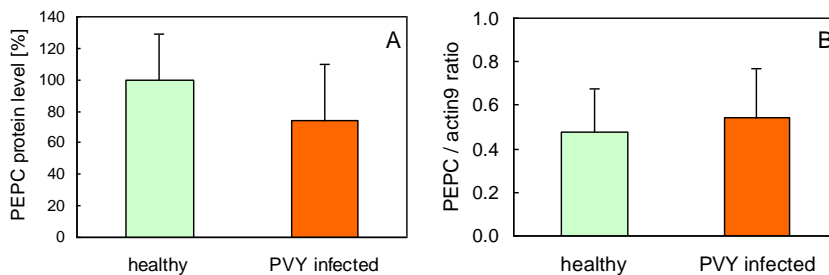


Figure 2: Amount of PEPC protein (A) and mRNA (B) in and infected tobacco leaves collected 17 days after PVY^{NTN} inoculation.

Changes in PEPC phosphorylation during PVY^{NTN} infection

As there were no changes in PEPC expression, we studied the post-translational modification of PEPC protein. Phosphorylation of serine residue near N terminus of plant type PEPC plays important role in its activity regulation (Chollet et al., 1996). The PEPC, from extracts of control and infected leaves collected 17th day after virus inoculation, was treated by alkaline phosphatase and decreasing PEPC activity was monitored. PEPC activity in the dephosphorylated control sample was 60% when compared to native form. The difference was more evident in PVY^{NTN} infected samples where the value of dephosphorylated PEPC activity was 40% compared to native form (Figure 3A).

Concentration of free phosphate was measured in leaf extracts. Concentration of phosphate in dephosphorylated extracts from healthy tobacco leaves was 145% compared to non-treated extracts. Higher phosphate concentration (185%) was detected in dephosphorylated PVY^{NTN} samples.

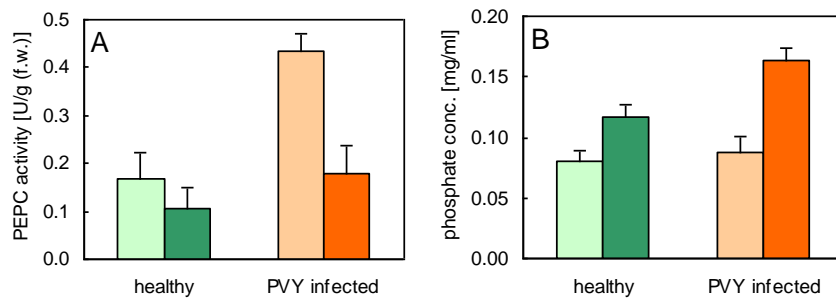


Figure 3: PEPC from tobacco leaves was dephosphorylated by alkaline phosphatase. A) Difference of PEPC activity between native (light colours) and dephosphorylated (dark colours) PEPC in control and PVY^{NTN} infected tobacco leaves. B) Concentration of free phosphate in native (light colours) and phosphatase treated (dark colours) extracts from healthy and PVY^{NTN} tobacco leaves.

Immunochemical detection of phosphoproteins was carried out using anti-phosphoamino acids. Higher intensity of band corresponding to PEPC was monitored in PVY^{NTN} infected sample in comparison with healthy control.

Higher expression of PEPC during stress conditions is more often described mechanism of regulation of PEPC activity (Thomas et al., 1992; Gonzales et al., 2003). Fontaine et al. (2003) reports possible post-translational regulation of PEPC in *Pinus halepensis* exposed to ozone. We proved that PEPC in infected leaves was more phosphorylated and thus the phosphorylation is responsible for higher PEPC activity in infected plants. Translational apparatus of the infected plant is used for the production of defense proteins and competes with the virus tendency to multiply itself in the host cells, thus post-translational changes may play more important regulatory role. However, the way to induce the phosphorylation of PEPC used by plant cells still remains to be elucidated.

