

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vliv teplotních změn na aktivitu různých enzymů v rostlinách

The effect of heat shock stress on enzyme activities in plants

Vlasta Doričová

Školitelka: RNDr. Veronika Doubnerová, Ph.D

Praha 2012

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Veroniky Doubnerové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne:_____

Podpis:_____

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce RNDr. Veronice Doubnerové, Ph.D. za rady, ochotu, trpělivost a pomoc při řešení této bakalářské práce. Stejně tak děkuji Doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za veškeré poskytnuté rady.

Děkuji také své rodině za podporu a pomoc v průběhu mého studia.

Abstrakt:

Teplotní stres je jedním z abiotických stresových faktorů, který podstatným způsobem ovlivňuje růst a vývoj rostlin. Rostliny odpovídají na teplotní stres řadou buněčných a metabolických změn, charakteristická je syntéza molekulárních chaperonů tzv. heat-shock proteinů (HSP). V této práci byl studován vliv teplotního šoku (v podobě působení 40°C 1 hodinu z 20°C) na aktivity NADP-dependentních enzymů, enzymů Hatchova-Slackova cyklu, glykosidas a na aktivitu peroxidasy v listech tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1). Vzhledem k tomu, že HSP napomáhají správnému sbalování nezralých proteinů, podílejí se na opravování špatně sbalených nebo částečně denaturovaných proteinů, na degradaci denaturovaných proteinů a na vytvoření termotolerance rostliny, bylo cílem práce zjistit, zda aktivita studovaných enzymů zůstane zachována, nebo zda bude modulována v rámci obranné odpovědi.

Největší množství proteinu HSP70 detekované imunochemicky bylo zjištěno 1 hodinu po aplikaci teplotního šoku kdy byly také stanoveny vyšší aktivity šikimátdehydrogenasy, NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát-dekarboxylační), fosfoenolpyruvát-karboxylasy, β -hexosaminidasy a α -mannosidasy, než v kontrolních rostlinách, které vyšší teplotě vystaveny nebyly. Aktivita peroxidasy byla oproti kontrolním rostlinám nejvíce zvýšena 1 den po aplikaci HS. Pomocí nativní elektroforézy byly nalezeny rozdíly v zastoupení isoform peroxidasy kontrolních a stresovaných rostlin.

Další dny po působení teplotního šoku (3., 5., 7. a 10. den) došlo k významnému snížení jak množství proteinu HSP70, tak aktivity všech sledovaných enzymů kromě NADP-ME a částečně i peroxidasy. Zda se jedná o vliv HSP, nebo o regulaci na úrovni aktivity, transkripce a translace bude objasněno dalšími experimenty.

Klíčová slova:

Teplotní šok, chaperony, heat-shock proteiny, NADP-dependentní enzymy, enzymy Hatchova-Slackova cyklu, glykosidasy, peroxidasa

Abstract:

Heat stress is one of abiotic stress factors, which fundamentally influences the growth and development of plants. Plants response to heat stress by series of cell and metabolic changes, the specificity of heat stress is synthesis of molecular chaperons, called heat-shock proteins (HSP). The influence of heat shock (in the form of 1 hour application of 40°C from 20°C) on the activity of NADP-dependent enzymes, enzymes of Hatch-Slack cycle, glycosidases and the activity of peroxidase in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) was studied in this work. Since HSP are involved in proper folding of immature, misfolded or partly denaturated proteins, in degradation of denaturated proteins and in induction of thermotolerance of plants, the aim of this work was to find out, if the activity of studied enzymes will be maintained or modulated within the plant defense response.

The highest amount of HSP70 detected immunochemically together with higher activities of NADP-malic enzyme, phosphoenolpyruvate carboxylase, β -hexosaminidase and α -mannosidase compared to control plants was found 1 hour after application of heat shock. Peroxidase activity was most increased 1 day after HS compared to controls. Using native electrophoresis the differences in isoform content between control and HS-stressed plants were observed.

Later after application of heat stress (the 3rd, the 5th, the 7th and the 10th day after heat shock), significant decrease of activity of all studied enzymes excepting NADP-ME and partially peroxidase was determined. Next experiments are needed to clarify if the reason of decreased activities is the influence of HSP or the regulation on activity, transcriptional and translational level.

Keywords:

Heat shock, chaperones, heat-shock proteins, NADP-dependent enzymes, enzymes of Hatch-Slack cycle, glycosidases, peroxidase

Použité zkratky:

ADP – adenosindifosfát

ATP - adenosintrifosfát

BCIP – 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát

BSA – hovězí sérový albumin

C3 – rostliny, které mají jako první produkt fotosyntézy tříuhlíkatý 3-fosfoglycerát

C4 – rostliny, které mají jako první produkt fotosyntézy čtyřuhlíkatý oxalacetát

CAM – z anglického termínu crassulacean acid metabolism

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DTT - dithiothreitol

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

G6PDH – glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

GOGAT – glutamin-oxoglutarát aminotransferasa, nyní glutamátsynthasa

GS - glutaminsynthetasa

HS – teplotní šok

HSF – transkripční faktory teplotního šoku

HSc – skupina rostlin vystavená teplotnímu šoku

HSP – proteiny teplotního šoku

K – kontrolní skupina

NAD-MDH – NAD-dependentní malátdehydrogenasa

NAD(H) – nikotinamidadeninukleotid (redukovaný)

NADP(H) – nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaný)

NADP-ICDH – NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa

NADP-ME – NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)

NBT – nitrobluetetrazolium chlorid

PEPC – fosfoenolpyruvátcarboxylasa

PPDK – pyruvát, fosfátdikinasa

PVP – polyvinylpolypyrrolidon

ROS – reaktivní formy kyslíku

RubisCO – ribulosabisfosfátcarboxylasa/oxygenasa

SDH – šikimátdehydrogenasa

TEMED – N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

Obsah

1. Úvod.....	3
1.1. Teplotní stres.....	3
1.2. Heat-shock proteiny.....	5
1.2.1. Skupiny heat-shock proteinů.....	7
1.2.2. Regulace odpovědi na teplotní stres.....	11
1.3. Enzymy.....	13
1.3.1. NADP-dependentní enzymy.....	13
1.3.2. Enzymy Hatchova-Slackova cyklu.....	15
1.3.3. Glykosidasy.....	18
1.3.4. Antioxidační enzymy.....	20
2. Cíl práce.....	22
3. Materiál.....	23
3.1. Pomůcky.....	23
3.2. Chemikálie.....	23
3.3. Rostlinný materiál.....	25
4. Metody	26
4.1. Pěstování rostlin, provedení pokusu a odběr vzorků.....	26
4.2. Příprava rostlinného extraktu.....	26
4.3. Stanovení aktivity NADP–dependentních enzymů.....	27
4.3.1. Stanovení aktivity SDH.....	27
4.3.2. Stanovení aktivity G6PDH.....	27
4.3.3. Stanovení aktivity NADP-ICDH.....	27
4.4. Stanovení aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu	28

4.4.1. Stanovení aktivity NADP-ME.....	28
4.4.2. Stanovení aktivity PEPC.....	28
4.4.3. Stanovení aktivity PPK.....	28
4.5. Stanovení aktivity glykosidas.....	29
4.6. Stanovení aktivity peroxidasy.....	29
4.7. Elektroforetické metody.....	30
4.7.1. Nativní elektroforéza.....	30
4.7.1.1. Detekce NADP-ME v polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze.....	31
4.7.1.2. Detekce peroxidasy v polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze.....	31
4.7.2. SDS elektroforéza.....	31
4.8. Přenos proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu metodou „Western blot“.....	32
4.9. Imunochemická detekce proteinu HSP70 na nitrocelulosové membráně.....	32
5. Výsledky	34
5.1. Vliv teplotního šoku na aktivitu NADP-dependentních enzymů.....	35
5.2. Vliv teplotního šoku na aktivitu enzymů Hatchova-Slackova cyklu.....	37
5.3. Vliv teplotního šoku na aktivitu a isoenzymové složení NADP-ME.....	39
5.4. Vliv teplotního šoku na aktivitu glykosidas.....	40
5.5. Vliv teplotního šoku na aktivitu a isoenzymové složení peroxidasy.....	43
5.6. Imunochemická detekce proteinu HSP70 v rostlinách vystavených teplotnímu stresu.....	44
6. Diskuze.....	45
7. Závěr.....	47
8. Seznam použité literatury.....	48

1. Úvod

1.1. Teplotní stres

Rostliny jako sesilní organizmy jsou vystaveny různým změnám okolního prostředí, se kterými se musejí neustále vyrovnávat. Jedním z hlavních faktorů limitujícím růst a vývoj rostlin je teplotní stres. Při teplotách nad 40°C dochází u většiny rostlinných druhů k zásadním změnám ve fyzikálně-chemických vlastnostech buněčných membrán a bílkovin. ^[1]

Závažnost teplotního stresu je podmíněná délkou trvání stresových podmínek, rychlostí změny teploty, hodnotou vysoké teploty a případnou adaptací rostliny na teplotní stres. ^[2] Příkladem adaptace rostliny na zvýšenou teplotu je lesklý voskový povrch listů či trichomy, které odrážejí přebytečné světlo. Dále se jedná o různé adaptace listů např. svinutí, vertikální orientaci, případně růst malých členitých listů tak, aby docházelo k maximálním ztrátám tepla. ^[3]

Všechny rostliny disponují určitým teplotním optimem, teplotou, která je pro růst dané rostliny nejvhodnější. Teploty nad tímto optimem způsobují metabolické změny, neboť rychlost většiny chemických reakcí se zvyšuje dvakrát při nárůstu teploty o 10°C. ^[4] Při dalším zvyšování teploty však jsou enzymy postupně inhibovány a denaturovány. Rovněž dochází k poškození buněčných membrán a proteinů. Lipidová vrstva membrán se mění na superfluidní, což vede ke ztrátě fyziologické funkce. Dochází k propustnosti membrány pro ionty. Membrána v superfluidním stavu přestává být oporou pro membránové proteiny. Většinou jsou nejdříve poškozené thylakoidní membrány v chloroplastech. Velmi často je poškozený fotosystém II. Dochází k jeho rozpadu a postupné denaturaci jeho proteinů. Při dosažení kritické teploty se rozpadá i cytoskelet buňky, což se projeví zastavením proudění cytoplazmy. ^[5]

Poškození membrán tedy způsobuje inhibici důležitých procesů jako je fotosyntéza a respirace, pro které je membrána nezbytná. Se vzrůstající teplotou dochází nejdříve k poklesu rychlosti fotosyntézy, a poté k poklesu rychlosti respirace. ^[3] I když respirace může být na počátku teplotního stresu zvýšena. ^[6] Nerovnováha mezi fotosyntézou a respirací je jedním z hlavních důvodů nepříznivého působení vysokých teplot, neboť rychle dochází ke spotřebování sacharidových zásob. Zvýšená respirace v poměru

k fotosyntéze při vyšších teplotách je více škodlivá pro rostliny mírného pásma (C3 rostliny) než pro rostliny adaptované vůči vyšším teplotám a suchu (C4 a CAM rostliny), protože v C3 rostlinách se s rostoucí teplotou zvyšuje jak respirace, tak fotorespirace. ^[3] Rostliny C3, C4 a CAM se rovněž liší způsobem fixace CO₂, což bude zmíněno později. Teplotní stres je často spojen se stresem způsobeným nedostatkem vody. Teplota většiny C3 a C4 rostlin s neomezeným přístupem vody je udržována pod 45°C pomocí ochlazení odpařováním vody listy a stonky (transpirací). Jakmile je však voda omezena, uzavírají se průduchy, transpirace klesá a teplota pletiv oproti okolnímu prostředí se zvyšuje. Rostliny CAM (sukulentní vyšší rostliny), které mají vzhledem k vysokým teplotám průduchy přes den uzavřené, se transpirací ochlázovat nemohou, namísto toho u nich dochází k rozptylu tepla dopadajícího slunečního záření a re-emisi infračerveného záření. ^[3] Dále bylo zjištěno, že vyšší teplota snižuje rozpustnost plynů, snižuje absorpci minerálních látek, snižuje příjem vody a zvyšuje oxidativní degeneraci membránových lipidů. ^{[4] [7]} Změna lipidové části membrány je vratná. Při poklesu teploty pod kritickou hodnotu se stav lipidů vrací k původní struktuře a funkci. U proteinů je daná změna většinou nevratná a je potřeba proteiny nahradit novými. ^[5] Rostliny odpovídají na teplotní stres řadou buněčných a metabolických změn, z nichž mnohé se neliší od odpovědí vůči tomuto typu stresu probíhajících ve všech organismech. Především se jedná o snížení syntézy běžných proteinů, avšak zvýšenou transkripci a translaci nové sady proteinů nazývaných heat-shock proteiny, ve zkratce HSP. ^{[8] [9]}

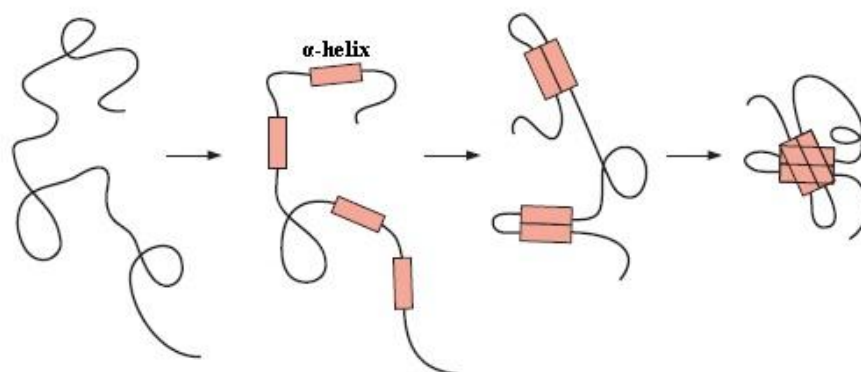
1.2. Heat–shock proteiny

Heat-shock proteiny (HSP) jsou molekulární chaperony, které byly objeveny v souvislosti s působením teplotního stresu, avšak některé HSP jsou v buňce přítomny konstitutivně. Působením stresu se ale jejich množství zvyšuje. Později bylo zjištěno, že nejen teplotní stres, ale také další typy stresu (zvýšená koncentrace solí, sucho, oxidativní stres, vysoká intenzita ozáření, poranění, těžké kovy) indukuje syntézu HSP. ^{[10] [11]} HSP se nacházejí ve všech organismech, jak prokaryotických, tak eukaryotických. ^[12] Jedná se o vysoce homologní, konzervované proteiny.

Heat-shock proteiny pomáhají nově syntetizovaným proteinům při sbalení do nativní konformace, čímž se neaktivní nesbalené proteiny mění na aktivní proteiny schopné vykonávat své funkce. Také se HSP uplatňují při vytvoření správné struktury u špatně sbalených nebo částečně denaturovaných proteinů, nebo při jejich degradaci. HSP se podílejí na ochraně buněk před škodlivými účinky teplotního šoku a na vytvoření termotolerance rostliny, tedy tolerance k jinak letální teplotě po krátkém pravidelném vystavení sub-letální teplotě. ^[13-15] HSP se podílejí také na přenosu signálů, kontrole buněčného cyklu, degradaci proteinů a importu proteinů do buněčných organel. ^[16]

Proteiny v buňce jsou syntetizované pomocí ribozomů. Touto biosyntézou se vytváří nezralý polypeptid, který dosahuje svojí aktivní formu prostřednictvím specifického sbalování a tím se mění na nativní protein. Na těchto procesech participují HSP. Prostorová struktura nativního proteinu reprezentuje nejnižší energetický stav molekuly. ^[17]

Sbalování proteinů probíhá pomocí vícekrokového procesu. Nejdříve dochází k vytvoření sekundární struktury, buď α -helixu nebo β -skládaného listu. Tyto struktury jsou složeny z několika aminokyselinových zbytků a spojují se vzájemně do větších struktur pomocí vodíkových vazeb (obr. č. 1). Po těchto konformačních změnách původní struktury nezralého proteinů dochází k vytvoření prostorové a nativní struktury proteinů (terciární struktury). U proteinů s několika podjednotkami dochází k jejich spojování za vzniku kvarterní struktury. ^[17]



Obr. č. 1. Sbalování proteinů. Nezralý protein vytváří skládáním sekundární struktury složené z několika aminokyselinových zbytků. Sekundární struktury se shlukují a vytvářejí vyšší struktury proteinu ^[17]

Biologická funkce proteinů je závislá na vzniku nebo zániku slabých chemických vazeb. Slabé vazebné interakce jsou ovlivňovány faktory vnějšího prostředí. Když jsou tyto faktory v prostředí organismu přítomné v nadbytku, nebo naopak v nedostatečném množství, dochází u proteinů ke změně jejich nativní struktury. To má negativní důsledky na funkci proteinů. Proteiny, které mají nesprávnou prostorovou konformaci, mají odhalené určité oblasti, které jsou u nativních proteinů skryté. Tyto odkryté oblasti se vážou na podobné oblasti jiných proteinů. Tak dochází v buňce k agregaci proteinů, tzv. hydrofobnímu kolapsu, nebo jsou tyto proteiny vystavené působení proteas, které je následně odstraní. ^[18]

K agregaci proteinů dochází často v průběhu syntézy proteinů, když je ještě protein vázaný na ribozom, nebo během transportu nesbaleného proteinu přes membránu. Agregace proteinů je také pravděpodobnější v případě, kdy je koncentrace nově syntetizovaných proteinů příliš vysoká. ^[17] Následkem agregace proteinů v buňce se tvoří proteiny pro buňku toxické, nebo se redukuje zásoby funkčních proteinů v buňce. ^[18] Pro prevenci špatného sbalování proteinů se v různých buněčných kompartmentech nacházejí chaperony, (HSP). ^[17]

V některých buňkách jsou HSP syntetizované jako základní proteiny v buňce. ^[19] Hlavní HSP, syntetizované eukaryoty, také rostlinami, patří k šesti základním skupinám, označených: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 (nebo chaperoniny), malé HSP a ubikvitin. Toto rozdělení je na základě molekulové hmotnosti proteinů patřících do jednotlivých

skupin. Malé heat-shock proteiny mají velikost od 17 do 30 kDa a ubikvitiny mají kolem 8,5 kDa. ^[19] Nyní se také dělí na základě svojí homologie.

