

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
katedra biochemie**



**Studium regulace NADP - malátdehydrogenasy (dekarboxylační) a vliv
stresu na tento enzym**

Disertační práce

Školitel: RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: RNDr. Noemi Čěřovská, CSc.

Praha 2008

Veronika Doubnerová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem pracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a RNDr. Noemi Čerovské, CSc. jako konzultantky a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
Mgr. Veronika Doubnerová

Prohlášení spoluautorů

Prohlašuji, že Mgr. Veronika Doubnerová rozhodujícím způsobem přispěla ke vzniku všech 5 článků, které jsou přílohami této disertační práce. Sama provedla většinu experimentů a významně se podílela i na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání článků.

V Praze dne

.....

RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla především poděkovat své školitelce RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., která mě výborně vedla již v průběhu magisterského studia, za její odborné podněty a rady, za výběr zajímavých projektů, ale také za její laskavost a vstřícnost a možnost pracovat v příjemném tvůrčím prostředí. Tím také děkuji všem mým milým kolegyním a kolegům z naší laboratoře, se kterými mi bylo potěšením pracovat a spolupracovat. Zvláště Ing. Karlovi Müllerovi, který mi pomáhal v začátcích a dodnes mi ve všech otázkách vychází vstříc. Velké poděkování patří také konzultantce RNDr. Noemi Čeřovské CSc. a kolektivu virologické laboratoře, stejně jako RNDr. Heleně Synkové CSc. V neposlední řadě děkuju mojí rodině, hlavně mamince a bratrovi, kteří mě všemožně podporovali po celou dobu studia.

Práce byla finančně podporována Grantovou agenturou ČR (projekt 206/03/0310) a Grantovou agenturou UK (projekty 428/2004; 7552/2007 a 7546/2007).

(+) ss RNA	pozitivní jednovláknová RNA
3-PG	3-fosfoglycerát
ABA	kyselina abscisová
Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ADP	adenosin 5'-difosfát
AOS	aktivní formy kyslíku
APOD	askorbátperoxidasa (EC 1.11.1.11)
ATP	adenosin 5'-trifosfát
Avr	komplementární dominantní gen avirulence
BSA	hovězí sérový albumin
C ₃	rostlina, ve které je prvním fotosyntetickým produktem 3-fosfoglycerát (tříuhlíkatá sloučenina)
C ₄	rostlina, ve které je prvním fotosyntetickým produktem oxaloacetát (čtyřuhlíkatá sloučenina)
CAM	Crassulacean acid metabolism
CAT	katalasa (EC 1.11.1.6)
CI	protein kódovaný genomem potyvírů (z angl. cytoplasmatic inclusion)
c-	cytosolová isoforma
CoA	koenzym A
CP	kapsidový protein (z angl. coat protein)
CTP	cytidin 5'-trifosfát
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay
DEAE	diethylaminoethyl
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa (EC 1.8.5.1)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	dvouřetězcová ribonukleová kyselina
GAP	glyceraldehydfosfát
GR	glutathionreduktasa (EC 1.8.1.7)
GTP	guanosin 5'-trifosfát
HC-pro	proteasa kódovaná genomem potyvírů (z angl. helper component protease)
Hsp 70	protein indukovaný teplotním stresem (z angl. heat shock protein)
IgG	imunoglobulin třídy G
Kc 49	izolát kmene O viru PVY
K _m	Michaelisova konstanta
LNV	vzorek (vrcholové listy)
LNVV	vzorek (nově vyvinuté listy během pokusu)
LV	vzorek (první dospělé listy)
m-	mitochondriální isoforma
Me ²⁺	dvojmocný kation kovu
MPs	proteiny kódované virovým genomem sloužící k transportu v rostlině (z angl. movement proteins)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger RNA)
NAD(P) ⁺	nikotinamidadeninukleotid(fosfát) oxidovaná forma
NAD(P)H	nikotinamidadeninukleotid(fosfát) redukováná forma

NAD-MDH	NAD-dependentní malátdehydrogenasa EC 1.1.1.37
NAD-ME	NAD(P)-dependentní malátdehydrogenasa dekarboxylační (EC 1.1.1.38)
NAD(P)-ME	NAD(P)-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.39)
NADP-ME	NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40)
NIa	virová proteasa (z angl. nuclear inclusion type a)
Nt-	tabáková (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)
OAA	oxaloacetát
Oscyt ME1-2	cytosolové isoformy NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxaloacetát dekarboxylační) z <i>Oryza sativa</i> L.
Oschl ME	chloroplastová isoforma NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxaloacetát dekarboxylační) z <i>Oryza sativa</i> L.
p	hodnota statistického testu
P1	proteasa kódovaná genomem potyvirů
P3	protein kódovaný genomem potyvirů
PAGE	elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu
PEP	fosfoenolpyruvát
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa (EC 4.1.1.31)
PEP-CK	fosfoenolpyruvátkarboxykinasa (EC 4.1.1.32)
pI	isoelektrický bod
PPDK	pyruvát, fosfátdikinasa (EC 2.7.9.1)
PR proteins	proteiny související s patogenezí (z angl. pathogenesis related proteins)
PTGS	obrana rostlin proti virové infekci - „umlčení“ genové exprese (z angl. „post-transcriptional gene silencing“)
PVA	<i>A virus bramboru</i>
PVY	<i>Y virus bramboru</i>
PVY ^C	C kmen PVY způsobující proužkovitost bramboru
PVY ^N	nekrotický N kmen PVY
PVY ^{NTN}	NTN kmen PVY způsobující nekrotické změny na hlízách některých odrůd brambor (z angl. tuber necrosis)
PVY ^O	obecný O kmen viru PVY (z angl. ordinary)
Real time-PCR	polymerasová řetězová reakce v reálném čase
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	počet otáček za minutu
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (EC 4.1.1.39)
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SAR	systemová získaná rezistence
SDS	dodecylsulfát sodný
siRNA	malé interferující RNA (z angl. small interfering RNA)
SODs	superoxiddismutasy (EC 1.15.1.1)
SR1	<i>Nicotiana tabacum</i> L. kultivar Petit Havana
TBRV	virus kroužkovitosti černé rajčete (z angl. tomato black ring nepovirus)
TTP	thymidin 5'-trifosfát
VPg	protein kódovaný genomem potyvirů
W38	kultivar Wiskonsin

1. ÚVOD	1
1.1 Obecná charakteristika malátdehydrogenas (dekarboxylačních).....	1
1.2 Obecná charakteristika a výskyt NADP-ME, EC 1.1.1.40	1
1.3 Genové rodiny NADP-ME v rostlinách.....	4
1.4 Struktura NADP-ME	5
1.5. Některé fyzikální vlastnosti NADP-ME	7
1.5.1 Relativní molekulová hmotnost	7
1.5.2 pH optimum a pI	8
1.6 Kinetický mechanismus reakce katalyzované NADP-ME.....	8
1.7 Regulace NADP-ME metabolismy	9
1.8 Funkce NADP-ME	10
1.8.1 Bakterie	10
1.8.2 Rostliny	11
1.8.2.1 Nefotosyntetická isoforma NADP-ME	11
1.8.2.2 Fotosyntetická isoforma NADP-ME: rozdíl ve fixaci CO ₂ u C ₃ a C ₄ a CAM rostlin.....	12
1.8.3 Živočichové	16
1.9 Stres rostlin	17
1.9.1 Biotický stres způsobený rostlinnými viry	17
1.9.1.1 Obecná charakteristika virů.....	17
1.9.1.2 Transport a šíření virů	18
1.9.1.3 Potyviry	19
1.9.1.4 Obranné mechanismy rostlin vůči virům	21
1.9.1.5 Rezistence u rostlin	24
1.9.10 Abiotický stres rostlin způsobený suchem	25
2. CÍL	27
3. MATERIÁL A METODY	28
Materiál	28
Metody.....	29
3. 1 Odběr vzorků z rostlinného materiálu	29
3.1.1. Pro izolace NADP-ME a studium regulace NADP-ME	29
3.1.2. Pro sledování vlivu biotického stresu způsobeného PVY ^{NTN} na NADP-ME v rostlinách <i>Nicotiana tabacum</i> L., cv. Petit Havana SR1	29

3.1.3. Pro sledování vlivu proteinu P3 na aktivitu NADP-ME a dalších anaplerotických enzymů v transgenních rostlinách <i>N. tabacum</i> L., cv. Petit Havana SR1 s vneseným genem pro protein P3	29
3.1.4. Pro sledování aktivity a přítomnosti isoformů NADP-ME v transgenních rostlinách <i>Nicotiana benthamiana</i> s vneseným genem pro HC-pro vystavených biotickému stresu v podobě PVY ^{NTN}	29
3.1.5. Pro sledování vlivu nedostatku CO ₂ na NADP-ME.....	29
3.1.6. Pro sledování vlivu sucha na NADP-ME.....	30
3.2 Purifikace NADP-ME, příprava rostlinných extraktů	31
3.2.1. Purifikace enzymového preparátu NADP-ME z listů tabáku	31
3.2.2. Purifikace enzymového preparátu NADP-ME ze semen kukuřice pro imunizaci králíků.....	31
3.2.3. Příprava rostlinného extraktu	31
3.3. Stanovení aktivity a rychlosti reakce katalyzované NADP-ME	31
3.3.1. Stanovení aktivity NADP-ME v rostlinném extraktu	31
3.3.2. Stanovení základních kinetických parametrů NADP-ME	31
3.3.3. Stanovení pH optima NADP-ME.....	31
3.3.4. Stanovení kinetického mechanismu reakce katalyzované NADP-ME	31
3.3.5. Studium vlivu různých látek na aktivitu NADP-ME	31
3.3.6. Inhibiční studie NADP-ME.....	31
3.4. Stanovení aktivity PEPC a PPK.....	31
3.5. Elektroforetické metody	32
3.5.1. Elektroforetická separace v prostředí SDS.....	32
3.5.2. Nativní elektroforéza a detekce NADP-ME.....	32
3.5.3. Stanovení relativní molekulové hmotnosti NADP-ME podle Fergusonsona.....	32
3.6. Imunochemické metody	32
3.6.1. DAS-ELISA	32
3.6.2. Příprava králičích protilátek proti NADP-ME	33
3.6.3. Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu.....	33
3.6.4. Imunochemická detekce NADP-ME na nitrocelulosové membráně	33
3.7. Stanovení množství bílkovin.....	33
3.8. Další metody.....	33
3.8.1. In vivo lokalizace NADP-ME v histologických řezech.....	33
3.8.2. Kvantifikace mRNA NADP-ME metodou „Real time“ PCR.....	33
3.8.3. Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů (CAT, GR a APOD) a detekce aktivity SOD po nativní elektroforéze	34
3.8.4. Isoelektrická fokusace NADP-ME.....	34
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	35
4.1. Purifikace a charakterizace NADP-ME z listů <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Petit Havana, SR1.....	35
4.1.1 Purifikace	35
4.1.2 Základní kinetické parametry a specifita vůči kofaktorům	36

4.1.3 Mechanismus reakce katalyzované NADP-ME	37
4.1.4 Základní fyzikální vlastnosti enzymu NADP-ME	38
4.1.5 Lokalizace NADP-ME v listech <i>N. tabacum</i> L. cv. Petit Havana SR1	39
4.2. Regulace NADP-ME z listů <i>N. tabacum</i> L. buněčnými metabolity	40
4.2.1 Vliv buněčných metabolitů na aktivitu NADP-ME	40
4.2.2 Inhibice NADP-ME makroergickými látkami (GTP, ATP a ADP).....	41
4.3 Vliv biotického stresu na aktivitu, expresi a transkripci NADP-ME z listů <i>N. tabacum</i> L.	42
4.3.1 Průběh virové infekce (Y virem bramboru, kmenem NTN a O: PVY ^{NTN} a PVY ^O) v rostlinách <i>N. tabacum</i> L.	42
4.3.2 Vliv infekce PVY na aktivitu NADP-ME	43
4.3.3 Vliv infekce PVY ^{NTN} na expresi proteinu NADP-ME.....	44
4.3.4 Vliv infekce PVY ^{NTN} na mRNA NADP-ME	45
4.4 Vliv infekce PVY^{NTN} na aktivitu NADP-ME a některých dalších anaplerotických a antioxidačních enzymů v transgenních rostlinách <i>N. tabacum</i> L. cv. SR1 s vneseným genem pro protein P3 z PVA.....	45
4.4.1 Anaplerotické enzymy (NADP-ME, PEPC, PPK)	45
4.4.2 Antioxidační enzymy (CAT, GR, APOD, SOD)	46
4.5 Vliv infekce PVY^{NTN} na aktivitu a isoformy NADP-ME v kontrolních a transgenních rostlinách <i>N. benthamiana</i> s vneseným genem pro protein HC-pro.	46
4.5.1 Aktivita a isoformy NADP-ME v <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
4.5.2 Vliv infekce PVY ^{NTN} na NADP-ME.....	48
4.5 Aktivita NADP-ME v rostlinách <i>N. tabacum</i> L. cv. Petit Havana, SR1 pěstovaných v podmínkách <i>in vitro</i>.....	48
4.6 Vliv sucha na aktivitu NADP-ME v rostlinách <i>N. tabacum</i> L.....	49
4.7 Význam NADP-ME pro rostlinu za nefyziologických podmínek	51
5. ZÁVĚR	53
REFERENCE:	55
PŘÍLOHA 1	63
PŘÍLOHA 2	78
PŘÍLOHA 3	101
PŘÍLOHA 4	125
PŘÍLOHA 5	144

1. Úvod

1.1 Obecná charakteristika malátdehydrogenas (dekarboxylačních)

Malátdehydrogenasy (dekarboxylační) (L-malát: NAD(P)⁺ oxidoreduktasy (dekarboxylační)) katalyzují v přítomnosti koenzymu NAD(P)⁺ a dvojmocného kationtu kovu oxidační dekarboxylaci L-malátu za vzniku pyruvátu, NAD(P)H a CO₂ (Wedding, 1989; Edwards a Andreo, 1992; Drincovich *et al.*, 2001). Podle specifity vůči koenzymu a schopnosti dekarboxylovat kromě malátu i oxaloacetát byly malátdehydrogenasy (dekarboxylační) rozděleny do 3 skupin.

1. NAD-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát-dekarboxylační) EC 1.1.1.38 (dále jen NAD-ME, z angl. malic enzyme), která dekarboxyluje i oxaloacetát. Jako koenzym preferuje NAD⁺. Tento enzym se nachází především v bakteriích a v mitochondriích živočichů (Chang a Tong, 2003).

2. NAD(P)-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační) EC 1.1.1.39 (dále jen NAD(P)-ME, která nedekarboxyluje oxaloacetát a koenzymem může být NAD⁺ či NADP⁺, se nachází zejména u bakterií.

3. NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát-dekarboxylační) EC 1.1.1.40 (dále pouze NADP-ME). Koenzymem NADP-ME je NADP⁺ a kromě dekarboxylace malátu katalyzuje ještě další dvě dílčí reakce a reakci reversibilní viz dále (Wedding, 1989; Edwards a Andreo, 1992).

1.2 Obecná charakteristika a výskyt NADP-ME, EC 1.1.1.40

Systematický název: L-malát: NADP⁺ oxidoreduktasa (oxaloacetát-dekarboxylační). Základní reakcí, kterou NADP-ME v přítomnosti koenzymu NADP⁺ a dvojmocného kationtu (nejčastěji Mg²⁺ nebo Mn²⁺ iontů) katalyzuje, je oxidační dekarboxylace L-malátu za vzniku pyruvátu, CO₂ a NADPH (schéma 1). V této reakci je pro katalytickou funkci enzymu přítomnost koenzymu a kofaktoru nezbytná (Edwards a Andreo, 1992; Drincovich *et al.*, 2001).

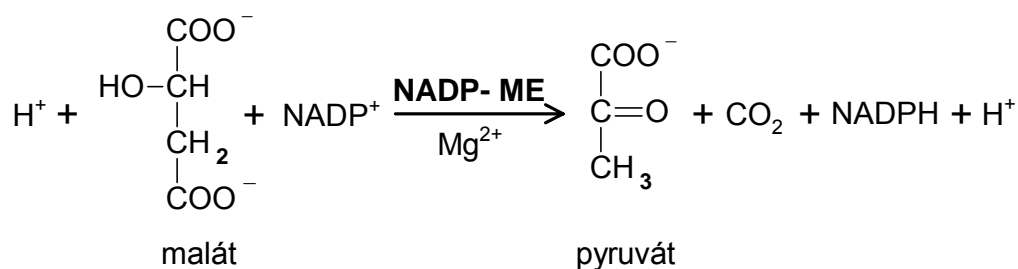
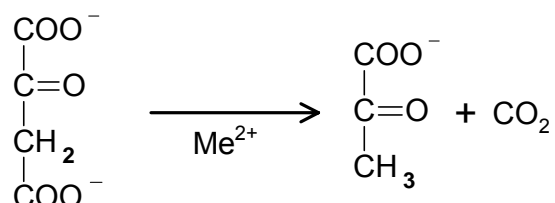
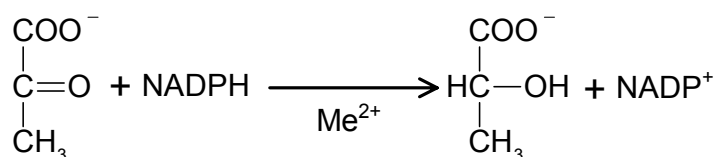
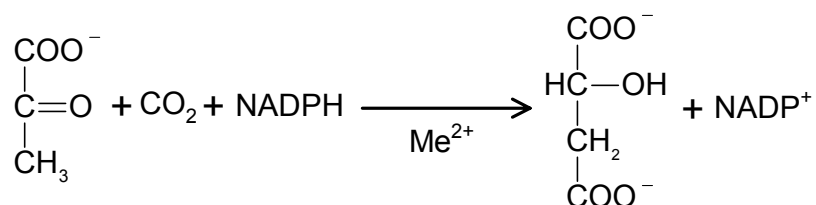


Schéma 1: Reakce katalyzovaná NADP-ME

NADP-ME může také katalyzovat dvě další dílčí reakce, jednak může působit jako oxaloacetátdekarboxylasa (schéma 2) nebo může redukovat α -ketokarboxylové kyseliny (schéma 3).

Schéma 2: Dílčí reakce katalyzovaná NADP-ME (Převzato z Gerrard Wheeler *et al.*, 2008)Schéma 3: Dílčí reakce katalyzovaná NADP-ME (Převzato z Gerrard Wheeler *et al.*, 2008)

NADP-ME katalyzuje také reversibilní reakci, v opačném směru se tvoří L-malát a NADP^+ , avšak většinou v mnohem menší míře (u rekombinantní cytosolové NADP-ME z tabáku je poměr karboxylační a dekarboxylační reakce 1:8, Müller *et al.*, 2008).

Schéma 4: Reversibilní reakce NADP-ME (Převzato z Gerrard Wheeler *et al.*, 2008)

Aktivita NADP-ME byla poprvé zjištěna v roce 1947 v játrech holuba, kde je tento protein přítomen v cytosolu buněk (Ochoa *et al.*, 1947) v poměrně velkém množství (může v této tkáni představovat až 0,6 % všech cytosolických proteinů) (Hsu, 1982). Výskyt NADP-ME v přírodě je široký; tento enzym se nachází v prokaryotických i eukaryotických

mikroorganismech, ve všech typech rostlin (C_3 , C_4 i CAM) a v živočišných tkáních včetně člověka.

Prokaryotické NADP-ME jsou více variabilní co do velikosti molekuly a její struktury než isoformy eukaryotické (Bologna *et al.*, 2007).

V rostlinách bylo na základě lokalizace a fyziologické funkce klasifikováno 7 isoform NADP-ME (Drincovich *et al.*, 2001).

1. $C_{4(1)}$ - NADP-ME je fotosyntetická isoforma chloroplastů buněk pochev cévních svazků některých C_4 rostlin. Tato unikátní a vysoce specializovaná forma NADP-ME se specifickými kinetickými a regulačními vlastnostmi je exprimována výhradně v chloroplastech věnčitých buněk, které jsou zpravidla agranické nebo pouze s řídkými grany (Takeuchi *et al.*, 1998).
2. $C_{4(2)}$ - NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP- ME, která se nachází v plastidech C_4 rostlin.
3. $C_{4(3)}$ - NADP-ME je cytosolová NADP- ME C_4 rostlin.
4. $CAM_{(1)}$ - NADP-ME je fotosyntetickou isoformou NADP- ME nacházející se v cytosolu CAM rostlin.
5. $CAM_{(2)}$ - NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP- ME, obsažená v cytosolu CAM rostlin.
6. $C_{3(1)}$ - NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP- ME, která se nachází v cytosolu C_3 rostlin.
7. $C_{3(2)}$ - NADP-ME je nefotosyntetická isoforma NADP- ME přítomná v plastidech C_3 rostlin (Drincovich *et al.*, 2001).

Také distribuce NADP-ME v různých rostlinných orgánech je velmi široká. Tento enzym byl nalezen v květech, plodech, semenech, kořenech a speciálních zásobních orgánech, stejně tak jako v listech (Wedding, 1989).

U živočichů a člověka se malátdehydrogenasy (dekarboxylační) obvykle dělí do tří kategorií:

1. cytosolová NADP-dependentní isoforma (c-NADP-ME, EC 1.1.1.40)
2. mitochondriální NADP-dependentní isoforma (m-NADP-ME, EC 1.1.1.40)
3. mitochondriální NAD(P)-dependentní isoforma (m-NAD-ME, EC 1.1.1.38), která jako koenzym může vázat jak $NADP^+$, tak i NAD^+ , preferuje však NAD^+ (Chang a Tong, 2003). Vyskytuje se především v tukové tkáni, játrech a rychle se dělicích tkáních (Xu *et al.*, 1999).

1.3 Genové rodiny NADP-ME v rostlinách

Rostlinná NADP-ME je enzym kódovaný malými genovými rodinami. Modelové rostliny, C₃ dvouděložná rostlina houseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) a C₃ jednoděložná rostlina rýže setá (*Oryza sativa* L.) obsahují 4 geny pro NADP-ME, z toho jsou 3 geny pro cytosolové isoformy, které jsou u *Arabidopsis thaliana* pojmenované (NADP-ME1-3) a jeden gen pro isoformu plastidovou (NADP-ME4) (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005; Chi *et al.*, 2004). Zatímco NADP-ME2 a NADP-ME4 jsou exprimovány konstitutivně, exprese druhých dvou isoform je omezena vývojovými a specifickými buněčnými signály (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005). Exprese genů pro isoformy NADP-ME2 a NADP-ME4 byla zjištěna v listech, stoncích, květech i kořenech, isoforma NADP-ME1 byla detekována pouze v kořenech a isoforma NADP-ME3 pouze v květech a slabě ve stoncích. Také exprese jednotlivých isoform v průběhu embryogeneze a klíčení se liší. Gen pro NADP-ME4 obsahuje tranzitní peptid, složený z přibližně 74 aminokyselinových zbytků, předurčující, že se tento protein bude vyskytovat v plastidu (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005).

Stejně tak u rýže (*Oryza sativa* L.) byla exprese všech 4 nalezených genů zjištěna jako vývojově a orgánově specifická, navíc bylo zjištěno, že všechny geny odpovídají na stres. Jednotlivé geny pro cytosolové isoformy označeny Oscyt ME1 (gen exprimující se v listech a kořenech), Oscyt ME2 (gen exprimující se pouze v kořenech) a Oscyt ME3 (gen exprimující se ve většině pletiv, avšak v malém množství). Gen pro chloroplastovou (plastidovou) isoformu Oschl ME se stejně jako Oscyt ME1 exprimuje v listech a kořenech (Chi *et al.*, 2004).

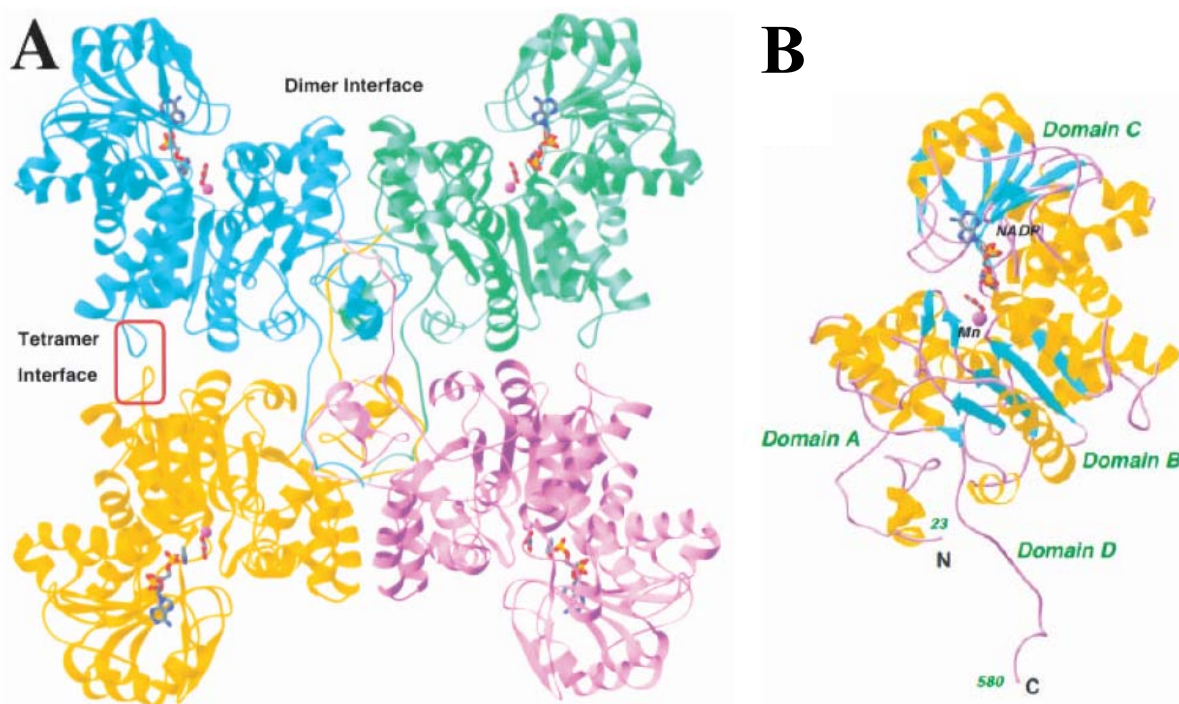
V posledním roce byly též u modelové C₃ dvouděložné rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) zjištěny 3 různé transkripty pro NADP-ME. V chloroplastech je pravděpodobně přítomna NADP-ME (Nt-NADP-ME1) kódovaná sekvencí databáze GenBank č. DQ923119, v cytosolu NADP-ME (Nt-NADP-ME2) kódovaná sekvencí databáze GenBank č. DQ923118. Třetí transkript (kódovaný sekvencí databáze GenBank č. EH663836) je také předpokládaná cytosolová NADP-ME. Zdá se, že exprese všech 3 transkriptů v dospělých rostlinách je konstitutivní, pravděpodobně všechny isoformy jsou součástí primárního metabolismu, i když současně také odpovídají na různé typy stresu. Relativní poměr exprese genu isoformy Nt-NADP-ME1 a Nt-NADP-ME2 v listech, stoncích a kořenech je mnohonásobně ve prospěch cytosolové isoformy. Naopak v květech je více exprimována isoforma chloroplastová (Müller *et al.*, 2008).

1.4 Struktura NADP-ME

Primární struktura (aminokyselinová sekvence) NADP-dependentních malátdehydrogenas je vzhledem k jejich důležitým biologickým funkcím poměrně značně konzervována. Například lidská, potkaní a myší cytosolová NADP-ME sdílejí 90 % identity. Sekvenční identita mezi lidskou mitochondriální NAD-ME a lidskou mitochondriální či cytosolovou NADP-ME je 55 %. Dalším významným příkladem vysokého stupně konzervovanosti je 47 % sekvenční identita aminokyselin mezi kukuřičnou chloroplastovou isoformou NADP-ME a lidskou mitochondriální NADP-ME (Xu *et al.*, 1999).

Plastidová isoforma *Nicotiana tabacum* L. Nt-NADP-ME1 skládající se z 642 aminokyselin, z nichž pravděpodobně 56 tvoří tranzitní peptid, vykazuje 76 % sekvenční identitu aminokyselin s cytosolovou Nt-NADP-ME2, která se skládá z 591 aminokyselin. Ve fylogenetickém stromu rostlinných NADP-ME sestaveném z 26 rostlin byl Nt-NADP-ME1 zařazen do monofyletické skupiny (skupiny II) sdružující plastidové isoformy NADP-ME dvouděložných rostlin a Nt-NADP-ME2 do skupiny cytosolových isoform dvouděložných rostlin (skupina I) (Müller *et al.*, 2008).

Trojrozměrná struktura rostlinných isoform NADP-ME není známá, zatímco krystaly c-NADP-ME z jater holuba byly získány už před více jak 40-ti lety (Hsu a Lardy, 1967). Avšak podrobné výsledky získané rentgenovými difrakčními studiemi byly publikovány až Yangem *et al.* (2002). Bylo zjištěno, že holubí c-NADP-ME je tetramer, jednotlivé monomery mohou být rozděleny na 4 domény (viz obr. 1A, str. 6). Doména A je tvořena především α -helikální strukturou. Doména B obsahuje ve středu 5 paralelních β -skládaných listů obklopených po obou stranách α -helixy. Doména C obsahuje Rossmanův žlábek, ve kterém je místo pro vazbu dinukleotidu. Doména D zahrnuje C-konec enzymu (Yang *et al.*, 2002) (viz obr. 1B, str. 6).



obr. 1A. Krystalová struktura tetrameru cytosolového NADP-ME z jater holuba. Jednotlivé monomery jsou vyznačeny v různých barvách, jsou označena místa, kde se tvoří dimer a monomer. B. Schématické znázornění struktury monomeru holubí NADP-ME v komplexu s NADP⁺, oxalátem a Mn²⁺. β -skládané listy jsou znázorněny modře, α -helixy žlutě a spojovací smyčky fialově (převzato, Yang *et al.*, 2002).

Také pro živočišné NAD-dependentní malátdehydrogenasy jsou známy krystalové struktury (isoforma lidská, potkaní a z hlísta *Ascaris suum*) (Xu *et al.*, 1999).

Struktura monomeru lidské mitochondriální NAD-ME je velmi podobná cytosolové isoformě NADP-ME z holubích jater. Všechny prvky sekundární struktury jsou analogické, monomer může být také rozdělen na 4 domény A, B, C, D liší se pouze ve vazném místě pro adenin koenzymu NADP⁺/NAD⁺, které se nachází za β -skládanými listy Rossmanova žlábků, a to jak konformačně tak i rozdílnou sekvencí aminokyselin, dochází zde k záměně lysin-tyrosin u lidské NAD-ME za serin-lysin u holubí NADP-ME. Postranní hydroxyl serinu je vázán na 2'-fosfát, zatímco postranní řetězec lysinu s molekulou NADP⁺ neinteraguje. Další rozdíly byly pozorovány v uspořádání tetrameru, i když symetrie obou struktur zůstala zachována (Yang *et al.*, 2002). U lidské mitochondriální NAD-ME bylo nalezeno vazebné místo pro inhibitor ATP a allosterické místo pro aktivátor fumarát (Chang a Tong, 2003). Strukturní studie ukázaly, že enzym obsahuje 2 vazebná místa pro ATP: jedno v aktivním centru enzymu, kde se také váže koenzym NAD⁺ a další místo na povrchu tetrameru. ATP zde má dvojí funkci, jednak vazbou do aktivního centra enzymu funguje jako kompetitivní

inhibitor vůči NAD^+ , jednak je vazba molekuly ATP mimo aktivní centrum důležitá pro zachování integrity kvarterní struktury (Hsu *et al.*, 2004).

1.5. Některé fyzikální vlastnosti NADP-ME

1.5.1 Relativní molekulová hmotnost

Relativní molekulová hmotnost jedné podjednotky rekombinantních proteinů *Nicotiana tabacum* L. Nt-NADP-ME1 a Nt-NADP-ME2 byla zjištěna 63 000 u chloroplastové a 65 000 u cytosolové isoformy, přičemž uspořádání obou isoformem je tetramerní (Müller *et al.*, 2008).

Bylo zjištěno, že plastidová isoforma NADP-ME4 z *Arabidopsis thaliana* je přítomna v rovnováze aktivních dimerů a tetramerů, přičemž relativní molekulová hmotnost NADP-ME4 je odhadována na 260 000 a 130 000. Relativní molekulová hmotnost nativních cytosolových isoformem *A. thaliana* (NADP-ME1, NADP-ME2 a NADP-ME3) je překvapivě vyšší než 400 000, což odpovídá vyšším oligomerizačním stavům, pravděpodobně hexamerům a oktamerům (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005).

V zelených listech kukuřice (C_4 rostliny) byly charakterizovány 3 isoformy: chloroplastová převládající v zelených listech a podílející se na C_4 fotosyntetické fixaci CO_2 o relativní molekulové hmotnosti jedné podjednotky 62 000, nefotosyntetická 66 000 isoforma vyskytující se jako dimer a nefotosyntetická 72 000 isoforma převládající v etiolovaných listech (Maurino *et al.*, 1996; Saigo *et al.*, 2004). Ačkoliv protein o relativní molekulové hmotnosti jedné podjednotky 72 000 také purifikovaný ze stonků pšenice (Casati *et al.*, 1997) z *Ricinus communis* (Colombo *et al.*, 1997), či z vodní rostliny *Egeria densa* (Casati *et al.*, 2000), detekovaný pouze pomocí protilátek byl později identifikován jako Hsp 70 (heat shock protein), který interaguje s NADP-ME a byl mylně považován za isoformu (Lara *et al.*, 2005).

Další rostliny, u kterých byla stanovena relativní molekulová hmotnost jedné podjednotky NADP-ME jsou: C_4 strom *Haloxylon persicum* (chloroplastová 67 000 isoforma), *Flaveria floridana* (chloroplastová 62 000) a kosmatec křišťálový (*Mesembryanthemum crystallinum*) po indukci solným stresem (cytosolová 64 000 isoforma) (Drincovich *et al.*, 2001).

Kosmatec křišťálový je fakultativní CAM rostlinou, z C_3 metabolismu přechází na CAM metabolismus pouze je-li vystaven solnému stresu či stresu suchem (Cushman *et al.*, 1992).

Rostliny rodu *Flaveria* se podle způsobu fotosyntézy dělí na druhy *Flaveria* C₃, C₃-C₄ přechodné (z angl. C₃-C₄ intermediate), podobné C₄ (z angl. C₄ like) a C₄. U těchto druhů byly převážně v chloroplastech identifikovány 3 isoformy NADP-ME: s relativní molekulovou hmotností 72 000, 64 000, 62 000 (Drincovich *et al.*, 1998)

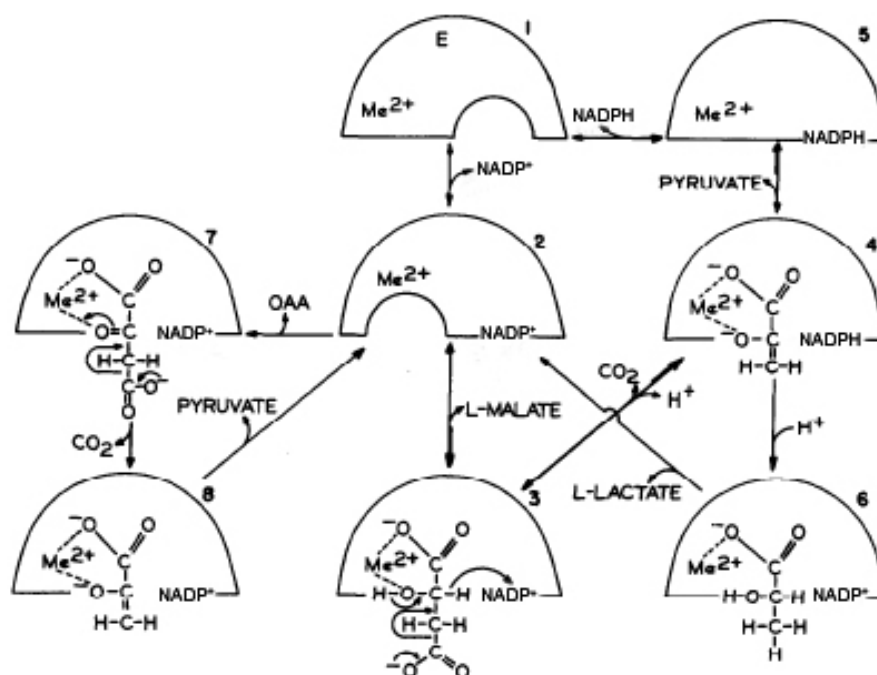
1.5.2 pH optimum a pI

pH optimum rostlinných NADP-ME se pohybuje v neutrální oblasti, a to především u C₃ a CAM rostlin (např. rekombinantní proteiny z tabáku Nt-NADPME1 7,3; Nt-NADPME2 7,0; pšenice 7,2; *Egeria densa* 7,3, *Solanum tuberosum* 7,4 a CAM rostlina *Mesembryanthemum crystallinum* 7,2). Více alkalické pH bylo zjištěno pro NADP-ME z C₄ rostlin (zelené listy kukuřice 8,0; *Flaveria floridana* 7,5; *Haloxylon persicum* 8,2. (Müller *et al.*, 2008, Drincovich *et al.*, 2001, Edwards a Andreo, 1992). U lidského NADP-ME bylo jak pro cytosolový tak mitochondriální NADP-ME stanoveno pH optimum 7,8 - 8,1 (Bukato *et al.*, 1995).

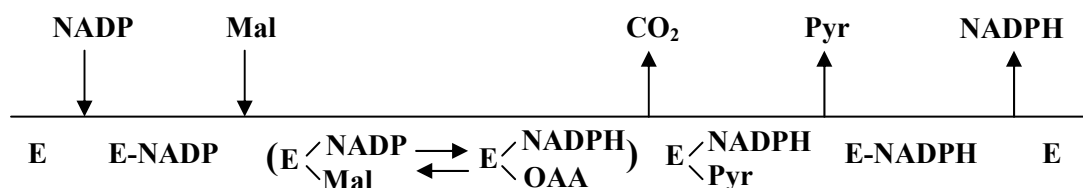
Isoelektrický bod rostlinných NADP-ME byl pro NADP-ME izolované z nefotosyntetických kořenů a etiolovaných listů kukuřice stanoven 5,4, zatímco fotosyntetická isoforma izolovaná ze zelených listů kukuřice měla pI vyšší (6,2) (Maurino *et al.*, 2001).

1.6 Kinetický mechanismus reakce katalyzované NADP-ME

Kinetický mechanismus reakce katalyzované NADP-ME (EC 1.1.1.40) byl objasněn u cytosolové isoformy izolované z jater holuba (obr. 2, str. 9) (Hsu *et al.*, 1967) a z lidských nádorových buněk rakoviny prsu (obr. 3, str. 9) (Chang *et al.*, 1992). Z inhibičních studií produkty a analogem substrátu vyplývá, že reakce probíhá následným uspořádaným mechanismem dvousubstrátové reakce Bi-Ter, přičemž vedoucím substrátem je NADP⁺, následuje vazba L-malátu. Produkty se uvolňují v pořadí CO₂, pyruvát a NADPH (Chang *et al.*, 1992).



Obr. 2. Navrhovaný kinetický mechanismus reakce katalyzované NADP-ME z holubích jater (převzato od Hsu *et al.*, 1967 a upraveno).



Obr. 3. Navrhovaný kinetický mechanismus (následný uspořádaný, Bi-Ter) dvousubstrátové reakce katalyzované NADP-ME a z linií lidských nádorových buněk rakoviny prsu. Mal-L-malát, OAA-oxaloacetát, Pyr-pyruvát (Chang *et al.*, 1992).

Pro mitochondriální NAD(P)-ME (EC 1.1.1.39) z nádorových jaterních buněk byl odvozen stejný mechanismus (Teller *et al.*, 1992).

Jiný mechanismus byl zjištěn pro mitochondriální NAD(P)-ME (EC 1.1.1.39) enzym z *Ascaris suum* (hlísta parazitujícího ve střevech domácích i divokých prasat) (Aktas a Cook, 2008). Mechanismus byl diagnostikován jako následný, ale neuspořádaný (náhodný).

1.7 Regulace NADP-ME metabolismy

Regulace fotosyntetických isoform NADP-ME (např. z C₄ rostliny kukuřice) se jednak uskutečňuje inhibicí nadbytkem substrátu (L-malátu), ke které naopak u nefotosyntetických isoform z C₃ rostlin nedochází (Drincovich *et al.*, 2001). Jednak se také

uskutečňuje prostřednictvím aktivátorů a inhibitorů, např. u C₄ rostliny cukrové třtiny byla zaznamenána aktivace NADP-ME sukcinátem, avšak pouze při nízkých koncentracích malátu. Byla popsána inhibice chloroplastové isoformy NADP-ME z listů kukuřice α -ketoglutarátem a oxaloacetátem, která je výraznější při pH 7,5 než při pH 8,4 (Edwards a Andreo, 1992). Jako allosterický inhibitor byl také pro C₄ isoformy NADP-ME z kukuřice, cukrové třtiny a čiroku a pro CAM isoformu (z *Bryophyllum*) zjištěn fruktosa-1,6-bisfosfát, který však byl aktivátorem pro NADP-ME z C₃ rostliny rýže (Edwards a Andreo, 1992).

Regulace nefotosyntetické NADP-ME, která je jednou z hlavních součástí této disertační práce nebyla v minulosti podrobně studována. V klíčící C₃ rostlině *Ricinus communis* byla nalezena jedna isoforma NADP-ME aktivovaná sukcinátem, koenzymem A, acetyl-koenzymem A a palmitoyl-koenzymem A (Colombo *et al.*, 1997). Aktivace těmito metabolity může souviset se syntézou vyšších mastných kyselin. V roce 2008 bylo u dvou rekombinantních isoform z C₃ rostliny tabáku: plastidové (Nt-NADP-ME1) a cytosolové (Nt-NADP-ME2) studována regulace sukcinátem, fumarátem, aspartátem, oxaloacetátem, pyruvátem, glukosa-6-fosfátem, ATP, CoA a acetyl-CoA. Rekombinantní plastidový Nt-NADP-ME1 byl aktivován aspartátem a inhibován fumarátem, oxaloacetátem, pyruvátem, glukosa-6-fosfátem, ATP, CoA a acetyl-CoA. Rekombinantní cytosolový Nt-NADP-ME2 byl aktivován CoA a inhibován všemi ostatními testovanými látkami kromě aspartátu (Müller *et al.*, 2008).

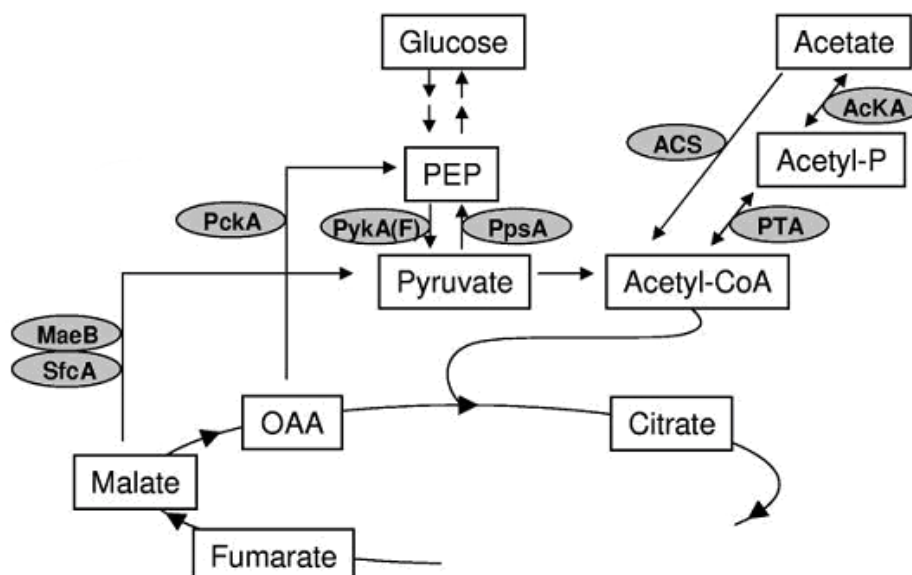
Regulace byla podrobně studována u živočišné mitochondriální NAD-ME, která je kompetitivně inhibována ATP, a to jak vůči NAD⁺ tak vůči L-malátu a allostericky aktivována fumarátem (Hsieh *et al.*, 2006, Hsu *et al.*, 2004).

1.8 Funkce NADP-ME

1.8.1 Bakterie

U bakterií jsou malátdehydrogenasy (dekarboxylační) součástí metabolické smyčky fosfoenolpyruvát-pyruvát-oxaloacetát, která spojuje glykolýzu/glukoneogenezi s citrátovým cyklem. V podmínkách glukoneogeneze jsou tak fosfoenolpyruvátkarboxykinasa a/nebo malátdehydrogenasa (dekarboxylační) spolu s fosfoenolpyruvát-syntetasou ústředními enzymy, které zprostředkovávají přeměnu intermediátů citrátového cyklu na fosfoenolpyruvát, prekurzor glukoneogeneze (obr 4, str. 11). Tím se

fosfoenolpyruvátcarboxykinasa a malátdehydrogenasy (dekarboxylační) stávají esenciální pro růst bakterií na meziproduktech citrátového cyklu nebo na substrátech, které vstupují do ústředního metabolismu přes acetyl-koenzym A (koenzym A), jako tomu je v případě acetátu (Bologna *et al.*, 2007).



Obr. 4. Metabolická smyčka fosfoenolpyruvát (PEP)-pyruvát-oxaloacetát (OAA) a její napojení na glykolýzu/glukoneogenezi a na aktivaci acetátu. Bakteriální malátdehydrogenasy dekarboxylační (SfcA a/nebo MaeB) spolu s fosfoenolpyruvát-synthetasou (PpsA) umožňují vznik PEP, přímého prekursoru glukoneogeneze, z intermediátů citrátového cyklu. Případně také fosfoenolpyruvátcarboxykinasa (PckA) dovoluje přeměnu C₄ intermediátů na PEP. Klíčový krok glykolýzy, přeměna PEP na pyruvát, je katalyzován pyruvátkinasou (PykA(F)). Dále je znázorněna aktivace acetátu, která je zprostředkována dvěma možnými cestami. První je katalyzována AMP-tvořící acetyl-CoA-synthetasou (ACS), druhá alternativní cesta pak acetátkinasou (AcKA) spolu s fosfotransacetylasy (PTA). (Bologna *et al.*, 2007).

1.8.2 Rostliny

1.8.2.1 Nefotosyntetická isoforma NADP-ME

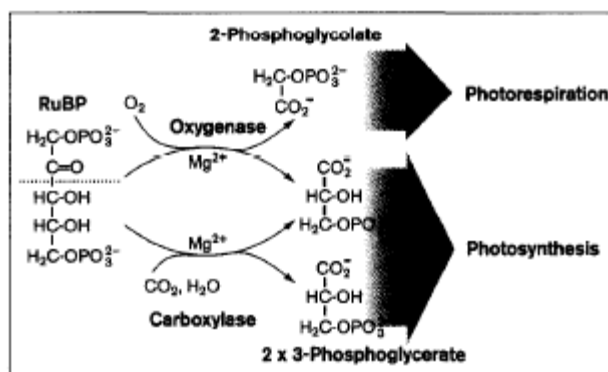
U rostlin závisí funkce NADP-ME na tom, zda se jedná o isoformu C₃, C₄ nebo CAM. Zatímco v C₃ rostlinách je NADP-ME pouze jako nefotosyntetická isoforma, u rostlin CAM a rostlin C₄ (typu NADP-ME) katalyzuje reakci, která je součástí fotosyntetické fixace CO₂.

Pro nefotosyntetickou isoformu NADP-ME, přítomnou ve všech rostlinách, jsou předpokládány tyto funkce i) poskytování NADPH pro biosyntetické procesy (např. biosyntézu tuků, ligninu, fytoalexinů), ii) NADPH může rovněž sloužit jako koenzym některých antioxidačních enzymů (glutathionreduktasy, EC 1.8.1.7; monodehydroaskorbát-reduktasy, EC 1.6.5.4.), iii) spolu s fosfoenolpyruvátcarboxylasou (PEPC, EC 4.1.1.31) se podílí na udržování intracelulárního pH, iv) NADPH produkované cytosolovou isoformou listů, plodů a kořenů může být oxidováno enzymem vnější mitochondriální membrány specifickou mitochondriální NADPH-dehydrogenasou za vzniku

ATP, v) produkt NADP-ME pyruvát může být zpracován respirací nebo být využit biosyntetickými procesy vyžadujícími C_3 kyseliny, vi) NADP-ME může hrát roli v odbočce glykolýzy, kde spolu s PEPC a NAD-MDH přeměňuje fosfoenolpyruvát na pyruvát a NADH na NADPH, vii) velmi pravděpodobně se NADP-ME uplatňuje při zrání plodů, viii) v tkáních reprodukčních orgánů NADP-ME může poskytovat CO_2 pro fotosyntézu ix) NADP-ME může sloužit jako prostředník mezi katabolickými (respirace pyruvátu a NADPH) a anabolickými procesy (využití pyruvátu a NADPH pro biosyntetické pochody) (Edwards a Andreo, 1992). NADP-ME je také studována v souvislosti se stresem (Levitt, 1980; Schaaf *et al.*, 1995; Synková a Valcke, 2001; Maurino *et al.*, 2001; Ryšlavá *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003; Crecelius *et al.*, 2003; Chi *et al.*, 2004; Synková *et al.*, 2004; Smeets *et al.*, 2005; Saher *et al.*, 2005; Valderrama *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007, příloha 3 a 4).

1.8.2.2 Fotosyntetická isoforma NADP-ME: rozdíl ve fixaci CO_2 u C_3 a C_4 a CAM rostlin

C_3 rostliny (především rostliny mírného pásu, tvoří přibližně 95 % všech rostlin) váží vzdušný CO_2 přímo přes průduchy pokožky listu a mezibuněčným prostorem na ribulosa-1,5-bisfosfát enzymem ribulobisfosfátcarboxylasou/oxygenasou (obr. 6c, str.15) (Rubisco, EC 4.1.1.39). Vzniklý šestiuhlíkatý labilní meziprodukt je štěpen na 3-fosfoglycerát (odtud název C_3 rostliny), který je dále přeměňován Calvinovým cyklem (obr. 6a, str. 15). Rubisco má však i aktivitu oxygenasovou, jelikož na stejný substrát (ribulosa-1,5-bisfosfát), na který se váže CO_2 , se může také kompetitivní reakcí vázat O_2 za vzniku fosfoglycerátu a fosfoglykolátu (obr. 5, str. 13). Důsledkem oxygenasové aktivity Rubisco je fotorespirace (Griffin a Seemann, 1996; Šetlík *et al.*, 1998; Malkin a Niyogi, 2000). Tento cyklus je pozoruhodný tím, že při něm dochází ke kooperaci enzymů ve třech organelách. Sekvence reakcí se zdá být pro rostliny zcela neúčinná, pravděpodobně se však jedná o jakýsi regulační mechanismus asimilace CO_2 a velmi pravděpodobně i o cestu biosyntézy aminokyselin glycinu a serinu. S rostoucí teplotou se poměr fotorespirace k fotosyntéze výrazně zvyšuje. Příčinou je jednak snižující se afinita Rubisco k CO_2 více než-li k O_2 a klesající rozpustnost CO_2 . Z toho vyplývá, že oxygenasová aktivita a z ní plynoucí fotorespirace může významně snižovat produktivitu rostlin (Griffin a Seemann, 1996; Šetlík *et al.*, 1998; Malkin a Niyogi, 2000).