Activities of NADP-ME and PPDK during potyviral infection

The activities of enzymes biochemically related to PEPC (NADP dependent malic enzyme and pyruvate, phosphate dikinase) were studied in tobacco leaves during potyviral infection. PVY^{NTN} infection caused an increase in activity of both enzymes; the most sensitive was NADP-ME with 6-fold higher activity compared to healthy control. The activity PPDK was 2-3-fold elevated.

Effect of cytokinins in tobacco leaves during stress

Transgenic plants over-expressing bacterial gene coding for isopentenyl transferase (*ipt*), a key enzyme of cytokinin biosynthesis, were used for study of the effect of cytokinins on tobacco response to the biotic stress. The *ipt* transgenic tobacco plants had increased concentration of endogenous cytokinins. Four types of plants were used for our experiments: control tobacco (*N. tabacum* L., cv. Petit Havana SR1) from seeds (SR1) or grafted onto the control rootstock (SRG); *ipt* transgenic shoots grafted on control rootstock (G) and autogamic progeny of the transgenic grafts, which are able to form a small root system (SE).

Effect of cytokinins on Rubisco activity during PVY^{NTN} infection was studied. Healthy SR1 plants exhibited the highest Rubisco activity compared to other plant types. SRG and SE plants exhibited more than 70% reduction in Rubisco activity as compared with SR1 plants. Even lower activity was detected in samples from G. PVY infection caused the most significant decline in SR1 (ca. 20% of healthy control), while 0 or only 10 - 15% activity reduction in G and SRG + SE plants, respectively, was observed after infection.

Effect of PVY^{NTN} infection on PEPC, NADP-ME and PPDK activities were studied in control (SR1) and *ipt* transgenic rooted tobacco plants (SE). Activities of all three enzymes were increased during infection in wild-type and transgenic plants, however transgenic tobacco plants embodied 5-7 days long delay in elevation of enzyme activities.

What could be the meaning of induced PEPC activity in tobacco leaves during virus infection? We propose these possibilities:

- i. Replenishing intermediates of citrate cycle depleted by proteosynthesis.
- ii. PEPC together with NADP-ME and PPDK form reaction cycle which converts NADH to NADPH at the cost of ATP. NADPH is utilized in biosynthetic pathways and as a substrate for several antioxidant and detoxification enzymes.
- iii. Plants in our experiments closed their stomata and had lower photosynthetic activity during potyviral infection. PEPC can refix CO₂ released by respiration and photorespiration. The drop of inbound CO₂ could be compensated by its more effective disposal, which PEPC can provide.

Úvod

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (PEPC; EC 4.1.3.31) katalyzuje karboxylaci fosfoenolpyruvátu za vzniku oxaloacetátu a fosfátového aniontu. Patří k enzymům fixujícím CO₂; bikarbonát slouží jako substrát a pro průběh reakce je nutná přítomnost kationtu Mg²⁺ (Lepiniec a kol., 1994; Chollet a kol., 1996; Izui a kol., 2004). PEPC se vyskytuje ve všech fotosyntetizujících organizmech (rostliny, řasy, sinice a fotosyntetizující bakterie) ale též ve většině nefotosyntetizujících bakterií a prvocích. PEPC hraje klíčovou úlohu v primární fixaci CO₂ v listech rostlin s C₄ a CAM metabolismem (Andreo a kol., 1987; Kawamura a kol., 1990; Ernst a Westhoff, 1997; Nimmo, 2000). Oxaloacetát a po redukcí malát je využit pro doplnění intermediátů citrátového cyklu a též jako uhlíkových skeletů nutných pro fixaci dusíku a metabolismu aminokyselin. PEPC také působí v regulaci pH buněk (Latzko a Kelly, 1983; Huppe a Thurpin, 1994; Vance a kol., 1994; Miyao a Fukayama, 2003).