1.2.1. Skupiny heat-shock proteinů

HSP100

Skupina proteinů HSP100 se nachází v prokaryotických i v eukaryotických buňkách. Na rozdíl od ostatních chaperonů se tato rodina nepodílí na napomáhání správnému sbalování, ale na disagregaci proteinů a/nebo degradaci proteinů. Poprvé byl protein HSP100 popsán v bakteriích, konkrétně jako součást Clp proteasového systému vytvořeného ze dvou podjednotek. ^[20] Velká podjednotka ClpA reprezentuje ATP-dependentní protein, jehož funkce je rozbalování proteinů. Malá podjednotka ClpP je enzym s proteolytickou funkcí (proteasa). Podjednotka ClpA nedokáže sama proteiny hydrolyzovat. Proteiny podobné ClpA byly popsány v prokaryotických i eukaryotických buňkách po působení stresu, a proto byly zařazeny do skupiny nazvané HSP100. ^[21]

Proteolytická podjednotka ClpP, nalezená pouze v bakteriích, je často asociovaná s podjednotkou ClpA. U eukaryotických organismů byla nalezená jen velká podjednotka ClpA, která plní funkci chaperonu. ^[22]

Bylo zjištěno, že syntéza HSP100 v *Arabidopsis* a v kvasinkách, hraje významnou roli ve vytvoření tolerance daných organismů na stres způsobený zvýšenou teplotou. ^{[23] [24]}

HSP90

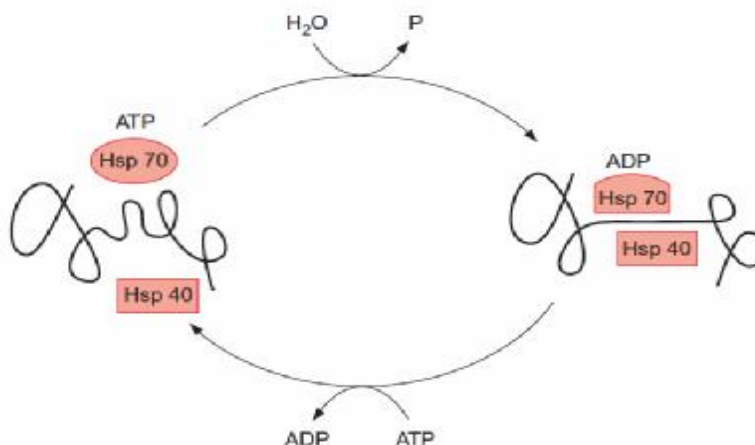
Proteiny skupiny HSP90 jsou v buňkách zastoupené hojně (1 – 2% z celkového obsahu buněčných proteinů). ^[25] V rostlinách byly nalezeny proteiny HSP90 v různých buněčných kompartmentech. Například genom *Arabidopsis thaliana* kóduje čtyři cytosolové, jeden chloroplastový, jeden mitochondriální a jeden endoplazmatický protein HSP90. ^[26]

Jejich hlavní úlohou je řízené sbalování proteinů do vyšších prostorových struktur. Podílejí se také na kontrole buněčného cyklu a degradaci proteinů. ^[25] V eukaryotické buňce jsou HSP90 součástí aktivace klíčových signálních proteinů jako jsou proteinkiny, receptory pro hormony, a transkripční faktory. ^[27] Bylo zjištěno, že hrají roli v morfologické evoluci v *Drosophila* a stresové adaptaci v *Arabidopsis*. ^[25]

Protein HSP90 je složený ze třech částí (domén). Doména na N-konci (ND) je důležitá pro navázání ATP, prostřední doména (MD) váže nesbalený protein a doména na C-konci (CD) se podílí na dimerizaci HSP90. Každá doména HSP90 interaguje se specifickými proteiny nazývanými ko-chaperony regulujícími funkce tohoto proteinu. [27]

HSP70

Skupina těchto proteinů byla nalezená v bakteriích. V eukaryotech se HSP70 nacházejí v mitochondriích, chloroplastech, endoplazmatickém retikulu a v cytosolu. HSP70 obsahuje místo pro navázání ATP nebo ADP. Když se na toto místo váže ADP, vytváří HSP70 komplex s HSP40 a nesbaleným proteinem. Nikdy nevytváří tento komplex s nativním proteinem. Po vytvoření nativní struktury proteinu je ADP navázané k HSP70 nahrazeno ATP a tento nově vzniklý komplex má slabou afinitu ke zbytku původního komplexu, a proto dochází k jeho disociaci. Následně dochází k hydrolyze ATP na ADP, čímž je daný segment ADP s HSP70 schopný vázat další nesbalený protein (obr. č. 2). HSP70 se váže na protein jen krátký čas, pak se od něj oddělí a když je potřeba dojde k jeho opětovnému navázání. [17]



Obr. č. 2. Schéma funkce komplexu HSP70, HSP40 a ATP nebo ADP. Komplex HSP70 s HSP40 a ADP váže nesbalený protein. ADP je po sbalení proteinu nahrazeno ATP a dochází k disociaci komplexu HSP70 a HSP40. Hydrolyza ATP na ADP způsobí obnovení komplexu a jeho schopnosti vázat další nezralý protein [17]

Základní funkce proteinů HSP70 je asistence při sbalování proteinů za normálních a stresových podmínek. Další funkce HSP jsou asistence při importu proteinů do organel

buňky, usnadnění proteolytické degradace nestabilních proteinů jejich směřováním do lyzozomů nebo proteozomů, asistence při translokačních procesech. ^[16]

HSP60 – chaperoniny

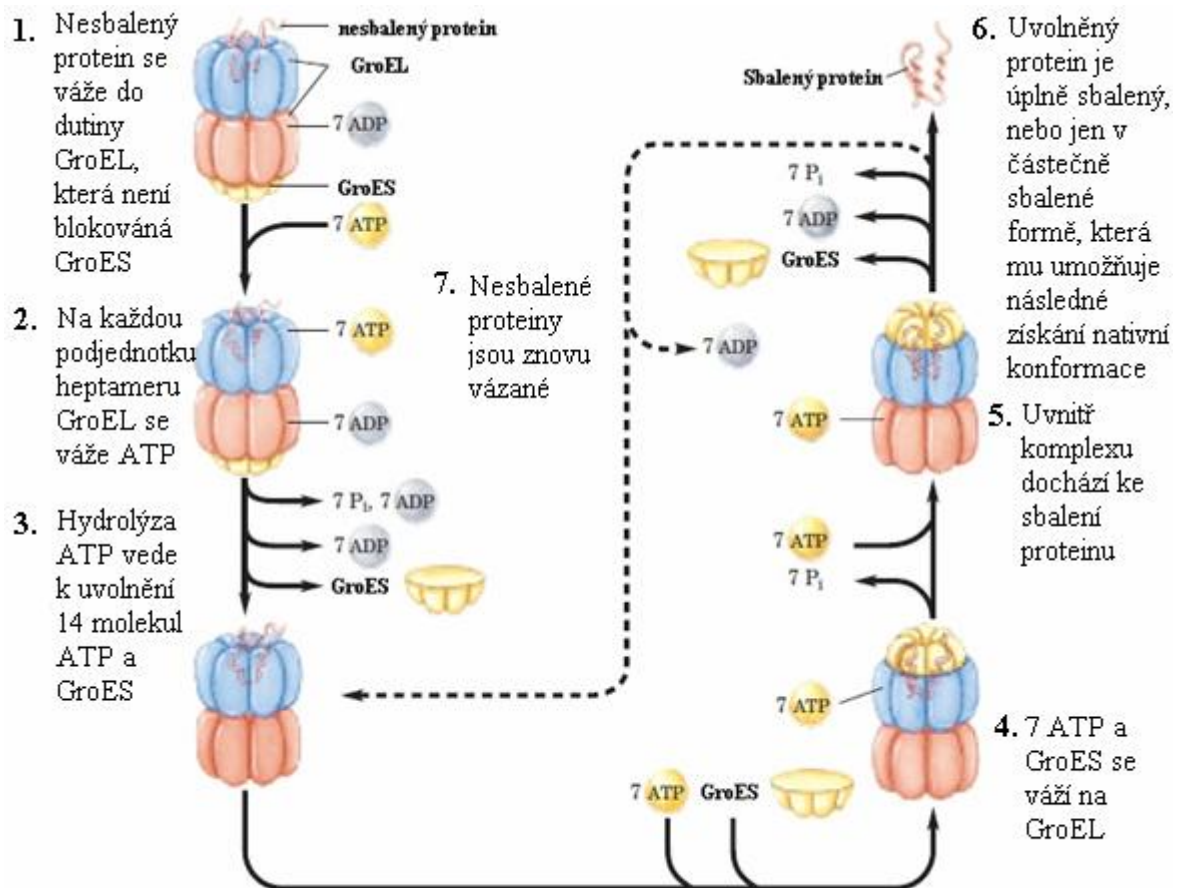
Termín chaperonin byl poprvé navrženo pro popis třídy molekul chaperonů, které jsou evolučně homologní s GroEL, vyskytujícím se v *E. coli*. ^[28] Chaperoniny jsou skupina chaperonů, které se nacházejí u prokaryot a v mitochondriích a plastidech eukaryot. ^{[16][29]}

Hlavními představiteli skupiny HSP60 jsou prokaryotní GroEL a eukaryotní ekvivalent HSP60. Chaperoniny jsou dále klasifikované do dvou podskupin. Podskupina I jsou takzvané GroE chaperoniny. Nacházejí se v bakteriích a v eukaryotických buňkách jsou lokalizované v mitochondriích a chloroplastech. Podskupina II se nazývají CCT chaperoniny (chaperoniny obsahující t-komplex polypeptidu 1; TCP1). Proteiny druhé podskupiny byly popsány v *Archaea* a v cytosolu eukaryot. ^[30]

Chaperoniny asistují širokému okruhu nově syntetizovaných proteinů při dosažení jejich nativních forem. ^[31]

Rostlinné chaperoniny mají několik funkcí. Pomáhají plastidovým proteinům, například enzymu RubisCO při jeho složení. ^{[28] [29]} V mitochondriích a chloroplastech se nachází GroES faktor jinak nazývaný HSP10. Ten se podílí na sbalování proteinů prostřednictvím HSP60. ^[17]

V bakteriích byl objevený komplex, vytvořený ze 14 jednotek GroEL a 7 jednotek GroES, které jsou uspořádané do tvaru kavity, v níž dochází ke složení proteinů do nativní formy. Nesložený protein se na začátku procesu váže k HSP60 podobně jako je tomu u HSP70, vázajícího nesbalený protein. Správné sbalení proteinů vyžaduje hydrolýzu několika molekul ATP, která podporuje disociaci a vytvoření nových vazeb ve struktuře proteinů (obr. č. 3). ^[17]



Obr. č. 3. Úloha chaperoninů ve sbalování proteinu. Nesbalený protein se váže ke komplexu vytvořenému jednotkou GroEL (protein ze skupiny HSP60) a jednotkou GroES (protein ze skupiny HSP10). 7 jednotek ATP se váže k heptameru GroEL, dochází k hydrolyze ATP za uvolnění anorganického fosfátu a ADP. Zároveň se od komplexu uvolňuje GroES. Po navázání dalších 7 ATP a GroES na opačnou stranu heptameru GroEL dojde ke sbalení proteinu. ^[32]

Malé heat-shock proteiny

V rostlinách jsou malé heat-shock proteiny zastoupené mnohem více než ostatní skupiny heat-shock proteinů. ^[8] Tato skupina proteinů je syntetizována jak v prokaryotických tak i eukaryotických buňkách jako odpověď na zvýšenou teplotu a ostatní stresy. Některé malé heat-shock proteiny jsou exprimované v průběhu určitých stádií života organismů jako jsou například: embryogeneze, klíčení a zrání ovoce. ^[33] ^[29] Malé heat-shock proteiny mají na svém C-konci doménu tvořenou 90 aminokyselinami. Tato doména se nazývá α -crystallin podle její podobnosti s doménou proteinů oční čočky u obratlovců. ^[8] ^[33] Doména α -

crystallin odlišuje malé heat-shock proteiny od ostatních proteinů, které se tvoří vlivem teplotního šoku. ^[33]

Malé heat-shock proteiny rostlin se dělí do šesti skupin podle sekvence aminokyselin, intracelulární lokalizace a imunologické zkřížené reaktivity. ^{[19] [33]} Geny pro všechny skupiny jsou uloženy v buněčném jádře. Tři skupiny malých heat-shock proteinů (skupiny CI, CII a CIII) jsou lokalizované v cytosolu nebo v jádře. Ostatní tři skupiny se nacházejí v plastidech, endoplazmatickém retikulu a v mitochondriích (skupiny CIV, CV a CVI). ^[34] Bylo zjištěno, že některé malé heat-shock proteiny působí jako molekulární chaperony *in vivo* a *in vitro*. ^[34]

Ubikvitin

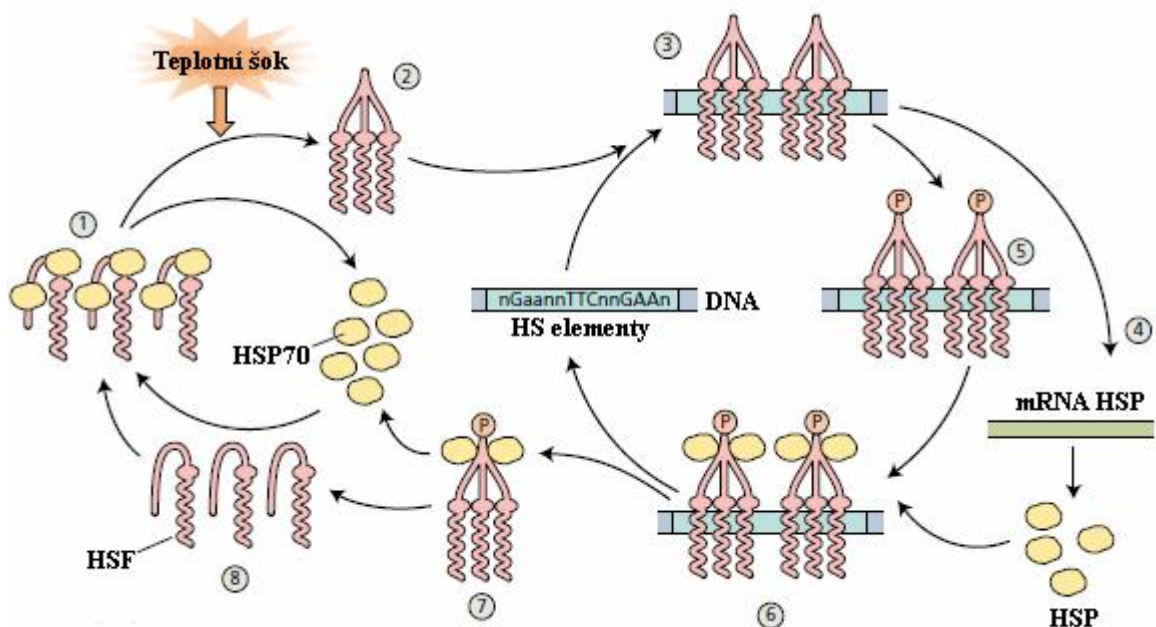
Ubikvitin je nízkomolekulární protein, obsahující 75 až 76 zbytků aminokyselin, nacházející se ve všech buňkách eukaryotických organismů. ^[12] Slouží k rozpoznávání chybně poskládaných nebo neúplně sestavených nadmolekulárních proteinových struktur. ^[35] Byl nalezen volný nebo vázaný k různým proteinům, přesněji k jejich koncové aminokyselině glycinu. ^[12] Syntéza ubikvitinu indukovaná teplotním stresem může mít rozhodující roli pro vytvoření stresové tolerance a pro následné zotavení organismu. ^[36] Rostliny využívají více způsobů kontroly množství a aktivity pro ně důležitých proteinů. Jedním z příkladů je právě selektivní odstranění proteinů pomocí systému ubikvitin/26S proteasom. Analýzy genomu *Arabidopsis thaliana* ukázaly, že více než 1300 genů, neboli 5% proteomu se podílí na funkci systému ubikvitin/26S proteasom. To řadí tento systém k nejvíce komplikovaným regulačním mechanismům u rostlin. ^[37]

1.2.2. Regulace odpovědi na teplotní stres

Odpověď na teplotní šok je řízená pomocí transkripčních faktorů teplotního šoku (HSF), které se vážou na specifická místa promotorů DNA, na tzv. HS elementy a tím aktivují transkripci heat-shock genů. ^[38]

Všeobecně HSF obsahují čtyři funkčně rozdílné oblasti: DNA-vázací oblast - DBD, oblast oligomerizace bohatou na leucinové zipy (dimerizace dvou podobných nebo stejných molekul obsahujících helix bohatý na leucin) – LZR, jaderný lokalizační signál (pomáhá proteinům prostupovat jaderné póry) – NLS a oblast aktivace HSF. ^[39]

Při optimálních podmínkách růstu rostliny je většina z HSF přítomných v buněčném cytosolu a jádře jenom ve formě monomerů, které nejsou schopné vázat se na DNA (postrádají oblast DBD). Působením teplotního stresu a ostatních stresů se tyto monomery HSF skládají do trimerů a akumulují se v jádře buňky. ^[40] Trimery HSF se váží na promotory DNA a zároveň se fosforylují. Fosforylované trimery HSF podporují transkripci mRNA proteinů HSP. Tato transkripční aktivita heat-shock genů vede ke zvýšené syntéze proteinů HSP, včetně HSP70, které se poté váží na HSF a tím dochází k disociaci trimerů HSF z DNA. Trimery HSF se mohou konvertovat zpátky na monomery (obr. č. 4). ^{[3] [10]} Na rozdíl od živočichů a kvasinek, které mohou obsahovat čtyři nebo méně HSF, u rostlin byly nalezeny mnohonásobné kopie genů kódujících HSF. *Arabidopsis* obsahuje 21 různých HSF genů, u rajčete bylo dosud nalezeno 17 genů kódujících HSF. ^[40]



Obr. č. 4. Funkce HSF v syntéze proteinů teplotního šoku. 1, v nestresovaných buňkách jsou HSF ve formě monomerů asociovaných s proteiny HSP70. 2, Po působení teplotního šoku dochází k disociaci HSP70 z monomerů HSF, které následně tvoří trimery. 3, Aktivní trimery HSF se váží na HS elementy promotorů genů HSP. 4, Dochází k transkripci DNA na mRNA, která se překládá na HSP, mezi kterými jsou i HSP70. 5, Trimery HSF asociované s HS elementy DNA se fosforylují. 6, Proteiny HSP70 se váží na fosforylované trimery HSF. 7, Komplex HSP70 s fosforylovanými trimery HSF disociuje z promotoru DNA. 8, Trimery HSF se rozpadají na monomery a následně asociují s HSP70. HSF – transkripční faktory teplotního šoku, HSP – proteiny teplotního šoku ^[3]

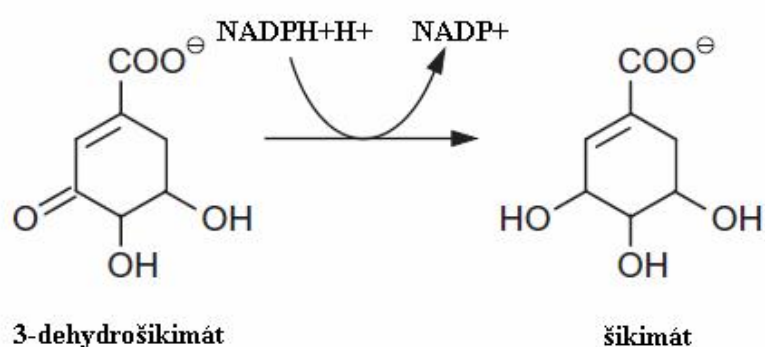
1.3. Enzymy

1.3.1. NADP-dependentní enzymy

Tyto enzymy potřebují pro svoji funkci nikotinamidové kofaktory, a to NADP^+ nebo jeho redukovaný ekvivalent $\text{NADPH}+\text{H}^+$. Nikotinamidové koenzymy jsou přenašeče elektronů, protonů nebo vodíků.