Obr. 5. Reakce katalyzované ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasou/oxygenasou (Rubisco). Karboxylasová aktivita spočívá ve fixaci CO₂ na ribulosa-1,5-bisfosfát (RuBP) za vzniku 2 molekul 3-fosfoglycerátu, který je dále zpracováván na triosafosfáty a následně na sacharidy. Kompetitivní oxygenasová reakce poskytuje 1 molekulu 2-fosfoglykolátu a 1 molekulu 3-fosfoglycerátu (Griffin a Seemann, 1996).

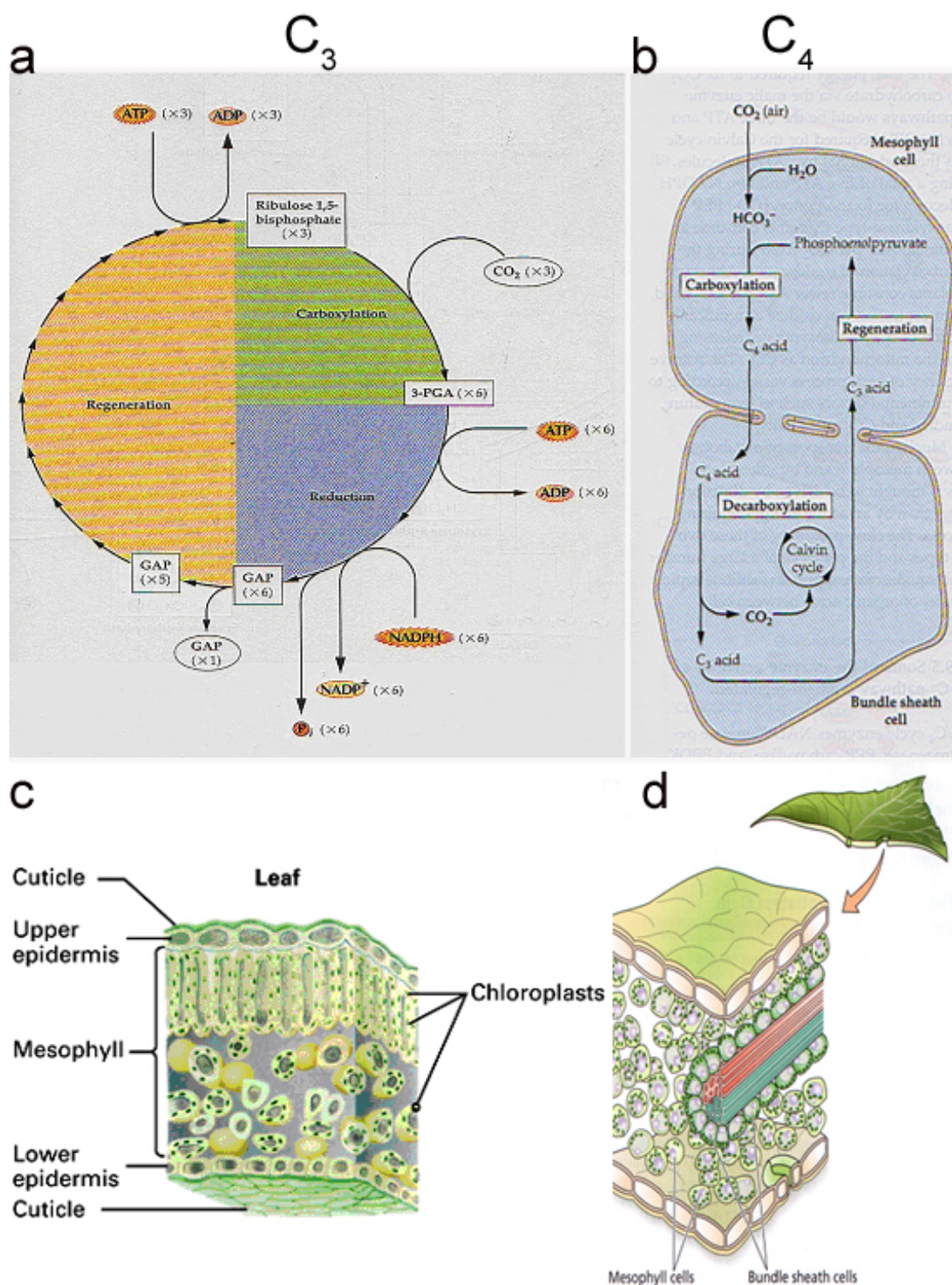
NADP-ME v C₃ rostlinách se nachází jako nefotosyntetický enzym. Z taxonomických a fylogenetických studií vyplývá, že C₄ a CAM rostliny se pravděpodobně vyvinuly z C₃ rostlin před 85 - 65 miliony lety, kdy došlo k výraznému snížení CO₂ v atmosféře (Chi *et al.*, 2004).

C₄ a CAM způsob fotosyntetické fixace CO₂ tak představuje adaptaci rostlin na vysoké sluneční intenzity, horko a sucho na základě prostorového či časového oddělení primární a sekundární fixace CO₂ (Maurino *et al.*, 1996; Šetlík *et al.*, 1998; Malkin a Niyogi, 2000).

K prostorovému oddělení karboxylační a dekarboxylační reakce dochází u C₄ rostlin využívajících zvláštní tzv. věnčitou (Kranz) anatomii listového pletiva. U těchto rostlin se mezi povrchovými buňkami epidermu a vaskulárním pletivem nacházejí dva typy odlišných buněk: mesofylové buňky a buňky pochev cévních svazků (obr. 6d, str. 15). Mesofylové buňky mají sníženou aktivitu enzymů Calvinova cyklu, zato mají v cytoplazmě vysokou aktivitu fosfoenolpyruvátkarboxylasy (PEPC, EC 4.1.1.31) dovolující C₄ rostlinám fixovat CO₂ v podobě HCO₃⁻ enzymem PEPC do čtyřuhlíkaté sloučeniny oxaloacetátu (odtud název C₄). Schopnost PEPC vázat CO₂ ve formě HCO₃⁻ je velkou výhodou, neboť dovoluje využívat nižší koncentrace CO₂ než Rubisco, navíc nedochází ke konkurenci s O₂. Oxaloacetát je následně v mesofylových buňkách převáděn buď na malát (NADP-ME typ) nebo je transaminován na aspartát (NAD-ME či PEP-CK typ) podle typu rostliny. Sloučenina se čtyřmi atomy uhlíku (malát či aspartát) pak přechází z mesofylových buněk do buněk pochev cévních svazků, kde se dekarboxyluje a tak se vytváří vysoká koncentrace CO₂ pro Calvinův cyklus (obr. 6b, str. 15). V důsledku toho je velmi silně potlačena oxygenasová aktivita Rubisco (Šetlík *et al.*, 1998; Malkin a Niyogi, 2000).

Dekarboxylační reakce, které se pro jednotlivé typy rostlin liší, probíhají ve věnčitých buňkách buď v chloroplastech dekarboxylací malátu pomocí enzymu NADP-ME (NADP-ME typ), nebo v mitochondriích dekarboxylací oxaloacetátu enzymem NAD-dependentní malátdehydrogenasou dekarboxylační (NAD-ME typ), nebo v cytoplazmě dekarboxylací oxaloacetátu enzymem fosfoenolpyruvátkarboxykinasou (PEP-CK typ). U NADP-ME typu je produkt dekarboxylace pyruvát vrácen zpět do mesofylových buněk, kde je fosforylován pyruvát, fosfátdikinasou (PPDK, EC 2.7.9.1) na fosfoenolpyruvát (obr. 6b, str. 15).

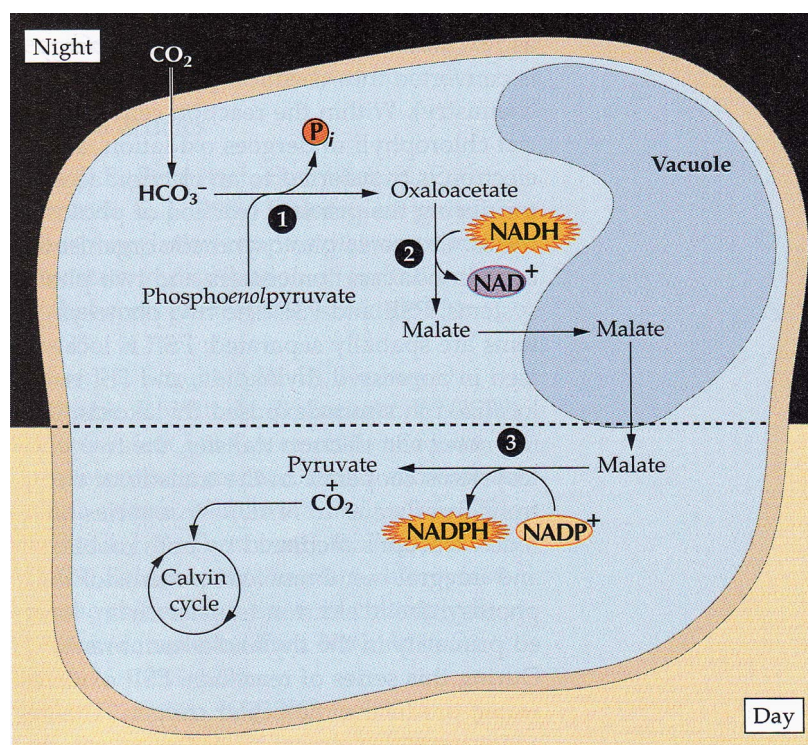
V C₄ rostlinách (NADP-ME typu) je tedy celková spotřeba na fixaci 1 molekuly CO₂ 5 molekul ATP plus 2 molekuly NADPH. Tato vynaložená investice však rostlině přináší výhodu, která se s rostoucí teplotou, vysokou světelnou intenzitou a klesající dostupností vody stupňuje a která způsobí, že výtěžek fotosyntézy není snižován fotorespirací (Šetlík *et al.*, 1998; Malkin a Niyogi, 2000).



Obr. 6. Porovnání fotosyntetické fixace CO₂ u C₃ (a, c) a C₄ (b, d) rostlin. Zatímco u C₃ rostlin je vzdušný CO₂ fixován přímo přes průduchy listů a mezibuněčný prostor enzymem Rubisco Calvinova cyklu (a) mesofylových buněk (c), u C₄ rostlin dochází díky specifické anatomii listového pletiva (d) v mesofylových buňkách pouze k prefixaci vstupujícího vzdušného CO₂, který je ve vodném prostředí cytoplazmy vázán ve formě HCO₃⁻ fosfoenolpyruvátcarboxylasou na PEP za vzniku oxaloacetátu (čtyřuhlíkaté sloučeniny). Oxaloacetát je dále přeměňována na malát/aspartát podle typu rostliny a poté transportován do sousední věnčité buňky (buňky pochev cévních svazků). Zde je C₄ sloučenina dekarboxylována, přičemž poskytuje CO₂ pro Rubisco Calvinova cyklu. Tříuhlíkatý produkt dekarboxylace se vrací zpět do mesofylové buňky a je regenerován na fosfoenolpyruvát (b). 3-PG: 3-fosfoglycerát, GAP-glyceraldehydfosfát, (Malkin a Niyogi, 2000; Taiz a Zeiger, 2002).

CAM rostliny

Také rostliny s metabolismem CAM (crassulacean acid metabolism) přizpůsobené krajně suchým stanovištím a proměnlivým podmínkám, mezi které patří především sukulenty, ale také tropické rostliny např. orchideje využívají stejně jako C₄ rostliny spřažení karboxylace fosfoenolpyruvátu a dekarboxylace malátu k tomu, aby co nejvíce omezily ztráty vody způsobené transpirací. Reakce karboxylace a dekarboxylace však nejsou odděleny prostorově (neprobíhají v různých typech buněk asimilačního pletiva), avšak jsou odděleny v čase. V průběhu noci, kdy se CO₂ váže fosfoenolpyruvátkarboxylasou, je vznikající oxaloacetát průběžně přeměňován na malát a ten je přes noc skladován ve vakuole. Ve dne je pak malát transportován ven z vakuoly a dekarboxylován NADP-ME (obr. 7). Uvolněný CO₂ je přímo poskytován pro Calvinův cyklus, přičemž průduchy CAM rostlin zůstávají při silném denním slunečním záření uzavřené (Šetlík *et al.*, 1998; Malkin a Niyogi, 2000)



Obr. 7. CAM metabolismus, který se vyvinul jako adaptace fotosyntézy především v aridních podmínkách. Během noci je CO₂ fixován fosfoenolpyruvátkarboxylasou (1) do čtyřuhlíkaté sloučeniny oxaloacetátu, který je malátdehydrogenasou (2) redukován na malát. Malát je přes noc skladován ve vakuole a ve dne, kdy mají rostliny průduchy zavřené, aby zabránily ztrátám vody, je uvolňován NADP-ME (3) pro Calvinův cyklus. Převzato Malkin a Niyogi, 2000.

1.8.3 Živočichové

Důležitou funkcí holubí cytosolové isoformy (c-NADP-ME) je produkce NADPH a biosyntéza mastných kyselin v játrech a tukové tkáni, dále se také může podílet na mikrosomální detoxifikaci léků (Xu *et al.*, 1999). Tato isoforma může být indukována dietou

bohatou na cukry nebo thyroïdními hormony (Xu *et al.*, 1999). Lidská mitochondriální isoforma (m-NAD-ME) hraje klíčovou úlohu v rychle se dělicích a nádorových buňkách v metabolismu glutaminu, který je hlavním zdrojem energie těchto buněk. Děje se tak prostřednictvím několikastupňové přeměny glutaminu na pyruvát tzv. glutaminolýzy (přeměny glutaminu \Rightarrow glutamát \Rightarrow α -ketoglutarát \Rightarrow sukcinát \Rightarrow fumarát \Rightarrow malát \Rightarrow pyruvát). V posledním kroku je malát přeměňován na pyruvát pomocí m-NAD-ME (Xu *et al.*, 1999).

1.9 Stres rostlin

Rostlinná enzymologie je úzce spojena se studiem obranných odpovědí rostlin vůči stresu, ať již abiotickému (vznikajícího jako následek působení chemických a fyzikálních stresových faktorů) nebo biotickému (působeného především patogenními mikroorganismy). Právě v nepříznivých podmínkách dochází k aktivaci celé řady genů, což se projeví zvýšenou hladinou některých metabolitů a proteinů, z nichž některé mohou být zodpovědné za určitý stupeň ochrany vůči danému stresu (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2007). Může docházet k přesměrování, zeslabení či zintenzivnění určitých metabolických drah a ke změně aktivity příslušných enzymů.

Objasnění biochemických změn, ke kterým při stresu rostlin dochází, pak vede k možnostem, jak zvýšit jejich odolnost. V této práci byl studován jednak vliv biotického stresu vyvolaného *Y virem bramboru* (PVY), jednak vliv abiotického stresu, v podobě sucha a nedostatku CO₂ na aktivitu NADP-ME.

1.9.1 Biotický stres způsobený rostlinnými viry

1.9.9.1 Obecná charakteristika virů

Viry jsou intracelulární biotrofní parazité, jejichž životní cyklus plně závisí na hostiteli (Agrios, 1997d; Rosypal, 2002). Celkový počet známých virů je více jak 2000 a neustále jsou popisovány viry další. Z tohoto počtu skoro jednu čtvrtinu tvoří rostlinné viry. Existuje více než 40 rodů rostlinných DNA a RNA virů. Nejpočetnější skupinou rostlinných virů jsou pozitivní jednovláknové RNA viry: (+) ss RNA (Hammond-Kosack a Jones, 2000).

Jeden virus může infikovat jeden nebo více rostlinných druhů, přičemž každý rostlinný druh je obvykle napadán mnoha různými viry (Agrios, 1997d). Choroby rostlin způsobené

viry představují třetí ekonomicky nejvýznamnější skupinu (13 %) po chorobách vyvolaných houbami (57 %) a háďátky (17 %) (Burketová a Čeřovská, 2003).

Rostlinné viry se od ostatních rostlinných patogenů liší nejenom velikostí a tvarem, ale i svým jednoduchým chemickým složením a strukturou, způsobem infekce, multiplikací, translokací a šířením v hostiteli. Příznaky, které viry vyvolávají jsou také odlišné od jiných patogenů (Agrios, 1997d). Většina virových infekcí způsobuje omezení růstu rostliny, různé typy zakrslosti a též zkrácení délky života rostliny. Nejpatrnější jsou příznaky na listech, avšak příznaky způsobené viry se mohou objevovat i na stoncích, plodech a kořenech. Symptomy jsou buď ohraničené (pouze v místě vstupu infekce) a projevují se chlorotickou nebo nekrotickou lézí, anebo systémové. Systémové infekce se nejčastěji projevují mozaikami a kroužkovitostí, které jsou doprovázené chlorózami, nekrózami, žloutenkami a žilkováním (Agrios, 1997d; Hammond-Kosack a Jones, 2000; Rosypal, 2002).

1.9.9.2 Transport a šíření virů

Jelikož jsou rostlinné buňky chráněné buněčnou stěnou pokrytou kutikulou a vosky, a viry nemají žádný mechanismus, který by jim umožňoval aktivně pronikat do buňky, vnikají do buňky pouze v místě mechanického poranění nebo pomocí přenašečů, např. mšic (Agrios, 1997d; Hammond-Kosack a Jones, 2000; Rosypal, 2002). Jakmile se virus dostane do rostlinné buňky, dochází k jeho množení s využitím translačního aparátu hostitele a nově vzniklé virové částice se šíří do dalších buněk plasmodesmaty (Rosypal, 2002). Dřívější studie rostlinných virů prokázaly, že plasmodesmata umožňují pohyb virem kódovaných proteinů, tak zvaných MPs (movement proteins) z buňky do buňky (Lucas, 2006). Současné studie předkládají, že virové MPs nespecificky váží RNA/DNA za vzniku nukleoproteinových komplexů. Poté se proteiny hostitele účastní přemístění MPs a nukleoproteinových komplexů k ústí plasmodesmat. Přeprava nukleoproteinových komplexů plasmodesmaty zahrnuje 3 fáze, ve kterých MPs (a) interagují s domnělým komplexem v ústí plasmodesmat, (b) indukují rozšíření mikrokanálů plasmodesmat a (c) váží se na vnitřní translokační systém, kterým se pronikají do cytoplazmy sousední buňky (Lucas, 2006). V infikované parenchymatické buňce dojde k multiplikaci viru. U většiny ekonomicky významných infekcí se virové částice dostávají do floému, odkud se rychle šíří rostlinou na větší vzdálenosti, především směrem k vyvíjejícím se částem rostliny (k apikálním meristémům) nebo k částem přijímajícím živiny (rhizomy) (Agrios, 1997d).

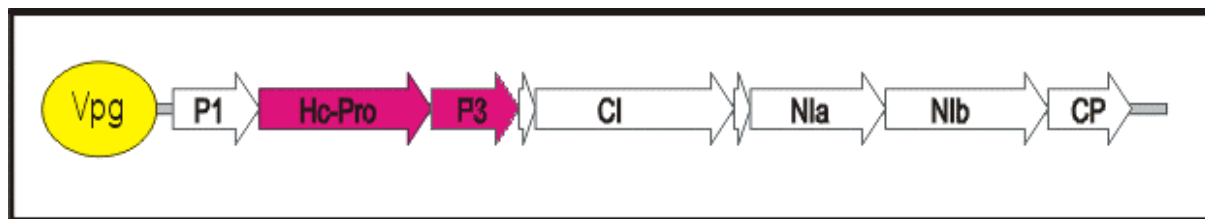
1.9.9.3 Potyviry

Y virus bramboru patří do čeledi *Potyviridae* představující významnou a početnou čeleď rostlinných virů, která se dále dělí do rodů: *Potyvirus*, *Bymovirus*, *Rymovirus* a *Ipomovirus*.

Virová částice *potyvirů* má tvar pružné tyčinky či vlákna o délce 700 až 900 nm. Obal tvoří přibližně 2000 kopií molekul kapsidového proteinu o relativní molekulové hmotnosti 30 000 - 35 000. Genom všech *potyvirů* (obr. 8, str. 20) je tvořen jednovláknovou pozitivní RNA o délce kolem 9500 nukleotidů. 5' - konec genomu je chráněn kovalentně vázaným proteinem VPg. Úvodní 5' - nekódující oblast je dlouhá až 200 nukleotidů a funguje jako zesilovač translace. Účastní se rovněž iniciace obalování. *Potyviry* překládají genom do jediného polyproteinu o molekulové hmotnosti 340 000 - 380 000. Jednotlivé funkční proteiny jsou pak z polypeptidu vyštěpovány třemi různými virovými proteasami: P1, HC-pro a NIa (Rosypal, 2002; Shukla *et al.*, 1994).

Protein HC-pro (z angl. helper component protease) je vícefunkční s doménou cysteinové proteasy na C-konci. Tato proteasa se autokatalyticky odštěpuje od následujícího proteinu P3. HC-pro se v buňkách hromadí ve velkém množství a štěpením v místě Gly ↓ Gly v motivu Tyr Leu Val Gly ↓ Gly inaktivuje proteiny obranného systému hostitele (Rosypal, 2002). V cytoplazmě infikovaných buněk *potyviry* vytváří charakteristické spirálovité inkluze složené z molekul helikasy CI (z angl. cytoplasmatic inclusion). Funkce proteinu P3 zůstává stále neobjasněna. Předpokládá se, že hraje roli při replikaci viru (Guo *et al.*, 2001; Merits *et al.*, 1998), jeho šíření z buňky do buňky (Johansen *et al.*, 2001). Dále se zvažuje, že protein P3 slouží jako kofaktor proteasy (Riechmann *et al.*, 1992), případně, že se podílí na vysoce specifických interakcích virus-hostitel (Jenner *et al.*, 2003; Johansen *et al.*, 2001).

Hlavní proteasou *potyvirů* je proteasa NIa (z angl. nuclear inclusion type a), která štěpí polypeptid v sedmi místech a vyštěpuje tak většinu funkčních proteinů. Sama se vyštěpuje autokatalyticky. Kapsidový protein CP (z angl. coat protein) je multifunkční protein, který reguluje replikaci v pozdních fázích infekce tím, že se váže za prvním terminačním kodonem replikasy na mRNA a stimuluje tak tvorbu stabilní vlásenky. Na ní dojde k zastavení ribozomů a přestává se tvořit větší protein replikasy. Molekuly s navázaným kapsidovým proteinem jsou označeny jako genomové RNA a posléze se sbalují do virionů. Protein kapsidu je nezbytný pro šíření viru do okolních buněk. 3' - konec je velmi heterogenní v délce i složení. U všech *potyvirů* je polyadenylován.



Obr. 8. Schematické znázornění potyvirového genomu. Červeně jsou vyznačeny geny, které byly vneseny do transgenních rostlin studovaných v této práci (Shukla *et al.*, 1994).

Spektrum hostitelů většiny potyvírů je úzké, jejich význam je však značný vzhledem k tomu, že téměř pro všechny známé kulturní plodiny existuje nějaký patogenní potyvirus. Název rodu *Potyvirus*, který je tvořen minimálně 126 členy, je odvozen od anglického názvu typového viru *Y viru bramboru* (*Potato virus Y* - PVY).

Infekce PVY patří mezi nejtěžší virová onemocnění vyskytující se u brambor. Na základě příznaků, které jednotlivé kmeny vyvolávají na bramborách a indikátorových rostlinách se tradičně dělí do 3 hlavních kmenových skupin:

1. PVY^o obecný kmen (angl. ordinary) vyvolávající především mozaiky, deformace, žloutnutí a předčasný opad listů. Někdy také vznikají bodové nekrosy na listech a stoncích. Ačkoliv mírnější izoláty a tolerantní rostliny mohou mít příznaky bez výskytu nekrotických změn, předčasně opadají listy a uhynou stonky.
2. PVY^C kmen způsobující proužkovitost bramboru
3. PVY^N je nekrotický kmen způsobující nekrózy žilek tabáku

Izoláty PVY^N vyvolávající nekrotické změny na hlízách některých odrůd brambor byly zařazeny do skupiny nového kmene:

4. PVY^{NTN}

Hostitelskými rostlinami, které v laboratorních podmínkách označujeme jako indikátorové rostliny, jsou pro *Y virus bramboru* zejména: *Nicotiana glutiosa* L., *Nicotiana tabacum* L., *Solanum tuberosum* L.

Symptomy infekce Y virem bramboru přetrvávají po celou dobu infekce a jsou do značné míry závislé na kmeni viru a odrůdě rostliny. Zvláště izoláty ze skupiny PVY^{NTN} vyvolávají závažnější poškození indikátorových rostlin.

V přírodě je PVY přenášen vektorem, kterým je nejčastěji mšice. K přenosu může dojít i po mechanickém poškození rostliny, čehož se využívá v laboratorních podmínkách. Virus se přenáší rovněž roubováním nebo při vegetativním množení, nepřenáší se semenem.

Mezi potyviry patří také *A virus bramboru* (PVA), který byl objeven dříve než PVY. Výskyt tohoto viru je celosvětový, napadá mnoho kultivarů brambor, přičemž může působit

až 40 % ztráty výtěžku. Stejně jako PVY^{NTN} má i PVA schopnost infikovat modelové rostliny tabáku systémově. Hlavní rozdíl mezi oběma viry je v příznacích: zatímco PVY^{NTN} způsobuje žilní nekrosy a některé izoláty (např. Lebanon) také kroucení listů a nekrosy stonku, jsou příznaky vyvolané PVA mírnější (pouze velmi jemná difúzní mozaika a prosvítající žilky (Shukla *et al.*, 1994).

1.9.9.4 Obranné mechanismy rostlin vůči virům

Rostlinné viry jako biotrofové musí překonat tři základní překážky, musí se replikovat v místě vstupu infekce, rozšířit se do sousedních buněk a vaskulárního systému a konečně potlačit obranu hostitele a tím kolonizovat celou rostlinu (Hammond-Kosack a Jones, 2001). Mnoho rostlin je odolných vůči většině rostlinných patogenů. Je to dáno tím, že virus nepřekoná tyto překážky, případně že rostlina není schopná zajistit látky nezbytné pro život patogenu, nebo nepříznivými podmínkami prostředí, ve kterých patogen nepřežije (Dangl a Jones, 2001).

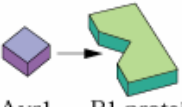
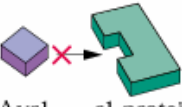
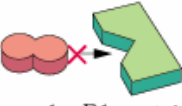
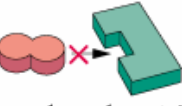
Každá rostlina však disponuje jak předem danou (konstitutivní), tak indukovatelnou obranyschopností (Agrios, 1997a,c).

Buňky na povrchu rostlin též obsahují různá množství hydrolytických enzymů, z nichž některé např. glukonasy a chitinasy mohou způsobit narušení buněčné stěny patogenu, a tím se podílet na rezistenci vůči infekci.

Rostliny dále nemusí být infikovány, jestliže v povrchových buňkách neobsahují specifické molekuly potřebné pro rozpoznání hostitele, nebo jestliže rostlina neobsahuje specifické faktory nezbytné pro infekci u hostitele (Agrios, 1997c).

K nekrotické obranné reakci neboli obraně hypersenzitivní reakcí dochází pouze při specifických kombinacích hostitel-patogen, kdy hostitel a patogen jsou navzájem inkompatibilní, neboli patogen není schopen infikovat hostitele (Agrios, 1997c). Genetickou podstatu interakce hostitel-patogen vystihuje model „gen proti genu“ navržený v roce 1940 Haroldem H. Florem (obr. 9, str. 22). Tento model předpokládá, že k rezistenci rostliny dojde pouze tehdy, když rostlina obsahuje dominantní gen rezistence (R) a patogen exprimuje komplementární dominantní gen avirulence (Avr) (Agrios, 1997c; Hammond-Kosack a Jones, 2000; Dangl a Jones, 2001). Florův model je platný pro většinu interakcí biotrofní patogen-rostlina. Hypersenzitivní reakce je výsledkem obranných odpovědí rostliny iniciovaných rozpoznáním specifické signální molekuly (elicitoru) produkované patogenem, nebo uvolněné z buněčné stěny rostliny. Rozpoznání je složitý proces, kterého se pravděpodobně účastní

různé látky typu oligosacharidů, polysacharidů, proteinů a glykoproteinů (Agrios, 1997c). Také o rostlinných receptorech interagujících s elicitory nebo rostlinnými hormony je na rozdíl od živočišné biochemie známo velmi málo, i když se ukazuje, že jejich struktura a funkce je založena na podobných principech. Tyto receptory jsou buď iontové kanály, nebo jsou spojené s G-proteiny anebo mají proteinkinasovou aktivitu (Mehdy *et al.*, 1996).

Pathogen genotype	Host plant genotype	
	<i>R1</i>	<i>r1</i>
<i>Avr1</i>	 <p>Avr1 R1 protein No disease (Plant and pathogen are incompatible.)</p>	 <p>Avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible.)</p>
<i>avr1</i>	 <p>avr1 R1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible.)</p>	 <p>avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible.)</p>

Obr. 9. Florův model „gen proti genu“. K rezistenci (inkompatibilitě) dochází, jestliže rostlina (hostitel) obsahuje dominantní gen rezistence (*R1*) a patogen komplementární dominantní gen avirulence (*Avr 1*). Záměna nebo ztráta dominantního genu rezistence *R1* rostliny za recesivní gen *r1*, či dominantního genu avirulence *Avr* patogenu za recesivní gen *avr* způsobí kompatibilitu vedoucí k onemocnění rostliny (Hammond-Kosack a Jones, 2000).

Rozpoznání hostitelskou rostlinou aktivuje kaskádu biochemických reakcí jak v napadené buňce, tak v buňkách okolních. Mezi okamžité odpovědi napadených buněk patří tvorba aktivních forem kyslíku (AOS), syntéza NO, otevření iontových kanálů, fosforylace/defosforylace proteinů, cytoskeletární změny, indukce genů a hypersenzitivní reakce směřující ke vzniku nekrosy zastavující šíření patogenu a zahajující obranné reakce (Agrios, 1997c; Hammond-Kosack a Jones, 2000).

Mezi důležité aktivní formy kyslíku patří superoxidový anion (O_2^-), který je tvořen membránovou NADPH oxidasou. Superoxidový anion je rychle přeměňován na peroxid vodíku, který je přímo toxický pro patogen, ale prochází také přes plasmatickou membránu a působí jako signální molekula, která aktivuje další obranné reakce a transkripční faktory. Peroxid vodíku se rovněž podílí na zesílení buněčné stěny, čímž se rostlinná buňka stává odolnější vůči průniku patogenů (Bartosz, 1997). Indukce obranných odpovědí směřuje k vytvoření nepříznivých podmínek pro vývoj a množení patogenu, současně však také

vede k detoxifikaci a snížení účinku toxinů produkovaných patogenem. Během 24 hodin je obranná odpověď u inkompatibilních interakcí mezi rostlinou a patogenem natolik intenzivní, že dochází přímo či nepřímo ke smrti hostitelských buněk v bezprostřední blízkosti patogenu, tzv. hypersenzitivní reakci. Následným zastavením přísunu živin či dalšími mechanismy rostliny je pak patogen eliminován. Hypersenzitivní reakce je příkladem programované buněčné smrti (Dangl *et al.*, 2000).

Aktivní formy kyslíku mění redoxní stav buňky a jsou pro vlastní buňku toxické. Buňky se chrání pomocí systému vlastních antioxidačních látek a antioxidačních enzymů, které jsou citlivě regulovány (Mehdy *et al.*, 1996; Lee a Lee, 2000). Antioxidační látky jsou jednak hydrofobní látky rozpustné v tucích přítomné v buněčných membránách např. tokofenoly, karotenoidy, xantofyly, flavonoidy, vitamin D, jednak ve vodě rozpustné redukční látky např. glutathion, askorbát, cystein, kyselina močová a další.

Nejdůležitějšími antioxidačními enzymy jsou superoxidodismutasy (SODs; EC 1.15.1.1) katalyzující disproporcionační reakci superoxidového aniontu na peroxid vodíku a vodu, katalasa (CAT; EC 1.11.1.6) katalyzující přeměnu peroxidu vodíku na kyslík a vodu, askorbátperoxidasa (APOD; EC 1.11.1.11) katalyzující oxidaci askorbátu peroxidem vodíku na dehydroaskorbát a vodu, glutathionreduktasa (GR; EC 1.8.1.7) katalyzující reakci oxidovaného glutathionu a NADPH a další enzymy např. monodehydroaskorbátreduktasa (EC 1.6.5.4), dehydroaskorbátreduktasa (EC 1.8.5.1) a glutathionperoxidasa (EC 1.11.1.12) (Bartosz, 1997).

Na regulaci obranných reakcí rostliny se také podílí oxid dusnatý (NO). Posiluje účinky aktivních forem kyslíku, působí synergicky (Hammond-Kosack a Jones, 2000). Signální transdukcí dochází ke změnám v sekundárních metabolických drahách, v syntéze proteinů spojených s patogenezí (PR proteinů), hromadění kyseliny benzoové a kyseliny salicylové, produkci ethylenu a kyseliny jasmonové a k zesílení buněčných stěn (Hammond-Kosack a Jones, 2000). Další skupinou látek, které jsou syntetizovány v souvislosti s napadením rostliny patogenem jsou fytoalexiny, látky antimikrobiální povahy indukované většinou patogenními houbami. Avšak jako induktory produkce fytoalexinů byly zaznamenány i viry (Agrios, 1997c; Dixon, 2001).

PR proteiny se vyskytují jak uvnitř buňky, tak v mezibuněčných prostorech. Různé části rostliny (např. listy, semena, kořeny) mohou produkovat různé PR proteiny. Podle funkce, aminokyselinové sekvence, molekulové hmotnosti, sérologických a dalších vlastností bylo popsáno několik skupin PR proteinů. Nejznámější PR proteiny jsou (1→3) β-glukanasy

(PR-2), chitinasy (PR-3, 4, 8 a PR-11), defensiny (PR12), thioniny (PR13), inhibitory proteínas (PR-6) a peroxidasy (PR-9) (Agrios, 1997c; Hammond-Kosack a Jones, 2000; van Loon a van Strien, 1999). Produkce β -glukanas, chitinas, peroxidas a syntéza dalších PR proteinů představuje systémové odpovědi rostliny (Hammond-Kosack a Jones, 2000, van Loon a van Strien, 1999).

1.9.9.5 Rezistence u rostlin

Jestliže je určitý rostlinný druh imunní k určitému viru, jedná se o nehostitelskou rezistenci (Fraser, 1998). Teoreticky je tato rezistence vysvětlována tím (Bald a Tinsley, 1967), že viry mohou produkovat různé faktory patogenicity, které jsou nezbytné pro jejich multiplikaci a šíření. Zatímco rostliny produkují různé faktory susceptibility, které umožňují virům multiplikaci a šíření. Pouze při kompatibilitě mezi rostlinnými a virovými faktory může dojít k úspěšné patogenezí (Fraser, 1998). Jiný mechanismus navržený Holmesem uvažuje, že nehostitelská rostlina obsahuje značné množství inhibitorů jednotlivých kroků vzniku nových virových částic (Fraser, 1998).

K rezistenci kultivarů dochází, jestliže je druh, který je obecně susceptibilní vůči určitému viru, křížen s rezistentními příbuznými druhy (Fraser, 1998).

Mnoho patogenních hub, bakterií a virů může systémově aktivovat sadu genů mechanismem nazývaným systémová získaná rezistence (SAR). Aby u rostliny došlo k SAR, musí původní infekce vyvolat vytvoření nekrotické léze, buď jako součást hypersenzitivní reakce, nebo jako příznak choroby. Aktivace SAR vede ke značné redukci příznaků nemoci při další infekci mnoha různými druhy patogenu (Fraser, 1998; Hammond-Kosack a Jones, 2000).

Účinný způsob obrany rostlin proti virové infekci je „umlčení“ genové exprese pomocí specifických interakcí nukleotidových sekvencí, tzv. „post-transcriptional gene silencing“ (PTGS) (Waterhouse *et al.*, 2001; Savenkov *et al.*, 2002). Hlavní iniciační molekulou tohoto procesu je dvouřetězcová RNA (dsRNA), která může být do rostliny vpravena exogenně nebo může být produkována *in vivo* RNA dependentní RNA polymerasou kódovanou virem či hostitelem. Dvouřetězcová RNA je štěpena enzymem Dicer, který je podobný RNaseIII, na úseky o délce 21 až 24 párů bazí, označované jako siRNA (small interfering RNA). siRNA řídí činnost multipodjednotkové endonukleasy, která zajišťuje specifické štěpení RNA (Susi *et al.*, 2004).

Proti tomuto obrannému systému rostlin si viry během evoluce vytvořily supresorové proteiny, které jsou schopné potlačit RNA „silencing“, a tím umožnit replikaci viru a jeho systémové šíření. Příkladem supresoru je HC-protein, který je součástí genomu potyvírů

(Waterhouse *et al.*, 2001). Protein HC-pro podporuje replikaci genomu potyvirů, a tím zvyšuje hromadění viru (Hammond-Kosack a Jones, 2000).

Gen pro protein HC-pro vnesený do genomu hostitelské rostliny znamená jakýsi kompromis mezi rezistencí rostliny a zvýšenou vnímavostí rostliny vůči virové infekci (Savenkov *et al.*, 2002).

1.10 Abiotický stres rostlin způsobený suchem

Mezi nejčastější abiotické stresory, kterým musí rostliny čelit, patří sucho, extrémní teploty a zasolené půdy (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2007). Stres suchem může být vyvolán nejen nedostatkem vody způsobeným nedostatečnými či žádnými dešťovými srážkami v aridních oblastech, ale také v zasoleném prostředí či prostředí velmi nízkých teplot, která znemožňují kořenům přijímat vodu. Adaptaci rostlin vůči suchu ovlivňuje mnoho faktorů, mezi které patří délka a intenzita nedostatku vody a možnost aklimatizace vyvolaná předchozím vystavením rostliny suchu (Bray *et al.*, 2000).

Obsah vody v rostlině je charakterizován dvěma základními parametry: relativním obsahem vody (RWC relative water content) a vodním potenciálem (ψ_w), který je po zjednodušení definován jako součet osmotického a tlakového potenciálu tzv. turgoru. Osmotický potenciál je ovlivněn množstvím rozpuštěných částic v buňce. Vodní potenciál tak určuje pohyb vody z buňky, nebo do buňky, neboť voda se samovolně pohybuje z místa vyššího vodního potenciálu do přilehlého místa nižšího vodního potenciálu. Rostlina nemůže přijímat vodu kořeny dokud není vodní potenciál v kořenech nižší než v půdě, musí tedy vytvořit gradient vodního potenciálu takový, aby voda mohla být kořeny přijímána. Některé rostliny jsou na stres suchem velmi citlivé a rychle uvadají (ztrácejí turgor), jakmile v půdě dojde k poklesu vodního potenciálu. Existují však i takové rostliny, které mohou ztrátě turgoru odolávat tím, že dokáží regulovat svůj osmotický potenciál (tzv. osmotickým přizpůsobením) a tak kompenzovat klesající turgor. K osmotickému přizpůsobení dochází hromaděním osmoticky aktivních látek, především aminokyseliny prolinu, sacharidů (hlavně oligosacharidů rafinosové řady, sacharosy, trehalosy), cukerných alkoholů (např. manitolu, sorbitolu) a aminů (glycinbetainu a polyaminu) (Seki *et al.*, 2007; Bray *et al.*, 2000). Mezi klíčové signální molekuly podílející se na transdukci stresu suchem identifikované u *Arabidopsis thaliana* patří především transkripční faktory a proteinkinasy. Některé stresem indukované geny jsou regulovány kyselinou abscisovou, která se podílí na obranné odpovědi

rostliny vůči stresu suchem uzavíráním průduchů a indukcí genové exprese (Seki *et al.*, 2007; Bray *et al.*, 2000).

2. Cíl

Cílem této disertační práce byl komplexní pohled na enzym NADP-dependentní malátdehydrogenasu (dekarboxylační) (dále NADP-ME) z listů tabáku, jednak v souvislosti s její regulací, která nebyla u rostlinných nefotosyntetických NADP-ME studována, jednak v souvislosti s biotickými a abiotickými stresy, na kterých se může významně podílet. Studie byla také doplněna srovnáním vlivu infekce *Y virem bramboru* na NADP-ME v kontrolních rostlinách s rostlinami transgenními s vnesenými geny pro potyvirové proteiny, které by se mohly infekci ovlivnit.

1. Purifikace a charakterizace NADP-ME z listů *Nicotiana tabacum* L., cv Petit Havana SR1 (určení základních fyzikálních a kinetických parametrů, studium kofaktorové specifity a mechanismu reakce katalyzované NADP-ME).
2. Studium regulace NADP-ME různými metabolity, stanovení typu inhibice a příslušných inhibičních konstant
3. Sledování vlivu biotického stresu (*Y viru bramboru*) na NADP-ME na úrovni aktivity, exprese a transkripce.
4. Srovnání vlivu *Y viru bramboru* na NADP-ME v kontrolních a transgenních rostlinách s využitím rostlin *Nicotiana tabacum* L., s vneseným genem pro protein P3 z *A viru bramboru* a transgenních rostlin *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro protein HC-pro z *A viru bramboru*.
5. Sledování aktivity NADP-ME a dalších anaplerotických enzymů v rostlinách *N. tabacum* L. pěstovaných *in vitro*.
6. Studium stresu suchem v souvislosti s aktivitou NADP-ME u rostlin *N. tabacum* L.

3. Materiál a metody

Materiál

Rostlinný materiál

Rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 viz přílohy 1-4 a rostliny *Nicotiana benthamiana* viz příloha 5) byly laskavě poskytnuty Dr. N. Čeřovskou, Ústav experimentální botaniky AV ČR.

Transgenní rostliny *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR 1s vneseným genem pro protein P3 z PVA (*A viru bramboru*) viz příloha 4 byly laskavě poskytnuty Dr. Z. Šubrem, Virologický ústav, Slovenská akademie věd.

Transgenní rostliny *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro protein HC-pro (z angl. helper component protease) z PVA (*A viru bramboru*) viz příloha 5 byly laskavě poskytnuty Prof. E. Savenkovem, SLU (Swedish University of Agricultural Sciences), Uppsala, Švédsko.

Rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 pěstované *in vitro* v kultivačním médiu byly laskavě poskytnuty Dr. H. Synkovou, Ústav experimentální botaniky AV ČR.

Semena kukuřice *Zea mays* L. var. 2013 Čejč 2002 byla získána ze šlechtitelské stanice Cezea, ČR.

Rostliny *Nicotiana tabacum* L. cv. W 38 stresované suchem byly laskavě poskytnuty Dr. Vaňkovou, Ústav experimentální botaniky AV ČR.

Rostlinné viry:

Y virus bramboru, kmen PVY^{NTN} (izolát Lebanon) a PVY^O (izolát Kc 49) byly laskavě poskytnuty Dr. N. Čeřovskou, Ústav experimentální botaniky AV ČR.

Protilátky:

Králičí polyklonální protilátka třídy IgG připravená proti PVY^{NTN} a PVY^O-Ústav experimentální botaniky AV ČR

Protilátka třídy IgG připravená proti PVY^{NTN} značená alkalickou fosfatou-Ústav experimentální botaniky AV ČR

Myší protilátka IgG připravená proti králičí protilátce značená alkalickou fosfátasou – Sigma, USA

Králičí polyklonální protilátka třídy IgG připravená proti NADP-ME v naší laboratoři (příloha 3, str. 105), imunizace: Ústav sér a očkovacích látek, ČR

Metody

3. 1 Odběr vzorků z rostlinného materiálu

3.1.1. Pro izolace NADP-ME a studium regulace NADP-ME

viz příloha 1, str. 65 a příloha 2, str. 82.

*3.1.2. Pro sledování vlivu biotického stresu způsobeného PVY^{NTN} na NADP-ME v rostlinách *Nicotiana tabacum L.*, cv. *Petit Havana SR1**

viz příloha 3, str. 103-104. V pokusu bylo použito 40-60 kontrolních a 40-60 infikovaných rostlin.

*3.1.3. Pro sledování vlivu proteinu P3 na aktivitu NADP-ME a dalších anaplerotických enzymů v transgenních rostlinách *N. tabacum L.*, cv. *Petit Havana SR1* s vneseným genem pro protein P3*

viz příloha 4, kapitola Metody, str. 129. Bylo použito 50 rostlin ze všech skupin rostlin (kontrolní, transgenní, infikované kontrolní a infikované transgenní).

*3.1.4. Pro sledování aktivity a přítomnosti isoform NADP-ME v transgenních rostlinách *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro HC-pro vystavených biotickému stresu v podobě PVY^{NTN}*

viz příloha 5, str. 145. V pokusu bylo použito 50 rostlin ze všech skupin rostlin (kontrolní, transgenní, infikované kontrolní a infikované transgenní).

Jednotlivé pokusy byly prováděny nejméně třikrát.

3.1.5. Pro sledování vlivu nedostatku CO₂ na NADP-ME

Tyto vzorky listů mi byly laskavě poskytnuty Dr. Synkovou, Ústav experimentální botaniky AV ČR. Jednalo se o rostliny *N. tabacum L.*, cv. *Petit Havana SR1* pěstované *in vitro*, v uzavřených nádobách omezujících přístup CO₂ (obr. 10, str. 30), při vyšší vlhkosti

vzduchu a na živném médiu obsahujícím 2 % sacharosy (Murashige-Skoogův agar). Vzorke byly odebrány 3 týdny po pasážování z deseti rostlin. Jako kontroly byly použity stejně staré rostliny *N. tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 pěstované v půdě stejným způsobem jako v 3.1.2.



Obr. 10. Pěstování rostlin in vitro, za podmínek nedostatku CO₂.

3.1.6. Pro sledování vlivu sucha na NADP-ME

Rostlinný materiál (rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. W38) byl pěstován v boxech pro kultivaci rostlin při relativní vlhkosti vzduchu 80 % a při režimu 16 hodin při 25°C a umělém osvětlení 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 8 hodin při 23°C tma.

Rostliny byly přesazeny po 4 týdnech od výsevu. Osmitýdenní rostliny pak byly rozděleny do dvou skupin (kontrolní skupina 15-ti rostlin a skupina stresovaná suchem 15 rostlin). Skupině rostlin stresované suchem byla naposledy dodána voda v den označený jako nultý den pokusu. Rostliny stresované suchem byly zabaleny do parafilmu, aby nedocházelo k přijímání vzdušné vlhkosti, která byla snížena na 35 %. Kontrolním rostlinám byla dodávána voda pravidelně (každý den).

Vzorke byly odebírány 5. a 11. den sucha. Déle byly rostliny stresované suchem 11. den pokusu zality a 12. den také odebírány.

Listy byly odebírány jako směsné vzorky z několika intaktních rostlin, a to po jednotlivých patrech, podle umístění na rostlině: zvlášť vrcholové listy (LNV), první dospělé listy (LV) a nově vyvinuté listy během pokusu (LNVV). Směsné vzorky listů a kořenů byly okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při - 80°C.

3.2 Purifikace NADP-ME, příprava rostlinných extraktů

3.2.1. Purifikace enzymového preparátu NADP-ME z listů tabáku

Proces zahrnoval 3 chromatografické kroky viz příloha 1, str. 68 a příloha 2, str. 82.

3.2.2. Purifikace enzymového preparátu NADP-ME ze semen kukuřice pro imunizaci králíků

viz příloha 3, str. 105.

3.2.3. Příprava rostlinného extraktu

viz příloha 3, str. 104, příloha 4 str. 129-130 a příloha 5, str. 145.

3.3. Stanovení aktivity a rychlosti reakce katalyzované NADP-ME

3.3.1. Stanovení aktivity NADP-ME v rostlinném extraktu

viz příloha 3, str. 104, příloha 4, str. 130 a příloha 5, str. 145.

3.3.2. Stanovení základních kinetických parametrů NADP-ME

viz příloha 1, str. 65-66.

3.3.3. Stanovení pH optima NADP-ME

viz příloha 1, str. 66.

3.3.4. Stanovení kinetického mechanismu reakce katalyzované NADP-ME

viz příloha 2, str. 82-83.

3.3.5. Studium vlivu různých látek na aktivitu NADP-ME

viz příloha 2, str. 83-84.

3.3.6. Inhibiční studie NADP-ME

viz příloha 2, str. 84-85.

3.4. Stanovení aktivity PEPC a PPDK

Stanovení aktivity fosfoenolpyruvátcarboxylasy (PEPC) a pyruvát, fosfátdikinasy (PPDK) viz příloha 4, str. 130.

3.5. Elektroforetické metody

3.5.1. Elektroforetická separace v prostředí SDS

Elektroforéza v prostředí SDS byla provedena metodou podle Laemmliho (1970) viz příloha 1, str. 66. Enzymové preparáty s nízkým obsahem proteinů byly nejdříve sráženy 12 hodin při -20°C s trojnásobným množstvím 96 % ethanolu, poté centrifugovány 15 minut při 4°C při 15 000 RPM (16 600 x g) a sediment resuspendován v 20 μl destilované vody a 20 μl vzorkového pufru. Byly použity i standardní proteiny o relativní molekulové hmotnosti 97 400; 67 000; 45 000; 29 000. Dělení probíhalo při počátečním stejnosměrném napětí 70 V a v okamžiku dosažení hranice separačního gelu při 150 V. Po skončení elektroforézy byly gely inkubovány ve fixační detekční směsi, která obsahovala 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250; 425 ml ethanolu; 100 ml kyseliny octové; 50 ml methanolu a 425 ml redestilované vody. Následné odbarvení probíhalo v několika lázních odbarvovacího roztoku, který obsahoval ethanol, kyselinu octovou a destilovanou vodu v poměru 25 : 10 : 65.

3.5.2. Nativní elektroforéza a detekce NADP-ME

Nativní elektroforéza byla provedena obdobně jako v případě elektroforézy v prostředí SDS, avšak SDS bylo nahrazeno glycerolem (Lee a Lee, 2000). Byly použity 10 % a 6 % separační a 5 %, respektive 3 % zaostřovací polyakrylamidové gely (viz příloha 1, 3 a 5, str. 66, 105 a str. 146). Dělení probíhalo při počátečním napětí 70 V, po dosažení hranice separačního gelu při 150 V.

3.5.3. Stanovení relativní molekulové hmotnosti NADP-ME podle Fergusonova

viz příloha 5, str. 146.

3.6. Imunochemické metody

3.6.1. DAS-ELISA

Relativní obsah viru (PVY^{NTN}, PVY^O) byl v extraktech infikovaných listů sledován metodou DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Clarks a Adams, 1997) pomocí králíčích polyklonálních protilátek zaměřených vůči kapsidovému proteinu Y viru bramboru (Čeřovská, 1998). V případě přítomnosti antigenu (kapsidového proteinu viru bramboru) ve vzorku dochází k navázání těchto protilátek a po

přidání sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatásoou je umožněna vizualizace pomocí substrátu p-nitrofenylfosfátu, poskytujícího enzymatickou reakcí žlutý p-nitrofenol. Množství viru je úměrné absorbanci při 405 nm.

3.6.2. Příprava králičích protilátek proti NADP-ME

viz příloha 3, str. 105.

3.6.3. Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu

viz příloha 3, str. 106.

3.6.4. Imunochemická detekce NADP-ME na nitrocelulosové membráně

viz příloha 3, str. 106.

3.7. Stanovení množství bílkovin

Množství bílkovin bylo stanoveno metodou podle Bradfordové (1976). Jako standard byl použit hovězí sérový albumin BSA o koncentraci 0,25-1,4 mg/ml.