PEPC se skládá ze čtyř identických podjednotek o relativní molekulové hmotnosti 95-110 kDa. Většina PEPC patří k alosterickým enzymům, dosud bylo identifikováno mnoho alosterických efektorů. Rostlinné PEPC jsou inhibovány malátem a aktivovány glukosa-6-fosfátem (Blonde a Plaxton, 2003). Významný prvek regulace rostlinné PEPC je reverzibilní fosforylace serinového zbytku nacházejícím se poblíž N-konce proteinu (Chollet a kol., 1996). Fosforylaci katalyzuje specifická PEPC kinasa, která byla popsána pro několik rostlinných druhů, zejména však rostlin s C₄ typem metabolismu. Je to nejmenší známá protein kinasa a její aktivita v buňkách je regulována především syntézou *de-novo*; podnětem syntézy je například světlo (Duff a Chollet, 1995).

Nedávno byl prokázán vliv stresu na aktivitu PEPC. Zvýšená exprese PEPC vlivem solného stresu byla popsána v rostlinách *Mesembryanthemum crystallinum*, rostliny s fakultativním CAM typem metabolismu. V tomto případě dochází vlivem stresu k přechodu z C₃ na CAM metabolismus (Cushman a Bohnert, 1999). I další typy stresu souvisejících s vodní rovnováhou vedly ke zvýšené aktivitě PEPC, a to v několika rostlinných druzích (Fedina a Popova, 1996; Gonzalez a kol., 2003). Nedostatek kyslíku podnítl zvýšení PEPC aktivity v sazenicích rýže (Moons a kol., 1998). V jehlicích smrku byla vlivem ozonu zjištěna vedle zvýšené aktivity PEPC také její zvýšená fosforylace (Fontaine a kol., 2003).

Cíle práce

Cílem předkládané práce je zjistit význam PEPC pro rostliny tabáku za podmínek biotického stresu způsobeném virovou infekcí. Práce byla rozdělena do následujících částí.

- Příprava purifikovaného preparátu PEPC z listů tabáku a stanovení kinetických parametrů a vliv regulátorů pro fosforylovanou a defosforylovanou formu PEPC.
- Stanovení aktivity PEPC a metabolicky souvisejících enzymů v průběhu infekce potyvíry.
- Studium PEPC v listech tabáku na transkripční, translační a posttranslační úrovni během infekce PVY^{NTN}.
- Stanovení aktivity PEPC a metabolicky souvisejících enzymů v transgenních rostlinách tabáku se zvýšeným obsahem endogenních cytokininů v průběhu infekce PVY^{NTN}.

Výsledky a diskuze

Isolace PEPC z listů tabáku

Fosfoenolpyruvátcarboxylasa byla izolována z listů 8-10 týdnů starých rostlin tabáku. Purifikační kroky zahrnovaly: srážení síranem amonným, ionexovou chromatografií na DEAE celulosovém nosiči, gelovou chromatografií na nosiči Sephadex G200 a chromatografií na hydroxyapatitovém nosiči. Výsledná specifická aktivita takto purifikovaného enzymu byla 0,8 U/mg. Tato nízká hodnota odpovídá izolacím z C₃ rostlin (například 0,14 U/mg z *Cicer arietium*, Singhal a Singh, 1986).

Charakterizace PEPC z listů tabáku

Fosforylace serinového zbytku poblíž N-konce PEPC proteinu je důležitým prvkem v regulaci aktivity enzymu (Chollet a kol., 1996). *In vivo* je PEPC fosforylována specifickou PEPC kinasou a defosforylována protein fosfatasou 2A.

Sledovali jsme změnu aktivity PEPC během reakce s alkalickou fosfatasou. Inhibitory fosfatas byly přítomny v kontrolní reakci; žádná změna PEPC aktivity nebyla v této kontrolní reakci pozorována. Oproti tomu defosforylační reakce vykazovala zřetelný pokles aktivity PEPC a to až 40% po 4 hodinách reakce. Delší čas reakce ani zvýšené množství fosfatasy již nezpůsobilo žádný další pokles aktivity, předpokládáme tedy, že PEPC již byla plně defosforylována.

