

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

*Přírodovědecká fakulta*

Katedra biochemie

---

# **Studium isoformem NADP–ME v rostlinách**

Diplomová práce

**Klinická a toxikologická analýza**

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.**

**Praha 2006**

**Alena Jirásková**

## PROHLÁŠENÍ

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

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

V Praze, 30. dubna 2006.

*Jiřina Korať*

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali během mých studií a zejména při zpracování zadaného tématu.

Děkuji své školitelce RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za její odborné rady a připomínky a také celému kolektivu naší biochemické laboratoře, za to, že vždy dokázali vytvořit velmi příjemné pracovní prostředí. Neocenitelným rádcem a pomocníkem mi byla Mgr. Veronika Doubnerová, které tímto patří můj největší dík.

Děkuji také Ing. Karlovi Müllerovi za jeho pohotové rady a postřehy.

Dále bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům ÚEB AV ČR, kteří mi pomáhali orientovat se v problematice rostlinného materiálu.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*,  
NADP-malátdehydrogenasa, fosfoenolpyruvátkarboxylasa, pyruvát, fosfátdikinasa

## Obsah

Seznam použitých zkratek .....	7
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Čeleď <i>Potyvirydae</i> .....</b>	<b>10</b>
1.1.1 Rod <i>Potyvirus</i> .....	10
1.1.2 Y virus bramboru .....	12
<b>1.2 NADP – malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační) .....</b>	<b>13</b>
1.2.1 Výskyt .....	13
1.2.2 Funkce .....	13
1.2.3 NADP-ME a stres .....	15
1.2.4 Vlastnosti .....	15
1.2.5 Regulace .....	16
<b>1.3 Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (orthofosfát : oxaloacetát karboxylasa) ..</b>	<b>16</b>
1.3.1 Výskyt .....	16
1.3.2 PEPC a stres .....	17
1.3.3 Vlastnosti .....	18
1.3.4 Regulace .....	18
<b>1.4 Pyruvát, fosfátdikinasa .....</b>	<b>18</b>
1.4.1 Výskyt .....	19
1.4.2 Vlastnosti .....	19
1.4.3 PPDK a stres .....	19
<b>1.5 Cíl práce .....</b>	<b>20</b>
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Materiál .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Chemikálie .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Přístroje .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Metody .....</b>	<b>23</b>
2.4.1 Příprava rostlinného materiálu .....	23
2.4.2 Příprava vzorků .....	23
2.4.3 Příprava rostlinného extraktu .....	25
2.4.4 Stanovení enzymové aktivity .....	25
2.4.5 Elektroforetická separace – nativní a v prostředí SDS .....	26
2.4.6 Detekce proteinů a aktivity NADP-ME .....	27
2.4.7 Detekce virové infekce .....	27
2.4.8 Stanovení koncentrace bílkovin .....	28
2.4.9 Stanovení relativních molekulových hmotností isoform NADP-ME ..	29
<b>3 VÝSLEDKY .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Studium isoform NADP-ME v různých částech rostliny <i>Nicotiana</i></b>	
<b><i>tabacum</i> .....</b>	<b>31</b>
3.1.1 Aktivita NADP-ME, PEPC a PPDK v různých částech rostliny <i>Nicotiana</i>	
<i>tabacum</i> .....	31
3.1.2 Výskyt isoform NADP-ME v různých částech rostliny <i>Nicotiana</i>	
<i>tabacum</i> .....	33
3.1.3 Obsah bílkovin v různých částech rostliny <i>Nicotiana tabacum</i> .....	34

<b>3.2</b>	<b>Studium isoformů NADP-ME v různých částech rostliny <i>Nicotiana benthamiana</i></b>	<b>35</b>
3.2.1	Aktivita NADP-ME, PEPC a PPDK v různých částech rostliny <i>Nicotiana benthamiana</i>	36
3.2.2	Výskyt isoformů NADP-ME v různých částech rostliny <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
3.2.3	Obsah bílkovin v různých částech rostliny <i>Nicotiana benthamiana</i>	39
<b>3.3</b>	<b>Vliv virové infekce na NADP-ME, PEPC a PPDK</b>	<b>40</b>
3.3.1	Relativní obsah viru v rostlinách <i>Nicotiana benthamiana</i>	40
3.3.2	Vliv virové infekce na aktivitu NADP-ME v rostlinách <i>Nicotiana benthamiana</i>	41
3.3.3	Vliv virové infekce na výskyt isoformů NADP-ME v rostlinách <i>Nicotiana benthamiana</i>	43
3.3.4	Vliv virové infekce na aktivitu PEPC v rostlinách <i>Nicotiana benthamiana</i>	45
3.3.5	Vliv virové infekce na aktivitu PPDK v rostlinách <i>Nicotiana benthamiana</i>	46
3.3.6	Vliv virové infekce na množství proteinů v rostlinách <i>Nicotiana benthamiana</i>	48
<b>3.4</b>	<b>Studium NADP-ME, PEPC a PPDK v průběhu virové infekce</b>	<b>49</b>
3.4.1	Relativní obsah viru v průběhu virové infekce v rostlinách <i>Nicotiana benthamiana</i>	50
3.4.2	Sledování aktivity NADP-ME v průběhu virové infekce	50
3.4.3	Stanovení relativních molekulových hmotností jednotlivých isoformů NADP-ME	52
3.4.4	Sledování aktivity PEPC v průběhu virové infekce	56
3.4.5	Sledování aktivity PPDK v průběhu virové infekce	58
3.4.6	Sledování množství bílkovin v průběhu virové infekce	60
<b>4</b>	<b>DISKUSE</b>	<b>63</b>
4.1	NADP-malátdehydrogenasa (dekarboxylační) v různých částech rostlin	64
4.2	Vliv virové infekce na NADP-ME v rostlinách <i>Nicotiana benthamiana</i>	65
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>69</b>

## Seznam použitých zkratk

a	enzymová aktivita vztažená na gram čerstvé hmotnosti	[ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ]
$A_\lambda$	absorbance při vlnové délce $\lambda$	
AMP	adenosinmonofosfát	
ATP	adenosintrifosfát	
BSA	hovězí sérový albumin	
C3 rostlina	rostlina, u které je prvním fotosyntetickým produktem 3-fosfoglycerát (tříuhlíkatá sloučenina)	
C4 rostlina	rostlina, u které je prvním fotosyntetickým produktem oxalacetát (čtyřuhlíkatá sloučenina)	
CAM rostlina	Crassulacean acid metabolism	
$c_M$	molární koncentrace	[ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]
CP	obalový protein virů	
DAS-ELISA	double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay	
DTT	dithiothreitol	
EDTA	ethylendiamintetraacetát	
g	tíhové zrychlení ( $g = 9,80665$ )	[ $\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$ ]
HC-Pro	protein HC-Pro potyvirů	
Hsp 70	protein indukovaný teplotním stresem (heat shock protein)	
IgG	protilátka třídy G	
kb	počet párů bází v genomu virů	
$K_m$	Michaelisova konstanta	[ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]
$K_R$	retardační koeficient	
$M_r$	relativní molekulová hmotnost	
NAD / NADH	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaný / redukovaný)	
NAD-MDH	NAD-malátdehydrogenasa	
NADP / NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný / redukovaný)	
NADP-ME	NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)	
NIa	protein NIa potyvirů	
NIb	protein NIb potyvirů	
OAA	oxalacetát	
P3	protein P3 potyvirů	
PEP	fosfoenolpyruvát	
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa	
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů	

---

Pi	anorganický fosfát	
PPDK	pyruvát, fosfátdikinasa	
PVA	A virus bramboru	
PVP	polyvinylpolypyrrolidon	
PVY	Y virus bramboru	
PVY <sup>C</sup>	virus způsobující proužkovitost bramboru	
PVY <sup>N</sup>	Y virus bramboru nekrotický kmen	
PVY <sup>NTN</sup>	Y virus bramboru kmene NTN	
PVY <sup>O</sup>	Y virus bramboru obecný kmen (ordinary)	
R <sup>2</sup>	koeficient determinace	
R <sub>f</sub>	relativní pohyblivost	
RNA / mRNA	ribonukleová kyselina / mediátorová ribonukleová kyselina	
RPM	počet otáček za minutu	
SDS	dodecylsulfát sodný	
SR1	kultivar Petit Havana SR1	
t	teplota	[°C]
	nebo čas	[s]
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin	
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan	
Vpg	protein Vpg potyvirů	
z angl.	z anglického originálu	
ε <sub>λ</sub>	molární absorpční koeficient při vlnové délce λ	[cm <sup>-1</sup> .mol <sup>-1</sup> .dm <sup>3</sup> ]
λ	vlnová délka záření	[nm]



## 1 ÚVOD

Rostliny jsou během svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Aby přežily, musí se těmto podmínkám neustále přizpůsobovat. V některých případech je okolní prostředí natolik nepříznivé, že dochází k poškození jednotlivých orgánů a v krajním případě nastává uhynutí.

Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí ohrožující rostlinu jsou označovány jako **stresové faktory** (stresory). Jako **stres** je označován stav, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů. Vždy se jedná o dynamickou rovnováhu mezi řadou spolupůsobících faktorů.

Rostliny jsou navíc znevýhodněny svým přisedlým způsobem života. Nemohou uniknout před působením stresoru. Navíc vykazují mnohem větší mezidruhovou variabilitu a heterogenitu vnitřního prostředí (buňky, pletiva, orgány). Důsledkem toho jsou změny biochemických pochodů v rostlinných buňkách i za fyziologických podmínek. Hůře se pak vymezuje stresové období [1].

Stresové faktory dělíme do dvou skupin – abiotické a biotické. Nedostatek vody, zvýšené zasolení okolního prostředí, vysoké a nízké teploty jsou hlavní abiotické faktory [2]. Biotický stres je hůře definovatelný a kvantifikovatelný. Kromě živočichů ohrožují rostliny i patogenní mikroorganismy (viry, bakterie, houby). Každý patogen si vyvinul specifický způsob, jak proniknout do rostliny. Někteří za tímto účelem syntetizují enzymy degradující buněčnou stěnu, popřípadě mechanickým způsobem poškozují tělo rostliny, či využívají přirozené otvory (průduchy, lenticely). Další vstupují v místech, která byla již dříve poraněna a nebo ke svému přenosu využívají hmyz.

Tento posledně jmenovaný způsob je charakteristický pro viry. Nemají žádný mechanismus, který by jim umožňoval aktivně proniknout do rostlinné buňky. Podaří-li se jim vstoupit do buňky, probíhá replikace virového genomu v cytoplasmě s využitím translačního aparátu hostitele. Transport virových částic mezi buňkami umožňují plasmodesmata. Šíření částic také napomáhají specifické virem kódované transportní proteiny. Do větších vzdáleností se viry šíří vodivými pletivy. Rostlinné viry (na rozdíl

od živočišných) musí překonávat pevnou buněčnou stěnu tvořenou kutikulou a vosky [3].

## 1.1 Čeleď *Potyvirydae*

Spektrum hostitelů většiny potyvirů je úzké. Avšak jejich význam je značný vzhledem k tomu, že téměř pro všechny známé kulturní plodiny existuje nějaký patogenní potyvirus. Symptomy infekčního onemocnění jsou prosvětlení žilek, chlorózy, nekrózy, kadeřavost, zakrslost, deformace plodů, semen a listů. Dalším faktorem, zvyšujícím škody způsobené potyviry, je jejich snadná přenosnost hmyzím vektorem a poraněními.

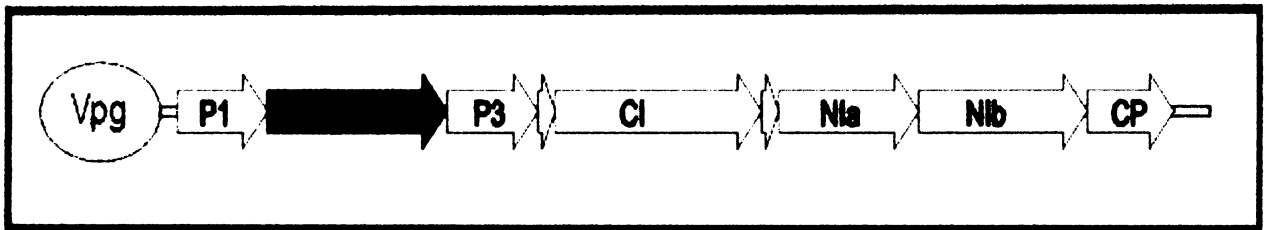
Společným znakem potyvirové infekce je vznik jaderných, popřípadě cytoplazmatických inkluzí v buňkách infikované rostliny. Tvar inkluzí bývá pro určitý virus specifický (válcovitý nebo amorfni).

*Potyviridae* lze ještě dále dělit na rody: *Potyvirus*, *Bymovirus*, *Rymovirus* a *Ipomovirus*.

Čeleď potyvirů se vyznačuje následujícími společnými charakteristikami uspořádání genomu. Virová částice má tvar pružné tyčinky či vlákna s helikální symetrií, která je dlouhá přibližně 700 až 900 nm a má 12 až 15 nm v průměru. Částice je tvořena přibližně 2000 kopiemi obalového proteinu (CP). Proteinový obal chrání potyvirový genom tvořený cca 9,6 kb dlouhou jednovláknovou pozitivní RNA. Na 3'konci genomu se nachází polyA sekvence jako u běžných mRNA. Kromě CP a genomové RNA virová partikule obsahuje ještě jednu kopii proteinu VPg. Tento protein zřejmě slouží místo čepičky nutné pro transkripci mRNA v cytoplazmě. Výjimku z tohoto uspořádání představuje podskupina Bymovirů [4], [5].

### 1.1.1 Rod *Potyvirus*

Genom potyvirů (viz. obr. 1.1.1) kóduje jediný polyprotein, který se posléze proteolyticky štěpí na 8 až 10 proteinů.



Obr.1.1.1 Struktura genomu Potyvirů

**VPg** (z angl. virus protein genome linked) protein slouží jako aktivátor při replikaci. Protein **P1** má proteasovou funkci a vyskytuje se v cytoplazmatických inkluzích infikovaných buněk.

Proteasa **Hc-Pro** (helper component protease) je multifunkční protein. Je cysteinovou proteasou a provádí štěpení na svém C-konci hraničícím s proteinem **P3**. V nativním funkčním stavu je ve formě dimeru. Jeho variabilita mezi jednotlivými potyviry je poměrně malá. Hc-Pro spolu s **CP** napomáhá systémovému šíření viru v rostlině (zvyšuje propustnost plasmodesmat a je schopen vázat RNA). Také zprostředkuje vazbu mezi vektorem (mšice) a virovou částicí.

Funkce proteinu **P3** není dosud přesně známa. Protein byl prokázán v cytoplazmatických i v jaderných inkluzích a v blízkosti plasmodesmat. Protein **CI** je hlavním proteinem cytoplazmatických inkluzí. Byl také detekován v blízkosti buněčných stěn. Vykazuje helikasovou a ATP-asovou aktivitu. Protein jaderných a cytoplazmatických inkluzí **NIa** je hlavní proteasou potyvirů a její proteolytická aktivita je velmi specifická. Vyštěpuje většinu funkčních virových proteinů. Polymerasa **NIb** je jednou z nejvíce konzervovaných potyvirových proteinů. Vykazuje funkci RNA dependentní RNA polymerasy. Vyskytuje se v jaderných inkluzích a v krystalických inkluzích v cytoplazmě.

**CP** (z angl. coat protein) podílí se na přenosu potyvirů vektorem. Je nezbytný pro pohyb viru z buňky do buňky a pro systémové šíření viru rostlinnými pletivy. Tento protein se využívá k důkazu přítomnosti viru v rostlině na základě imunochemického stanovení. [4], [5]

### 1.1.2 Y virus bramboru

Y virus bramboru je celosvětově rozšířený. Poprvé byl popsán v roce 1931 na bramborách ve Velké Británii. V dnešní době PVY patří mezi nejtěžší virová a ekonomicky nejrozšířenější onemocnění vyskytující se u brambor.

Na základě příznaků, které jednotlivé kmeny PVY vyvolávají na bramborách a indikátorových rostlinách, byly tyto kmeny rozděleny do tří hlavních kmenových skupin:

1. PVY<sup>O</sup> obecný kmen (ordinary)
2. PVY<sup>C</sup> virus proužkovitosti bramboru
3. PVY<sup>N</sup> nekrotický kmen způsobující nekrózy žilek tabáku
4. Izoláty PVY<sup>N</sup> vyvolávající také nekrotické změny na hlízách některých odrůd brambor byly zařazeny do skupiny nového kmene PVY<sup>NTN</sup>.

V přírodě jsou přirozenými hostitelskými rostlinami *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum* a některé rostliny rodu *Nicotiana* a *Capsicum*. PVY je přenášen vektorem (mšice). V laboratořích se používají rostliny *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* a *Tinantia erecta*. Přenos se uskutečňuje mechanicky (poraněním rostliny). Další možné způsoby přenosu jsou roubování a vegetativní množení. Nepřenáší se semeny. Virovou částici lze inaktivovat tepelně (50 až 62 °C). Symptomy infekce Y virem bramboru přetrvávají po celou dobu infekce a jsou do značné míry závislé na kmeni viru a odrůdě rostliny. Vliv na průběh choroby mají i klimatické podmínky. Obzvláště závažné příznaky vyvolávají izoláty PVY<sup>NTN</sup> [4], [5].

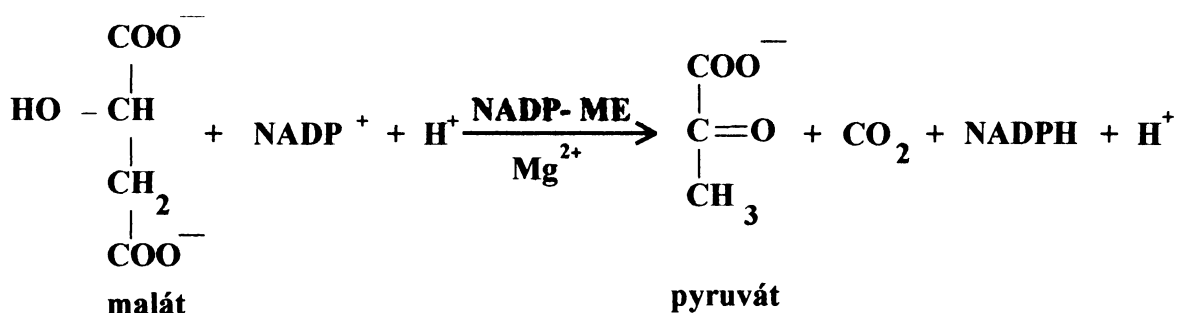
Patogeni si vyvinuli široké spektrum mechanismů působení na hostitelské organismy. Stejně tak rozmanité jsou i reakce rostlin směřující k potlačení následků jejich působení. Dochází k aktivaci opravných procesů na biochemické, fyziologické a molekulární úrovni. K těmto procesům patří změny v množství některých proteinů a u některých tvorba *de novo*, dále tvorba fytohormonů, aktivních forem kyslíku a osmoregulačních látek [1]. Může docházet ke zvýšení aktivity některých enzymů, které katalyzují anaplerotické reakce, např. fosfoenolpyruvátkarboxylasa [2]; pyruvát, fosfátdikinasa [6] a NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační) [7].

## 1.2 NADP – malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)

/EC 1.1.1.40; dále jen NADP – ME/

systematický název – (S)-malát : NADP oxidoreduktasa

NADP-ME je univerzální oxidoreduktasa, katalyzující přeměnu L-malátu na pyruvát a oxid uhličitý (dále jen CO<sub>2</sub>) za účasti dvojmocných kationtů (hořečnaté a manganaté) a NADP. Reakce je reverzibilní, *in vivo* převažuje dekarboxylace [8].



NADP-ME je hojně rozšířený enzym. Vyskytuje se v eukaryotní, ale i prokaryotní říši.

Nalézáme ho v savčích játrech a ve všech typech rostlin, kde se uplatňuje při katalýze rozličných metabolických pochodů [9].

### 1.2.1 Výskyt

U rostlin se vyskytuje v listech, etiolovaných tkáních, kořenech a reprodukčních orgánech (plody a semena) [9]. Podle jeho umístění v buňce rozlišujeme dvě formy – cytosolovou a plastidovou [10]. Přítomnost obou forem se zdá být univerzální pro všechny rostliny (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> a CAM) [11]. Podle kofaktoru (NADP či NAD), který je vyžadován při katalýze, rozlišuje tři enzymy: NAD-ME (EC 1.1.1.38), NADP-ME (EC 1.1.1.40) a NAD(P)-ME (EC 1.1.1.39). V mitochondriích všech rostlin je přítomen NAD-malátdehydrogenasa (dekarboxylační) EC 1.1.1.39 [12]

U savců je NADP-ME přítomen v cytosolu a mitochondriích [13], [14].

### 1.2.2 Funkce

V savčích játrech působí jako hlavní enzym tvořící NADPH pro lipogenezi.

Podle účasti v rostlinných metabolických pochodech rozlišujeme dvě formy - fotosyntetickou a nefotosyntetickou. Na základě rozdílné lokalizace a fyziologických funkcí v buňce bylo klasifikováno sedm isoform rostlinných NADP-ME [15].

1. *C4(1)-NADP-ME* jedná se o chloroplastovou fotosyntetickou isoformu některých C4 rostlin a je z uvedených nejlépe prostudována.

2. *C4(2)-NADP-ME* je plastidová nefotosyntetická isoforma C4 rostlin.

3. *C4(3)-NADP-ME* je nefotosyntetická isoforma přítomna v cytosolu C4 rostlin.