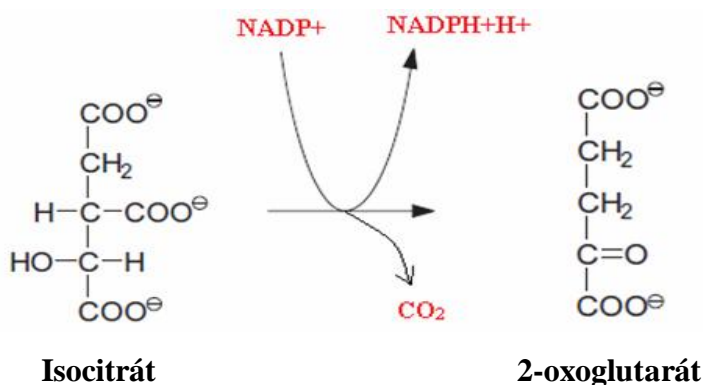
V rostlinách je hlavním zdrojem NADPH fotosyntéza. Kofaktor NADPH je velmi důležitý pro růst rostlin a vývoj rostlin, stejně jako pro zachování buněčné homeostázy. NADPH se podílí na biosyntetických reakcích, jako je např. biosyntéza aminokyselin, mastných kyselin, isoprenoidů a fytohormonů. NADPH je důležitou součástí antioxidačních a regulačních systémů. ^[9] Dalším důležitým zdrojem NADPH, kromě fotosyntézy, je oxidativní pentosafosfátová cesta a další NADP-dependentní enzymy.

Šikimátdehydrogenasa (EC 1.1.1.25) je součástí šikimátové dráhy, prostřednictvím které se u rostlin syntetizují aminokyseliny s aromatickým charakterem (fenylalanin, tyrosin a tryptofan), foláty a sekundární metabolity (některé pigmenty, flavonoidy, auxiny, fytoalexiny, lignin a taniny). ^[41] Šikimátdehydrogenasa katalyzuje reverzibilní redukci 3-dehydrošikimátu za vzniku šikimátu. Enzym vyžaduje kofaktor $\text{NADPH}+\text{H}^+$, který přenáší vodíky za vzniku šikimátu a tím se oxiduje (obr. č.5). ^[17] Enzym je lokalizovaný v plastidech buněk rostlin. ^[41]



Obr. č. 5. Redukce 3-dehydrošikimátu na šikimát katalyzovaná SDH ^[17]

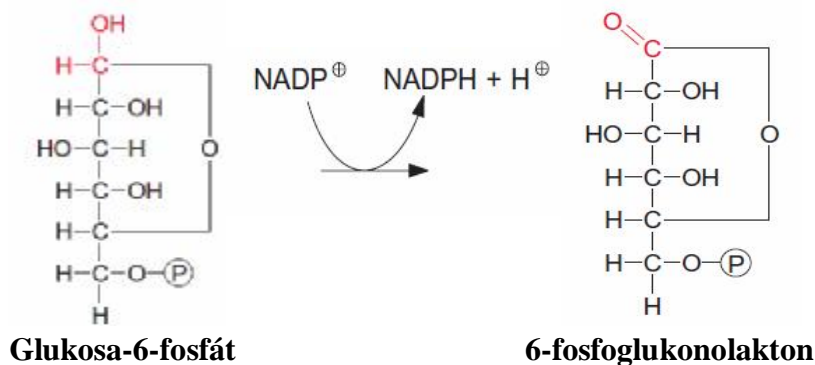
NADP-isocitrátdehydrogenasa (EC 1.1.1.42) katalyzuje oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na 2-oxoglutarát, za vzniku $\text{NADPH}+\text{H}^+$ a CO_2 (obr. č. 6). Produkt této reakce 2-oxoglutarát je klíčovým metabolitem v metabolismu dusíku a uhlíku, neboť 2-oxoglutarát poskytuje svůj uhlíkatý skelet pro asimilaci amoniaku za vzniku aminokyselin. V rostlinách se tyto reakce uskutečňují pomocí enzymů glutaminsynthetasy (GS) a glutamátsynthasy (GOGAT) tvořící cyklus GS/GOGAT. ^[42] Zároveň je enzym NADP-ICDH považován za alternativní zdroj 2-oxoglutarátu vedle citrátového cyklu, v době kdy jej buňka potřebuje ve zvýšeném množství. ^[43] NADP-ICDH se nachází ve velkém množství organismů. NADP-ICDH se vykytuje ve formě několika isoenzymů lokalizovaných v různých intracelulárních kompartmentech, např. v cytosolu, chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech. ^[43]



Obr. č. 6. Dekarboxylace isocitrátu na 2-oxoglutarát katalyzovaná NADP-ICDH ^[17]

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (EC 1.1.1.49) je hlavní součástí oxidativní pentosafosfátové cesty. Je prvním enzymem tohoto cyklu a zároveň i enzymem limitujícím rychlost oxidativní pentosafosfátové cesty. Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa katalyzuje oxidaci glukosa-6-fosfátu na 6-fosfoglukonolakton, za vzniku redukovaného kofaktoru $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (obr. č. 7). ^[17]

G6PDH je poskytováním NADPH také součástí reakcí účastnících se asimilace dusíku. ^[44] Bylo zjištěno, že G6PDH hraje úlohu při ochraně organismu před oxidativním stresem ^[45], stresem způsobeným zvýšenou koncentrací solí ^[46], suchem a teplotní stresem ^[6]. Podílí se rovněž na obranných odpovědích rostlin vůči biotickému stresu ^[47] i vůči toxickému působení těžkých kovů. ^[48]



Obr. č. 7. Oxidace glukosa-6-fosfátu na 6-fosfoglukonolakton katalyzovaná G6PDH ^[17]

1.3.2. Enzymy Hatchova-Slackova cyklu

Při nárůstu teplot nad hodnoty 20-30°C dochází k vyšším ztrátám vody než za optimálních teplot. Tato ztráta vody představuje vážný problém pro rostliny žijící v suchém a horkém prostředí, proto si tyto rostliny vyvinuly systém přídatných metabolických drah nazvaný Hatchův-Slackův cyklus, jinak nazývaný C4 nebo CAM cesta fixace CO₂. ^[17] C4 a CAM rostliny ztrácejí méně vody transpirací a mají nižší ztráty produktů fotosyntézy fotorespirací oproti C3 rostlinám. ^[9]

Enzymy Hatchova-Slackova cyklu jsou: fosfoenolpyruvátcarboxylasa (PEPC), NADP-malátdehydrogenasa (NADP-MDH), NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační) (NADP-ME) a pyruvát, fosfát dikinasa (PPDK). ^[9]

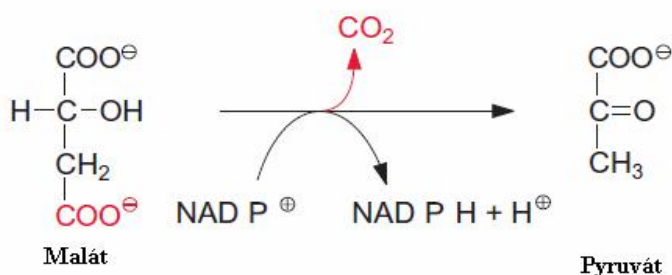
Primární fixace CO₂ v C4 rostlinách je katalyzovaná PEPC v mesofylových buňkách, produktem této reakce je oxalacetát, který je dále přeměněn na čtyřuhlíkatou sloučeninu L-malát enzymem NADP-MDH. L-malát je přenesen do buněk pochev svazků cévních. L-malát je dále dekarboxylován pomocí NADP-ME na CO₂ a tříuhlíkatý metabolit pyruvát. V buňkách pochev svazků cévních je uvolněný CO₂ fixovaný enzymem RubisCO. Tříuhlíkatý metabolit je transportován do mesofylových buněk a u NADP-ME typu fotosyntézy dochází k vytvoření fosfoenolpyruvátu za katalýzy PPDK. ^[9]

NADP-malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40) je velmi rozšířený enzym, nacházející se jak v prokaryotických tak v eukaryotických organismech. ^[49] NADP-ME katalyzuje oxidativní dekarboxylaci L-malátu a NADP⁺ za vzniku pyruvátu a NADPH+H⁺ (obr. č. 8). Ke své funkci NADP-ME potřebuje dvojmocný kation (Mg²⁺,

Mn²⁺).^[50] NADP-ME katalyzuje také dekarboxylaci oxalacetátu a redukcí α -ketokarboxylové kyseliny.^[49]

NADP-ME má více isoform. Isoforma NADP-ME katalyzující reakci fotosyntézy u C4 rostlin je nejvíce prostudovaná. Tato isoforma NADP-ME se nachází v chloroplastech buněk pochev svazků cévních a její další důležitou funkcí je poskytování CO₂, který je následně fixovaný enzymem RubisCO. Další isoforma NADP-ME se nachází v cytosolu buněk rostlin CAM a má rovněž fotosyntetickou funkci jako výše popsaná isoforma nacházející se v rostlinách C4.^{[51] [52]}

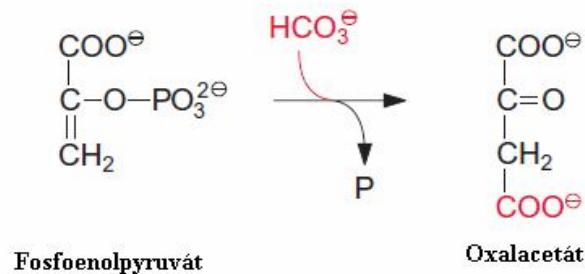
NADP-ME byl nalezen také v rostlinách C3. V rostlinách C3 se isoformy NADP-ME neúčastní fotosyntézy a jejich hlavní funkce spočívá ve vytváření NADPH+H⁺ pro biosyntetické reakce, jako je syntéza mastných kyselin, nebo v poskytování pyruvátu. Tyto isoformy NADP-ME se také účastní udržování intracelulárního pH, uzavírání průduchů a hospodaření rostliny s vodou. Jejich intracelulární lokalizace je buď cytosolová nebo plastidová. Podobné nefotosyntetické isoformy NADP-ME se nacházejí i u C4 a CAM rostlin.^{[51] [52]}



Obr. č. 8. Oxidativní dekarboxylace malátu na pyruvát katalyzovaná NADP-ME^[17]

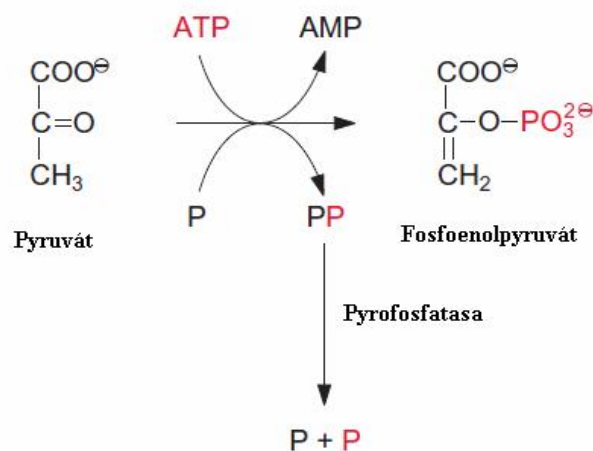
Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (EC 4.1.1.31) je cytosolový enzym, který katalyzuje karboxylaci fosfoenolpyruvátu za vzniku oxalacetátu (obr. č. 9). Fosfoenolpyruvát reaguje s hydrogenuhličitanovým iontem, který vzniká účinkem karbonátanhydrasy, nacházející se v cytosolu mesofylových buněk. PEPC pro svoji funkci potřebuje přítomnost dvojmocného kationtu. Reakce katalyzovaná PEPC je silně exergonická a ireverzibilní.^[17] PEPC má kromě fotosyntetické funkce i další nefotosyntetické funkce. PEPC doplňuje intermediáty citrátového cyklu, podílí se na asimilaci dusíku a syntéze aminokyselin, participuje na malátovém kvašení a pomáhá při udržování elektroneutrálnosti. Spolu s NAD-MDH se PEPC podílí na udržování optimální hodnoty pH v buňce. PEPC, v kooperaci s enzymy NAD-MDH a NADP-ME, vytváří redukované kofaktory NADPH+H⁺. Další důležitou funkcí

PEPC je opětovná fixace respirovaného CO_2 .^{[53] [54]} PEPC má podobně jako ostatní enzymy několik isoform. V částech C4 a CAM rostlin, kde probíhá fotosyntéza byla nalezena fotosyntetická isoforma PEPC, ostatní isoformy PEPC jsou zastoupené ve všech rostlinách a jejich funkce jsou anaplerotické.^[55]



Obr. č. 9. Karboxylace fosfoenolpyruvátu na oxalacetát katalyzovaná PEPC^[17]

Pyruvát, fosfátdikinasa (EC 2.7.9.1) v chloroplastech mesofylu rostlin mění pyruvát na fosfoenolpyruvát poněkud neobvyklou reakcí. Dikinasa označuje enzym, katalyzující dvojnásobnou fosforylaci. Z ATP se jeden fosfátový zbytek přenáší na pyruvát a druhý fosfátový zbytek se přenáší na fosfát za vzniku pyrofosfátu (obr. č. 10). Pyrofosfatasa ve stroma chloroplastu však vznikající pyrofosfát hydrolyzuje na anorganické fosfáty, čímž činí reakci katalyzovanou PDK ireverzibilní.^[17] PDK se v rostlinách nachází v několika isoformách. Isoforma účastníci se fotosyntézy je lokalizovaná v chloroplastech buněk C4 rostlin, nefotosyntetická isoforma je cytosolová. V C3 rostlinách jsou přítomné isoformy PDK v chloroplastech i cytosolu buněk.^[56]



Obr. č. 10. Fosforylace pyruvátu na fosfoenolpyruvát katalyzovaná PDK se spřaženou reakcí hydrolyzy pyrofosfátu na anorganický fosfát katalyzovanou pyrofosfatasou^[17]

1.3.3. Glykosidasy

Glykosidasy jsou enzymy katalyzující hydrolýzu glykosidových vazeb ve všech glykosidech, glykanech a glykokonjugátech. Jako skupina enzymů jsou pravděpodobně nejvíce prostudované enzymy, podílející se na uvolnění sacharidů a nesacharidové části z glykosidů, glykanů a glykokonjugátů. ^[57]



Obr. č. 11. Hydrolýza glykosidu katalyzovaná glykosidasou. ^[57]

Glykosidasy jsou rozděleny na *exo*- nebo *endo*-glykosidasy. Táto klasifikace je na základě toho, zda štěpí vazbu uvnitř řetězce nebo na jeho okraji. Podle toho, zda glykosidasy působí změnu anomerické konfigurace uvolněného sacharidu vůči sacharidu vázanému v molekule substrátu, se dělí mechanismy katalýzy glykosidas na invertující a udržující původní anomerickou konfiguraci. ^[58] Dále jsou glykosidasy specifické vůči typu glykosidové vazby (α -glykosidasy nebo β -glykosidasy), vůči sacharidové části substrátu (u některých druhů enzymů to není zcela striktní specificita), avšak vůči nesacharidové části (aglykonu) vykazují malou specificitu.