Sledovali jsme též vliv protein kinasy A (katalytické podjednotky) na aktivitu PEPC v přítomnosti ATP a Mg²⁺ iontů. Žádný vliv na aktivitu PEPC nebyl patrný a to i při použití již předem defosforylovaného enzymu. Domníváme se, že PEPC z tabáku není substrátem použité protein kinasy. Oproti tomu PEPC izolována ze semen kukuřice je za stejných podmínek

substrátem protein kinasy A; aktivita předem defosforylovaného enzymu v tomto případě po působení kinasy vzrostla na původní hodnotu (Černý, 2007).

Kinetika saturace substrátem PEP byla studována pro nativní i defosforylovanou formu PEPC tabáku. Měření byla provedena při optimálním pH 8,1 a sub-optimálním pH 7,3. V obou případech vykazovala závislost počáteční reakční rychlosti na koncentraci substrátu klasický hyperbolický průběh popsany rovnicí Michaelis-Mentenové. Hodnoty V_{max} a K_m jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Hodnoty V_{max} a K_m nativní a defosforylované formy PEPC izolované z listů tabáku.				
	pH 7.3		pH 8.1	
	V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$]	K_m [mM]
nativní	0.50	0.45	0.80	0.25
defosforylovaná	0.37	0.47	0.45	0.21

Nižší hodnota Michaelisovy konstanty a tedy vysoká afinita k substrátu odpovídá nefotosyntetické PEPC isoformě (Svensson a kol., 2003). C_4 fotosyntetické formy PEPC obvykle vykazují nižší afinitu k substrátu, například Michaelisova konstanta PEPC z kukuřice 1,1 mM při pH 8,1 a 8,7 mM při pH 7,3.

Byl studován vliv malátu na závislost reakční rychlost nativní a defosforylované PEPC na koncentraci substrátu fosfoenolpyruvátu. Malát inhiboval aktivitu PEPC, a to jak při optimálním pH 8,1, tak i při pH 7,3, avšak výraznější inhibice byla prokázána v případě sub-optimálního pH. Naměřená data byla proložena křivkou definovanou rovnicí rovnicí smíšené inhibice:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{IC}}\right) + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{IU}}\right)}$$

Hodnoty inhibičních konstant byly vypočteny nelineární regresí a jsou zobrazeny v tabulce 3. Nebyl pozorován rozdíl v citlivosti k inhibici malátem mezi nativní a defosforylovanou formou PEPC.

Tabulka 3: Hodnoty inhibičních konstant charakterizujících inhibici PEPC malátem.		
	K_{IU} [mM]	K_{IC} [mM]
nativní	1.3	0.2
defosforylovaná	1.7	0.5

Stejná citlivost nativní a defosforylované formy PEPC k inhibici malátem nebyla dosud pro PEPC z jiných rostlinných druhů zjištěna. Vyšší citlivost defosforylované formy PEPC k inhibici malátem byla naměřena například pro PEPC z listů a semen kukuřice (Tovar-Mendez a kol., 2000; Černý, 2007). Avšak pro PEPC z C_3 rostlin nejsou v literatuře k dispozici žádné detailní kinetické studie.

Dále jsme sledovali vliv L-aspartátu na reakční rychlost PEPC. Aspartát působil jako slabý inhibitor PEPC; 2 mM aspartát vedl k 10% a 5% poklesu reakční rychlosti nativní a defosforylované PEPC. Inhibice odpovídala typu kompetitivní s hodnotou $K_{IC} = 3$ mM (nativní PEPC) a $K_{IC} = 10$ mM (defosforylovaná PEPC).

Reakční rychlost PEPC tabáku vzrostla v přítomnosti glukosa-6-fosfátu. Vyšší aktivaci jsme pozorovali při sub-optimálním pH a nižší koncentraci substrátu PEP. 1 mM koncentrace glukosa-6-P způsobila zvýšení reakční rychlosti PEPC o 100%. Nižší aktivaci jsme pozorovali v případě defosforylovaného enzymu; 1 mM glukosa-6-P vedla pouze ke 40% zvýšení reakční rychlosti.