4. *CAM(1)-NADP-ME* je cytosolová fotosyntetická isoforma některých CAM rostlin.

5. *CAM(2)-NADP-ME* je cytosolová nefotosyntetická isoforma některých CAM rostlin.

6. *C3(1)-NADP-ME* je cytosolová nefotosyntetická isoforma některých C3 rostlin.

7. *C3(2)-NADP-ME* je plastidová nefotosyntetická isoforma některých C3 rostlin.

Zde uvedené dvě fotosyntetické formy (*C4(1)-NADP-ME* a *CAM(1)-NADP-ME*) se liší svou lokalizací v buňce. U C4 rostlin je přítomna v chloroplastech buněk pohev cévních svazků, kde katalyzuje dekarboxylaci malátu a tím uvolňuje CO<sub>2</sub> pro fixaci Calvinovým cyklem [16]. U CAM rostlin je přítomna v cytosolu a její funkce je obdobná jako u C4 rostlin. Primární fixace CO<sub>2</sub> se uskutečňuje v noci, zatímco dekarboxylace ve dne, kdy jsou uzavřeny průduchy. Výskyt fotosyntetických isoform v C4 a CAM rostlinách je důležitý pro snížení ztrát CO<sub>2</sub> způsobených fotorespirací [17]. Je důkazem přizpůsobení se nepříznivým okolním podmínkám (život v horkých a suchých oblastech) [1].

Nefotosyntetické formy katalyzují anaplerotické reakce. Plastidové isoformy poskytují redukční ekvivalenty NADPH a pyruvát pro syntézu lipidů. Cytosolové isoformy rovněž poskytují redukční ekvivalenty NADPH na biosyntetické procesy (zejména ligninu, dále pak pro syntézu sacharidů a některých aminokyselin) [7], [8], [18]. Spolu s fosfoenolpyruvátkarboxylasou se uplatňují na regulaci vnitrobuněčného pH [11], [19]. Také se podílí na otevírání a uzavírání průduchů [11], [19], [20].

Cytosolové i plastidové isoformy se podílí na rostlinných obranných mechanismech.

### 1.2.3 NADP-ME a stres

Působením některých chemikálií (herbicidy, pesticidy), změnou fyzikálních podmínek (horko, sucho, chlad), zvýšené koncentrace některých solí v okolí rostliny (kademnaté a zinečnaté sole,  $K_2SO_4$ ) a vlivem celulas a houbových elicitorů dochází ke zvýšení aktivity NADP-ME [7], [19], [21]. Aktivita NADP-ME je také zvýšena při virové infekci [22]. To zřejmě souvisí s krytím zvýšené spotřeby NADPH při biosyntetických procesech (např. pro zajištění dostatečného množství prekursorů pro syntézu stavebních látek – lignin, specifických obraných látek – fytoalexiny) [7], [9]. NADPH je také koenzymem některých antioxidačních enzymů (glutathionreduktasy, askorbátperoxidasy, katalasy a superoxididismutasy) [23], [24].

### 1.2.4 Vlastnosti

Aktivita a množství enzymu se mění s ontogenezí rostliny (u listů roste od báze směrem k vrcholu) [8]. Veškeré rostlinné isoformy jsou kódovány malou genovou rodinou. Expres jednotlivých isoform úzce souvisí s jejich specifickou úlohou v jednotlivých orgánech a vývojových stádiích rostliny (některé jsou exprimovány konstitutivně, jiné pouze v určitém orgánu či fázi vývoje) [11], [25].

U kukuřice (modelová  $C_4$  rostlina) byly popsány dvě isoformy o rozdílné molekulové hmotnosti jedné podjednotky (62 000 a 72 000) [17]. V kořenech byla detekována další isoforma s molekulovou hmotností 66 000 [10]. Protein s molekulovou hmotností 72 000 převládá v etiolovaných listech a kořenech. Byl také detekován v některých rostlinách rodu *Flaveria* a ve stoncích a kořenech pšenice. Jedná se o agregát NADP-ME s heat shock proteinem (Hsp 70), proto byl dříve považován za jednu isoformu [10], [17]. Isoforma s molekulovou hmotností 62 000 se vyskytuje v zelených listech a plní funkci fotosyntetickou.

NADP-ME se vyskytuje jako tetramer. V některých rostlinách se vyskytuje i dimer s nižší aktivitou. Tato rovnováha je ovlivněna pH [26]. V některých rostlinách byly zjištěny i vyšší agregáty – hexamer či oktamer [11].

Fotosyntetická forma se vyznačuje rozdílnými kinetickými vlastnostmi oproti ostatním nefotosyntetickým formám. Má vyšší katalytickou účinnost (vyšší aktivita), vyšší pH optimum, nižší  $K_m$  vůči substrátům (NADP, malát) a je regulována nadbytkem malátu [15].

## 1.2.5 Regulace

Fotosyntetická forma NADP-ME přítomná v chloroplastech buněk pochev cévních svazků je citlivě regulována prostřednictvím změny pH, ke které dochází po osvětlení. Působením světla dochází k nárůstu mRNA transkriptu a NADP-ME proteinu [9].

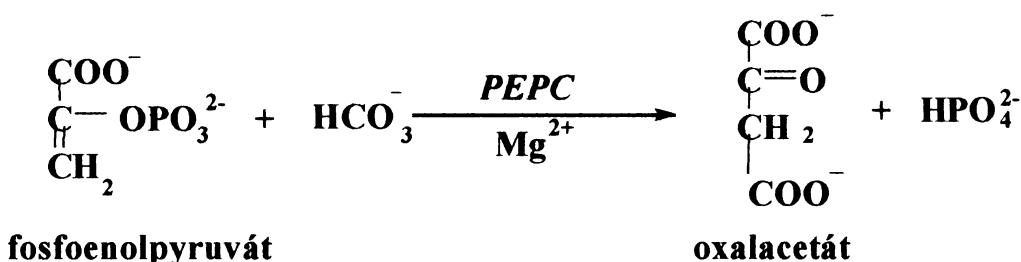
Chod dekarboxylace je závislý na kontinuálním odebrání CO<sub>2</sub> a NADPH [8]. Pro některé isoformy jsou sukcinát, fumarát, koenzym A, acetyl-koenzym A a palmitoyl-koenzym A aktivátory [27]. Zatímco účinnými inhibitory jsou malát, vysoký poměr NADPH/NADP, fruktosa 1,6-bis-fosfát, organické fosfáty, ionty těžkých kovů (kadmennaté, zinečnaté a rtuťnaté) a některé produkty cyklu trikarboxylových kyselin [8].

## 1.3 Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (orthofosfát : oxaloacetát karboxylasa)

/EC 4. 1. 1. 31 ; dále jen PEPC/

systematický název – fosfát : oxalacetát karboxylasa (fosforylační)

Katalyzuje ireverzibilní β-karboxylaci fosfoenolpyruvátu v přítomnosti hydrogenuhličitanového aniontu a hořečnatých či manganatých kationtů za vzniku oxalacetátu a anorganického fosfátu [2], [28].



### 1.3.1 Výskyt

PEPC je hojně rozšířený cytosolový enzym (homotetramer) [2]. Nalézáme ho ve všech fotosynteticky aktivních organismech (vyšší rostliny, fotosyntetické bakterie, sinice, zelené řasy) a nefotosyntetických bakteriích. U rostlin je zastoupen v listech C4 a



CAM rostlin. V C3 rostlinách je rovnoměrně zastoupen ve všech orgánech. V živočišné říši nalezen nebyl [2], [28].

Podle výskytu u vyšších rostlin můžeme PEPC rozdělit :

- 1 ) PEPC přítomný v mezofylových buňkách C4 rostlin
- 2 ) PEPC přítomný v CAM rostlinách
- 3 ) PEPC přítomný v nefotosyntetických částech C4 rostlin
- 4 ) PEPC přítomný v C3 rostlinách.

*PEPC vyskytující se v mezofylových buňkách C4 rostlin* je nejlépe prostudován a je klíčovým enzymem fixace CO<sub>2</sub> u těchto rostlin. Jeho působením vzniká oxalacetát, jenž je redukován na malát a nebo transaminován na aspartát v závislosti na rostlinném typu. V mezofylových buňkách kukuřice vstupuje oxalacetát do chloroplastů, kde se rychle redukuje na malát. Ten je transportován do buněk pochev cévních svazků, dekarboxylován na pyruvát a uvolněný CO<sub>2</sub> je fixován sledem reakcí charakteristických pro C3 rostliny – Calvinovým cyklem [15].

*PEPC přítomný v CAM rostlinách* plní obdobnou fotosyntetickou funkci jako výše uvedený u C4 rostlin. Rozdílem je, že fixace pomocí PEPC probíhá pouze v noci. Malát je transportován do vakuol, ve dne je přenesen zpět do cytosolu, dekarboxylován a uvolněný CO<sub>2</sub> je znovu fixován Calvinovým cyklem [15], [16].

*PEPC přítomný v C3 rostlinách a nefotosyntetických částech C4 rostlin* je méně prozkoumán. Plní řadu anaplerotických funkcí, jako je především dodávání čtyřuhlíkatého skeletu pro syntézu malátu a aspartátu, doplňování intermediátů cyklu trikarboxylových kyselin, udržování pH cytoplasmy [2], [29]. Podílí se také na zrání plodů, tvorbě a klíčení semen [30].

### 1.3.2 PEPC a stres

Bylo zjištěno, že vlivem některých stresorů (horko, chlad, sucho a zvýšená koncentrace solí) dochází k nárůstu PEPC. Nedostatek fosforu vyvolal zvýšení obsahu PEPC v tabáku [31]. Nutriční stres v podobě nedostatku železa zvýšil aktivitu PEPC okurky [32]. Ozón způsobil výrazný nárůst aktivity PEPC v jehlicích borovice [33]. Také přítomnost amonných solí a glutaminu v okolním prostředí rostliny stimuluje syntézu malátu prostřednictvím PEPC [2].

### 1.3.3 Vlastnosti

PEPC je obvykle tvořen čtyřmi identickými podjednotkami, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 92 000 až 116 000. Primární struktura PEPC monomeru byla poprvé objasněna u *E. coli* v roce 1984. Od té doby byla primární struktura určena u více než 75 rostlinných a bakteriálních druhů [28], [29].

### 1.3.4 Regulace

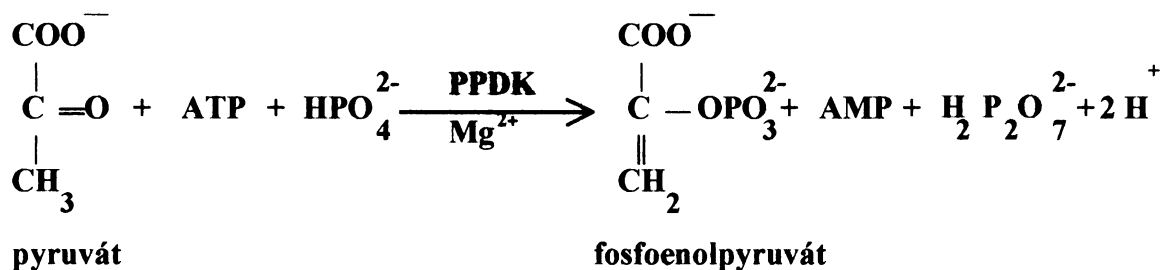
Je citlivě regulován prostřednictvím pH v cytoplasmě. Aktivitu PEPC ovlivňuje řada metabolitů glykolýzy. Glukosa-6-fosfát, fruktosa-1,6-bisfosfát, ale také glycin působí jako aktivátory, aspartát, malát a další organické kyseliny reakci katalyzovanou PEPC inhibují [7], [34]. PEPC je dále regulován fosforylací serinu blízko N-konce, tato fosforylace je katalyzována specifickou fosfoenolpyruvátkarboxylasou kinasou. Fosforylací se snižuje vnímavost k inhibičnímu účinku malátem a zvyšuje se citlivost vůči glukosa-6- fosfátu [7], [28], [29], [30].

## 1.4 Pyruvát, fosfátdikinasa

/EC 2.7.9.1; dále jen PPK/,

systematický název – ATP : pyruvát, fosfát fosfotranferasa

Katalyzuje reakci, v níž je pyruvát za přítomnosti ATP a anorganického fosfátu přeměněn na fosfoenolpyruvát, AMP a pyrofosfát. Vyžaduje přítomnost hořečnatých kationtů [6].



Průběh reakce je závislý na druhu organismu. PPDK bakterií katalyzuje zpětnou reakci za účelem syntézy ATP z fosfoenolpyruvátu [6]. Naproti tomu rostlinná PPDK katalyzuje reakci za účelem tvorby fosfoenolpyruvátu. Dochází tak k regeneraci fosfoenolpyruvátu – primárního akceptoru CO<sub>2</sub> v C4 a CAM fotosyntéze [35].

### 1.4.1 Výskyt

V hojné míře se vyskytuje především v listech C4 a CAM rostlin, kde je odpovědná za produkci fosfoenolpyruvátu. U C4 rostlin je PPDK lokalizována v chloroplastech mezofylových buněk [6], [36]. U kukuřice (C4 rostlina) se vyskytuje ještě druhá isoforma – cytosolová. PPDK se vyskytuje i u CAM a C3 rostlin. Vyšší rostliny obsahují cytosolovou isoformu PPDK. Vyskytuje se v nefotosyntetických orgánech a její funkce není přesně objasněna.

### 1.4.2 Vlastnosti

V kořenech C3 rostlin rýže byla nalezena cytosolová PPDK s relativní molekulovou hmotností jedné podjednotky 97 000 [6]. V C4 rostlinách (v kukuřici) je lokalizována v chloroplastech mesofylových buněk ve formě homotetrameru o relativní molekulové hmotnosti jedné podjednotky 95 000. Tato isoforma je regulována světlem pomocí mechanismu fosforylace/defosforylace .

U fakultativní CAM rostliny kosmatce křišťálového je PPDK přítomna ve formě homotetrameru s relativní molekulovou hmotností jedné podjednotky 95 000. Naproti tomu u bakterií (*Clostridium symbiosum*) je PPDK v podobě homodimeru s relativní molekulovou hmotností jedné podjednotky 96 000 [37] .

### 1.4.3 PPDK a stres

Bylo zjištěno, že abiotický stres v podobě působení polyethylenglykolu, nedostatek kyslíku a vody indukovaly expresi cytosolové isoformy PPDK u rýže, C3 rostliny[6]. PPDK plní úlohu v procesu adaptace rostlin vůči UV-B záření [38]

Horko ani kyselina abscisová nevyvolávají indukci PPDK [6].

## 1.5 Cíl práce

1. Zjistit aktivitu NADP – malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační), fosfoenolpyruvátkarboxylasy, pyruvát, fosfátdikinasy v různých částech rostlin *Nicotiana tabacum* a *Nicotiana benthamiana*.
2. Ověřit vliv virové infekce na aktivitu NADP – malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační), fosfoenolpyruvátkarboxylasy, pyruvát, fosfátdikinasy v rostlinách *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlinách *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro HC-Pro protein.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Materiál

Rostlinný materiál:

- rostliny *Nicotiana benthamiana* a transgenní rostliny *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro HC-Pro protein z A viru bramboru (PVA), poskytnuté Dr. Savenkovem z Univerzity Uppsalla, Švédsko

- rostliny *Nicotiana tabacum*

Rostliny byly pěstovány ve skleníku v Ústavu experimentální botaniky AV ČR (ÚEB AV ČR).

Virový materiál:

- Y virus bramboru, kmen PVY<sup>NTN</sup>, poskytnuté Dr. Noemi Čeřovskou; Ústav experimentální botaniky AV ČR

Protilátky:

a) králičí polyklonální protilátka třídy IgG připravené proti PVY

b) monoklonální protilátka třídy IgG připravená proti PVY<sup>NTN</sup> konjugovaná s alkalickou fosfátasou.

### 2.2 Chemikálie

Akrylamid - Sigma, USA, p.a.

ATP - Sigma, USA; 98%

Bradfordovo činidlo - Sigma, USA.

Coomassie Brilliant Blue R,G - Sigma, USA; p.a.

Dithiothreitol (DTT) - Sigma, USA; p.a.

Dodecylsulfát sodný (SDS) - Serva, Německo; p.a.

Fast Violet B - Sigma, USA; p.a.

---

Fosfoenolpyruvát sodný - Sigma, USA; p.a.  
Kyselina oxaloctová - Sigma, USA; 98%  
L-malát sodný - Sigma, USA; 99%  
N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin (TEMED) - Serva, Německo; 99%  
N,N'-metylenbisakrylamid - Serva, Německo; p.a.  
NADH - Sigma, Německo; 98%  
NADP - Sigma, Německo; 96%  
Nitroblue tetrazolium chlorid - Sigma, USA; p.a.  
Phenazin methosulfát - Sigma, USA; p.a.  
Polyvinylpyrrolidon (PVP) - Sigma, USA; 99%  
Pyruvát sodný - Sigma, USA; 99%  
Standardní proteiny pro SDS elektroforézu o molekulové hmotnosti 36 000 až 205 000 -  
Sigma, USA  
Standardní proteiny pro nativní elektroforézu o molekulové hmotnosti 36 000 až  
248 000 - Sigma, USA  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan - Serva, Německo; 99%  
Ostatní chemikálie- Lachema, ČR; p.a.

### 2.3 Přístroje

Analytické váhy 100A - Denver Instrument Company, USA  
Centrifuga - Hettich, Německo  
Elektroforetická souprava - Biometra, Německo  
Mikrotitrační inkubátor - Dynatech, Anglie  
pH metr - Denver Instrument, USA  
Spektrofotometr Helios  $\alpha$  - Thermo Spectronic, USA  
Spektrofotometr Ultrospec 2 100 - Amersham Pharmacia Biotech, Anglie  
Spektrofotometr MRX - Dynatech, Anglie  
Vortex KMO - Labortechnik, Německo

## 2.4 Metody

### 2.4.1 Příprava rostlinného materiálu

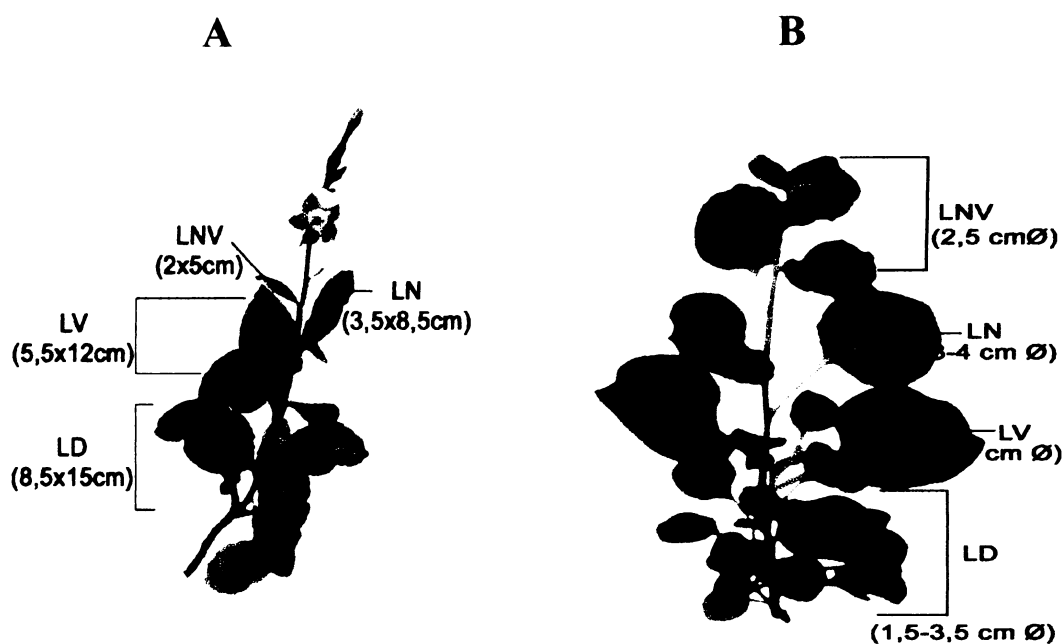
Veškerý rostlinný materiál (rostliny *Nicotiana benthamiana*, transgenní rostliny *Nicotiana benthamiana* s vnesným genem pro nestrukturní virový protein HC-Pro A viru bramboru a rostliny *Nicotiana tabacum*, cv. Petit Havana SR 1) byly po celou dobu experimentu pěstovány ve skleníku, při přirozeném osvětlení a teplotním režimu (20 °C/18 °C, den/noc).

Ve stáří čtyř týdnů byly rostliny jednotlivě přeneseny do květináčů obsahujících směs (substrát:písek, 3:1). Zde byly ponechány do ukončení pokusu. Při pokusech s infikovanými rostlinami byly (ve stáří osmi týdnů) nejprve rozděleny na dvě stejně početné skupiny (kontrolní a infikované). Skupina infikovaných rostlin byla očkována Y virem bramboru kmene NTN (PVY<sup>NTN</sup>). Očkování bylo provedeno mechanickým přenosem extraktu infekčního materiálu (infikované listy PVY<sup>NTN</sup> homogenizované v desetinásobném množství 0,057 M fosfátového pufru pH 8,0) na spodní list rostliny porušený karborundovým práškem.

### 2.4.2 Příprava vzorků

**Pro pokus studium isoformů NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum*** (viz. 3.1) byly dvanáct týdnů staré rostliny vyjmuty z květináčů. Z jednotlivých částí rostlin (květy; nejvrchnější, vrchní, střední, a dolní listy; vrchní a dolní části stonků; kořeny) byly zhotoveny směsné vzorky, ty byly okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80°C. Rozdělení listů podle velikosti je naznačeno na obrázku (viz. obr. 2.4.1-A).