Glykosidasy se člení také podle aminokyselinové sekvence do několika rodin, jejichž počet se od založení této klasifikace významně rozrostl. Na základě trojrozměrné struktury glykosidas byla založená další klasifikace do několika klanů. ^[59]

Lokalizace rostlinných glykosidas byla popsána v několika buněčných kompartmentech, např: v cytosolu, buněčné membráně, vakuole, endoplazmatickém retikulu a peroxisomu. ^[60 - 63]

β -glukosidasa (EC 3.2.1.21) katalyzuje hydrolýzu β -glukosidové vazby mezi dvěma sacharidovými zbytky nebo jedním sacharidovým a jedním aglykonovým zbytkem. β -glukosidasa má v rostlinách několik funkcí: vytváří intermediáty v procesu lignifikace buněčné stěny ^[64] ^[65], degraduje buněčné stěny endospermu během klíčení ^[66], aktivuje fytohormony ^[67] a aktivuje obranné chemické látky. ^[68]

α -glukosidasa (EC 3.2.1.20) patří mezi *exo*-glykosidasy, katalyzuje hydrolýzu glykosidové vazby za uvolnění α -glukosy. Skupina enzymů α -glukosidas se nachází v mikroorganismech, rostlinách a živočiších a je rozdělená na tři typy. Typ I katalyzuje hydrolýzu různorodých substrátů, jako jsou glukosidy nebo sacharosa s navázanými aromatickými látkami. Typ II α -glukosidas katalyzuje hydrolýzu maltosy a isomaltosy a typ III hydrolyzuje amylosu a škrob. ^{[69][70]}

α -mannosidasa (EC 3.2.1.24) katalyzuje štěpení vazeb v oligosacharidech a glykoproteinech, za uvolnění krátkých zbytků oligomannosidových řetězců. Při pozorování aktivity α -mannosidasy u rajčete jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.) byl zaznamenán nárůst aktivity α -mannosidasy při zrání a měknutí plodu. Z tohoto důvodu se předpokládá, že α -mannosidasa napomáhá při zrání a měknutí plodu svým hydrolytickým štěpením sacharidové části glykoproteinů. ^[71]

α -galaktosidasa (EC 3.2.1.22) katalyzuje hydrolytické uvolnění α -galaktosy z molekuly substrátu, patří mezi *exo*-glykosidasy. Je to enzym iniciující metabolické procesy katabolismu raffinosu a stachyosu. ^[72]

Několik různých forem α -galaktosidasy bylo studováno a popsáno. Tyto formy enzymů jsou rozděleny do dvou skupin na alkalické a kyselé, podle hodnot pH, při kterých jsou dané formy α -galaktosidasy aktivní. Kyselé formy enzymu se podílejí na vývoji semen a klíčení rostliny. Alkalické formy enzymu α -galaktosidasy vykazují vysokou afinitu vůči stachyose a nízkou specificitu vůči raffinose. Kyselé formy enzymu více preferují raffinosu jako substrát. ^[72]

β -hexosaminidasa (EC 3.2.1.52) se podílí na katalýze hydrolýzy koncové částí N-acetyl- β -D-hexosaminidu, za odštěpení N-acetyl-D-hexosaminu. β -hexosaminidasy byly detekovány v několika rostlinných pletivech, např. v semenech a listech. Vysoká hladina β -hexosaminidasy byla zjištěna v klíčících semenech, což podporuje hypotézu o funkci tohoto enzymu v metabolismu a skladování glykoproteinů. Také se předpokládá účast tohoto enzymu i na obranných procesech rostlin, protože bylo zjištěno, že několik β -hexosaminidas dokáže degradovat oligomery chitinu. ^[73]

1.3.4. Antioxidační enzymy

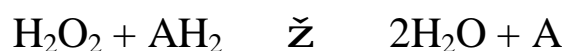
Stresové podmínky u rostlin navozují zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). ROS jsou však syntetizované také u rostlin, které stresu vystaveny nejsou. [74] ROS představují skupinu kyslíkatých derivátů, které jsou ve zvýšené koncentraci pro buňky rostlin nebezpečné. Mezi ROS patří volné radikály (superoxidový radikál O_2^{\bullet} a hydroxylový radikál OH^{\bullet}), peroxid vodíku H_2O_2 , singletový kyslík 1O_2 a ozon O_3 . [75]

Rostliny mají dobře vyvinutý obranný systém proti ROS, který tvorbu ROS omezuje nebo podporuje jejich eliminaci. Za optimálních podmínek růstu rostliny je vytváření a eliminace ROS v rovnováze, při stresových podmínkách dochází ke zvýšené produkci ROS a obranné systémy proti ROS můžou být zpomaleny. [74]

Součástí obranného systému proti ROS jsou antioxidační enzymy. Hlavním představitelem antioxidačních enzymů je skupina superoxidodismutas (EC 1.15.1.1). Superoxidodismutasy patří mezi metaloenzymy katalyzující dismutaci superoxidového radikálu na peroxid vodíku. Tyto enzymy se nacházejí v chloroplastech, mitochondriích, peroxisomech a v cytosolu.

Další důležitou skupinou antioxidačních enzymů jsou katalasy (EC 1.11.1.6), hemové enzymy lokalizované v peroxisomech buňky, které katalyzují odstranění peroxidu vodíku. Enzymy askorbát-glutathionového cyklu (askorbátperoxidasa EC 1.11.1.11, glutathionreduktasa EC 1.8.1.7, monodehydroaskorbátreduktasa EC 1.6.5.4) katalyzují reakce eliminující peroxid vodíku. Tato skupina enzymů je lokalizovaná v cytosolu a organelách. [76 - 78]

Peroxidasy (EC 1.11.1.x) katalyzují oxidoredukce mezi peroxidy (peroxidem vodíku) a různými reduktanty.



Přesně je známo 15 rozdílných skupin peroxidas označených kódem EC 1.11.1.1 až EC 1.11.1.16 (skupina EC 1.11.1.4 byla odstraněna). Ostatní skupiny peroxidas byly kvůli výskytu dvou enzymových domén zařazeny pod číselné kódy: EC 1.13.11.44, EC 1.14.99.1, EC 1.6.3.1 a EC 4.1.1.44. Některé peroxidasy nemají přidělené vlastní EC číslo a jsou zařazeny pod společný kód EC 1.11.1.7. [79]

Peroxidasy se dělí do dvou nadčeledí:

- 1. nadčeleď reprezentuje skupinu peroxidas přítomných v bakteriích, houbách a rostlinách. ^[80]
- 2. nadčeleď byla popsána hlavně v živočiších, houbách a bakteriích. ^[81]

V první nadčeledi peroxidas rozlišujeme tři třídy podle struktury a katalytických schopností. ^[82] Třída I. zahrnuje askorbátperoxidasu, cytochrom c peroxidasu, katalasu peroxidasu. Ve II. třídě jsou enzymy: lignin peroxidasa, mangan peroxidasa, univerzální peroxidasa. ^[82] Třída III. obsahuje rostlinné peroxidasy (EC 1.11.1.7), které jsou sekretované ven z buňky nebo jsou uskladněné ve vakuolách. ^[83]

Enzymy druhé nadčeledi jsou reprezentované myeloperoxidasou, eosinofilní peroxidasou, laktoperoxidasou, tyroidní peroxidasou, prostaglandin H syntasou, peroxidasinem a peroxinektinem. ^[79]

Rostlinné peroxidasy (třída III.) jsou glykoproteiny obsahující hem a dělí se podle isoelektrického bodu na kyselý, neutrální nebo bazický. ^[84]

Rostlinné peroxidasy se v buňkách nacházejí ve formách, které jsou vázané na buněčnou stěnu. Mají více funkcí, např: vytváření ROS a regulace jejich hladiny v buňce, regulace hladiny H₂O₂ v buňce a oxidace různých substrátů. ^[85] Peroxidasy rostlin se podílejí na biosyntéze a degradaci ligninu buněčné stěny, katabolismu auxinu, obranné odpovědi rostliny na poranění, poškození rostliny patogeny a hmyzem a na respiračních procesech. ^[86] Rostlinné peroxidasy se účastní obranných reakcí rostlinné buňky na stres (teplotní šok a ostatní). Největší exprese genů peroxidas je na začátku působení stresových faktorů. ^[87]

Peroxidasy rostlin se při optimálních růstových podmínkách podílejí hlavně na růstu podporováním prodloužení a dřevnatění rostliny. ^[85]

2. Cíl práce

1. Zjistit, zda teplotní šok (1 hodina 40°C) má vliv na aktivitu některých enzymů (NADP-dependentních, enzymů Hatchova-Slackova cyklu, glykosidas, peroxidas) rostlin tabáku *Nicotiana tabacum* L.
2. Optimalizovat časový průběh experimentu
3. Sledovat množství proteinu HSP70 ve stresovaných rostlinách

3. Materiál

3.1. Pomůcky

Analytické váhy 100 A – Denver Instrument Company, USA

Centrifuga Universal 32 R – Hettich Zentrifugen, Německo

Termostat se suchou lázní EL-01 – Major Science, USA

Spektrofotometr Ultrospec 2100 Pro – Biochrom, Velká Británie

Spektrofotometr Helios α – Thermo Spectronic, USA

Elektroforetická souprava - Biometra, Německo

Mísíč gradientu – Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie

Souprava pro přenos proteinů - Biometra, Německo

pH/mV metr UB-10 – Denver Instrument Company, USA

Vortex – Biosan, Lotyšsko

3.2. Chemikálie

2-amino-2-methyl-1-propanol, Sigma, USA

3,3'-diaminobenzidin, Sigma, USA

Akrylamid, Sigma, USA

ATP, Sigma, USA

Bisakrylamid, Sigma, USA

Bromfenolová modř, Sigma, USA

BSA, Sigma, USA

Citronan sodný, Penta, ČR

Coomassie Brilliant Blue G 250, Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R 250, Sigma, USA

D-glukosa-6-fosfát, Sigma, USA

D, L-isocitrát trisodný, Sigma, USA

DTT, Sigma, USA

Ethanol, Lachema, ČR

EDTA, Sigma, USA

Glycerol, Penta, ČR
Glycin, Degussa, ČR
HCl, Penta, ČR
KCl, Lachema, ČR
K₂HPO₄, Lachema, ČR
KH₂PO₄, PENTA, ČR
Kyselina citronová, Lachema, ČR
Kyselina octová, PENTA, ČR
L-Malát sodný, Sigma, USA
MgCl₂, Sigma, USA
Methanol, Penta, ČR
NADH, Sigma, USA
NADP⁺, Sigma, USA
NaHCO₃, Sigma, USA
NaH₂PO₄, PENTA, ČR
NaN₃, Fluka, Velká Británie
Nitroblue tetrazolium, Sigma, USA
PEP, Sigma, USA
Peroxid vodíku, Penta, ČR
Peroxodisíran amonný, Lachema, ČR
Phenazin methosulfát, Sigma, USA
p-nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid, Sigma, USA
p-nitrofenyl- α -D-glukopyranosid, Sigma, USA
p-nitrofenyl- β -D-glukopyranosid, Sigma, USA
p-nitrofenyl- α -D-mannopyranosid, Sigma, USA
p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-galaktosaminid, Sigma, USA
p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-glukosaminid, Sigma, USA
protilátka Anti HSP70, Thermo Fischer Scientific, USA
protilátka Anti Rabbit IgG, Sigma, USA
Pyruvát sodný, Sigma, USA
PVP, Sigma, USA
Sacharosa, Lachema, ČR
SDS, Serva, Německo

Šikimát sodný, Sigma, USA

TEMED, Serva, Německo

Tris (hydroxymethyl)aminomethan, Sigma, USA

Tween, Sigma, USA

3.3. Rostlinný materiál

Použity byly rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1), pěstované ve sklenicích Ústavu experimentální botaniky Akademie Věd s laskavým svolením Doc. RNDr. Noemi Čerovské, CSc.

4. Metody

4.1. Pěstování rostlin, provedení pokusu a odběr vzorků

Byly provedeny 2 pokusy vystavení rostlin tabáku teplotnímu šoku. Pro každý pokus bylo ve směsi substrátu a písku (3:1) pěstováno 50 rostlin. Polovina z těchto rostlin byla celou dobu (6 týdnů) pěstovaná při teplotě 20°C (kontrolní skupina) a druhá polovina rostlin byla po 4 týdnech růstu při 20°C podrobena teplotnímu šoku (skupina rostlin HSk). Teplotní šok byl proveden v kultivačním boxu, ve kterém byly stresované rostliny vystaveny teplotě 40°C po dobu jedné hodiny.

V prvním experimentu byly vzorky odebrány třetí, sedmý a desátý den po aplikaci teplotního šoku z obou skupin rostlin.

Ve druhém pokusu byly vzorky odebrány jednu hodinu, jeden den a sedm dní po teplotním šoku opět jak z kontrolní skupiny rostlin tak ze skupiny, která byla vystavená teplotnímu šoku.

Vzorky byly připravovány z prvních plně vyvinutých vrchních listů, ze kterých byla odstraněna střední žilka. Při každém odběru byly odebrány vzorky asi ze šesti rostlin kontrolní skupiny a šesti rostlin skupiny vystavené teplotnímu šoku. Směsné vzorky byly váženy po přibližně 0,5 g, mrazeny tekutým dusíkem a uloženy v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C.

4.2. Příprava rostlinného extraktu

Odebrané vzorky listů rostlin kontrolní skupiny a skupiny po HS byly homogenizovány ve třecí misce s trojnásobkem extrakčního pufru A, který obsahoval 100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,8; 1 mM DTT; 1mM EDTA; 5 mM MgCl₂ a 5 % (v/v) glycerol. Extrakty byly převedeny do mikrozkušavek, bylo přidáno přibližně 0,02 g PVP a poté byly vzorky centrifugovány po dobu 15 minut při 4°C a 16 600 x g. Poté byl supernatant odebrán do Eppendorfových zkumavek a použit k měření enzymové aktivity.

4.3. Stanovení aktivity NADP–dependentních enzymů

Pro stanovení aktivity NADP–dependentních enzymů byla použita kinetická spektrofotometrická metoda. Pomocí této metody bylo po dobu 3 minut sledováno množství vytvořeného $\text{NADPH} + \text{H}^+$ způsobujícího nárůst absorbance při 340 nm.

Reakční směs pro jednotlivé enzymy byla pipetována do Eppendorfových zkumavek, které byly následně vloženy do předehřáté suché lázně o teplotě 36°C a po dobu 5 minut temperovány. Poté byl k reakční směsi přidán rostlinný extrakt, který inicioval danou reakci.

4.3.1. Stanovení aktivity SDH

Reakční směs pro stanovení aktivity SDH obsahovala 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol-NaOH pufr, pH 9; 3 mM šikimát a 0,2 mM NADP^+ . Nakonec bylo přidáno 50 μl extraktu pro iniciaci enzymové reakce.

4.3.2. Stanovení aktivity G6PDH

Reakční směs pro stanovení aktivity G6PDH obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,6; 5 mM roztok D-glukosa-6-fosfátu; 2 mM MgCl_2 a 0,2 mM NADP^+ . Nakonec bylo k reakční směsi přidáno 50 μl rostlinného extraktu.

4.3.3. Stanovení aktivity NADP-ICDH

Stanovení aktivity NADP-ICDH bylo provedeno pomocí reakční směsi obsahující 100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,4; 2 mM roztok D,L-isocitrátu; 2 mM MgCl_2 a 0,2 mM NADP^+ . Reakce byla iniciována 50 μl rostlinného extraktu.

4.4. Stanovení aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu

Pro stanovení aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu byla rovněž použita kinetická spektrofotometrická metoda.

Aktivita NADP-ME byla stanovena metodou, při které bylo po dobu 3 minut sledováno množství vytvořeného $\text{NADPH} + \text{H}^+$ odpovídající nárůstu absorbance při 340 nm.

Aktivita enzymů PEPC a PPDK byly stanoveny pomocí metody, při které byla po dobu 3 minut sledovaná spotřeba $\text{NADH} + \text{H}^+$ spřaženou reakcí katalyzovanou MDH projevující se poklesem absorbance při 340 nm.

Reakční směs pro jednotlivé enzymy byla pipetovaná do Eppendorfových zkumavek, které byly následně temperovány v suché lázni o teplotě 36°C po dobu 5 minut. Poté byl k reakční směsi přidán rostlinný extrakt, který inicioval danou reakci.

4.4.1. Stanovení aktivity NADP-ME

Aktivita NADP-ME byla stanovena v reakční směsi obsahující 100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,4; 10 mM L-malát; 2 mM MgCl_2 a 0,2 mM NADP^+ . K reakční směsi bylo přidáno 50 μl extraktu pro spuštění enzymové reakce.

4.4.2. Stanovení aktivity PEPC

Ke stanovení aktivity PEPC byla využita jednoduchá spřažená reakce, ve které byl produkt reakce oxalacetát v přítomnosti $\text{NADH} + \text{H}^+$ přeměňován MDH, obsaženou v rostlinném extraktu.

Reakční směs pro stanovení aktivity PEPC obsahovala: 100 mM Tris-HCl pufr, pH 8,1; 5 mM NaHCO_3 ; 2 mM MgCl_2 ; 0,2 mM NADH a 2 mM fosfoenolpyruvát. K reakční směsi bylo přidáno 20 μl rostlinného extraktu, čímž byla enzymová reakce iniciována.

4.4.3. Stanovení aktivity PPDK

Ke stanovení aktivity PPDK byla využita dvojitá spřažená reakce, ve které byl produkt reakce PEP v přítomnosti NaHCO_3 přeměňován PEPC na oxalacetát, který v přítomnosti $\text{NADH} + \text{H}^+$ byl substrátem pro MDH, obsaženou v rostlinném extraktu, stejně jako PEPC

Reakční směs pro stanovení aktivity PPK obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr, pH 8,1; 10 mM MgCl₂; 5 mM NaHCO₃; 2 mM pyruvát; 1 mM ATP; 2 mM K₂HPO₄ a 0,2 mM NADH. Reakce byla iniciována přidáním 50 µl extraktu k reakční směsi.