Regulace PEPC v rostlinách tabáku infikovaných PVY^{NTN}

Aktivita PEPC a regulace její aktivity byla studována v rostlinách tabáku infikovaných potyviry. Přítomnost viru v rostlině byla prokázána metodou ELISA a relativní kvantifikací PCR v reálném čase. Vlivem infekce PVY^{NTN} se aktivita PEPC zvýšila 2-3 krát. Oproti tomu, vliv PVA infekce na zvýšení aktivity PEPC byl neprůkazný (Figure 1). Zvýšení aktivity PEPC v rostlinách bylo dříve zjištěno i za podmínek abiotického stresu (Thomas a kol., 1992; Moons a kol., 1998; Gonzales a kol., 2003).

V dalších experimentech jsme sledovali, zda zvýšení aktivity PEPC v rostlinách tabáku vlivem infekce PVY^{NTN} je provázeno rovněž zvýšenou transkripcí a translací PEPC. Množství proteinu PEPC bylo detekováno imunochemicky použitím specifických protilátek. Množství mRNA pro PEPC bylo sledováno použitím reversní transkripce s následnou kvantifikační real-time PCR. Ani jednou z použitých metod nebyl zjištěn podstatný rozdíl mezi zdravými a PVY^{NTN} infikovanými rostlinami tabáku (Figure 2). Další možností regulace aktivity PEPC je rozdíl v posttranslační modifikaci PEPC fosforylací.

Fosforylace PEPC je v rostlinách důležitým regulačním prvkem aktivity tohoto enzymu (Chollet a kol., 1996). Fosforylovaný enzym se od defosforylované formy může lišit v řadě

vlastností (Izui a kol., 2003). V případě PEPC tabáku je významný rozdíl v aktivitě mezi oběma formami. Pro sledování míry fosforylace PEPC v rostlinách jsme použili tři různé přístupy.

1) Rozdíl v poklesu aktivity po působení alkalické fosfatasy. Větší pokles nastal v případě vzorků z infikovaných listů tabáku (Figure 3A).

2) Byla změřena koncentrace volného fosfátu v extraktech z listů tabáku a v extraktech ošetřených alkalickou fosfatasou. Touto metodou jsme detekovali větší množství fosfátu uvolněného fosfatasou ve vzorcích z infikovaných rostlin (Figure 3B).

3) Imunochemická detekce fosfoproteinů pomocí specifických anti-fosfoaminokyselinových protilátek ukázala silnější proužek odpovídající PEPC proteinu v případě infikovaných rostlin.

Všechny tyto přístupy ukazují na zvýšenou fosforylaci PEPC v listech tabáku infikovaných PVY^{NTN}. Jelikož exprese PEPC zůstává vlivem infekce nezměněna, je vyšší aktivita zřejmě zapříčiněna vyšší fosforylací proteinu PEPC. Ačkoliv je v literatuře častěji popsána vyšší exprese PEPC vlivem stresu (Thomas a kol., 1992; Gonzales a kol., 2003), existují i studie v nichž je prokázána modifikace na úrovni posttranslační. Například Fontaine a kol. (2003) tento jev pozoroval v jehlicích smrku v přítomnosti vysoké koncentrace ozonu.

V případě virové infekce, kdy je proteosyntetický aparát buněk využíván pro syntézu obranných proteinů ale též pro produkci nových virionů, je posttranslační modifikace s následným zvýšením aktivity enzymu pravděpodobně pro rostlinu výhodným. Fosforylace PEPC je v rostlinách katalyzována specifickou PEPC kinasou (Chollet a kol., 1996). Avšak způsob jakým dochází k indukci fosforylace v průběhu virové infekce teprve čeká na své objasnění.