**Pro pokus studium isoformů NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*** (viz. 3.2) byly směsné vzorky zhotoveny stejným způsobem jako v pokusech různé části rostliny *Nicotiana tabacum* pouze s tím rozdílem, že nebyly odebrány květy a stáří rostlin bylo deset týdnů. Rozdělení listů podle velikosti je naznačeno na obrázku (viz. obr. 2.4.1-B).



**Obr. 2.4.1** Rozdělení rostliny na různé části podle velikosti a umístění listů. Zvlášť odebrány nejvrchnější (LNV), vrchní (LN), velké střední (LV) a dolní (LD) listy.

**A** – rostlina *Nicotiana tabacum*

**B** – rostlina *Nicotiana benthamiana*

**Pro pokus vliv virové infekce na NADP-ME, PEPC a PPDK** (viz. 3.3) byly obě skupiny sledovaných rostlin (*Nicotiana benthamiana* a transgenní rostlina *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro virový nestrukturní protein HC-Pro) ve stáří osmi týdnů rozděleny na poloviny, z nichž jedna byla inokulována PVY<sup>NTN</sup> (viz 2.4.1). V průběhu virové infekce (10. den) byly ve skupinách infikovaných i kontrolních rostlin odděleně odebrány květy a dospělé (první plně vyvinuté) listy. V den ukončení pokusu (17. den) pak byly odděleně odebrány květy, plně vyvinuté listy, stonky a kořeny. Ze všech odebraných částí byly zhotoveny směsné vzorky.

**Pro pokus studium NADP-ME, PEPC a PPDK v průběhu virové infekce** (viz. 3.4) byly během virové infekce (třikrát týdně) odebrány vzorky dospělých (prvních plně vyvinutých) listů v obou skupinách rostlin (kontrolní a infikované) a zhotoveny směsné vzorky. V den ukončení pokusu (26. den) byly odděleně odebrány květy, dospělé listy, stonky a kořeny v obou skupinách, z nichž byly opět zhotoveny směsné vzorky.



### 2.4.3 Příprava rostlinného extraktu

Pro stanovení enzymové aktivity bylo odebráno ze směsných vzorků vždy přesné množství rostlinného materiálu. Poté bylo homogenizováno s trojnásobným množstvím chlazeného **extrakčního pufru A** obsahujícího  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl pufr (pH 7,8),  $1 \text{ mmol.l}^{-1}$  DTT,  $1 \text{ mmol.l}^{-1}$  EDTA,  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  a 5% glycerol. K homogenátům bylo přidáno PVP (0,02 g/1 ml) a následně byly centrifugovány při 15 000 RPM ( $16\,600 \times g$ ) při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 15 minut. Supernatant byl použit jako extrakt pro měření enzymových aktivit.

Pro **nativní elektroforetické separace proteinů** bylo odebráno ze směsných vzorků vždy přesné množství rostlinného materiálu a homogenizováno s dvojnásobným množstvím chlazeného extrakčního pufru A (viz. příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity). K homogenátům bylo přidáno PVP (viz. příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity) a poté byly centrifugovány (viz. příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity). Extrakty byly smíšeny se sacharosou, výsledná koncentrace byla 20 %.

Pro **elektroforetickou separaci v prostředí SDS** byly extrakty zhotoveny stejným způsobem jako u nativní elektroforézy. Extrakty byly smíšeny se vzorkovým pufrem (v poměru 1:1) obsahujícím  $130 \text{ mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl pufr (pH 6,8),  $70 \text{ mmol.l}^{-1}$  SDS,  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  DTT, 20% glycerol a  $5 \cdot 10^{-3}\%$  bromfenolovou modř.

### 2.4.4 Stanovení enzymové aktivity

Aktivita enzymů (PEPC, PPK a NADP-ME) v extraktu byla stanovena spektrofotometricky z rozdílu naměřených hodnot absorbance při 340 nm za dobu 5 minut při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Hodnota molárního absorpčního koeficientu pro NADH při 340 nm je  $6\,200 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ .

Měření bylo provedeno na spektrofotometru - Helios  $\alpha$ , délka kyvety 1 cm, objem reakční směsi 1 ml. Výsledná hodnota aktivit enzymů je vždy průměrnou hodnotou ze tří stanovení, byla použita pro výpočet specifické aktivity enzymu (aktivita sledovaného enzymu vztahovaná na koncentraci rozpustných proteinů v extraktu) a aktivity vztahované na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu.

Pro **stanovení aktivity enzymu PEPC**, bylo využito spřažené reakce, kdy v prvním kroku vzniká OAA, který je pomocí NAD-malátdehydrogenasy redukován za

spotřeby NADH na malát. NAD-malátdehydrogenasa je v extraktu přítomna v dostatečném množství.

Zaznamenáváme pokles absorbance způsobený úbytkem NADH. Reakční směs obsahovala vždy 20  $\mu\text{l}$  extraktu a 100  $\text{mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl pufr (pH 8,1); 5  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ ; 2  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; 0,2  $\text{mmol.l}^{-1}$  NADH; 2  $\text{mmol.l}^{-1}$  PEP.

**Pro stanovení aktivity enzymu PPDK**, bylo využito dvojité spřažené reakce, kdy je v prvním kroku vzniklý PEP karboxylován za katalýzy PEPC na OAA a ten je dále NAD-malátdehydrogenasou redukován na malát. Zaznamenáváme pokles absorbance způsobený úbytkem NADH. Reakční směs obsahovala vždy 50  $\mu\text{l}$  extraktu a 100  $\text{mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl pufr (pH 8,1); 5  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ ; 10  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; 2  $\text{mmol.l}^{-1}$  pyruvátu; 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  ATP; 2  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2  $\text{mmol.l}^{-1}$  NADH.

**Pro stanovení aktivity enzymu NADP-ME** bylo využito reakce, v níž je malát za současné redukce NADP tímto enzymem dekarboxylován a vzniká pyruvát, oxid uhličitý a NADPH. Vznik redukováného NADPH se projeví nárůstem absorbance. Reakční směs obsahovala vždy 50  $\mu\text{l}$  extraktu a 100  $\text{mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl pufr (pH 7,4); 10  $\text{mmol.l}^{-1}$  L-malát; 2  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; 0,2  $\text{mmol.l}^{-1}$  NADP.

#### 2.4.5 Elektroforetická separace – nativní a v prostředí SDS

Pro provedení nativní elektroforézy a elektroforézy v SDS prostředí byla použita souprava pro elektroforézu firmy Biometra.

**Nativní elektroforéza** byla provedena v 3% zaostřovacím gelu obsahujícím 3% akrylamid a N,N'-metylen-bis(akrylamid); 126  $\text{mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl pufr pH 6,8; 0,1% glycerol; 0,1% peroxodisíran amonný a TEMED. A v 6% separačním gelu obsahujícím 6% akrylamid a N,N'-metylen-bis(akrylamid); 375  $\text{mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl pufr pH 8,8; 0,1% glycerol; 0,1% peroxodisíran amonný a TEMED. Elektrodový pufr obsahoval 18,8 g glycinu; 3 g Tris a 10% glycerol v 1000 ml destilované vody (pH 8,3).

Do jamek gelu bylo nanášeno vždy stejné množství (20  $\mu\text{l}$ ) rostlinných extraktů v 20% sacharose. Dělení probíhalo v chladové místnosti při teplotě 4 °C. Po dosažení rozhraní obou gelů bylo počáteční napětí 70 V zvýšeno na 140 V.

**Elektroforéza v prostředí SDS** byla provedena metodou podle Laemmliho [39], [40]. Byl použit 12% separační polyakrylamidový gel a 5% zaostřovací gel o shodném složení jako u nativní elektroforézy pouze 3% a 6% akrylamid byl nahrazen 5% a 12%;

glycerol byl nahrazen 0,1% SDS. Elektrodotový pufr navíc obsahoval 0,1% SDS. Dělení molekul probíhalo při počátečním napětí 70 V. V okamžiku dosažení hranice separačního gelu bylo zvýšeno na 140 V. Pro určení molekulové hmotnosti proteinů byly použity elektroforetické standardní proteiny (36 000 až 205 000).

#### 2.4.6 Detekce proteinů a aktivity NADP-ME

**Detekce NADP-ME:** okamžitě po skončení nativní elektroforézy byly gely několik hodin inkubovány při laboratorní teplotě v 10 až 20 ml reakční směsi obsahující 100 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufr pH 7,4; 10 mmol.l<sup>-1</sup> L-malát; 10 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 2 mmol.l<sup>-1</sup> NADP; 0,1 mg.ml<sup>-1</sup> nitroblue tetrazolium a 5 μg.ml<sup>-1</sup> phenazin methosulfát.

**Detekce proteinů v gelu** byla provedena barvením gelů po nativní elektroforéze a po elektroforéze v prostředí SDS. Barvení probíhalo 12 hodin v lázni obsahující 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250; 425 ml ethanol; 50 ml methanolu; 100 ml kyseliny octové a 425 ml redestilované vody. Následné odbarvení gelu probíhalo v několika lázních odbarvovacího roztoku připraveného z ethanolu; kyseliny octové a destilované vody v poměru 25:10:65.

#### 2.4.7 Detekce virové infekce

Přítomnost virové infekce byla prokázána imunochemickou metodou DAS-ELISA (z angl. Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Imuno Sorbent Assay). Jedná se o metodu založenou na reakci antigenu se specifickou protilátkou a značenou sekundární protilátkou. Nejprve je primární protilátka (králičí polyklonální protilátka třídy IgG připravená proti PVY) zachycena na mikrotitrační destičce, v další fázi jsou přidány extrakty připravené homogenizací směsných vzorků s konjugačním pufrům (antigenem jsou virové částice přítomné v extraktech infikovaných rostlin). Antigen se naváže na primární protilátku. Dále se přidá značená sekundární protilátka (monoklonální protilátka třídy IgG připravená proti PVY<sup>NTN</sup> konjugovaná s alkalickou fosfatou). Nakonec se nanese substrát (p-nitrofenylfosfát).

Jsou-li v infikovaných rostlinách přítomny virové částice, vznikne žluté zabarvení, vyvolané přeměnou bezbarvého p-nitrofenylfosfátu na barevný p-nitrofenol. Detekce se provádí spektrofotometricky při 405 nm. Měřeno na spektrofotometru MRX.

Pro stanovení byly použity směsné vzorky odebíraných horních dospělých listů rostlin, kam byla infekce systémově rozšířena. Primární protilátka byla naředěna potahovacím pufrům na výslednou koncentraci  $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a v množství  $100\mu\text{l}$  nanášena do jednotlivých jamek destičky. Zakrytá destička byla inkubována v mikrotitračním inkubátoru tři hodiny při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Poté byly směsné vzorky kontrolních a infikovaných rostlin rozetřeny v konjugačním pufru v poměru 1:10 a nanášeny na destičku. Byly inkubovány 18 hodin při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Následně byla aplikována konjugačním pufrům ředěná (v poměru 1:500) sekundární protilátka značená alkalickou fosfátasou a inkubována čtyři hodiny při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V posledním kroku byl přidán p-nitrofenylfosfát, ředěný substrátovým pufrům na koncentraci  $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a proběhla inkubace jednu hodinu při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Mezi nanášením vzorků, sekundární značené protilátky a substrátu byla destička čtyřikrát promývána  $200\mu\text{l}$  promývacího pufru.

Jeden extrakt byl vždy nanášen do tří jamek na mikrotitrační destičce a výsledná hodnota absorbance je průměrem těchto tří aplikací. Nanášený konjugační pufr (bez extraktů) sloužil jako slepá kontrola, zatímco infekční rostlinný materiál užívaný k inokulaci rostlin byl použit jako pozitivní kontrola.

**Potahovací pufr** (pH 9,6) obsahoval  $15\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ Na}_2\text{CO}_3$ ;  $35\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ NaHCO}_3$  a  $3\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ NaN}_3$ .

**Konjugační pufr** (pH 7,4) obsahoval  $137\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ NaCl}$ ;  $8\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{ H}_2\text{O}$ ;  $15\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ KH}_2\text{PO}_4$ ;  $2,7\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ KCl}$ ;  $3\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ NaN}_3$ ; 0,05% Tween 20; 2% polyvinylpyrrolidon; 0,2% ovalbumin.

**Substrátový pufr** (pH 9,8) obsahoval destilovanou vodu a 10,8% diethanolamin.

**Promývací pufr** (pH 7,4) obsahoval  $137\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ NaCl}$ ;  $8\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{ H}_2\text{O}$ ;  $15\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ KH}_2\text{PO}_4$ ;  $2,7\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ KCl}$ ;  $3\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ NaN}_3$ ; 0,05% Tween 20.

#### 2.4.8 Stanovení koncentrace bílkovin

Množství bílkovin obsažených ve vzorcích bylo určeno metodou podle Bradfordové [41]. Metoda je založena na vzniku modrého komplexu barviva (Brilliant Blue G) a proteinů rozpuštěných ve vzorku, což způsobí změnu absorpčního maxima z původních 465 na 595 nm. Komplex detekujeme spektrofotometricky při 595 nm.

Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) v koncentračním rozsahu 0 až 1,4 mg.ml<sup>-1</sup>.

#### 2.4.9 Stanovení relativních molekulových hmotností isoformem NADP-ME

Stanovení relativních molekulových hmotností isoformem NADP-ME bylo provedeno nativní elektroforézou v šesti různých koncentracích akrylamidu s následným vyhodnocením podle Ferguson, Hedricka a Smitha [42], [43], [44].

Kalibrace byla provedena pomocí komerčních standardů (firmy Sigma; 14 200 až 248 000). Pro provedení nativní elektroforézy byla použita souprava pro elektroforézu firmy Biometra.

Nejprve byly standardní proteiny elektroforeticky separovány v gelech o různých koncentracích akrylamidu (podle návodu firmy Sigma).

Ihned po skončení elektroforézy byly nejprve gely inkubovány ve **fixační lázni** obsahující 400 ml methanolu; 70 ml kyseliny octové a 530 ml vody. Následně byly umístěny po dobu 6 hodin do **barvicí lázně** obsahující 0,5 g Coomassie Brilliant Blue R v 500 ml fixační lázně. Poté 14 hodin inkubovány ve fixační lázni. Nakonec byly gely uchovány v 7% kyselině octové. Následně byly u jednotlivých standardů odečteny relativní pohyblivosti v každém gelu (**R<sub>f</sub>** ; viz. obr. 2.4.2). Vynesemím 100 x [log (R<sub>f</sub> x 100)] proti koncentraci polyakrylamidového gelu byl vytvořen **Kalibrační graf I** (viz. obr. 3.4.19, str. 54) a směrnice každé závislosti byla označena jako retardační koeficient (**K<sub>R</sub>**). Pro každý standardní protein byl vypočítán individuální K<sub>R</sub>. Vynesemím záporné hodnoty K<sub>R</sub> proti relativní molekulové hmotnosti standardního proteinu byl vytvořen **Kalibrační graf II** (viz. obr. 3.4.20, str. 54), z kterého byly určeny relativní molekulové hmotnosti isoformem NADP-ME detekované v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*.

$$R_f = \frac{\text{vzdálenost standardního proteinu [cm]}}{\text{vzdálenost čela barvy [cm]}}$$

**Obr. 2.4.2** Definice relativní pohyblivosti (R<sub>f</sub>).

**Standardní proteiny** ( $\alpha$ -laktalbumin; karboanhydrasa; vaječný albumin; hovězího sérového albumin; kukuřičný NADP-ME) byly skladovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro použití byly proteiny resuspendovány 1 ml roztoku obsahující  $50\text{ mmol.l}^{-1}$  NaCl a  $1\text{ mmol.l}^{-1}$   $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (pH 7,0).

**Rostlinné extrakty** (viz. 2.4.3) byly smíšeny se vzorkovým pufr (v poměru 1:1) obsahujícím  $50\text{ mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl pufr; TEMED; 10% glycerol a  $0,25\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$  bromfenolová modř (pH 6,7). Vždy  $20\text{ }\mu\text{l}$  extraktu bylo aplikováno na čtyři gely různých koncentrací akrylamidu. Ihned po skončení elektroforézy byly gely inkubovány v lázni umožňující specifickou detekci NADP-ME (viz. 2.4.6).

Nativní elektroforéza byla provedena v 3% zaostřovacím gelu obsahujícím 3% akrylamid a N,N'-methylen-bis(akrylamid);  $126\text{ mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl pufr pH 6,8; 0,1% glycerol; 0,1% peroxidisíran amonný a TEMED. A v separačních gelech o různých koncentracích akrylamidu a N,N'-methylen-bis(akrylamidu). Dělení probíhalo v chladové místnosti při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po dosažení rozhraní mezi zaostřovacím a separačním gelem bylo počáteční napětí 70 V zvýšeno na 140 V. Elektrodotový pufr obsahoval 18,8 g glycinu; 3 g Tris a 10% glycerol v 1000 ml destilované vody (pH 8,3).

## 3 VÝSLEDKY

### 3.1 Studium isoformů NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum*

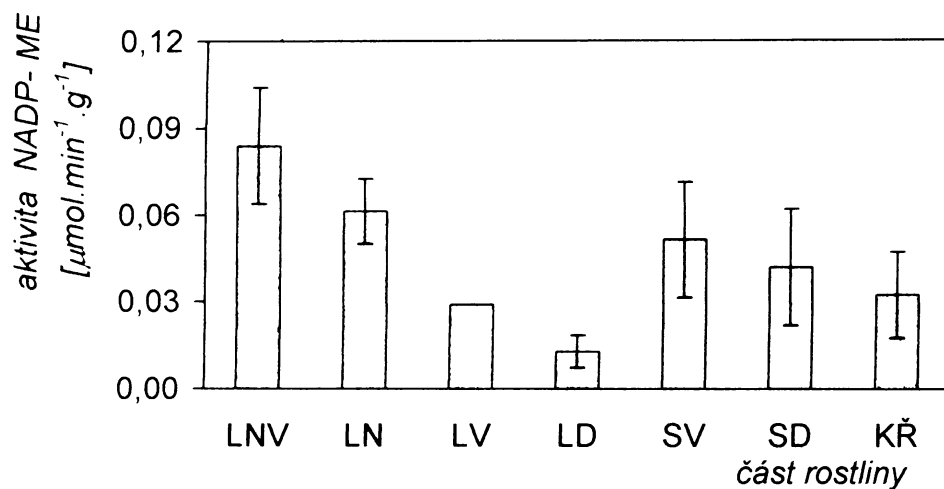
Cílem tohoto pokusu bylo sledovat zastoupení isoformů NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum* a stanovit aktivitu zejména NADP-ME, ale i PEPC a PPDK v jednotlivých rostlinných částech.

Šest rostlin *Nicotiana tabacum* kultivar Petit Havana SR1 bylo pěstováno za definovaných podmínek (viz. 2.4.1). Ve stáří rostlin dvanáct týdnů byl pokus ukončen a z různých částí rostlin – květy; nejvrchnější, vrchní, střední a dolní listy (viz. obr. 2.4.1-A; str. 24); vrchní a dolní části stonků a kořeny byly zhotoveny směsné vzorky (viz. 2.4.2). Ty byly použity pro přípravu extraktů (viz. 2.4.3), ve kterých pak byla stanovena aktivita enzymů NADP-ME, PEPC a PPDK (viz. 2.4.4) a koncentrace bílkovin (viz. 2.4.8). Rostlinné extrakty byly také použity pro elektroforetickou separaci proteinů za nedenaturujících i denaturujících podmínek (viz. 2.4.5).

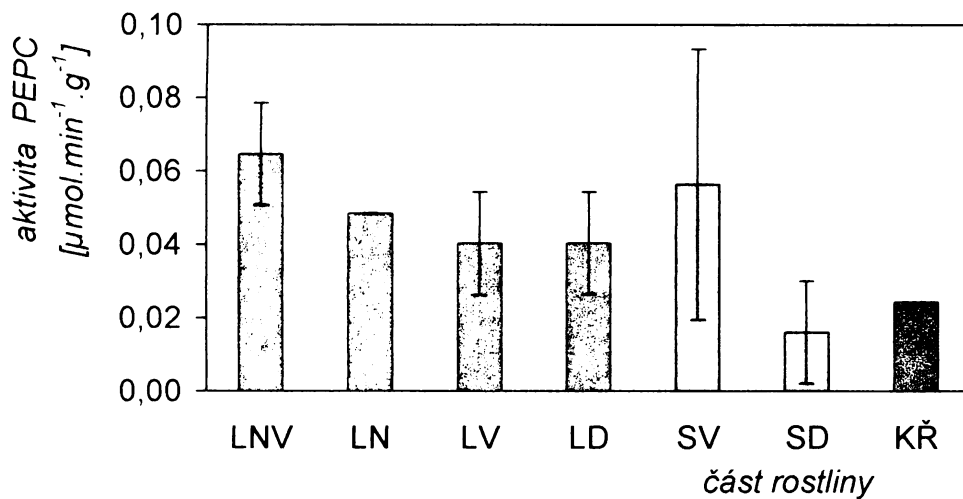
#### 3.1.1 Aktivita NADP-ME, PEPC a PPDK v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum*

Aktivita sledovaných enzymů byla stanovena (viz. 2.4.4) v extraktech a vypočítána ze změn absorbance při 340 nm. Aktivita je udána jako průměr tří měření. Enzymová aktivita byla vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu a také na množství bílkovin obsažených ve vzorcích, tedy jako specifická aktivita.