4.5. Stanovení aktivity glykosidas

Aktivita glykosidas byla měřená pomocí uměle připravených substrátů glykopyranosidů s navázaným p-nitrofenylem tzv. metodou „end point“. Reakční směs obsahovala 2 mM roztok substrátu (p-nitrofenyl-β-D-glukopyranosid pro stanovení aktivity β-glukosidasy, p-nitrofenyl-α-D-glukopyranosid pro stanovení α-glukosidasy, p-nitrofenyl-α-D-mannopyranosid pro stanovení aktivity α-mannosidasy, p-nitrofenyl-α-D-galaktopyranosid pro stanovení α-galaktosidasy, p-nitrofenyl-N-acetyl-β-D-glukosaminid nebo p-nitrofenyl-N-acetyl-β-D-galaktosaminid pro stanovení aktivity β-hexosaminidasy); 0,2 M citrátový pufr, pH 4,5 a 100 µl rostlinného extraktu. Reakce probíhala 10 min. při 25°C v suché lázni, poté byla zastavena přidáním borátového pufru, pH 9, a měřena absorbance při 405 nm oproti slepému pokusu. Tento pokus měl stejné složení jako v případě stanovovaného vzorku, avšak borátový pufr, pH 9, byl do reakční směsi pipetován ještě před přidáním enzymu, takže reakce neproběhla.

4.6. Stanovení aktivity peroxidasy

Pro stanovení aktivity peroxidasy byla použita kinetická spektrofotometrická metoda, při které se po dobu 3 minut sledoval lineární nárůst absorbance při 430 nm odpovídající vznikající oxidované formě substrátu.

Detekční činidlo bylo připraveno navážením 0,01 g 3,3'-diaminobenzidinu a jeho rozpuštěním v 2,5 ml destilovaného ethanolu. Poté bylo přidáno 7 ml fosfátového pufru o pH 7,0; 0,1 ml 30% peroxidu vodíku a 400 µl destilované vody. Toto detekční činidlo bylo přefiltrované přes filtrační papír.

Reakční směs o výsledném objemu 0,5 ml obsahovala 250 µl detekčního činidla a vhodně zředěný rostlinný extrakt tak, aby nárůst absorbance byl lineární a vypočtená linearita se blížila 100%.

4.7. Elektroforetické metody

4.7.1. Nativní elektroforéza

Aktivita a isoenzymové složení NADP-ME a peroxidasy bylo sledováno pomocí metody nativní elektroforézy.

Nejprve byla ze dvou skel sestavená elektroforetická aparatura na nalití polymeračního roztoku. Malopórový dělicí gel byl připravený smísením 6% a 12% roztoku pomocí mísiče gradientu. 6% roztok obsahoval 3 ml 30% směsi akrylamidu/bisakrylamidu; 3,8 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru, pH 8,8; 0,15 ml 10% glycerolu; 0,012 ml roztoku TEMED a 7,9 ml destilované vody. 12% roztok obsahoval 6 ml 30% směsi akrylamidu/bisakrylamidu; 3,8 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru, pH 8,8; 0,15 ml 10% glycerolu; 0,006 ml roztoku TEMED a 4,9 ml destilované vody. Pro iniciaci polymerace gelů byl přidán peroxidisíran amonný, 0,15 ml 10% roztoku peroxidisíranu amonného.

Po ztuhnutí dělicího gradientového gelu byl tento gel převrstven 3% velkopórovým gelem, který obsahoval 0,4 ml 30% směsi akrylamidu/bisakrylamidu; 0,5 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru, pH 6,8; 0,04 ml 10% glycerolu; 0,008 ml roztoku TEMED a 3 ml destilované vody. Nakonec bylo pro iniciaci polymerace přidáno 0,04 ml 10% roztoku peroxidisíranu amonného. Do gelu byla vložena šablona pro vytvoření jamek.

Po polymeraci obou gelu bylo odstraněno silikonové těsnění a šablona pro vytvoření jamek. Skla s gely byla umístěna do elektroforetické aparatury Biometra. Do aparatury byl nalit elektrodový pufr (obsahující 18,8 g glycinu; 3 g Tris a 10 ml 10% glycerolu v 1 l destilované vody) a do vrchní části aparatury bylo pipetováno ještě 150 μ l 0,1% bromfenolové modři. Do jamek bylo aplikováno po 25 μ l extraktů listů tabáku v 20% (w/v) sacharose. Aparatura byla uzavřena a napětí bylo nejprve nastaveno na 70 mV, po doběhnutí bromfenolové modři na rozhraní velkopórového a malopórového gelu na 140 mV. Když bromfenolová modř dosáhla konce malopórového gelu byla elektroforéza vypnuta a gely byly převedeny do Petriho misek obsahujících reakční směsi na detekci enzymů.

4.7.1.1. Detekce NADP-ME v polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze

Reakční směs pro detekci enzymu NADP-ME v gelu po nativní elektroforéze obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,4; 10 mM L-malát; 10 mM MgCl₂; 1,5 mg/ml NAD⁺; 0,005 mg/ml Nitroblue tetrazolium a 0,005 mg/ml phenazin methosulfát.

4.7.1.2. Detekce peroxidasy v polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze

Pro detekci peroxidasy po nativní elektroforéze byla připravena reakční směs obsahující 0,02 g 3,3'-diaminobenzidinu v 5 ml destilovaného ethanolu; 14 ml fosfátového pufru o pH 7,0; 0,2 ml 30% peroxidu vodíku a 800 µl destilované vody.

4.7.2. SDS elektroforéza

Pro SDS elektroforézu byl použit 10% gel jako malopórový dělicí gel. Tento gel obsahoval 3,3 ml 30% směsi akrylamidu/bisakrylamidu; 2,5 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru, pH 8,8; 0,1 ml 10% roztoku SDS; 0,004 ml roztoku TEMED a 4 ml destilované vody. Pro iniciaci polymerace gelu bylo pipetováno 0,1 ml 10% roztoku peroxidisíranu amonného.

Jako velkopórový gel byl použitý 6% roztok akrylamidu obsahující 2 ml 30% směsi akrylamidu/bisakrylamidu; 2,5 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru, pH 6,8; 0,1 ml 10% roztoku SDS; 0,008 ml roztoku TEMED a 5,3 ml destilované vody. Přidáním 0,1 ml 10% roztoku peroxidisíranu amonného byla iniciována polymerace gelu.

Následně byla sestavená aparatura pro elektroforézu. Elektroforetické vzorky, obsahující rostlinný extrakt se vzorkovým pufrům v poměru 1:1 byly 10 minut zahřívány v suché lázni při teplotě 100°C. Vzorkový pufr obsahoval 2,6 ml 0,5 M Tris-HCl pufru, pH 6,8; 2 ml 10% SDS; 2 ml glycerolu; 0,1542 g DTT; 0,5 ml 0,1% bromfenolové modři a 2,9 ml destilované vody. Po vychladnutí bylo pipetováno po 25 µl vzorku do jednotlivých jamek gelu.

Elektrodový pufr pro SDS elektroforézu obsahoval 18,8 g glycinu; 3g Tris a 1g SDS v 1 l destilované vody. Elektroforéza byla spuštěna napětím o hodnotě 70 mV a po doputování bromfenolové modři na rozhraní gelů bylo napětí zvýšeno na 140 mV.

Po skončení elektroforézy byl jeden gel vložen do barvicí lázně (2 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250; 425 ml ethanolu; 50 ml methanolu; 100

ml kys. octové a 425 ml destilované vody), kde byl ponechán přes noc. Následně byl gel odbarvován v odbarvovací lázni (250 ml ethanolu; 100 ml kyseliny octové a 650 ml destilované vody).

Druhý gel byl dále použit pro metodu imunochemické detekce proteinu HSP70

4.8. Přenos proteinů z gelu na nitroceluloseovou membránu metodou „Western blot“

Do aparatury pro přenos proteinů Biometra bylo umístěno 5 vrstev filtračního papíru napuštěného transferovým pufrém (25 mM Tris-HCl pufr, pH 8,3; 150 mM glycin; 20% methanol). Nitroceluloseová membrána určena pro přenos proteinů byla také ekvilibrována v transferovém pufru a přenesená na vrstvy filtračního papíru. Gel po SDS elektroforéze byl omyt destilovanou vodou a následně rovněž ekvilibrován transferovým pufrém a poté byl umístěn na membránu. Na gel bylo položeno dalších 5 vrstev filtračního papíru napuštěného transferovým pufrém. Aparatura byla uzavřena a byl nastaven proud, vypočítaný jako pětinašobek obsahu membrány v cm^2 . Čas přenosu proteinů z gelu na membránu byl 35 minut.

4.9. Imunochemická detekce proteinu HSP70 na nitroceluloseové membráně

Nitroceluloseová membrána po přenosu proteinů z gelu byla inkubována 1 hodinu v 1% roztoku BSA v konjugačním pufru (obsahující 2 g BSA; 20 g PVP v 1 litru pufru PBS+T). Poté byla membrána třikrát promyta po 5 minutách v pufru PBS+T. Pufr PBS+T byl připravený smísením pufru PBS (obsahující 8 g NaCl; 2,9 g Na_2HPO_4 ; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,2 g KCl a 0,2 g NaN_3 v 1 l destilované vody) a 0,05% Tween 20.

Následně byla membrána vložena do roztoku primární králičí protilátky (protilátky proti heat-shock proteinu) ředěné 1:1000 s konjugačním pufrém a inkubována přes noc v lednici při 4°C.

Poté následovalo promývání membrány v pufru PBS+T třikrát po 5 minutách a inkubace v roztoku sekundární kozí protilátky značené alkalickou fosfataseou proti primární králičí protilátce v konjugačním pufru (1:30 000) po dobu 3 hodin při 37°C.

Po posledním promýváním membrány v pufru PBS+T třikrát po 5 minutách byla membrána nakonec vložena do roztoku tablety BCIP/NBT v 10 ml destilované vody až do objevení proužků.

Základním principem této metody je skutečnost, že přítomnost proteinu HSP70 způsobuje navázání primární králičí protilátky, na kterou se váže sekundární kozí protilátka s alkalickou fosfatase. Po aplikaci tablety obsahující fosfát v podobě BCIP, je tento fosfát alkalickou fosfatase odštěpován a volný fosfát reaguje s NBT za tvorby fialového zabarvení.

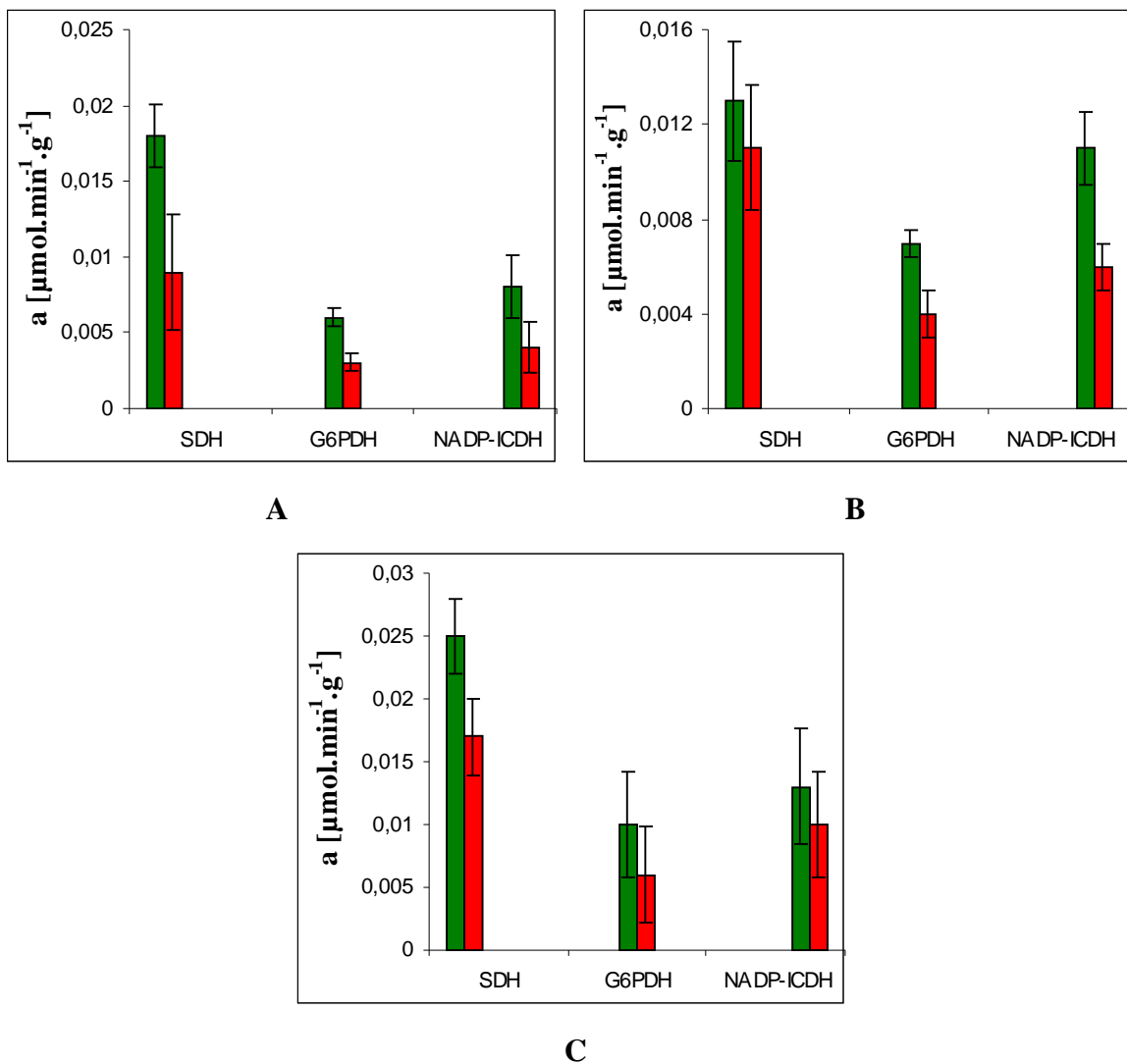
5. Výsledky

V práci byl sledován vliv teplotního šoku (HS) na aktivitu různých enzymů rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1). Teplotní šok byl proveden vystavením rostlin teplotnímu stresu 40°C trvajícím 1 hodinu. Vzhledem k tomu, že jedním z cílů bylo zjistit, za jak dlouhou dobu po působení HS dojde k metabolickým změnám, byly vzorky listů odebrány v různých časových úsecích. V 1. pokusu byly vzorky odebrány 3. den, 7. den a 10. den po aplikaci HS, ve 2. pokusu 1 hodinu, 1. den a 7. den po působení HS.

Ze vzorků listů skupiny rostlin vystavených teplotnímu šoku (HSk) a z kontrolní skupiny (K) byly připraveny extrakty, ve kterých byly výše popsány postupy měřeny aktivity NADP-dependentních enzymů (viz. kapitola 4.3.), enzymů Hatchova-Slackova cyklu (4.4.), glykosidas (4.5.) a peroxidasy (4.6.).

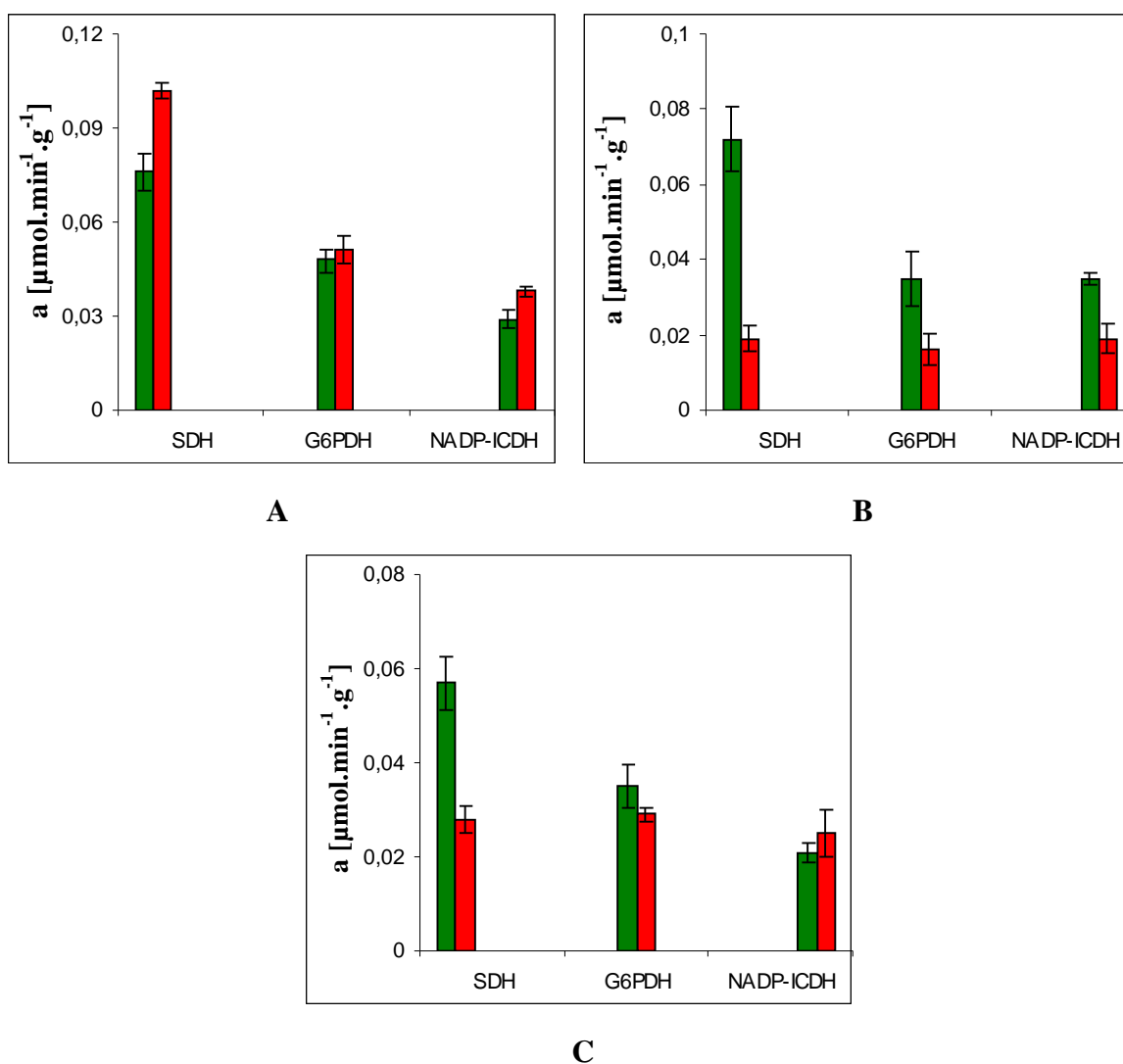
5.1. Vliv teplotního šoku na aktivitu NADP-dependentních enzymů

Obrázek č. 12 znázorňuje aktivitu SDH, G6PDH a NADP-ICDH v průběhu 1. pokusu v rostlinách vystavených teplotnímu šoku (HSk) v porovnání s kontrolními rostlinami (K), které teplotnímu šoku vystaveny nebyly. Ve všech sledovaných dnech (3., 7. a 10. den po HS) byl ve srovnání s kontrolní skupinou zaznamenán pokles aktivity NADP-dependentních enzymů (SDH, G6PDH, NADP-ICDH) v listech rostlin vystavených HS.