3.8. Další metody

Mezi další metody, které doplnily tuto disertační práci, avšak které jsem sama neprováděla patří *in vivo* lokalizace NADP-ME v histologických řezech, kvantifikace mRNA NADP-ME metodou polymerasové řetězové reakce v reálném čase (dále jen Real time-PCR) a stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů: katalasy (CAT), glutathionreduktasy (GR) a askorbátperoxidasy (APOD), detekce aktivity superoxiddismutasy (SOD) v gelu po nativní elektroforéze a isoelektrická fokusace.

3.8.1. In vivo lokalizace NADP-ME v histologických řezech

viz příloha 1, str. 65 a příloha 5, str. 146.

3.8.2. Kvantifikace mRNA NADP-ME metodou „Real time“ PCR

viz příloha 3, str. 106-107.

3.8.3. Stanovení aktivity vybraných antioxidantních enzymů (CAT, GR a APOD) a detekce aktivity SOD po nativní elektroforéze

viz příloha 4, str. 130-131.

3.8.4. Isoelektrická fokusace NADP-ME

viz příloha 1, str. 66. Detekce aktivity NADP-ME stejně jako 3.5.2.

4. Výsledky a diskuze

V minulosti byla detailně charakterizována fotosyntetická isoforma NADP-ME z listů C₄ a CAM rostlin, jejíž vlastnosti a funkce byly objasněny. Avšak o nefotosyntetické isoformě NADP-ME z rostlin je v tomto směru k dispozici informací méně (Casati, 2000). A byla-li tato isoforma studována, tak z nefotosyntetických tkání (kořenů, stonků, semen) (Casati *et al.*, 1997; Colombo *et al.*, 1997, Maurino *et al.*, 2001), případně byl hlavní důraz kladen na studium genů tohoto enzymu (Chi *et al.*, 2004; Gerrard Wheeler *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007). Další oblastí zájmu je souvislost nefotosyntetických isoform NADP-ME se stresem rostlin (Levitt, 1980; Schaaf *et al.*, 1995; Synková a Valcke, 2001; Maurino *et al.*, 2001; Ryšlavá *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003; Crecelius *et al.*, 2003; Chi *et al.*, 2004; Synková *et al.*, 2004; Smeets *et al.*, 2005; Saher *et al.*, 2005; Valderrama *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007, příloha 3 a 4).

V naší laboratoři byla pro studium kinetických parametrů, kofaktorové specifity a regulace různými metabolity izolována nefotosyntetická NADP-ME z listů modelové C₃ rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1). Ve stejných rostlinách byla také sledována mRNA, exprese proteinu a aktivita NADP-ME v rostlinách infikovaných *Y virem bramboru*. Projekt byl dále doplněn o transgenní rostliny *N. tabacum* cv. Petit Havana, SR1 s vneseným genem pro potyvirový protein P3, jehož funkce je neznámá a o transgenní rostliny *Nicotiana benthamiana* s vneseným multifunkčním potyvirovým proteinem HC-pro. Také abiotickému stresu byla věnována pozornost, a sice byl zkoumán vliv nedostatku CO₂ a sucha na aktivitu NADP-ME v listech tabáku.

4.1. Purifikace a charakterizace NADP-ME z listů *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana, SR1

4.1.1 Purifikace

Z listů tabáku odebraných ve vegetativním stadiu byl třemi chromatografickými kroky zahrnujícími ionexovou chromatografii na DEAE-celulose, následovanou gelovou a afinitní chromatografií purifikována NADP-ME o výsledné specifické aktivitě 0,95 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Nejúčinnějším purifikačním krokem byla afinitní chromatografie na sloupci 2',5'-ADP-

Sepharosy 4B, která NADP-ME v přítomnosti L-malátu a Mg^{2+} iontů specificky váže. Eluce je pak možná pufrem bez přidavku substrátu a kofaktoru (Skorkowski a Storey, 1987). Enzym se při všech chromatografiích eluoval jako symetrický vrchol. Souhrn jednotlivých purifikačních kroků znázorňuje tabulka I v příloze 1, str. 68. Purifikací byl získán téměř homogenní enzym (příloha 1, obr. 2, str. 69).

Aktivita NADP-ME v C_3 rostlinách (v tabáku), a tedy i výsledná aktivita po purifikaci je mnohonásobně nižší než aktivita fotosyntetického enzymu NADP-ME izolovaného z listů kukuřice ($30,9 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$), avšak je srovnatelná se specifickou aktivitou NADP-ME izolovaného z etiolovaných listů kukuřice ($1,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$), z kořenů kukuřice ($1,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) nebo z pšenice ($0,98 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) (Drincovich *et al.*, 2001; Maurino *et al.*, 1996; Casati *et al.*, 1997).

4.1.2 Základní kinetické parametry a specifita vůči kofaktorům

NADP-ME je enzym vyžadující přítomnost kofaktoru (dvojmocného kofaktoru kovu). V literatuře se jako kofaktory nejčastěji uvádějí Mg^{2+} a Mn^{2+} , případně Co^{2+} ionty. Pro rostlinný NADP-ME spíše ionty Mg^{2+} , pro živočišný enzym Mn^{2+} (Chang a Tong, 2003; Maurino *et al.*, 2001). V naší studii byly kromě těchto iontů jako kofaktory studovány ještě ionty Ni^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} a Zn^{2+} . Vhodnými kofaktory NADP-ME z listů tabáku byly ionty Mg^{2+} (100 % aktivity), Mn^{2+} (140 % aktivity oproti Mg^{2+}), Co^{2+} (59 %), Ni^{2+} (54 %) a Zn^{2+} ionty (pouze 20 % aktivity oproti Mg^{2+}). Na tom, které ionty budou mít schopnost se vázat na enzym NADP-ME má pravděpodobně vliv velikost iontu, neboť nevyhovující ionty (Ca^{2+} a Cu^{2+}) nespádají do rozmezí velikosti účinných kofaktorů (72-80 pm), ale jsou větší.

V přítomnosti Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} a Ni^{2+} iontů byly stanoveny Michaelisovy konstanty NADP-ME pro substrát L-malát a koenzym $NADP^+$ (příloha 1, obr. 5 a tabulka III, str. 72-73). Michaelisovy konstanty NADP-ME pro L-malát se v závislosti na přítomném kofaktoru měnily. Nejnižší K_m byla nalezena v přítomnosti Co^{2+} iontů, poté s Mn^{2+} ionty, které měly K_m NADP-ME pro L-malát nižší než v přítomnosti s ionty Mg^{2+} . Na druhou stranu Michaelisovy konstanty NADP-ME pro $NADP^+$ nebyly přítomností různých kofaktorů ovlivněny (příloha 1, tabulka III, str. 73). Vzhledem k tomu, že dvojmocné kationty kovů tvoří s L-malátem a $NADP^+$ komplexy a jako substráty slouží pouze sloučeniny volné (Maurino *et al.*, 2001, Grover *et al.*, 1981), byla provedena korekce na chelataci Me^{2+} -L-malát (příloha 1, tabulka IV, str. 73), pro kterou byly na rozdíl od Me^{2+} - $NADP^+$ příslušné asociačních konstanty pro všechny studované ionty dostupné (Martel *et al.*, 2003).

Oproti NADP-ME z C_4 rostlin, nebyla u NADP-ME z listů tabáku zjištěna inhibice nadbytkem substrátu (L-malátu) (příloha 1, obr. 5A, str. 72, Drincovich *et al.*, 2001). Získaná Michaelisova konstanta NADP-ME pro L-malát a nepřítomnost inhibice L-malátem je ve shodě s rekombinantním cytosolovým proteinem z tabáku Nt-NADP-ME2.

U rekombinantního chloroplastového proteinu Nt-NADP-ME1 naopak k inhibici nadbytkem substrátu dochází, přestože se nejedná o fotosyntetickou isoformu NADP-ME (Müller *et al.*, 2008).

Zajímavá byla závislost reakční rychlosti NADP-ME z listů tabáku na koncentraci kofaktorů (dvojmocných kationtů kovů: Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} a Ni^{2+}). Žádná totiž nevykazovala klasickou hyperbolickou závislost, v dvojité reciprokém vynesení lineární, jak tomu bylo v případě závislosti reakční rychlosti na koncentraci L-malátu či $NADP^+$ (příloha 1, obr. 4, str. 71 a tabulka II, str. 70). V případě Mg^{2+} experimentální data nejvíce vyhovovala rovnici popisující 2 vazná místa. To znamená, že na jedné podjednotce enzymu je více než jedno vazné místo pro Mg^{2+} ionty (pravděpodobně dvě), s různou afinitou vůči Mg^{2+} iontům. Stejně tomu tak je i v případě NADP-ME z C_4 rostlin kukuřice a cukrové třtiny (Drincovich *et al.*, 2001; Iglesias a Andreo, 1990). Závislost rychlosti reakce na koncentraci ostatních iontů vykazovala sigmoidální kinetiku. Největší pozitivní kooperativita byla zjištěna pro Mn^{2+} ; hodnota Hillova koeficientu 7,5 znamená nejméně 8 vazných míst pro Mn^{2+} ionty. Vzhledem k tetramernímu uspořádání NADP-ME z listů tabáku (viz 4.1.4) by se opět jednalo o dvě vazná místa na podjednotku. Konstanta $S_{0,5}$, vyjadřující koncentraci substrátu při poloviční reakční rychlosti v závislosti, která není podle Michaelise a Mentenové, byla pro Mn^{2+} nejnižší, což vyjadřuje vyšší afinitu NADP-ME z listů tabáku k Mn^{2+} iontům než k iontům Co^{2+} a Ni^{2+} . Pro Co^{2+} a Ni^{2+} byla pozitivní kooperativita mnohem nižší, hodnota Hillova koeficientu byla pouze 3 a 1,3 (příloha 1, obr. 4, str. 71 a tabulka II, str. 70).

Výsledky detailních kinetických studií týkajících se vlivu iontů kovů na NADP-ME z jiných zdrojů nejsou dostupné.

4.1.3 Mechanismus reakce katalyzované NADP-ME

Přestože se na reakci katalyzované NADP-ME podílejí 3 substráty (L-malát, $NADP^+$ a Mg^{2+}), je tato reakce v literatuře posuzována jako dvousubstrátová, vzhledem k tomu, že Mg^{2+} ionty nejsou enzymovou reakcí přeměňovány (Hsu *et al.*, 1967; Chang *et al.*, 1992; Teller *et al.*, 1992; Aktas a Cook, 2008). Kinetika reakce katalyzované NADP-ME z listů tabáku byla studována metodou počátečních rychlostí. Vždy při jedné fixní koncentraci Mg^{2+} iontů byla sledována reakční rychlost pěti různých koncentrací prvního substrátu ($NADP^+$) spolu s pěti

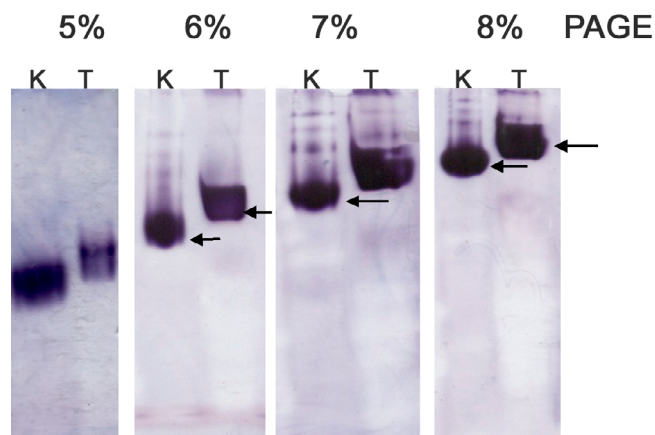
různými koncentracemi druhého substrátu (L-malátu). Koncentrace substrátů byly redukovány o koncentrace substrátů vázaných v komplexech Mg^{2+} -L-malát, Mg^{2+} -NADP⁺ (Grover *et al.*, 1981). Následným vyhodnocením experimentálních dat nelineární regresi s využitím rovnic popisujících oba základní mechanismy (následný a ping pong) (Marangoni, 2003), byl pro NADP-ME z listů tabáku mechanismus ping pong vyloučen a specifikován jako následný (sekvenční) viz příloha 2, obr. 1, str. 97.

Dalším diagnostickým výnosem závislosti zdánlivých konstant K' a V'_{lim} (viz příloha 2, metody str. 82-83 obr. 1 str. 97) na koncentraci NADP⁺ či L-malátu byl sekvenční mechanismus specifikován na uspořádaný, což se shoduje s cytosolovou isoformou NADP-ME (EC 1.1.1.40) z jater holuba (Hsu *et al.*, 1967), a s cytosolovou isoformou z nádorových linií epiteliálních buněk prsu (Chang *et al.*, 1992) a stejně jako s NAD(P)-ME (EC 1.1.1.39) z nádorových jaterních buněk (Teller *et al.*, 1992). Ze zjištěného mechanismu vyplývá, že u rostlinného NADP-ME z listů tabáku záleží na pořadí vazby substrátů (NADP⁺ a L-malátu) na enzym. Naopak u mitochondriálního NAD(P)-ME (EC 1.1.1.39) enzymu z *Ascaris suum* byl mechanismus diagnostikován následný, ale neuspořádaný (náhodný) (Aktas a Cook, 2008).

4.1.4 Základní fyzikální vlastnosti enzymu NADP-ME

Purifikovaný enzymový preparát NADP-ME byl analyzován SDS-elektroforetickou separací v denaturujících podmínkách, která ukázala přítomnost proužku s relativní molekulovou hmotností přibližně 67 000 a dalšího minoritního proužku s nižší molekulovou hmotností pravděpodobně odpovídající kontaminujícímu proteinu. Nativní elektroforézou a isoelektrickou fokusací byl detekcí aktivity NADP-ME nalezen pouze 1 proužek.

Oligomerizační uspořádání enzymu NADP-ME bylo zjištěno nativní elektroforézou s využitím Fergusonovy metody (Ferguson, 1964; Lottspeich a Zorbas, 1998) viz příloha 5, obr. 3, str. 147, tabulka 2, str. 148 a obr. 5 str. 149, podle kterého NADP-ME z listů *N. tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 odpovídá tetrameru o relativní molekulové hmotnosti přibližně 264 000 (obr. 11, str. 39).



Obr. 11. Specifická detekce aktivity NADP-ME z listů tabáku (T) a listů kukuřice (K) po nativní elektroforéze v 5-8 % polyakrylamidovém gelu, následně vyhodnocené Fergusonovou metodou. Podle kalibračního grafu (příloha 5, str. 149) relativní molekulová hmotnost NADP-ME z tabáku je přibližně 264 000. Pro srovnání byla analyzována i fotosyntetická isoforma NADP-ME z kukuřice, která také odpovídá tetrameru, avšak s nižší relativní molekulovou hmotností 248 000 (Detarsio *et al.*, 2007). Rostlinný extrakt z kukuřice je 7x zředěný oproti tabáku).

Tetramerní uspořádání NADP-ME bylo nalezeno také v listech kukuřice (Detarsio *et al.*, 2007; obr. 11). Na oligomerizaci však má vliv i hodnota pH; NADP-ME z listů kukuřice a stonků pšenice byl při pH nad 8 ve formě tetrameru, zatímco snižováním pH se rovnováha posouvá k dimerům a monomerům, a při pH nižším než 6 se dokonce většina molekul vyskytuje jako monomer. Podobně také oligomerizace závisí na teplotě; snižováním teploty od 42°C k nule převažuje disociace na dimery a monomery (Spampinato *et al.*, 1998). V listech cukrové třtiny byl NADP-ME nalezen při pH 8 převážně ve formě tetrameru a mnohem vyšší aktivité, než při pH 7, kdy převládalo uspořádání dimerní (Iglesias a Andreo, 1990). Vyšší oligomerizační stavy oktamer, hexamer a tetramer NADP-ME byly popsány u *Arabidopsis thaliana* (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005).

Metodou isoelektrické fokusace a pomocí standardních proteinů byl zjištěn isoelektrický bod (pI) této isoformy (pI = 5,5) viz příloha 1, obr. 2, str. 69. Nalezený isoelektrický bod se shoduje s pI nefotosyntetické isoformy NADP-ME přítomné v etiolovaných listech a v kořenech kukuřice, zatímco fotosyntetická isoforma má pI vyšší (6,2) (Maurino *et al.*, 2001). pH optimum NADP-ME z listů tabáku odpovídalo hodnotě 7,1 - 7,4 (příloha 1, obr. 3, str. 70), což se shoduje s nefotosyntetickými isoformami NADP-ME např. z hlíz brambor (pH optimum 7,4), či z plodů jablka (7,2), manga (7,2), grepu (7,2), rajčete (7,0), anebo z pšenice (pH optimum 7,3). pH optimum fotosyntetické isoformy z kukuřice je vyšší (8,0) (Edwards a Andreo, 1992).

4.1.5 Lokalizace NADP-ME v listech *N. tabacum L. cv. Petit Havana SR1*

V rostlinách tabáku je NADP-ME podobně jako v rostlinách se známým genomem (*Arabidopsis thaliana* (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005) a *Oryza sativa* L. (Chi *et al.*, 2004)) kódován malou genovou rodinou. Detekcí aktivity NADP-ME v histologických řezech byla zjištěna přítomnost tohoto enzymu v chloroplastech (příloha 1, obr. 1, str. 67). Avšak měřením aktivity NADP-ME v separovaných chloroplastech a v rozpustné cytosolové frakci bylo zjištěno přibližně desetinásobně vyšší aktivita v cytosolu než v chloroplastech (Potůčková, 2008). Při purifikaci NADP-ME (příloha 1 a 2) byla přítomna jedna isoforma, a tedy pravděpodobně cytosolová. V letošním roce byla publikována sekvence chloroplastové isoformy (GenBank č. DQ923119), cytosolové (GenBank č. DQ923118) a sekvence předpokládané isoformy NADP-ME (GenBank č. EH663836) z *Nicotiana tabacum* L. V naší laboratoři byla provedena izolace RNA z listů tabáku, reverzní transkripce a polymerasová řetězová reakce v reálném čase pomocí primerů navržených na základě sekvencí pro chloroplastovou a cytosolovou isoformu NADP-ME. Také tento pokus ukázal vyšší množství mRNA cytosolové než chloroplastové isoformy NADP-ME (příloha 3., obr. 6, str.124) Tento výsledek je ve shodě s údaji uvedenými Müllerem *et al.* (2008). Získané výsledky se vztahují k listům ve vegetativním stádiu vývoje, v jiných částech rostliny bude je situace pravděpodobně jiná.

Také podobnost vlastností NADP-ME purifikované v naší laboratoři s vlastnostmi rekombinantní cytosolové Nt-NADP-ME2 potvrzuje, že se jedná o isoformu cytosolovou. Těmito vlastnostmi jsou především relativní molekulová hmotnost, Michaelisova konstanta pro L-malát a absence inhibice nadbytkem substrátu (Müller *et al.*, 2008).

4.2. Regulace NADP-ME z listů *N. tabacum* L. buněčnými metabolity

4.2.1 Vliv buněčných metabolitů na aktivitu NADP-ME

Vzhledem k tomu, že NADP-ME je enzym, který může ovlivňovat jak anabolické procesy (např. poskytováním NADPH pro biosyntézu lipidů), tak procesy katabolické (tvorba energie ve formě ATP přeměnou produktu NADP-ME pyruvátu pyruvátdehydrogenasou) byly jako potenciální modulátory testovány látky pěti metabolických skupin (intermediáty citrátového cyklu, látky spojené s lipogenezí, metabolity glykolýzy, některé aminokyseliny a energeticky bohaté látky (příloha 2, tabulka 2, str. 96). Vliv různých látek na aktivitu NADP-ME byl studován nejen v saturačních, ale i subsaturačních koncentracích obou substrátů (NADP⁺ a L-malátu), aby bylo možné odhalit kompetici mezi substrátem a inhibitorem.

Inhibice NADP-ME energeticky bohatými látkami (silná inhibice GTP, ATP, slabší ADP) a velmi slabá inhibice intermediáty glykolýzy naznačuje, že funkce rostlinného NADP-ME má pravděpodobně souvislost s energetickou bilancí rostliny. Ostatní látky neměly významnější vliv na aktivitu NADP-ME. Rekombinantní cytosolová isoforma Nt-NADP-ME2 z tabáku byla inhibována fumarátem, oxaloacetátem, pyruvátem, glukosa-6-fosfátem, ATP a naopak aktivována koenzymem A (Müller *et al.*, 2008). Stejně tak u chloroplastové tabákové Nt-NADP-ME1 byly inhibitory oxaloacetát, pyruvát, glukosa-6-fosfát, ATP, koenzym A a také acetylkoenzym A. Na rozdíl od výrazné aktivace Nt-NADP-ME1 aspartátem, na Nt-NADP-ME2 neměl aspartát žádný vliv, stejně jako vyplývá z našich výsledků (Příloha 2, tabulka 2, str.96; Müller *et al.*, 2008). Také u rekombinantních isoform NADP-ME z *Arabidopsis thaliana*, které jsou 4, byly zjištěny některé změny aktivity vlivem různých metabolitů. Jako nejvíce regulovaný isoenzym byl u *Arabidopsis thaliana* vyhodnocen cytosolový AtNADP-ME2, který byl aktivován aspartátem, fumarátem, sukcinátem a koenzymem A a inhibován ATP, oxaloacetátem a glukosa-6-fosfátem (Gerrard Wheeler *et al.*, 2008). Některé rozdíly od našich výsledků mohou být způsobeny pozměněným trojrozměrným uspořádáním rekombinantních proteinů, jejichž vlastnosti se pak mohou značně lišit od nativní molekuly.

V jiné práci, ve které byl NADP-ME izolován z čerstvého materiálu, byla v klíčící rostlině *Ricinus communis* zjištěna aktivace nefotosyntetické NADP-ME sukcinátem, koenzymem A, acetylkoenzymem A a palmitoylkoenzymem A pravděpodobně související se syntézou mastných kyselin ve vyvíjející se rostlině (Colombo *et al.*, 1997).

4.2.2 Inhibice NADP-ME makroergickými látkami (GTP, ATP a ADP)

Pro GTP, ATP a ADP byly provedeny detailní inhibiční studie vzhledem k oběma substrátům (L-malátu a NADP⁺) a v přítomnosti jak Mg²⁺, tak Mn²⁺ iontů (příloha 2, tabulka 1, str. 95, obr. 2-4, str. 98-100). Na základě několika různých diagnostických výnosů (dvojitého reciprokého vnesení, Dixonova vnesení, Hanes-Woolfova vnesení, Woolf-Augustinsson-Hoffstee vnesení) (Kotyk a Horák, 1977) bylo zjištěno, že stejně jako v případě živočišné mitochondriální NAD-ME je inhibítoem pouze volný GTP (ATP, ADP) (Hsu *et al.*, 2004) a že je třeba celkovou koncentraci GTP (ATP, ADP) redukovat o množství látky vázané v komplexech s dvojmocnými kationty kovů, pomocí příslušných asociačních konstant (Sigel *et al.*, 2004, Sigel *et al.*, 2001, Bianchi *et al.*, 2003). Inhibice všemi zkoumanými látkami (GTP, ATP, ADP) byla v přítomnosti Mg²⁺ i Mn²⁺ iontů vůči NADP⁺ nekompetitivní, což znamená vazbu inhibitoru do jiného místo než se váže NADP⁺. V případě

inhibice vůči L-malátu byla pro ATP a GTP v přítomnosti Mg^{2+} i Mn^{2+} iontů zjištěna inhibice smíšená. Slabší inhibitor ADP byl vůči L-malátu v přítomnosti Mg^{2+} iontů kompetitivním inhibitorem, v přítomnosti Mn^{2+} iontů inhibitorem smíšeným. V přítomnosti Mg^{2+} byly převážně zjištěny vyšší inhibiční konstanty inhibitorů ATP, GTP a ADP. To ukazuje na silnější inhibici v přítomnosti Mn^{2+} iontů než iontů Mg^{2+} .

Inhibice živočišné NAD-ME je založena na jiném principu, přestože inhibitorem je také ATP, typ inhibice je vůči $NADP^+$ i L-malátu kompetitivní. Strukturní studie ukázaly, že ATP se váže přímo v aktivním centru. CTP a TTP nebyly inhibitory NAD-ME, tudíž pro vazbu jsou zřejmě nutné purinové nukleotidy (Hsu *et al.*, 2004). ATP se však může vázat i v tzv. exo místě na povrchu enzymu, kde má vliv na udržování kvarterní struktury.

4.3 Vliv biotického stresu na aktivitu, expresi a transkripci NADP-ME z listů *N. tabacum* L.

Biotický stres v rostlině podstatně ovlivňuje fyziologické funkce (zejména fotosyntézu, respiraci, transpiraci, transport živin a asimilátů, příjem živin kořeny a reprodukci) (Agrios, 1997b), čímž působí na metabolismus rostliny, na jednotlivé biochemické reakce. Kromě specifických obranných reakcí (mezi které patří aktivace obranných genů, produkce aktivních forem kyslíku, NO, kyseliny jasmonové a salicylové, produkce specifických proteinů a fytoalexinů a další) v rostlině dochází také ke změně průtoku metabolitů primárními a sekundárními metabolickými drahami, což souvisí se změnou aktivity příslušných enzymů. V této práci byla NADP-ME studována v souvislosti s biotickým stresem působeným dvěma kmeny *Y viru bramboru*: PVY^O (běžný kmen, z angl. ordinary způsobující mírné příznaky projevující se chlorosami) a PVY^{NTN} (izolát nekrotického kmene N způsobující nekrotické změny na hlízách některých odrůd brambor, z angl. tuber necrosis). V experimentech byla použita indikátorová rostlina *N. tabacum* L.cv. Petit Havana, SR1.

4.3.1 Průběh virové infekce (*Y virem bramboru*, kmenem NTN a O: PVY^{NTN} a PVY^O) v rostlinách *N. tabacum* L.

Studium biotického stresu je komplikovanější než studium abiotického stresu vzhledem k obtížnosti kvantifikace příslušného stresoru. Množství viru lze v listech systémově infikovaných rostlin bylo zjištěno imunochemicky pomocí metody DAS-ELISA založené na interakci virového proteinu, především kapsidového s příslušnou protilátkou

(příloha 3, obr. 1, str. 119). Pro virus způsobující závažnější příznaky (PVY^{NTN}) bylo zjištěno vyšší relativní množství viru než pro PVY^O, jedná se však o metodu semikvantitativní, která neumožňuje přesně porovnávat jednotlivé experimenty podle „rozsahu“ infekce. Maximální obsah viru byl v obou případech (PVY^O i PVY^{NTN}) zjištěn 10. – 17. den po inokulaci, kdy byl pokus ukončen (příloha 3, obr. 1, str. 119).

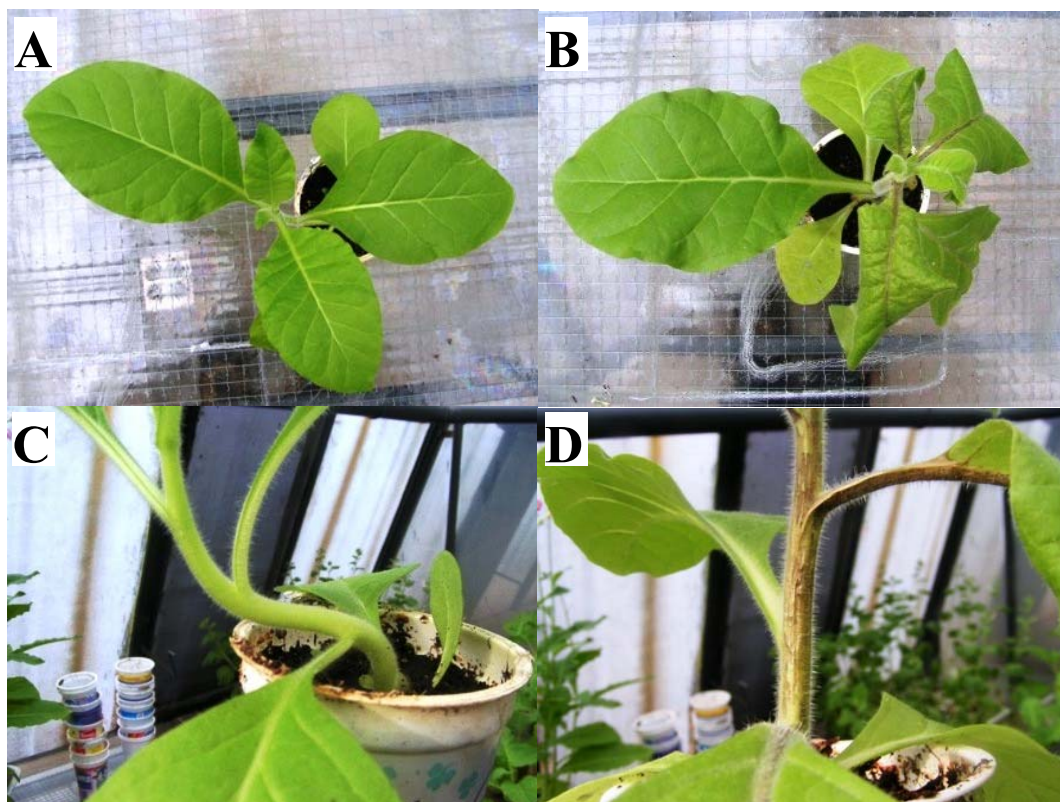
4.3.2 Vliv infekce PVY na aktivitu NADP-ME

Aktivita NADP-ME v horních plně vyvinutých systémově infikovaných listech *N. tabacum* L. byla vlivem PVY^O 12. den infekce zvýšená oproti zdravým neinfikovaným rostlinám (příloha 3, obr. 2, str. 120) méně než v případě viru PVY^{NTN}, u kterého bylo toto zvýšení v prvním biologickém pokusu 17. den infekce až 6-ti násobné (příloha 4, obr. 5, str. 136), v druhém nezávislém pokusu 10. den až 4-násobné (příloha 3, obr. 2, str. 120). V průběhu infekce bylo zvýšení aktivity NADP-ME v listech úměrné množství viru.

Dále byla aktivita NADP-ME sledována ve stoncích a kořenech. Aktivita ve stoncích byla v maximu příznaků infekce (11. den u PVY^O a 13. den u PVY^{NTN}) vlivem mírnějšího viru PVY^O zvýšena 1,5-násobně, zatímco vlivem PVY^{NTN} způsobujícího závažné nekrosy na povrchu listů a stonků 2,1-násobně vyšší vůči zdravým stonkům. Obdobný výsledek byl zjištěn v kořenech, virus PVY^O vyvolal 1,4-násobný a virus PVY^{NTN} 2,4-násobný nárůst aktivity NADP-ME oproti kontrolním kořenům zdravých rostlin (příloha 3, obr. 3, str. 121).

Vedle měření aktivity NADP-ME ve směsných vzorcích byla aktivita ve všech částech *N. tabacum* L. sledována také specifickou detekcí po nativní elektroforetické separaci (příloha 3, obr. 4, str. 122). Ve všech částech rostlin byl nalezen jeden proužek ukazující na přítomnost jedné isoformy.

Z literatury je známé zvýšení aktivity NADP-ME především působením abiotických stresorů: v rostlině fazole po působení kadmia (Smeets *et al.*, 2005), v hyperhydrických výhoncích hvozdíku zahradního po 14 a 28 dnech kultivace *in vitro* (Saher *et al.*, 2005), v listech vodní rostliny *Egeria densa* po přenosu z podmínek nízké teploty a světla do podmínek vysoké teploty a světla (Casati *et al.*, 2000), v ozimém žitě (*Secale cereale* L.) po vystavení chladu (Crecelius *et al.*, 2003), v listech olivovníků vystavených solnému stresu (Valderrama *et al.*, 2006) podobně jako solný stres v listech rostliny *Aloe vera* L. (Sun *et al.*, 2003), solný a osmotický stres v listech a kořenech semenáčků rýže (Chi *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). V kořenech kukuřice byla zvýšená aktivita NADP-ME nalezena po působení celulasy, jasmonátu a houbového elicitoru (Maurino *et al.*, 2001).



Obr. 12. Nekrotické příznaky infekce PVY^{NTN} na listech (B) a stonku (D) oproti kontrolním rostlinám (A, C).

4.3.3 Vliv infekce PVY^{NTN} na expresi proteinu NADP-ME

Významně zvýšená aktivita NADP-ME vlivem PVY^{NTN} v listech iniciovala otázku, zda tomuto nárůstu odpovídá syntéza NADP-ME *de novo*, tedy zvýšená transkripce a translace proteinu NADP-ME. Detekce množství proteinu byla provedena metodou Western blot s využitím specifických králičích protilátek připravených proti antigenu NADP-ME izolovaného ze semen kukuřice (viz příloha 3, obr. 5, str. 123) Semena kukuřice jako zdroj antigenu namísto listů tabáku byla zvolena z důvodu nepřítomnosti kontaminujícího enzymu Rubisco, který má v listech majoritní zastoupení.

Závislost množství NADP-ME (purifikovaného z listů tabáku viz příloha 1, str. 65) stanovené imunochemickou detekcí specifickou protilátkou na nitrocelulosové membráně na intenzitě proužku byla lineární (příloha 3, obr. 5A, str. 123). Bylo provedeno porovnání množství proteinu NADP-ME v extraktech ze zdravých a infikovaných rostlin tabáku. Intenzivnější proužky byly detekovány ve vzorcích z infikovaných rostlin odebraných 6., 10. a 14. den infekce PVY^{NTN}. Densitometrickým vyhodnocením programem Elfoman 2.0 pak byl v tyto dny zjištěn přibližně 2-násobný nárůst proteinu NADP-ME v PVY^{NTN} infikovaných listech (příloha 3, obr. 5B, str. 123).

4.3.4 Vliv infekce PVY^{NTN} na mRNA NADP-ME

Vliv infekce na transkripční úrovni byl studován Ing. Karlem Müllerem pomocí izolace mRNA, následné reverzní transkripce a metody „real time“-PCR. Jako standardní gen byl použit *Aktin 9*, jehož transkripce není ovlivňována virovou infekcí (Rizhsky *et al.*, 2002).

Pomocí této metody byla v listech kvantifikována mRNA pro cytosolovou a chloroplastovou isoformu proteinu NADP-ME v průběhu infekce PVY^{NTN}. Zatímco během infekce došlo k významnému zvýšení cytosolové mRNA (17. den až k trojnásobnému oproti kontrolám ze zdravých listů), chloroplastová mRNA zůstala infekcí neovlivněna (příloha 3, obr. 6, str. 124). Produkty „real time“-PCR byly s využitím primerů pro cytosolovou a chloroplastovou mRNA sekvenovány. PCR produkty vykazaly 100 % homologii se sekvencemi databáze GenBank DQ923119 a DQ923118, odpovídající rekombinantním proteinům *N. tabacum* L. Nt-NADP-ME1 a Nt-NADP-ME2 (Müller *et al.*, 2008).

Výsledky tedy ukazují na syntézu NADP-ME v cytosolu *N. tabacum* L. vlivem infekce PVY^{NTN} *de novo*. Zvýšená aktivita NADP-ME spolu se zvýšenou expresí a transkripcí proteinu NADP-ME byla zjištěna také v kořenech kukuřice po působení celulasy, jasmonátu a houbového elicitoru (Maurino *et al.*, 2001). Zvýšená aktivita NADP-ME v listech olivovníku vystavených solnému stresu byla rovněž doprovázena zvýšenou expresí NADP-ME (Valderrama *et al.*, 2006). Podobně solný stres v rostlinách aloe způsobil nejen zvýšení aktivity, ale i transkripce NADP-ME (Sun *et al.*, 2003).

4.4 Vliv infekce PVY^{NTN} na aktivitu NADP-ME a některých dalších anaplerotických a antioxidačních enzymů v transgenních rostlinách *N. tabacum* L. cv. SR1 s vneseným genem pro protein P3 z PVA.

Prvním transgenním modelem využitým v této práci byly rostliny s vneseným genem pro potyvirový protein P3 z *A viru bramboru* (PVA). Strategií pokusu bylo sledovat, jaký vliv bude mít exprese proteinu P3, jehož funkce je neznámá, na aktivitu anaplerotických (NADP-ME, PEPC a PPK) a antioxidačních enzymů (CAT, GR, APOD a SOD) v horních, systémově infikovaných listech rostlin *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1 v průběhu infekce PVY^{NTN} (příloha 4).

4.4.1 Anaplerotické enzymy (NADP-ME, PEPC, PPK)

Spolu s aktivitou NADP-ME byla sledována i aktivita dalších anaplerotických enzymů PEPC a PPK, jelikož fotosyntetické isoformy jsou v C₄ rostlinách s NADP-ME spojeny

v cyklu fotosyntetické fixace CO₂. Bylo zjištěno, že stejně jako aktivita NADP-ME, tak i aktivita PEPC a PPDK se v průběhu infekce PVY^{NTN} oproti zdravým rostlinám zvyšuje, a to jak v rostlinách *N. tabacum* L., tak v rostlinách transgenních s vneseným genem pro protein P3 (příloha 4, obr. 5, str. 136). Nejvyšší aktivity NADP-ME, PEPC a PPDK byly zjištěny 17., 21. a 25. den infekce PVY^{NTN}. Nejcitlivějším enzymem vůči infekci byla NADP-ME (až 6-ti násobné zvýšení). Aktivita PEPC byla nejvíce zvýšena 5-ti násobně u netransgenních rostlin a aktivita PPDK 2,8-násobně. Mezi kontrolními a transgenními rostlinami s vneseným genem pro protein P3 nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v aktivitě sledovaných enzymů (příloha 4, obr. 5, str. 136).

4.4.2 Antioxidační enzymy (CAT, GR, APOD, SOD)

Antioxidační enzymy se účastní především okamžitých odpovědí rostliny (Hammond-Kosack a Jones, 2000; Wojtaszek, 1997). V tomto pokusu byly aktivity některých antioxidačních enzymů sledovány jednak brzy po inokulaci PVY^{NTN} (2, 12 a 24 hodin po inokulaci) a jednak v době plně rozvinutých příznaků (10. den po inokulaci), avšak ne v místě infekce, ale v horních, systémově infikovaných listech, kam se viry dostávají vodivými pletivy. Až na ojedinělé změny (např. zvýšená aktivita CAT v PVY^{NTN} infikovaných rostlinách 24 hodin po inokulaci) nebyly v aktivitách vybraných antioxidačních enzymů zjištěny významné rozdíly mezi kontrolními, PVY^{NTN} infikovanými a transgenními rostlinami (příloha 4, obrázky 1-4, str. 132-135). Pravděpodobně je přechodné zvýšení aktivity antioxidačních enzymů ve stresovaných rostlinách omezené nejen časově (na okamžité odpovědi), ale i lokálně (na místní odpověď přímo v místě vstupu patogenu).

4.5 Vliv infekce PVY^{NTN} na aktivitu a isoformy NADP-ME v kontrolních a transgenních rostlinách *N. benthamiana* s vneseným genem pro protein HC-pro.

Druhým transgenním modelem byly rostliny *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro protein HC-pro z *A viru bramboru* (PVA). Na rozdíl od proteinu P3 je funkce proteinu HC-pro (z angl. helper component protease) známá. Protein HC-pro je multifunkčním proteinem, usnadňujícím šíření viru rostlinou, zvyšujícím amplifikaci virového genomu a snižujícím PTGS (z angl. posttranscriptional gene silencing). Ovlivňuje šíření viru jednak z buňky do buňky, jednak na dlouhé vzdálenosti a má proteinasovou aktivitu cysteinového typu (Savenkov a Valkonen, 2002, Waterhouse *et al.*, 2001). Na druhou stranu

může přítomnost proteinu viru (HC-pro proteinu z PVA) znamenat ochranu vůči infekci homologním virem (PVY^{NTN}) podobně, jako to bylo popsáno pro tabák exprimující HC-pro a jeho snížené příznaky virem tabákové mozaiky a větší odolnost vůči viru TBRV (tomato black ring nepovirus) (Pruss *et al.*, 2004).

Opět byl studován nejen vliv vneseného proteinu, ale i vliv virové infekce (PVY^{NTN}) v transgenních rostlinách na aktivitu NADP-ME (příloha 5).

4.5.1 Aktivita a isoformy NADP-ME v *Nicotiana benthamiana*

Cílem pokusu bylo zjistit, zda vliv virové infekce na aktivitu NADP-ME zjištěný pro rostliny *N. tabacum* platí i pro rostliny *N. benthamiana*. V rostlinám *N. benthamiana* však byla na rozdíl od rostlin *N. tabacum* L. zjištěna přítomnost více isoform po nativní elektroforetické separaci. Zatímco v rostlinách *N. tabacum* byla ve všech částech rostliny zjištěna přítomnost pouze jednoho proužku odpovídajícímu aktivitě NADP-ME (příloha 3, obr. 5, str. 122), naznačující přítomnost jedné isoformy, v rostlinách *N. benthamiana* byl jeden proužek identifikován pouze v mladých vrchních listech a v kořenech, dvě isoformy a proužek odpovídající pravděpodobně štěpu ve starších listech a ve stoncích, a dokonce tři proužky byly nalezeny v květech (příloha 5, obrázky 2 a 3, str. 147). Fergusonovou metodou (Ferguson, 1964), umožňující přibližně určit relativní molekulovou hmotnost na základě rozdílné pohyblivosti nativních standardních proteinů v různých koncentracích polyakrylamidového gelu (příloha 5, obr. 5, str. 149), bylo stanoveno, že relativní molekulová hmotnost kořenové isoformy odpovídá ~248 000, isoformy přítomné ve starších listech a stoncích odpovídají ~280 000, ~248 000 a štěp ~70 000, a isoformy v květech pak ~70 000, ~140 000 a ~280 000 (příloha 5, tabulka 2, str. 148). Při předpokládaném tetramerickém uspořádání, jsou v rostlinách v *N. benthamiana* přítomny isoformy NADP-ME o relativní molekulové hmotnosti ~62 000 a ~70 000, což odpovídá relativním molekulovým hmotnostem popsaných u rostlinných NADP-ME (viz úvod, kapitola 1.5.1).

Fergusonovým výnosem (závislosti $100[\log(R_f \times 100)]$ na koncentraci polyakrylamidového gelu, kde R_f odpovídá relativní pohyblivosti daného proteinu v gelu) lze také určit, jak spolu dané isoformy souvisí, například která isoforma je větší ve velikosti či náboji, popřípadě jedná-li se o různé oligomerizační stavy. Ty se ve Fergusonově výnosu projeví jako protínající se přímky v jednom bodě, v oblasti osy x menší než 2 % koncentrace polyakrylamidového gelu (Lottspeich a Zorbas, 1998). Právě takový výsledek byl získán pro tři isoformy nalezené v květech, jedná se tedy nejspíše o monomer, dimer a tetramer isoformy NADP-ME o relativní molekulové hmotnosti ~70 000 (příloha 5, obr. 6, str. 149).

Aktivita NADP-ME v listech a kořenech transgenních rostlin byla obdobná jako u rostlin kontrolních. Nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi rostlinami produkujícími protein HC-pro a rostlinami netransgenními (příloha 5, tabulka 1, obr. 4. str. 147 a 148) možná z důvodu nízké nukleotidové podobnosti PVY s PVA, která činí pouze 58 % (Moravec, 2001).

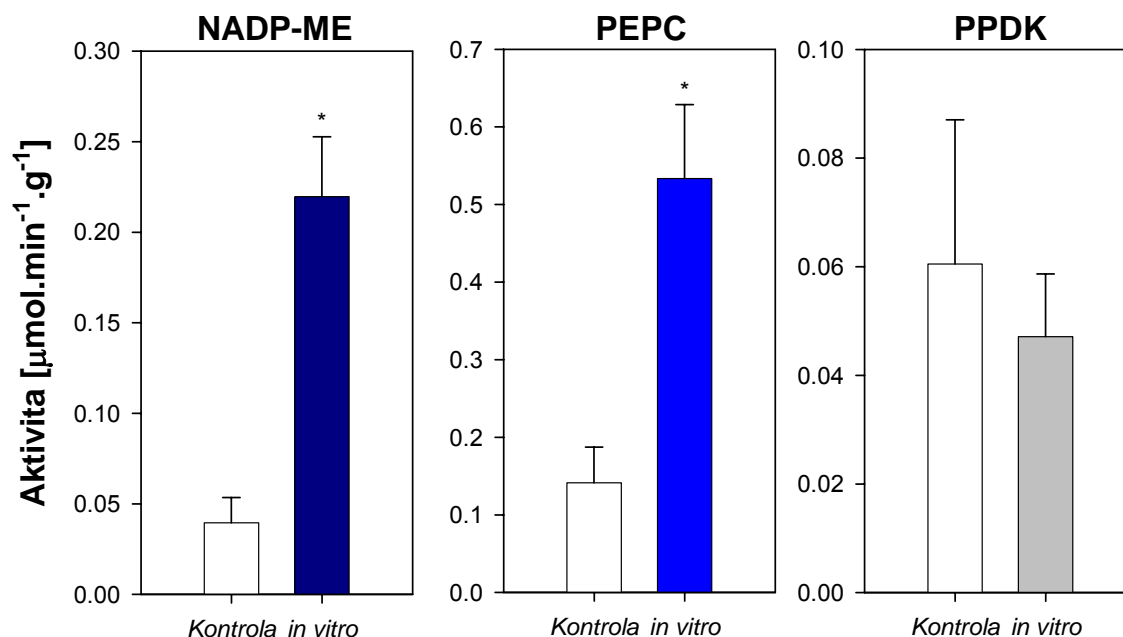
4.5.2 Vliv infekce PVY^{NTN} na NADP-ME

Další rozdíl rostlin *N. benthamiana* oproti rostlinám *N. tabacum* L. byl zaznamenán při studiu vlivu infekce PVY^{NTN} na aktivitu NADP-ME v listech. Oproti až šestinásobnému nárůstu aktivity NADP-ME v průběhu PVY^{NTN} v listech *N. tabacum* L. (příloha 4, obr. 5, str. 136) nebyl v listech rostlin *N. benthamiana* v průběhu 25 dní infekce pozorován rozdíl mezi kontrolními zdravými a PVY^{NTN} infikovanými (příloha 5, obr. 4A, str. 148). Pouze v kořenech PVY^{NTN} infikovaných rostlin byl v transgenních i netransgenních rostlinách zjištěn mírný nárůst aktivity NADP-ME (180 a 215 % oproti kořenům kontrolních zdravých rostlin (příloha 5, obr. 4B, str. 148).

Je tedy zřejmé, že zvýšení aktivity NADP-ME v listech vlivem virové infekce není pravidlem pro všechny rostliny. Pravděpodobně záleží jednak na isoenzymovém složení NADP-ME, lokalizaci jednotlivých isoformů a především na samotné obranné odpovědi dané rostliny vůči stresu.

4.5 Aktivita NADP-ME v rostlinách *N. tabacum* L. cv. Petit Havana, SR1 pěstovaných v podmínkách *in vitro*

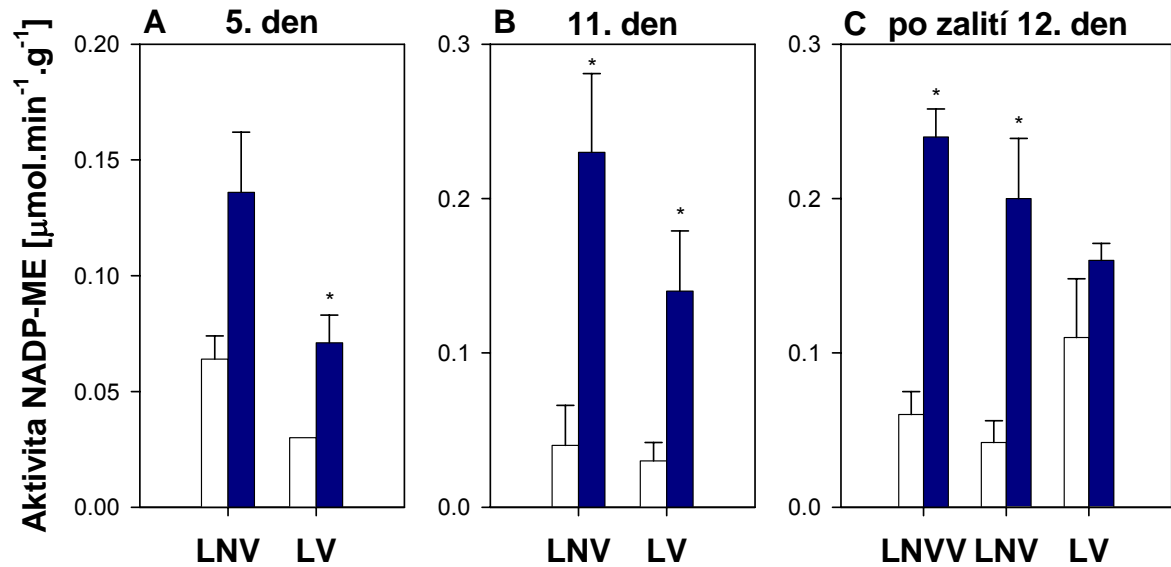
Rostliny *N. tabacum* L. pěstované *in vitro*, v uzavřených nádobkách omezující přístup CO₂, při vyšší vlhkosti vzduchu a na živném médiu obsahujícím 2 % sacharosu (Murashige-Skoogův agar) vykazovaly vyšší aktivitu NADP-ME a PEPC než rostliny kontrolní pěstované v půdě (aktivita NADP-ME se oproti rostlinám kontrolním zvýšila 5,5-násobně, aktivita PEPC 2,4-násobně) (obr. 13, str. 49). Zvýšení aktivity těchto dvou enzymů může znamenat efektivnější využívání CO₂, fixaci CO₂ uvolněného respirací a fotorespirací prostřednictvím PEPC a následné uvolnění CO₂ za katalýzy NADP-ME. Nezměněná aktivita PPDK (obr. 13, str. 49) pravděpodobně znamená, že v rostlinách tabáku nedochází k regeneraci fosfoenolpyruvátu, substrátu pro PEPC. Důvodem může být přítomnost sacharosu v médiu.



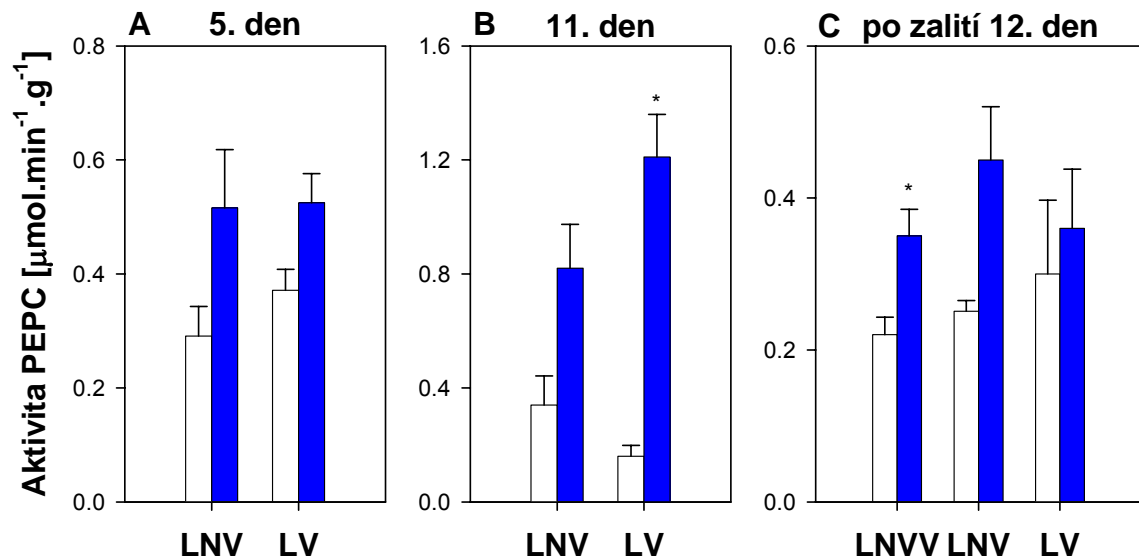
Obr. 13. Aktivita NADP-ME, PEPC a PPDK vztažená na čerstvou hmotnost v listech rostlin *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1 pěstovaných v podmínkách nedostatku CO₂, in vitro, v Murashige-Skoogovu agaru, ve srovnání s kontrolními rostlinami pěstovanými v půdě. Výsledky jsou průměrem a směrodatnou odchylkou měření 30 vzorků in vitro a 6 vzorků rostlin pěstovaných v půdě. Statistické vyhodnocení bylo provedeno t-testem. Hvězdička označuje statisticky významné změny vůči kontrolní skupině s $p < 0.05$.