Aktivita NADP-ME (viz. obr. 3.1.1) a PEPC (viz. obr. 3.1.2) klesá od nejvrchnějších listů ke kořenům, podobně ve stoncích. Zatímco aktivita PPDK (viz. obr. 3.1.3) klesá pouze od vrchních částí stonků ke kořenům, v listech je aktivita PPDK vyšší, poměrně vysoká hodnota byla zjištěna i v dolních listech.

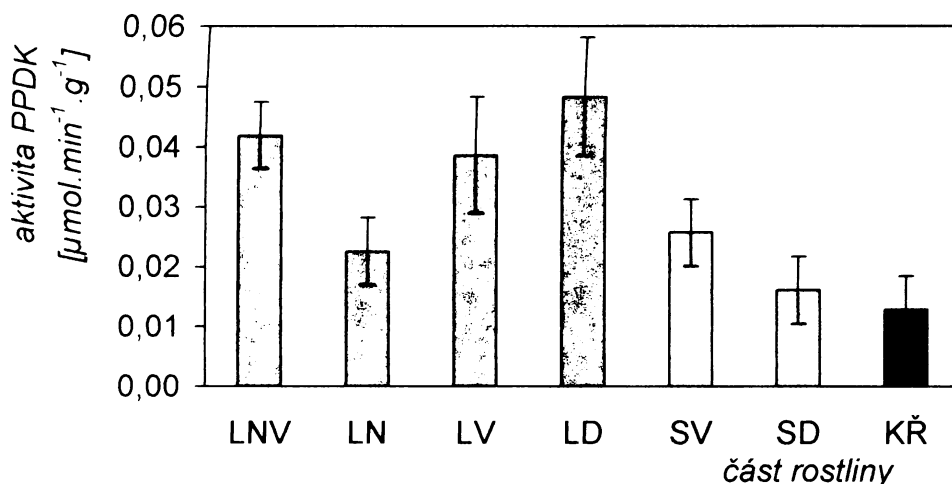


**Obr. 3.1.1** Aktivita **NADP-ME** vztažená na gram čerstvé hmotnosti v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum*. □ listy (LNV – nejvrchnější; LN – vrchní; LV - střední; LD – dolní) □ části stonků (SV – vrchní; SD – dolní) a □ kořeny.



**Obr. 3.1.2** Aktivita **PEPC** vztažená na gram čerstvé hmotnosti v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum*. □ listy (LNV – nejvrchnější; LN – vrchní; LV - střední; LD – dolní) □ části stonků (SV – vrchní; SD – dolní) a ■ kořeny.



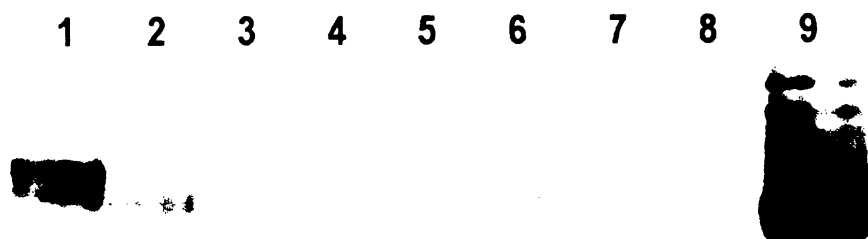


**Obr. 3.1.3** Aktivita PPKK vztážená na gram čerstvé hmotnosti v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum*. □ listy (LNV – nejvrchnější; LN – vrchní; LV – střední; LD – dolní) □ části stonků (SV – vrchní; SD – dolní) a ■ kořeny.

### 3.1.2 Výskyt isoform NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum*

Elektroforetická separace proteinů (viz. 2.4.5) byla provedena za účelem následné detekce isoform NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum*. Dělení proteinů v rostlinných extraktech probíhalo v 6% polyakrylamidovém gelu za nedennaturujících podmínek. Ihned po skončení elektroforézy byly gely inkubovány v lázni umožňující detekci NADP-ME (viz. 2.4.6). Pro porovnání byly naneseny extrakty zhotovené z listů kukuřice.

Ve všech listech, stoncích a kořenech rostliny *Nicotiana tabacum* i listech kukuřice byl detekován pouze jeden proužek (viz. obr. 3.1.4) svědčící pro výskyt pouze jedné isoformy NADP-ME. Tyto proužky vykazují ve všech zmíněných rostlinných částech shodnou elektroforetickou pohyblivost. Jedná se zřejmě o shodnou isoformu. Zatímco v květech se vyskytují zřejmě dvě isoformy (přítomny dva proužky). Isoforma s vyšší elektroforetickou pohyblivostí v květu vykazuje shodnou pohyblivost jako isoforma přítomná v ostatních částech rostliny *Nicotiana tabacum* a listech kukuřice.



**Obr. 3.1.4** Detekce **NADP-ME** po nativní elektroforéze v 6% polyakrylamidovém gelu. Aplikovány extrakty připravené ze směsných vzorků různých částí rostlin *Nicotiana tabacum* (dráha 1 až 8) a listů kukuřice.

**Dráha 1** - květy (39,9  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),

**Dráha 2** - nejvrchnější listy (20,6  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),

**Dráha 3** - vrchní listy (6,9  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),

**Dráha 4** - střední listy (7,2  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),

**Dráha 5** - dolní části stonků (4,9  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),

**Dráha 6** - vrchní části stonků (11,7  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),

**Dráha 7** - dolní části stonků (2,7  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),

**Dráha 8** - kořeny (30,5  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),

**Dráha 9** - listy kukuřice (18,0  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

### 3.1.3 Obsah bílkovin v různých částech rostliny *Nicotiana tabacum*

Množství rozpustných bílkovin ve vzorcích bylo stanoveno metodou podle Bradfordové (viz. 2.4.8) a přepočítáno na gram čerstvé hmotnosti jednotlivých rostlinných částí.

Obsah rozpustných bílkovin ve vzorcích a množství bílkovin vztažené na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu (viz. tabulka 3.1.1) klesá od nejvrchnějších listů k dolním. Nejmenší množství proteinů bylo stanoveno v kořenech, naopak nejvyšší množství bílkovin je přítomno ve vrchních částech stonků.

**Tabulka 3.1.1** Obsah rozpustných bílkovin ve vzorcích různých částí rostlin *Nicotiana tabacum* a množství bílkovin vztažených na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu.

část rostliny	obsah bílkovin	směrodatná odchylka	obsah bílkovin	směrodatná odchylka
	[mg·ml <sup>-1</sup> ]		[mg·g <sup>-1</sup> čerstvé hmotnosti]	
nejvrchnější listy	0,8	0,2	2,5	0,5
vrchní listy	0,7	0,2	2,0	0,6
střední listy	0,3	0,1	1,0	0,2
dolní listy	0,2	0,0	0,6	0,1
vrchní části stonků	1,2	0,2	3,6	0,6
dolní části stonků	0,4	0,2	1,3	0,6
kořeny	0,3	0,0	1,0	0,1

### 3.2 Studium isoformů NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*

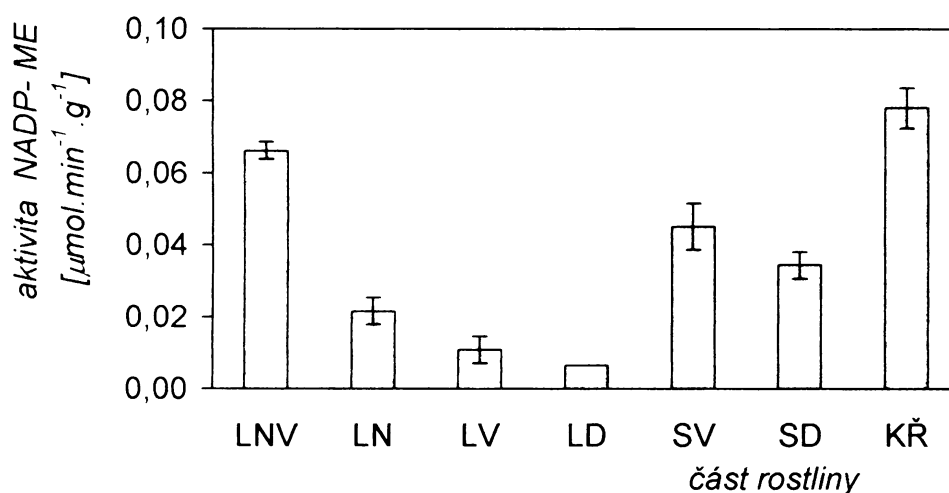
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, jak se liší isoenzymové složení NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*, zda a jakým způsobem se mění aktivita enzymů NADP-ME a také PEPC i PPK v závislosti na části rostliny *Nicotiana benthamiana*.

Třicet rostlin *Nicotiana benthamiana* bylo pěstováno za definovaných podmínek (viz. 2.4.1). Ve stáří rostlin deset týdnů byl pokus ukončen a z různých částí rostlin - nejvrchnější, vrchní, střední a dolní listy (viz. obr. 2.4.1-B; str. 24); vrchní a dolní části stonků a kořeny byly zhotoveny směsné vzorky (viz. 2.4.2). Ty byly použity pro přípravu extraktů (viz. 2.4.3), ve kterých pak byla stanovena aktivita NADP-ME, PEPC a PPK (viz. 2.4.4) a obsah bílkovin (viz. 2.4.8). Rostlinné extrakty byly také použity pro elektroforetickou separaci proteinů za nenedenaturujících i denaturujících podmínek (viz. 2.4.5).

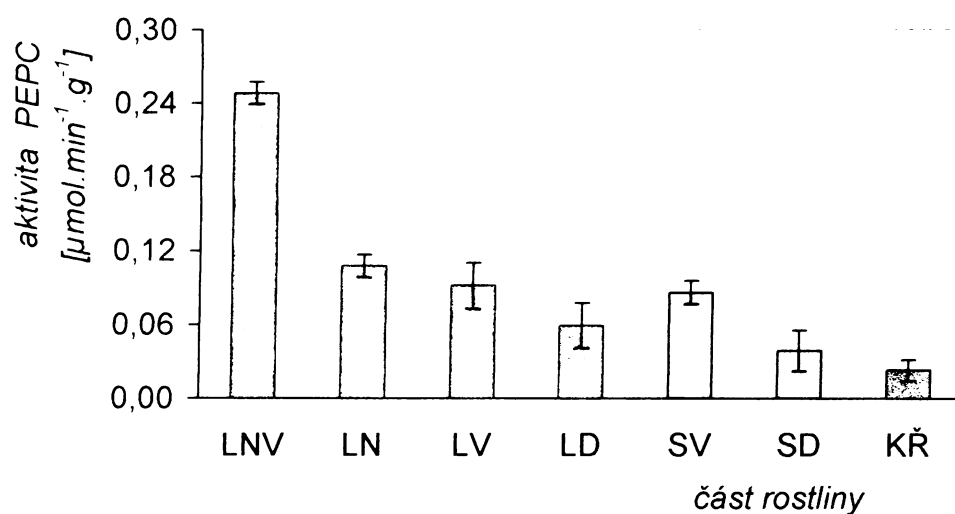
### 3.2.1 Aktivita NADP-ME, PEPC a PPDK v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*

Aktivita enzymů byla stanovena (viz. 2.4.4) v extraktech a vypočítána ze změny absorbance při 340 nm. Uvedená hodnota je průměr tří měření. Enzymová aktivita byla vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu a také na množství bílkovin obsažených ve vzorcích, tedy jako specifická aktivita.

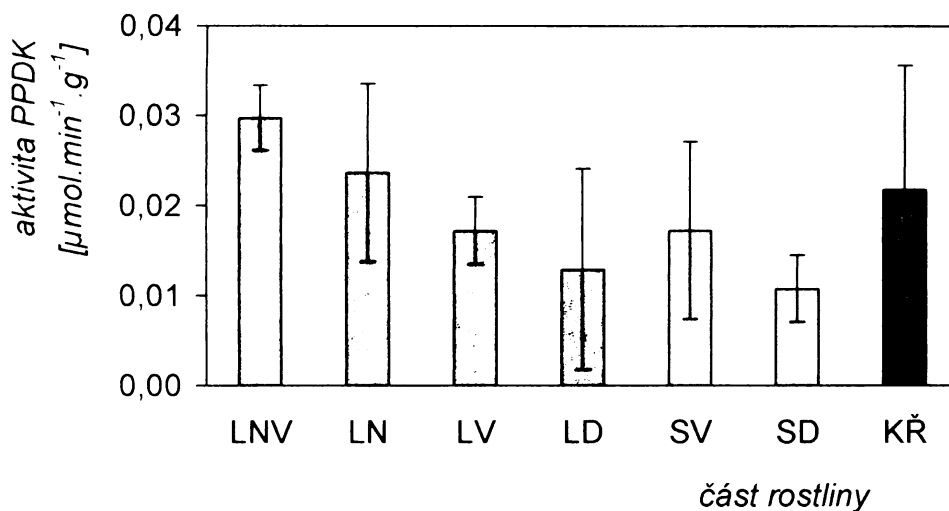
Aktivita NADP-ME (viz. obr. 3.2.5), PEPC (viz. obr. 3.2.6) i PPDK (viz. obr. 3.2.7) postupně v nadzemních částech klesá od nejvrchnějších ke spodním listům, stejně tak od vrchních částí stonků ke spodním. Zjištěná aktivita NADP-ME i PPDK v kořenech je poměrně vysoká, naopak aktivita PEPC je v kořenech *Nicotiana benthamiana* nízká.



**Obr. 3.2.5** Aktivita NADP-ME vztažená na gram čerstvé hmotnosti v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*. □ listy (LNV – nejvrchnější; LN – vrchní; LV – střední; LD – dolní) □ části stonků (SV – vrchní; SD – dolní) a □ kořeny.



**Obr. 3.2.6** Aktivita **PEPC** vztažená na gram čerstvé hmotnosti v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*. □ listy (LNV – nejvrchnější; LN – vrchní; LV – střední; LD – dolní) □ části stonků (SV – vrchní; SD – dolní) a ■ kořeny.



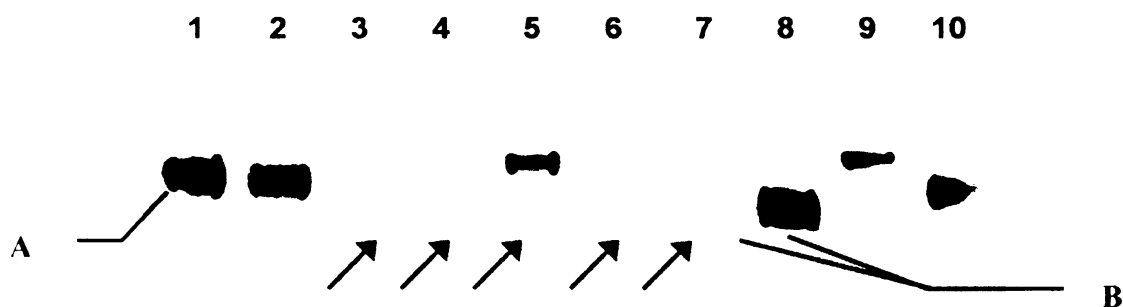
**Obr. 3.2.7** Aktivita **PPK** vztažená na gram čerstvé hmotnosti v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*. □ listy (LNV – nejvrchnější; LN – vrchní; LV – střední; LD – dolní) □ části stonků (SV – vrchní; SD – dolní) a ■ kořeny.

### 3.2.2 Výskyt isoformem NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*

Pro detekce isoenzymového složení NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana* byla provedena elektroforetická separace proteinů rostlinných extraktů (viz. 2.4.5) v 6% polyakrylamidovém gelu za nedenaturujících podmínek. Následovala inkubace gelů v lázni umožňující detekci NADP-ME (viz. 2.4.6).

Intenzita proužků je úměrná aktivitě NADP-ME. Masivní proužky odpovídají nejvyšší aktivitě NADP-ME, která je nejvyšší v nejvrchnějších a vrchních listech (viz. obr. 3.2.8). Přítomnost pouze jednoho proužku v nejvrchnějších a vrchních listech, ale i kořenech rostliny *Nicotiana benthamiana* svědčí pro přítomnost pouze jedné isoformy v těchto rostlinných částech. Pro porovnání byly nanášeny extrakty zhotovené z listů rostliny *Nicotiana tabacum* a ze semen i listů kukuřice. Také zde (listy kukuřice a rostliny *Nicotiana tabacum*) je patrný pouze jeden intenzivní proužek stejné elektroforetické pohyblivosti jako byl detekován v kořenech rostliny *Nicotiana benthamiana*. Isoforma přítomná v nejvrchnějších a vrchních listech vykazuje nižší elektroforetickou pohyblivost.

Ve středních a dolních listech, ale také ve stoncích jsou znatelné dva proužky, což naznačuje přítomnost dvou isoform tohoto enzymu.



**Obr. 3.2.8** Detekce NADP-ME po nativní elektroforéze v 6% polyakrylamidovém gelu. Aplikovány extrakty připravené ze směsných vzorků různých částí rostlin *Nicotiana benthamiana* (dráha 1 až 7), listů rostlin *Nicotiana tabacum*, listů a semen kukuřice.

**Dráha 1** – nejvrchnější listy (15,8  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),

- Dráha 2** - vrchní listy (7,6  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),  
**Dráha 3** - střední listy (6,5  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),  
**Dráha 4** - dolní listy (2,7  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),  
**Dráha 5** - vrchní části stonků (10,1  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),  
**Dráha 6** - dolní části stonků (4,1  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),  
**Dráha 7** - kořeny (6,7  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),  
**Dráha 8** - listy kukuřice (12,2  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),  
**Dráha 9** - semena kukuřice (18,0  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu),  
**Dráha 10** - listy *Nicotiana tabacum* (8,4  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

**A** - značí isoformy s nižší elektroforetickou pohyblivostí

**B** - značí isoformy s vyšší elektroforetickou pohyblivostí.

Šipky označují jednotlivé isoformy se stejnou elektroforetickou pohyblivostí ve středních a dolních listech, vrchních a dolních částech stonků a kořenech rostliny *Nicotiana benthamiana*.

### 3.2.3 Obsah bílkovin v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*

Množství rozpustných bílkovin ve vzorcích bylo stanoveno metodou podle Bradfordové (viz. 2.4.8) a přepočítáno na množství bílkovin vztažených na gram čerstvé hmotnosti jednotlivých rostlinných částí.

Obsah rozpustných bílkovin ve vzorcích a množství bílkovin vztažené na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu (viz. tabulka 3.2.2) klesá od nadzemních částí rostliny ke kořenům. V mladých vyvíjejících se listech je zastoupení proteinů nejvyšší.

**Tabulka 3.2.2** Obsah rozpustných bílkovin ve vzorcích různých částí rostlin *Nicotiana benthamiana* a množství bílkovin vztažených na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu.

část rostliny	obsah bílkovin	směrodatná odchylka	obsah bílkovin	směrodatná odchylka
	[ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]		[ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmotnosti]	
nejvrchnější listy	6,6	1,4	10,7	0,7
vrchní listy	1,7	0,2	4,1	1,2
střední listy	1,7	0,1	3,7	0,5
dolní listy	0,9	0,3	1,8	0,7
vrchní části stonků	0,5	0,1	1,3	0,3
dolní části stonků	0,4	0,1	0,8	0,2
kořeny	0,5	0,0	0,7	0,6

### 3.3 Vliv virové infekce na NADP-ME, PEPC a PPK

V tomto pokuse bylo použito 50 rostlin *Nicotiana benthamiana* a stejné množství transgenních rostlin *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro virový nestrukturní protein HC-Pro A viru bramboru (PVA). Ve stáří čtyř týdnů byla polovina rostlin infikována Y virem bramboru kmene NTN (PVY<sup>NTN</sup>) a druhá byla použita jako kontrolní (viz. 2.4.1). Rostliny *Nicotiana benthamiana* byly tedy rozděleny na 25 kontrolních rostlin a 25 infikovaných PVY<sup>NTN</sup>. Stejně tak tomu bylo i u transgenních rostlin. Kontrolní rostliny nebyly infikovány žádným virem a byly pěstovány odděleně od infikovaných.

Desátý den infekce byly ve všech skupinách odebrány květy i první plně vyvinuté listy a byly z nich zhotoveny směsné vzorky (viz. 2.4.2). Sedmnáctý den byl pokus ukončen a byly odebrány vzorky z různých částí rostlin (květy, plně vyvinuté listy, stonky a kořeny). Směsné vzorky byly použity pro zhotovení rostlinných extraktů (viz. 2.4.3), v kterých byla stanovena aktivita NADP-ME, PEPC a PPK (viz. 2.4.4) i množství proteinů (viz. 2.4.8). Proteiny extraktů byly separovány elektroforézou za nedenaturujících i denaturujících podmínek (viz. 2.4.5).

Obsah virových proteinů v infikovaných rostlinách byl ověřen imunochemicky (metodou DAS-ELISA).

#### 3.3.1 Relativní obsah viru v rostlinách *Nicotiana benthamiana*

Relativní obsah PVY<sup>NTN</sup> v infikovaných rostlinách byl stanoven imunochemickou metodou DAS-ELISA pomocí protilátek proti virovému obalovému proteinu (viz. 2.4.7). Obsah viru byl stanoven ve směsných vzorcích vrchních listů rostlin. Absorbance při 405 nm je přímo úměrná množství virových částic a konkrétní hodnoty jsou uvedeny v tabulce (viz. tabulka 3.3.3). V kontrolních rostlinách nebyla detekována přítomnost virových částic. V infikovaných rostlinách se množství virových částic zvyšuje v závislosti na době po inokulaci, 17. den je vyšší než 10. den infekce. Nebyl zaznamenán výrazný rozdíl mezi obsahem viru v rostlinách *Nicotiana benthamiana* a v transgenních rostlinách.