Obr. č. 12. Aktivity NADP-dependentních enzymů (SDH, G6PDH a NADP-ICDH) v listech rostlin vystavených teplotnímu šoku (■) v porovnání se skupinou kontrolních rostlin (■) v průběhu 1. pokusu, 3. (A), 7. (B) a 10. den (C) po aplikaci HS. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu, vyjadřuje průměr ze 3 stanovení, je znázorněna směrodatná odchylka.

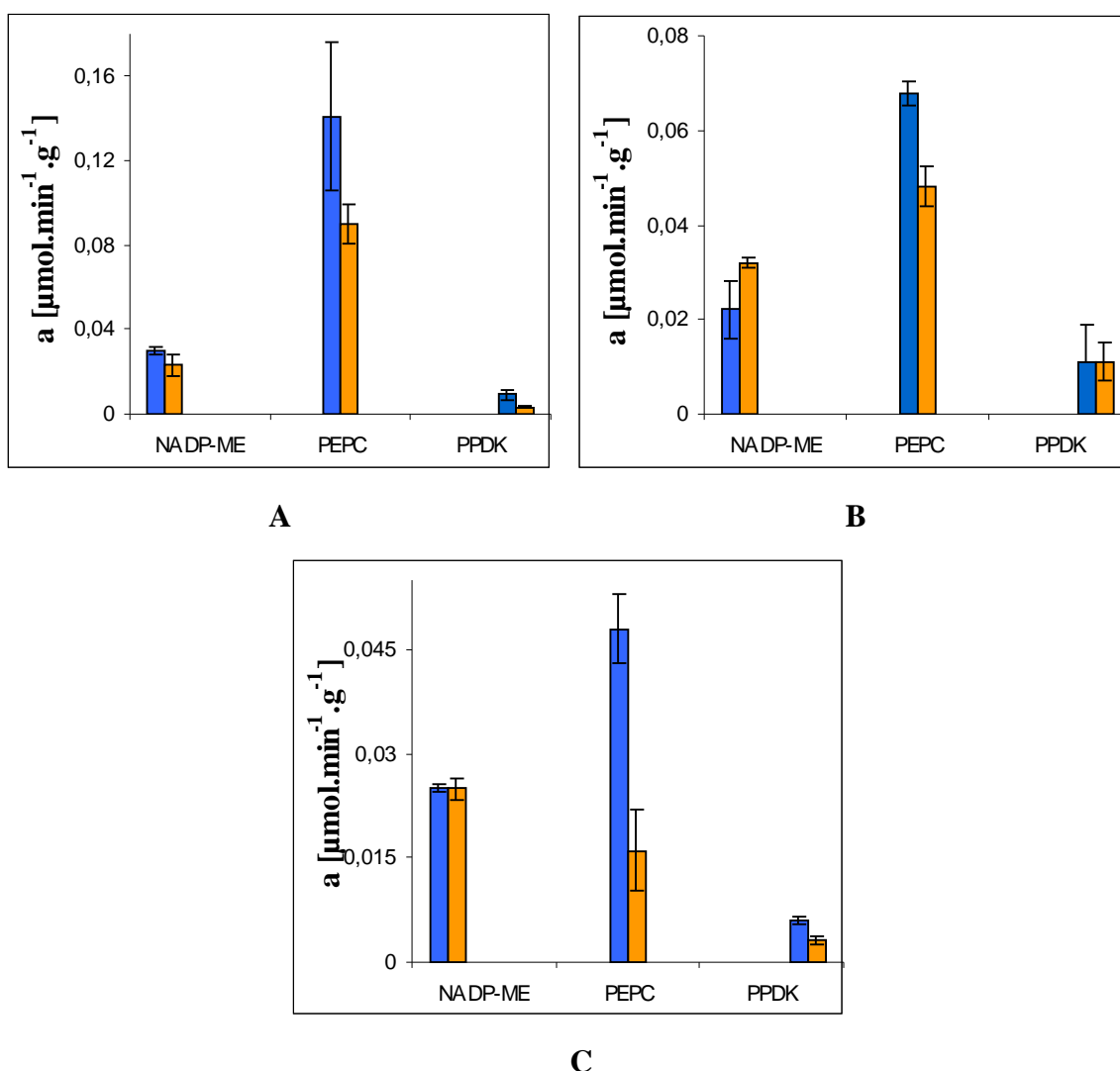
V 2. pokusu byl zařazen odběr již 1 hodinu po působení HS. Z obr. č. 13A vyplývá, že po takto krátké době dochází v HSk rostlinách ke zvýšení aktivity NADP-dependentních enzymů oproti kontrolním rostlinám, především SDH (o 34%). Avšak již 1 den po působení HS aktivita SDH, G6PDH a NADP-ICDH opět klesá a je naopak vyšší, v kontrolní skupině (obr. č. 13B). Také 7. den po HS byly zjištěny nižší aktivity (SDH a G6PDH) v porovnání s kontrolními rostlinami (obr. č. 13C). Aktivita NADP-ICDH byla ve skupině HSk 7.den odběru mírně vyšší (obr. č. 13C)



Obr. č. 13. Aktivity NADP-dependentních enzymů (SDH, G6PDH a NADP-ICDH) v listech rostlin vystavených teplotnímu šoku (■) v porovnání s kontrolními rostlinami (■) v průběhu 2. pokusu, 1. hodinu (A), 1. den (B) a 7. den (C) po aplikaci HS. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu, vyjadřuje průměr ze 3 stanovení, je znázorněna směrodatná odchylka.

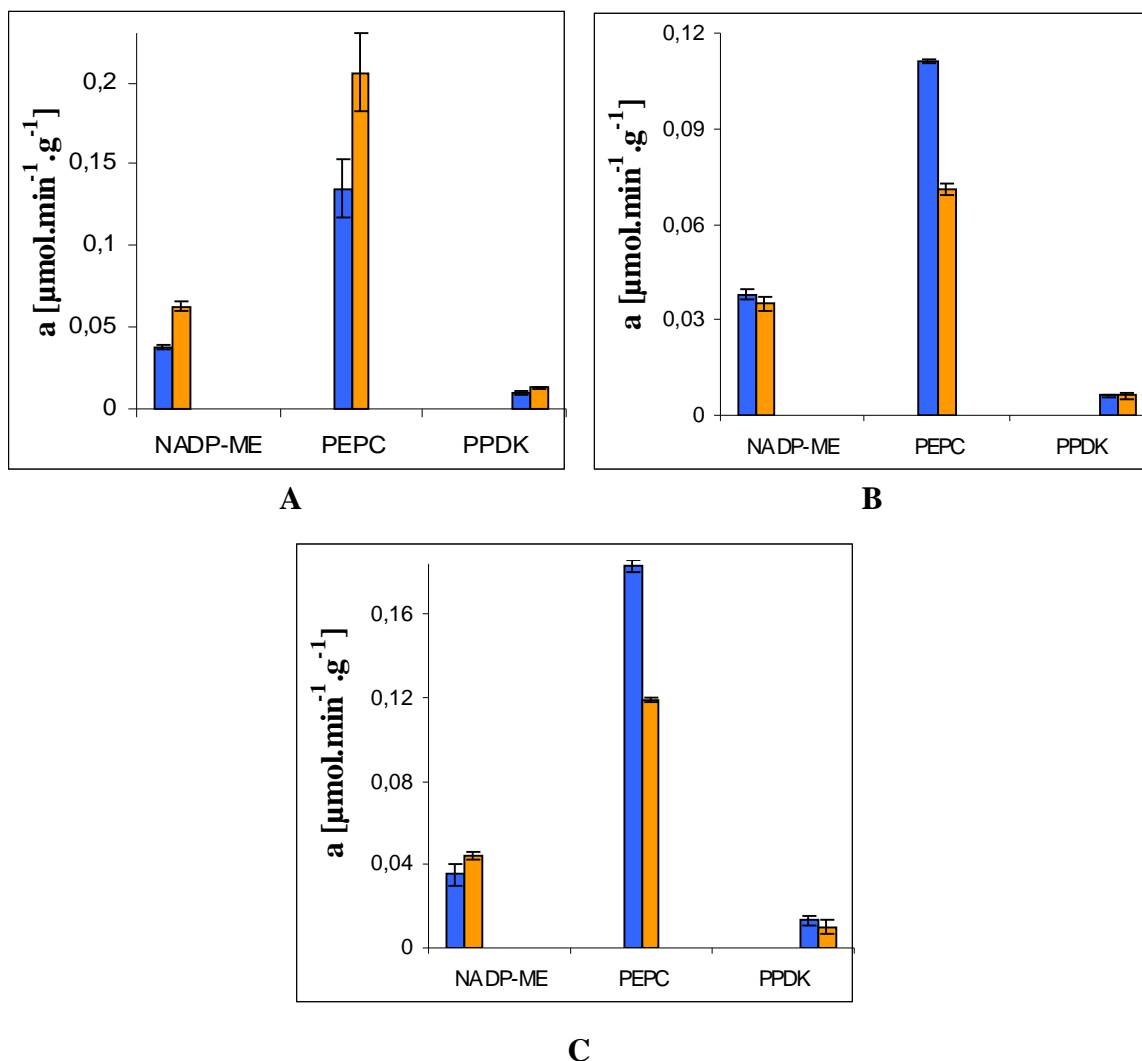
5.2. Vliv teplotního šoku na aktivitu enzymů Hatchova-Slackova cyklu

Dále byla v rostlinách vystavených HS sledována aktivita enzymů Hatchova-Slackova cyklu (NADP-ME, PEPC, a PPDK). V prvním pokusu byl 3., 7. a 10. den po aplikaci HS ve stresovaných rostlinách zaznamenán pokles aktivity PEPC (obr. č. 14). Aktivita PPDK u skupiny HSk byla 7. den po HS na úrovni kontrolních rostlin (obr. č. 14B), 3. a 10. den mírně nižší než v kontrolních rostlinách. Aktivita NADP-ME v HSk byla 3. a 10. den v rámci směrodatné odchylky na úrovni kontrolních rostlin (obr. č. 14A, C), mírné zvýšení aktivity NADP-ME bylo zjištěno 7. den po aplikaci HS (obr. č. 14B).



Obr. č. 14. Aktivita enzymů Hatchova-Slackova cyklu (NADP-ME, PEPC a PPDK) v listech rostlin vystavených teplotnímu šoku (■) v porovnání s kontrolními rostlinami (■) v průběhu 1. pokusu, 3. (A), 7. (B) a 10. den (C) po aplikaci HS. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu, vyjadřuje průměr ze 3 stanovení, je znázorněna směrodatná odchylka.

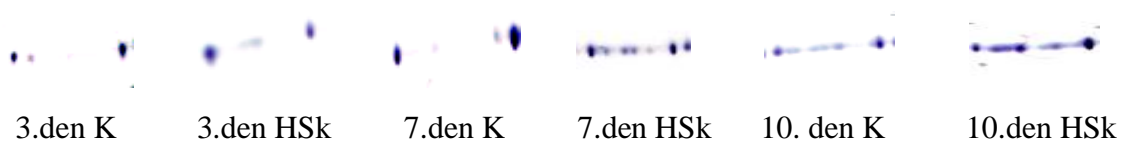
Z obr. č. 15, znázorňujícího výsledky 2. experimentu, je patrné, že v rané fázi po působení HS, po 1 hodině, dochází ke zvýšení aktivity PEPC (o 45%) aktivity NADP-ME (o 66%) a nepatrnému zvýšení aktivity PPDK (obr. č. 15A). Později však (za 1 den a týden) je aktivita PEPC v HSk rostlinách opět nižší než v kontrolní skupině a aktivita PPDK je s kontrolními rostlinami srovnatelná (obr. č. 15B,C). Aktivita NADP-ME v HSk odebraných 1 den po HS je mírně nižší a 7.den po HS je aktivita NADP-ME skupiny HSk mírně zvýšená.



Obr. č. 15. Aktivity enzymů Hatchova-Slackova cyklu (NADP-ME, PEPC a PPDK) v listech rostlin vystavených teplotnímu šoku (■) v porovnání kontrolními rostlinami (■) v průběhu 2. pokusu, 1. hodinu (A), 1. den (B) a 7. den (C) po aplikaci HS. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu, vyjadřuje průměr ze 3 stanovení, je znázorněna směrodatná odchylka.

5.3. Vliv teplotního šoku na aktivitu a isoenzymové složení NADP-ME

Aktivita enzymu NADP-ME byla rovněž detekována v gelu po nativní elektroforéze (viz. metoda kapitoly 4.7.1.1.). Porovnání aktivity NADP-ME ve skupinách kontrolních (K) a stresovaných (HSk) rostlin ukazuje vyšší aktivitu NADP-ME ve skupinách rostlin vystavených teplotnímu šoku (HSk) odebraných 3., 7., a 10. den 1. pokusu

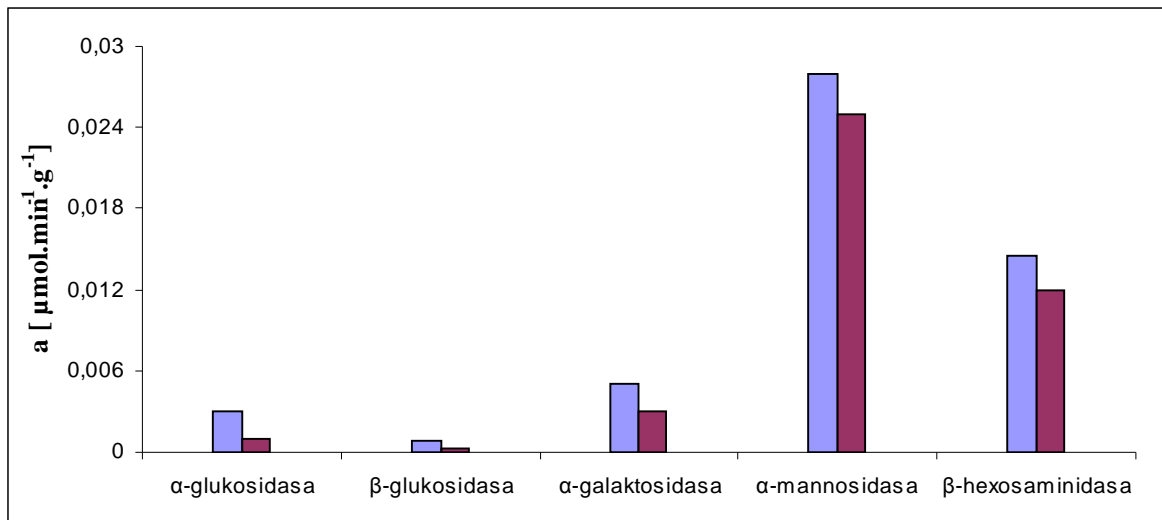


Obr. č. 16. Detekce aktivity NADP-ME v 6-12% gradientu polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze. Pod obrázky drah jsou uvedeny dny odběru po aplikaci HS u skupiny stresovaných rostlin (HSk) v porovnání s kontrolními rostlinami, které HS vystaveny nebyly (K). Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu

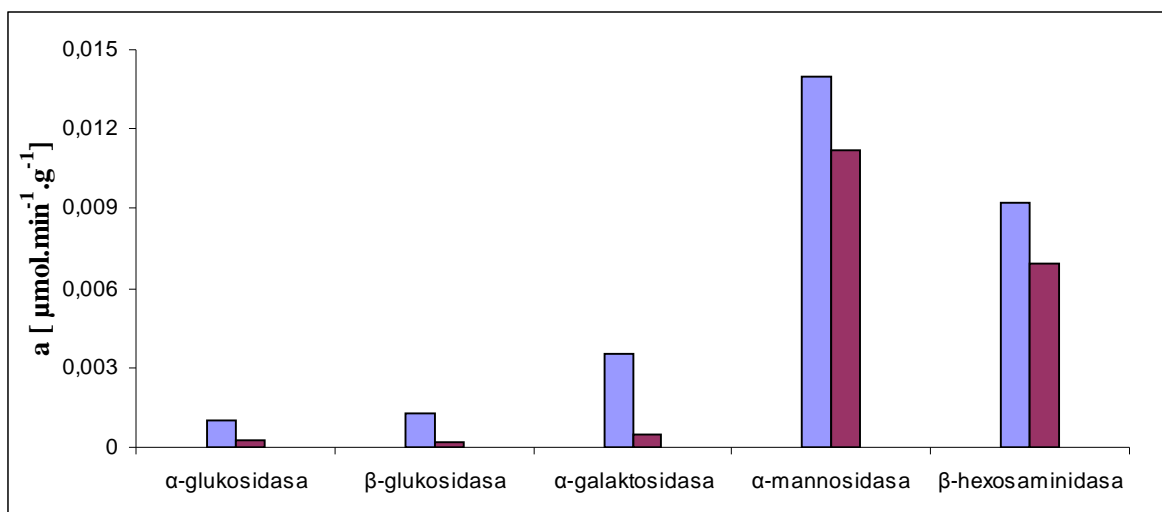
5.4. Vliv teplotního šoku na aktivitu glykosidas

Vliv teplotního šoku byl sledován také na aktivity glykosidas: α -glukosidasy, β -glukosidasy, α -galaktosidasy, α -mannosidasy a β -hexosaminidasy.