Aktivity NADP-malátdehydrogenasy, dekarboxylační (NADP-ME) a pyruvát, fosfát dikinasy (PPDK), enzymů biochemicky spřízněných s PEPC, byly též sledovány v průběhu virové infekce. Vlivem infekce PVY^{NTN} byly aktivity obou enzymů zvýšeny, a to až šestkrát v případě NADP-ME a dvou až třikrát v případě PPDK, v porovnání s kontrolními rostlinami.

Vliv cytokininů na průběh virové infekce v rostlinách tabáku

Ve studii vlivu cytokininů na průběh virové infekce byly použity rostliny tabáku se zvýšenou expresí isopentenyltransferasy (*ipt*), klíčovým enzymem biosyntézy cytokininů. Tyto transgenní rostliny vykazovaly zvýšené množství endogenních cytokininů. Byly použity následující typy rostlin: kontrolní pravokořenné, kontrolní roubované, transgenní roubované a transgenní se schopností vytvářet drobný kořenový systém.

V prvních pokusech byla měřena aktivita ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasy/oxygenasy (Rubisco) v průběhu infekce PVY^{NTN} ve všech typech rostlin. Nejvyšší aktivitu Rubisco vykazovaly kontrolní pravokořenné rostliny, avšak vlivem infekce byla aktivita snížena o 80%. Roubované rostliny a rostliny transgenní s kořenovým systémem vykazovaly o 70% nižší aktivitu Rubisco než kontrolní tabáky. Virová infekce však měla v těchto rostlinách vliv na aktivitu Rubisco nepatrný, jen 10-15% pokles v aktivitě byl pozorován v infikovaných listech v porovnání se zdravými.

Dále byly sledovány aktivity PEPC, NADP-ME a PPK v průběhu virové infekce v kontrolních a transgenních kořenových rostlin tabáku. Aktivity všech tří enzymů byly zvýšeny v obou případech, avšak zajímavý byl rozdíl v počátku nárůstu enzymových aktivit. Transgenní rostliny vykazovaly zpožděný nárůst aktivit o 5-7 dní. To pravděpodobně souvisí se zvýšenou resistencí *ipt* transgenních rostlin tabáku k virové infekci. Podobný vliv cytokininů na průběh biotického stresu byl publikován v práci Pogány a kol. (2004).

Jaký význam může mít zvýšená aktivita PEPC pro rostlinu v průběhu virové infekce? Nabízejí se následující možnosti:

- i. PEPC doplňuje intermediáty citrátového cyklu spotřebované zvýšenou proteosyntézou.
- ii. Zvýšené množství malátu a zvýšená aktivita NADP-ME vede k produkci redukčních ekvivalentů NADPH využitelných pro biosyntetické účely a jako substrát některých antioxidantních enzymů.
- iii. Rostliny v našich experimentech měly vlivem virové infekce zavřené průduchy a sníženou fotosyntetickou aktivitu. Pomocí PEPC se může refixovat CO₂ uvolněný respirací a fotorespirací. Toto efektivnější CO₂ by mohlo kompenzovat jeho limitující přísun.