4.6 Vliv sucha na aktivitu NADP-ME v rostlinách *N. tabacum* L.

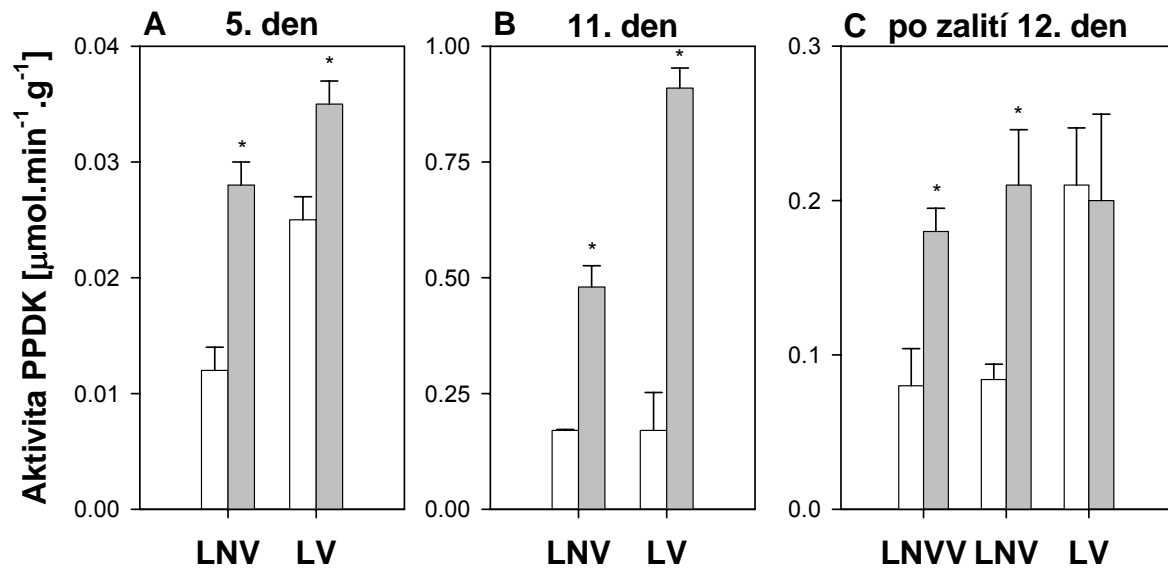
Jelikož i stres suchem má určité podobnosti a důsledky (např. uzavírání průduchů) jako biotický stres, byl zkoumán jeho vliv na aktivitu NADP-ME, PEPC a PPDK v různých částech rostlin *N. tabacum* L., cv. W38. Vzorky listů dělených podle umístění na rostlině (zvláště vrcholové listy: LNV, první dospělé listy: LV a nově vyvinuté listy během pokusu: LNVV) byly odebírány 5. a 11. den podmínek sucha a den po zalití stresovaných rostlin (12. den pokusu). Již 5. den bylo zjištěno zvýšení aktivity NADP-ME (u LNV o 110 %), PEPC (u LNV o 75 %) a PPDK (u LNV o 130 %) (obr. 14A, 15A, 16A, str. 50-51). Nárůst aktivity byl ještě významnější 11. den podmínek sucha, kdy aktivita u stresovaných vystoupila u enzymu NADP-ME (u LNV o 475 %), u PEPC (u LNV o 650 %) a u PPDK (u LNV o 180 %) (obr. 15B, 16B, 17B, str. 50-51). V listech LV byla aktivita i její zvýšení vlivem stresu většinou nižší. Den po zalití se rozdíly mezi kontrolními a stresovanými rostlinami zase začaly snižovat. Zvýšení aktivity NADP-ME 24 hodin po zalití bylo u LNV o 370 %, PEPC u LNV o 80 % a PPDK u LNV o 150 % (obr. 14C, 15C, 16C, str. 50-51).



Obr. 14. Aktivita NADP-ME vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny, po 5., 11. dnu sucha a den po zalití 11 dnů stresovaných rostlin *Nicotiana tabacum* L. cv. W38; □ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy. Výsledky jsou průměrem a směrodatnou odchylkou měření 3 vzorků. Statistické vyhodnocení bylo provedeno t-testem. Hvězdička označuje statisticky významné změny vůči kontrolní skupině s $p < 0.05$.



Obr. 15. Aktivita PEPC vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny, po 5., 11. dnu sucha a den po zalití 11 dnů stresovaných rostlin *Nicotiana tabacum* L. cv. W38; □ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy. Výsledky jsou průměrem a směrodatnou odchylkou měření 3 vzorků. Statistické vyhodnocení bylo provedeno t-testem. Hvězdička označuje statisticky významné změny vůči kontrolní skupině s $p < 0.05$.



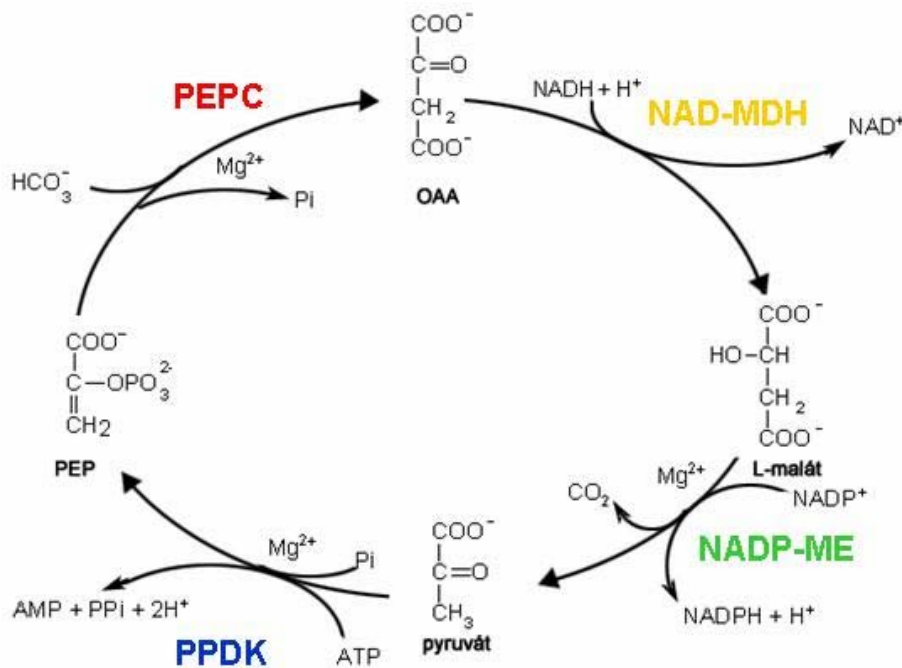
Obr. 16. Aktivita PPDK vztažená na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v různých částech rostliny, po 5., 11. dnu sucha a den po zalití 11 dnů stresovaných rostlin *Nicotiana tabacum* L. cv. W38; □ – kontrolní rostliny, ■ – rostliny vystavené suchu; LNV – vrcholové listy, LV – první plně vyvinuté listy. Výsledky jsou průměrem a směrodatnou odchylkou měření 3 vzorků. Statistické vyhodnocení bylo provedeno t-testem. Hvězdička označuje statisticky významné změny vůči kontrolní skupině s $p < 0.05$.

V rostlinách stresovaných nedostatkem vody je hlavním problémem pokles turgoru (tlakového potenciálu), uzavření průduchů, snížení fotosyntézy a pokles růstu rostliny. Druhotně pak stres suchem vyvolává deficienci živin způsobenou jejich nedostatečným zásobováním a příjmem kořeny. Silná dehydratace je spojena s poškozením membrán, což se projeví ztrátou jejich permeability. Jedním ze způsobů udržení vodního potenciálu je syntéza osmoticky aktivních látek, především prolinu, sacharidů, glycinbetainu a cukerných alkoholů (sorbitolu, manitolu). Tudíž v takto stresovaných rostlinách může být zvýšená aktivita NADP-ME, PEPC a PPDK umožňující poskytování NADPH pro biosyntetické reakce jako např. biosyntézu prolinu, mastných kyselin poškozených membrán, nebo biosyntézu manitolu z mannosu-6-fosfátu výhodná. Za podmínek uzavřených průduchů v souvislosti se suchem může být rovněž důležité poskytování CO_2 enzymem NADP-ME. Produkci pyruvátu se NADP-ME také podílí na podporování citrátového cyklu.

4.7 Význam NADP-ME pro rostlinu za nefyziologických podmínek

V této práci byla zjištěna zvýšená aktivita NADP-ME, PEPC a PPDK za nefyziologických podmínek, vlivem biotického stresu způsobeného virovou infekcí či

abiotickým stresem způsobeným nedostatkem CO₂ a vody. Zůstává otázkou, zda by NADP-ME, PEPC a PPK mohly spolu s NAD-malátdehydrogenasou, které je v cytosolu nadbytek, tvořit obdobně jako jejich fotosyntetické protějšky v C₄ rostlinách cyklus, kterým by bylo možné získávat redukční ekvivalenty NADPH na úkor ATP a NADH (obr. 17). Obzvláště ve stresovaných rostlinách za nefyziologických podmínek by NADPH bylo využitelné pro biosyntetické pochody, především k opravě poškozených struktur či syntéze osmolytik v případě stresu suchem. Stejně tak další produkt tvořený tímto cyklem, CO₂, je v rostlinách, u kterých došlo k poškození listů (např. stresem virovou infekcí, suchem) a/nebo k uzavření průduchů vlivem stresu využitelný pro fotosyntézu, jejíž rychlost je v těchto podmínkách podstatně snížena.



Obr. 17. Enzymy předpokládané metabolické dráhy v rostlinách tabáku, která je pravděpodobně více využívána za podmínek biotického stresu vyvolaného virovou infekcí.

Podobně v rostlinách čeledi *Chenopodiaceae* (merlíkovitých) byla popsána C₄ fotosyntéza probíhající pouze v jediné buňce, bez prostorového oddělení karboxylační a dekarboxylační reakce mezi mesofylovou buňkou a buňkou pochev cévních svazků (Lara *et al.*, 2006).

5. Závěr

1. Nefotosyntetická cytosolová isoforma NADP-dependentní malátdehydrogenasy (dekarboxylační) (NADP-ME) byla třemi chromatografickými kroky izolována z listů tabáku *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 o výsledné specifické aktivitě $0,95 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, relativní molekulové hmotnosti jedné podjednotky tetrameru přibližně 67 000, isoelektrickém bodu 5,5 a pH optimu 7,1 - 7,4. Byly stanoveny základní kinetické parametry této isoformy pro substrát L-malát a NADP^+ v přítomnosti účinných kofaktorů Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , stejně jako byly sledovány závislosti reakčních rychlostí na koncentraci jednotlivých iontů. Závislost reakční rychlosti na koncentraci Mn^{2+} iontů byla sigmoidální, se silnou pozitivní kooperativitou a vysokou hodnotou Hillova koeficientu 7,5.
2. Mechanismus dvousubstrátové reakce katalyzované NADP-ME z listů tabáku byl určen jako uspořádaný sekvenční.
3. Regulace NADP-ME isoformy purifikované z listů tabáku se uskutečňuje především energeticky bohatými látkami (GTP, ATP a ADP), mírně pak některými metabolity glykolýzy.
4. Vlivem biotického stresu způsobeného Y virem bramboru (PVY) došlo v průběhu infekce ke zvýšení aktivity NADP-ME v listech, stoncích i kořenech *Nicotiana tabacum* L., a to jak kmenem PVY^O, tak kmenem PVY^{NTN}. Mírnější kmen PVY^O způsobil nižší zvýšení aktivity než nekrotický izolát kmene PVY^{NTN}. Významně zvýšené aktivitě NADP-ME vlivem PVY^{NTN} odpovídala i zvýšená transkripce cytosolové isoformy NADP-ME a exprese tohoto proteinu.
5. Transgenní rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1 s vneseným genem pro potyvirový protein P3 z *A viru bramboru* a transgenní rostliny *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro multifunkční potyvirový protein HC-pro z *A viru bramboru* se

v odpovědi na infekci PVY^{NTN} aktivitou NADP-ME nelišily od svých netransgenních kontrol.

6. Rostliny *Nicotiana benthamiana* neodpovídají na virovou infekci PVY^{NTN} v podobě zvýšené aktivity NADP-ME v listech, avšak zvýšení aktivity nalezené v kořenech je obdobné jako zvýšení v kořenech infikovaných rostlin *Nicotiana tabacum* L. V různých částech kontrolních i infikovaných rostlin *Nicotiana benthamiana* byly nalezeny isoformy NADP-ME.
7. Abiotický stres v podobě nedostatku CO₂ a sucha zvyšoval aktivitu NADP-ME v listech rostlin *Nicotiana tabacum* L.

Reference:

- Agrios, G.N., 1997a. How pathogens attack plants, v knize Plant Pathology, (Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers) San Diego, str. 63-82.
- Agrios, G.N., 1997b. Effects of pathogens on plant physiological functions, v knize Plant Pathology, (Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers) San Diego, str. 83-92.
- Agrios, G.N., 1997c. How plants defend themselves against pathogens, v knize Plant Pathology, (Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers) San Diego, str. 93-114.
- Agrios, G.N., 1997d. Plant diseases caused by viruses v knize Plant Pathology, (Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers) San Diego, str. 479-564.
- Aktas, D.F., Cook, P.F., 2008. Proper positioning of the nicotinamide ring is crucial for the *Ascaris suum* malic enzyme reaction. *Biochemistry* **47**, 2539-2546.
- Bartosz, G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* **19**, 47-64.
- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., Sharma, K.K., 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospect. *Plant Cell Rep.* **27**, 411-424.
- Bianchi, E.M., Sajadi, S.A.S., Song B., Sigel, H., 2003. Stabilities and isomeric equilibria in aqueous solution of monomeric metal ion complexes of adenosine 5'-diphosphate (ADP³⁻) in comparison with those of adenosine 5'-monophosphate (AMP²⁻). *Chem. Eur. J.* **9**, 881-892.
- Bisswanger, H., 2002. Enzyme kinetics. Principles and methods. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Bologna, F.P., Andreo, C.S., Drincovich, M.F., 2007. *Escherichia coli* malic enzymes: two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure. *J. Bacteriol.* **189**, 5937-5946.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000. Responses to Abiotic Stresses, v knize Biochemistry & Molecular biology of plants (Buchanan B.B., Gruissem W. and Jones R.L., eds) American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, str. 1158-1203.
- Bukato, G., Kochan, Z., Swierczyński, J., 1995. Purification and properties of cytosolic and mitochondrial malic enzyme isolated from human brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 47-54.
- Burketová, L., Čeřovská, N.: Přednášky Fytopatologie, PřF UK Praha (2003)
- Casati, P., Spampinato, C.P., Andreo, C.S., 1997. Characterization and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat. *Plant Cell Physiol.* **38**, 928-934.
- Casati, P., Lara, M.V., Andreo, C.S., 2000. Induction of C₄-like mechanism of CO₂ fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. *Plant Physiol.* **123**, 1611-1621.
- Clark, M. F., Adams, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**, 475-483.
- Colombo, S.L., Andreo, C.S., Podestá, F.E., 1997. Carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. Purification, characterization and developmental profile of NADP-dependent malic enzyme. *Physiol. Plant.* **101**, 821-826.
- Creelius, F., Streb, P., Feierabend, J., 2003. Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *J. Exp. Bot.* **54**, 1075-1083.
- Cushman, J.C., 1992. Characterization and expression of a NADP-malic enzyme cDNA induced by salt stress from the facultative crassulacean acid metabolism plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *Eur. J. Biochem.* **208**, 259-266.
- Čeřovská, N., 1998. Production of monoclonal antibodies to potato virus Y^{NTN} strain and their use for strain differentiation. *Plant Pathol.* **47**, 505-509.
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826 – 833.
- Detarsio, E., Alvarez, C.E., Saigo, M., Andreo, C.S., Drincovich, M.F., 2007. Identification of domains involved in tetramerization and malate inhibition of maize C₄ NADP-malic enzyme. *J. Biol. Chem.* **282**, 6053-6060.
- Dixon, R. A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843 – 847.

- Drincovich, M.F., Casati, P., Andreo, C.S., Chessin, S.J., Franceschi, V.R., Edwards, G.E., Ku, M.S.B., 1998. Evolution of C₄ photosynthesis in *Flaveria* species. *Plant Physiol.* **117**, 733-744.
- Drincovich, M.F., Casati, P., Andreo, C.S., 2001. NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Letters* **490**, 1-6.
- Edwards, G.E., Andreo, C.S., 1992. NADP-malic enzyme from plants. *Phytochemistry* **31**, 1845-1857.
- Ferguson, K.A., 1964. Starch-gel electrophoresis: application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metab.* **13**, 985-1002.
- Fraser, R.S.S., 1998. *Biochemistry of Resistance to Plant Viruses, v knize Plant virus disease control, (The American Phytopathological Society) St. Paul, Minnesota, str. 56 - 64 (1998).*
- Gerrard Wheeler, M.C., Tronconi, M.A., Drincovich, M.F., Andreo, C.S., Flüge, U.I., Maurino, V.G., 2005. A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **139**, 39-51.
- Gerrard Wheeler, M.C., Arias, C.L., Tronconi, M.A., Maurino, V.G., Andreo, C.S., Drincovich, M.F., 2008. *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzyme isoforms: high degree of identity but clearly distinct properties. *Plant Mol. Biol. V tisku.*
- Griffin, K.L., Seemann, J.R., 1996. Plants, CO₂ and photosynthesis in the 21st century. *Chem. Biol.* **3**, 245-254.
- Grover, S.D., Canellas, P.F., Wedding, R.T., 1981. Purification of NAD malic enzyme from potato and investigation of some physical and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **209**, 396-407.
- Guo, D., Rajamäki, M.-L., Saarma, M., Valkonen, J.P.T., 2001. Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* **82**, 935-939.
- Hammond-Kosack, K.H., Jones, J.D.G., 2000. Responses to Plant Pathogens, v knize *Biochemistry & Molecular Biology of Plants, (Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.L., eds.) Rockville, Maryland, str. 1102 – 1152.*
- Hsieh, J.-Y., Liu, G.-Y., Chang, G.-G., Hung, H.-Ch., 2006. Determinations of the dual cofactor specificity and substrate cooperativity of the human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme. *J. Biol. Chem.* **281**, 23237-23245.

- Hsu, W.-Ch., Hung, H.-Ch., Tong, L., Chang, G.-G., 2004. Dual functional roles of ATP in human mitochondrial malic enzyme. *Biochemistry* **43**, 7382-7390.
- Hsu, R.Y., 1982. Pigeon liver malic enzyme. *Mol. Cell. Biochem.* **43**, 3-26.
- Hsu, R.Y., Lardy, H.A., 1967. Pigeon liver malic enzyme. II. Isolation, crystallization, and some properties. *J. Biol. Chem.* **242**, 520-526.
- Hsu, R.Y., Lardy, H.A., Cleland, W.W., 1967. Pigeon liver malic enzyme. V. Kinetic studies. *J. Biol. Chem.* **242**, 5315-5322.
- Chang, G.-G., Huang, T.-M., Wang, J.-K., Lee, H.-J., Chou, W.-Y., Meng, Ch.-L., 1992. Kinetic mechanism of the cytosolic malic enzyme from human breast cancer cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 468-473.
- Chang, G.-G., Tong, L., 2003. Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry* **42**, 12721-12731.
- Chi, W., Yang, J., Wu, N., Zhang, F., 2004. Four rice genes encoding NADP malic enzyme exhibit distinct expression profiles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1865-1874.
- Iglesias, A.A., Andreo, C.S., 1990. Kinetic and Structural Properties of NADP-Malic Enzyme from Sugarcane Leaves. *Plant Physiol.* **92**, 66-72.
- Jenner, C.E., Xiaowu, W., Tomimura, K., Ohshima, K., Ponz, F., Walsh, J.A., 2003. The dual role of the potyvirus P3 protein of *Turnip mosaic virus* as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**, 777-784.
- Johansen, I.E., Lund, O.S., Hjulsager, C.K., Laursen, J., 2001. Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in gene-for-cistron correspondence between host and virus. *J. Virol.* **75**, 6609-6614.
- Kotyk, A., Horák, J., 1977. *Enzymová kinetika*. Academia, Praha.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laporte M.M., Shen B., Tarczyski M.C., 2002. Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function, *J. Exp. Bot.* **53**, 699-705.
- Lara, M.V., Drincovich, M.F., Müller, G.L., Maurino, V.G., Andreo, C.S., 2005. NADP-malic enzyme and Hsp70: Co-purification of both proteins and modification of NADP-malic enzyme properties by association with Hsp 70. *Plant Cell Physiol.* **46**, 997-1006.

- Lara, M.V., Chuong, S.D.X., Akhiani, H., Andreo, C.S., Edwards, G.E., 2006. Species having C₄ single-cell-type photosynthesis in the *Chenopodiaceae* family evolved a photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase like that of Kranz-type C₄ species. *Plant Physiol.* **142**, 673- 684.
- Lee, D.H., Lee, C.B., 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* **159**, 75-85.
- Levitt, J.L., 1980. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York.
- Liu, S., Cheng, Y., Zhang, X., Guang, Q., Nishiuchi, S., Hase, K., Takano, T., 2007. Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stresses; over-expression of that gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* **64**, 49-58.
- Lottspeich, F., Zorbach, H., 1998. Bioanalytics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin (*v němčině*).
- Lucas, W.J., 2006. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**, 169-184.
- Malkin, R., Niyogi, K., 2000. Photosynthesis, v knize *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, (Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.L., eds.) Rockville, Maryland, str. 568 – 628.
- Marangoni, A.G., 2003. Enzyme kinetics. A modern approach. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Martell, A.E., Smith, R.M., Motekaitis, R.J., 2003. NIST Standard Reference Database 46 (Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes), Version 7.0, NIST Standard Reference Data, Gaithersburg, MD.
- Maurino, V.G., Drincovich, M.F., Andreo, C.S., 1996. NADP-malic enzyme isoforms in maize leaves. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38**, 239-250.
- Maurino, V.G., Saigo, M., Andreo, C.S., Drincovich, M.F., 2001. Non-photosynthetic malic enzyme from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant Mol. Biol.* **45**, 409-420.
- Mehdy, M.C., Sharma, Y.K., Sathasivan, K., Bays, N.W., 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.* **98**, 365-374.
- Merits, A., Guo, D., Saarma, M., 1998. VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence unspecific manner. *J. Gen. Virol.*, **79**, 3123-3127.

- Moravec, T., 2001. Bližší charakterizace a specifická detekce dvou rostlinných virů PVA a PVY. Disertační práce AF ČZU Praha, Katedra ochrany rostlin, str. 1-9.
- Müller, G.L., Drincovich, M.F., Andreo, C.S., Lara, M.V., 2008. *Nicotiana tabacum* NADP-malic enzyme: cloning, characterization and analysis of biological role. *Plant Cell Physiol.* **49**, 469-480.
- Ochoa, S., Mehler, A., Kornberg, A., (1947). Reversible oxidative decarboxylation of malic acid. *J. Biol. Chem.* **167**, 871-872.
- Paleg, L.G., Aspinall, D., 1981. The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Academic press, Sydney, New York, London, Toronto, San Francisco.
- Potůčková, L., 2008. Regulace NADP-dependentní malátdehydrogenasy (dekarboxylační) z listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). Diplomová práce PřF UK Praha, str. 41-66.
- Pruss, G.J., Lawrence, C.B., Bass, T., Li, Q.Q., Bowman, L.H., Vance, V., 2004. The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology* **320**, 107-120.
- Riechmann, J.L., Lain, S., Garcia, J.A., 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* **73**, 1-16.
- Rizhsky, L., Hongjian, L., Mittler, R., 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* **130**, 1143-1151.
- Rosypal, S., 2002. Úvod do molekulární biologie, díl čtvrtý, Brno, str. 929 - 933.
- Ryšlavá, H., Muller, K., Semorádová, Š., Synková, H., Čeřovská, N., 2003. Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Photosynthetica* **41**, 357-363.
- Ryšlavá, H., Doubnerová, V., Muller, K., Bařková, P., Schnablová, R., Liberda, J., Synková, H., Čeřovská, N., 2007. The enzyme kinetics of the NADP-malic enzyme from tobacco leaves. *Collect. Czech Chem. Commun.* **72**, 1420-1434.
- Saher, S., Fernández-García, N., Piqueras, A., Hellín, E., Olmos, E., 2005. Reduction properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured in vitro: a hypoxia stress? *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 573-582.
- Saigo, M., Bologna, F.P., Maurino, V.G., Detarsio, E., Andreo, C.S., Drincovich, M.F., 2004. Maize recombinant non-C₄ NADP-malic enzyme: A novel dimeric malic enzyme with high specific activity. *Plant Mol. Biol.* **55**, 97-107.

- Savenkov, E.I., Valkonen, J.P.T., 2002. Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants. *J. Gen. Virol.* **83**, 2325-2335.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., Shinozaki, K., 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 296-302.
- Shukla, D., Ward, C.W., Brunt, A.A. (eds), 1994. *The Potyviridae*. CAB International, Wallingford.
- Schaaf, J., Walter, M.H., Hess, D., 1995. Primary Metabolism in Plant Defense (Regulation of a Bean Malic Enzyme Gene Promoter in Transgenic Tobacco by Developmental and Environmental Cues). *Plant Physiol.* **108**, 949-960.
- Sigel, H., Bianchi, E.M., Corfu, N.A., Kinjo, Y., Tribolet, R., Martin, R.B., 2001. Stabilities and isomeric equilibria in solutions of monomeric metal-ion complexes of guanosine 5'-triphosphate (GTP⁴⁻) and inosine 5'-triphosphate (ITP⁴⁻) in comparison with those of adenosine 5'-triphosphate (ATP⁴⁻). *Chem. Eur. J.* **7**, 3729-3737.
- Sigel, H., 2004. Adenosine 5'-triphosphate (ATP⁴⁻) aspects of the coordination chemistry of a multitasking biological substrate. *Pure Appl. Chem.* **76**, 375-388.
- Skorkowski, E.F., Storey, K.B., 1987. Affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B for purification of malic enzyme from crustacean muscle. *J. Chromatogr.* **389**, 427-432.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J., 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanism in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 437-444.
- Spampinato, C.P., Casati, P., Andreo, C.S., 1998. Factors affecting the oligomeric state of NADP-malic enzyme from maize and wheat tissues: a chemical crosslinking study. *Biochim. Biophys. Acta* **1383**, 245-252.
- Sun, S.-B., Shen, Q.-R., Wan, J.-M., Liu, Z.-P., 2003. Induced expression of the gene for NADP-malic enzyme in leaves of *Aloe vera* L. under salt stress. *Acta Biochim. et Biophys. Sinica* **35**, 423-429.
- Susi, P., Hohkuri, M., Wahlroos, T., Kilby, N.J., 2004. Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol. Biol.* **54**, 157-174.
- Synková, H., Valcke, R., 2001. Response to mild water stress in transgenic Pssu-ipt tobacco. *Physiol. Plant.* **112**, 513-523.

- Synková, H., Semorádová, Š., Burketová, L., 2004. High content of endogenous cytokinins stimulates activity of enzymes and proteins involved in stress response in *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Tis. Org. Cul.* **79**, 169-179.
- Šetlík, I., Seidlová, F., Šantrůček, J., 1998. Fyziologie rostlin, učební texty Biologické fakulty Jihočeské Univerzity, str. 136-158.
- Takeuchi, Y., Akagi, H., Kamasawa, N., Osumi, M., Honda, H., 2000. Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme. *Planta* **211**, 265-274.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2002. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Teller, J.K., Fahien, L.A., Davis, J.W., 1992. Kinetics and regulation of hepatoma mitochondrial NAD(P) malic enzyme. *J. Biol. Chem.* **267**, 10423-10432.
- Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M.V., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Fernández-Ocana, A., Del Río, L.A., Barroso, J.B., 2006. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell Environ.* **29**, 1449-1459.
- van Loon, L.C., van Strien, E.A., 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 85-97.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.-B., Lough, T., 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-842
- Wedding, R.T., 1989. Malic enzymes of higher plants. Characteristics, regulation and physiological function. *Plant Physiol.* **90**, 367-371.
- Wojtaszek, P., 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322**, 681-692.
- Xu, Y., Bhargava, G., Wu, H., Loeber, G., Tong, L., 1999. Crystal structure of human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme: a new class of oxidative decarboxylases. *Structure* **7**, 877-889.
- Yang, Z., Lanks, Ch.W., Tong, L., 2002. Molecular mechanism for the regulation of human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme by ATP and fumarate. *Structure* **10**, 951-960.

THE ENZYME KINETICS OF THE NADP-MALIC ENZYME FROM TOBACCO LEAVES

Helena RYŠLAVÁ^{a1,*}, Veronika DOUBNEROVÁ^{a2}, Karel MULLER^{a3},
Petra BAŤKOVÁ^{b1,c}, Renáta SCHNABLOVÁ^{b2,c}, Jiří LIBERDA^{a4},
Helena SYNKOVA^{b3} and Noemi ČEŘOVSKÁ^{b4}

^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030,
CZ-128 40 Prague 2, Czech Republic; e-mail: ¹ rysl@natur.cuni.cz, ² doubnerova@volny.cz,
³ muller@ueb.cas.cz, ⁴ jirik@natur.cuni.cz

^b Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Karlovce 1a,
CZ-160 00 Prague 6, Czech Republic; e-mail: ¹ batkova@ueb.cas.cz, ² schnablova@ueb.cas,
³ synkova@ueb.cas.cz, ⁴ cerovska@ueb.cas.cz

^c Department of Plant Anatomy and Physiology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 5,
CZ-128 44 Prague 2, Czech Republic

Received February 6, 2007

Accepted July 22, 2007

Malic enzyme (L-malate: NADP⁺ oxidoreductase (oxaloacetate-decarboxylating), EC 1.1.1.40, NADP-ME), which was found in chloroplasts, was isolated from tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.) almost homogenous. The specific enzyme activity was 0.95 μmol min⁻¹ mg⁻¹. The enzyme pH optimum was found between pH 7.1 and 7.4. The affinity of NADP-ME to substrates (L-malate and NADP⁺) was evaluated in the presence of divalent metal ions (Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺). The value of the apparent Michaelis constant of NADP-ME for L-malate was dependent on the ion cofactor, while no such relationship was found for NADP⁺. The dependence of the reaction rate on concentration of Mg²⁺ indicates the presence of more than one binding site for these ions in NADP-ME. Likewise, the sigmoidal dependence of the reaction rate on Mn²⁺ concentration and the value of Hill coefficient 7.5 indicate the positive cooperativity of the reaction kinetics in the presence of the ions. The effect of Co²⁺ and Ni²⁺ ions was analogous to that of Mn²⁺ ions; however, the cooperativity was lower (the values of Hill coefficients were 3.0 and 1.3 for Co²⁺ and Ni²⁺, respectively). Regulation of NADP-ME from tobacco leaves by divalent metal ions is discussed.

Keywords: Oxidoreductases; Enzyme kinetics; NADP-malic enzyme; Divalent metal ions; *Nicotiana tabacum* L.

Malic enzyme (L-malate: NAD(P)⁺ oxidoreductase (decarboxylating)) catalyzes oxidative decarboxylation of L-malate using NAD⁺ or NADP⁺ as coenzymes in the presence of divalent metal ions to produce pyruvate, NAD(P)H and CO₂^{1,2}. This is ascribed to three related forms of malic enzymes. The first, EC 1.1.1.38, which uses NAD⁺ as a coenzyme and can

decarboxylate oxaloacetate in addition to L-malate, is predominantly found in bacteria. The second enzyme, denoted as EC 1.1.1.39, uses NAD(P)⁺, but it is unable to decarboxylate oxaloacetate. This enzyme is localized in plant mitochondria as well as in animal cells³. Finally, NADP-dependent malic enzyme (NADP-ME), EC 1.1.1.40, utilizes NADP⁺ and catalyzes the decarboxylation of L-malate and other partial reactions including decarboxylation of oxaloacetate and reduction of α -ketocarboxylic acid¹. This enzyme is found in animal and plant tissues as well as in prokaryotic and eukaryotic microorganisms¹. NADP-ME is widely distributed among all types of plants and its isoforms are either plastidic or cytosolic². NADP-ME is coded by a small gene family, the expression of which is tissue and ontogenic stage specific. In *Arabidopsis* three isoforms in cytosol and one in chloroplasts are present⁴, similar results were obtained in rice⁵.

NADP-ME, located in chloroplasts of bundle sheet cells of C₄ plants (a plant, in which the first photosynthetic product is a 4-carbon compound), plays an important role in C₄ photosynthesis. It catalyzes the release of CO₂, which is utilized in the Calvin cycle. In Crasulean acid mechanism (CAM) plants, malic enzyme has an analogous function, but its localization is cytoplasmic^{2,6}. NADP-ME is also present in C₃ plants (a plant, in which the first photosynthetic product is a 3-carbon compound), and in non-photosynthetic tissues of C₄ plants^{2,7}. It is assumed that its main role is to supply reduced equivalents, NADPH, for synthetic metabolic pathways such as synthesis of fatty acids and pyruvate. Moreover, NADP-ME together with phosphoenolpyruvate carboxylase serves to maintain the intracellular pH. NADP-ME also participates in the mechanism of stomatal closure and can affect the water economy of a plant⁸.

The NADP-ME function seems to be associated with metabolic response of plants to stress. The increased activity of NADP-ME in maize roots treated with fungal elicitors, jasmonate, or cellulase was found⁹, and in tobacco leaves affected by viral infection¹⁰. The enhancement of NADP-ME activity was also found in water-stressed tobacco¹¹ and in transgenic tobacco overproducing endogenous cytokinins¹². Molecular mechanisms of such responses have not yet been explained. Furthermore, the enzyme of C₃ plants has not been fully characterized until now. Therefore, we have isolated NADP-ME from tobacco leaves and characterized kinetics of the reaction catalyzed by this enzyme. Kinetic parameters of the enzyme in the presence of various divalent metal ions were determined.

EXPERIMENTAL

Plant Material

Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) were grown in a greenhouse under 22/18 °C day/night temperatures. Seeds were sown in pots with sand and plantlets were transferred to soil after 3 weeks. Leaves of seven-week old plants were collected for isolation, frozen immediately in liquid N₂ and stored at -75 °C.

In vivo Localization of NADP-ME

Malic enzyme was localized by staining in fresh hand-cut sections of leaf midribs. The sections were incubated immediately in 10 ml of staining solution consisting of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM L-malate, 10 mM MgCl₂, 7.6 mg NADP⁺, 12 μM Nitroblue Tetrazolium chloride, and 0.16 μM phenazine methosulfate at room temperature for 30 min in the dark. The control staining was done without L-malate or NADP⁺. The blue color indicated NADP-ME activity, which was not present in the control staining. The sections were examined in light microscope Nikon Eclipse E600 equipped with CCD camera.

Enzyme Purification

Tobacco leaves (50 g) were homogenized in 100 mM Tris-HCl (pH 7.8) containing 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 5 mM MgCl₂ (buffer A) using a disperser Turrax DI-18. The homogenate was filtered through cheesecloth, 1 g of poly(vinylpyrrolidone) was added, and the mixture was centrifuged at 9400g for 30 min. The extract was precipitated with ammonium sulfate. The fraction with NADP-ME activity precipitated between 30 and 55% saturation of (NH₄)₂SO₄. The precipitated protein was dissolved in 6 ml of 25 mM Tris-HCl (pH 7.8) containing 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 5 mM MgCl₂ (buffer B) and dialyzed overnight against 1 l of buffer B. The solution was applied onto a DEAE-cellulose column (1.5 × 10 cm) equilibrated with buffer B. After washing with buffer B, elution was performed with a linear NaCl gradient (0–300 mM NaCl in buffer B) at flow rate 1 ml min⁻¹. NADP-ME activity was eluted as a single peak at 250 mM NaCl. Fractions containing the highest activity were pooled, precipitated with 80% saturation of ammonium sulfate and centrifuged at 9400g for 10 min. The pellet was dissolved in a minimal volume of buffer B and applied onto a column of Sephadex G-200 (1.5 × 30 cm) previously equilibrated with buffer B. Elution with buffer B was performed and fractions with NADP-ME activity were pooled.

2',5'-ADP-Sepharose 4B was swollen and washed with buffer B, packed into a column (1 × 8 cm), equilibrated by washing with buffer B containing 5 mM L-malate and 5 mM MgCl₂, and then used for the separation of NADP-ME. Elution was performed with buffer C (25 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA).

Protein concentration was determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as standard¹³.

The Enzyme Activity Assays

The NADP-ME activity was determined spectrophotometrically (Hellios α, Thermo Spectronic) at 21 °C by monitoring NADPH production at 340 nm. The NADP-ME assay mixture contained 80 mM 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS)–20 mM sodium ace-

tate-NaOH buffer (pH 7.4), 16 mM L-malate, 2 mM MgCl₂ and 0.2 mM NADP⁺ in total volume of 1 cm³. The reaction was started by addition of the enzyme. Apparent Michaelis constants ($S_{0.5}$ constants, respectively) of NADP-ME for the substrates and cofactors were determined by varying its concentration and maintaining the other substrates and cofactors concentrations saturating (16 mM L-malate, 0.2 mM NADP⁺ and 2 mM cofactor). Kinetic parameters were obtained by fitting the data from a substrate saturation curve to the equation: Michaelis-Menten equation (A); Hill equation (B); expression, which describes two binding sites for Mg²⁺ ions¹⁴ (C)

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad (A)$$

$$v = \frac{V[S]^n}{[S_{0.5}]^n + [S]^n} \quad (B)$$

$$v = \frac{V_1[S]^{n_1}}{[S_{0.5_1}]^{n_1} + [S]^{n_1}} + \frac{V_2[S]^{n_2}}{[S_{0.5_2}]^{n_2} + [S]^{n_2}} \quad (C)$$

where V is apparent maximal velocity of enzyme reaction ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$), $[S]$ substrate concentration (mol l^{-1}), K_m Michaelis constant (mol l^{-1}), $S_{0.5}$ is substrate concentration when the reaction rate is half of the maximal velocity in non-Michaelis-Menten kinetics, and n is Hill coefficient under the given experimental conditions. The data were processed by non-linear regression with MS Excel program.

The pH optimum of NADP-ME was measured utilizing 80 mM MOPS-20 mM sodium acetate-NaOH buffer (pH 6.5-7.7) and 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.1-9.0).

Electrophoretic Separations

Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was carried out according to Laemmli¹⁵ using a Biometra apparatus. Gels (10%) were stained for protein with Coomassie Brilliant Blue. Native gel electrophoresis was performed according to Lee and Lee¹⁶. The gels (6%) were assayed for the NADP-ME activity by incubating in a solution of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 10 mM L-malate, 10 mM MgCl₂, 2 mM NADP⁺, 0.1 mg ml⁻¹ Nitroblue Tetrazolium chloride and 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ phenazine methosulfate at room temperature⁹.

Isoelectric focusing was performed according to the Pharmacia manual except the prolongation of the procedure to 6000 V h instead of 3500 V h. The standard protein mixture obtained from Serva was used for calibration.

RESULTS*Localization of NADP-ME in Tobacco Plants*

The localization of NADP-ME was studied in tobacco leaf midribs by staining for its activity (Figs 1A–1C). The dark blue colour, which is formed by

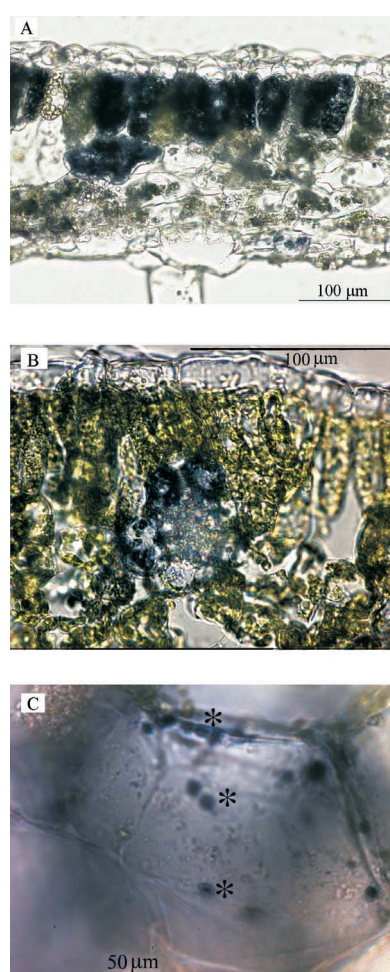


FIG. 1
Histochemical localization of the NADP-ME activity on fresh hand-cut section of tobacco leaf. Blue staining indicates the enzyme activity. Cross-section of the tobacco leaf (A), more detailed view of leaf cross-section (B), detailed view of mesophyll cell with stained chloroplast (C). Chloroplasts marked by * showed the NADP-ME activity

reduction of Nitroblue Tetrazolium chloride and phenazine methosulfate, corresponds to activity of NADP-ME. Figures 1A and 1B document higher activity of NADP-ME in the cells surrounding the bundle sheets than in other cells of tobacco leaf, i.e. L-malate transported in veins can be decarboxylated in these surrounding cells. Within the cell, NADP-ME is localized particularly in the chloroplasts. In Fig. 1C the chloroplasts are marked with asterisk. However, the presence of this enzyme in other cell compartments, such as vacuole or cytosol, cannot be excluded.

Purification of NADP-ME

The enzyme was isolated from seven-week old tobacco plants and purified to a final specific activity of $0.95 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, using chromatography on DEAE-cellulose followed by gel and affinity chromatography. The purification procedure is summarized in Table I. Purified NADP-ME was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE). The band with molecular weight of 67 000 corresponded to NADP-ME. Another band with lower molecular weight was also present, but it was probably a contaminant protein (Fig. 2A). This was proved by non-denaturing electrophoresis tested for NADP-ME activity, which showed only the presence of one protein band with the NADP-ME activity (Fig. 2B). Native isoelectric focustion assayed for activity indicated also only one form of NADP-ME, with the estimated isoelectric point pI 5.5 (Fig. 2C).

TABLE I
Procedures used for purification of NADP-ME from tobacco leaves

Step	Total protein mg	Total activity $\mu\text{mol min}^{-1}$	Specific activity $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Purification fold	Yield %
Crude extract	67.62	0.99	0.015	1	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	29.61	0.73	0.025	2	74
Dialysis	25.83	0.65	0.025	2	65
DEAE-cellulose	3.84	0.34	0.088	6	34
Gel chromatography	0.36	0.21	0.591	41	22
Affinity chromatography	0.04	0.04	0.950	65	4

Kinetic Properties of NADP-ME

The activity of NADP-ME was pH-dependent, having pH optimum between 7.1 and 7.4. A significant decrease in the enzyme activity was found below pH 6.8 and above pH 7.6 (Fig. 3).

NADP-ME is known² to catalyze oxidative decarboxylation of L-malate in the presence of divalent metal ions, particularly Mg^{2+} . Therefore, in addition to Mg^{2+} ions, other ions such as Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} were also analyzed (Table II). While Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Co^{2+} ions acted as the NADP-ME cofactors stimulating the enzyme activity (Table II), Ca^{2+} and Cu^{2+} were ineffective (not shown). The presence of a divalent metal ion is essential, no NADP-ME activity was observed without this cofactor. Zero activity without addition of divalent metal ions to the reaction mixture also confirms, that the enzyme extract is free of divalent metal ions after all isolation procedures. The Mn^{2+} ions served as the most efficient cofactor of NADP-ME, being 1.4-fold more efficient than Mg^{2+} ions (Table II). Ni^{2+} and Co^{2+} ions were less effective to stimulate the NADP-ME activity, exhibiting

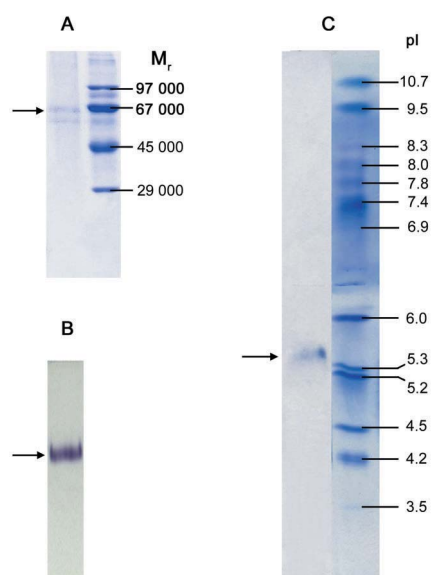


FIG. 2
NADP-ME from tobacco leaves separated by SDS-PAGE stain-tested for proteins (A), by native electrophoresis stain-tested for enzyme activity (B), by isoelectric focusing stain-tested for enzyme activity (C). Positions of molecular weight markers (A) and isoelectric focusing markers are indicated on the right-hand side

only 54 and 59% of the value of the reaction rate in the presence of Mg^{2+} ions, respectively. The activity of NADP-ME in the presence of Zn^{2+} was only 20% compared with Mg^{2+} ions (not shown).

The experimental data obtained from the dependence of the reaction rate on the concentration of MgCl_2 corresponded to the equation that describes two binding sites for Mg^{2+} ions (see Eq. (C) in Experimental). The particu-

TABLE II
Kinetic parameters of NADP-ME from tobacco leaves characterizing the dependence of the reaction rate on the concentration of Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} ions

Cofactor	Mg^{2+}		Mn^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}
	1	2			
$S_{0.5}$ (Me^{2+}), mM	0.21 ± 0.03	1.15 ± 0.55	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.16 ± 0.02
n	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.5	7.5 ± 1.3	3.0 ± 0.3	1.3 ± 0.1
V , $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	0.42 ± 0.07	0.65 ± 0.11	1.49 ± 0.25	0.63 ± 0.11	0.58 ± 0.10

Measured with 16 mM L-malate and 0.2 mM NADP^+ at 21 °C, SEMs were calculated from at least 3 sets of data. V is apparent maximal velocity, $S_{0.5}$ substrate concentration when the reaction rate is half of maximal velocity in non-Michaelis-Menten kinetics, n Hill coefficient under the given experimental conditions. Column 1: the first binding site for Mg^{2+} ions, column 2: second binding site for Mg^{2+} ions.

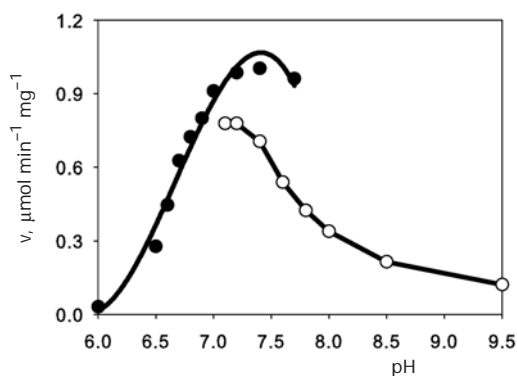


FIG. 3
Effect of pH on activity of NADP-ME from tobacco leaves. ● 80 mM MOPS-20 mM sodium acetate-NaOH buffer (pH 6.5-7.7), ○ 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.1-9.0)

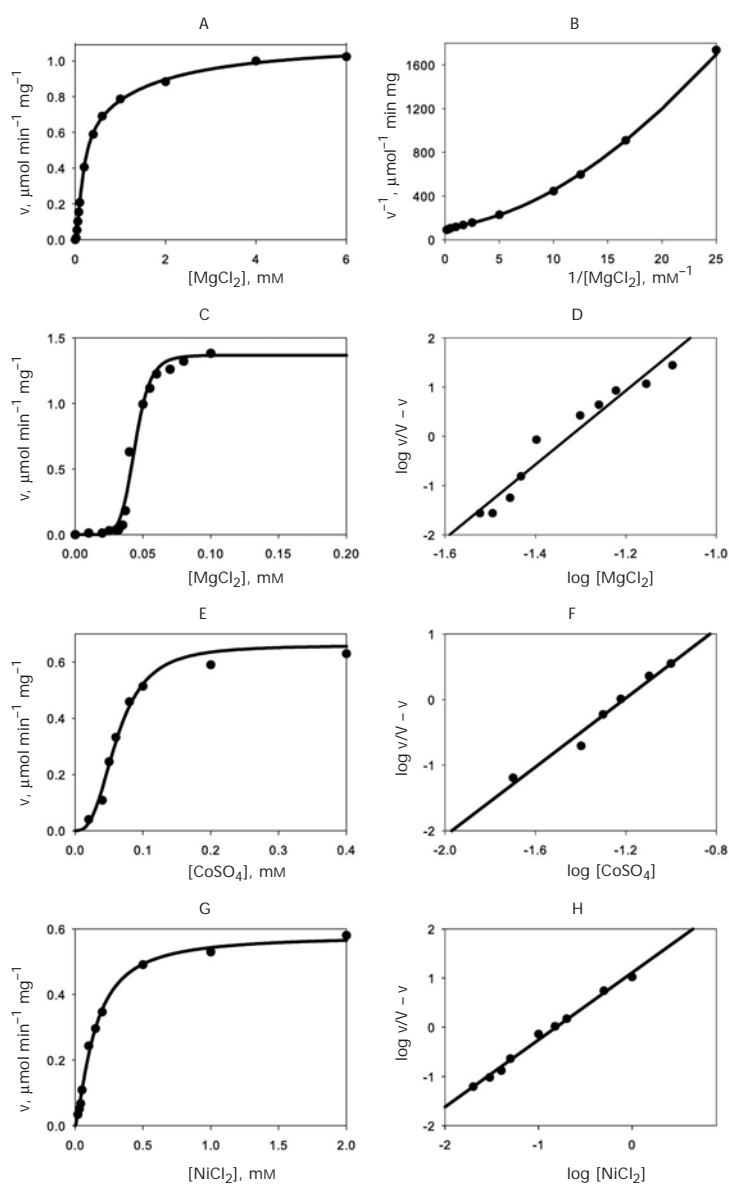


FIG. 4

Effect of increasing concentrations of divalent metal ions on the reaction rate of NADP-ME from tobacco leaves. The concentrations of L-malate and NADP⁺ were at saturating levels. Mg²⁺ saturation curve of NADP-ME (A), double reciprocal plots (B), Mn²⁺ saturation curve of NADP-ME (C), Hill plots (D), Co²⁺ saturation curve of NADP-ME (E), Hill plots (F), Ni²⁺ saturation curve of NADP-ME (G), Hill plots (H)

lar constants for both binding sites $S_{0.5}$ (concentration of MgCl_2 at half-saturation; for first binding site (subscript 1) and for second binding site (subscript 2), $S_{0.5_1}$, $S_{0.5_2}$) and V (maximal reaction rate, V_1 , V_2) were calculated (Table II). The mild positive cooperativity in the presence of variable concentrations of Mg^{2+} characterized by Hill coefficients of 1.6 and 1.2 for these two binding sites were found (Figs 4A and 4B, Table II).

A typical sigmoidal kinetic curve, indicating a positive cooperativity, was detectable in the presence of different concentrations of MnCl_2 . The value of the $S_{0.5}$ was equal to 0.04 mM, the value of Hill coefficient was 7.5 (Figs 4C and 4D, Table II). The enzyme kinetics in the presence of variable concentrations of Co^{2+} and Ni^{2+} ions was analogous to that in the presence of Mn^{2+} ions, but the positive cooperativity characterized by values of Hill coefficients and maximal reaction rate was much lower (Figs 4E–4H, Table II).

The divalent metal ions affected the affinity of NADP-ME to L-malate (Table III). Hyperbolic kinetic curves were found for the NADP-ME reactions in the presence of different concentrations of L-malate and all the ions tested in the study (Fig. 5A). The values of apparent K_m for L-malate at saturation level of NADP^+ and relevant metal ions are summarized in Table III. For comparison, we calculated values of Michaelis constants in the presence of Mg^{2+} using association constants Mg–malate (Table IV). The highest K_m value for L-malate was found in the presence of MgCl_2 , whereas K_m was twice lower with MnCl_2 . None of the tested ions affected the affinity of NADP^+ to the NADP-ME (Fig. 5B, Table III). No inhibition of NADP-ME by L-malate was found (Fig. 5A).

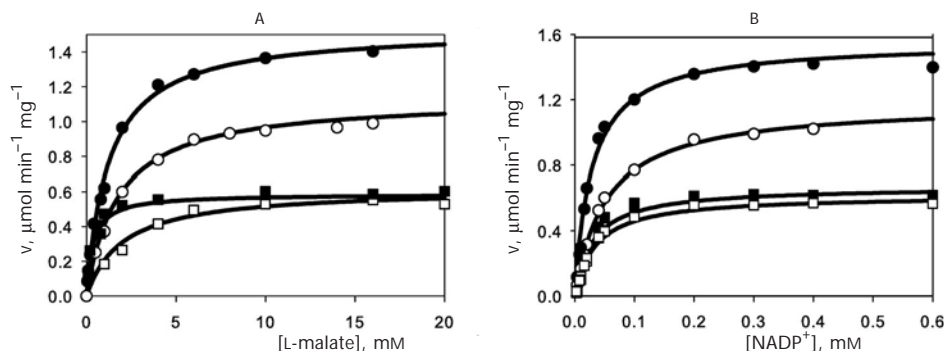


FIG. 5 Effect of L-malate concentration (A) and NADP^+ concentration (B) on the reaction rate of NADP-ME from tobacco leaves in the presence of divalent metal ions. ● 2 mM Mn^{2+} , ○ 2 mM Mg^{2+} , ■ 2 mM Co^{2+} , □ 2 mM Ni^{2+}

TABLE III
Apparent Michaelis constants of NADP-ME for L-malate and NADP⁺ at saturating concentrations (2 mM) of Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ and Ni²⁺ ions

Cofactor	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺
K_m (L-malate), mM	2.0 ± 0.4	1.4 ± 0.4	0.4 ± 0.1	2.2 ± 1.1
K_m (NADP ⁺), mM	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01

SEMs were calculated from at least 3 sets of data.

TABLE IV
Kinetic parameters NADP-ME calculated using association constants (Me²⁺-L-malate): Michaelis constants NADP-ME for L-malate in the presence of Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ and Ni²⁺ ions and $S_{0.5}$ for Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ and Ni²⁺ ions

Cofactor	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	
$\log \beta$ (Me ²⁺ -L-malate) ²⁸		1.71	2.24	2.82	3.17
K_m (L-malate), mM		1.8 ± 0.4	1.1 ± 0.3	0.17 ± 0.02	0.72 ± 0.25
$S_{0.5}$ (Me ²⁺), mM	0.11 ± 0.03	0.67 ± 0.37	0.03 ± 0.01	0.010 ± 0.006	0.006 ± 0.001
n	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.5	7.5 ± 1.3	2.8 ± 0.3	1.3 ± 0.1

DISCUSSION

The results shown in this paper demonstrate that in young tobacco leaves only one form of NADP-ME is present. It follows from our data: (i) using native gel electrophoresis, only one band detecting the enzyme activity was found (Fig. 2); (ii) likewise, using native focustation, only one band detecting the enzyme activity was observed (Fig. 2); (iii) symmetric peaks of NADP-ME activity were evident after all chromatographic separations, especially after DEAE-cellulose chromatography, when the enzyme is eluted by a very mild gradient of ionic strength; (iv) localization of NADP-ME activity in chloroplasts (Fig. 1). Even though these data strongly suggest that the NADP-ME in green tobacco leaves is present as one isoform, other isoforms localized in other parts of tobacco plant or taking part in the metabolism of other developmental stages of the plant cannot be excluded. Indeed, in other C₃ plants, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*, the genes for four NADP-MEs were found^{4,5}. However, in these plants the proteins of individual isoforms were not investigated.

Figure 1C demonstrates that most enzyme activity is localized in chloroplasts and the contribution of possible cytosolic isoform is negligible. NADP-ME was detected via enzyme activity (see Experimental), not immunohistochemically, which could interfere with heat shock protein 70¹⁷.

A higher activity of NADP-ME was found in cells surrounding the veins (Fig. 1B) although NADP-ME was detected also in other mesophyll cells (Fig. 1A). Hibberd and Quick reported similar results, decarboxylation activity of NADP-ME in stems and petioles of tobacco and celery plants can cover a part of CO₂ supply required for photosynthesis under higher energy needs¹⁸.

In order to characterize the properties of non-photosynthetic C₃ NADP-ME, we isolated the enzyme from leaves of tobacco. The isolated enzyme with the specific activity 0.95 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ was obtained during the isolation procedure. The activity detected for the isolated enzyme is much lower than that of the enzyme isolated from maize leaves (30.9 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$), but it is comparable with the activity of the enzyme isolated from etiolated maize leaves (leaves developed without chlorophyll by being deprived of light) (1.4 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$), maize roots (1.4 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$), and wheat (0.98 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)^{2,19,20}. The specific activity of NADP-ME from tobacco leaves is comparable with the enzyme activities of other C₃ plants and with those of non-photosynthesizing parts of C₄ plants. Moreover, the values of pH optimum of NADP-ME from tobacco leaves correspond to pH optimum of the NADP-ME of other C₃ plants such as wheat²⁰. In contrast, the pH optimum of photosynthetic form (C₄) of this enzyme lies in the alkaline region, at pH 8.0².

There are different values of the isoelectric point (*pI*) of NADP-ME from green leaves and from non-photosynthetic parts of maize². The *pI* value of NADP-ME from tobacco leaves, 5.5 (see Fig. 2C), is analogous to that of NADP-ME from maize roots and etiolated leaves⁹.

Malic enzymes isolated from various sources require Mg²⁺ or Mn²⁺ ions for their activity. Generally, NADP-MEs from plants are known to prefer Mg²⁺ to Mn²⁺ ions^{2,21,22}, but the activity of the enzyme from tobacco leaves was stimulated more efficiently (by 140%) in the presence of Mn²⁺ compared with Mg²⁺ ions (Table II). This effect was observed also for malic enzymes of animal origin^{23,24}. We have also tested other ions for their ability to substitute Mg²⁺ and Mn²⁺ and proved that Co²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ could act as additional cofactors of tobacco NADP-ME. However, they were less effective than Mg²⁺ and Mn²⁺ ions. Co²⁺ was found also by other authors to stimulate NADP-ME from maize leaves²².

Another target of our study was the investigation of the affinity of NADP-ME to various substrates (L-malate, NADP⁺) in the presence of divalent metal ions. Divalent metal ions form complexes with organic acid anions such as L-malate, oxaloacetate, pyruvate and coenzyme NADP(H), which are all components of the reaction mixture for measurement of NADP-ME activity. Therefore, it is very complicated to consider the incidence of all these factors because of equilibrium between all complexes, which is influenced not only by association constants but also by the actual concentrations of substrates and products in the course of the reaction. A further problem is to determine the accurate values of these constants. Even though the values of the constants were partly estimated by more authors about 30 years ago²⁵⁻²⁷, some of the constants are not available. This is a reason why we used in our calculations analytical concentrations of metal ions and other compounds.

For comparison, we calculated values of Michaelis constants in the presence of Mg²⁺ using association constants Mg-malate, which are available not only for Mg²⁺, Mn²⁺, but also for Co²⁺ and Ni²⁺ ions²⁸. The values are summarized in Table IV.

The values of apparent Michaelis constants for L-malate and NADP⁺ of enzymes from C₄, CAM and C₃ plants in the presence of Mg²⁺ were reviewed by Drincovich et al.². The value of Michaelis constant of NADP-ME for L-malate is lower for the enzyme of C₄ plants (i.e. 0.08–0.46 mM) than for that of wheat (0.96 mM)^{2,29}. We found higher values of this constant for NADP-ME from tobacco leaves (see Table III). Nevertheless, we detected that in the presence of Mn²⁺ and predominately Co²⁺ the K_m value of NADP-ME for L-malate is lower and thus comparable with those reported for other plants². In C₄ plants, inhibition of NADP-ME by excess of L-malate was described². No such inhibition was observed in our results (Fig. 5A); this is in agreement with other C₃ plants². The K_m value of NADP-ME for NADP⁺ in C₄ plants is 3.15–12 μM and that of wheat (37 μM) is the same as that of NADP-ME from tobacco leaves (see Table III). The affinity of tobacco NADP-ME to NADP⁺ was not affected by the presence of other metal ions. Variations in the affinity of plant NAD-ME to L-malate and also to NAD⁺ in the presence of Mg²⁺, Mn²⁺ and Co²⁺ were found³.

As demonstrated in this work, more than one binding site (probably two binding sites) for Mg²⁺ ions might be situated in one subunit of NADP-ME from tobacco leaves with different affinity to Mg²⁺. This is in agreement with properties of malic enzyme from maize² and sugar-cane²⁹. Moreover, we found the sigmoidal kinetics for the reaction catalyzed with NADP-ME from tobacco in the presence of variable concentrations of Mn²⁺, with pro-

nounced positive cooperativity. The value of the Hill coefficient was 7.5, which might indicate the presence of at least two binding sites also for Mn^{2+} in one subunit of the enzyme. The binding of Co^{2+} and Ni^{2+} showed also positive cooperativity, although the value of the Hill coefficient was lower.

Our results showed that the regulation of NADP-ME from tobacco is affected not only by the substrate accessibility, but also by the presence of different concentrations of divalent metal ions such as Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} . They differ in some properties; of those the ionic radius is probably the most important. Only ions with the radius 72–80 pm could bind to the NADP-ME molecule, which becomes able to catalyze enzyme reactions. Larger ions (i.e. Ca^{2+} and Cu^{2+}) are not able to play this role. The different character of Mg^{2+} and other ions, such as Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , can be explained by their different ability to deform electron cloud and their different polarization potentials. Mg^{2+} ion is a “hard” Lewis acid, while Mn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} are on the borderline³⁰.

The physiological role of these metal ions in regulation of NADP-ME is unclear. One of the reasons is that the exact concentration of those ions is not known in relevant cell compartments. Nevertheless, we suggest that in spite of its low content present in cells, Mn^{2+} may affect the activity of NADP-ME by smaller changes in its concentration even more efficiently than Mg^{2+} ions. This suggestion is supported by results found in our previous work¹⁰. We have found an increase in the NADP-ME activity in tobacco plants infected by *Potato virus Y*. Although the virus presence was not proved inside the chloroplasts, the reduction of pigment content and the signs of plastid degradation were found³¹. An increase in Mn^{2+} concentration, which might result from decomposition of the pigment–protein complexes in chloroplasts, could be responsible for the stimulation of the enzymes obtained in these experiments.

This work was supported by grants of the Grant Agency of the Charles University 428/2004 and Grant Agency of the Czech Republic 206/03/0310.

REFERENCES

1. Edwards G. E., Andreo C. S.: *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1845.
2. Drincovich M. F., Casati P., Andreo C. S.: *FEBS Lett.* **2001**, *490*, 1.
3. Wedding R. T.: *Plant Physiol.* **1989**, *90*, 367.
4. Wheeler M. C. G., Tronconi M. A., Drincovich M. F., Andreo C. S., Flügge U. I., Maurino V. G.: *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 39.

5. Chi W., Yang J., Wu N., Zhang F.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 1865.
6. Cushman J. C., Bohnert H. J.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 305.
7. Saigo M., Bologna F. P., Maurino V. G., Detarsio E., Andreo C. S., Drincovich M. F.: *Plant Mol. Biol.* **2004**, *55*, 97.
8. Laporte M. M., Shen B., Tarczyski M. C.: *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 699.
9. Maurino V. G., Saigo M., Andreo C. S., Drincovich M. F.: *Plant Mol. Biol.* **2001**, *45*, 409.
10. Ryšlavá H., Muller K., Semorádová Š., Synková H., Čeřovská N.: *Photosynthetica* **2003**, *41*, 357.
11. Synková H., Valcke R.: *Physiol. Plant.* **2001**, *112*, 513.
12. Synková H., Semorádová Š., Burketová L.: *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **2004**, *79*, 169.
13. Bradford M. M.: *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
14. Canellas P. F., Wedding R. T.: *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *229*, 414.
15. Laemmli U. K.: *Nature* **1970**, *227*, 680.
16. Lee D. H., Lee C. B.: *Plant Sci.* **2000**, *159*, 75.
17. Lara M. V., Drincovich M. F., Müller G. L., Maurino V. G., Andreo C. S.: *Plant Cell Physiol.* **2005**, *46*, 997.
18. Hibberd J. M., Quick W. P.: *Nature* **2002**, *415*, 451.
19. Maurino V. G., Drincovich M. F., Andreo C. S.: *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, *38*, 239.
20. Casati P., Spampinato C. P., Andreo C. S.: *Plant Cell Physiol.* **1997**, *38*, 928.
21. Drincovich M. F., Andreo C. S., Iglesias A. A.: *Plant Physiol. Biochem. (Paris)* **1990**, *28*, 43.
22. Drincovich M. F., Iglesias A. A., Andreo C. S.: *Physiol. Plant.* **1991**, *81*, 462.
23. Hung H. C., Chang G. G., Yang Z., Tong L.: *Biochemistry* **2000**, *39*, 14095.
24. Chang G. G., Tong L.: *Biochemistry* **2003**, *42*, 12721.
25. Apps D. K.: *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *320*, 379.
26. Colman R. F.: *Anal. Biochem.* **1972**, *46*, 358.
27. Grover S. D., Canellas P. F., Wedding R. T.: *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *209*, 396.
28. Martell A. E., Smith R. M., Motekaitis R. J.: *NIST Standard Reference Database 46 (Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes)*, Version 7.0. NIST Standard Reference Data, Gaithersburg (MD) 2003.
29. Iglesias A. A., Andreo C. S.: *Plant Physiol.* **1990**, *92*, 66.
30. Zivarts M., Liu Y., Breaker R. R.: *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 622.
31. Schnablová R., Synková H., Čeřovská N.: *Int. J. Plant Sci.* **2005**, *166*, 713.

The regulation of the NADP-malic enzyme from tobacco leaves

V. Doubnerová*, L. Potůčková, K. Muller, H. Ryšlavá

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, CZ-128 40 Prague 2

* Correspondence to: Veronika Doubnerová

E-mail: doubnerova@volny.cz

Fax number: +420 221 951 283

Abstract

Non-photosynthetic NADP-malic enzyme EC 1.1.1.40 (NADP-ME) catalysing oxidative decarboxylation of L-malate and NADP^+ to produce pyruvate and NADPH, which could be involved in plant defence responses, was isolated from *Nicotiana tabacum* L. leaves. Mechanism of the enzyme reaction was studied by the initial rate method and was found out as ordered sequential one. Possibility of regulation of purified cytosolic NADP-ME was tested.

Intermediates of citric acid cycle (α -ketoglutarate, succinate, fumarate), metabolites of glycolysis (pyruvate, phosphoenolpyruvate, glucose-6-phosphate), compounds connected with lipogenesis (coenzyme A, acetyl-CoA, palmitoyl-CoA) and some amino acids (glutamate, glutamine, aspartate) didn't significantly affect the NADP-ME activity from tobacco leaves. In contrast, macroergic compounds (GTP, ATP and ADP) were strong inhibitors of NADP-ME; a type of inhibition and inhibition constants were determined in the presence of the most effective cofactors (Mn^{2+} or Mg^{2+} ions), required by NADP-ME. Predominantly non-competitive type of inhibitions of NADP-ME with respect to NADP^+ and mixed type to L-malate were found.

Possible functions and properties of NADP-ME from tobacco leaves were discussed.

Key Words: NADP-malic enzyme – macroergic compounds – *Nicotiana tabacum* L– kinetic

mechanism –inhibition.

Abbreviations: c-, cytosolic; CAM, Crassulacean acids metabolism; C₃ plant, a plant that produces the 3-carbon compound 3-phosphoglyceric acid as the first photosynthetic products; C₄ plant, a plant that produces the 4-carbon compound oxaloacetic acid as the first photosynthetic products; m-, mitochondrial; m-NAD-ME, mitochondrial NAD-dependent malic enzyme EC 1.1.1.38; MOPS, 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid; NADP-ME, NADP-dependent malic enzyme EC 1.1.1.40; PVY^{NTN}, *Potato virus Y*, NTN strain.

Introduction

NADP-malic enzyme ([L-malate: NADP⁺ oxidoreductase (decarboxylating)], EC 1.1.1.40, NADP-ME) catalyzes the oxidative decarboxylation of L-malate using NADP⁺ as coenzyme in the presence of divalent metal ions to produce pyruvate, NADPH and CO₂ (Edwards and Andreo 1992, Drincovich et al. 2001). The presence of a cofactor and the coenzyme is required for the reaction. The most effective cations are Mg²⁺, Mn²⁺ (Wedding et al. 1989). NADP-MEs have been found in most living organisms, including prokaryotic and eukaryotic microorganisms, plants (C₃, C₄ and CAM), animals and humans. Their amino acid sequences are highly conserved among various living organisms, suggesting that NADP-MEs may have important biological function (Yang et al. 2002).

Regulation and kinetic mechanism of animal malic enzymes is much better investigated than plant NADP-MEs. In animals, three types of malic enzyme are known: cytosolic NADP⁺-dependent (c-NADP-ME) (EC 1.1.1.40), mitochondrial NAD(P)⁺ dependent (m-NADP-ME) (EC 1.1.1.40) and mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzymes (m-NAD-ME) (EC 1.1.1.38). Mitochondrial m-NAD-ME can use either NAD⁺ or NADP⁺ as cofactors but prefers NAD⁺ under physiological conditions (Chang and Tong 2003).

The crystal structures of the pigeon and rat cytosolic (c-NADP-ME) and of the *Ascaris suum* and human mitochondrial NAD(P)⁺ dependent malic enzyme (m-NAD-ME) are known (Xu et al. 1999; Yang et al. 2002; Chang and Tong 2003). In animals, the cytosolic isoform (c-NADP-ME) is involved in the generation of NADPH for the biosynthesis of fatty acids and steroids in liver and adipose tissues. c-NADP-ME may also have a role in microsomal drug detoxification (Xu et al. 1999). Human mitochondrial m-NAD-ME is believed to have an

important role in metabolism of glutamine for energy production in rapidly proliferating cells and tumors (Xu et al. 1999). The activity of this enzyme is regulated by ATP as an inhibitor and by fumarate as an activator (Yang et al. 2002). Structural studies of m-NAD-ME reveal two ATP-binding sites, one at the NAD⁺ binding site in the active center and the other at the exo site in the tetramer interface. Inhibition of the enzyme activity is due to the competition between ATP and NAD⁺ for the nucleotide-binding site at the active center. Binding of the ATP molecule at the exo site, on the other hand, is important for the maintenance of quaternary structural integrity (Hsu et al. 2004).

NADP-ME in plants is localized in plastids and cytosol (Drincovich et al. 2001). The best characterized is photosynthetic NADP-ME isoform present in chloroplast of bundle sheet cells of some C₄ plants (e. g. maize, sugar cane, sorghum). In this case, NADP-ME plays a key role in photosynthetic metabolism as it generates CO₂ and NADPH (reducing power) in places of Calvin cycle operation; thus it eliminates a photorespiratory loss of CO₂. In CAM plants in addition to supplying CO₂ for Calvin cycle, NADP-ME also provides pyruvate and reductive power for gluconeogenesis. (Edwards and Andreo 1992). The photosynthetic isoform (NADP-ME from maize leaves) is up regulated by light (Tausta et al., 2002). Regulation of maize NADP-ME by various compounds is accomplished either *via* inhibition by an excess of L-malate as a substrate or by other effectors. Several organic acids have been found to inhibit the C₄ NADP-ME (from maize leaves); the strongest inhibition was observed in the presence of oxaloacetate and α -ketoglutarate. Fructose 1,6-bis-phosphate is reported to be an allosteric inhibitor of NADP-ME from the C₄ species (maize, sugar cane and sorghum) and a CAM plant, but an activator for the enzyme from the C₃ species rice (Edwards and Andreo 1992). Photosynthetic NADP-ME (from sugar cane leaves) is also influenced with pH (pH optimum is about 8), which affects oligomerization state of enzyme. The enzyme can readily undergo changes between monomer, dimer and tetramer. All three forms of the enzyme possess enzyme activity, but the highest specific activity occurs at pH 8 for the tetramer form (Edwards and Andreo 1992). Photosynthetic intermediates were tested as possible activators or inhibitors too. At least at a concentration of 1 mmol/l the mono- and di-phosphates of ribulose and fructose, phosphoenolpyruvate, 3-phosphoglycerate, dihydroxyacetone phosphate and orthophosphate had no effect on the activity of NADP-ME isolated from maize leaves (Edwards and Andreo 1992). Recombinant non-photosynthetic isoforms of NADP-ME from *Arabidopsis thaliana* and

Nicotiana tabacum L. were found to be regulated with some intermediates of citric acid cycle (oxaloacetate, fumarate, succinate) and ATP (Müller et al. 2008; Gerrard Wheeler et al. 2008).

The function of non-photosynthetic NADP-ME isoform present in C₃ plants and in non-photosynthetic tissues of C₄ plants is not fully explained. It is assumed that its main role is to supply reduced equivalents (NADPH), for synthetic metabolic pathways such as synthesis of fatty acids. NADP-ME together with phosphoenolpyruvate carboxylase serves to maintain the intracellular pH. NADP-ME also participates in the mechanism of stomatal closure and can affect the water economy of a plant (Laporte et al. 2002). Moreover, NADP-ME function seems to be associated with metabolic response of plants to stress (Maurino et al. 2001; Synková and Valcke 2001; Crecelius et al. 2003; Ryšlavá et al. 2003; Sun et al. 2003; Synková et al. 2004; Chi et al. 2004; Smeets et al. 2005; Saher et al., 2005; Valderrama et al. 2006; Liu et al. 2007). In C₃ plants NADP-MEs are encoded by a small gene family, the expression of which is tissue and ontogenic stage specific. The best-studied family of malic enzymes is from *Arabidopsis thaliana* (C₃ dicot plant) and rice (C₃ monocot plant), where the whole genome sequence is known (Gerrard Wheeler et al. 2005, Chi et al. 2004). Two recombinant isoforms of *Nicotiana tabacum* L. were fully characterized (chloroplastic Nt-NADP-ME1 and cytosolic Nt-NADP-ME2) and the transcript of a third putative NADP-ME has also been identified (Müller et al. 2008).

Previously we have characterized NADP-ME from tobacco leaves (Ryšlavá et al. 2007). The objective of the present communication is the study of the kinetic mechanism of NADP-ME reaction that has not been described for any plant enzyme as well as detailed inhibition studies with important inhibitors.

Materials and Methods

Plant material

Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) were grown in a greenhouse under 22/18 °C day/night temperatures. Seeds were sown in pots with sand and plantlets were transferred to soil after 3 weeks. Leaves of seven-week old plants were collected, frozen immediately in liquid N₂ and stored at -75 °C.

Enzyme purification

A modified procedure described by Ryšlavá et al. (2007) was used for the purification of NADP-ME enzyme from tobacco leaves. In contrast to previously used method, homogenization buffer contained in addition 330 mM sorbitol. Chromatography on DEAE-cellulose, Sephacryl S-300 and finally on a 2'5'-ADP-Sepharose yielded a purified enzyme preparation with specific activity 0.95 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Purified NADP-ME was stored at 4 °C for further studies.

The enzyme activity assays

The NADP-ME activity was determined spectrophotometrically (Hellios α , Thermo Spectronic) at 21 °C by monitoring NADPH production at 340 nm as previously indicated Ryšlavá et al. 2003.

Kinetic studies

The initial-rate study of kinetic mechanism of NADP-ME was performed by varying the concentrations of free NADP⁺ (0.025 - 0.166 mmol/l) and varying the concentration of free L-malate (0.879 - 14.633 mmol/l). Association constants for Me²⁺-NADP⁺ and Me²⁺-L-malate complexes described by Grover et al. (1981) were used. Concentrations of other compounds were constant (4 mmol/l MgCl₂, 80 mmol/l MOPS-20 mmol/l sodium acetate-NaOH buffer (pH 7.4)). Experimental data were fitted using the equations characterizing two-substrate mechanism. The

sequential initial-rate pattern (Eq. 1) was found to be the best suitable. Differentiation between order sequential and random sequential mechanisms was achieved by scrutiny of the constants K' and constants V'_{lim} (calculated from Eq. 2,3 and 4) versus L-malate concentration and versus $NADP^+$ concentration, respectively.

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

$$K' = \frac{K_A \cdot K_{mB}}{K_{mB} + [B]} \quad (2)$$

$$K' = \frac{K_A \cdot K_{mB}}{[A]} + K_{mB} \quad (3)$$

$$V'_{lim} = \frac{V_{lim} \cdot [B]}{K_{mB} + [B]} \quad (4)$$

where v is initial reaction rate, V_{lim} is apparent maximal reaction rate, $[A]$, $[B]$ substrate concentrations; $K_{mA(B)}$ Michaelis constant for the particular substrate, K_A dissociation constant for complex enzyme-substrate A, B, K' apparent Michaelis constant (Marangoni 2003).

Effect of various compounds on the NADP-ME activity

The NADP-ME assay mixture contained 80 mmol/l MOPS-20 mmol/l sodium acetate-NaOH buffer (pH 7.4), 16 mmol/l L-malate, 4 mmol/l $MgCl_2$ and 0.2 mmol/l $NADP^+$ in total volume of 1 cm^3 . Alternatively, the reaction mixture contained subsaturation concentration of some substrate: 2 mmol/l L-malate, 2 mmol/l $MgCl_2$ or 0.05 mmol/l $NADP^+$, respectively. The reaction was started by an addition of the enzyme. The tested concentration of potential modulators (GTP, ATP, ADP, puruvate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate, glutamate, glutamine, aspartate, phosphoenolpyruvate, and glucose-6-phosphate) in the reaction mixture was 2 mmol/l or 5 mmol/l. In the case of compounds related to lipogenesis (coenzyme A, acetyl-coenzyme A and palmitoyl-coenzyme A) their concentration in the reaction mixture was 0.01

mmol/l or 0.1 mmol/l. The NADP-ME activity without additions of potential regulators was taken as 100%.

Inhibition studies

Inhibition constants and type of inhibition for GTP, ATP and ADP were established with 3 concentration of inhibitor towards 5 various concentration of L-malate (free concentrations result from particular graphs in Fig. 2-4A,B) or 5 various concentrations of NADP⁺ (free concentrations result from particular graphs in Fig. 2-4 C,D) and in the presence of Mg²⁺ (Fig. 2-4A,C) or Mn²⁺ ions (Fig. 2-4B,D). The saturation NADP-ME assay mixture for inhibition studies together with varying substrates and inhibitors contained 80 mmol/l MOPS-20 mmol/l sodium acetate-NaOH buffer (pH 7.4), 2 mmol/l MgCl₂ or 0.1 mmol/l MnCl₂ in total volume of 1 cm³. The reaction was started by addition of the enzyme. Concentrations of free inhibitors ATP, ADP and GTP are listed in figure legends (Fig. 2,3,4 respectively). The free ATP (GTP, ADP) was calculated using association constants of complexes ATP - Mg²⁺ (log β = 4.29), ATP - Mn²⁺ (log β = 5.01), GTP - Mg²⁺ (log β = 4.31), GTP - Mn²⁺ (log β = 5.36), (log ADP - Mg²⁺ (log β = 3.36) and ADP - Mn²⁺ (log β = 4.22) (Sigel et al. 2004, Sigel et al. 2001, Bianchi et al. 2003). In the presence of ATP (GTP and ADP), the chelations by the substrate or cofactors are negligible (Hsu et al. 2004). Inhibition constants were obtained by fitting the experimental data to the equation (5: equation characterizing non-competitive inhibition, 6: equation characterizing competitive inhibition, 7: equation characterizing mixed inhibition) (Bisswanger 2002):

$$v = \frac{V_{\text{lim}}[A]}{(K_m + [A])\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (5) \qquad v = \frac{V_{\text{lim}}[A]}{K_m\left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [A]} \quad (6)$$

$$v = \frac{V_{\text{lim}}[A]}{K_m\left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)[A]} \quad (7)$$

where V_{lim} is apparent maximal reaction rate, $[A]$ substrate concentration; $[I]$ inhibitor concentration; K_m Michaelis constant for the substrate, K_{ic} , K_{iu} inhibition constants for inhibitor

(free ATP, ADP or free GTP) derived by slope (intercept respectively) in Lineweaver-Burk plot. The data were processed by non-linear regression with MS Excel program.

Results

Mechanism of two-substrate reaction catalyzed by NADP-ME

Kinetic mechanism of reaction catalyzed by non-photosynthetic isoform of NADP-ME present in leaves of *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1 (C₃ plant) was analyzed by initial rate studies with 5 various concentrations of NADP⁺ at 5 fixed concentrations of L-malate as sequential (Fig. 1A,B). This type of two-substrate reaction is distinguished by all lines intercept in one point at (or above) x axis in double reciprocal plot (Fig. 1A,B). Ping-pong mechanism characteristic with set of parallel lines in double reciprocal plot was excluded. Dependence of apparent Michaelis constants (K') and V'_{lim} calculated from Eq. 2,3 and 4, respectively on the concentration of fixed substrate was used for the additional specification of sequential mechanism, which was determined as ordered (Fig. 1C,D,E). Fig. 1E (substrate 's concentration dependence of V'_{lim}) indicate, that second substrate to bind to the enzyme is L-malate. From determinations of K' at different concentrations of substrate it is possible to obtain estimates of K_{mB} and K_A .

Inhibition of NADP-ME by macroergic compounds

NADP-ME from tobacco leaves was inhibited by ATP, ADP and GTP. ATP and GTP are stronger inhibitors than ADP (Table 1). Detailed inhibition studies were carried out with ATP, ADP and GTP as inhibitors with respect to L-malate and NADP⁺ in the presence of Mg²⁺ or Mn²⁺ ions as NADP-ME cofactors (Fig. 2,3,4). Based on various diagnostical plots of experimental sets of data (double reciprocal plot (Figs. 2,3,4), Dixon plot, Hanes-Woolf plot, Woolf-Augustinsson-Hoffstee plot (data not shown)), it was concluded, that ATP (GTP, ADP) concentration have to be corrected for Me²⁺ - ATP (Me²⁺ - GTP, Me²⁺ - ADP) complex, because only free ATP (GTP, ADP) was assumed to be the inhibitory species (Hsu et al. 2004).

ATP, ADP and GTP are non-competitive inhibitors with respect to NADP⁺

Dependences of the enzyme reaction rate on NADP^+ concentration were measured in the presence of 3 concentrations of inhibitors (ATP, GTP or ADP) and Mg^{2+} or Mn^{2+} ions. Lines in double reciprocal plots of these dependences are in all cases intercepted at the x axis (Fig. 2C,D; Fig. 3C,D; Fig. 4C,D), indicating non-competitive type of inhibition.

It means that macroergic inhibitors (ATP, GTP or ADP) are bound to the other site than binding site for coenzyme NADP^+ . Relevant inhibition constants are summarized in Table 1. $K_{i, \text{ADP (free)}}$ is in the presence of Mg^{2+} ions approximately 10-times higher than $K_{i, \text{ATP (free)}}$ and $K_{i, \text{GTP (free)}}$ and also in the presence of Mn^{2+} ions is $K_{i, \text{ADP (free)}}$ the highest constant (7-times higher than $K_{i, \text{ATP (free)}}$ and 12-times higher than $K_{i, \text{GTP (free)}}$).

ATP, ADP and GTP are predominantly mixed inhibitors with respect to L-malate

Detailed kinetic studies of NADP-ME inhibition by ATP (GTP) with respect to L-malate in the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} ions showed mixed type of inhibition. In double reciprocal plot all lines meet in a joint intercept left of the ordinate, i.e., they differ in gradient and ordinate intercept, because this type of inhibition influences both the apparent Michaelis constant and the maximum rate Fig. 2A,B; Fig. 3A,B; Fig. 4A,B. Two constants K_{ic} and K_{iu} characterizing this type of inhibition are for both inhibitors (ATP and GTP) and cofactors (Mg^{2+} and Mn^{2+} ions) summarized in Table 1. ADP was with respect to L-malate milder inhibitor than ATP. Inhibition of NADP-ME by ADP toward L-malate was in the presence of Mg^{2+} evaluated as competitive, whereas in the presence of Mn^{2+} ions mixed analogous to inhibitors ATP and GTP.

Effect of other compounds on NADP-ME activity

Five groups of compounds important in metabolism were tested as inhibitors or modulators of NADP-ME activity: macroergic compounds (ATP, ADP, and GTP), intermediates of citric acid cycle (α -ketoglutarate, succinate, fumarate), metabolites of glycolysis (glucose-6-phosphate, phosphoenolpyruvate, pyruvate), compounds related to lipogenesis (coenzyme A, acetyl-CoA, palmitoyl-CoA) and some amino acids (glutamate, glutamine, aspartate). The influence of these compounds was tested as possible modulators with respect to L-malate and to NADP^+ not only at

saturating concentrations, but also at sub-saturation concentrations to indicate e.g. competition between inhibitor and NADP-ME substrate. Only macroergic compounds (ATP, ADP and GTP) significantly affect (inhibit) the NADP-ME activity. Other compounds, with exception of a slight inhibition effect of intermediates of glycolysis, did not influence the NADP-ME activity within the frame of S. E. M. (Table 2).

Discussion

In this paper, the mechanism of the reaction catalyzed by the non-photosynthetic NADP-ME from tobacco leaves and its regulation possibilities were studied.

Although the enzyme is in tobacco both in chloroplast and in cytosol, we work likely with cytosolic isoform because: i) chloroplast were removed during the enzyme isolation (see Methods, Enzyme purification) ii) the activity of NADP-ME in the chloroplastic fraction is much lower than in soluble cytosolic fraction (data not shown), iii) the transcription and translation of NADP-ME in cytosol is much higher than in chloroplasts (Müller et al. 2008) and iv) the kinetic parameters determined for purified NADP-ME from tobacco leaves (Ryšlavá et al. 2007) is in good agreement with those published for recombinant cytosolic NADP-ME (Müller et al. 2008).

The mechanism of the two-substrate reaction catalyzed by mitochondrial NAD(P)-ME from *Ascaris suum* was found to be random sequential (Aktas and Cook 2008), while the cytosolic NADP-ME from pigeon liver and human breast cancer cell lines were established as ordered sequential one (Hsu et al. 1967; Chang et al. 1992). Similarly, kinetic studies of mitochondrial NAD(P)-ME from hepatoma tumor cells were consistent with an ordered sequential mechanism (Teller et al., 1992). As far as we know, the reaction mechanism of plant NADP-ME has not been studied yet.

The reaction mechanism catalyzed by NADP-ME from tobacco leaves was found to be ordered sequential (Fig. 1). It means that the enzyme must bind only one substrate first (substrate A), followed by binding of substrate B, to form the ternary complex enzyme-substrate A-substrate B. (Marangoni 2003). With respect to the Fig 1E, which can be used as an indicator of substrate-binding order (a fixed substrate's concentration dependence of V'_{lim} is associated with the second substrate to bind the enzyme) (Marangoni 2003) and from results shown in Fig. 1C,D, we supposed, that $NADP^+$ is leading substrate followed by L-malate. This mechanism is analogous to animal cytosolic NADP-ME (Hsu et al. 1967; Chang et al. 1992).

Our results indicate that the regulation of non-photosynthetic NADP-ME from C_3 plant tobacco differ from that of human m-NAD-ME. No activation of NADP-ME from tobacco leaves by citric acid cycle intermediates (α -ketoglutarate, succinate, fumarate) was observed, while the human m-NAD-ME activity can be allosterically activated by fumarate (Hsieh et al. 2006, Hsu et al. 2004). Also next two tested groups: compounds related to lipogenesis (coenzyme A, acetyl-CoA and palmitoyl-Co) and amino acids (glutamate, glutamine and aspartate) haven't been found

as regulators of natural NADP-ME from tobacco leaves. On the other hand, fumarate, oxaloacetate, pyruvate, ATP, CoA and glucose-6-phosphate are potent regulators of recombinant cytosolic tobacco Nt-NADP-ME2 and recombinant cytosolic Arabidopsis AtNADP-ME1, (Müller et al. 2008; Gerrard Wheeler et al. 2008). Significantly increased activity of AtNADP-ME1 was observed in the case of succinate (Gerrard Wheeler et al. 2008). However, recombinant proteins may not be consistent with native proteins or proteins isolated from fresh material. Recombinant protein can differ in 3D structure and in oligomerization state that can affect enzyme properties.

NADP-ME from germinating *Ricinus communis* cotyledons was activated by coenzyme A, acetyl-CoA, palmitoyl-CoA and succinate. Therefore, the cotyledon NADP-ME was suggested to play a role in metabolism of fatty acids (Colombo et al. 1997).

Macroergic compounds have been found as NADP-ME inhibitors. Although the inhibitors of NADP-ME from tobacco and from human m-NAD are the same (ATP, ADP), human m-NAD-ME differs in type of inhibition. We established non-competitive inhibition of NADP-ME by ATP, GTP and the ADP with respect to NADP^+ and predominantly mixed inhibition by ATP, GTP and ADP to L-malate in the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} ions, whereas inhibition of human m-NAD-ME by ATP toward NAD^+ and L-malate is competitive. Free ATP (GTP, ADP respectively) was assumed as the inhibiting species in both tobacco NADP-ME (by evaluating various diagnostically plots) and in human m-NAD-ME (from structural studies) (Hsu et al. 2004). Divalent metal ions (cofactors) significantly influenced inhibition constants. The values of $K_{i, \text{ATP (free)}}$, $K_{i, \text{GTP (free)}}$ and $K_{i, \text{ADP (free)}}$ for non-competitive inhibition by ATP (GTP, ADP) toward NADP^+ were in the presence of Mn^{2+} ions lower than in the presence of Mg^{2+} ions, it means that ATP (GTP, ADP) is in the presence of Mn^{2+} ions as cofactor stronger inhibitor. Also $K_{i, \text{ATP (GTP) free}}$ and $K_{i, \text{ATP (GTP) free}}$ constants of mixed type of inhibition by ATP (GTP) to L-malate are lower in the presence of Mn^{2+} ions than Mg^{2+} ions. Only exception is inhibition by ADP with respect to L-malate, which is however in the presence of Mg^{2+} ions competitive and in the presence of Mn^{2+} ions mixed.

Structural derivate of NADP^+ β -nicotinamide mononucleotide had no effect on tobacco NADP-ME activity (data not shown), suggesting that adenosine diphosphate part of the molecule is important for NADP^+ binding.

Regulation of NADP-ME from tobacco leaves by its cofactors was studied previously (Ryšlavá et al. 2007). Not only Mg^{2+} and Mn^{2+} , but also Co^{2+} and Ni^{2+} ions were found to be cofactors of NADP-ME. The dependence of reaction rates on Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} concentrations does not correspond to Michaelis - Menten kinetics. Two binding sites were determined for Mg^{2+} ions and binding of Mn^{2+} ions caused strong positive cooperativity (Ryšlavá et al. 2007). NADP-ME from tobacco leaves was not regulated by inhibition by L-malate, which is characteristic trait for C_3 plant.

A role of NADP-ME in plant is more important under abiotic or biotic stress conditions (Maurino et al. 2001; Synková and Valcke 2001; Crecelius et al. 2003; Ryšlavá et al. 2003; Sun et al. 2003; Synková et al. 2004; Chi et al. 2004; Smeets et al. 2005; Saher et al., 2005; Valderrama et al. 2006; Liu et al. 2007). Biotic stress caused by *Potato virus Y*, strain NTN (PVY^{NTN}) increased the NADP-ME activity from tobacco leaves up to six-times (Ryšlavá et al. 2003). One of the functions of NADP-ME in leaves with necrosis caused by PVY^{NTN} could be providing NADPH for biosynthetic process related to repairing of damage structures. Another function could be to facilitate C_3 photosynthesis in wounded leaves by generating CO_2 . Malate in stressed plants may serve as an additional carbon sink and as a CO_2 store (Crecelius et al. 2003). Higher activity of NADP-ME in tobacco was also found in young developing leaves than in vegetative and lower leaves (not published data), in young leaves the requirement for NADPH for biosynthetic processes is very high.

In conclusion, the inhibition of NADP-ME by macroergic compounds (ATP, ADP and GTP) (Fig. 2,3,4) and slight inhibition by intermediates of glycolysis (Tab. 2) indicate that the enzyme could participate in maintaining plant energy balance. It could be more important, when this non-photosynthetic isoform is involved in plant defense response (Ryšlavá et al. 2003). Results of NADP-ME could affect not only anabolic pathways (e.g. lipid biosynthesis by providing NADPH), but also katabolic ones (e.g. retrieval of energy by pyruvate conversion in citric acid cycle).

References:

- Aktas D. F., Cook P. F. (2008): Proper positioning of the nicotinamide ring is crucial for the Ascaris suum malic enzyme reaction. *Biochemistry* 47, 2539-2546
- Bisswanger H. (2002): *Enzyme kinetics. Principles and methods.* WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- Bianchi E. M., Sajadi S. A. S., Song B., Sigel H. (2003): Stabilities and isomeric equilibria in aqueous solution of monomeric metal ion complexes of adenosine 5'-diphosphate (ADP³⁻) in comparison with those of adenosine 5'-monophosphate (AMP²⁻). *Chem. Eur. J.* 9, 881-892
- Casati P., Spampinato C. P., Andreo C. S. (1997): Characterization and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat. *Plant Cell Physiol.* 38, 928-934
- Colombo S. L., Andreo C. S., Podestá F. E. (1997): Carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. Purification, characterization and developmental profile of NADP-dependent malic enzyme. *Physiol. Plant.* 101, 821-826
- Crecelius F., Streb P., Feierabend J. (2003): Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *J. Exp. Bot.* 54, 1075-1083
- Gang G.-G., Huang T.-M., Wang J.-K., Lee H.-J., Chou W.-Y., Meng Ch.-L. (1992): Kinetic mechanism of the cytosolic malic enzyme from human breast cancer cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* 296, 468-473
- Chang G.-G., Tong L. (2003): Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry* 42, 12721-12731
- Chi W., Yang J., Wu N., Zhang F. (2004): Four rice genes encoding NADP malic enzyme exhibit distinct expression profiles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1865-1874
- Drincovich M. F., Casati P., Andreo C. S. (2001): NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Letters* 490, 1-6
- Edwards G. E., Andreo C. S. (1992): NADP-malic enzyme from plants. *Phytochemistry* 31, 1845-

- Gerrard Wheeler M. C., Tronconi M. A., Drincovich M. F., Andreo C. S., Flüge U. I., Maurino V. G. (2005): A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of Arabidopsis, *Plant Physiol.* 139, 39-51
- Gerrard Wheeler M. C., Arias C. L., Tronconi M. A., Maurino V. G., Andreo C. S., Drincovich M. F. (2008): *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzyme isoforms: high degree of identity but clearly distinct properties. *Plant Mol. Biol. In press*
- Hsieh J.-Y., Liu G.-Y., Chang G.-G., Hung H.-Ch. (2006): Determinations of the dual cofactor specificity and substrate cooperativity of the human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme. *J. Biol. Chem.* 281, 23237-23245
- Hsu W.-Ch., Hung H.-Ch., Tong L., Chang G.-G. (2004): Dual functional roles of ATP in human mitochondrial malic enzyme. *Biochemistry* 43, 7382-7390
- Laporte M. M., Shen B., Tarczynski M. C. (2002): Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function, *J. Exp. Bot.* 53, 699-705
- Liu S., Cheng Y., Zhang X., Guang Q., Nishiuchi S., Hase K., Takano T. (2007): Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stresses; over-expression of that gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* 64, 49-58
- Marangoni A. G. (2003): *Enzyme kinetics. A modern approach.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey
- Maurino V. G., Saigo M., Andreo C. S., Drincovich M. F. (2001): Non-photosynthetic malic enzyme from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant Mol. Biol.* 45, 409-420
- Müller G. L., Drincovich M. F., Andreo C. S., Lara M. V. (2008): *Nicotiana tabacum* NADP-malic

- enzyme: cloning, characterization and analysis of biological role. *Plant Cell Physiol.* 49, 469-480
- Ryšlavá H., Muller K., Semorádová Š., Synková H., Čeřovská N. (2003): Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by Potato virus A and Potato virus Y. *Photosynthetica* 41, 357-363
- Ryšlavá H., Doubnerová V., Muller K., Bařková P., Schnablová R., Liberda J., Synková H., Čeřovská N. (2007): The enzyme kinetics of the NADP-malic enzyme from tobacco leaves. *Collect Czech Chem Commun* 72, 1420-1434
- Saher S., Fernández-García N., Piqueras A., Hellín E., Olmos E. (2005): Reduction properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured in vitro: a hypoxia stress? *Plant Physiol. Biochem.* 43, 573-582
- Sigel H., Bianchi E. M., Corfu N. A., Kinjo Y., Tribolet R., Martin R. B. (2001): Stabilities and isomeric equilibria in solutions of monomeric metal-ion complexes of guanosine 5'-triphosphate (GTP⁴⁻) and inosine 5'-triphosphate (ITP⁴⁻) in comparison with those of adenosine 5'-triphosphate (ATP⁴⁻). *Chem. Eur. J.* 7, 3729-3737
- Sigel H. (2004): Adenosine 5'-triphosphate (ATP⁴⁻) aspects of the coordination chemistry of a multitasking biological substrate. *Pure Appl. Chem.* 76, 375-388
- Synková H., Valcke R. (2001): Response to mild water stress in transgenic Pssu-ipt tobacco. *Physiol. Plant.* 112, 513-523
- Synková H., Semorádová Š., Burketová L. (2004): High content of endogenous cytokinins stimulates activity of enzymes and proteins involved in stress response in *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Tis. Org. Cul.* 79, 169-179
- Smeets K., Cuypers A., Lambrechts A., Semane B., Hoet P., Van Laere A., Vangronsveld, J. (2005): Induction of oxidative stress and antioxidative mechanism in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 437-444
- Sun S.-B., Shen Q.-R., Wan J.-M., Liu Z.-P. (2003): Induced expression of the gene for NADP-malic

- enzyme in leaves of *Aloe vera* L. under salt stress. *Acta Biochim. et Biophys. Sinica* 35, 423-429
- Tausta, S.-L., Coyle, H. M., Rothermael, B., Stiefel, V, Nelson, T. (2002): Maize C₄ and non-C₄ NADP-dependent malic enzymes are encoded by distinct genes derived from a plastidic-localized ancestor. *Plant Mol. Biol.* 50, 635-652.
- Teller J. K., Fahien L. A., Davis J. W. (1992): Kinetics and regulation of hepatoma mitochondrial NAD(P) malic enzyme. *J. Biol. Chem.* 267, 10423-10432
- Valderrama R., Corpas F. J., Carreras A., Gómez-Rodríguez M. V., Chaki M., Pedrajas J. R., Fernández-Ocana A., Del Río L. A., Barroso J. B. (2006): The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell Environ.* 29, 1449-1459
- Wedding R. T. (1989): Malic enzymes of higher plants. Characteristics, regulation and physiological function. *Plant Physiol.* 90, 367-371
- Xu Y., Bhargava G., Wu H., Loeber G., Tong L. (1999): Crystal structure of human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme: a new class of oxidative decarboxylases. *Structure* 7, 877-889
- Yang Z., Lanks Ch. W., Tong L. (2002): Molecular mechanism for the regulation of human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme by ATP and fumarate. *Structure* 10, 951-960

Table 1. Inhibition constants and types of inhibition of plant NADP-ME from tobacco leaves by ATP, ADP or GTP with respect to NADP⁺ or L-malate in the presence of Mg²⁺ or Mn²⁺ ions as cofactors. S.E.M. from 3 independent measurements are shown. K_{ic} , K_{iu} inhibition constants for inhibitor (free ATP, ADP or free GTP) derived by slope (intercept respectively) in Lineweaver-Burk plot, calculated from Eqs. 5,6 and 7.

Inhibitor/with respect to		Mg ²⁺	Mn ²⁺
		MIXED	MIXED
ATP/L-malate	K_{ic} [mmol/l]	0.19 ± 0.06	0.053 ± 0.013
	K_{iu} [mmol/l]	0.94 ± 0.13	0.39 ± 0.06
		NON - COMPETITIVE	NON - COMPETITIVE
ATP/NADP⁺	K_i [mmol/l]	0.54 ± 0.20	0.40 ± 0.13
			COMPETITIVE
ADP/L-malate	K_{ic} [mmol/l]	0.68 ± 0.15	0.45 ± 0.02
	K_{iu} [mmol/l]	2.76 ± 0.64	
		NON - COMPETITIVE	NON - COMPETITIVE
ADP/NADP⁺	K_i [mmol/l]	5.08 ± 0.43	3.58 ± 0.39
			MIXED
GTP/L-malate	K_{ic} [mmol/l]	0.23 ± 0.08	0.047 ± 0.025
	K_{iu} [mmol/l]	1.65 ± 0.32	0.35 ± 0.10
		NON - COMPETITIVE	NON - COMPETITIVE
GTP/NADP⁺	K_i [mmol/l]	0.70 ± 0.20	0.23 ± 0.03

Table 2. Effect of different compounds on NADP-ME activity from tobacco leaves. Activity of the enzyme expressed in percentage, control experiment without inhibitors or modulators taken as 100 %.^a Concentration of tested compounds 5 mmol/l, ^b concentration of tested compounds: 0.1 mmol/l. S.E.M. from 3 independent measurements are shown.

Different compounds		Composition of the reaction mixture		
		16 mmol/l L-malate 0.2 mmol/l NADP ⁺ 4 mmol/l MgCl ₂	2 mmol/l L-malate 0.2 mmol/l NADP ⁺ 4 mmol/l MgCl ₂	16 mmol/l L-malate 0.05 mmol/l NADP ⁺ 4 mmol/l MgCl ₂
Macroergic compounds ^a	GTP	59 ± 2	50 ± 2	62 ± 2
	ATP	54 ± 4	46 ± 8	51 ± 2
	ADP	71 ± 8	70 ± 5	78 ± 4
Intermediates of glycolysis ^a	glucose-6-phosphate	98 ± 4	97 ± 6	100 ± 3
	3-phosphoglycerate	92 ± 5	84 ± 9	90 ± 5
	phosphoenolpyruvate	94 ± 6	100 ± 17	85 ± 5
	pyruvate	97 ± 4	91 ± 2	98 ± 3
Metabolites of citric acid cycle ^a	α-ketoglutarate	97 ± 2	91 ± 6	101 ± 1
	succinate	100 ± 4	109 ± 14	104 ± 6
	fumarate	102 ± 4	103 ± 9	100 ± 4
Compounds related to lipogenesis ^b	coenzyme A	103 ± 10	103 ± 4	96 ± 5
	acetyl-CoA	106 ± 4	99 ± 6	97 ± 3
	palmitoyl-CoA	101 ± 2	97 ± 18	95 ± 5
Amino acids ^a	glutamate	105 ± 10	104 ± 4	107 ± 17
	glutamine	102 ± 3	102 ± 6	99 ± 4
	aspartate	100 ± 2	102 ± 5	101 ± 4

Legends to Figs.

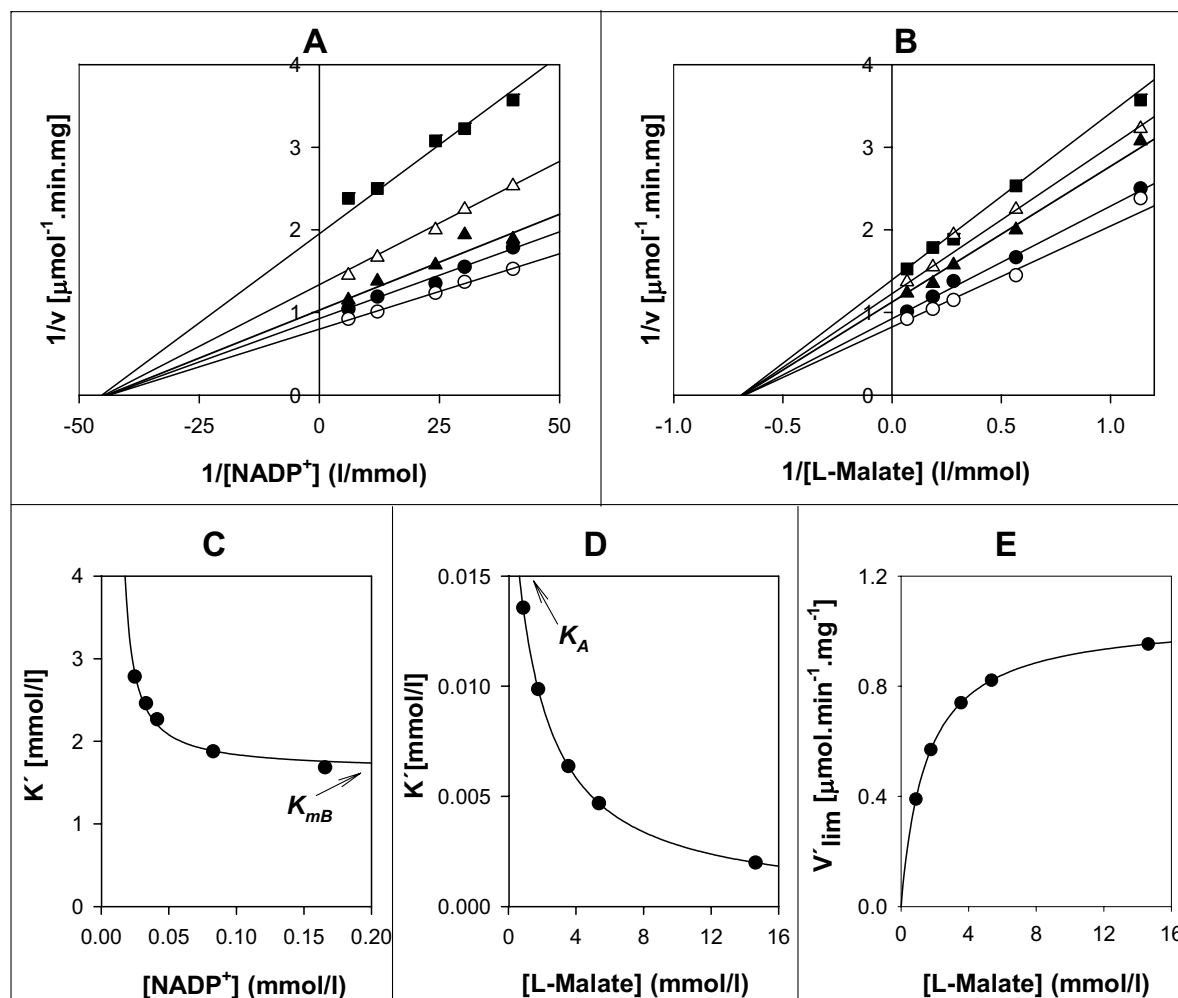


Figure 1. Double reciprocal plots of dependence of reaction rate on concentration of NADP^+ (A) and L-malate (B) and dependences of apparent Michaelis constants (K') and constants V'_{lim} calculated from Eq. 2,3 and 4 respectively on concentration of NADP^+ (C) and L-malate (D, E) specified sequential mechanism as ordered. Plot C also indicate Michaelis constant for substrate B (K_{mB}) and plot D dissociation constant for complex enzyme-substrate A, B (K_A) (both labeled with arrows). Concentrations of the free (chelation-corrected) NADP^+ : 0.025 - 0.166 mmol/l; concentration of free L-malate: 0.879 - 14.633 mmol/l.

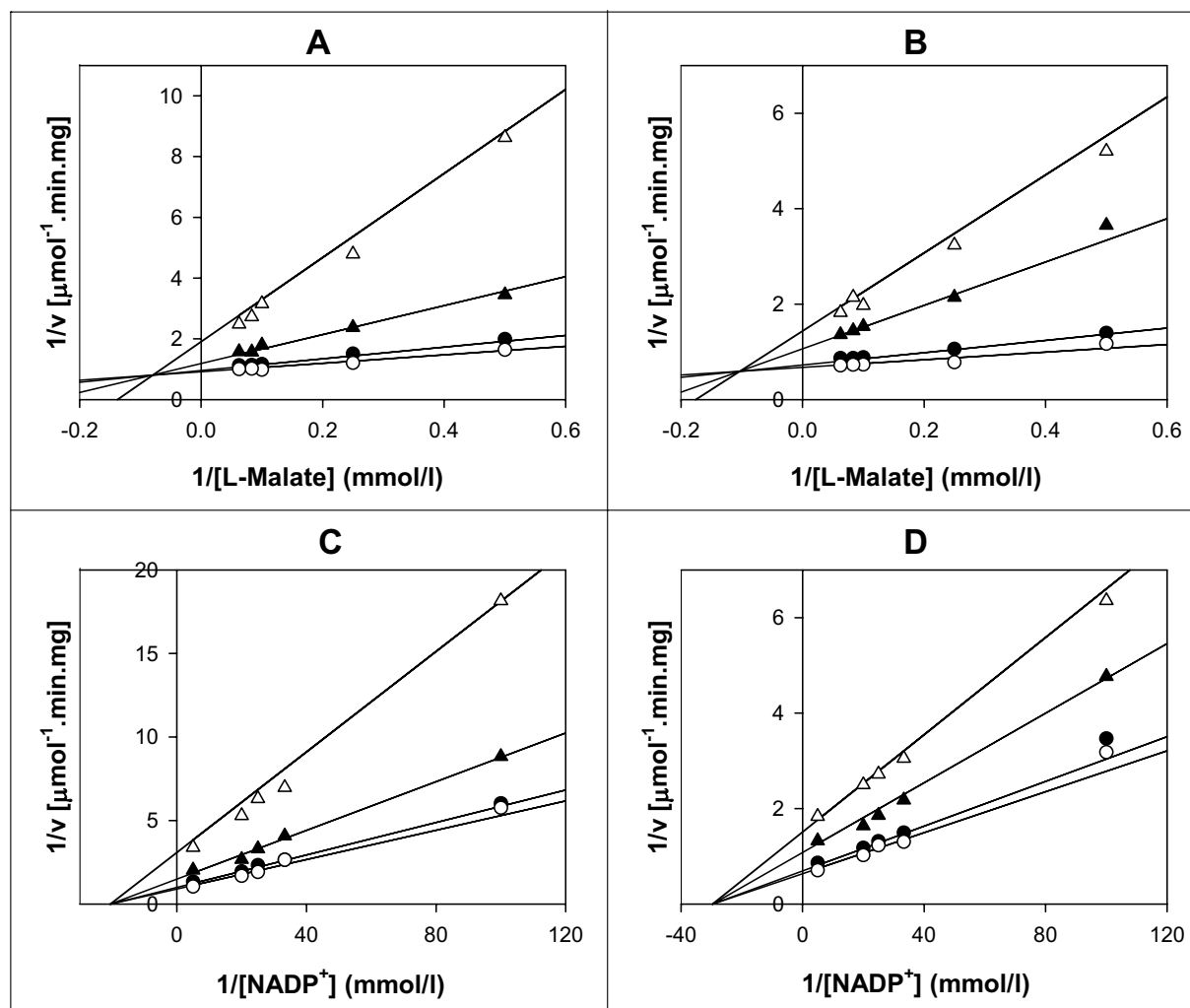


Figure 2. Mixed and non-competitive type of inhibition of the plant NADP-ME from tobacco leaves by ATP with respect to L-malate and NADP^+ in the presence of Mg^{2+} ions (A, C) or Mn^{2+} ions (B, D). NADP-ME activity was measured at different concentrations of L-malate (A, B) or NADP^+ (C, D) at various concentrations of free ATP (from top to the bottom, the chelation-corrected free ATP concentrations were 1.090, 0.296, 0.047 and 0 mmol/l in A, C and 0.402, 0.200, 0.027 and 0 mmol/l in B, D).

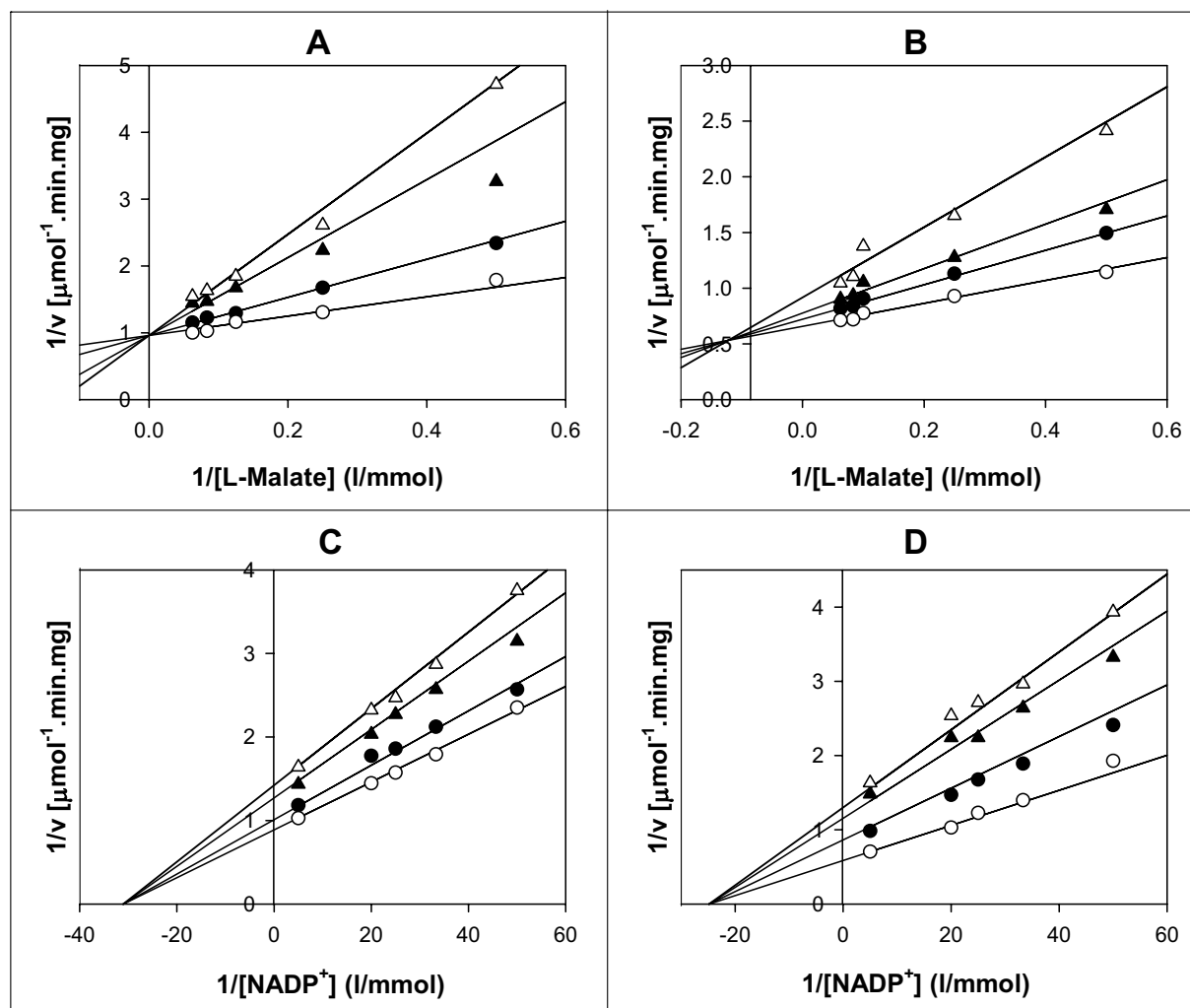


Figure 3. Competitive, mixed and non-competitive type of inhibition of the plant NADP-ME from tobacco leaves by ADP with respect L-malate and NADP^+ in the presence of Mg^{2+} ions (A, C) or Mn^{2+} ions (B, D). NADP-ME activity was measured at different concentrations of L-malate (A, B) or NADP^+ (C, D) at various concentrations of free ADP (from top to the bottom, the chelation-corrected free ADP concentrations were 3.238, 2.317, 0.741 and 0 mmol/l in A, C; 1.903, 0.906, 0.510 and 0 in B and 4.901, 3.902, 1.903 and 0 mmol/l in D).

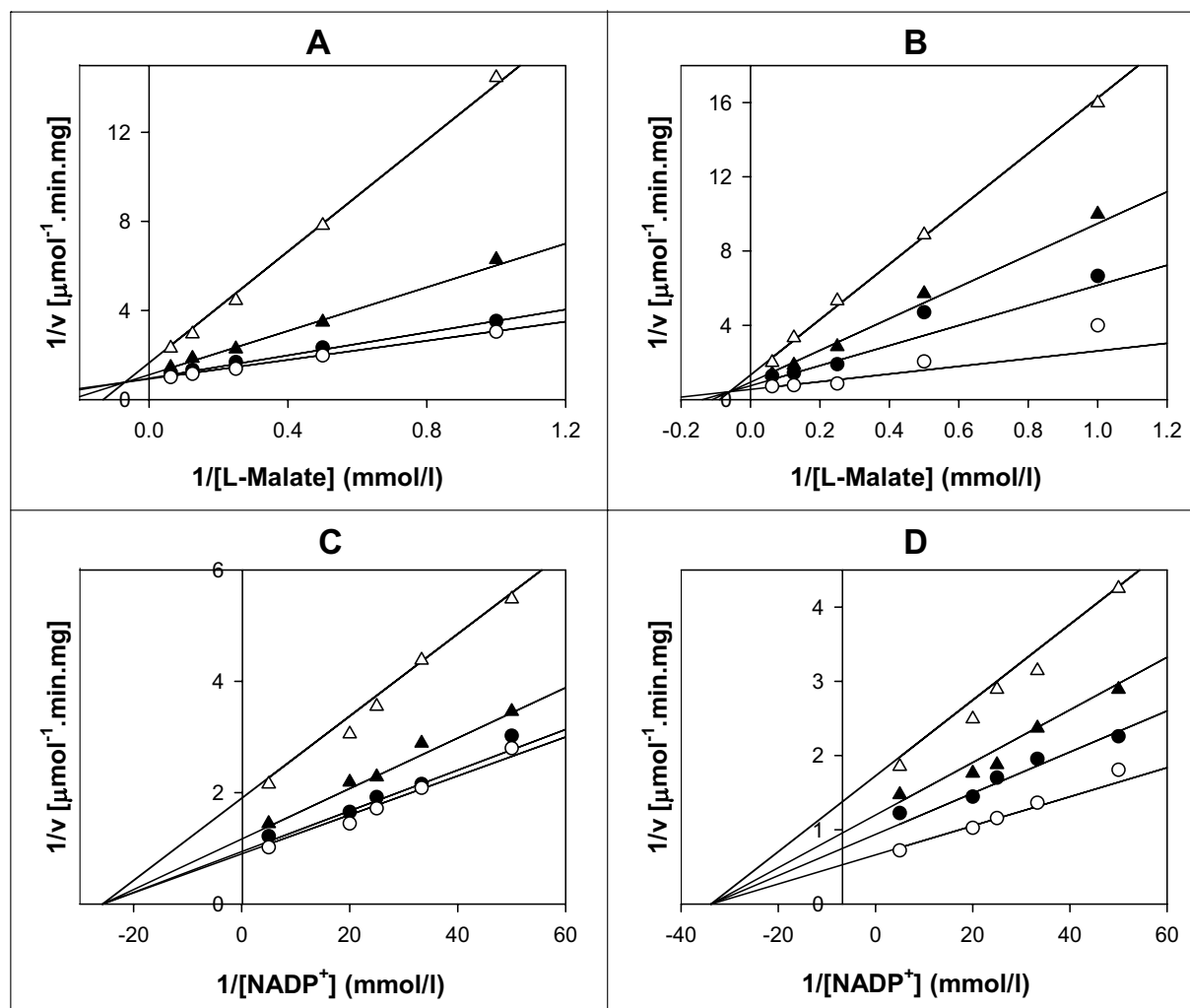


Figure 4. Mixed and non-competitive type of inhibition of the plant NADP-ME from tobacco leaves by GTP with respect to L-malate and NADP^+ in the presence of Mg^{2+} ions (A, C) or Mn^{2+} ions (B, D). NADP-ME activity was measured at different concentrations of L-malate (A, B) or NADP^+ (from top to the bottom, the chelation-corrected free GTP concentrations were 1.086, 0.289, 0.049 and 0 mmol/l in A, C and 0.401, 0.202, 0.104 and 0 mmol/l in B,D).

Effect of biotic stress on the NADP-malic enzyme from *Nicotiana tabacum* L.: mRNA, expressed protein and activity

Veronika Doubnerová^{a,*}, Karel Muller^{a,b}, Michaela Šumpelová^a, Noemi Čerovská^c and Helena Ryšlavá^a

^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, Prague 2, 128 40, Czech Republic

^bInstitute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 263, Praha 6, 165 02, Czech Republic

^cInstitute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00, Czech Republic

Abstract

Plants respond to stress not only by specific defense reactions but also by changes in the participation of their primary and secondary metabolic pathways. The effect of biotic stress induced by viral infection (*Potato virus Y*, strain NTN and O) on NADP-malic enzyme (EC 1.1.1.40) in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1) was tested at the transcriptional, translation and activity level. The increase of enzyme activity in infected leaves was correlated with an increased amount of expressed enzyme protein and with mRNA of cytosolic NADP-ME isoform. Transcription of the chloroplastic enzyme was not influenced. The increase of the enzyme activity was also detected in infected stems and roots. The effect of viral infection induced by *Potato virus Y*, NTN strain, causing more severe symptoms, was compared with that induced by milder strain PVY^O. The observed increase in NADP-malic enzyme activity in all parts of the studied plants was higher in the case of PVY^{NTN} strain than in the case of strain PVY^O. The relevance of NADP-malic enzyme in plants under stress conditions was discussed.

Keywords - NADP-malic enzyme; *Nicotiana tabacum* L.; *Potato virus Y*, strain NTN (PVY^{NTN}); *Potato virus Y*, strain O (PVY^O); biotic stress, real time-PCR.

Abbreviations - DAS-ELISA, Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; EDTA, ethylenediaminetetraacetate; NADP-ME, NADP-dependent malic enzyme; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; PVY, *Potato virus Y*; Rubisco, Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase

Introduction

Virus diseases are one of the main causes for decreased world-wide crop productivity (Arias et al. 2003). On the other hand plants have both preformed and infection-induced factors, that help them to defend against pathogen infestation. Whereas preformed factors are provided by waxy cuticular “skin” layers and antimicrobial compounds, induced defence responses are connected partly with specific responses (e.g. generation of reactive oxygen species, synthesis of NO, opening of ion channels, modification of protein phosphorylation status, hypersensitive cell death and transcriptional activation of numerous defence-related genes), but also with changes of fluxes through primary and secondary

metabolic pathways (Dangl and Jones 2001, Hammond-Kosack and Jones 2000). Under stress conditions enzymes with anaplerotic function could play more important role.

In the present study the influence of biotic stress caused by plant viruses on non-photosynthetic NADP-malic enzyme (E.C. 1.1.1.40) (NADP-ME) from C₃ plant *Nicotiana tabacum* L. was discussed. A relationship between non-photosynthetic isoform of NADP-ME and plant defence response was suggested (Maurino et al. 2001, Synková and Valcke 2001, Ryšlavá et al. 2003, Sun et al. 2003, Chi et al. 2004, Synková et al. 2004, Smeets et al. 2005). NADP-ME catalyzes the oxidative decarboxylation of L-malate using NADP⁺ as a coenzyme in the presence of divalent metal ions (Mg²⁺ or Mn²⁺ ions) to produce pyruvate, NADPH and CO₂ (Edwards and Andreo 1992, Drincovich et al. 2001). The presence of a cofactor and the coenzyme is required for the catalysis. The NADP-ME is widely distributed in nature from bacteria to humans, in both the cytosol and the mitochondria (Chang et al. 2002). Animal cytosolic NADP-ME is involved in the generation of NADPH necessary for the biosynthesis of fatty acids and steroids in liver and adipose tissues. This isoform may also participate in microsomal drug detoxification (Xu et al. 1999). Besides this, NADP-ME in plants is localized in chloroplasts, well known is its photosynthetic function in some C₄ plants (e.g. maize). Supporting functions such as providing NADPH for assimilatory process (e.g. lipid biosynthesis), maintaining intracellular pH (Edwards and Andreo 1992) and above-mentioned implication in plant defence to stress are proposed for non-photosynthetic C₃ NADP-ME isoform localized in chloroplasts and/or in cytosol (Drincovich et al. 2001, Müller et al. 2008).

This study is focused on changes in transcriptional, translation and activity levels of non-photosynthetic tobacco NADP-ME under biotic stress caused by *Potato virus Y*, (PVY), one of the most economically damaging plant viruses (Čeřovská 1998).

Material and methods

Plant material

Nicotiana tabacum L., cv. Petit Havana, SR1 plants were grown in a greenhouse under 22/18 °C day/night temperatures. Day irradiance [overall integrated mid-values were *ca.* 500 μmol(quantum) m⁻² s⁻¹] was prolonged by the additional

irradiation [PPFD *ca.* 200 $\mu\text{mol}(\text{quantum}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Philips TL-D 36W/54-76 T] to 16 h. Seeds were sown in pots with sand and plantlets were transferred to soil after 3 weeks. Leaves of seven-weeks old plants were mechanically inoculated with *Potato virus Y*, strain *NTN* (PVY^{NTN}) or *Potato virus Y*, strain *O* (PVY^O) kindly provided by Dr. Dědič (Potato Research Institute, Havlíčkův Brod, Czech Republic).

Two groups of controls were used for measuring of NADP-ME activities. First one involved 50 healthy, non-inoculated plants, the second one included 50 mock-inoculated (buffer and carborundum) plants. The samples were collected from control and infected leaves, stems and roots within 3 weeks. Leaves were collected each 2-4 days during infection until plants death, whereas stems and roots were collected in the maximum of symptom development (11th and 13th day, respectively). Roots were washed thoroughly and dried. Material from several plants was cut with scissors, mixed and packet separately as 0.5-2 g sample. As a control the plants without viral infection were used. Samples were immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C . The extent of viral infection was determined by real time-PCR and by DAS-ELISA (Clark and Adams 1977) in homogenates of the leaves of infected plants using polyclonal antibodies raised against the respective pathogens (Čeřovská 1998). Two different biological experiments with PVY^O and three independent experiments with PVY^{NTN} continuing to our previous work (Ryšlavá et al. 2003) were done.

Enzyme activity assay

For assay of NADP-ME activity, 0.5g of plant tissue were homogenized in 1.5 ml of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 5 mM MgCl₂ (buffer A); then 0.02 g of polyvinylpolypyrrolidone was added and the homogenate was centrifuged at 23 000 *g* for 15 min at 4 °C. The supernatant was used as plant extract for measuring NADP-ME activity. The NADP-ME activity was determined spectrophotometrically at 25 °C by monitoring NADPH production at 340 nm. The NADP-ME assay mixture contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM malate, 2 mM MgCl₂ and 0.2 mM NADP⁺ in total volume of 1 ml. The reaction was started by addition of 50 μl of the enzyme extract (Ryšlavá et al. 2003).

Native PAGE

Native gel electrophoresis was performed according to Lee and Lee (2000). The same volume (25 μ l) of all plant extracts in 20% (w/v) of sucrose was applied to the gel. Protein zones with NADP-ME activity were detected after incubation of gels (10%) in a solution of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 10 mM L-malate, 10 mM MgCl₂, 2 mM NADP⁺, 0.1 mg/ml nitroblue tetrazolium and 5 μ g/ml phenazine methosulfate at room temperature (Maurino et al. 2001). The estimation of relative molecular mass after native electrophoresis was performed according to Ferguson's method (Ferguson 1964, Doubnerová et al. 2007).

Purification of NADP-ME from maize seeds

NADP-ME from maize seeds was purified as was described previously for NADP-ME from tobacco leaves with some minor modification (Ryšlavá et al. 2007). 100 g of dry maize seeds were finely ground and then extracted in 300 ml of buffer A (100 mM Tris-HCl, pH 7.8 containing 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 5 mM MgCl₂) for 30 min. Next procedures including ion-exchange, gel and affinity chromatography were performed by the same way as in Ref. (Ryšlavá et al. 2007), only Sephadex G 200 was replaced by Sephacryl S 300. The obtained enzyme preparation was used for rabbit immunisation. Similarly, NADP-ME from *Nicotiana tabacum* L. leaves was isolated according to (Ryšlavá et al. 2007).

Preparation of rabbit antibodies against NADP-ME

Antibodies against NADP-ME were obtained by immunization of two New Zealand rabbits with 0.2 mg of the purified protein NADP-ME from maize seeds emulsified in Freund's complete adjuvant, in subcutaneous and intramuscular injections. Booster injections (0.4 and 0.6 mg) of the same protein with incomplete adjuvant were applied after 21 and 42 days. Pure antigen (0.822 mg) was administered after 63 and 84 days. The rabbits were bled 14 days after the last antigen injection. The serum fractions were collected and stored at -20 °C until required. The immunoglobulin (IgG) fraction from the antisera was obtained according to (Steinbach and Audran 1969) and stored with 0.05% (w/v) NaN₃ at 4 °C.

Western blot analysis

Equal amounts of total proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Laemmli 1970) in 10% polyacrylamide gels. After electrophoresis proteins were transferred to nitrocellulose membrane by electroblotting using a semi-dry system (Fastblot B31, Biometra). The immunochemical detection of NADP-ME was carried out using polyclonal rabbit antiserum raised against maize seed NADP-ME. Bound antibodies were visualized using mouse antirabbit IgG labelled with alkaline phosphatase. NBT-BCIP (nitroblue tetrazolium, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) was used as a substrate for alkaline phosphatase. At least 4 western blot analyses were performed with control and infection samples. The linearity of band intensity was tested using various quantities of NADP-ME protein purified from tobacco leaves and determined by program Elfoman 2.0.

mRNA extraction and quantification

Total mRNA was isolated from 100 mg of leaf sample using RNeasy kit (Qiagen). Any contaminated genomic DNA was removed by treatment with DNaseI (Qiagen). The quantity and purity of the mRNA was determined spectrophotometrically and the level of intact RNA was determined by agarose gel electrophoresis.

Approximately 1 µg of RNA was transcribed by M-MLV reverse transcriptase (Promega) using oligo-dT primer. Quantitative real-time PCR was performed on a Lightcycler 480 (Roche) using FastStart DNA Master SYBR Green PLUS kit (Roche Applied Science). Conditions for the amplification of *Actin9*, NADP-ME(cyt) and NADP-ME(chl) transcripts were: 10 min polymerase activation at 95 °C and 50 cycles, each cycle at 95 °C for 10 s, 60 °C for 10 s and 72 °C for 15 s. Primers for chloroplastic and cytosolic form of NADP-ME were designed according to GenBank sequences **DQ923119** and **DQ923118**, respectively.

Sequences of primers were:

MEcyt Forward	ATA CAT TCT TGT TCC TCG GAG CAG
MEcyt Reverse	CCC TTT GAA TCC ACC AGC CA
MEchl Forward	GCT CTC TTT ATA CAC TGC TCT GG
MEchl Reverse	AAG TTC GGC ATA TTC CTG TCC T

Actin9 primers were kindly provided by Dr. Helena Štorchová (Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences, Czech Republic).

The ratio corresponding to the difference in NADP-ME transcription between healthy and infected plants was calculated according to eqn. 1:

$$ratio = \frac{e^{CP_{NADP-ME}}}{e^{CP_{Actin9}}} \quad 1$$

where $e_{NADP-ME}$ and e_{Actin9} represent PCR amplification efficiency of each product and CP represent the crossing point of each sample reaction.

Statistical analysis

Two independent PVY^O and two PVY^{NTN} experiments were performed. Leaves for enzyme activity measurements and real-time PCR quantification were processed at least in 3 samples, activity of NADP-ME in roots and stems at least in 6 samples. Statistically significant differences in the mean values were tested by Student's t-test at P = 0.05

Results

Time course of viral infection caused by PVY^O and by PVY^{NTN} in *Nicotiana tabacum* L. plants

Two different strains (O and NTN) of *Potato virus Y* (PVY) were used to *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1 plants to inflict biotic stress. Determinations of relative content of virus in tobacco leaves by DAS-ELISA and real time-PCR confirmed the increase of viral infections. In the case of more harmful virus (PVY^{NTN}), higher relative content of virus was determined than in the case of PVY^O (Fig. 1). The maximal content of both viruses was found about 10th-17th d after inoculation (Fig.1).

Fig. 1

Influence of PVY infection on NADP-ME activity

The NADP-ME activity in PVY^O infected leaves was on the 12th day 2.5-fold higher than in control plants. Similarly, the 4-fold enhanced NADP-ME activity in PVY^{NTN} infected leaves was detected on the 10th day (Fig. 2). In the course of infection, the virus content correlated with the activity of NADP-ME (Figs. 1, 2). Mock-inoculation didn't change NADP-ME activity in leaves; it was the same as in healthy control leaves (data not shown).

Fig. 2

NADP-ME activity in stems (Fig. 3A) was in the phase of maximum of symptom development (11th day of PVY^O infection and 13th day of PVY^{NTN} infection) in plants infected by milder PVY^O 1.5-fold higher and in plants infected by PVY^{NTN} 2.1-fold higher than in control stems. Similar situation was observed in roots: PVY^O caused 1.4-fold increase in NADP-ME activity, whereas PVY^{NTN} caused 2.4-fold increase in NADP-ME activity as compared to control roots (Fig. 3B).

Fig. 3

NADP-ME activity was also evaluated after electrophoretic separation in polyacrylamide gel under native conditions. Higher activity in infected plants corresponded to more intensive bands noticeable after the detection of NADP-ME activity. Active NADP-ME zones in gel corresponding to control, PVY^O and PVY^{NTN} infected leaves, stems and roots are shown in Figure 4. Only one band was found in all parts (leaves, stems and roots) of *Nicotiana tabacum* L. (Fig. 4). No band corresponding to NADP-ME activity was observed in control incubation without substrate, coenzyme and cofactor, respectively (result not shown).

Fig. 4

Influence of PVY^{NTN} infection on the expression of NADP-ME

Western blot analysis was used for the detection of the amount of NADP-ME in tobacco leaves the 6th-17th day after PVY^{NTN} inoculation. For this purpose, rabbit antibodies raised against maize seeds NADP-ME were used.

The linearity of intensity tested using various amounts of NADP-ME is shown in Fig. 5A. NADP-ME purified from *Nicotiana tabacum* L. leaves using three types of chromatography (DEAE-cellulose, Sephacryl S 300 and 2', 5'-ADP-Sepharose 4B) according to (Ryšlavá et al. 2007) was used.

More intensive bands indicating enhanced expression of NADP-ME, were found the 6th, 10th and 14th day of viral infection (Fig. 5B). Intensity of bands was analysed by densitometry with commercial program Elfoman 2.0. About 2-fold higher signal was found for PVY^{NTN} infected leaf samples the 6th, 10th and 17th day after inoculation, in comparison with control plants.

Fig. 5

Influence of PVY^{NTN} infection on NADP-ME mRNA

Reverse transcription followed by real-time PCR was used to measure transcription of NADP-ME mRNA in tobacco leaves in the period from 6th to 17th day after PVY^{NTN} inoculation. *Actin9* was used as standard gene as its transcription is not affected by biotic stress (Rizhsky et al. 2002). In infected samples the increase in the amount of NADP-ME mRNA of cytosolic isoform was observed (Fig. 6A). Maximum transcription occurred the 17th day after virus inoculation and was 3-fold higher as compared to healthy control (Fig. 6A). The transcription of chloroplastic isoform of NADP-ME was not influenced by PVY^{NTN} infection (Fig. 6B).

Melting curve analysis of real-time PCR reaction shows a single product peak in the expected temperature range (result not shown). Products of real time PCR using primers for chloroplastic and cytosolic NADP-ME were sequenced. PCR fragments showed 100% homology with GenBank sequences **DQ923119** and **DQ923118**, respectively.

Fig. 6

DISCUSSION

Generally, the study of biotic stress is more complicated than abiotic stress, due to problems with a quantification of the stressor. To test the impact of various severity of viral disease on metabolic changes in tobacco plants, we used two strains of PVY characterized with different severity of symptoms. *Potato virus Y*, strain NTN (PVY^{NTN}) is harmful, economically significant, rapidly expansive virus, which caused extensive veinal necrosis on the surface of leaves of host plants. Tobacco plants belong to such models. *Potato virus Y*, strain O (PVY^O) caused milder symptoms (mottle mosaic, chlorosis) than PVY^{NTN}. Furthermore, the used isolates of PVY had a capacity to infect tobacco systemically (Synková

et al. 2006).

PVY^{NTN}, which induced more severe symptoms, was accompanied by 4-fold enhanced activity of NADP-ME in leaves of infected tobacco plants (Fig. 2).

PVY^O, characterized by milder symptoms, increased the enzyme activity up to 2.5-fold. In our previous study, where we tested the influence of *Potato virus A* (PVA) which caused only very mild symptoms, no significant increase of NADP-ME activity in *Nicotiana tabacum* L. was found (Ryšlavá et al. 2003).

The different amount of virus was spread in various parts of tobacco plants (results not shown). The highest virus content was found in systemically infected leaves and this finding was in correlation with the highest measured activity of NADP-ME (Fig. 2). Lower increase of NADP-ME activity was found in roots, in which the virus content is lower as compared to upper leaves (Fig. 3). Similar correlations between NADP-ME activity and stress conditions were observed also in other systems. Enhanced enzyme activity (2-fold) was found in maize seedlings treated with cellulase, jasmonate and fungal elicitor in roots (Maurino et al. 2001). Increased activity of NADP-ME was found mainly in plant stressed by abiotic factors, e.g. in *Phaseolus vulgaris* after Cd application (Smeets et al. 2005), in hyperhydric carnation shoots cultured for 14 and 28 days *in vitro* (Saher et al. 2005), in leaves of submersed aquatic species *Egeria densa* after transfer from low temperature and light to high temperature and light conditions (Casati et al. 2000), in cold hardened winter rye (*Secale cereale* L.) (Crecelius et al. 2003), in leaves of olive plants under salt stress condition (Valderrama et al. 2006), in leaves of *Aloe vera* L. under salt stress (Sun et al. 2003), similarly salt and osmotic stress induced NADP-ME in leaves and roots of rice seedlings (Chi et al. 2004, Liu et al. 2007).

Different result was found in *Nicotiana benthamiana* plants, where PVY^{NTN} strain did not cause a significant increase of the NADP-ME activity in leaves, but only slight increase (1.8-fold higher) of NADP-ME activity in roots (Doubnerová et al. 2007). *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum* L. plants also differed in NADP-ME isoform content. Whereas one band corresponding to NADP-ME activity was found in *Nicotiana tabacum* L leaves (Ryšlavá et al. 2007), in *Nicotiana benthamiana* one band was found only in roots, two isoforms were present in stems and leaves (Doubnerová et al. 2007).

To find out a relationship between the enhanced activity of NADP-ME in tobacco plants after potyviral infection and the enzyme biosynthesis *de novo*, we evaluated immunochemically the amount of NADP-ME and also by quantitative real time-PCR the amount of NADP-ME mRNA (Figs. 5 and 6). The increase of translational level was up to 2-fold (Fig. 5) and in the transcription was interestingly increased only mRNA of cytosolic NADP-ME (up to 3-fold), whereas chloroplastic NADP-ME wasn't affected (Fig. 6).

Maurino et al. (2001) found out that the increase in activity of NADP-ME in maize roots after cellulase, fungal elicitor and jasmonate treatment is correlated to the increase of both the protein and the mRNA content, thus they supposed *de novo* synthesis of NADP-ME. The enhanced activity of NADP-ME in olive plants under salt-induced oxidative stress was also accompanied by its increased protein expression (Valderrama et al. 2006). Similarly in Aloe plants, salt stress in the form of NaCl caused in addition to an increased NADP-ME activity also increased transcription (Sun et al. 2003). Enhancement of NADP-ME activity in plants of Aloe species - correlated with salt stress tolerance, in *Aloe vera* L. plant, which is a tolerant species, was the activity of NADP-ME significant more enhanced than in *Aloe saponarea* Haw, a sensitive one (Sun et al. 2003).

NADP-MEs in C₃ plants are encoded by small gene families (Chi et al. 2004, Wheeler et al. 2005, Müller et al. 2008). In *Arabidopsis thaliana* (C₃ dicot plant), where the whole genome sequence is known (Wheeler et al. 2005), one isoform is localized in plastids (NADP-ME4), whereas the other three isoforms are cytosolic (NADP-ME1-3). The expression of NADP-ME1 and NADP-ME3 is restricted by both developmental and cell specific signals (Wheeler et al. 2005). Similarly, the rice (*Oryza sativa*, C₃ monocot plant) NADP-ME family is composed of four members, one plastidic and three cytosolic versions. Each rice NADP-ME gene has presumably a different tissue-specific and developmental profile (Chi et al. 2004). Three different putative *nadp-me* transcripts were identified in *Nicotiana tabacum* L. plants, from which cytosolic NADP-ME encoded by GenBank sequence accession no **DQ923118** and plastidic counterpart encoded by GenBank sequence accession no. **DQ923119** were expressed and their response to stress (hypoxia, NaCl, Na₂CO₃, NaHCO₃, abscisic acid, polyethyleneglycol, UV-B exposure, fungal elicitors, cellulase and infiltration with *Agrobacterium tumefaciens*) was analyzed. Various stressors affect particular

nadp-me transcripts in different manner, analogous the enzyme activity (Müller et al. 2008). In leaves of rice plants grown in carbonates (NaHCO₃ and Na₂CO₃) the increased activity by more than 50 % was accompanied by gene NADP-ME₂ induction (Liu et al. 2007). Using transgenic plant *Arabidopsis thaliana* with inserted gene for rice cytosolic NADP-ME₂, the role of this gene in adapting to carbonate stress was confirmed (Liu et al. 2007). Our results documented that biotic stress affected only the cytosolic isoform. On the other hand Müller et al. (2008) found out, that stress caused by fungal elicitor influenced more transcription of chloroplastic NADP-ME. The four rice NADP-ME genes all responded to salt and osmotic stresses regardless of subcellular protein localization (Chi et al. 2004).

The biosynthesis of the enzyme may be not the only source of the enhanced activity of NADP-ME in infected tobacco plant leaves, but other factors can modulate the activity, too, e.g. the interaction with heat shock protein 70 (Lara et al. 2005), that is associated with some types of stress (Wang et al. 2004) or some other factors.

The proposed function of NADP-ME in infected plants is probably the production of NADPH for biosynthetic purposes. The supply of reducing equivalents in the form of NADPH is important not only for the plant growth and development, but especially it is important under stress conditions. Besides its participation in several reductive biosynthetic reactions, NADPH is also required in the ascorbate – glutathione cycle for protection against oxidative damage.

In tobacco plant under conditions of viral infection, stomatal conductance is reduced, the stomata are closed (Ryšlavá et al. 2003) and the CO₂ supply for photosynthesis is limited. Under these conditions, CO₂ formed in the reaction catalysed by NADP-ME, which is in tobacco plants predominantly localized in chloroplasts, could be significant. This hypothesis is supported by the fact that enhanced activities of phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate, phosphate dikinase besides NADP-ME were found in stressed tobacco plants (Ryšlavá et al. 2003). These enzymes together with NAD-malate dehydrogenase could form a cycle within one cell analogous to plants with “single cell C₄ photosynthesis” (Edwards et al. 2004). NADH and energy in the form of ATP are consumed in this cycle, but at the same time NADPH is produced. Simultaneously, respired CO₂ is fixed to Rubisco. Rubisco can thus re-fix CO₂ released by respiration or to

use CO₂ incipient of malate transported from non-photosynthetic plant parts especially from roots. This pathway was also suggested by Hibberd and Quick (2002) in the course of flowering.

Many plants response to various types of stress by changes in the activity of NADP-ME, but its enhancement and protein expression vary among plant species and probably could correspond to plant tolerance to stress, however many experiments in this field is needed.

Acknowledgements

This work was supported by the grant of GA UK 7552/2007

References

- Arias MC, Lenardon S, Taleisnik E (2003) Carbon metabolism alternations in sunflower plants infected with the *Sunflower chlorotic mottle virus*. J Phytopathology 151: 267-273
- Casati P, Lara MV, Andreo CS (2000) Induction of C₄-like mechanism of CO₂ fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. Plant Physiol 123: 1611-1621
- Čeřovská N (1998) Production of monoclonal antibodies to potato virus Y^{NTN} strain and their use for strain differentiation. Plant Pathol 47: 505-509
- Chang H-Ch, Chou W-Y, Chang G-G (2002) Effect of metal binding on the structural stability of pigeon liver malic enzyme. J Biol Chem 277: 4663-4671
- Chi W, Yang J, Wu N, Zhang F (2004) Four rice genes encoding NADP malic enzyme exhibit distinct expression profiles. Biosci Biotechnol Biochem 68: 1865-1874
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J Gen Virol 34: 475-483
- Creceľius F, Streb P, Feierabend J (2003) Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. J Exp Bot 54: 1075-1083
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411: 826 – 833
- Doubnerová V, Jirásková A, Janořková M, Müller K, Bařková P, Synková H, Čeřovská N, Ryřlavá H (2007) The activity and isoforms of NADP-malic enzyme in *Nicotiana benthamiana* plants under biotic stress. Gen Physiol Biophys 26: 281-289
- Drincovich MF, Casati P, Andreo CS (2001) NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. FEBS Lett 490: 1-6
- Edwards GE, Andreo CS (1992) NADP-malic enzyme from plants. Phytochemistry 31: 1845-1857
- Edwards GE, Franceschi VR, Voznesenskaya EV (2004) Single-cell C(4) photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. Annu Rev Plant Biol 55: 173-196
- Ferguson KA (1964) Starch-gel electrophoresis: application to the classification of

- pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism* 13: 985-1002
- Hibberd JM, Quick WP (2002) Characteristics of C₄ photosynthesis in stems and petioles of C₃ flowering plants. *Nature* 415: 451-454
- Hammond-Kosack KH, Jones JDG (2000) Responses to Plant Pathogens. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville – Maryland, pp. 1102 – 1152
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lara MV, Drincovich MF, Müller GL, Maurino VG, Andreo CS (2005) NADP-malic enzyme and Hsp 70: Co-purification of both proteins and modifications of NADP-malic enzyme properties by association with Hsp 70. *Plant Cell Physiol* 46: 997-1006
- Lee DH, Lee CB (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci* 159: 75-85
- Liu S, Cheng Y, Zhang X, Guang Q, Nishiuchi S, Hase K, Takano T (2007) Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stresses; over-expression of that gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Mol Biol* 64: 49-58
- Maurino VG, Saigo M, Andreo CS, Drincovich MF (2001) Non-photosynthetic malic enzyme from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant Mol Biol* 45: 409-420
- Müller GL, Drincovich MF, Andreo CS, Lara MV (2008) *Nicotiana tabacum* NADP-malic enzyme: cloning, characterization and biological role analysis. *Plant Cell Physiol* 49: 469-480
- Rizhsky L, Hongjian L, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* 130: 1143-1151
- Ryšlavá H, Doubnerová V, Müller K, Bařková P, Schnablová R, Liberda J, Synková H, Čerovská N (2007) The enzyme kinetics of the NADP-malic enzyme from tobacco leaves. *Collect Czech Chem Commun* 72: 1420-1434
- Ryšlavá H, Müller K, Semorádová Š, Synková H, Čerovská N (2003) Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Photosynthetica* 41: 357-363
- Saher S, Fernández-García N, Piqueras A, Hellín E, Olmos E (2005) Reduction properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and

- normal carnation shoots cultured in vitro: a hypoxia stress? *Plant Physiol Biochem* 43: 573-582
- Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semane B, Hoet P, Van Laere A, Vangronsveld J (2005) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanism in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol Biochem* 43: 437-444
- Steinbach M, Audran R (1969) The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch Biochem Biophys* 34: 279-284
- Synková H, Valcke R (2001) Response to mild water stress in transgenic Pssu-ipt tobacco. *Physiol Plant* 112: 513-523
- Synková H, Semorádová Š, Burketová L (2004) High content of endogenous cytokinins stimulates activity of enzymes and proteins involved in stress response in *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Tis Org Cul* 79: 169-179
- Synková H, Semorádová Š, Schnablová R, Müller K, Pospíšilová J, Ryšlavá H, Malbeck J, Čeřovská N (2006) Effect of biotic stress caused by *Potato virus Y* on photosynthesis in *ipt* transgenic and control *Nicotiana tabacum* L. *Plant Sci* 171: 607-616
- Sun S-B, Shen Q-R, Wan J-M, Liu Z-P (2003) Induced expression of the gene for NADP-malic enzyme in leaves of *Aloe vera* L. under salt stress. *Acta Biochim et Biophys Sinica* 35: 423-429
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gómez-Rodríguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernández-Ocana A, Del Río LA, Barroso JB (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell Environ* 29: 1449-1459
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperons in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9: 244-252
- Wheeler MCG, Tronconi MA, Drincovich MF, Andreo CS, Flüge UI, Maurino VG (2005) A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*, *Plant Physiol* 139: 39-51
- Xu Y, Bhargava G, Wu H, Loeber G, Tong L (1999) Crystal structure of human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme: a new class of oxidative decarboxylases. *Structure* 7: 877-889

Figure legends

Fig. 1. The relative content of PVY^O (grey columns) and PVY^{NTN} (black columns) in leaves of *Nicotiana tabacum* L. in the course of PVY^O and PVY^{NTN} infection was determined by DAS-ELISA with p-nitrophenylphosphate as substrate for alkaline phosphatase. Absorbance at 405 nm is proportional to the virus content. The absorbance of each sample was measured in triplicate, S.E. are shown.

Fig. 2. Activities of NADP-ME from *Nicotiana tabacum* L. leaves during PVY^O (grey columns) and PVY^{NTN} (black columns) infections calculated per fresh mass. The activity of each sample is shown as percentage of the non-infected control in particular day, where 100% NADP-ME is $0.053 \pm 0.017 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. NADP-ME activity in mock-inoculated leaves was the same as in non-inoculated controls. The activity was measured in at least 3 samples, S.E. are shown. Statistical analysis was done using t-test. * denotes significant difference from controls at $P < 0.05$.

Fig. 3. Activities of NADP-ME from *Nicotiana tabacum* L. stems (A) and roots (B) collected 11th day after PVY^O inoculation and 13th day after PVY^{NTN} inoculation calculated per fresh mass. The activity of each sample is shown as percentage the activity value of the non-infected control, where 100% NADP-ME is in stems $0.040 \pm 0.005 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, in roots $0.076 \pm 0.016 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. The activity was measured in at least six samples, S.E. are shown. Statistical analysis was done using t-test. * denotes significant difference from controls at $P < 0.05$.

Fig. 4. Detection of isoforms of NADP-ME from control (marked as C), PVY^O and PVY^{NTN} infected leaves, stems and roots of *Nicotiana tabacum* L. plants in 10% polyacrylamide gel after non-denaturing electrophoresis. Samples were collected at the maximal symptoms occurrence of infection.

Fig. 5. Test of linearity of Western blot analysis signal using various quantities of purified NADP-ME protein from *Nicotiana tabacum* L. leaves. Estimated relative molecular mass according standard protein was 66 000. Inset plot indicate decrease in relative intensity of signal (expressed in %) evaluated densitomerically by Elfoman 2.0 (A). Detection of NADP-ME protein in control (white columns) and PVY^{NTN} infected (black columns) leaves collected 6th-17th day after inoculation (B) by Western blot analysis. At least 4 Western blot analyses were performed (representative one is shown) with control and infection samples. 100% corresponds to intensity of protein NADP-ME in control sample in the 6th day. Statistical analysis was done using t-test. * denotes significant difference from controls at P < 0.05.

Fig. 6. Amount of cytosolic (A) and chloroplast (B) NADP-ME mRNA in PVY^{NTN} infected *Nicotiana tabacum* L. leaves (black columns) compared to healthy control (white columns) leaves measured by reverse transcription followed by real-time PCR method 6th – 17th day of viral infection. Result corresponds to ratio of cytosol NADP-ME transcript (A) or chloroplast NADP-ME transcript (B) and standard gene *Actin9*. The amount of NADP-ME mRNA was calculated from at least 3 samples, S.E. are shown. Statistical analysis was done using t-test. * denotes significant difference from controls at P < 0.05.

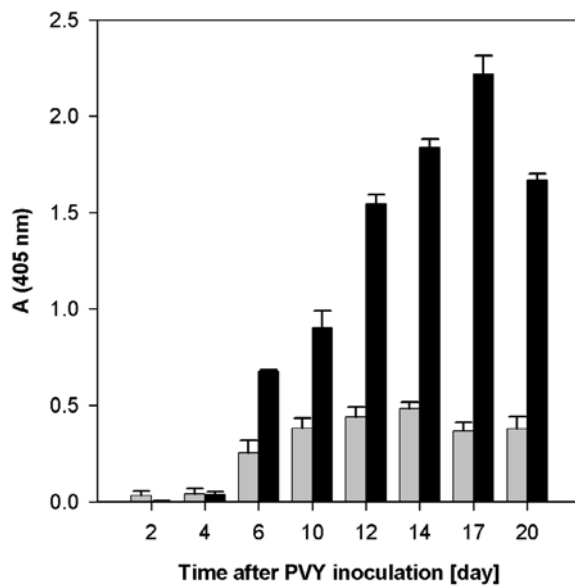


Fig. 1 The relative content of PVY^O (grey columns) and PVY^{NTN} (black columns) in leaves of *Nicotiana tabacum* L. in the course of PVY^O and PVY^{NTN} infection was determined by DAS-ELISA with p-nitrophenylphosphate as substrate for alkaline phosphatase. Absorbance at 405 nm is proportional to the virus content. The absorbance of each sample was measured in triplicate, S.E. are shown.

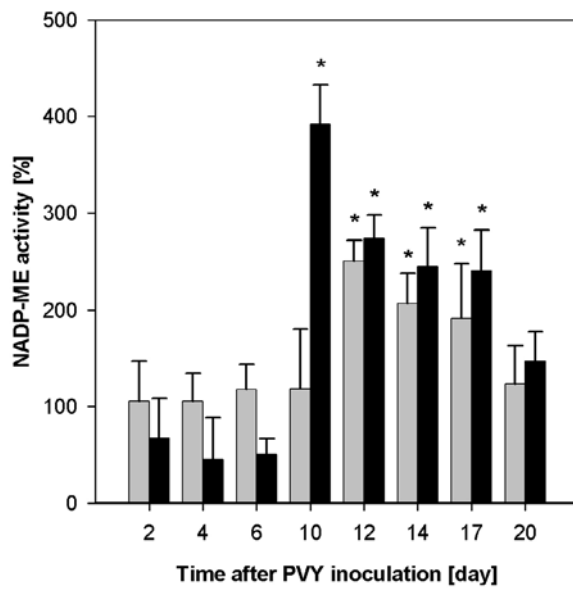


Fig. 2 Activities of NADP-ME from *Nicotiana tabacum* L. leaves during PVY^O (grey columns) and PVY^{NTN} (black columns) infections calculated per fresh mass. The activity of each sample is shown as percentage of the non-infected control in particular day, where 100% NADP-ME is $0.053 \pm 0.017 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. NADP-ME activity in mock-inoculated leaves was the same as in non-inoculated controls. The activity was measured in at least 3 samples, S.E. are shown. Statistical analysis was done using t-test. * denotes significant difference from controls at $P < 0.05$.

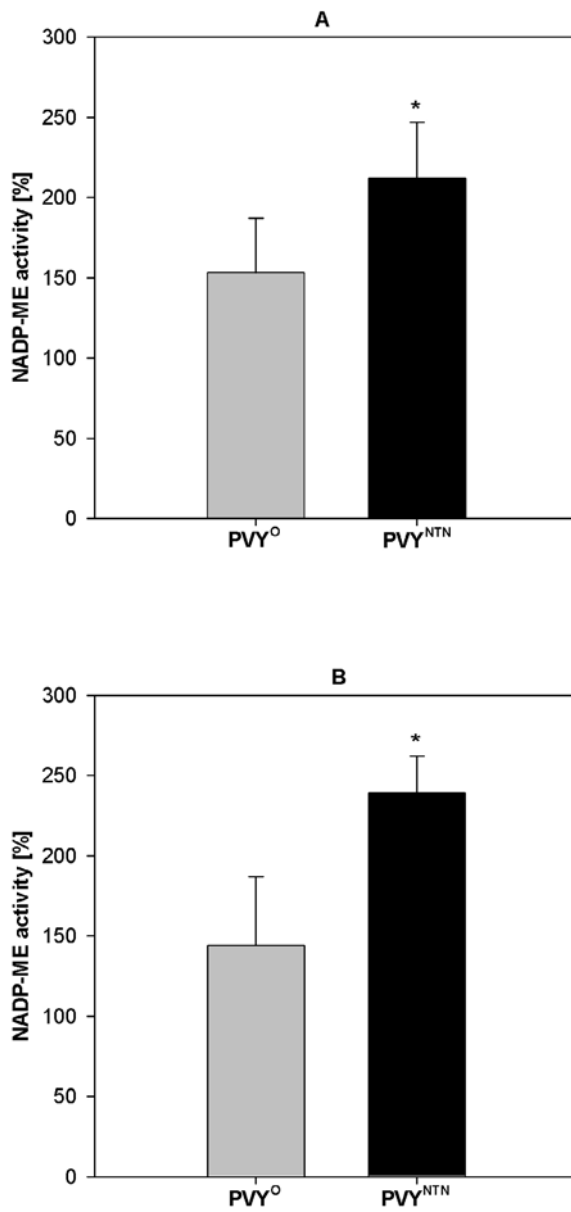


Fig. 3 Activities of NADP-ME from *Nicotiana tabacum* L. stems (A) and roots (B) collected 11th day after PVY^O inoculation and 13th day after PVY^{NTN} inoculation calculated per fresh mass. The activity of each sample is shown as percentage the activity value of the non-infected control, where 100% NADP-ME is in stems $0.040 \pm 0.005 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, in roots $0.076 \pm 0.016 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. The activity was measured in at least six samples, S.E. are shown. Statistical analysis was done using t-test. * denotes significant difference from controls at $P < 0.05$.

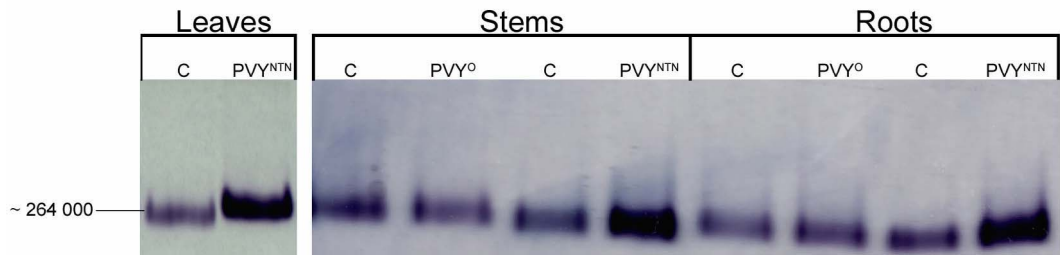


Fig. 4 Detection of isoforms of NADP-ME from control (marked as C), PVY^O and PVY^{NTN} infected leaves, stems and roots of *Nicotiana tabacum* L. plants in 10% polyacrylamide gel after non-denaturing electrophoresis. Samples were collected at the maximal symptoms occurrence of infection.

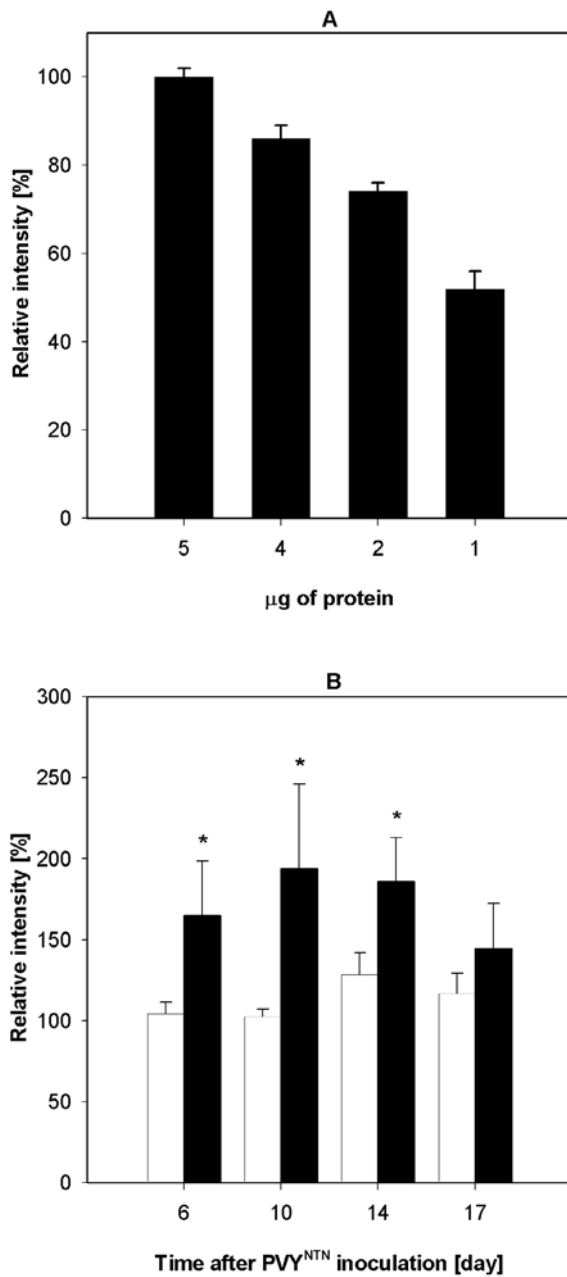


Fig. 5 Test of linearity of Western blot analysis signal using various quantities of purified NADP-ME protein from *Nicotiana tabacum* L. leaves. Estimated relative molecular mass according standard protein was 66 000. Inset plot indicate decrease in relative intensity of signal (expressed in %) evaluated densitomerically by Elfoman 2.0 (A). Detection of NADP-ME protein in control (white columns) and PVY^{NTN} infected (black columns) leaves collected 6th-17th day after inoculation (B) by Western blot analysis. At least 4 Western blot analyses were performed (representative one is shown) with control and infection samples. 100% corresponds to intensity of protein NADP-ME in control sample in the 6th day. Statistical analysis was done using t-test. * denotes significant difference from controls at P < 0.05.

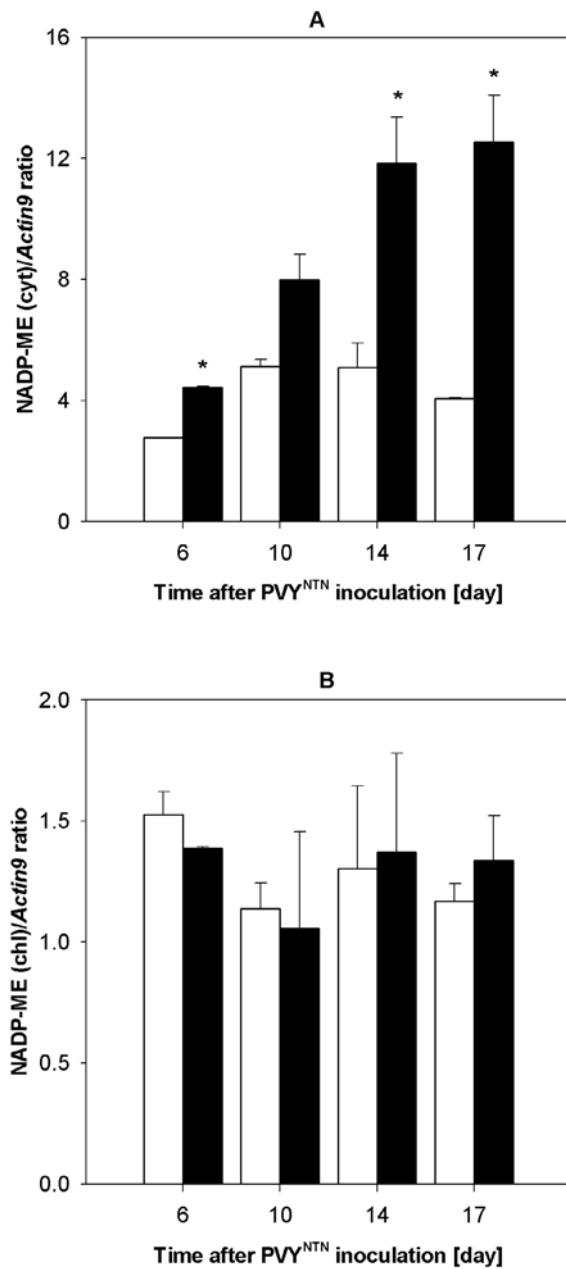


Fig. 6 Amount of cytosolic (A) and chloroplast (B) NADP-ME mRNA in PVY^{NTN} infected *Nicotiana tabacum* L. leaves (black columns) compared to healthy control (white columns) leaves measured by reverse transcription followed by real-time PCR method 6th – 17th day of viral infection. Result corresponds to ratio of cytosol NADP-ME transcript (A) or chloroplast NADP-ME transcript (B) and standard gene *Actin9*. The amount of NADP-ME mRNA was calculated from at least 3 samples, S.E. are shown. Statistical analysis was done using t-test. * denotes significant difference from controls at $P < 0.05$.

EFFECT OF *POTATO VIRUS Y* ON THE ACTIVITIES OF ANTIOXIDANT AND ANAPLEROTIC ENZYMES IN *NICOTIANA TABACUM* L. TRANSGENIC PLANTS TRANSFORMED WITH THE GENE FOR P3 PROTEIN

V. Doubnerová^{1*}, M. Janošková¹, H. Synková², Z. Šubr³, N. Čeřovská², H. Ryšlavá¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, CZ-128 40 Prague 2,

²Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Karlovce 1a, CZ-160 00 Praha 6,

³Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská 9, SK-84505 Bratislava, Slovak Republic

Received 8 November 2007

Summary. The response of transgenic *Nicotiana tabacum* L. plants carrying the gene for potyviral non-structural P3 protein to *Potato virus Y* (strain NTN) infection was not significantly different from the wild type. The activities of antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathion reductase (GR), ascorbate peroxidase (APOD) and superoxid dismutase (SOD), determined in systemically infected leaves at early stages of the infection did not change except for the transient increase in CAT and GR activities in the wild type infected plants compared to the healthy ones. At the stages, when severe symptoms of the infection developed on the leaves and the virus content reached its maximum, a significant increase in the activities of several enzymes of anaplerotic metabolic pathways, NADP-dependent malic enzyme (NADP-ME), phosphoenolpyruvate carboxylase

*Corresponding author, e-mail: doubnerova@volny.cz

(PEPC), and pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) in transgenic plants was found, similarly as in the wild type.

Key words: antioxidant enzymes, NADP-malic enzyme, PEPC, PPDK, *Potato virus Y*.

Abbreviations: AOS-activated oxygen species, APOD-ascorbate peroxidase, CAT-catalase, DAS-ELISA-Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, FW-fresh weight, GR-glutathion reductase, SOD-superoxid dismutase, NADP-ME-NADP-dependent malic enzyme, OAA-oxaloacetate, P3 plants-*Nicotiana tabacum* L, cv. Petit Havana, SR1 transformed with gene of protein P3 from *Potato virus A*, PEP-phosphoenolpyruvate, PEPC-phosphoenolpyruvate carboxylase, PPDK-pyruvate orthophosphate dikinase, PVY-*Potato virus Y*, SR1 plants-*Nicotiana tabacum* L, cv. Petit Havana, SR1, TMV-*tobacco mosaic virus*.

INTRODUCTION

Plants must continuously defend themselves against changing and often harmful environmental conditions. One of the factors which affect plants in their environment, is biotic stress that results from a battery of potential pathogens such as fungi, bacteria, nematodes, viroids and viruses (Dangl and Jones, 2001) Viral diseases are one of the main causes for decreased crop productivity world wide (Arias et al., 2003). *Potato virus Y*, strain NTN (PVY^{NTN}) invoking necrotic lesions on the host plant *Nicotiana tabacum* L., is a member of the genus *Potyvirus* (family *Potyviridae*), the largest and most destructive group of plant viruses (Shukla et al., 1994). Although plants respond to pathogens in a variety of ways, their resistance always correlates with the activation of diverse sets of certain defence mechanisms. The response involves transcriptional activation of numerous defence-related genes, opening of ion channels, modification of protein phosphorylation status, and activation of preformed enzymes to undertake specific modifications of primary and secondary metabolism. In addition, a range of secondary signalling molecules is generated to ensure coordination

of the defence response both temporally and spatially, resulting in rapid containment of the pathogen (Hammond-Kosack and Jones, 2000).

Plant-virus interaction may result in a host hypersensitive response or in systemic symptoms (Arias et al., 2003). One of the earliest responses of plant cells to pathogens is the production of activated oxygen species (AOS) (Mehdy et al., 1996). The typical AOS detected are superoxide radicals (O_2^{\bullet}) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Hammond-Kosack and Jones, 2000). AOS play a crucial role during pathogenesis. They are involved in the hypersensitive response typical for plant-pathogen incompatible interactions. They can limit the spread of pathogen by strengthening plant cell walls and/or by killing pathogens directly (Dat et al., 2000). However, AOS act as cytotoxic compounds, too. Plants have evolved complex antioxidant systems in order to protect cellular membranes and organelles from the damaging effects of AOS (Lee and Lee, 2000). Antioxidant enzymes and metabolites are located in different plant cell compartments to fulfil their protective function. The key enzymes, superoxide dismutases (EC 1.15.1.1; SODs), are a family of metalloenzymes catalyzing the dismutation of O_2^{\bullet} to H_2O_2 . SODs can be found in chloroplasts, mitochondria, peroxisomes, and in cytoplasm. Catalases (EC 1.11.1.6; CATs), heme proteins that catalyze the removal of H_2O_2 , are located in peroxisomes. Enzymes and metabolites of the ascorbate-glutathione cycle (ascorbate peroxidase (APOD), EC 1.11.1.11; glutathione reductase (GR), EC 1.8.1.7; monodehydroascorbate reductase (DHAR), EC 1.6.5.4), which is important in H_2O_2 scavenging, are located in organelles and cytoplasm (Bartosz, 1997; Dat et al., 2000; Lee and Lee, 2000). Antioxidant enzymes were often studied at sites of attempted pathogen attack and in connection with immediate responses of invaded cells (Wojtaszek, 1997). The activity of SOD and guaiacol peroxidase increased under blight conditions (caused by *Phytophthora colocasiae*) in taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) (Sahoo et al., 2007). Simultaneous overexpression of both CuZn SOD and APOD in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses (methyl viologen, H_2O_2 and heavy metals) (Lee et al., 2007). Enhanced activities of peroxidase, APOD, SOD and CAT were found in rice in response to infection caused by *Rhizoctonia solani* (Paranidharan et al., 2003).

Our present study focused on systemic responses at later infection stages. Anaplerotic enzymes can redirect the flux of intermediates in primary and secondary metabolism, thus regulating plant metabolism under stress conditions. NADP-malic enzyme (NADP-ME; EC 1.1.1.40), phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC; EC 4.1.1.31), and pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK; EC 2.7.9.1) are known as photosynthetic enzymes in C4 plants (e.g. maize, sorghum), but in C3 plants (i.e. tobacco) these enzymes play diverse functions. One of them, in addition to maintaining intracellular pH, is production of reduction equivalent NADPH. Generally, the demand for NADPH is probably higher in infected cells especially for anabolic processes requiring NADPH, such as biosynthesis of lipids, protein turnover and synthesis of specific plant defence compounds as phytoalexins (Edwards and Andreo, 1992). Transgenic plants containing viral proteins can modulate the sensitivity of the plant to viral infection due to gene silencing. It is well documented for viral coat protein (Goldbach et al., 2003). The function of potyviral non-structural P3 protein remains unknown. Immunological studies showed that it was localized either in the cytoplasm or in the nucleus of infected cells (Langenberg and Zhang, 1997; Rodríguez-Cerezo et al., 1993). P3 is believed to play a role in virus replication (Guo et al., 2001; Merits et al., 1998), in cell-to-cell movement (Johansen et al., 2001), as a protease cofactor (Riechmann et al., 1992). In addition, it can play an important role in some highly specific process, e.g. in the virus-host interaction. Although the functions of the P3 protein in the potyviral infection are not clear, interactions with products of plant resistance genes have been indirectly demonstrated (Jenner et al., 2003; Johansen et al., 2001). Therefore, it is possible that P3 protein affects some enzymes included in plant defence reactions.

The aim of the present work was to study the effect of viral infection on the activities of antioxidant and anaplerotic enzymes in upper, systemically infected leaves of transgenic *Nicotiana tabacum* L. plants transformed with the non-structural P3 gene of *Potato virus A* (PVA) in comparison with the wild type.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Transgenic plants of *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 with introduced one copy of the PVA P3 gen (P3 plants) were prepared in the Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia (Nováková et al., 2005; Ľubur et al., 2006). These plants as well as the non-transgenic controls-wild type *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 (SR1 plants) were grown in a greenhouse at 22/18 °C day/night temperatures. Seeds were sown in pots with sand and plantlets were transferred to pots with soil after 3 weeks. Leaves of 50 seven-week-old plants were infected with the virus PVY^{NTN}. Virus isolate PVY^{NTN} (Lebanon) was kindly provided by Dr. P. Dědič (Institute of Potato Research, Havlíčkův Brod, Czech Republic) as frozen symptomatic leaves. For virus inoculation, those leaves were homogenized (1/10 w/v) in 0.057 M Na₂HPO₄ buffer (pH 8) and mechanically inoculated on the adaxial surface of the bottom of mature leaves using carborundum mesh 600 as abrasive.

Two groups of controls were used for measuring the activities of the antioxidant enzymes. The first one consisted of 50 healthy, non-inoculated plants while the second one included 50 mock-inoculated (buffer and carborundum) plants. Mixed samples from upper, systemically infected leaves were collected after 2, 12, and 24 h, and then each 3-4 following days from whole mature leaves, placed above those used for the inoculation. Samples were immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C. The extent of viral infection was determined by DAS-ELISA (Clark and Adams, 1977) in homogenates of the leaves of infected plants using polyclonal antibodies raised against the respective pathogens (Čeřovská, 1998).

Enzyme activity assays

For enzyme activity assays, 1 g of leaf material was homogenized in 3 ml 100 mM Tris-HCl (pH 7.8) containing 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 5 mM MgCl₂ (buffer A); then 0.02 g of polyvinylpolypyrrolidone was added and the homogenate was centrifuged at 23 000 g for 15 min at 4 °C.

The supernatant was immediately used for enzyme activity measurements and native electrophoretic separations (applied in 20 % sucrose).

Antioxidant enzymes (CAT, GR, APOD)

Catalase was detected at 240 nm as the rate of decomposition of H₂O₂ as described by Aebi (1984). Glutathione reductase activity was assayed by the oxidation increase of NADPH at 340 nm according to Goldberg and Spooner (1984) Total ascorbate peroxidase activity was determined as the decrease in absorbance of ascorbate at 298 nm by the method of Gerbling et al. (1984).

Enzymes of anaplerotic pathways (NADP-ME, PEPC, PPDK)

The activities of all enzymes were determined spectrophotometrically at 25 °C by monitoring NAD(P)H production or depletion at 340 nm and activities were calculated as [$\mu\text{mol (substrate/product).min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ (fresh weight)].

The NADP-ME assay mixture contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM malate, 2 mM MgCl₂ and 0.2 mM NADP⁺ in total volume of 1 ml (Iglesias and Andreo, 1990). The PEPC assay mixture contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.1), 5 mM NaHCO₃, 2 mM MgCl₂, 2 mM PEP, and 0.2 mM NADH in a total volume of 1ml (Slack and Hatch, 1967). The PPDK assay mixture contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.1), 10 mM MgCl₂, 5 mM NaHCO₃, 2 mM pyruvate, 2 mM K₂HPO₄, 1 mM ATP, and 0.2 mM NADH in a total volume of 1 ml (Aoyagi and Bassham, 1983).

Electrophoretic separation

Native gel electrophoresis was performed according to Lee and Lee (2000).

Detection of SOD

The patterns and activities of superoxide dismutase (SOD) isoenzymes

were obtained after separation by gradient 7 - 14 % non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Aliquots of supernatants corresponding to 25 µg of protein per lane were used. SOD isoenzymes were detected *in situ* in the gel by the photochemical nitrobluetetrazolium (NBT) staining method according to Beauchamp and Fridovich (1971). For identification of Cu/Zn-, Mn-, and Fe-SOD isoenzymes the inhibition by 2 mM KCN and 5 mM H₂O₂ was used prior to placing the gels into the staining solution. KCN inhibited Cu/Zn-SOD while H₂O₂ inactivated both Cu/Zn-SOD and Fe-SOD.

Protein content determination

Protein content was determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976).

RESULTS

PVY^{NTN} infection

The spread of PVY^{NTN} infection was followed by the development of necrosis and determined by DAS-ELISA. The development of the symptoms was identical in both wild type and transgenic plants. Typical vein necrosis followed by leaf distortion and deformation was observed from the 9th – 12th day of the infection. The relative content of PVY^{NTN} according to DAS-ELISA was rapidly enhanced from the 7th day of the infection in infected transgenic plants and from the 10th day in the wild type plants (Table 1).

Antioxidant enzymes

Firstly, we studied the antioxidant enzymes, GR, APOD, CAT and SOD. These enzymes are known to be involved in an immediate plant defence response. Samples for activity measurements of the antioxidant enzymes were collected (a) during the early stage of the infection (2, 12 and 24 h after inoculation), and (b) when the first visible symptoms of the virus infection appeared on the leaves (10 days after PVY^{NTN} inoculation).

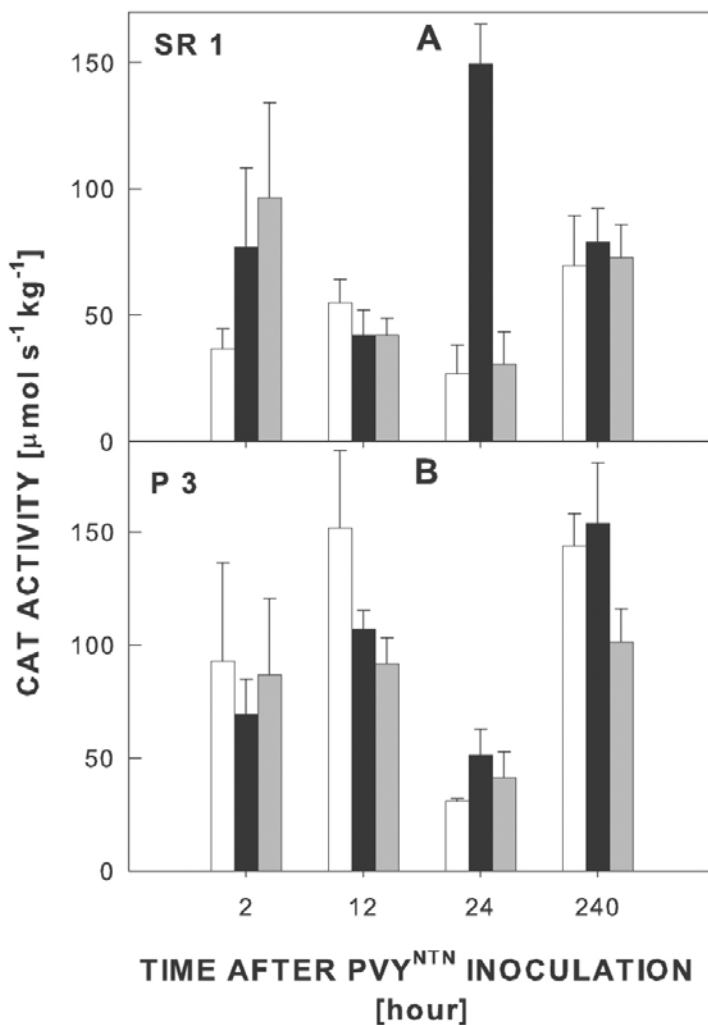


Fig. 1. Activities of CAT from *Nicotiana tabacum* L., SR1 leaves (A) and from leaves of transgenic *Nicotiana tabacum* L., SR1 transformed with the gene for P3 protein (B) 0-240 hours after inoculation by PVY^{NTN} calculated per fresh mass. Activity of control healthy plants - □, activity of mechanically mock-inoculated - ■, and activity of PVY^{NTN} infected plants - ■. The activities were measured in triplicate. The means \pm SE are shown.

The activities of CAT, GR and APOD were measured spectrophotometrically (Fig. 1, 2, 3), whereas the activities of the particular isoforms of SOD were monitored in the gel (Fig. 4).

The changes in the antioxidant enzyme activities at early stages of the infection were insignificant particularly in the transgenic P3 plants infected with PVY^{NTN}. The only exception was CAT activity which was 5-fold higher in the PVY^{NTN} infected SR1 already 24 h after inoculation (Fig. 1A) and 1.5-fold higher in the infected P3 plants compared to the healthy plants (Fig. 1B).

GR activity increased significantly 2 h after the inoculation in PVY^{NTN} infected SR1 (Fig. 2A), while a decrease was observed in P3 infected plants (Fig. 2B). The increase of GR activity was apparent in both types of infected plants (up to 120 %) 10 days after the inoculation (Fig. 2A, B).

APOD activity showed a similar time-course as GR activity. An increase

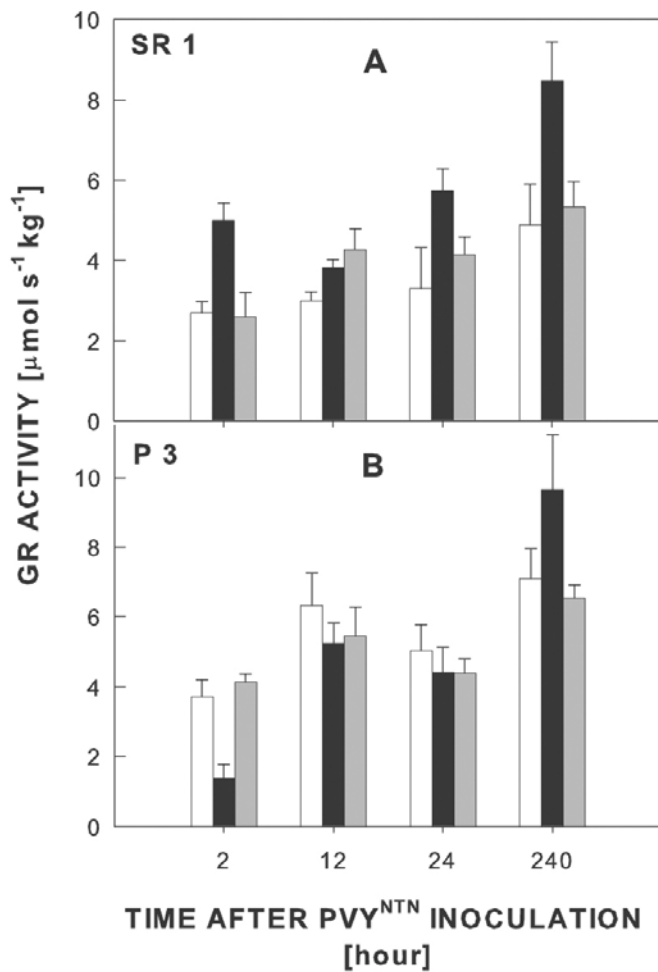


Fig. 2. Activities of GR from *Nicotiana tabacum* L., SR1 leaves (A) and from leaves of transgenic *Nicotiana tabacum* L., SR1 transformed with the gene for P3 protein (B) 0-240 hours after inoculation by PVY^{NTN} calculated per fresh mass. Activity of control healthy plants - □, activity of mechanically mock-inoculated plants - ■, and activity of PVY^{NTN} infected plants - ■. The activities were measured in triplicate. The means \pm SE are shown.

was observed 2 h after the inoculation in the infected SR1 and then 10 days after the inoculation (Fig. 3A), while in P3 plants (Fig. 3B) no significant differences among control, mock-treated and infected plants were found, although generally APOD activity increased in all plants at a later stage of the infection (Fig. 3).

The activity of SOD was specifically detected after non-denaturing electrophoresis (Fig. 4). Total SOD activity represents the combined action of Cu/Zn-, Mn- and Fe-SOD. Using KCN to inhibit Cu/Zn-SOD (Fig. 4C) or H₂O₂ to inactivate both Cu/Zn-SOD and Fe-SOD (Fig. 4D), SOD isoforms were identified. As shown in Fig. 4, one isoform of SOD in SR1 and transgenic P3 plants was identified as Mn-SOD, one isoform as Fe-SOD and two isoforms as Cu/Zn-SOD. No changes in the isoenzyme content between control healthy plants and PVY^{NTN} infected plants, and between transgenic P3 plants and wild type plants were found (Fig. 4). The

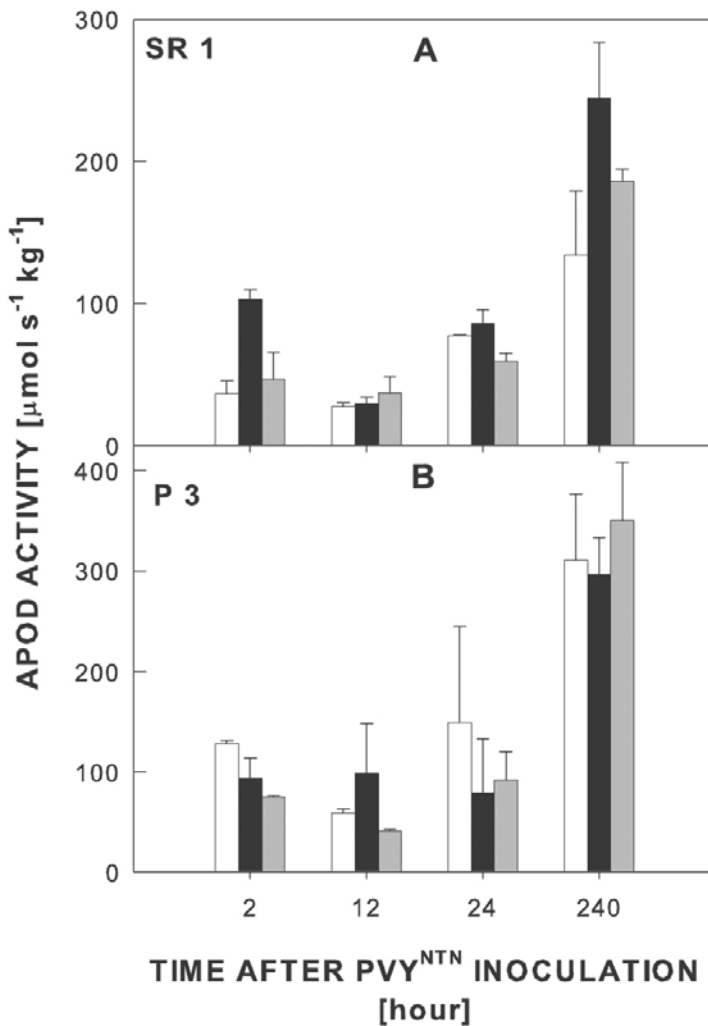


Fig. 3. Activities of APOD from *Nicotiana tabacum* L., SR1 leaves (A) and from leaves of transgenic *Nicotiana tabacum* L., SR1 transformed with the gene for P3 protein (B) 0-240 hours after inoculation by PVY^{NTN} calculated per fresh mass. Activity of control healthy plants - □, activity of mechanically mock-inoculated plants - ▒, and activity of PVY^{NTN} infected plants - ■. The activities were measured in triplicate. The means \pm SE are shown.

difference was apparent between the 10th day of the infection, when the activity of SOD was much higher than on the 2nd day of PVY^{NTN} infection (Fig. 4A, B). It could be related to senescence of the plant.

Enzymes of anaplerotic pathways

We focused our attention on NADP-ME, PEPC, and PPDK, the enzymes of anaplerotic metabolic pathways, which seem to play a very important role in plants under stress conditions (Ryšlavá et al. 2003). The time course of enzymatic activities in control (healthy), PVY^{NTN} infected and transgenic plants during the 25-d period of infection is shown in Fig. 5. NADP-ME, PEPC and PPDK significantly increased from the 10th day of PVY^{NTN} infection in leaves of infected SR1 and transgenic P3 plants as compared to the healthy controls (Fig. 5). The highest activities of NADP-

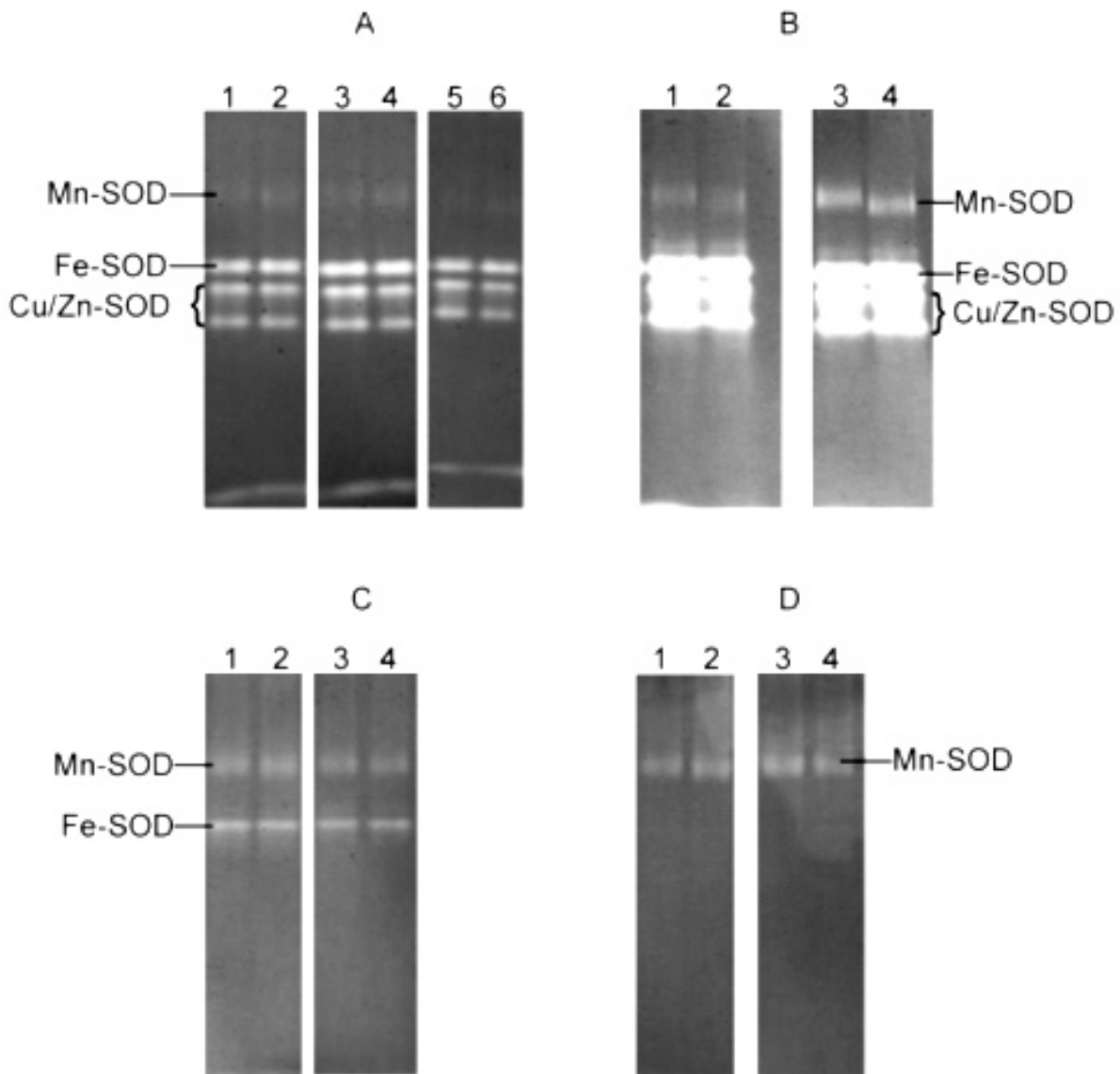


Fig. 4. Specific detection of SOD after non-denaturing electrophoresis on the 2nd (A) and 10th (B) day of PVY^{NTN} infection and identification of SOD isoforms in the presence of 2 mM KCN which inhibited Cu/Zn-SOD (C) and in the presence of 5 mM H₂O₂ which inactivated both Cu/Zn-SOD and Fe-SOD (D).

1 - healthy control leaves from *Nicotiana tabacum* L., SR1

2 - infected leaves from *Nicotiana tabacum* L., SR1

3 - healthy control leaves from transgenic *Nicotiana tabacum* L., SR1 plants carrying the gene for P3 protein

4 - infected leaves from transgenic *Nicotiana tabacum* L., SR1 plants carrying the gene for P3 protein

5 - mechanically mock-inoculated leaves from *Nicotiana tabacum* L., SR1

6 - mechanically mock-inoculated leaves from *Nicotiana tabacum* L., SR1 plants carrying the gene for P3 protein

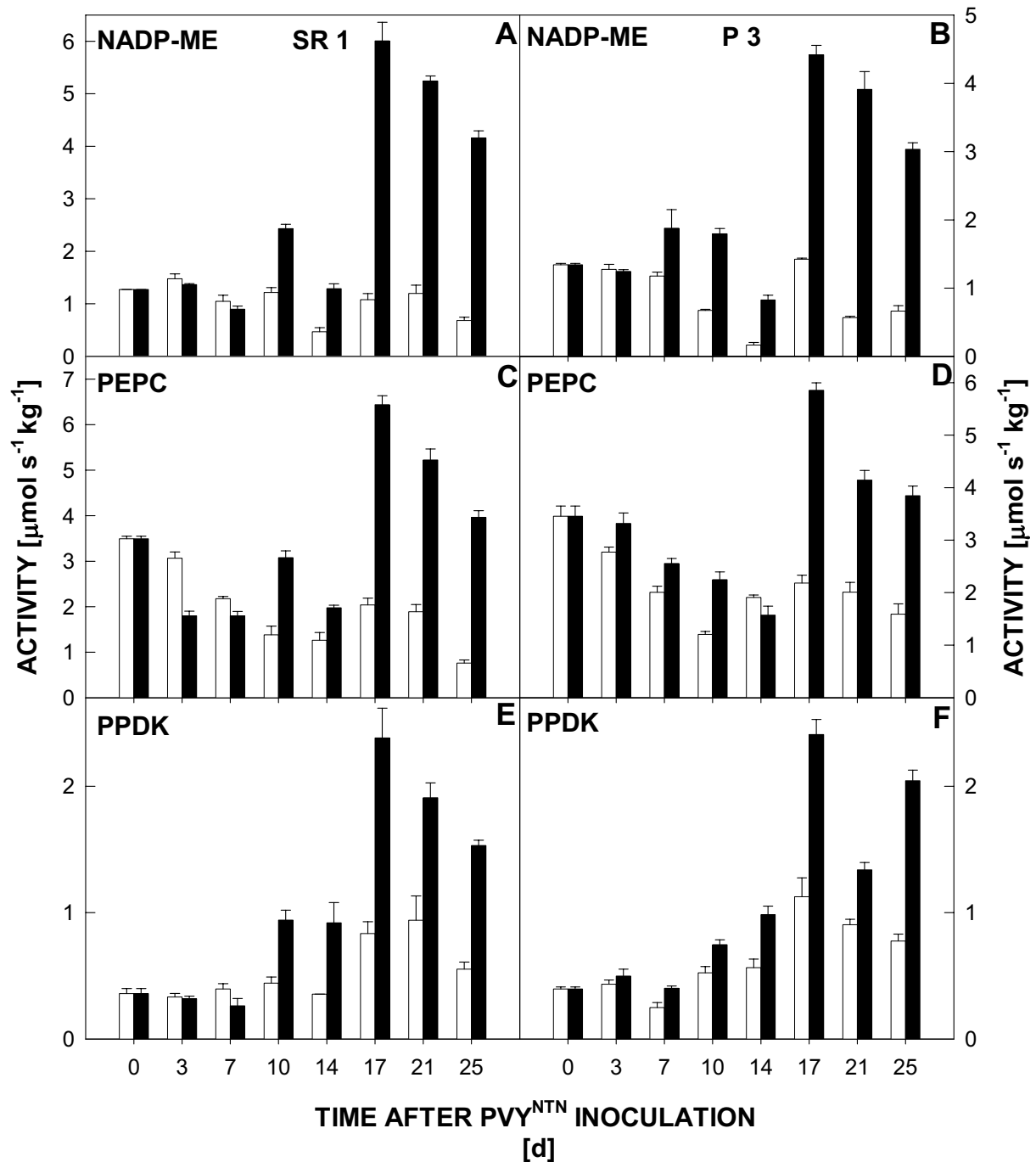


Fig. 5. NADP-malic enzyme, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate orthophosphate dikinase.

Activities of NADP-ME, PEPC and PPDK from *Nicotiana tabacum* L., SR1 leaves (A, C, E) and from leaves of transgenic *Nicotiana tabacum* L., SR1 transformed with gene for protein P3 (B, D, F) 0-25th day after inoculation by PVY^{NTN} calculated per fresh mass. The activity of control healthy plants is shown as \square , the activity of PVY^{NTN} infected plants as \blacksquare . The activity was measured in triplicate; S.E. are shown.

DAY OF PVY ^{NTN} INFECTION	A (405 nm)	
	<i>Nicotiana tabacum</i> L., SR 1	Transgenic <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> - P3
3.	0.010	0.001
7.	0.003	0.214
10.	0.454	0.128
17.	0.389	0.185
21.	0.227	0.112

Table 1. DAS-ELISA.

The relative content of virus PVY^{NTN} in infected *Nicotiana tabacum* L., SR1 plants and in infected transgenic *Nicotiana tabacum* L., SR1 with gene for protein P3 was determined by DAS-ELISA with p-nitrophenylphosphate as a substrate. Absorbance at 405 nm corresponds to virus content.

ME, PEPC and PPDK were obtained on days 17, 21 and 25 of the infection in both groups of infected plants (Fig. 5). NADP-ME was the most sensitive enzyme to PVY^{NTN} spread. The activity of NADP-ME was 6 times higher in SR1 plants and also in transgenic P3 plants within the last 8 days of the infection, when severe symptoms of virosis were visible (Fig. 5A, B).

The activity of PEPC increased from 10th day of the PVY^{NTN} infection up to 520 % in infected SR1 plants and up to 270 % in infected transgenic P3 plants (Fig. 5C, D). A similar response was observed with PPDK. This enzyme was most enhanced on the 7th and 25th days of the infection. The increase was slightly higher (up to 280 %) in infected SR1 plants (Fig. 5E) than in infected P3 plants (Fig. 5F) (up to 260 %).

DISCUSSION

Virus infection

Tobacco plants transformed with potyviral *P3* gene may be resistant against the homologous virus, as shown by Moreno et al. (1998). The P3 plants used in our experiments showed no resistance against PVA, although the P3 protein was immunologically proved in them (Nováková et al., 2005; 2006). However, a slight infection delay was observed in comparison with

non-transgenic plants (Nováková, personal communication). With PVY^{NTN} we did not detect such a delay but the virus concentration according to ELISA was generally lower in P3 plants than in SR1 plants although no time or severity differences in symptoms formation were recorded.

Antioxidant enzymes

Infection of plants by necrogenic pathogens often results in enhanced protection against secondary infection not only in the inoculated leaves but also systemically, i.e. in the healthy leaves located above the inoculated site. The biochemical mechanisms of this effect are still poorly understood, even when phenomenon of local acquired resistance and systemic acquired resistance have been thoroughly studied for many years (Ryals et al., 1996). In our study, we have focused our attention on several antioxidant enzymes, which play a crucial role in the metabolism of H₂O₂ that seems to play a central role in oxidative burst. It acts as a signal for localized death of challenged cells (i.e. hypersensitive reaction) and as a diffusible signal for the induction of a cellular protectant in adjacent cells (Levine et al., 1994). As we were interested particularly in the systemic response, we followed only the systemic response to the PVY^{NTN} infection in the leaves located above the inoculation site.

Surprisingly, a transient increase of the activities of GR and APOD was observed already 2 h after the inoculation in the infected SR1 plants. This effect was only temporary but significant and it seemed to respond to virus inoculation rather than to mock-treatment. Substantial enhancement was observed 10 d after the inoculation. A transient increase was found also in CAT activity 24 h after the inoculation. Later on, no differences among healthy control, mock-treated and infected plants were observed in CAT activity. This is in agreement with previous findings of other research groups (Hernández et al., 2001; Fodor et al., 1997). They found no changes in tobacco infected by TMV (Fodor et al., 1997) or rather a decrease in CAT activity in apricot infected by *plum pox* virus (Hernández et al., 2001). Fodor et al. (1997) found also a transient decline in APOD, GR, and SOD activities preceding the appearance of symptoms, but a substantial increase of these activities after the onset of necrosis in the inoculated leaves. In

the upper leaves, the glutathione level and the activities of GR and SOD increased 10-14 d after the inoculation concomitantly with the development of systemic acquired resistance. We did not find any substantial changes in SOD isoenzymes pattern evoked by PVY^{NTN} infection, although the activities of all isoenzymes were significantly higher compared with non-infected controls.

In transgenic P3 plants, an early systemic response to the inoculation was not observed and no significant changes in antioxidant enzyme activities were found. Nevertheless, the infected P3 plants exhibited a similar increase in GR activity as SR1 plants 10 days following the inoculation.

Enzymes of anaplerotic metabolic pathways

In the maximum of the infection, when the symptoms were fully developed and the virus proteins were immunochemically detected, enhanced activities of anaplerotic enzymes (NADP-ME, PEPC, PPDK) in the infected plant leaves were found (Fig. 5). These enzymes catalyse reactions connecting primary metabolism and thus redirect the metabolic flow which could be advantageous for the plant under non-physiological or stress conditions. PEPC can connect the metabolism of saccharides and amino acids and proteins. Under stress conditions the glycolytic degradation of storage polysaccharides and the synthesis of proteins including “pathogenesis-related proteins” is enhanced. The reaction catalysed by NADP-ME provides reduction equivalents NADPH for biosynthetic purposes, such as lipids and lignin for fortification of cell wall, specific defence compounds, phytoalexins or substrates for antioxidant enzymes (Edwards and Andreo, 1992). All these functions of NADPH could be important for the plant under viral infection. PPDK catalyses the production of phosphoenolpyruvate from pyruvate and so yields a substrate for PEPC. The described reactions could form a cycle inside one cell analogous to the cycle present in mesophyll and bundle sheath cells in C₄ plants. The significance of such a cycle in plants under biotic stress caused by viral infection could be the production of NADPH at the expense of ATP and NADH. CO₂ released after malate decarboxylation can be used for photosynthetic fixation via Calvin cycle, which can be important when the stomata are closed.

We can summarize that enhanced activities of the monitored anaplerotic enzymes were found in systemically infected leaves, however, enhanced activities of antioxidant enzymes were measured not only in infected plants, but also in mock-inoculated and healthy plants. These results were obtained for both groups of tobacco plants - control and transgenic plants carrying the gene for P3 protein. The increased metabolic flow through pathways catalyzed by PEPC, NADP-ME and PPDK seemed to be advantageous for plants under biotic stress, while the enhanced activities of the antioxidant enzymes were related more likely to plant senescence.

Acknowledgements: This work was supported by grants GA UK 428/2004, GA UK 7552/2007.

References:

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, *Methods Enzymol.*, 105, 121-126.
- Aoyagi, K., J.A. Bassham, 1983. Pyruvate orthophosphate dikinase in wheat leaves. *Plant Physiol.*, 73, 853-854.
- Arias, M.C., S. Lenardon, E. Taleisnik, 2003. Carbon metabolism alternations in sunflower plants infected with the *Sunflower chlorotic mottle virus*. *J. Phytopathology*, 151, 267-273.
- Bartosz, G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.*, 19, 47-64.
- Beuchamp, C., I. Fridovich, 1971. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44, 276-287.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Čeřovská, N., 1998. Production of monoclonal antibodies to potato virus Y^{NTN} strain and their use for strain differentiation. *Plant Pathol.*, 47, 505-509.
- Clark, M.F., A.N. Adams, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34, 475-483.

- Dangl, J.L., J.D.G. Jones, 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826-833.
- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranová, M. Van Montagu, D. Inzé, F. Van Breusegem, 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57, 779-795.
- Edwards, G.E., C.S. Andreo, 1992. NADP-malic enzyme from plants. *Phytochemistry*, 31, 1845-1857.
- Fodor, J., G. Gullner, A.L. Ádám, B. Barna, T. Kömíves, Z. Király, 1997. Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol.*, 114, 1443-1451.
- Gerbling, K.P., J.K. Grahame, K.H. Fisher, E. Latzko, 1984. Partial purification and properties of soluble ascorbate peroxidases from pea leaves. *J. Plant Physiol.* 115, 59-67.
- Goldbach, R., E. Bucher, M. Prins, 2003. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus res.* 92, 207-212.
- Goldberg, D.M., R.J. Spooner, 1984. *Methods in Enzymatic Analysis*, Vol. III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases, Verlag Chemie, Weinheim- Deerfield Beach-Florida- Basel.
- Guo, D., M.-L. Rajamäki, M. Saarma, J.P.T. Valkonen, 2001. Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.*, 82, 935-939.
- Hammond-Kosack, K.H., J.D.G. Jones, 2000. Responses to Plant Pathogens. In "Biochemistry & Molecular Biology of Plants," American Society of Plant Physiologists, Rockville-Maryland.
- Hernández, J.A., J.M. Talavera, P. Martínez-Gómez, F. Dicenta, F. Sevilla, 2001. Response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. *Physiol. Plant.*, 111, 313-321.
- Iglesias, A.A., C.S. Andreo, 1990. Kinetic and structural properties of NADP-malic enzyme from sugarcane leaves. *Plant Physiol.*, 92, 66-72.
- Jenner, C.E., W. Xiaowu, K. Tomimura, K. Ohshima, F. Ponz, J.A. Walsh, 2003. The dual role of the potyvirus P3 protein of *Turnip mosaic virus* as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Mol.*

Plant-Microbe Interact., 16, 777-784.

- Johansen, I.E., O.S. Lund, C.K. Hjulsager, J. Laursen, 2001. Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in gene-for-cistron correspondence between host and virus. *J. Virol.*, 75, 6609-6614.
- Langenberg, W.G., L. Zhang, 1997. Immunocytology shows the presence of Tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *J. Struct. Biol.*, 118, 243-247.
- Lee, D.H., C.B. Lee, 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.*, 159, 75-85.
- Lee, S.H., N. Ahsan, K.W. Lee, D.H. Kim, D.G. Lee, S.S. Kwak, S.Y. Kwon, T.H. Kim, B.H. Lee, 2007. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J. Plant Physiol.* 164, 1626-1638.
- Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon, C. Lamb, 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79, 583-593.
- Maurino, V.G., M. Saigo, C.S. Andreo, M.F. Drincovich, 2001. Non-photosynthetic malic enzyme from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant Mol. Biol.*, 45, 409-420.
- Mehdy, M.C., Y.K. Sharma, K. Sathasivan, N.W. Bays, 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.*, 98, 365-374.
- Merits, A., D. Guo, M. Saarma, 1998. VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence unspecific manner. *J. Gen. Virol.*, 79, 3123-3127.
- Moreno, M., J.J. Bernal, I. Jiménez, E. Rodríguez-Cerezo, 1998. Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of tobacco vein mottling potyvirus. *J. Gen. Virol.*, 79, 2819-2827.
- Nováková, S., J. Klaudivy, E. Kollerová, Z.W. Šubr, 2006. Expression of a part of the *Potato virus A* non-structural protein P3 in *Escherichia coli* for the purpose of antibody preparation and P3 immunodetection

- in plant material. *J. Virol. Methods*, 137, 229-235.
- Nováková, S., L. Mazúrová, N. Čeřovská, Z.W. Šubr, 2005. Transgenic tobacco plants carrying the non-structural P3 gene of *potato virus A*. *Biol. Plant.*, 49, 593-598.
- Paranidharan, V., A. Palaniswami, P. Vidhyasekaran, R. Velazhahan, 2003. Induction of enzymatic scavengers of active oxygen species in rice in response to infection by *Rhizoctonia solani*. *Acta Physiol. Plant.* 25, 91-96.
- Riechmann, J.L., S. Lain, J.A. Garcia, 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.*, 73, 1-16.
- Rodríguez-Cerezo, E., E.D. Ammar, T.P. Pirone, J.G. Shaw, 1993. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J. Gen. Virol.*, 74, 1945-1949.
- Ryals, J.A., U.H. Neuenschwander, M.G. Willits, A. Molina, H.-Y. Steiner, M.D. Hunt, 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
- Ryšlavá, H., K. Muller, Š. Semorádová, H. Synková, N. Čeřovská, 2003. Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Photosynthetica*, 41, 357-363.
- Sahoo, M.R., M. DasGupta, P.C. Kole, J.S. Bhat, A. Mukherjee, 2007. Antioxidative enzymes and isozymes analysis of taro genotypes and their implications in *Phytophthora* blight disease resistance. *Mycopathologia* 163, 241-248.
- Shukla, D., C.W. Ward, A.A. Brunt (eds), 1994. *The Potyviridae*, CAB International, Wallingford.
- Slack, C.R., M.D. Hatch, 1967. Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses. *Biochem. J.*, 103, 660-665.
- Šubr, Z., S. Nováková, H. Drahovská, 2006. Detection of transgene copy number by analysis of the T1 generation of tobacco plants with introduced P3 gene of *Potato virus A*. *Acta Virol.*, 50, 135-138.
- Wojtaszek, P., 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.*, 322, 681-692.

The activity and isoforms of NADP-malic enzyme in *Nicotiana benthamiana* plants under biotic stress

V. Doubnerová¹, A. Jirásková¹, M. Janošková¹, K. Müller¹, P. Bařková^{2,3}, H. Synková², N. Āeřovská² and H. Ryřlavá¹

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic

² Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Karlovce 1a, 160 00 Prague 6, Czech Republic

³ Department of Plant Anatomy and Physiology, Faculty of Sciences, Charles University, ViniĀná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic

Abstract. The activity and presence of isoforms of NADP-dependent malic enzyme (NADP-ME, EC 1.1.1.40) were studied in non-transgenic and transgenic *Nicotiana benthamiana* plants containing potyviral gene for helper component protease (HC-pro) and in plants infected by *Potato virus Y* strain NTN (PVY^{NTN}). No significant changes in enzyme activities and isoenzyme pattern were observed due to foreign gene introduction and PVY^{NTN} infection. However, the activity and isoenzyme composition of NADP-ME measured in extracts from different parts of the plants showed significant differences. Non-denaturing electrophoresis followed by specific detection of NADP-ME activity in polyacrylamide gel detected the presence of only one isoform in roots and younger leaves. Two isoforms of NADP-ME were detected in older leaves and stem (relative molecular mass ~248,000 and ~280,000) and three isoforms corresponding to tetramer, dimer and monomer were found in flowers. The activity of NADP-ME and the isoenzyme pattern was discussed in relation to its role in plant metabolism within distinct plant parts.

Key words: NADP-malic enzyme isoforms — *Nicotiana benthamiana* — HC-pro — *Potato virus Y*

Abbreviations: EDTA, ethylenediaminetetraacetate; NADP-ME, NADP-dependent malic enzyme; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; PVY, *Potato virus Y*

Introduction

NADP-dependent malic enzyme (NADP-ME, L-malate: NADP⁺ oxidoreductase (oxaloacetate-decarboxylating), EC 1.1.1.40) catalyzes the oxidative decarboxylation of L-malate and NADP⁺ to produce pyruvate, CO₂ and NADPH (Edwards and Andreo 1992; Maurino et al. 2001). To decarboxylate malate enzyme requires a divalent cation. The most effective cations are Mg²⁺, Mn²⁺ and Co²⁺ (Wedding 1989). The NADP-ME was found in animal and plant tissues as well as in prokaryotic and eukaryotic microorganisms (Edwards and Andreo 1992).

In mammals, malic enzyme is a tetrameric protein with double dimer structure and enzymes assigned as EC 1.1.1.40 are either cytosolic or mitochondrial enzymes (Chang and Tong 2003). In mammalian liver, NADP-ME is major NADPH-generating enzyme for lipogenesis (Chang and Tong 2003).

The NADP-ME is widely distributed among all types of plants, but the isoform present in bundle sheath chloroplasts of several C₄ plants is the best characterized. In this type of plants, NADP-ME plays an important role in photosynthetic metabolism as it generates CO₂ and reducing power (NADPH) in the chloroplasts, where Calvin cycle operates (Maurino et al. 2001). Three isoforms of NADP-ME have been characterized in maize: 62,000 form, which is implicated in C₄ metabolism and predominated in green leaves, 66,000 non-photosynthetic isoform assembles as a dimer and 72,000 non-photosynthetic form of the protein, present

Correspondence to: Veronika Doubnerová, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic
E-mail: doubnerova@volny.cz

mainly in etiolated leaves (Maurino et al. 1996; Saigo et al. 2004). However, the 72,000 protein, which was also purified from wheat stems (Casati et al. 1997), *Egeria densa* leaves (Casati et al. 2000), *Aptenia cordifolia* leaves (Falcone et al. 2003), *Ricinus communis* cotyledons (Colombo et al. 1997), and immunochemically identified, was later defined as a heat shock protein (Lara et al. 2005). The photosynthetic enzyme isolated from maize leaves exists as a tetramer (at pH 7.5) or a dimer (at pH 7.0) depending on pH and a buffer used. The enzyme purified from sugar cane (C_4) leaves can readily undergo changes in oligomerization between monomer, dimer and tetramer with the tetramer form being favoured at high pH (8.0). All three forms of the enzyme are enzymatically active (Edwards and Andreo 1992). In CAM (crassulacean acid metabolism) plants, a cytosolic isoform (e.g. ice plant 64,000 form) also functions as a decarboxylase of malate to donate CO_2 for Calvin cycle (Drincovich et al. 2001).

Also in C_3 plants, the NADP-MEs are encoded by small gene families. The best studied family of malic enzymes is from *Arabidopsis thaliana* (C_3 dicot plant), where the whole genome sequence is known (Wheeler et al. 2005). The *Arabidopsis* genome contains four genes encoding NADP-MEs. One isoform is localized in plastids and exists in equilibrium of active dimers and tetramers, whereas the other three isoforms are cytosolic and are present as hexamers or octamers (Wheeler et al. 2005). The rice (*Oryza sativa*, C_3 monocot plant) NADP-ME family is composed of four members, one plastidic and three cytosolic versions. Each rice NADP-ME gene has presumably a different tissue-specific and developmental profile (Chi et al. 2004).

Non-photosynthetic forms of NADP-ME seem to be present in all plants (C_4 , CAM, C_3) and they play diverse functions. These roles may be anaplerotic, providing pyruvate and NADPH, which could be used in assimilatory processes requiring NADPH, e.g. lipid biosynthesis (Edwards and Andreo 1992). NADP-ME has also been suggested to serve as a pH stat in a combination with phosphoenolpyruvate carboxylase. In addition, non-photosynthetic NADP-ME has been proposed to function in plant defence response. For example, a direct evidence of the induction of bean NADP-ME by UV-B radiation was obtained (Drincovich et al. 2001). The increase in NADP-ME activity was also observed, when a fungal elicitor preparation, cellulase or jasmonate were applied directly to roots of intact maize seedlings (Maurino et al. 2001). In our previous work, the influence of viral infection caused by *Potato virus Y* strain NTN (PVY^{NTN}) on plant metabolism of *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 was studied. PVY^{NTN}-infected tobacco plants responded with the enhanced activity of NADP-ME (Ryšlavá et al. 2003). Gels after non-denaturing electrophoresis stained for NADP-ME activity showed the presence of one protein band with the NADP-ME activity in leaves of *N. tabacum* L.

In this study, we used control, non-transgenic *Nicotiana benthamiana* and transgenic *N. benthamiana* plants transformed with the gene for helper component protease (HC-pro) of *Potato virus A* (PVA). Plants expressing HC-pro could change susceptibility to infection with homologous viruses (Savenkov and Valkonen 2002). The aim of this study was to test the influence of viral infection caused by PVY^{NTN} on the activity of NADP-ME and on the presence of NADP-ME isoforms in different parts of transgenic and non-transgenic *N. benthamiana* plants. The approximately relative molecular masses of corresponding NADP-ME isoforms were determined after non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

Materials and Methods

Plant material

N. benthamiana plants and transgenic *N. benthamiana* plants transformed with HC-pro of PVA were kindly provided by Dr. Savenkov (Uppsala, Sweden). The plants were grown in a greenhouse under temperatures 22/18°C day/night. Seeds were sown in pots with sand and plantlets were transferred to soil after 3 weeks. Leaves of 7-weeks old plants were mechanically inoculated with PVY^{NTN}, kindly provided by Dr. Dědič (Potato Research Institute, Havlíčkův Brod, Czech Republic). The samples were collected from control and infected leaves within 26 days and 26th day also from flowers, stems and roots. As a control the plants without viral infection were used. Samples were immediately frozen in liquid N_2 and stored at $-75^\circ C$. The extent of viral infection was determined by double antibody sandwich-ELISA (Clark and Adams 1977) in homogenates of the leaves of infected plants using polyclonal antibodies raised against PVY^{NTN} (Čeřovská 1998). Sample of maize leaves were collected from plants *Zea mays* var. 2013 Čejč.

The enzyme activity assays

For assay of NADP-ME activity, 0.5 g of plant tissue was homogenized in 1.5 ml 100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.8) containing 1 mmol/l dithiothreitol, 1 mmol/l EDTA and 5 mmol/l $MgCl_2$; then 0.02 g of polyvinylpyrrolidone was added and the homogenate was centrifuged at $23,000 \times g$ for 15 min at $4^\circ C$. The supernatant was used as plant extract for measuring NADP-ME activity. The NADP-ME activity was determined spectrophotometrically at $25^\circ C$ by monitoring NADPH production at 340 nm. The NADP-ME assay mixture contained 100 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mmol/l malate, 2 mmol/l $MgCl_2$ and 0.2 mmol/l $NADP^+$ in total volume of 1 cm^3 . The reaction was started by addition of 50 μl of the enzyme extract.

Electrophoretic separations

Native gel electrophoresis was performed according to Lee and Lee (2000). The same volume (25 μ l) of all plant extracts with 20% of sucrose was applied to the gel. The gels (6%) were assayed for the NADP-ME activity by incubating in a solution of 100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4) containing 10 mmol/l L-malate, 10 mmol/l MgCl₂, 2 mmol/l NADP⁺, 0.1 mg·ml⁻¹ nitroblue tetrazolium and 5 μ g·ml⁻¹ phenazine methosulfate at room temperature (Maurino et al. 2001).

Native molecular mass estimation

The molecular mass of the protein NADP-ME was evaluated by native gel electrophoresis using a Biometra multigel apparatus and commercial markers for native electrophoresis. 100[log(R_f × 100)] values were plotted against the acrylamide concentrations in gels, where R_f is relative mobility of standard proteins. Consequently, the logarithms of negative values of slopes were plotted against the logarithm of relative molecular masses (248,000; 132,000; 66,000; 45,000; 29,000; 14,200). The size of isoforms of NADP-ME was calculated from the regression line thus obtained (Ferguson 1964; Lottspeich and Zorbas 1998).

In vivo localization of NADP-ME

Malic enzyme was localized by staining for its activity on fresh hand-cut sections of the leaf midribs and the stem. The sections were incubated immediately in 10 ml of staining solution consisting of 100 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mmol/l L-malate, 10 mmol/l MgCl₂, 7.6 mg NADP⁺, 12 μ mol/l nitroblue tetrazolium chloride (NBT), and 0.16 μ mol/l phenazine methosulfate for 30 min in the dark at the room temperature. The control staining was done without malate or NADP⁺. The blue dye indicated NADP-ME activity, which was not present in the control staining. The sections were examined in the light microscope Nikon Eclipse E600 equipped with CCD camera.

Results

Activity and isoforms of NADP-ME in different parts of *N. benthamiana*

Plant extracts from different parts of *N. benthamiana* (leaves, stems, roots) were assayed for activity of NADP-ME and the presence of enzyme isoforms was studied. The whole plant was divided into several sections, labelled as L1–L4, indicating the position of leaves from top of the plant (Fig. 1). The stem was divided in two parts, upper (S1) and lower (S2). Leaves at top of the plant L1 exhibited the highest activity of NADP-ME calculated *per* fresh weight. The activity of

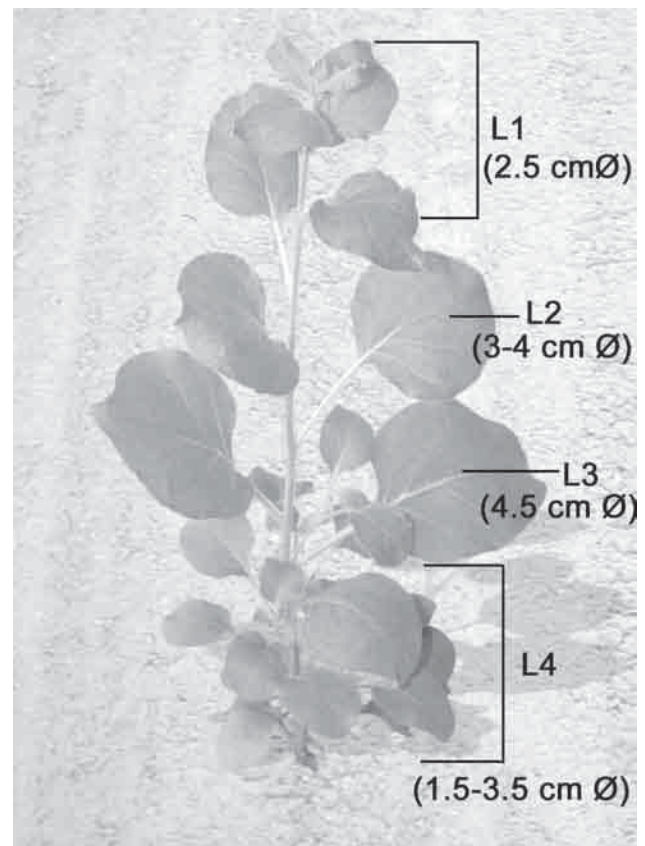


Figure 1. Leaves from 7-weeks old plants *N. benthamiana* were divided into 4 groups (L1, L2, L3 and L4) according their localization and size.

NADP-ME decreased gradually from the upper parts of the plant to the older basal leaves (Fig. 2).

Native gel electrophoresis and staining for NADP-ME activity detected one band in young (L1) leaves and in the roots (R), but with different electrophoretic mobility (Fig. 2). The occurrence of one band probably indicates the presence of solely isoform of NADP-ME in young leaves and roots. Two isoforms were observed in older leaves (L2, L3, L4) and in two different sections of the stem (S1, S2; see Fig. 2). Moreover, three isoforms of NADP-ME were apparent in flowers of *N. benthamiana* (Fig. 3).

Influence of PVY^{NTN} infection on NADP-ME

The relative content of virus PVY^{NTN} and activity of NADP-ME in leaves of control *N. benthamiana* and transgenic plants of HC-pro *N. benthamiana* were measured in samples collected three times a week during 26 days of infection. The time course of activity of NADP-ME in leaves was expressed as percentage of the activity of control healthy plants (calculated *per* fresh leaf matter). No statistically significant changes were

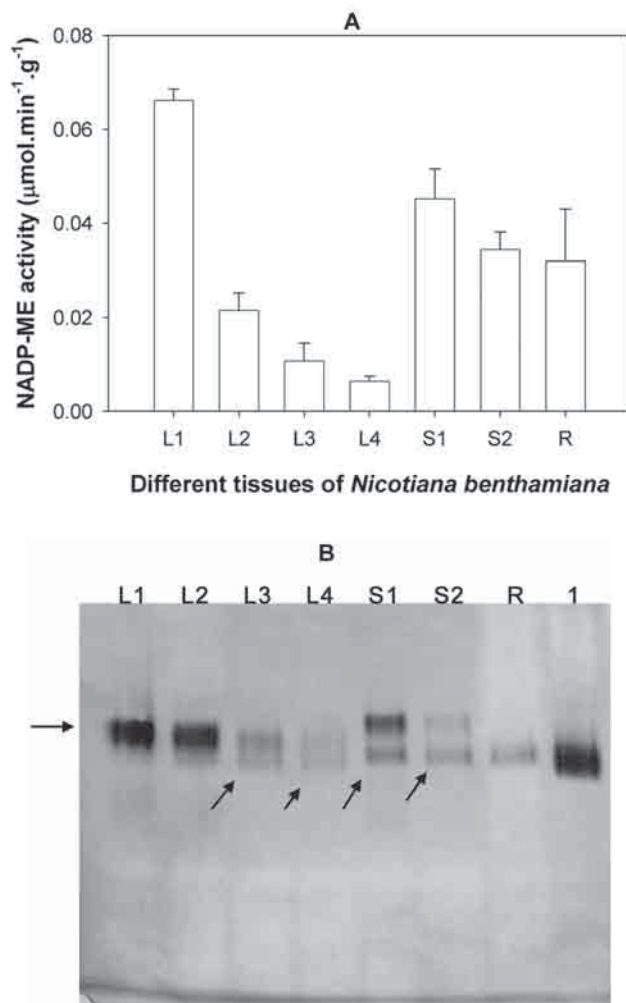


Figure 2. **A.** Activities of NADP-ME calculated *per* fresh mass from different parts of *N. benthamiana* (from different leaves L1, L2, L3 and L4; from upper stems S1, lower stems S2, and from roots R). The activity was measured in triplicate, S.E. are shown. **B.** Detection of activity of NADP-ME in 6% polyacrylamide gel after non-denaturing electrophoresis. The line with label 1 contains plant extract from green maize leaves, 7-times diluted compared to others samples. The straight arrow indicates a position of NADP-ME isoforms with lower electrophoretic mobility, whereas isoforms with higher electrophoretic mobility are marked with oblique arrows.

found in activities of leaves from *N. benthamiana* and transgenic HC-pro *N. benthamiana* plants infected by PVY^{NTN} (Fig. 4A). Only in PVY^{NTN}-infected roots from both groups of plants were found slight increase (180 and 215%) in activities of NADP-ME in comparison to healthy controls representing 100% (Fig. 4B) in the maximum of infection.

The maximal content of PVY^{NTN} virus was found in the end of the infection (26th day) in both transgenic (HC-pro) and non-transgenic plants of *N. benthamiana* (Table 1).

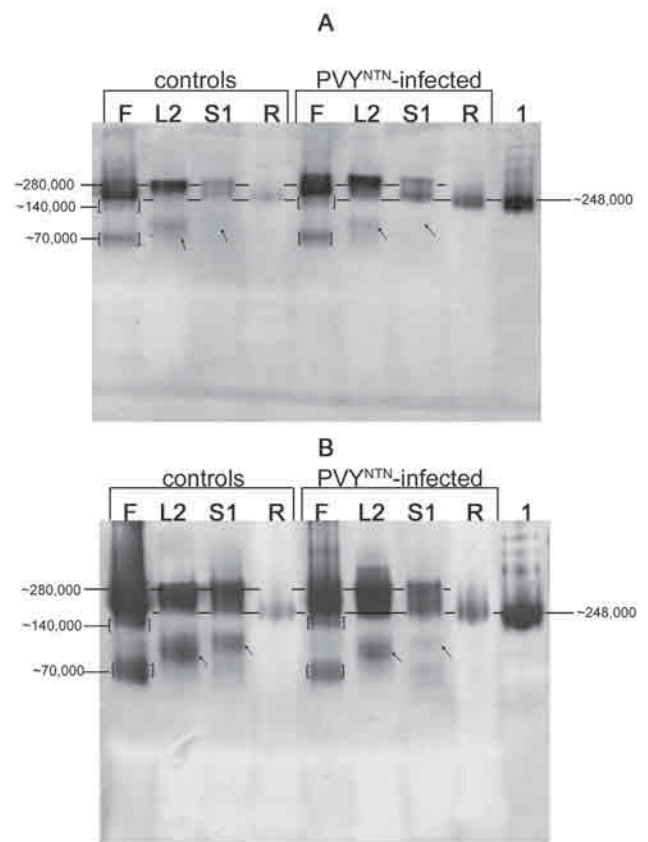
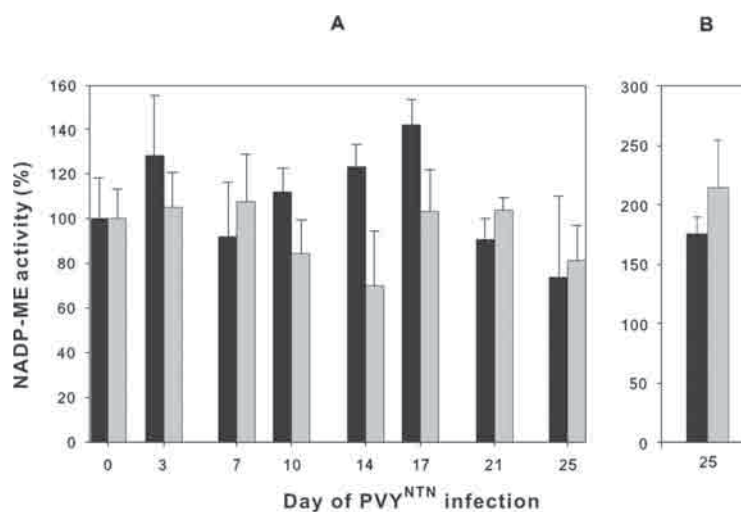


Figure 3. Detection of isoforms of NADP-ME from control and PVY^{NTN}-infected flowers (F), leaves (L2), stems (S1) and roots (R) of *N. benthamiana* plants (**A**) and from transgenic *N. benthamiana* plants transformed with HC-pro (**B**) in 7% polyacrylamide gel after non-denaturing electrophoresis. The line with label 1 contains plant extract from green maize leaves, 7-times diluted compared to others samples. The same results were obtained from two independent courses of PVY^{NTN} infection. The oblique arrows indicate position of bands corresponding to NADP-ME activity, which were visible only when 8 and 7% polyacrylamide gel was used.

Table 1. The relative content of virus PVY^{NTN} was determined by DAS-ELISA with *p*-nitrophenylphosphate as enzyme substrate. Absorbance at 405 nm is proportional to the virus content

Day of PVY ^{NTN} infection	Absorbance (405 nm)	
	<i>N. benthamiana</i>	<i>N. benthamiana</i> - HC-pro
3	0.03	0.02
7	0.06	0.05
10	0.06	0.08
14	0.78	0.67
17	0.85	0.92
21	1.19	1.28
25	1.74	1.31

Figure 4. Activities of NADP-ME in leaves L2 (A) and roots (B) of *N. benthamiana* (■) and in transgenic plants *N. benthamiana* with HC-pro (□) 0–26th day after inoculation by PVY^{NTN}. The activity of each sample is calculated as percentage of the non-infected control, where 100% of NADP-ME activity corresponds to $0.022 \pm 0.004 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ in *N. benthamiana* leaves and $0.032 \pm 0.011 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ in *N. benthamiana* roots. In each repetition of the experiment, the activity was measured triplicate. S.E. are shown.



NADP-ME isoform analysis of crude extracts from flowers, leaves, stems, and roots from healthy and infected non-transgenic and transgenic *N. benthamiana* plants was done on 26th day of the PVY^{NTN} infection, when the virus content was very high (Fig. 3). No significant differences in the isoform contents were observed among transgenic and non-transgenic plants.

Estimation of relative molecular masses of NADP-ME isoforms in *N. benthamiana*

Native electrophoresis carried out in various concentrations of polyacrylamide gel, which simultaneously enables to stain the gels for enzyme activity and distinguish isoform of NADP-ME and its oligomerization states, was applied. Non-denaturing electrophoresis with native standard proteins in various concentrations of polyacrylamide gel was used for molecular mass estimation of corresponding isoforms of NADP-ME. The presence of the isoforms of NADP-ME in flowers, leaves, stems and roots is shown in Table 2. When the native electrophoresis is carried out in a set of gels of various polyacrylamide concentrations, the enzyme isoforms differing both in molecular mass and/or charge could be determined (Lottspeich and Zorbas 1998). In 5, 6, 7 and 8% polyacrylamide gels we measured relative mobility of three bands presented in *N. benthamiana* flowers samples, two bands in leaves and stems samples and one band in roots and maize leaves sample (only 7% gel is shown in Fig. 3). No differences in isoenzyme content were observed between healthy and PVY^{NTN}-infected parts of *N. benthamiana* plants. Another (third) band was also visible in leaves and stems (Fig. 3), but only in 7 and 8% polyacrylamide gel. Therefore, this form couldn't be exactly analyzed with Ferguson's method (Ferguson 1964; Lottspeich and Zorbas 1998). Probably it is a partially degraded NADP-ME, but with retained enzyme activity. Also the presence of another

Table 2. The presence of isoforms of NADP-ME in flowers (F), leaves (L2), stems (S1) and roots (R) from both control and PVY^{NTN}-infected plants *Nicotiana benthamiana* and transgenic plants *N. benthamiana* transformed with HC-pro

	~280,000 (~70,000)	~248,000 (~62,000)	~140,000 (~70,000)	~70,000	Fragment NADP-ME
F	+	-	+	+	-
L2	+	+	-	-	(+)
S1	+	+	-	-	(+)
R	-	+	-	-	-

The numbers indicate apparent relative molecular mass of whole native protein NADP-ME, the number in brackets corresponds to relative molecular mass of a monomer in case of the native NADP-ME is a tetramer or dimer. +, the presence of the isoform; -, the absence of the isoform; (+), facultative presence of the isoform.

isoform is possible as well. Ferguson's plots (dependence of $100[\log(R_f \times 100)]$ on polyacrylamide gel concentration) allowed determine, which isoform is larger in size or charge, alternatively found how given isoforms are related to each other. For example, when in Ferguson's graph two plots are connected in one point, which is positioned below value 2% of polyacrylamide gel on x-axis, then two relevant proteins have different molecular weight, but the same charge. Generally it could be two oligomerization forms of one protein (Lottspeich and Zorbas 1998). It was the case of three forms presented in flower of *N. benthamiana*. All three Ferguson's plots were intersect in one point ($T < 2\%$ of polyacrylamide gel concentration) (Fig. 6). Each curve had different minus slope value (retardation coefficient) and calculated relative molecular masses from calibration curve (Fig. 5B) correspond to tetramer, dimer and monomer, when monomer was about 70,000 (Table 2).

Tetramer NADP-ME with molecular mass of one subunit about 70,000 found in flowers (~280,000 isoform) had ana-

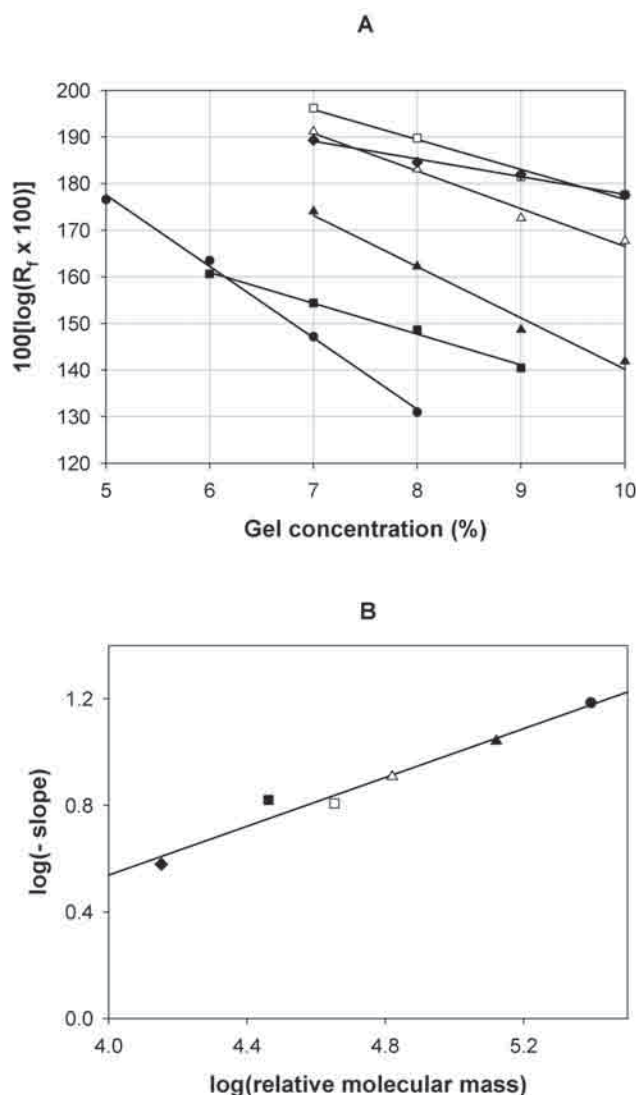


Figure 5. A. Ferguson plots for determination of standards slopes. R_f corresponds to relative mobility of native protein in various concentrations of polyacrylamide gel (5–10%). α -lactalbumin (14,200; ◆), carbonic anhydrase (29,000; ■), albumin from chicken egg (45,000; □), albumin from bovine serum (66,000 monomer \triangle ; 132,000 dimer \blacktriangle) and NADP-ME from maize green leaves (248,000; ●) were used as the standard proteins. B. Secondary regression line obtained from plot A, from which relative molecular masses of isoforms of NADP-ME from different parts of *N. benthamiana* were calculated.

logues in leaves and stems of *N. benthamiana*, because we established for appropriate forms identical relative mobility in gels. Second isoform of NADP-ME in leaves and stems and one isoform present in roots of *N. benthamiana* have very similar relative mobility in gels with NADP-ME from maize leaves. Ferguson's plots were near each other; retardation coefficients were almost the same. Calculated relative

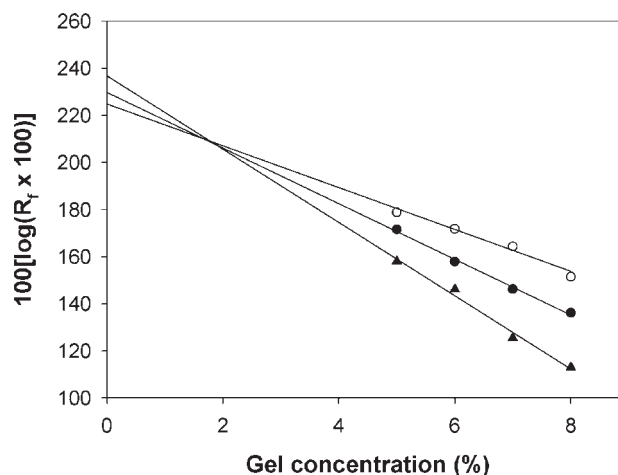


Figure 6. Ferguson's plots for determination of slopes for 3 isoforms NADP-ME present in *N. benthamiana* flowers. R_f corresponds to relative mobility of native protein in various concentrations of polyacrylamide gel (5–8%). The point of intersection indicates that there is one protein in three different oligomerization states. From the slopes relative molecular masses of 70,000; 140,000 and 280,000 can be estimated.

molecular masses from calibration curve (Fig. 5B) agree with tetramer of NADP-ME from maize leaves. Therefore, it could indicate, that NADP-ME isoform present in *N. benthamiana* leaves, stems and roots has relative molecular mass about 248,000, because it is known, that NADP-ME from maize leaves is tetramer with molecular mass 248,000 (Edwards and Andreo 1992; Detarsio et al. 2007). Ferguson's plot belonging to NADP-ME from maize leaves (248,000 isoform) and plot belonging to \sim 280,000 isoform weren't intersect, with 248,000 isoform plot above \sim 280,000 isoform (data not shown). It correlates with fact, that upper protein according to Ferguson's method is smaller and with larger charge (Lottspeich and Zorbach 1998).

Localization of NADP-ME in *N. benthamiana* plants

Localization of NADP-ME activity was carried out on fresh hand cut sections from various parts of *N. benthamiana* plant using NBT staining method (Fig. 7). NADP-ME activity was indicated by blue colour. Fig. 7A represents control staining without the presence of malate. In leaves, the enzyme was localized particularly in cells around the veins in the midrib (Fig. 7C). Blue stains were also apparent in chloroplasts of stomatal, epidermal, and mesophyll cells (small arrows, see Fig. 7D and E). In stem sections taken from upper and lower part of the stem (S1, S2), NADP-ME activity was localized in xylem parenchyma cells vessels and in phloem cells (Fig. 7B,E,G,H). Contrary to small changes in activities of crude extracts found in PVY^{NTN}-infected leaves, the stem sections of infected *N. benthamiana*

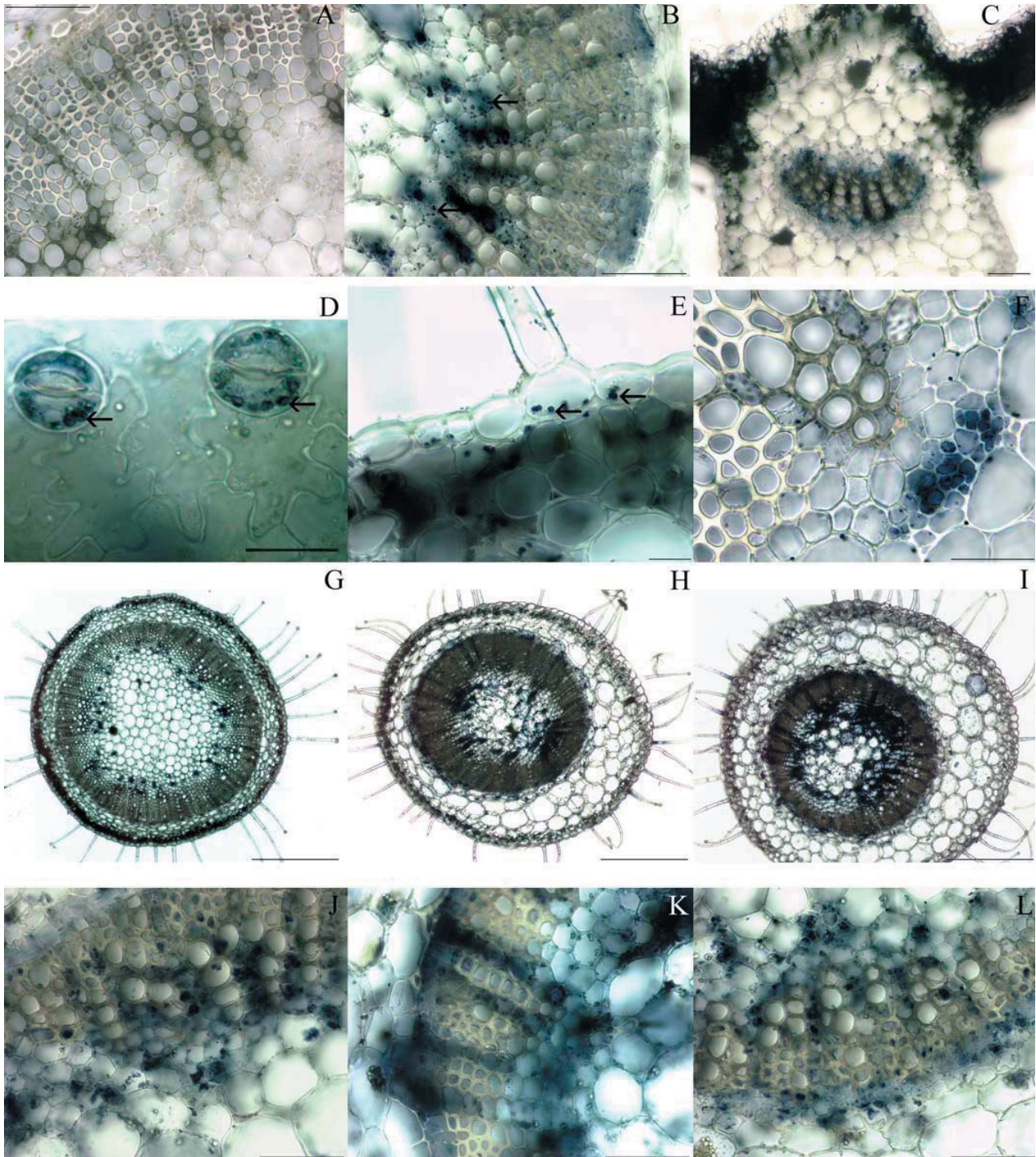


Figure 7. Localization of NADP-ME activities in fresh hand cut sections from different parts of *N. benthamiana* plant by the method of NBT staining. The blue coloration indicates NADP-ME activity. **A.** Control staining without the presence of malate. **B.** The section of the stem (S2). **C.** The section of the leaf midrib. **D.** Stomatal cells. **E.** Epidermal cells. **F.** Detailed view of the xylem and phloem cell in the stem section. **G.** Cross-section of the stem (S1). **H.** Cross-section of the stem (S2) of the healthy *N. benthamiana*. **I.** Cross-section of the stem (S2) of the PVY^{NTN}-infected *N. benthamiana*. **J., K., L.** Detailed view of S2 section from the PVY^{NTN}-infected *N. benthamiana*. Small arrows mark stained chloroplasts. Scale bars represent: A, B, C, J, K, L = 100 μm ; D = 35 μm ; E = 25 μm ; F = 50 μm ; G, H, I = 500 μm .

plants showed stronger coloration, particularly in phloem and along the xylem vessels (Fig. 7I,J,K,L).

Discussion

Occurrence of NADP-ME isoforms

Our results showed that NADP-ME in *N. benthamiana* plants is present at least in two isoforms differing in their electrophoretic properties (Figs. 2, 3). Plant NADP-MEs are coded by a small gene family (Wheeler et al. 2005). In C_3 plants *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* with known genome, the sequences of three cytosolic and one chloroplastic isoforms were found (Chi et al. 2004; Wheeler et al. 2005). However, it is not sure until now if such a composition of the gene family is common for all plants. Differences in the expression of particular NADP-MEs may occur in various tissues, in different developmental stages, and among plant species (Chi et al. 2004; Wheeler et al. 2005).

Localization of NADP-ME

We found NADP-ME activity in various parts of the plant *N. benthamiana*. It was present in epidermal cells, particularly in stomatal cells (Fig. 7D,E). The function of NADP-ME in these cells is in close relation to pH changes and stomatal movements (Latzko and Kelly 1983; Schnabl 1983).

We localized NADP-ME activity in cells surrounding main veins in stems and leaves (Fig. 7B,C,F,G,H). In these cells NADP-ME could contribute to photosynthetic CO_2 fixation via decarboxylation of malate transported through floem (Hibberd and Quick 2002). This possible function maintains the presence of NADP-ME in chloroplasts (Fig. 7). Probably, the cytosolic isoform is present but its contribution is not so easy to distinguish as that of plastids.

Molecular mass of subunits of NADP-ME

The molecular weights of monomers of isoforms NADP-ME found in *N. benthamiana* were estimated at ~62,000 and ~70,000. Even though molecular weights couldn't be determined with high accuracy, we used native polyacrylamide gel electrophoresis, because this method enables to detect enzyme isoforms and simultaneously estimate relative molecular masses of native proteins from Ferguson's calibration graph. Furthermore, mutual position of curves belonging to appropriate isoenzymes in Ferguson's graph could confirm which protein is smaller or which proteins are identical (Lottspeich and Zorbas 1998). Detected sizes of monomers are common for plant NADP-MEs (Drincovich et al. 2001). Monomer with relative molecular mass of 66,000–67,000 is typical for non-photosynthetic forms (C_3 plants, non-pho-

tosynthetic parts of C_4 plants) (Saigo et al. 2004; Lara et al. 2005). In *N. benthamiana* this isoform is mainly present in young leaves and together with other isoform in stems and in older leaves (Fig. 2). The molecular weight estimated for the other isoform was surprisingly 62,000, nevertheless, this lower molecular weight is typical for photosynthetic forms in C_4 plants (Edwards and Andreo 1992). Moreover, this isoform was the main one in roots of *N. benthamiana*.

Oligomerization of NADP-ME

NADP-ME occurs in plant tissues in several oligomeric stages (monomer, dimer, tetramer, hexamer, octamer) (Edwards and Andreo 1992; Wheeler et al. 2005). In some plants NADP-ME is in the form of larger oligomers, due to the absence of a sequence near the C terminal, which is responsible for tetrameric structure of animal NADP-ME (Chang and Tong 2003). Hexamers or octamers are supposed in some NADP-ME isoforms in *A. thaliana* (Wheeler et al. 2005) and *Zea mays* (Fig. 3, upper bands in sample 1) but such aggregates were not detected in our experiments. In leaves, stems, and roots of *N. benthamiana* isoforms with molecular weight of ~248,000 and ~280,000 were found, therefore NADP-ME build tetrameric molecules. The pattern of isoforms of NADP-ME in flowers is more complicated, because also molecules of molecular weight of ~140,000 and ~70,000 were found. It means the presence of dimers and monomers (Fig. 3).

Function of gene for HC-pro protein in plants

HC-pro is a multifunctional potyviral protein, enhancer of genome amplification and suppressor of PTGS (post-transcriptional gene silencing). It affects symptom development, cell-to-cell movement and long distance movement and has cystein-type proteinase activity (Waterhouse et al. 2001; Savenkov and Valkonen 2002). In our experiments we have not found any differences in susceptibility to PVY^{NTN} infection in *N. benthamiana* plants (Table 1). The activity and isoform composition of NADP-ME in leaves and roots of both types of *N. benthamiana* plants during PVY^{NTN} infection were very similar.

Stress response

The expression and activity of NADP-ME is associated with plant responses to biotic or abiotic stresses (Maurino et al. 2001; Sun et al. 2003; Chi et al. 2004; Smeets et al. 2005; Liu et al. 2007). Recently, we have reported, that the activity of NADP-ME of *N. tabacum* L. in PVY^{NTN} infected leaves increased 5 to 6 times (Ryšlavá et al. 2003). However, in analogous experiments performed with *N. benthamiana* plants, any significant change in NADP-ME activity in leaves was not found (Fig. 4). The reason for such differences between two

species of genus *Nicotiana* is not clear. However, in roots of *N. benthamiana* PVY^{NTN}-infected plants enhanced activity of NADP-ME was found (Fig. 4). Similar results were reported by Maurino et al. (2001) in maize roots after jasmonate, cellulase and fungal elicitor treatment.

Acknowledgements. This work was supported by the grants of GAUK 428/2004, AVOZ 50380511 and Ministry of Education Contact No. 12 and 16.

References

- Casati P., Spampinato C. P., Andreo C. S. (1997): Characterization and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat. *Plant Cell Physiol.* **38**, 928–934
- Casati P., Lara M. V., Andreo C. S. (2000): Induction of C₄-like mechanism of CO₂ fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. *Plant Physiol.* **123**, 1611–1621
- Čeřovská N. (1998): Production of monoclonal antibodies to potato virus Y^{NTN} strain and their use for strain differentiation. *Plant Pathol.* **47**, 505–509
- Chang G. G., Tong L. (2003): Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry* **42**, 12721–12731
- Chi W., Yang J., Wu N., Zhang F. (2004): Four rice genes encoding NADP malic enzyme exhibit distinct expression profiles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1865–1874
- Clark M. F., Adams A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**, 475–483
- Colombo S. L., Andreo C. S., Podestá F. E. (1997): Carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. Purification, characterization and developmental profile of NADP-dependent malic enzyme. *Physiol. Plant.* **101**, 821–826
- Detarsio E., Alvarez C. E., Saigo M., Andreo C. S., Drincovich M. F. (2007): Identification of domains involved in tetramerization and malate inhibition of maize C₄ NADP-malic enzyme. *J. Biol. Chem.* **282**, 6053–6060
- Drincovich M. F., Casati P., Andreo C. S. (2001): NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Lett.* **490**, 1–6
- Edwards G. E., Andreo C. S. (1992): NADP-malic enzyme from plants. *Phytochemistry* **31**, 1845–1857
- Falcone Ferreyra M. L., Andreo C. S., Podestá F. E. (2003): Purification and physical and kinetic characterization of a photosynthetic NADP-dependent malic enzyme from CAM plant *Aptenia cordifolia*. *Plant Sci.* **164**, 95–102
- Ferguson K. A. (1964): Starch-gel electrophoresis: application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism* **13**, 985–1002
- Hibberd J. M., Quick W. P. (2002): Characteristics of C₄ photosynthesis in stems and petioles of C₃ flowering plants. *Nature* **415**, 451–454
- Lara M. V., Drincovich M. F., Müller G. L., Maurino V. G., Andreo C. S. (2005): NADP-malic enzyme and Hsp70: co-purification of both proteins and modification of NADP-malic enzyme properties by association with Hsp70. *Plant Cell Physiol.* **46**, 997–1006
- Latzko E., Kelly G. J. (1983): The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Physiol. Veg.* **21**, 805–815
- Lee D. H., Lee C. B. (2000): Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* **159**, 75–85
- Liu S., Cheng Y., Zhang X., Guang Q., Nishiuchi S., Hase K., Takano T. (2007): Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stresses; over-expression of that gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* **64**, 49–58
- Lottspeich F., Zorbas H. (1998): Bioanalytics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin (in German)
- Maurino V. G., Drincovich M. F., Andreo C. S. (1996): NADP-malic enzyme isoforms in maize leaves. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38**, 239–250
- Maurino V. G., Saigo M., Andreo C. S., Drincovich M. F. (2001): Non-photosynthetic malic enzyme from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant Mol. Biol.* **45**, 409–420
- Ryšlavá H., Müller K., Semorádová Š., Synková H., Čeřovská N. (2003): Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Photosynthetica* **41**, 357–363
- Saigo M., Bologna F. P., Maurino V. G., Detarsio E., Andreo C. S., Drincovich M. (2004): Maize recombinant non-C₄ NADP-malic enzyme: A novel dimeric malic enzyme with high specific activity. *Plant Mol. Biol.* **55**, 97–107
- Savenkov E. I., Valkonen J. P. T. (2002): Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants. *J. Gen. Virol.* **83**, 2325–2335
- Smeets K., Cuypers A., Lambrechts A., Semane B., Hoet P., Van Laere A., Vangronsveld J. (2005): Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 437–444
- Schnabl H. (1983): The key role of phosphoenolpyruvate carboxylase during the volume changes of guard cell protoplast. *Physiol. Veg.* **21**, 955–962
- Sun S.-B., Shen Q.-R., Wan J.-M., Liu Z.-P. (2003): Induced expression of the gene for NADP-malic enzyme in leaves of *Aloe vera* L. under salt stress. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **35**, 423–429
- Waterhouse P. M., Wang M.-B., Lough T. (2001): Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature* **411**, 834–842
- Wedding R. T. (1989): Malic enzymes of higher plants. Characteristics, regulation and physiological function. *Plant Physiol.* **90**, 367–371
- Wheeler M. C. G., Tronconi M. A., Drincovich M. F., Andreo C. S., Flüge U. I., Maurino V. G. (2005): A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **139**, 39–51

Final version accepted: September 11, 2007

Podíl na publikacích uvedených v příloze disertační práce:

1. Ryšlavá, H., **Doubnerová, V.**, Müller, K., Bařková, P., Schnablová, R., Liberda, J., Synková, H., Čerovská, H.: The enzyme kinetics of the NADP-malic enzyme from tobacco leaves. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **72**, 1420-1434, (2007): **Fig. 2A, B; Fig. 3, 4, 5. Table II, III, IV.**
2. **Doubnerová, V.**, Potůčková, L., Müller K., Ryšlavá, H.: The regulation of the NADP-malic enzyme from tobacco leaves. Odesláno do časopisu *Gen. Physiol. Biophys.*: **Fig. 2, 3, částečně Fig. 1, 4, table 1, 2.**
3. **Doubnerová V.**, Müller K., Šumpelová M., Čerovská N., Ryšlavá H.: Effect of biotic stress on the NADP-malic enzyme from *Nicotiana tabacum* L.: mRNA, expressed protein and activity. Odesláno do časopisu *Acta Biochim. Pol.*: **Fig. 1-5.**
4. **Doubnerová, V.**, Janošková, M., Synková, H., Šubr, Z., Čerovská, N., Ryšlavá, H.: Effect of *Potato virus Y* on the activities of antioxidant and anaplerotic enzymes in *Nicotiana tabacum* L. transgenic plants transformed with the gene for P3 protein. *Gen. Appl. Plant Physiology* **33**, 123-140, (2007): **Fig. 5.**
5. **Doubnerová, V.**, Jirásková, A., Janošková, M., Müller, K., Bařková, P., Synková, H., Čerovská, N., Ryšlavá, H.: The activity and isoforms of NADP-malic enzyme in *Nicotiana benthamiana* plants under biotic stress. *Gen. Physiol. Biophys.* **26**, 281-289 (2007): **podíl na Fig. 1-6.**

Se souhlasem školitelky RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc.

Přehled publikací, které nejsou součástí této disertační práce:

6. Müller K., **Doubnerová V.**, Synková H., Čerovská N., Ryšlavá H. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in PVY^{NTN} infected tobacco plants. Odesláno do časopisu *Biol. Chem.*
7. Černý M., **Doubnerová V.**, Müller K., Ryšlavá H. Characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize seeds: Properties of phosphorylated and dephosphorylated forms. Rukopis v přípravě.