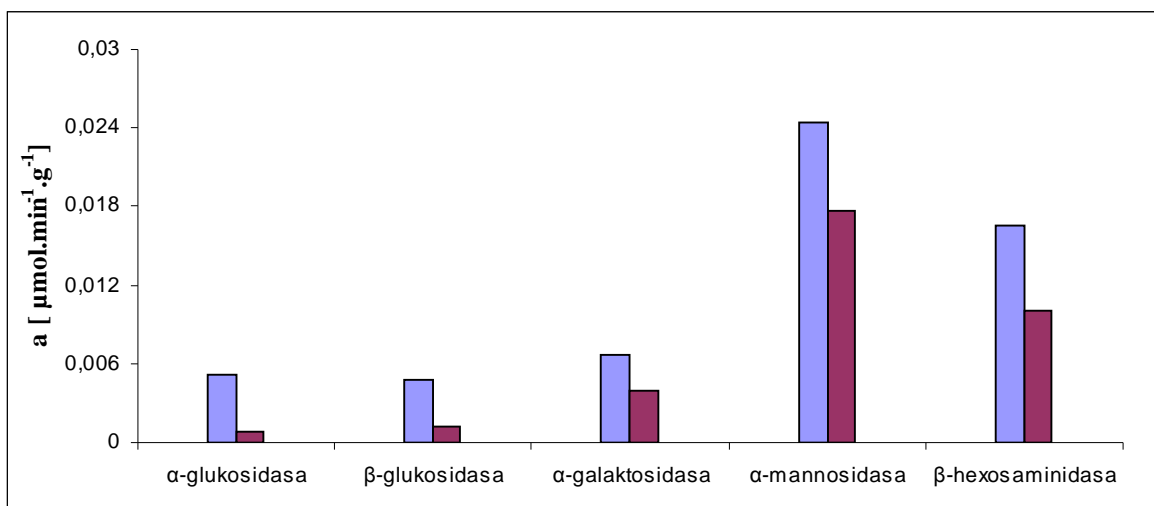
V prvním pokusu bylo zjištěno, že aktivita všech sledovaných glykosidas je 3. den (obr. č. 17), 7. den (obr. č. 18) a 10. den (obr. č. 19) po aplikaci HS ve stresovaných rostlinách nižší než v kontrolních rostlinách.



Obr. č. 17. Aktivity glykosidas v listech rostlin vystavených HS (■) v porovnání s kontrolními rostlinami, které stresu vystaveny nebyly (■), 3. den po aplikaci teplotního šoku. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

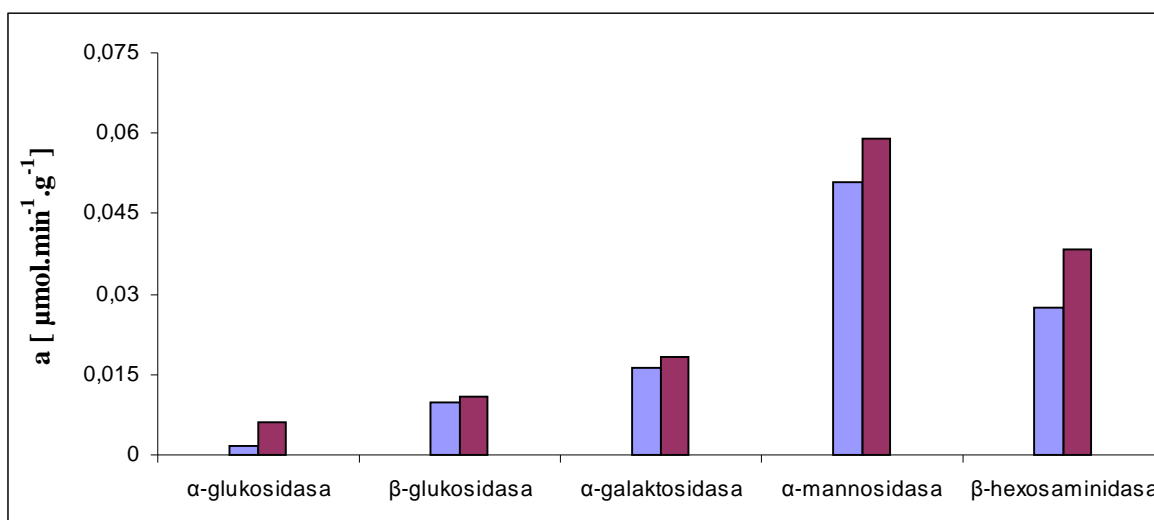


Obr. č. 18. Aktivity glykosidas v listech rostlin vystavených HS (■) v porovnání s kontrolními rostlinami (■), 7. den po působení teplotního šoku.. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.



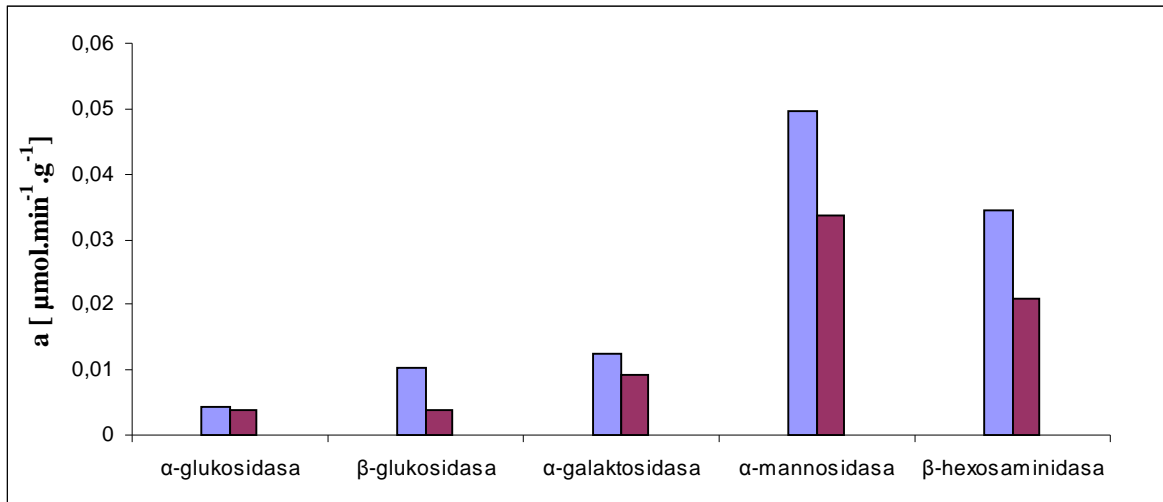
Obr. č. 19. Aktivity glykosidas v listech rostlin vystavených HS (■) v porovnání s kontrolními rostlinami (■), 10. den po působení teplotního šoku. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

Aktivity glykosidas: α -glukosidasy, β -glukosidasy, α -galaktosidasy, α -mannosidasy a β -hexosaminidasy byly v rámci 2. pokusu rovněž sledovány v rané fázi po působení stresu (1 hodinu po aplikaci teplotního šoku). V této rané fázi byl zjištěn nárůst aktivity všech sledovaných glykosidas. Nejvíce byla zvýšena aktivita β -hexosaminidasy (o 40%), nejméně aktivita β -glukosidasy a α -galaktosidasy, které byly srovnatelné s kontrolními rostlinami.



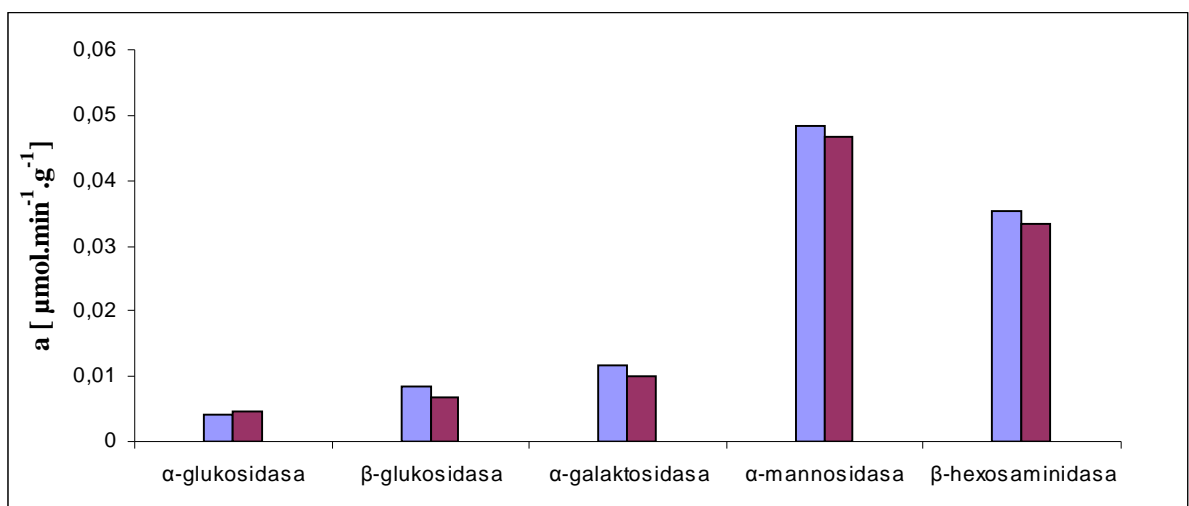
Obr. č. 20. Aktivity glykosidas v listech rostlin vystavených HS (■) v porovnání s kontrolními rostlinami (■), 1 hodinu po působení teplotního šoku. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

První den po působení teplotního šoku však došlo ke snížení aktivit sledovaných enzymů glykosidas oproti kontrolní skupině, přibližně o 67% (obr. č. 21).



Obr. č. 21. Aktivity glykosidas v listech rostlin vystavených HS (■) v porovnání s kontrolními rostlinami (■), 1. den po působení teplotního šoku. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

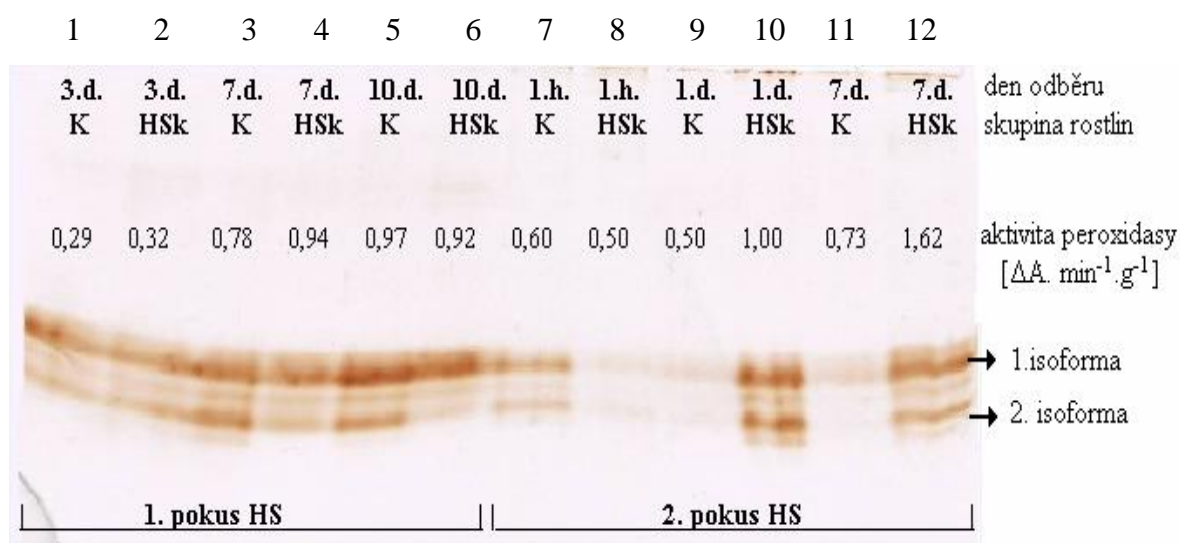
Aktivita glykosidas (β -glukosidasy, α -galaktosidasy) ve skupině HSk byla 7. den po HS mírně nižší než v kontrolních rostlinách (přibližně o 20%). Aktivity enzymů α -glukosidasy, α -mannosidasy, β -hexosaminidasy byly tento den s kontrolními rostlinami srovnatelné (obr. č. 22).



Obr. č. 22. Aktivity glykosidas v listech rostlin vystavených HS (■) v porovnání s kontrolními rostlinami (■), 7. den po působení teplotního šoku. Aktivita je vztažena na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu.

5.5. Vliv teplotního šoku na aktivitu a isoenzymové složení peroxidasy

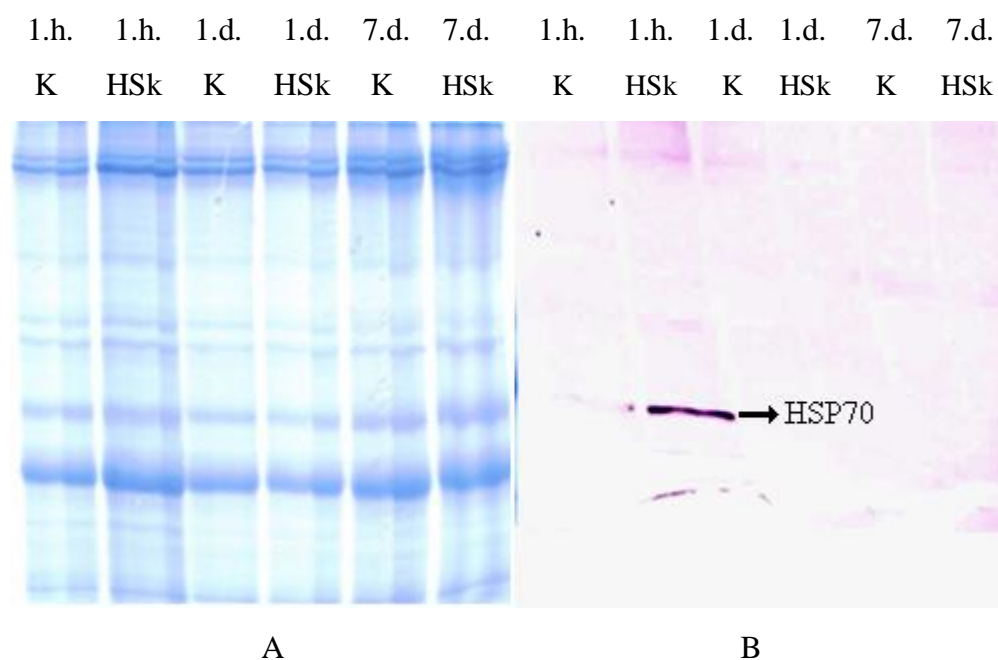
Aktivita peroxidasy v rostlinách vystavených HS byla stanovována nejen spektrofotometricky (podle metody popsané v kapitole 4.6.), ale také byla detekována v gelu po nativní elektroforéze (viz. metoda kapitoly 4.7.1.2.). Detekce v gelu současně umožňovala stanovení isoenzymového složení peroxidasy. Z obr. č. 23 vyplývá, že největší aktivita peroxidasy ve stresovaných rostlinách byla zjištěna 1. den po působení HS, kde byly patrné nejméně 4 isoformy peroxidasy, z nichž 2 majoritní byly zastoupené přibližně ve stejném poměru (obr. č. 23, dráha 10). Stejné zastoupení isoform a zvýšená aktivita peroxidasy byla nalezena také 7. den po HS (obr. č. 23, dráha 12). Vysoká aktivita peroxidasy byla dále zjištěna 10. den po HS, kdy v kontrolních rostlinách byly majoritní 2 isoformy (obr. č. 23, dráha 5), zatímco ve stresovaných rostlinách byla více zastoupena isoforma s menší pohyblivostí (obr. č. 23, dráha 6).



Obr. č. 23. Detekce aktivity a isoenzymového složení peroxidasy v 6-12% gradientu polyakrylamidového gelu po nativní elektroforéze. V obrázku jsou uvedené hodiny (h) a dny (d) po působení HS, kdy byly jednotlivé vzorky listů kontrolních (K) a rostlin vystavených teplotnímu šoku (HSk) odebírány. Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu. Šipka ukazuje isoformy diskutované v textu.

5.6. Imunochemická detekce proteinu HSP70 v rostlinách vystavených teplotnímu stresu

V rostlinách vystavených HS byl imunochemicky detekován protein HSP70. Po SDS elektroforéze vzorků listů stresovaných i kontrolních rostlin byly metodou popsanou v kapitole 4.8. proteiny přeneseny na nitrocelulosovou membránu, na které byla následně metodou popsanou v kapitole 4.9. imunochemicky detekovaná přítomnost proteinu HSP70. Nejvíce patrný proužek na nitrocelulosové membráně odpovídající množství proteinu HSP70 byl zjištěn v rostlinách vystavených HS a to 1 hodinu po aplikaci teplotního šoku. Další dny již množství HSP detekovatelné nebylo.