**Tabulka 3.3.3** Relativní obsah PVY<sup>NIN</sup> 10. a 17. den infekce u rostlin *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlin s vneseným genem pro HC-Pro protein. Stanoveno metodou DAS-ELISA. Číselné hodnoty udávají absorbanci při 405 nm.

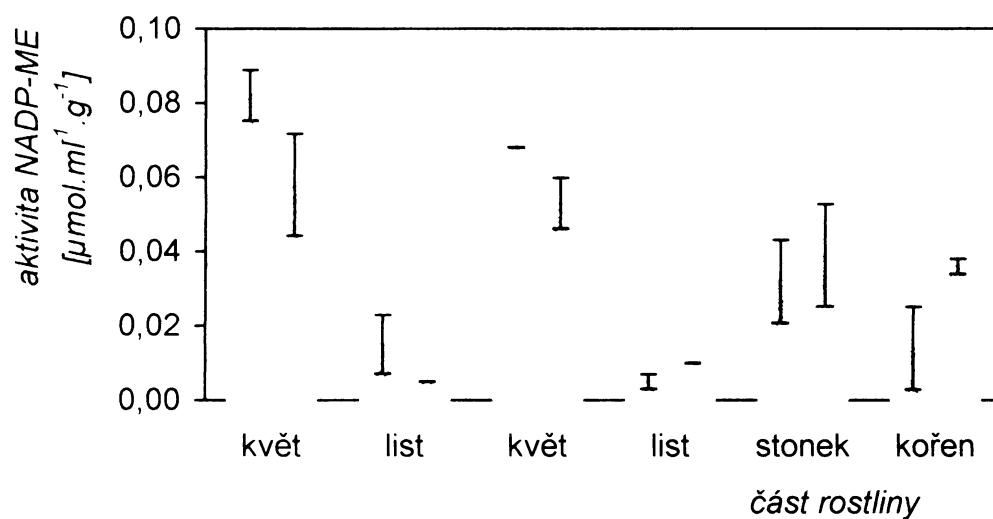
	kontrolní rostliny	10.den infekce	17. den infekce
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,000	0,014	0,089
<i>Nicotiana benthamiana</i> (HC-Pro)	0,000	0,045	0,123

### 3.3.2 Vliv virové infekce na aktivitu NADP-ME v rostlinách *Nicotiana benthamiana*

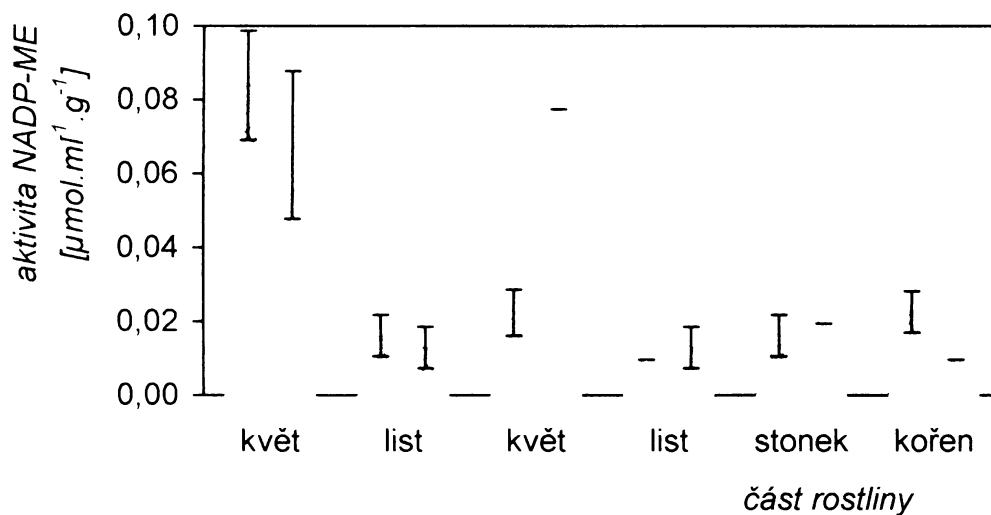
Aktivita NADP-ME byla stanovena (viz. 2.4.4) v extraktech připravených ze směsných vzorků různých částí rostlin *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlin.

Výsledná hodnota aktivity NADP-ME byla vztažena na množství rozpustných bílkovin v rostlinných extraktech, tedy jako specifická aktivita a na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu.

Aktivita NADP-ME v infikovaných rostlinách byla porovnána s aktivitou NADP-ME v kontrolních rostlinách (viz. obr. 3.3.9 – rostliny *Nicotiana benthamiana*; obr. 3.3.10 – transgenní rostliny). Nejvyšší aktivita NADP-ME byla stanovena 10. den infekce v květech obou sledovaných druhů rostlin. V ostatních rostlinných částech byla zjištěna nižší aktivita NADP-ME. V transgenních rostlinách došlo 17. den virové infekce k výraznému nárůstu aktivity NADP-ME v květech a to až na 350 % v porovnání s kontrolními rostlinami. V ostatních rostlinných částech není aktivita NADP-ME působením virové infekce výrazně ovlivněna (není rozdíl mezi kontrolními a infikovanými rostlinami). V rostlinách *Nicotiana benthamiana* byla 17. den infekce zjištěna zvýšená aktivita ve stoncích a kořenech. V kořenech transgenních rostlin nebylo zvýšení zaznamenáno.



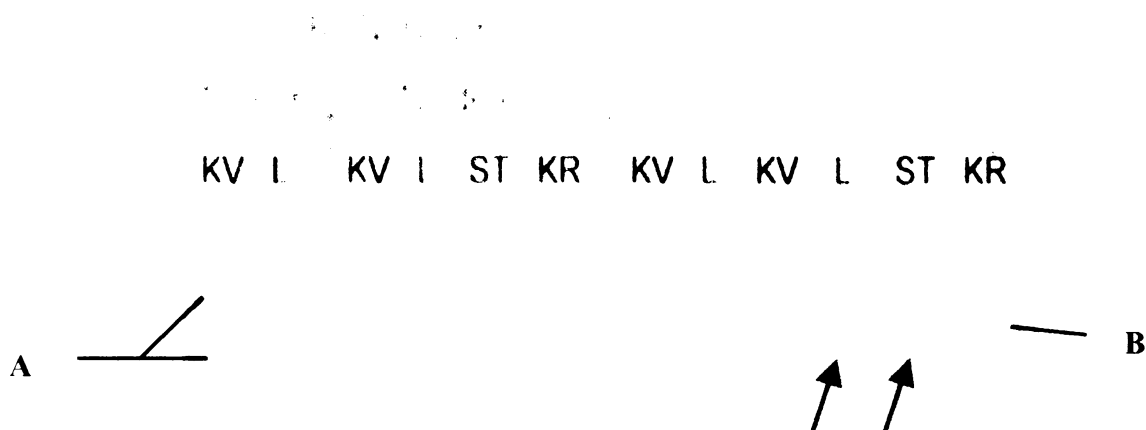
**Obr. 3.3.9** Aktivita **NADP-ME** vztažená na čerstvou hmotnost v různých částech kontrolních a infikovaných PVY<sup>NIN</sup> rostlin *Nicotiana benthamiana*: kontrolní rostliny, 10.den a 17. den infekce; infikované PVY<sup>NIN</sup> rostliny, 10. den a 17.den infekce.



**Obr. 3.3.10** Aktivita **NADP-ME** vztažená na čerstvou hmotnost v různých částech kontrolních a infikovaných PVY<sup>NIN</sup> rostlin *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro HC-Pro: kontrolní rostliny, 10.den a 17. den infekce; infikované PVY<sup>NIN</sup> rostliny, 10. den a 17.den infekce.

### 3.3.3 Vliv virové infekce na výskyt isoformů NADP-ME v rostlinách *Nicotiana benthamiana*

Nativní elektroforetické separace v nedenaturujícím prostředí umožňují následnou detekci NADP-ME přímo v gelu. Detekce NADP-ME byla provedena inkubací gelu ve specifické barvicí lázni (viz. 2.4.6). Počet barevných proužků v dané dráze odpovídá přítomnosti více isoformů NADP-ME v jedné rostlinné části. V souladu s výsledky předchozího pokusu (viz. 3.2.2) byly v listech i stoncích detekovány dva proužky a v kořenech pouze jeden. V tomto pokuse byly odebrány také květy, v kterých byly detekovány tři proužky. Nebyl zaznamenán rozdíl v isoenzymovém složení mezi rostlinami *Nicotiana benthamiana* a transgenními rostlinami (viz. obr. 3.3.11 a obr. 3.3.12). Podobně i mezi skupinami infikovaných a kontrolních rostlin.



**Obr. 3.3.11** Detekce NADP-ME po nativní elektroforéze smíšených vzorků různých částí rostlin *Nicotiana benthamiana* (kontrolních a infikovaných) v 6% polyakrylamidovém gelu.

Dráha 1,7 - květ, 10. den virové infekce (36,8  $\mu$ g; 39,5  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 2,8 - list, 10. den virové infekce (17,4  $\mu$ g; 10,7  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 3,9 - květ, 17. den virové infekce (20,9  $\mu$ g; 15,7  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 4,10 - list, 17. den virové infekce (38  $\mu$ g; 21,5  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

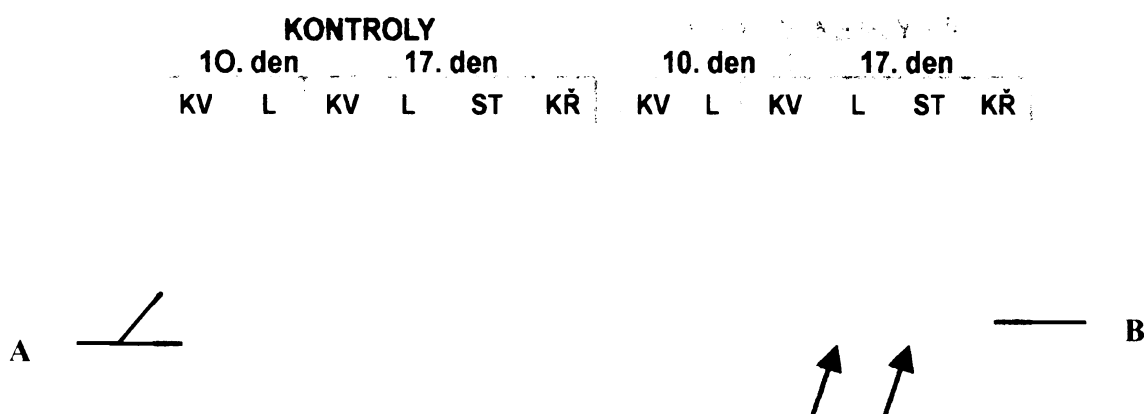
Dráha 5,11 - stonek, 17. den virové infekce (15  $\mu$ g; 16,4  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 6, 12 - kořen, 17. den virové infekce (4,2  $\mu\text{g}$ ; 5,7  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

**A** – označuje výskyt tří isoform (tři proužky) v květech

**B** – označuje výskyt pouze jedné isoformy (jeden proužek) v kořenech

Šipky označují výskyt dvou isoform (dva proužky) v listech a stoncích.



**Obr. 3.3.12** Detekce NADP-ME po nativní elektroforéze směsných vzorků různých částí transgenních rostlin (kontrolní a infikované) *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro HC-Pro protein v 6% polyakrylamidovém gelu.

Dráha 1,7 - květ, 10. den virové infekce (28,9  $\mu\text{g}$ , 24,4  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 2, 8 - list, 10. den virové infekce (19,9  $\mu\text{g}$ , 14,2  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 3, 9 - květ, 17. den virové infekce (23  $\mu\text{g}$ , 25,3  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 4,10 - list, 17. den virové infekce (25,7  $\mu\text{g}$ , 22,4  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 5, 11 - stonek, 17. den virové infekce (9,3  $\mu\text{g}$ , 8,6  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 6, 12 - kořen, 17. den virové infekce (6,2  $\mu\text{g}$ , 8,9  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

**A** – označuje výskyt tří isoform (tři proužky) v květech

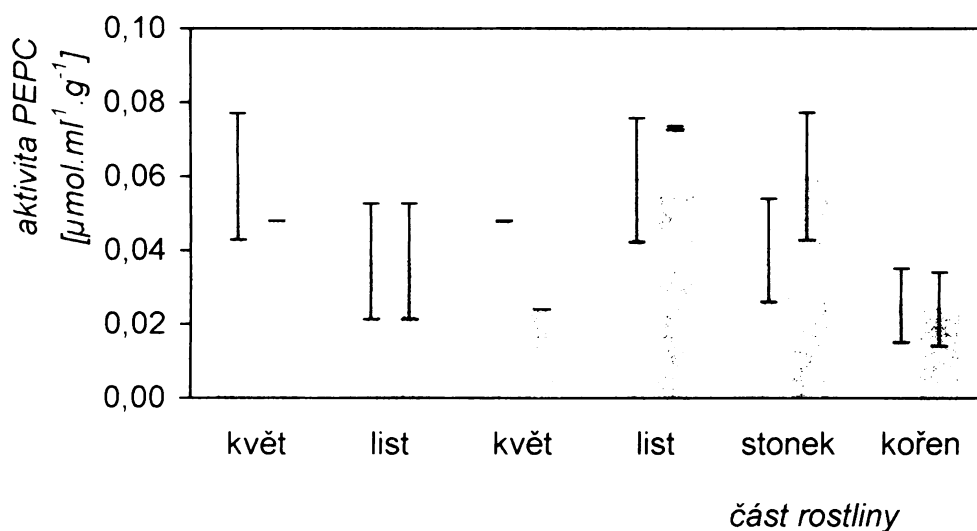
**B** – označuje výskyt pouze jedné isoformy (jeden proužek) v kořenech

Šipky označují výskyt dvou isoform (dva proužky) v listech a stoncích.

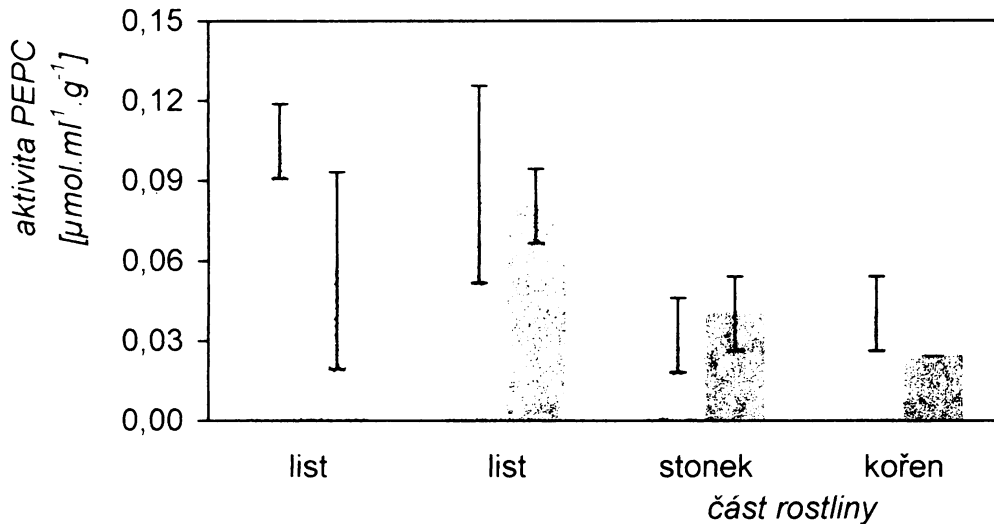
### 3.3.4 Vliv virové infekce na aktivitu PEPC v rostlinách *Nicotiana benthamiana*

Aktivita PEPC byla stanovena (viz. 2.4.4) v extraktech z rostlin *Nicotiana benthamiana* a z transgenních rostlin. Hodnota aktivity PEPC byla vztažena na množství rozpustných bílkovin v rostlinných extraktech, tedy jako specifická aktivita a na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu. Aktivita PEPC v infikovaných rostlinách byla porovnána s aktivitou PEPC v kontrolních rostlinách (viz. obr. 3.3.13 – rostliny *Nicotiana benthamiana*; obr. 3.3.14 – transgenní rostliny).

Aktivita PEPC v infikovaných rostlinách *Nicotiana benthamiana* (i transgenních rostlinách) se významně nelišila od aktivity PEPC v kontrolních rostlinách. 10. ani 17.den virové infekce, nebyl zjištěn rozdíl mezi aktivitami PEPC stanovenými v květech a listech rostlin *Nicotiana benthamiana*.



**Obr. 3.3.13** Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost v různých částech kontrolních a infikovaných PVY<sup>NIN</sup> rostlin *Nicotiana benthamiana*: kontrolní rostliny, 10.den a 17. den infekce; infikované PVY<sup>NIN</sup> rostliny, 10. den a 17.den infekce.

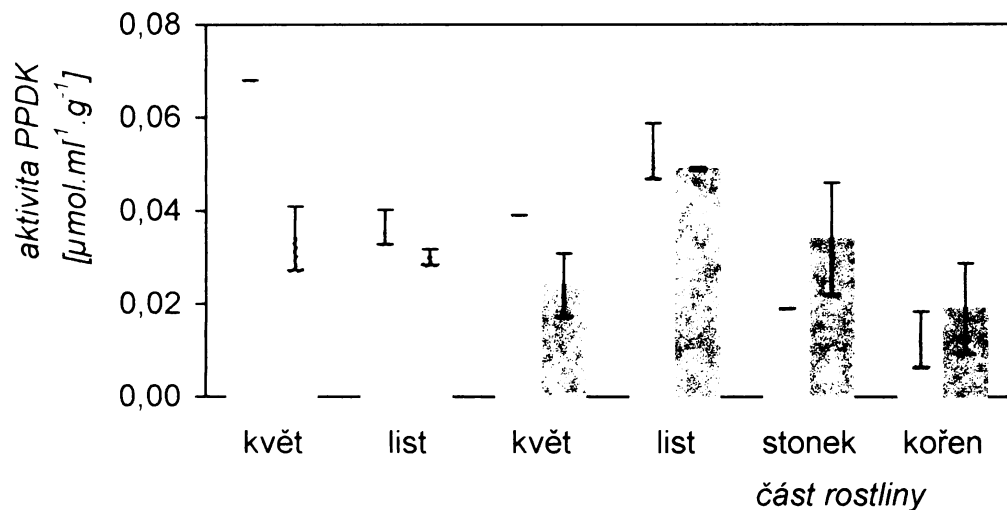


**Obr. 3.3.14** Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost v různých částech kontrolních a infikovaných PVY<sup>NIN</sup> rostlin *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro HC-Pro: kontrolní rostliny, 10.den a 17. den infekce; infikované PVY<sup>NIN</sup> rostliny, 10. den a 17.den infekce.

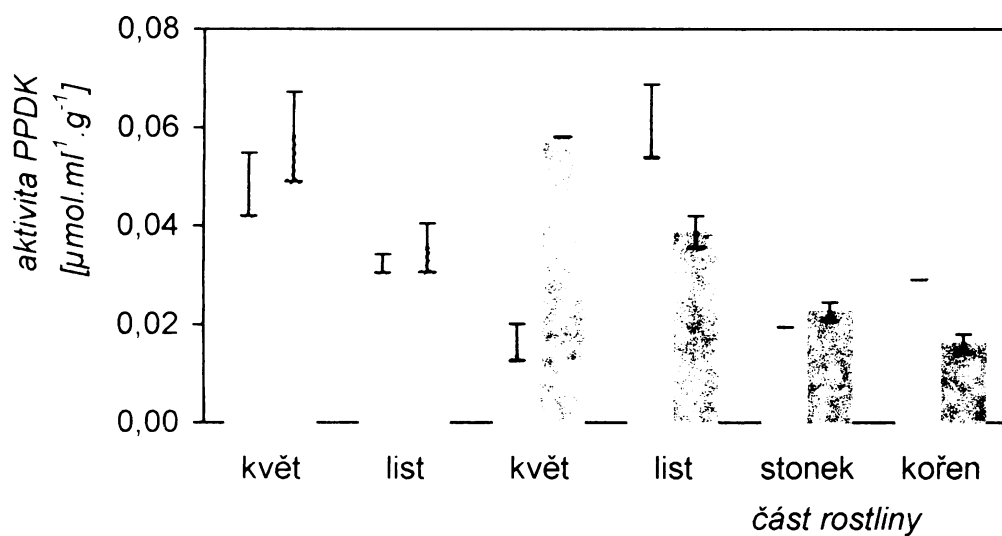
### 3.3.5 Vliv virové infekce na aktivitu PPDK v rostlinách *Nicotiana benthamiana*

V rostlinných extraktech byla stanovena aktivita PPDK (viz. 2.4.4). Enzymová aktivita byla vztažena na množství rozpustných proteinů v extraktu a na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu. Aktivita PPDK v infikovaných PVY<sup>NIN</sup> rostlinách byla porovnána s aktivitou PPDK v kontrolních rostlinách (viz. obr. 3.3.15 – rostliny *Nicotiana benthamiana*; obr. 3.3.16 – transgenní rostliny).

V infikovaných rostlinách *Nicotiana benthamiana* není aktivita PPDK působením virové infekce výrazně ovlivněna a to ve všech rostlinných částech. Stanovení 10. a 17. den virové infekce se také neliší. V transgenních rostlinách došlo 17. den infekce k nárůstu aktivity PPDK v květech infikovaných rostlin (na 350 % v porovnání s kontrolními rostlinami), v ostatních rostlinných částech nebyl vliv infekce zaznamenán.



**Obr. 3.3.15** Aktivita **PPDK** vztažená na čerstvou hmotnost v různých částech kontrolních a infikovaných PVY<sup>NIN</sup> rostlin *Nicotiana benthamiana*: kontrolní rostliny, 10.den a 17. den infekce; infikované PVY<sup>NIN</sup> rostliny, 10. den a 17.den infekce.



**Obr. 3.3.16** Aktivita **PPDK** vztažená na čerstvou hmotnost v různých částech kontrolních a infikovaných PVY<sup>NIN</sup> rostlin *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro HC-Pro: kontrolní rostliny, 10.den a 17. den infekce; infikované PVY<sup>NIN</sup> rostliny, 10. den a 17.den infekce.

### 3.3.6 Vliv virové infekce na množství proteinů v rostlinách *Nicotiana benthamiana*

Obsah proteinů v různých částech rostlin (ve všech sledovaných skupinách) byl stanoven metodou podle Bradfordové (viz. 2.4.8). Množství rozpustných bílkovin ve vzorcích bylo přepočítáno na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu.

Jak vyplývá z hodnot uvedených v tabulkách (tabulka 3.3.4 - rostliny *Nicotiana benthamiana*, tabulka 3.3.5 – transgenní rostliny), množství proteinů se snižuje od horních nadzemních částí směrem ke kořenům, maxima dosahují v květech. Vlivem infekce PVY<sup>NIN</sup> se jejich obsah významně nemění (v rostlinách *Nicotiana benthamiana* i transgenních rostlinách). Pouze 17.den infekce byla stanovena vyšší množství proteinů v květech infikovaných transgenních rostlin.

**Tabulka 3.3.4** Množství rozpustných bílkovin 10. a 17. den virové infekce vztahované na gram čerstvé hmotnosti v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*.

kontrolní rostliny				
<i>Nicotiana benthamiana</i>				
část rostliny	obsah	směrodatná	obsah	směrodatná
	bílkovin	odchylka	bílkovin	odchylka
	[mg.g <sup>-1</sup> ]		[mg.g <sup>-1</sup> ]	
<b>10. den</b>				
květ	4,65	0,00	4,65	0,00
list	2,52	0,20	1,89	0,42
<b>17. den</b>				
květ	3,13	1,06	2,34	1,70
list	3,32	0,00	2,36	0,61
stonek	1,63	0,09	1,38	0,48
kořen	0,52	0,31	0,66	0,02



**Tabulka 3.3.5** Množství rozpustných bílkovin 10. a 17.den virové infekce vztažené na gram čerstvé hmotnosti v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro virový nestrukturní protein HC-Pro.

kontrolní rostliny				
<i>Nicotiana benthamiana</i> (HC-Pro)				
část rostliny	obsah	směrodatná	obsah	směrodatná
	bílkovin	odchylka	bílkovin	odchylka
	[mg.g <sup>-1</sup> ]		[mg.g <sup>-1</sup> ]	
<b>10. den</b>				
květ	4,34	0,00	3,66	0,00
list	2,98	0,00	2,13	0,00
<b>17. den</b>				
květ	1,59	0,00	3,80	0,00
list	3,85	0,00	3,37	0,00
stonek	1,40	0,21	1,30	0,45
kořen	0,92	0,00	1,34	0,44

### 3.4 Studium NADP-ME, PEPC a PPDK v průběhu virové infekce

Cílem tohoto pokusu bylo podrobnější sledování vlivu virové infekce na sledované enzymy NADP-ME, PEPC a PPDK.

Pro tento experiment bylo použito 70 rostlin *Nicotiana benthamiana* a 60 transgenních rostlin *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro nestrukturní virový HC-Pro protein. Rostliny byly pěstovány za definovaných podmínek (viz. 2.4.1) ve skleníku. Ve stáří sedmi týdnů byla polovina rostlin infikována PVY<sup>N1N</sup> (označené jako infikované). Ve všech skupinách rostlin byly v průběhu virové infekce (0. až 26. den) třikrát týdně odebírány první plně vyvinuté listy. 26. den byl pokus ukončen a byly odebrány různé části rostlin - květy, listy, stonky a kořeny (viz. 2.4.2).

### 3.4.1 Relativní obsah viru v průběhu virové infekce v rostlinách *Nicotiana benthamiana*

Relativní obsah virových částic PVY<sup>NTN</sup> přítomných v infikovaných rostlinách *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlinách *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro HC-Pro protein byl stanoven imunochemickou metodou DAS-ELISA (viz. 2.4.7). Pro stanovení byly použity směsné vzorky vrchních listů rostlin. Hodnoty absorbance při 405 nm jsou přímo úměrné množství virových částic a jsou uvedeny v tabulce (viz. tabulka 3.4.6). V kontrolních rostlinách nebyla detekována přítomnost PVY<sup>NTN</sup>. Množství virových proteinů v infikovaných rostlinách roste v závislosti na době po inokulaci virem.

**Tabulka 3.4.** Relativní obsah PVY<sup>NTN</sup> v průběhu infekce u rostlin *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlin s vneseným genem pro HC-Pro protein. Stanoveno metodou DAS-ELISA. Číselné hodnoty udávají absorbanci při 405 nm.

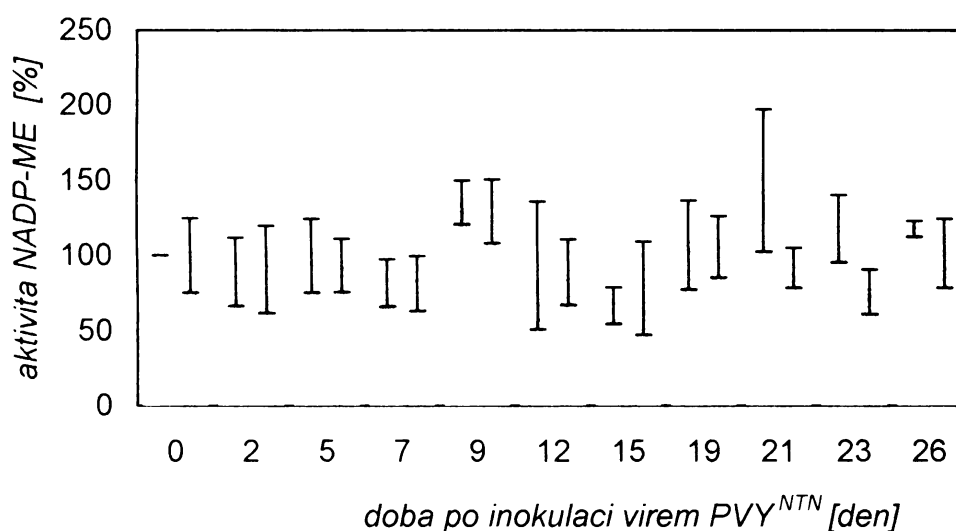
	kontrolní rostliny	Doba po inokulaci virem PVY <sup>NTN</sup> [den]				
		2	5	9	15	21
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,000	0,004	0,007	0,010	0,075	0,140
	kontrolní rostliny	2	5	9	19	26
<i>Nicotiana benthamiana</i> (HC-Pro)	0,000	0,004	0,022	0,042	0,036	0,075

### 3.4.2 Sledování aktivity NADP-ME v průběhu virové infekce

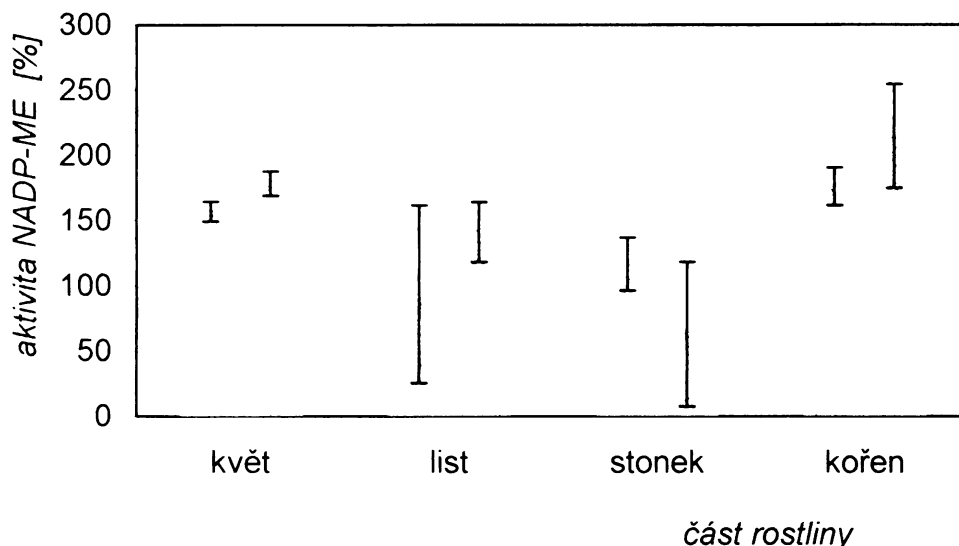
Aktivita NADP-ME (viz. 2.4.4) byla stanovena v extraktech připravených ze směsných vzorků prvních plně vyvinutých listů odebíraných 0. až 26. den infekce. Enzymová aktivita byla vztažena na množství proteinů (specifická aktivita) a na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu. 26. den infekce byly odebrány různé části rostlin - květy, listy, stonky a kořeny. Aktivita NADP-ME v infikovaných rostlinách byla porovnána s aktivitou NADP-ME v kontrolních rostlinách a byla procentuálně vyjádřena. 100 % je aktivita NADP-ME ve zdravých kontrolních rostlinách.

Působením virové infekce nedochází k významnému ovlivnění aktivity NADP-ME v rostlinách *Nicotiana benthamiana*, ani v transgenních rostlinách (viz. obr. 3.4.17). Není rozdíl v průběhu virové infekce v obou druzích sledovaných rostlin.

26. den infekce dochází k mírnému zvýšení aktivity NADP-ME ve všech rostlinných částech, mimo listů rostlin *Nicotiana benthamiana* a stonků transgenních rostlin (viz. obr. 3.4.18). Nejvyšší aktivita byla zaznamenána v kořenech obou typů rostlin. V infikovaných PVY<sup>NTN</sup> rostlinách *Nicotiana benthamiana* došlo k nárůstu aktivity NADP-ME v kořenech na 180 % oproti kontrolním rostlinám a v transgenních rostlinách na 215 %.



**Obr. 3.4.17** Aktivita **NADP-ME** vztažená na čerstvou hmotnost vyjádřená v % v rostlinách *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlinách s vneseným genem pro HC-Pro protein. Aktivita NADP-ME ve zdravých kontrolních rostlinách je rovna 100 %. Sledováno 0. až 26. den virové infekce.



**Obr. 3.4.18** Aktivita **NADP-ME** vztažená na čerstvou hmotnost vyjádřená v % v různých částech rostlin *Nicotiana benthamiana* a transgenických rostlin s vneseným genem pro HC-Pro protein. Aktivita NADP-ME ve zdravých kontrolních rostlinách je rovna 100 %. Stanoveno 26. den virové infekce.

### 3.4.3 Stanovení relativních molekulových hmotností jednotlivých isoformů NADP-ME

Byla stanovena molekulová hmotnost isoformů NADP-ME vyskytujících se v různých částech rostlin *Nicotiana benthamiana* a transgenických rostlin *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro virový protein HC-Pro. Proteiny rostlinných extraktů připravené ze směsných vzorků (viz. 2.4.2) květů, listů, stonků i kořenů kontrolních a infikovaných PVY<sup>N<sup>ITN</sup></sup> rostlin byly elektroforeticky separovány v nedenedurujícím prostředí. Separace probíhala v gelech o čtyřech různých koncentracích akrylamidu. Ihned po skončení elektroforézy byly gely inkubovány v barvicí lázni pro detekci aktivity NADP-ME (viz. 2.4.6).

Pro výpočet relativních molekulových hmotností jednotlivých isoformů NADP-ME bylo využito komerčních standardů firmy Sigma pro nativní elektroforézu v různě koncentrovaných akrylamidových gelech (viz. 2.4.9). Kalibrační graf I (viz. 3.4.19) byl sestaven na základě naměřených relativních pohyblivostí jednotlivých standardů ( $R_f$ ; viz. obr. 2.4.2, str. 29) v gelech o různé koncentraci akrylamidu. Vzniklé

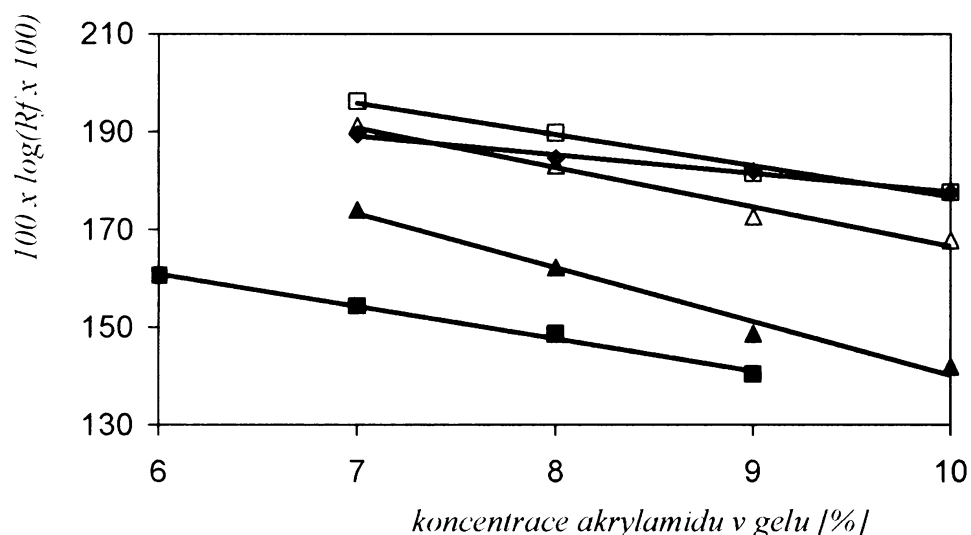
body byly proloženy přímkovou závislostí. Směrnice každé závislosti byla označena jako retardační koeficient ( $K_R$ , viz. 2.4.9). Záporná hodnota  $K_R$  byla vynesena proti relativní molekulové hmotnosti standardního proteinu - Kalibrační graf II (viz. 3.4.20), z kterého byly určeny přibližné relativní molekulové hmotnosti isoform NADP-ME detekované v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana*.

Počet proužků odpovídá zřejmě počtu isoform NADP-ME přítomných v jednotlivých částech rostlin. V kořenech obou typů sledovaných rostlin byl detekován pouze jeden proužek (viz. obr. 3.4.21 – rostliny *Nicotiana benthamiana* a obr. 3.4.22 – transgenní rostliny). Tato isoforma se vyskytuje ve všech sledovaných rostlinných částech, neboť ve všech rostlinných částech byl detekován proužek se stejnou elektroforetickou pohyblivostí. Je přítomna i v listech kukuřice, které byly aplikovány do gelu pro porovnání. Dva proužky jsou patrné v dospělých listech a stoncích. Druhý proužek (s nižší elektroforetickou pohyblivostí než předešlý) se vyskytuje i v květech, kde byla navíc detekována třetí isoforma. V transgenních rostlinách byly výsledky detekce shodné.

Nebyl zaznamenán rozdíl mezi zdravými a kontrolními rostlinami. Z obrázků (viz. obr. 3.4.21 a obr. 3.4.22) je patrné, že se neliší počet proužků ani jejich intenzita. Přibližné hodnoty relativních molekulových hmotností jednotlivých isoform v nativním stavu jsou uvedeny v tabulce (viz. tabulka 3.4.7). Čísla v závorkách udávají velikost jedné podjednotky (v případě tetrameru).

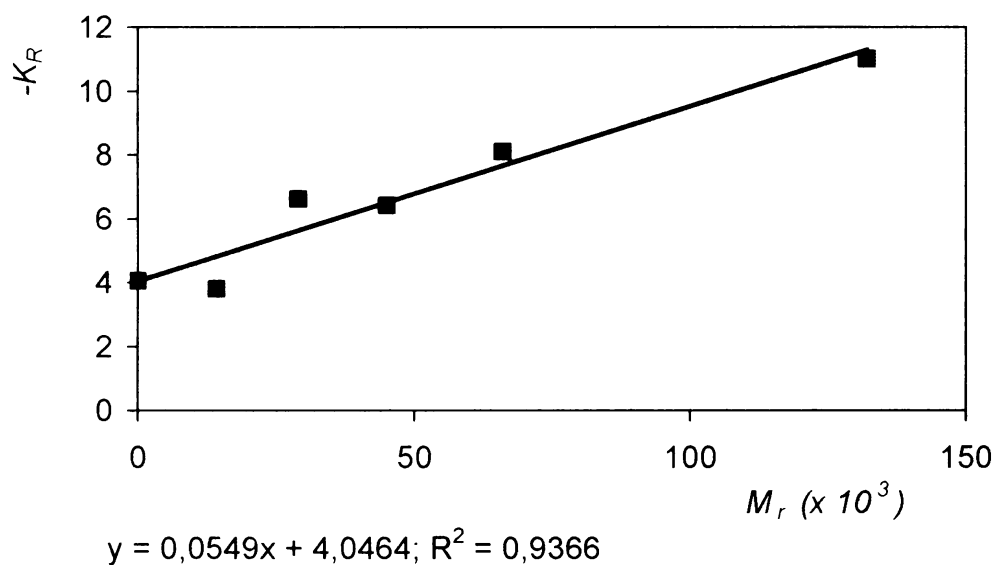
**Tabulka 3.4.7** Přítomnost isoform NADP-ME v květech, listech, stoncích a kořenech rostlin *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlin s vneseným genem pro HC-Pro protein. Číslo udává přibližnou relativní molekulovou hmotnost nativního proteinu, v závorce je uvedena  $M_r$  monomeru v případě, že se jedná o tetramer. + / - značí přítomnost / nepřítomnost jednotlivých isoform.

část rostliny	Relativní molekulová hmotnost ( $M_r$ )		
	272 000 (68 000)	248 000 (62 000)	136 000 (34 000)
květ	+	+	+
list	+	+	-
stonek	+	+	-
kořen	-	+	-



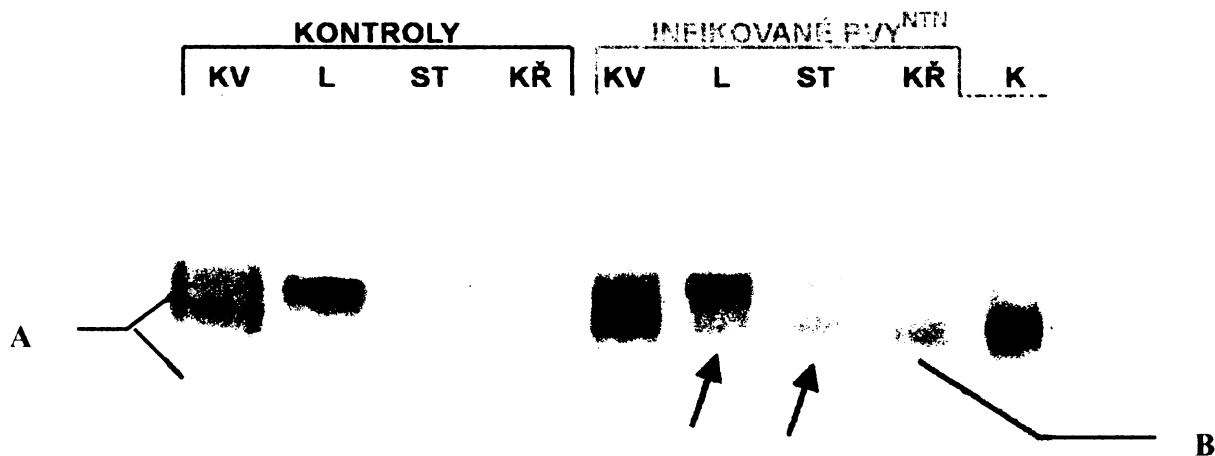
**Obr. 3.4.19 Kalibrační graf I** použitý pro výpočet relativních molekulových hmotností isoformů NADP-ME v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana* a transgenní rostliny Sestrojen na základě rozdílné relativní pohyblivosti ( $R_f$ ) komerčních standardů pro nativní elektroforézu v různě koncentrovaných polyakrylamidových gelech. Osa y -  $100 \times [\log(R_f \times 100)]$ ; osa x - koncentrace akrylamidu v gelu.

- - vaječný albumin
- △ - hovězí sérový albumin (monomer)
- ▲ - hovězí sérový albumin (dimer)
- - karboanhydrasa
- ◆ - α-laktalbumin



**Obr. 3.4.20 Kalibrační graf II** použitý pro výpočet relativních molekulových hmotností ( $M_r$ ) isoform NADP-ME detekovaných v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana* a transgenní rostliny.

Osa y - záporná hodnota retardačního koeficientu ( $K_R$ ); osa x - relativní molekulová hmotnost ( $M_r \cdot 10^3$ ).  $R^2$  - koeficient determinace.



**Obr. 3.4.21** Detekce NADP-ME po nativní elektroforéze směsných vzorků různých částí rostlin *Nicotiana benthamiana* (kontrolních a infikovaných) a listů kukuřice v 6% polyakrylamidovém gelu. Stanoveno 26. den virové infekce.

Dráha 1 a 5 – květ kontrolní a infikovaný (35,3  $\mu\text{g}$ ; 34,0  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 2 a 6 – list kontrolní a infikovaný (25,3  $\mu\text{g}$ ; 23,7  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 3 a 7 – stonek kontrolní a infikovaný (17,1  $\mu\text{g}$ ; 19,3  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

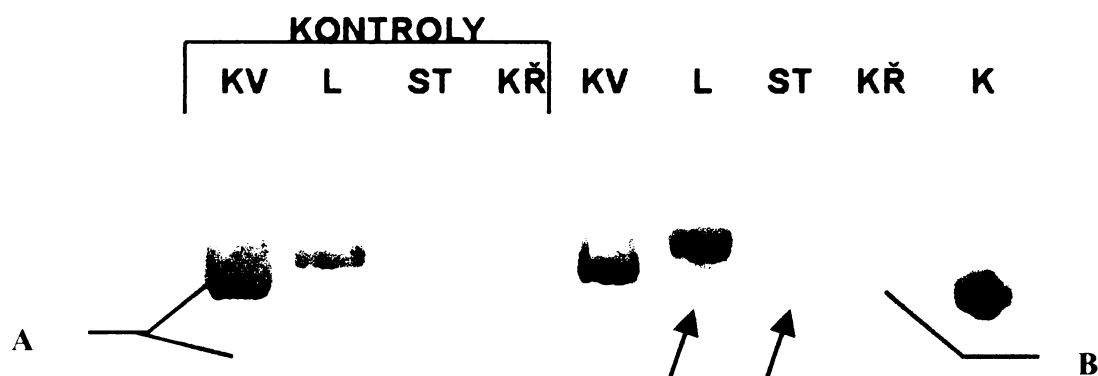
Dráha 6 a 8 – kořen kontrolní a infikovaný (13,9  $\mu\text{g}$ ; 14,5  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha 9 – list kukuřice (26,7  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)

**A** – označuje výskyt tří isoform (tři proužky) v květech

**B** – označuje výskyt pouze jedné isoformy (jeden proužek) v kořenech

Šipky označují výskyt dvou isoform (dva proužky) v listech a stoncích.



**Obr. 3.4.22** Detekce **NADP-ME** po nativní elektroforéze směsných vzorků různých částí transgenní rostliny *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro HC-Pro protein (kontrolních a infikovaných) a listů kukuřice v 6% polyakrylamidovém gelu. Stanoveno 26. den virové infekce.

Dráha **1 a 5** – květ kontrolní a infikovaný (39,4  $\mu$ g; 31,5  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha **2 a 6** – list kontrolní a infikovaný (27,3  $\mu$ g; 29,7  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha **3 a 7** – stoněk kontrolní a infikovaný (21,8  $\mu$ g; 22,2  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha **6 a 8** – kořen kontrolní a infikovaný (8,9  $\mu$ g; 13,3  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Dráha **9** – list kukuřice (31,8  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)

**A** – označuje výskyt tří isoform (tři proužky) v květech

**B** – označuje výskyt pouze jedné isoformy (jeden proužek) v kořenech

Šipky označují výskyt dvou isoform (dva proužky) v listech a stoncích

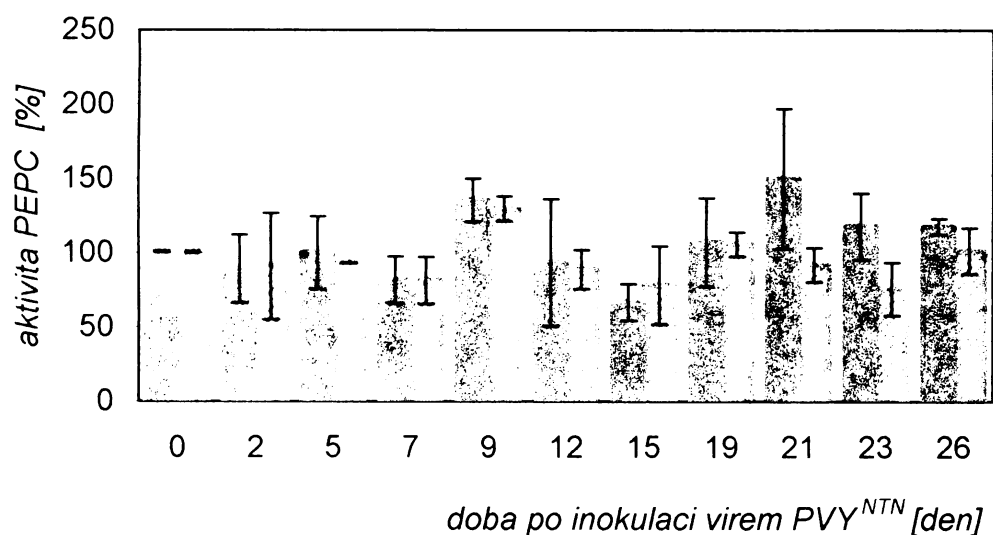
### 3.4.4 Sledování aktivity PEPC v průběhu virové infekce

Aktivita PEPC byla stanovena (viz. 2.4.4) v extraktech připravených z pokusných rostlin. V den ukončení pokusu (26. den infekce) byly odebrány různé části rostlin (květy, listy, stonky a kořeny). Aktivita PEPC v infikovaných rostlinách byla porovnána

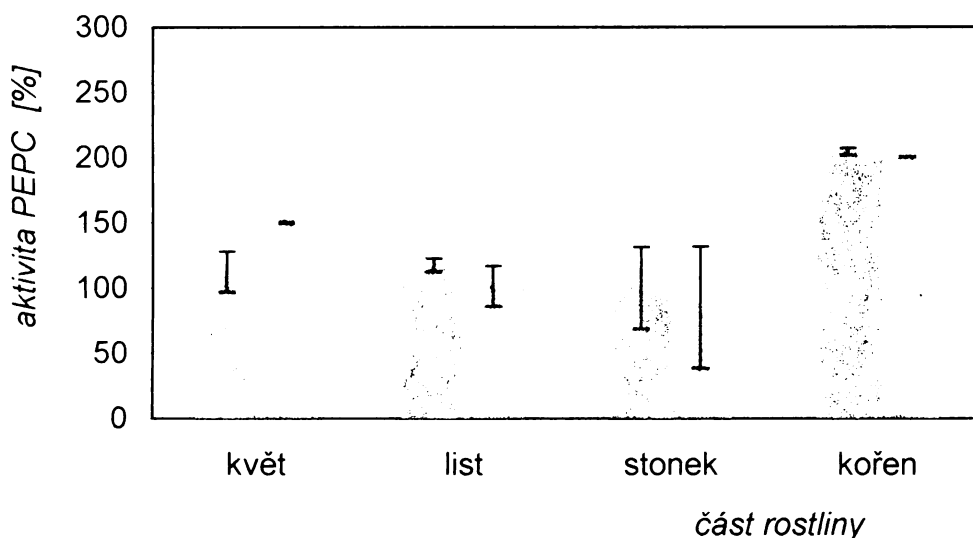


s aktivitou PEPC v kontrolních rostlinách a byla vyjádřena v procentech. 100 % je aktivita PEPC ve zdravých kontrolních rostlinách.

U infikovaných rostlin nebyly pozorovány průkazné změny aktivity PEPC v dospělých listech v porovnání s kontrolním rostlinám. Transgenní rostliny nevykazovaly výrazné rozdíly ve změnách aktivity PEPC v porovnání s rostlinami *Nicotiana benthamiana* a to ani poslední den pokusu (viz. obr. 3.4.23). 26. den byla vlivem virové infekce zaznamenána zvýšená aktivita PEPC v kořenech obou druhů sledovaných rostlin *Nicotiana benthamiana* (viz. obr. 3.4.24). Aktivita PEPC byla zvýšena na 200 % oproti kontrolním rostlinám.



**Obr. 3.4.23** Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost vyjádřená v % v rostlinách *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlinách s vneseným genem pro HC-Pro protein. Aktivita PEPC ve zdravých kontrolních rostlinách je rovna 100 %. Sledováno 0. až 26. den virové infekce.

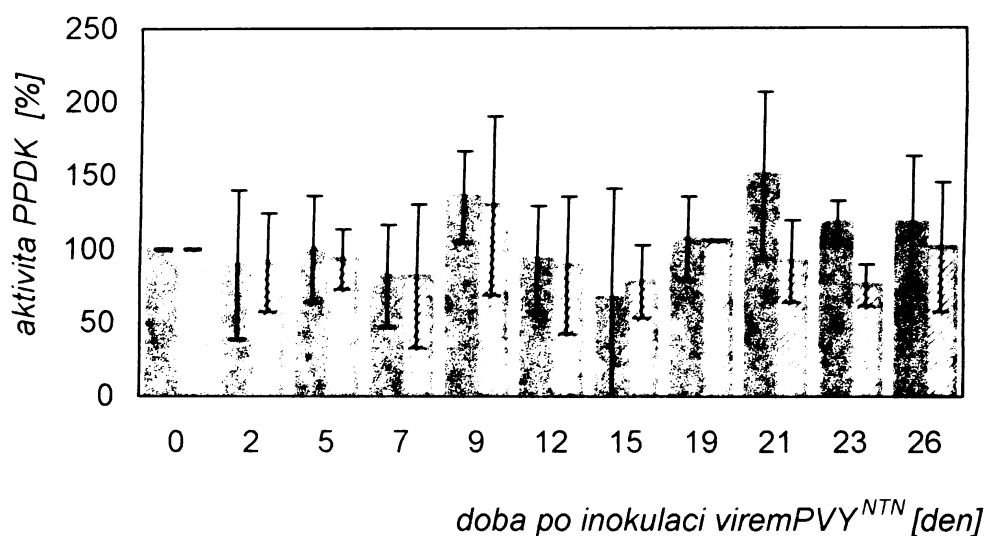


**Obr. 3.4.24** Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost vyjádřená v % v různých částech rostlin *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlin s vneseným genem pro HC-Pro protein. Aktivita PEPC ve zdravých kontrolních rostlinách je rovna 100 %. Stanoveno 26. den virové infekce.

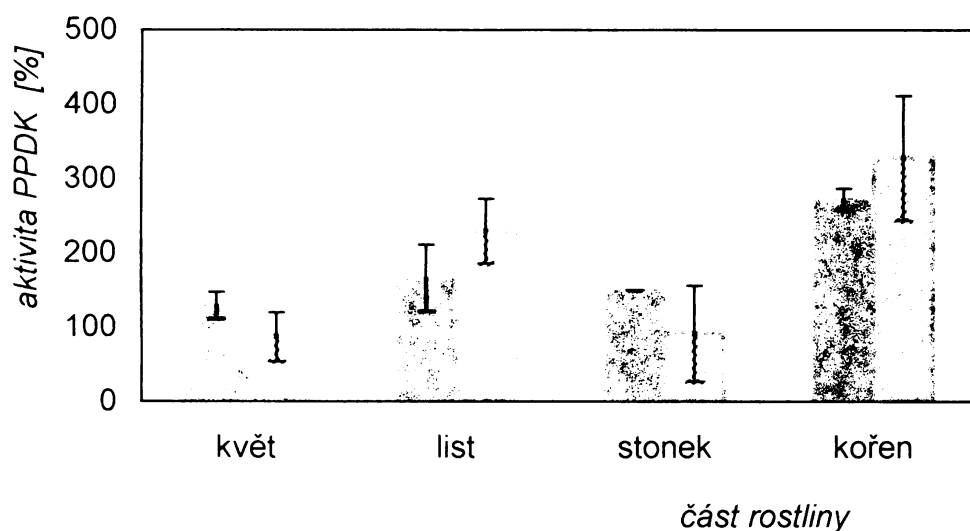
### 3.4.5 Sledování aktivity PPDK v průběhu virové infekce

V extraktech zhotovených ze směsných vzorků dospělých listů byla stanovena aktivita PPDK (viz. 2.4.4). Listy byly odebírány třikrát týdně v průběhu 0. až 26. den infekce. 26. den byl pokus ukončen a byly odebrány různé části rostlin. Aktivita PPDK byla vztažena na množství proteinů (specifická aktivita) a na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu. Aktivita PPDK v infikovaných rostlinách byla porovnána s aktivitou PPDK v kontrolních rostlinách a byla procentuálně vyjádřena. 100 % je aktivita PPDK ve zdravých kontrolních rostlinách.

Virová infekce nezpůsobuje zásadní změny aktivity PPDK v dospělých listech rostlin *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlin (viz. obr. 3.4.25). Obě skupiny rostlin vykazují podobný charakter změn, a to jak v průběhu virové infekce, tak i konečný den. V obou skupinách dochází 26. den k nárůstu aktivity PPDK v kořenech (viz. 3.4.26). V transgenních infikovaných rostlinách je aktivita PPDK zvýšena na 320 % oproti kontrolním rostlinám a v rostlinách *Nicotiana benthamiana* na 270 %.



**Obr. 3.4.25** Aktivita **PPDK** vztažená na čerstvou hmotnost vyjádřená v % v rostlinách *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlin s vneseným genem pro HC-Pro protein. Aktivita PPDK ve zdravých kontrolních rostlinách je rovna 100 %. Sledováno 0. až 26. den virové infekce.



**Obr. 3.4.26** Aktivita **PPDK** vztažená na čerstvou hmotnost vyjádřená v % v různých částech rostlin *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlin s vneseným genem pro HC-Pro protein. Aktivita PPDK ve zdravých kontrolních rostlinách je rovna 100 %. Stanoveno 26. den virové infekce.

### 3.4.6 Sledování množství bílkovin v průběhu virové infekce

Obsah rozpustných proteinů v extraktech zdravých kontrolních a infikovaných rostlin byl stanoven metodou podle Bradfordové (viz. 2.4.8). Množství bílkovin bylo přepočítáno na gram čerstvé hmotnosti a vyjádřeno v procentech. 100 % je množství bílkovin v kontrolních rostlinách.

Obsah proteinů v průběhu virové infekce v infikovaných rostlinách *Nicotiana benthamiana* (i v transgenních rostlinách) se výrazně neliší od obsahu proteinů v kontrolních rostlinách. Přesné hodnoty jsou uvedeny v tabulce (rostliny *Nicotiana benthamiana* viz. tabulka 3.4.8 a transgenní rostliny viz. tabulka 3.4.9). Z těchto tabulek je patrné, že nejnižší hodnoty byly zaznamenány na počátku a v den ukončení infekce.

26.den (ukončení pokusu) bylo také sledováno množství proteinů v různých částech kontrolních i infikovaných rostlin (květy, plně vyvinuté listy, stonky a kořeny). Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v souhrnné tabulce (viz. tabulka 3.4.10). Souhlasně s pokusem 3.2 (viz. 3.2.3) obsah proteinů klesá od horních částí rostliny – květy, ke spodním - kořeny. Ve všech částech infikovaných rostlin *Nicotiana benthamiana* dochází ke zvýšení obsahu proteinů v porovnání s kontrolními rostlinami. V transgenních rostlin *Nicotiana benthamiana* s vloženým genem pro HC-Pro protein je nárůst v množství proteinů pouze v květech a kořenech. Nejvyšší množství bílkovin je v listech obou skupin rostlin.

**Tabulka 3.4.8** Množství rozpustných bílkovin v průběhu virové infekce vztažené na gram čerstvé hmotnosti v rostlinách *Nicotiana benthamiana*.

<b>kontrolní rostliny</b>				
<i>Nicotiana benthamiana</i>				
doba po inokulaci virem	obsah bílkovin	směrodatná odchylka	obsah bílkovin	směrodatná odchylka
[den]	[mg.g <sup>-1</sup> ]		[mg.g <sup>-1</sup> ]	
0	5,04	0,23	5,04	0,23
2	11,86	0,39	11,89	2,16
5	12,79	1,51	8,55	0,11
7	10,21	2,87	10,92	1,92
9	10,46	0,88	9,90	0,12
12	11,75	1,40	11,38	1,70
15	14,58	0,76	11,97	0,68
19	9,31	1,94	8,22	0,42
21	11,25	0,33	10,87	10,23
23	10,86	0,19	10,44	0,30
26	5,30	0,43	6,30	0,27

**Tabulka 3.4.9** Množství rozpustných bílkovin v průběhu virové infekce vztažené na gram čerstvé hmotnosti v rostlinách *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro virový nestrukturní protein HC-Pro.

<b>kontrolní rostliny</b>				
<i>Nicotiana benthamiana</i>				
(HC-Pro)				
doba po inokulaci virem	obsah bílkovin	směrodatná odchylka	obsah bílkovin	směrodatná odchylka
[den]	[mg.g <sup>-1</sup> ]		[mg.g <sup>-1</sup> ]	
0	5,04	0,23	5,04	0,23
2	10,33	0,42	11,93	1,79
5	12,43	0,52	11,12	1,16
7	10,06	1,29	10,70	1,56
9	9,69	4,39	10,84	0,95
12	10,80	4,20	9,03	2,40
15	13,70	2,00	12,03	0,17
19	11,70	0,67	11,16	0,56
21	12,11	2,00	10,95	4,05
23	11,90	0,51	9,49	0,38
26	6,29	0,60	5,87	1,01

**Tabulka 3.4.10** Množství rozpustných bílkovin vztažené na gram čerstvé hmotnosti v různých částech rostlin *Nicotiana benthamiana* a transgenních rostlin *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro virový protein HC-Pro. Stanoveno 26. den virové infekce.

<b>kontrolní rostliny</b>				
<i>Nicotiana benthamiana</i>				
<b>část rostliny</b>	<b>obsah bílkovin</b>	<b>směrodatná odchylka</b>	<b>obsah bílkovin</b>	<b>směrodatná odchylka</b>
	[mg.g <sup>-1</sup> ]		[mg.g <sup>-1</sup> ]	
<b>květ</b>	4,39	0,29	5,87	0,05
<b>list</b>	5,3	0,43	6,3	0,27
<b>stonek</b>	1,88	0,29	3,07	0,60
<b>kořen</b>	1,28	0,07	1,83	0,04
<b>kontrolní rostliny</b>				
<i>Nicotiana benthamiana</i> (HC-Pro)				
<b>květ</b>	4,83	1,01	5,15	0,68
<b>list</b>	6,29	0,60	5,87	1,01
<b>stonek</b>	1,97	0,35	1,74	0,67
<b>kořen</b>	0,91	0,36	1,38	0,39

## 4 DISKUSE

Rostliny jsou během svého života vystaveny nepříznivým podmínkám, kterým čelí změnami metabolismu, popřípadě změnou využití jednotlivých metabolických drah. Přízpůsobením se vysokým světelným intenzitám, vysoké teplotě a nedostatku vody se vyvinul C4 a Crassulacean acid metabolism (CAM) typ fixace oxidu uhličitého [45]. Klíčovou roli v těchto metabolických drahách hraje fosfoenolpyruvátkarboxylasa, která katalyzuje primární fixaci oxidu uhličitého, NADP-malátdehydrogenasa (dekarboxylační), která katalyzuje dekarboxylaci a pyruvát, fosfátdikinasa, která katalyzuje regeneraci fosfoenolpyruvátu, aby tento cyklus mohl probíhat [16], [46]. Tyto enzymy se vyskytují i v C3 rostlinách a nefotosyntetických částech C4 a CAM rostlin, kde katalyzují anaplerotické reakce, které mohou spojovat jednotlivé metabolické dráhy [7], [15], [25].

Byly publikovány práce, kde bylo zjištěno zvýšení aktivity těchto enzymů v souvislosti s rostlinným stresem. Vlivem patogenních mikroorganismů, horka, sucha a chladu dochází ke zvýšení aktivity NADP-ME a PEPC [2], [7]. Působením celulas (enzymy rozrušující rostlinou buněčnou stěnu) došlo k dvojnásobnému zvýšení aktivity NADP-ME v kořenech kukuřice. Naopak hypoxie vyvolala pouze rychlý a krátkodobý nárůst, a poté aktivita NADP-ME klesla na polovinu ve srovnání s kontrolními rostlinami [7]. Také vlivem UV-B záření je aktivita NADP-ME stimulována [45]. Působení polyethylenglykolu, hypoxie a nedostatek vody indukují u rýže expresi PPK [6]. V naší laboratoři bylo zjištěno, že v rostlinách tabáku *Nicotiana tabacum* dochází vlivem virové infekce ke zvýšení aktivity fosfoenolpyruvátkarboxylasy, NADP-malátdehydrogenasy (dekarboxylační) i pyruvát, fosfátdikinas [22], [47], [48]. V příbuzné rostlině *Nicotiana benthamiana* byly zjištěny jiné výsledky [49], proto bylo cílem této práce podrobnější studium distribuce PEPC, NADP-ME a PPK, včetně isoenzymového složení v různých částech rostliny *Nicotiana benthamiana* a sledování těchto enzymů v průběhu virové infekce

## 4.1 NADP-malátdehydrogenasa (dekarboxylační) v různých částech rostlin

NADP-ME katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu za vzniku pyruvátu a současné redukce NADP. Pyruvát a NADPH se může využít pro katabolické děje (respirace) nebo anabolické děje (syntéza tuků, glukoneogeneze) [8], [11], [25]. V živočišném organismu se vyskytuje v mitochondriích a v cytoplasmě buněk především jaterních a tukových. U člověka se vyskytuje v mitochondriích buněk s nízkou dělicí schopností (srdce, svaly, mozek). Jako cytosolový je přítomen v adipózní tkáni a játrech, kde produkuje redukční ekvivalenty NADPH na syntézu mastných kyselin. Jeho zvýšená aktivita byla zaznamenána při dietě bohaté na sacharidy a také v tumorových buňkách, kde propojuje metabolismus dusíkatých sloučenin a organických kyselin [50]. Deficience či nepřítomnost cytosolové isoformy značí malignitu v lymfoidní tkáni [18].

V rostlinách je NADP-ME přítomen vedle cytoplasmy i v chloroplastech, NADP-ME je kódováno malou genovou rodinou, v jedné rostlině se vyskytuje více isoform tohoto enzymu. Přítomnost jednotlivých isoform je nejlépe prozkoumána u rostlin se známým genomem: *Arabidopsis* a rýže [11], [25]. V obou rostlinách byly nalezeny tři isoformy cytoplazmatické a jedna chloroplastová, některé jsou exprimovány konstitutivně, některé jen v souvislosti s ontogenetickým vývojem nebo s vnějšími podmínkami [25], [26], [51].

V rostlinách tabáku *Nicotiana tabacum* byla zjištěna pouze jedna isoforma přítomná v chloroplastech (viz. obr. 3.1.4, str. 34). Aktivita NADP-ME v cytoplasmě je buď velmi nízká v porovnání s NADP-ME v chloroplastech nebo jsou její vlastnosti velmi podobné chloroplastové isoformě, takže není odlišitelná při elektroforetických separacích. Nejvyšší aktivita byla zjištěna v nejvrchnějších listech (viz. obr. 3.1.1, str. 32), což může souviset s nutností syntézy velkého množství tuků pro výstavbu buněčných, zejména chloroplastových membrán. Aktivita v dalších částech rostliny se snižuje, v kořenech je poměrně nízká; neprobíhá tam pravděpodobně ve velké míře glukoneogeneze a ukládání škrobu. Přítomnost NADP-ME v buňkách kolem cévních



svazků znamená dekarboxylaci transportovaného malátu a nefotosyntetickou fixaci uvolněného CO<sub>2</sub> ve stoncích [11].

V rostlinách *Nicotiana benthamiana* bylo zjištěno více isoform (viz. obr. 3.2.8, str. 38; obr. 3.3.11, str. 43; obr. 3.4.21, str. 55): ve střední části rostliny (listy, stonek) se vyskytují dvě formy. Nižší elektroforetické pohyblivosti odpovídá molekulová hmotnost 272 000 a vyšší 248 000. Ve vrchních listech je přítomna pouze isoforma 272 000, v kořenech pouze 248 000. Jedná se pravděpodobně o tetramer, jejichž molekulová hmotnost podjednotek je 68 000 a 62 000.

Z literatury je známo, že velikost fotosyntetické formy NADP-ME kukuřice je 62 000, nefotosyntetické formy 66 000 popřípadě 72 000, podobné hodnoty platí pro NADP-ME i z jiných zdrojů [51], [52], [53]. Isoforma 72 000 však byla detekována pouze pomocí protilátek. Později se zjistilo, že se jedná o Hsp 70 (heat shock protein), který interaguje s NADP-ME a byl mylně považován za jednu isoformu [10].

Studium isoform NADP-ME v této práci bylo založeno na detekci enzymové aktivity, k záměně proteinu Hsp 70 s isoformou NADP-ME tedy nedošlo. Je zajímavé, že se v rostlinách *Nicotiana benthamiana* vyskytuje enzym s podjednotkou 62 000, neboť se doposud předpokládalo, že se vyskytuje pouze v C4 rostlinách.

NADP-ME se v rostlinách nevyskytuje pouze ve formě tetrameru, ale i dimeru nebo naopak vyšších agregátů- hexameru nebo oktameru [8], [11], [26]. V rostlinách tabáku i *Nicotiana benthamiana* byla zjištěna isoforma o molekulové hmotnosti 136 000 v květech. Zřejmě jde o dimer. Vyšší agregáty byly detekovány pouze v listech kukuřice (viz. obr. 3.1.4, str. 34 a obr. 3.4.21, str. 55), která byla použita pro porovnání s odebranými vzorky.

## **4.2 Vliv virové infekce na NADP-ME v rostlinách *Nicotiana benthamiana***

V další části této práce byl sledován vliv biotického stresu na sledované enzymy v rostlinách *Nicotiana benthamiana*. V listech rostlin *Nicotiana tabacum* působí virová infekce zvýšení aktivity PEPC, NADP-ME i PDK. Nejvyšší rozdíl v aktivitě mezi kontrolními a infikovanými rostlinami vykazovala NADP-ME [22], [47], [48]. V listech

rostlin *Nicotiana benthamiana* k průkaznému zvýšení aktivity studovaných enzymů nedochází. Infekce PVY<sup>NIN</sup> se v rostlině šíří mezi buňkami i vodivými pletivy, proto byla sledována aktivita PEPC, NADP-ME, PPDK i v jiných částech rostliny. Zjistilo se, že ke zvýšení aktivity dochází v kořenech infikovaných rostlin. Aktivita NADP-ME vzrostla na 180 % oproti kontrolním rostlinám (viz. obr.3.4.18, str. 52), aktivita PEPC na 200 % (viz. obr. 3.4.24, str. 58) a aktivita PPDK byla zvýšena na 270 % (viz. obr. 3.4.26, str. 59).

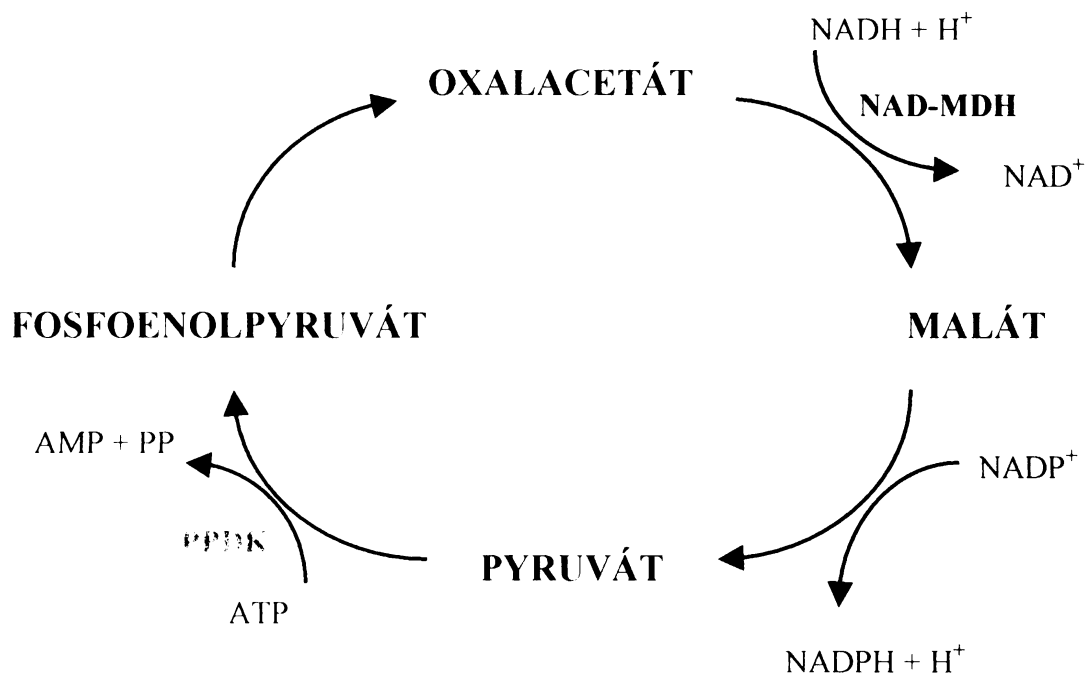
Zvýšené aktivity těchto enzymů byly nalezeny i v kořenech infikovaných rostlin tabáku, avšak méně než v listech [48]. Důvodem je pravděpodobně nižší obsah virových částic v kořenech než v nadzemních částech.

Vzhledem k přítomnosti dvou isoform NADP-ME v rostlinách *Nicotiana benthamiana* je možné, že na stres odpovídá pouze isoforma s větší pohyblivostí, která je nejvíce zastoupená právě v kořenech. Pro stanovení aktivity NADP-ME v listech byly odebírány vzorky z horních plně vyvinutých listů, kde je majoritně zastoupena isoforma s menší pohyblivostí.

Všechna měření byla prováděna i na transgenních rostlinách *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro potyvirovou proteasu HC-Pro. Vložení genu pro virové proteiny do rostlinného genomu může znamenat zvýšení odolnosti proti příslušnému viru. Proteasa HC-Pro je nositelem patogenicity viru, může naopak znamenat vyšší citlivost vůči této infekci. V této práci nebyl nalezen podstatný rozdíl mezi oběma rostlinami, to se týká zjištění obsahu viru pomocí metody DAS-ELISA (viz. tabulka 3.4.6, str. 50), enzymových aktivit (NADP-ME viz. obr. 3.4.17, str. 51; PEPC viz. obr. 3.4.23, str. 57; PPDK viz. obr. 3.4. 25, str.59) i přítomnost isoform NADP-ME (viz. obr. 3.4.21 a obr. 3.4.22, str. 55 a 56).

Zvýšení aktivity NADP-ME za stresových podmínek pravděpodobně souvisí s tvorbou redukčních ekvivalentů NADPH. NADPH je v buňce důležité pro biosyntetické účely: syntéza ligninu (zesílení buněčné stěny proti vnikajícímu patogenu), syntéza fytoalexinů a dalších obranných látek [3]. NADPH je také koenzymem antioxidantních enzymů (glutathionreduktasy, askorbátperoxidasy, katalasy a superoxidodismutasy) [23], [24].

Enzymy PEPC, NAD-MDH, NADP-ME a PPDK spolu mohou vytvořit cyklus (viz. obr. 4.2.1), který produkuje NADPH na úkor NADH a spotřeby ATP, což může být za určitých podmínek pro rostlinu výhodné.



**Obr. 4.2.1** Produkce **NADPH** za účasti enzymů fosfoenolpyruvátkarboxylasy - PEPC; NAD-malátdehydrogenasy - NAD-MDH; NADP-malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační) - NADP-ME a pyruvát, fosfátdikinyasy - PPDK.

## 5 ZÁVĚR

1. Byla sledována aktivita NADP-ME, PEPC a PPK v různých částech rostlin *Nicotiana tabacum* a *Nicotiana benthamiana*. Nejvyšší aktivity byly nalezeny v horních nejmladších listech. Směrem dolů se aktivity všech tří enzymů snižují.
2. Bylo sledováno zastoupení isoform NADP-ME v různých částech rostlin. V listech, stoncích a kořenech rostlin *Nicotiana tabacum* byla přítomna pouze jedna isoforma NADP-ME. Pouze v květech byla detekována další isoforma s menší pohyblivostí. V listech a stoncích rostliny *Nicotiana benthamiana* jsou přítomny dvě isoformy, jejichž relativní molekulové hmotnosti jsou 248 000 a 272 000. V kořenech byla zjištěna přítomnost pouze jedné isoformy s relativní molekulovou hmotností 248 000. V květech byl prokázán i dimer s relativní molekulovou hmotností 136 000.
3. Virová infekce způsobená PVY<sup>NTN</sup> nemá prokazatelný vliv na aktivitu sledovaných enzymů v listech rostlin *Nicotiana benthamiana*, avšak v kořenech dochází ke zvýšení aktivity NADP-ME, PEPC a PPK na 180, 200 a 270 % oproti kontrolní rostlinám.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Procházka, S.; Macháčková, I.; Krekule, J.; Šebánek, J.: *Fyziologie rostlin*. 1.vyd. Praha, Akademia 1998.
- [2] Gonzáles, M.C.; Sánchez, R.: Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta* **216**, 985-992 (2003).
- [3] Kosack, K.H.; Jones, J.D.G.: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Maryland, American Society of Plant Physiologists (ed.), 2000.
- [4] Rosypal, S.; Doškař, J.; Petržík, K.; Růžičková, V.: *Úvod do molekulární biologie 4. díl*. 3. inov. vyd. Brno, Stanislav Rosypal 2002.
- [5] kolektiv autorů ústavu experimentální botaniky: Potyviry. Dostupné z URL: [http://www.ueb.cas.cz/laboratory\\_of\\_virology/obsah.htm](http://www.ueb.cas.cz/laboratory_of_virology/obsah.htm) [cit. 15.10.2005].
- [6] Moons, A.; Valcke, R.; Van Montagu, M.: Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C<sub>3</sub> plant. *The Plant Journal* **15**:1, 89-98 (1998).
- [7] Maurino, V.G.; Saigo, M.; Andreo, C.S.; Drincovich, M.F.: Non-photosynthetic 'malic enzyme' from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant Molecular Biology* **45**, 409-420 (2001).
- [8] Edwards, G.E.; Andreo, C.S.: NADP-malic enzyme from plants. *Phytochemistry* **31**:6, 1845-1857 (1992).
- [9] Schaaf, J.; Walter, M.H.; Hess, D.: Primary metabolism in plant defense. *Plant Physiology* **108**, 949-960 (1995).
- [10] Lara, M.V.; Drincovich, M.F.; Müller, G.L.; Maurino, V.G.; Andreo, C.S.: NADP-malic enzyme and Hsp70: co-purification of NADP-malic enzyme properties and modification of NADP-malic enzyme properties by association with Hsp70. *Plant Cell Physiology* **46**, 997-1006 (2005).
- [11] Wheeler, M.C.G.; Troncoti, M.A.; Drincovich, M.F.; Andreo, C.S.; Flügge, U.I.; Maurino, V.G.: A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**, 39-51 (2005).
- [12] Kuo, Ch.; Tsai, L.Ch.; Chin, T.Y.; Chang, G.G.; Chou, W.Y.: Lysine residue 162 and 340 are involved in the catalysis and coenzyme binding of NADP<sup>+</sup>-dependent malic enzyme from pigeon. *Biochemical and biophysical research communications* **270**, 821-825 (2000).
- [13] Wedding, R.T.: Malic enzyme of higher plants. *Plant physiology* **90**, 367-371 (1989).
- [14] Loeber, G.; Dworkin, M.B.; Infante, A.; Ahorn, A.: Characterization of cytosolic malic enzyme in human tumor cells. *FEBS letters* **344**, 181-186 (1994).
- [15] Drincovich, M.F.; Casati, P.; Andreo, C.S.: NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Letters* **490**, 1-6 (2001).

- [16] Procházka, S.; Šebánek, J.; Gloser, J.; Sladký, Z.: *Botanika -- Morfologie a fyziologie rostlin*. 1. vyd., Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně 1998.
- [17] Maurino, V.G.; Drincovich, M.F.; Andreo, C.S.: NADP-malic enzyme isoforms in maize leaves. *Biochemistry and Molecular Biology International* **38**, 239-250 (1996).
- [18] Bériault, R.; Chénier, D.; Singh, R.; Middaugh, J.; Mailloux, R.; Appanna, V.: Detection and purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme, and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **26**, 2892-2897 (2005).
- [19] Tausta, S.T.; Coyle, H.M.; Rothermel, B.; Stiefel, V.; Nelson, T.: Maize C4 and non-C4 NADP-dependent malic enzymes are encoded by distinct genes derived from a plastidic-localized ancestor. *Plant molecular biology* **50**, 635-652 (2002).
- [20] Laporte, M.M.; Shen, B.; Tarczynski, M.C.: Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *Journal of Experimental Botany* **53**, 699-705 (2002).
- [21] Smeets, K.; Cuyperts, A.; Lambrechts, A.; Semane, B.; Hoet, P.; Van Leere, A.; Vangronsveld, J.: Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 437-444 (2005).
- [22] Ryšlavá, H.; Müller, K.; Semorádová, Š.; Synková, H.; Čerovská, 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).
- [23] Riedle-Bauer, M.: Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systematic virus infection of plants. *Journal of phytopathology* **148**, 297-302 (2000).
- [24] Mehdy, M.C.; Sharma, Y.K.; Sathasivan, K.; Bays, N.W.: The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiologia plantarum* **98**, 365-374 (1996).
- [25] Chi, W.; Yang, J.; Wu, N.; Zhang, F.: Four rice genes encoding NADP malic enzyme exhibit distinct expression profiles. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **68**, 1865-1874 (2004).
- [26] Lai, L.B.; Tausta, S.L.; Nelson, T.M.: Differential regulation of transcripts encoding cytosolic NADP-malic enzyme in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Plant Physiology* **128**, 140-149 (2002).
- [27] Colombo, S.L.; Andreo, C.S.; Podesta, F.E.: Carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. Purification, characterization and developmental profile of NADP-dependent malic enzyme. *Physiologia plantarum* **101**, 821-826 (1997).
- [28] Kai, Y.; Matsumura, H.; Izui, K.: Phosphoenolpyruvate carboxylase: three-dimensional structure and molecular mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **414**, 170-179 (2003).
- [29] Tripodi, K.E.; Turner, W.E.; Gennidakis, S.; Plaxton, W.C.: In vivo regulatory phosphorylation of novel phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in endosperm of developing castor oil seeds. *Plant Physiology* **139**, 969-978 (2005).
- [30] Chollet, R.; Vidal, J.; O'Leary, M.H.: Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 273-298 (1996).
- [31] Toyota, K.; Koizumi, N.; Sato, F.: Transcriptional activation of phosphoenolpyruvate carboxylase by phosphorus deficiency in tobacco. *Journal of experimental botany* **54**, 961-969 (2003).

- [32] De Nisi, P.; Zocchi, G.: Phosphoenolpyruvate carboxylase in cucumber (*Cucumis sativus L.*) roots under iron deficiency: activity and kinetic Characterization. *Journal of Experimental Botany* **362**, 1903-1909 (2000).
- [33] Fontaine, V.; Cabané, M.; Dizengremel, P.: Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Pinus halepensis* needles submitted to ozone and water stress. *Physiologia plantarum* **117**, 445-452 (2003).
- [34] Rivoal, J.; Plaxron, W.C.; Turpin, D.H.: Purification and characterization of high- and low-molecular-mass isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemical Journal* **331**, 201– 209 (1998).
- [35] Nakanishi, T.; Nakatsu, T.; Matsuoka, M.; Sakata, K.; Kato, H.: Crystal structures of pyruvate phosphate dikinase from maize revealed an alternative conformation in the swiveling-domain motion. *Biochemistry* **44**, 1136-1144 (2005).
- [36] Chastain, Ch.J.; Fries, J.P.; Vogel, J.A.; Randklev, Ch.L.; Vossen, A.P.; Dittmer, S.K.; Watkins, E.E.; Friedler, L.J.; Wacker, S.A.; Meinhover, K.C.; Sarath, G.; Chollet, R.: Pyruvate, Orthophosphate dikinase in leaves and chloroplasts of C<sub>3</sub> plants undergoes light-/dark-induced reversible phosphorylation. *Plant Physiology* **128**:4, 1368-1378 (2002).
- [37] Lin, Y.; Lusin, J.D.; Ye, D.; Dunaway-Mariano, D.; Ames, J.B.: Examination of the structure, stability, and catalytic potential in the engineered phosphoryl carrier domain of pyruvate phosphate dikinase. *Biochemistry* **45**, 1702–1711 (2006).
- [38] Casati, P.; Zhang, X.; Burlingame, A.L.; Walbot, V.: Analysis of leave proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**, 1673-1685 (2005).
- [39] Dangl, J.L.; Dietrich, R.A.; Thomas, H.: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Maryland, American Society of Plant Physiologists, 2000.
- [40] Bray, E.A.; Bailey-Serres, J.; Weretilnyk, E.: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Maryland, American Society of Plant Physiologists (ed.), 2000.
- [41] Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bonding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
- [42] Barton, J.R.: Anomalous behaviour of bovine serum albumin in electrophoresis on non-denaturing polyacrylamide gel. *Biochemistry journal* **129**, 983-985 (1972).
- [43] Hedrick, J.L.; Smith, A.J.: Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Archives of biochemistry and Biophysics* **126**, 155-164 (1968).
- [44] O'Sullivan, S.A.; Wedding, R.T.: Malate dehydrogenase isoenzymes from cotton leaves. *Plant physiology* **49**, 117-123 (1972).
- [45] Casati, P.; Andreo, C.S.; Edwards, G.E.: Characterization of NADP-malic enzyme from two species of *Chenopodiaceae*: *Haloxylon persicum* (C<sub>4</sub>) and *Chenopodium album* (C<sub>3</sub>). *Phytochemistry* **52**, 985-992 (1999).
- [46] Wakayama, M.; Ueno, O.; Ohnishi, J.: Photosynthetic enzyme accumulation during leaf development of *Arrundinella hirta*, a C<sub>4</sub> grass having Kranz cells not associated with veins. *Plant cell physiology* **44**, 1330-1340 (2003).
- [47] Müller, K.: Vliv virové infekce na hladinu enzymů v rostlinách tabáku. Diplomová práce FPBT VŠCHT Praha, katedra biochemie a mikrobiologie, str. 26-51 (2002).
- [48] Doubnerová, V.: Biochemické změny v rostlinách tabáku způsobené biotockým stresem. Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, str. 35-64 (2004).

- [49] Janošková, M.: Vliv virové infekce na transgenní rostliny nesoucí geny pro nestrukturní proteiny potyvírů. Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, str. 27-65 (2005).
- [50] Moreadith, R.W.; Lehninger, A.L.: The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. *The journal of biological chemistry* **259**, 6215-6221 (1984).
- [51] Lai, L.B.; Wang, L.; Nelson, T.M.: Distinct but conserved functions for two chloroplastic NADP-malic enzyme isoforms in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Plant Physiology* **128**, 125-139 (2002).
- [52] Saigo, M.; Bologma, F.B.; Maurino, V.G.; Detarsio, E.; Andreo, C.S.; Drincovich, M.F.: Maize recombinant non-C<sub>4</sub> NADP malic enzyme: A novel dimeric malic enzyme with high specific activity. *Plant molecular Biology* **55**, 97-107 (2004).
- [53] Honda, H.; Akagi, H.; Shimada, H.: An isozyme of the NADP-malic enzyme of a CAM plant, *Aloe arborescens*, with variation on conservative amino acid residues. *Gene* **243**, 85-92 (2000).