Citovaná literatura

- Andreo C.S., Gonzalez D.H., Iglesias A.A., FEBS Lett. 213 (1987) 1-8.
- Blonde J.D., Plaxton W.C., J. Biol. Chem. 278 (2003) 11867-11873.
- Černý M., Diploma thesis, Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of biochemistry (2007).
- Chollet R., Vidal J., O'Leary M.H., Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47 (1996) 273-298.
- Cushman J.C., Bohnert H.J., Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50 (1999) 305-332.
- Duff S.M.G., Chollet R., Plant Physiol. 107 (1995) 775-782.
- De Nisi P., Zocchi G., J. Exp. Bot. 51 (2000) 1903-1909.
- Ernst K., Westhoff P., Plant Mol. Biol. 34 (1997) 427-443.
- Fedina I.S., Popova A.V., Photosynthetica 32 (1996) 213-220.
- Fontaine V., Cabané M., Dizengremel P., Physiol. Plantarum 117 (2003) 445-452.
- Frank J., Vater J., Holzwarth J.F., Phys. Chem. Chem. Phys. 1 (1999) 455-461
- González M.C., Sánchez R., Cejudo F.J., Planta 216 (2003) 985-992.
- Huppe H.C., Turpin D.H., Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 30 (1994) 577-607.
- Izui K., Matsumura H., Furumoto T., Kai Y., Annu. Rev. Plant Biol. 55 (2004) 59-84.
- Kawamura T., Shigesada K., Yanagisawa S., Izui K., J. Biochem. 107 (1990) 165-168.
- Latzko E., Kelly G.J., Phys. Veg. 21 (1983) 805-815.
- Lee D.H., Lee C.B., Plant Sci. 159 (2000) 75-85.
- Lepiniec L., Vidal J., Chollet R., Gadal P., Crépin C., Plant Sci. 99 (1994) 111-124.
- Miyao M., Fukayama H., Arch. Biochem. Biophys. 414 (2003) 197-203.
- Moons A., Valcke R., Montagu M.V., Plant J, 15 (1998) 89-98.
- Nimmo H.G., Trends Plant Sci. 5 (2000) 75-80.
- Nimmo H.G., Arch. Biochem. Biophys. 414 (2003) 189-196.
- Pogany M., Koehl J., Heiser I., Elstner E.F., Barna B., Physiol. Mol. Plant Pathol. 65 (2004) 39-47
- Singal H.R., Singh R., Plant Physiol. 80 (1986) 369-373
- Sullivan S., Jenkins G.I., Nimmo H.G., Plant Physiol. 135 (2004) 2078-2087.
- Svensson P., Blassing O.E., Westhoff P., Arch. Biochem. Biophys. 414 (2003) 180-188.
- Rahoutei J., Garcia-Luque I., Baron M., Physiol. Plant. 110 (2000) 286-292.
- Thomas J.C., Dearmond R.L., Bohnert H.J., Plant Physiol. 98, 626-631 (1992).
- Tovar-Mendez A., Mujica-Jimenez C., Munoz-Clares R.A., Plant Physiol. 123 (2000) 149-160
- Vance C.P., Gregerson R.G., Robinson D.L., Miller S.S., Gantt J.S., Plant Sci. 101 (1994) 51-64.

Přehled publikací

Původní vědecké práce

1. Ryšlavá H., **Müller K.**, Semorádová Š., Synková H., Čeřovská N. Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by Potato virus A and Potato virus Y. *Photosynthetica* **41**, 357-363 (2003).
2. Synková H., Semorádová Š., Schnablová R., **Müller K.**, Pospíšilová J., Ryšlavá H., Malbeck J., Čeřovská N. Effects of biotic stress caused by Potato virus Y on photosynthesis in ipt transgenic and control *Nicotiana tabacum* L. *Plant Sci.* **171**, 607-616 (2006).
3. Ryšlavá H., Doubnerová V., **Müller K.**, Baťková P., Schnablová R., Liberda J., Synková H., Čeřovská N. The enzyme kinetics of the NADP-malic enzyme from tobacco leaves. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **72**, 1420-1434 (2007).
4. Doubnerová V., Jirásková A., Janošková M., **Müller K.**, Baťková P., Synková H., Čeřovská N., Ryšlavá H. The activity and isoforms of NADP-malic enzyme in *Nicotiana benthamiana* plants under biotic stress. *Gen. Physiol. Biophys.* **26**, 281-289 (2007).
5. **Müller K.**, Doubnerová V., Synková H., Čeřovská N., Ryšlavá H. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in PVYNTN infected tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* Submitted.

Přednášky a postery

-Ryšlavá H., **Müller K.**, Čeřovská N. Influence of biotic stress on metabolic enzymes activities in leaves of tobacco plants. *Zborník XVIII. Biochemického zjazdu S2.34* (2002)

-**Müller K.**, Doubnerová V., Ryšlavá H.: Studium NADP- malátdehydrogenasy (dekarboxylační) v rostlinách tabáku infikovaných viry bramboru. 3. metodické dny - *Methods in Plant Sciences, Žďárské vrchy - Milovy* (2003).

-Ryšlavá H., **Müller K.**, Doubnerová V., Synková H., Čeřovská N.: Influence of potyviral infection on metabolic enzymes activity in leaves of tobacco plants. *Recent Advances in Plant Biotechnology*, str. 119, Stará Lesná, Slovensko (2003).

-Synková H., Semorádová Š., **Müller K.**, Ryšlavá H., Burketová L., Čeřovská N. How genetic transformation and high cytokinin content affects plant resistance to viral infection. *Recent Advances in Plant Biotechnology*, str.120, Stará Lesná, Slovensko (2003)

-**Müller K.**, Ryšlavá H., Synková H., Pechová R., Doubnerová V., Čeřovská N. Biotic stress caused by potyviral infection – effects on anaplerotic metabolic pathways in tobacco. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis*, page 142, (2004)

- Čeřovská N., Synková H., Pechová R., **Müller K.**, Doubnerová V., Ryšlavá H. Influence of biotic stress caused by potyviral infection on CO₂ metabolism in tobacco plants. The 12th EAPR Virology section Meeting Rennes – France 2004, Book of Abstracts 38, (2004)
- Müller K.**, Čeřovská N., Ryšlavá H. Kvantifikace genu fosfoenolpyruvátcarboxylasy v rostlinách tabáku infikovaných Y virem bramboru. IX. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, sborník příspěvků, str.61, Brno, (2005)
- Doubnerová V., **Müller K.**, Čeřovská N., Ryšlavá H. Regulace NADP-malátdehydrogenasy (dekarboxylační) z listů tabáku dvojmocnými kationty kovů. IX. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, sborník příspěvků, str. 44, Brno (2005).
- Ryšlavá H., Doubnerová V., **Müller K.**, Janošková M., Nováková S., Synková H., Čeřovská N.: Effects of nonstructural potyviral proteins on plant viral infection and anaplerotic metabolic pathways. Book of abstracts 6th international symposium Recent advances in plant biotechnology, České Budějovice, Czech Republic (2005)
- Doubnerová V., **Müller K.**, Ryšlavá H. Regulace NADP-malátdehydrogenasy (dekarboxylační) z listů tabáku buněčnými metabolity. X. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, sborník příspěvků, str. 59, Brno (2006).
- Müller K.**, Ryšlavá H. Regulace aktivity fosfoenolpyruvát-karboxylasy v C₃ rostlinách za stresových podmínek. X. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, sborník příspěvků str. 33, Brno (2006).
- Doubnerová V., Jirásková A., **Müller K.**, Čeřovská N., Ryšlavá H. The effect of biotic stress on the activity of NADP-malic enzyme in plants from *Nicotiana* genus. XX. Biochemický zjazd, sborník příspěvků str. 239, Piešťany, Slovensko (2006).
- Ryšlavá H., **Müller K.**, Čeřovská N. Regulation of the phosphoenolpyruvate carboxylase under stress conditions. XX. Biochemický zjazd, sborník příspěvků str. 160, Piešťany, Slovensko (2006)
- Müller K.**, Doubnerova V., Cerovska N., Ryslava H. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in tobacco plants under biotic stress, Book of abstracts 20th IUBMB Int. Congress of Biochemistry and Mol. Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan (2006)
- Doubnerová V., **Müller K.**, Potůčková L., Šumpelová M., Minářů K., Čeřovská N., Ryšlavá H. Changes in expression and activity of PEPC and NADP-ME in plants infected with potato virus Y. 1st Central and Eastern European Proteomic Conference, book of abstracts P/45, p. 66, Prague, Czech Republic (2007)