Obr. č. 24. Detekce proteinů v 10% polyakrylamidovém gelu po SDS elektroforéze (A) a imunochemická detekce proteinu HSP70 na nitrocelulosové membráně (B). Nad obrázkem jsou znázorněné hodiny (h) a dny (d) odběru vzorků listů kontrolních (K) nebo stresovaných rostlin, vystavených teplotnímu šoku (HSk). Aplikován byl stejný objem rostlinného extraktu. Šipka ukazuje na proužek odpovídající proteinu HSP70 (Mr 70 000)

6. Diskuze

Jednou z charakteristik rostlin, kterou se odlišují od ostatních organismů je sesilita. Rostliny se nedokáží přemísťovat z jednoho místa na druhé a jsou tak vystaveny působení nepříznivých vnějších faktorů, tzv. stresových faktorů. Rostliny si však vyvinuly obranné mechanismy, které jim nepříznivé podmínky vnějšího prostředí pomáhají překonávat. Mezi obranné mechanismy patří i přizpůsobení metabolismu změnou aktivit určitých enzymů.

V této práci jsem zjišťovala, zda teplotní šok 40°C aplikovaný 1 hodinu ovlivňuje aktivity enzymů glykosidas, NADP-dependentních enzymů, enzymů Hatchova-Slackova cyklu a enzymu peroxidasy v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). Vzhledem k tomu, že teplotní šok (HS) indukuje syntézu molekulárních chaperonů (HSP), zajišťujících správné sbalení nově vytvořených, špatně sbalených nebo částečně denaturovaných proteinů do jejich nativní konformace, bylo cílem této práce zjistit, zda aktivity sledovaných enzymů budou zachovány, případně zda budou aktivity teplotním šokem indukované jako součást obranné reakce, anebo zda naopak dojde ke snížení jejich aktivity. Dalším cílem bylo zjistit, za jak dlouhou dobu po aplikaci HS dojde k případné modulaci aktivit sledovaných enzymů. Aktivity enzymů byly sledovány 1 hodinu, 1 den, 3 dny, 7 a 10 dní po aplikaci HS. Imunochemickou detekcí se specifickou protilátkou bylo největší množství proteinu HSP70 zjištěno ve stresovaných rostlinách 1 hodinu po působení HS (obr. č. 24, str. 44), což potvrzuje, že v experimentálních rostlinách skutečně došlo k teplotnímu stresu. Pozdější dny bylo množství HSP70 téměř zanedbatelné. Možným důvodem je, že doba působení HS na rostliny tabáku ještě nebyla dostatečná, proto by v další práci bylo zajímavé sledovat i další delší časové úseky působení teplotního stresu, případně i vyšší teploty.

V rané fázi po působení HS (1 hodinu) byly spolu s množstvím proteinu HSP70 mírně zvýšeny (o 30-70%) aktivity některých sledovaných enzymů, především SDH (obr. č. 13A, str. 36), PEPC a NADP-ME (obr. č. 15A, str. 38), β -hexosaminidasy, α -mannosidasy a α -glukosidasy (obr. č. 20, str. 41). PEPC a NADP-ME v naší laboratoři patří mezi dlouhodobě sledované enzymy v souvislosti se stresem.^{[88] [89]} Jsou to enzymy, které se podílejí např. na poskytování intermediátů citrátovému cyklu, poskytování NADPH, udržování cytosolového pH, a tím napomáhají rostlině vyrovnat se se stresem. Zvýšená

aktivita PEPC a NADP-ME byla zjištěna v souvislosti se širokou škálou stresorů, ať již biotických v podobě virové infekce ^[88] ^[89], tak abiotických v podobě sucha ^[90], solí, chladu, ozonu, nedostatku fosfátu, působení hliníku. ^[88] Redukční ekvivalent NADPH poskytovaný NADP-ME může být v rostlinách vystavených podmínkám teplotního stresu využitelný pro biosyntézu mastných kyselin pro opravy poškozených buněčných membrán vysokou teplotou. NADP-ME je také jediný enzym ze sledovaných enzymů, jehož aktivita byla i v pozdějších fázích po vystavení HS stále vyšší nebo na úrovni kontrolních rostlin (obr. č. 14, 15, str. 37, 38). SDH jako enzym šikimátové dráhy naopak NADPH spotřebovává, avšak touto drahou vznikají nejen aromatické aminokyseliny, ale i různé sekundární metabolity využitelné v obranné odpovědi (flavonoidy, chalkony, lignoly a ligniny). ^[41] Mírné zvýšení aktivity glykosidas především β -hexosaminidasy a α -mannosidasy (obr. č. 20, str. 41) může souviset s hydrolýzou zásobních glykoproteinů. Je zajímavé, že tyto dva enzymy se také podílejí na zrání plodů, kde odštěpením sacharidové části glykoproteinů způsobují měknutí plodů. ^[71] Pro α -mannosidasu jsou vhodnými substráty rovněž volné oligomannany, které nesou N-acetylglukosamin a které jsou signálními molekulami. ^[91]

Jednu hodinu po aplikaci HS, kdy byly zaznamenány zvýšené aktivity výše zmíněných enzymů, nebyly aktivity NADP-ICDH a G6PDH indukovány (obr. č. 13A, str. 36). Funkce těchto enzymů souvisí s poskytováním NADPH jako alternativním zdrojem tohoto redukčního ekvivalentu k fotosyntéze (kapitola 1.3.1.). Doba působení HS však zřejmě nebyla natolik dlouhá, aby způsobila poškození fotosyntetického aparátu a snížení dostupnosti NADPH.

Zvýšená aktivita peroxidasy byla zjištěna 1. a 7. den po působení HS (obr. č. 23, str. 43). Pro tento enzym byla zjištěna přítomnost více isoform, jejichž zastoupení se ve stresovaných a kontrolních rostlinách lišilo, proto by bylo zajímavé tento enzym nadále sledovat. Peroxidasu se na obranné odpovědi mohou podílet jak přímo (syntézou ROS a indukci obranné kaskády) tak nepřímo (ztlušťováním buněčných stěn). ^[92]

Již 1 den po působení HS a v pozdějších fázích pokusu (3.-10.den) došlo k poklesu všech sledovaných enzymů s výjimkou NADP-ME a peroxidasy. To může souviset s poklesem množství molekulárního chaperonu HSP70, v jehož nepřítomnosti mohou proteiny zaujímat nesprávnou konformaci, a tím ztrácet i aktivitu. Případně mohlo v rostlinách dojít k negativní regulaci syntézy sledovaných enzymů v rámci přizpůsobení se stresovým podmínkám.

7. Závěr

1. V experimentálních rostlinách byl navozen teplotní šok, což bylo potvrzeno imunochemickou detekcí proteinu HSP70.
2. K největšímu zvýšení množství proteinu HSP70 a aktivity NADP-ME, PEPC, SDH, β -hexosaminidasy a α -mannosidasy ve stresovaných rostlinách došlo 1 hodinu po aplikaci HS.
3. Největší aktivita peroxidasy byla zjištěna 1. den po vystavení HS. Byly pozorovány rozdíly v zastoupení isoformami mezi stresovanými a kontrolními rostlinami.
4. V pozdější fázi po působení HS došlo k významnému snížení jak množství proteinu HSP70, tak aktivity všech sledovaných enzymů s výjimkou NADP-ME a peroxidasy.

8. Seznam použité literatury

- [1] Luštinec, J., Žárský, V.: Fyziologie stresu, v knize Úvod do fyziologie vyšších rostlin, Karolinum, Praha, str. 235-246 (2003)
- [2] Chen, H.H., Shen, Z.Y., Li, P.H.: *Crop Sci.* 22, 719–725 (1982)
- [3] Taiz, L., Zeiger, E.: Stress Physiology, v knize *Plant Physiology* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, str. 591-623 (2002)
- [4] Treshow, M.: *Environment and Plant Response*, McGraw-Hill Company, New York (1970)
- [5] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J., a kol.: Fyziologie stresu, v knize *Fyziologie rostlin*, Academia Praha, str. 414-415 (1998)
- [6] Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R.: *Plant Physiol.* 134, 1683-1696 (2004)
- [7] Dash, S., Mohanty, N.: *J. Plant Physiol.* 159, 49–59 (2002)
- [8] Vierling, E.: *Annu. Rev. Plant Phys.* 42, 579-620 (1991)
- [9] Buchanan, B.B., Gruissem, W., Russell, L.J.: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA (2000)
- [10] Morimoto, R.I.: *Science* 259, 1409–1410 (1993)
- [11] Swindell, W.R., Huebner, M., Weber, A.P.: *BMC Genomics* 8, 125 (2007)
- [12] Lindquist, S., Craig, E.A.: *Annu. Rev. Genet.* 22, 631–677 (1988)
- [13] Hendrick, J.P., Hartl, F.U.: *Annu. Rev. Biochem.* 62, 349–384 (1993)
- [14] Landry, S.J., Gierasch, L.M.: *Annu. Rev. Biophys. Bio.* 23, 645-669 (1994)
- [15] Hartl, F.U., Martin, J., Neupert, W.: *Annu. Rev. Biophys. Bio.* 21, 293–322 (1992)
- [16] Hartl, F.U.: *Nature* 381, 571-580 (1996)
- [17] Heldt, H.W., Piechulla, B., Heldt, F.: *Plant Biochemistry*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo (2011)
- [18] Feder, E.M.: *Am. Zool.* 39, 857–864 (1999)
- [19] Vierling E.: *Acta Physiol. Plant.* 19, 539-547 (1997)
- [20] Gottesman, S., Squires, C., Pichersky, E., Carrington, M., Hobbs, M., Matick, J.S., Dalrympe, B., Kuramitsu, H., Shiroza, T., Foster, T., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3513-3517 (1990)

- [21] Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., Lindquist, S.: Trends Biochem. Sci. 21, 289-296 (1996)
- [22] Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., Lindquist, S.: Nature 372, 475-478 (1994)
- [23] Burke, J. J.: Physiol. Plantarum 112: 167–170 (2001)
- [24] Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H. J., Marmiroli, N.: Plant Mol. Biol. 48, 667–681 (2002)
- [25] Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A.: Trends Plant Sci. 9, 1360-1385 (2004)
- [26] Krishna, P., Gloor, G.: Cell Stress Chaperon 6, 238-246 (2001)
- [27] Pearl, L.H., Prodromou, C.: Annu. Rev. Biochem. 75, 271-294 (2006)
- [28] Hemingsem, S.M., et al.: Nature 26, 330–334 (1988)
- [29] Boston, R.S., et al.: Plant Mol. Biol. 32, 191–222 (1996)
- [30] Ranson, N.A., et al.: Biochem. J. 333, 233–242 (1998)
- [31] Frydman, J.: Annu. Rev. Biochem. 70, 603–647 (2001)
- [32] Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M.: The Three-Dimensional Structure of Proteins, v knize Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition, str. 152 (2005)
- [33] Waters, E.R., Lee G.J.: Vierling E.: J. Exp. Bot. 47: 296, 325–338 (1996)
- [34] Sun, W., Montagu, M.V.: Biochim. Biophys. Acta 1577: 1–9 (2002)
- [35] Rosypal, S.: Sestavování oligomerních proteinů a nadmolekulárních struktur, v knize Úvod do molekulární biologie I., Brno, str. 40-49 (1998)
- [36] Nover, L., Neumann, D., Scharf, K. D.: Heat shock and other stress response systems of plants, Springer, New York, (1989)
- [37] Viersta, R.D.: Trends Plant Sci. 8, 135–142 (2003)
- [38] Ang, D., Liberek, K., Skowyra, D., Zylicz, M., Georgopoulos, C.: J. Biol. Chem. 266, 24233–24236 (1991)
- [39] Harrison, C.J., Bohm, A.A., Nelson, H.C.M.: Science 263, 224–227 (1994)
- [40] Krishna, P.: Plant responses to heat stress, v knize Plant responses to abiotic stress (Hirt, H., Shinozaki, K., eds.) Springer, Berlin, str. 73–93 (2004)
- [41] Herrmann, K.M.: The Plant Cell 7, 907-919 (1995)
- [42] Mora, J.: Microbiol. Rev. 54, 293-304 (1990)
- [43] Palomo, J., Gallardo, F., Suarez, M. F., Canovas, F. M.: Plant Physiol. 118, 617-626 (1998)
- [44] Oji, Y., Watanabe, M., Wakiuchi, N., Okamoto, S.: Planta 165, 85-90 (1985)

- [45] Kletzien, R.F., Harris, P.K., Foellmi, L.A: *FASEB J.* 8, 174-181 (1994)
- [46] Nemoto, Y., Sasakuma, T.: *Plant Sci.* 158, 53-60 (2000)
- [47] Šindelář, L., Šindelářová, M: *Planta* 215, 862-869 (2002)
- [48] Esposito, S., Carillo, E., Carfagna, S.: *J. Plant Physiol.* 153, 61-66 (1998)
- [49] Edwards, G.E., Andreo, C.S.: *Phytochemistry.* 31, 1845-1857 (1992)
- [50] Wedding, R.T.: *Plant Physiol.* 90, 367-371 (1989)
- [51] Drincovich, M.F., Casati, P., Andreo, C.S.: *FEBS Lett.* 490, 1-6 (2001)
- [52] Laporte, M.M., Shen, B., Tarczyski, M.C.: *J. Exp. Bot.* 53, 699-705 (2002)
- [53] Andreo, C.S., Gonzalez, D.H., Iglesias, A.A.: *FEBS Lett.* 213, 1-8 (1987)
- [54] Latzko, E., Kelly, G.J.: *Physiol. Vég.* 21, 805 (1983)
- [55] Sanche, R., Cejudo, F.J.: *Plant. Physiol.* 132, 949 (2003)
- [56] Chastain, C.J., Heck, J.W., Colquhoun, T.A., Voge, D.G., Gu, X.Y.: *Planta* 224, 924 (2006)
- [57] Stick, R.V., Williams, S.J.: *Enzymatic Cleavage of Glycosides: Mechanism, Inhibition and Synthetic Applications*, v knize *Carbohydrates. The Essential Molecules of Life*, Elsevier: Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, str. 253-280 (2009)
- [58] Koshland, D.E.: *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 28, 416-436 (1953)
- [59] Henrissat, B., Davies, G.: *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7, 637-644 (1997)
- [60] Minic, Z., Jouanin, L.: *Plan Physiol. Biochem.* 44, 435-449 (2006)
- [61] Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S., Schulze-Lefert, P.: *Science* 310, 1180-1183 (2005)
- [62] Mega, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1353-1364 (2005)
- [63] Roitsch, T., Gonzalez, M.C.: *Trends. Plant. Sci.* 9, 606-613(2004)
- [64] Dharmawardhana, D.P., Ellis, B.E., Carlson, J.E.: *Plant Physiol.* 107, 331-339 (1995)
- [65] Escamilla-Trevino, Chen, W., Card, M.L., Shih, M.C., Poulton, J.E.: *Phytochemistry* 67, 1651-1660 (2006)
- [66] Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I., Mundy, J.: *J. Biol. Chem.* 270, 15789-15797 (1995)
- [67] Kristoffersen, P., Brzobohatý, B., Hohfeld, I., Bako, L., Melkonian, M., Palme, K.: *Planta* 210, 407-415 (200)
- [68] Nisius, A.: *Planta* 173, 474-481 (1988)

- [69] Chiba, S.: α -glucosidases, v knize Handbook of Amylases and Related Enzymes, (The Amylase Research Society of Japan ed.) Pergamon Press, Oxford, str. 104-105 (1988)
- [70] Chiba, S.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 1233-1239 (1997)
- [71] Suvarnalatha, G., Prabha, T.N.: Phytochemistry 50, 1111-1115 (1999)
- [72] Keller, F., Pharr, D.M.: Metabolism of carbohydrates in sink and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides, v knize Photoassimilate Distribution in Plants and Crops (Zamski, E., Schaffer, A.A. eds.) Marcel Dekker, New York, str. 157-183 (1996)
- [73] Oikawa, A., Itoh, E., Ishihara, A., Iwamura, H.: J. Plant Physiol. 160, 991-999 (2003)
- [74] Alsher, R.G., Hess, J.L.: Antioxidants in Higher Plants. Boca Raton: CRC Press (1993)
- [75] Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V.: Ann. Bot-London 91, 179-194 (2003)
- [76] Bartosz, G.: Acta Physiol. Plant. 19, 47-64 (1997)
- [77] Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F.: Cell. Mol. Life Sci. 57, 779-795 (2000)
- [78] Lee, D.H., Lee, C.B.: Plant Sci. 159, 75-85 (2000)
- [79] Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., Dunand, C.: Phytochemistry 68, 1605-1611 (2007)
- [80] Passardi, F., Zamocky, M., Favet, J., Jakopitsch, C., Penel, C., Obinger, C., Dunand, C.: Gene 397, 101-113 (2007)
- [81] Daiyasu, H., Toh, H.: J. Mol. Evol. 51, 433-445 (2000)
- [82] Welinder, K.G.: Cuur. Opin. Struct. Biol. 2, 388-393 (1992)
- [83] Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H.: Plant Cell Physiol. 42, 462-468 (2001)
- [84] Yoshida, K., Kaothien, P., Matsui, T., Kawaoka, A., Shinmyo, A.: Appl. Microb. Biotech. 60, 665-670 (2002)
- [85] Passardi, F., Cosi, C., Penel, C., Dunand, C.: Plant Cell. Rep. 24, 255-265 (2005)
- [86] Gaspar, T.H., Penel, C.L., Thorpe, T., Grappin, H.: Chemistry and biochemistry of peroxidases, v knize Peroxidases 1970-1980, A survey of their Biochemical and Physiological Roles of Higher Plants, University de Geneve Press, Geneva, str. 10-60 (1982)
- [87] Klumpp, G., Furlan, C.M., Domingos, M., Klumpp, A.: Sci. Total Environ. 246, 79-91 (2000)

- [88] Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: *Plant Sci.* 180, 575-583 (2011)
- [89] Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: NADP-dependent enzymes and abiotic stress, v knize *Abiotic Stress New Research* (Haryana, N., Punj, S., eds.) Novascience Publishers, New York, str. 57-98 (2012)
- [90] Miedzińska, L.: Vliv sucha na metabolismus rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L.): Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, str. 48-76 (2010)
- [91] Woo, K.K., Miyazaki, M., Hara, S., Kimura, M., Kimura, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2547-2556 (2004)
- [92] Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C.: *Plant Cell Rep.* 24, 255-265 (2005)

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka