112

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

Funkce rostlinných β-glukosidas

Blanka Holakovská

Školitel: RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha, 2006

Prohlášení

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

Praha, 8. 6. 2006 Podpis:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za poskytnuté cenné rady a pomoc při vypracování bakalářské práce, Mgr. Veronice Doubnerové za spolupráci při řešení praktických úkolů a Ing. Karlu Müllerovi za objasňování technických problémů.

Seznam zkratek

a	aktivita enzymu
ABA	kyselina abscisová
Asp52	kyselina asparagová číslo 52 v lysozymu
c_i	molární koncentrace inhibitoru
c_p	molární koncentrace p-nitrofenolu
C1	uhlík číslo 1 na D kruhu sacharidu
C1´	uhlík číslo 1 na cyklohexenovém kruhu kyseliny abscisové
CG	kyanogenní glykosidy
DIMBOA	4-Hydroxy-7-metoxy-1,4-benzoxazin-3-on
GA	giberelin
Glc	β-D-glukosa
GlcNAc	N-acetyl-β-D-glukosamin
Glu35	kyselina glutamová číslo 35 v lysozymu
IAA	indolyloctová kyselina
Inh	inhibitor
K_i	inhibiční konstanta
K_m	Michaelisova konstanta
Man	α-D-mannosa
O1	kyslík číslo 1 na D kruhu sacharidu
p-NP-β-D-glu	p-nitrofenyl-β-D-glukopyranosid
PP	pyrofosfát
PR-1	pathogenesis-related protein 1
SA	kyselina salicylová
SDS	dodecylsulfát sodný
v	rychlost reakce katalyzované β-glukosidasou
V_{max}	maximální rychlost reakce katalyzované β-glukosidasou

Obsah

1 Úvod **3**

1.1 Mechanismus katalýzy *3*

1.2 Struktura β-glukosidasy *5*

1.3 Funkce rostlinných β-glukosidas *6*

1.3.1 Glukosidy jako látky obranného systému rostlin 6

1.3.2 Glukosidy rostlinných hormonů 9

1.3.3 Posttranslační úpravy N-vázaných oligosacharidů v glykoproteinech 13

1.3.4 Degradace buněčné stěny 14

1.3.5 β-glukosidasy- podíl na dřevnatění rostlin 15

Přehled literatury k zadanému tématu **16**

Cíl práce: **17**

2 Materiál a metody **18**

2.1 Materiál *18*

2.2 Chemikálie *18*

2.3 Pufry *18*

2.4 Přístroje *18*

2.5 Metody a pracovní postupy *19*

2.5.1 Příprava emulzinu 19

2.5.2 Princip měření β-glukosidasové aktivity 19

2.5.3 Nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu 22

2.5.4 Elektroforéza v prostředí SDS 23

3 Výsledky **24**

3.1 Příprava emulzinu *24*

3.2 Stanovení aktivity glykosidas v emulzinu *24*

3.3 Optimalizace stanovení aktivity β-glukosidasy *25*

3.3.1 Závislost tvorby produktů reakcí katalyzovaných β-glukosidasou na čase. 25

3.3.2 Závislost rychlosti reakce katalyzované β-glukosidasou na koncentraci substrátu 26

3.3.3 Stanovení pH optima β-glukosidasy 27

3.4 Stanovení Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti reakce β-glukosidasy 28

3.5 Vliv glukosy na aktivitu β-glukosidasy *29*

3.6 Stanovení pH stability β-glukosidasy *30*

3.7 Studium isoenzymů β-glukosidasy 31
3.8 Elektroforéza v prostředí SDS 32

4 Diskuze 34

5 Souhrn 36

Seznam použité literatury 37

1 Úvod

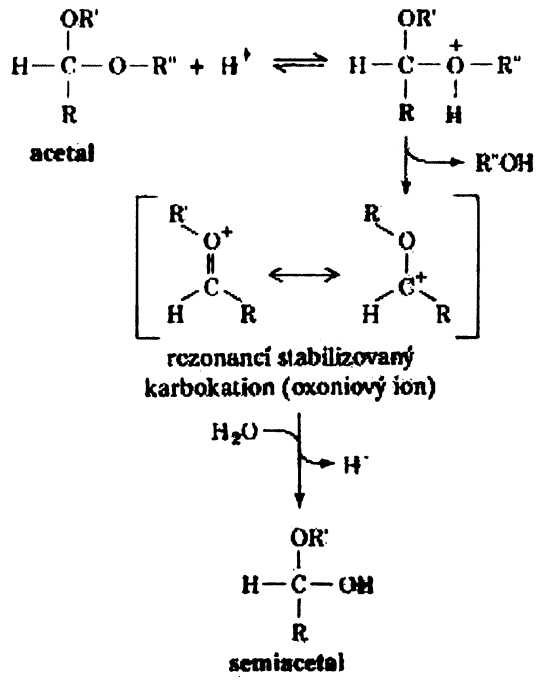
β-Glukosidasy (β-D-glukosid-β-D-glukohydrolasy EC 3.2.1.21) jsou enzymy, které katalyzují hydrolytické štěpení koncových, neredukujících β-D-glukosylových zbytků s následným uvolněním β-D-glukosy. Vyznačují se širokou specifitou k β-D-glukosidům.[1]

Vyskytují se prakticky v celém živém světě - v bakteriích, houbách, rostlinách i živočiších. β-glukosidasy hub, bakterií, člověka a dvouděložných rostlin byly zatím ve všech studovaných případech glykosylovány, zatímco β-glukosidasy jednoděložných rostlin nikoli. β-glukosidasy dvouděložných rostlin jsou lokalizovány na buněčné stěně nebo v proteinových tělíscích, zatímco u jednoděložných rostlin byly lokalizovány v plastidech. V savčích buňkách je možné nalézt β-glukosidasy jak v cytosolu jako rozpustný enzym, tak v lysozómech, kde působí kyselá β-glukosidasa (glukocerebrosidasa), jejíž nedostatek může vyvolat Gaucherovu chorobu.[2]

1.1 Mechanismus katalýzy

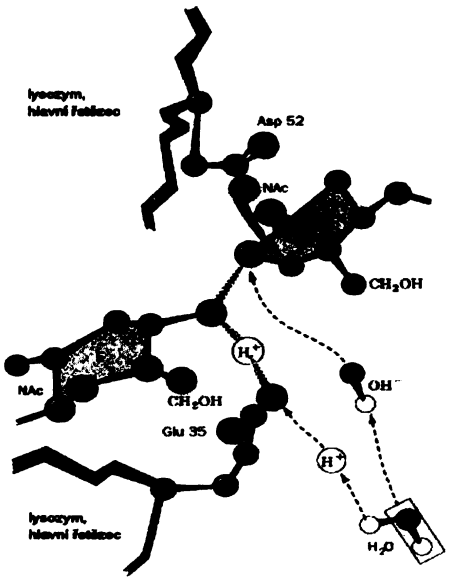
Mechanismus účinku jednotlivých glykosidas je obdobný, nejlépe prozkoumaná byla molekula lysozymu. Tento enzym hydrolyzuje β(1→4) glykosidické vazby mezi kyselinou N-acetylmuramovou a N-acetylglukosaminem, a tím napomáhá štěpit buněčnou stěnu bakterií.

Reakce je založena na přeměně acetálu na poloacetál (obr. 1). Pokud reakce probíhá bez přispění enzymu, jedná se o acetálovou hydrolýzu katalyzovanou kyselou skupinou, která zahrnuje protonaci reagujícího kyslíkového atomu následovanou rozštěpením C-O vazby. Výsledkem je vytvoření rezonančně stabilizovaného oxoniového iontu. Oxoniový kation poté naváže vodu za vytvoření poloacetálu a zpětné regenerace kyselé skupiny.



Obr.1: Mechanismus neenzymové kyselé hydrolýzy acetálu na poloacetál [3]

Mechanismus působení lysozymu (obr.2), je založen na přichycení lysozymu na šestiuhlíkatou cukernou jednotku bakteriální stěny. Židličková konformace D-cukerného zbytku se přemění na položidličkovou konformaci kvůli stereochemickému bránění skupiny C_6H_2OH. Glu35 přenáší svůj proton na kyslík 1 D-kruhu (jediná polární skupina v blízkosti), dochází k rozštěpení C1-O1 vazby a vzniku rezonančně stabilizovaného oxoniového iontu na C1. Ionizovaná karboxylová skupina Asp52 přistupuje a stabilizuje vzniklý oxoniový ion působením interakce dipól-dipól. Dojde k odštěpení E-kruhu se zbytkem polysacharidového řetězce a vzniká kationtový, nekovalentní glykosyl-enzymový meziprodukt. Oxoniový ion naváže molekulu vody za vzniku produktu a obnovení protonovaného Glu35. Enzym poté uvolní D-kruh produktu.[3]



Obr. 2: Phillipsův mechanismus reakce katalyzované lysozymem [3]

1.2 Struktura β-glukosidasy

Porovnáním krystalické struktury a katalytických domén několika různých glykosidas bylo zjištěno, že β-glukosidasy patří do nadrodiny enzymů, které mají strukturu osmičetného α/β barelu (obr. 3), s podobnými aminokyselinami tvořícími aktivní centrum. Donorem protonu (viz. 1.1.) je u všech těchto enzymů glutamát navázaný v blízkosti karboxylového konce β-řetězce 7. Tyto enzymy se také vyznačují podobností v sekvenci asparagin-glutamát v β-řetězci 4. [4]

Obr. 3: 3D struktura kyanogenní ß-glucosidasy (CBG) z Jetele plazivého (*Trifolium repens).* Struktura je zobrazena ve dvou různých orientacích. Sekundární struktura v $(\alpha/ß)_8$ barelu je obarvena následně: modře- osm α helixů; oranžově- osm ß konfromací; šedá vlákna –spojení helixů. [5]

1.3 Funkce rostlinných β-glukosidas

Rostlinné β-glukosidasy jsou známy už přes 150 let, kdy byla poprvé popsána hydrolýza amygdalinu (kyanogenní glukosid z mandlí) emulsinem (β-glukosidasa z madlí). Od té doby byla předpovězena a potvrzena přítomnost β-glukosidas v mnoha klíčových fyziologických procesech rostlin, od funkcí spojených s obranyschopností rostlin proti některým patogenům a býložravcům, přes uvolňování kumarinů, thiokyanátů, terpenů a kyanidu, až po hydrolýzu konjugátů rostlinných hormonů. [2]

1.3.1 Glukosidy jako látky obranného systému rostlin

Rostliny produkují celou řadu sekundárních metabolitů, z nichž mnohé mají fungicidní, baktericidní nebo insekticidní vlastnosti. Některé z těchto látek jsou produkovány ve zdravých rostlinách v jejich aktivní formě. Jiné, jako kyanogenní glukosidy, glukosinoláty aj., se vyskytují v inaktivované konjugované formě, a k jejich aktivování dochází teprve až při poškození pletiva nebo napadení rostlinným patogenem. [2]

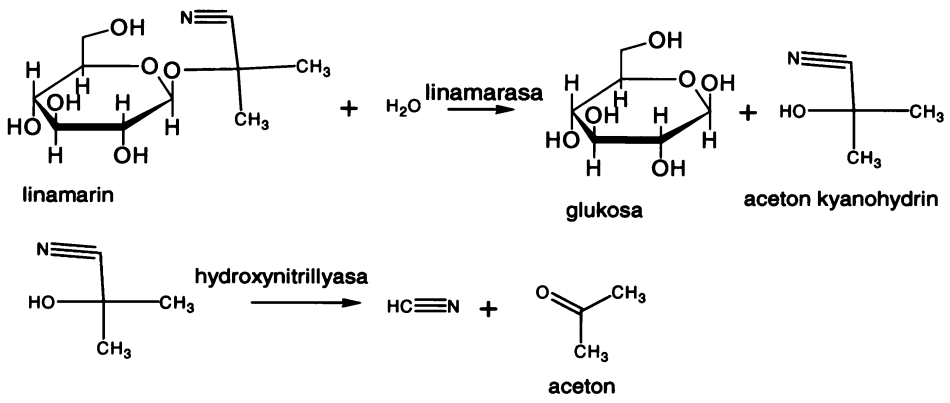
1.3.1.1 Kyanogeneze

Kyanogenní glykosidy (CG) patří k produktům sekundárního metabolismu rostlin. Skládají se z aglykonu, kterým bývá zejména α-hydroxynitril a cukerné složky (převážně D-glukosa). Kyanogenní glykosidy se vyskytují ve velkém množství rostlinných druhů, ale hladinou produkovaného kyanidu se liší.

Kyanogeneze zahrnuje biosyntézu kyanogenních glykosidů, jejich transport v rostlinách a odbourávání za produkce kyanidu.

Biosyntéza CG vychází z L-aminokyselin, které jsou hydroxylovány na N-hydroxylaminokyseliny a převedeny na aldoximy a následně na nitrily. Nitrily jsou hydroxylovány na α-hydroxynitrily a glykosylovány za vzniku kyanogenních glykosidů.

Odbourávání a produkce kyanidu je dvoustupňový proces, ve kterém nejdříve dochází k deglykosylaci a uvolnění sacharidu a ve druhém kroku vzniká aceton a kyanid. Na obr. 4 je popsáno uvolňování kyanidu z linamarinu, enzym linamarasa je β-glukosidasa, specifická pro linamarin.



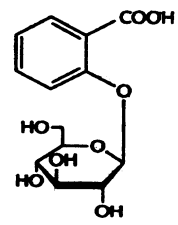
Obr. 4: Kyanogeneze z linamarinu [6]

CG se podílejí v obranných mechanismech rostlin proti různým patogenům. Rostliny jsou, díky jejich zvýšené koncentraci, rezistentní proti hmyzím škůdcům, plísním a bakteriím.[6]

1.3.1.2 β-D-glukosid kyseliny salicylové

Kyselina salicylová (SA) je jednoduchá chemická sloučenina, která hraje důležitou signální roli v rostlinném obranném systému proti patogenům. Bylo zjištěno, že zvýšení koncentrace endogenní SA koreluje s rezistencí tabáku (*Nicotiana tabacum*) vůči viru tabákové mozaiky a zároveň s indukcí genů spojených s obranou rostliny jako je pathogenesis-related protein 1 (PR-1). Po infekci je část nově vzniklé SA konjugována na D-glukosu za vytvoření salicyl-β-glukosidu. Byla izolována β-glukosidasa v buněčné stěně, která uvolňuje SA z tohoto glukosidu. SA-β-glukosid slouží jako zásoba kyseliny salicylové v rostlině (obr. 5). [7,8]

Mechanismus signalizace kyselinou salicylovou spočívá v její schopnosti inhibovat katalasu, která přeměňuje peroxid vodíku na kyslík a vodu. Zvýšená koncentrace intrabuněčného peroxidu vodíku potom vede k indukci exprese proteinů, např. PR-1 genů. [7,8]

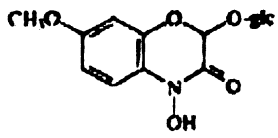


Obr. 5: Salicyl-2-O-β-glukosid [11]

1.3.1.3 Další glukosidy jako součást obranného systému rostlin

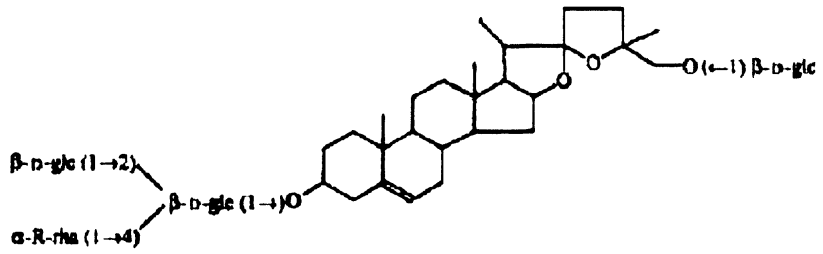
4-Hydroxy-7-metoxy-1,4-benzoxazin-3-on (DIMBOA) je derivátem hydroxamové kyseliny. DIMBOA je velice reaktivní sloučenina, která inaktivuje celou řadu enzymů. V intaktním kukuřičném pletivu a u obilovin se vyskytuje ve formě glukosidu (obr. 6).

Sloučenina se aktivuje hydrolýzou glykosidické vazby a uvolněním D-glukosy. [2]



Obr. 6 : Struktura O-glukosidu DIMBOA [2]

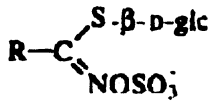
Avenakosidy jsou další skupinou látek, podílejících se na obranném systému rostlin (obr. 7). Jsou to glykosylované sloučeniny, které nejsou biologicky aktivní. Při poškození pletiva jsou glukosidasovou aktivitou přeměňovány na aktivní saponiny, které se komplexně váží na membránové steroly, vytváří se póry a brání účinku plísně. [2]



Obr. 7: Zástupce avenokosidů- Avenakosid A [2]

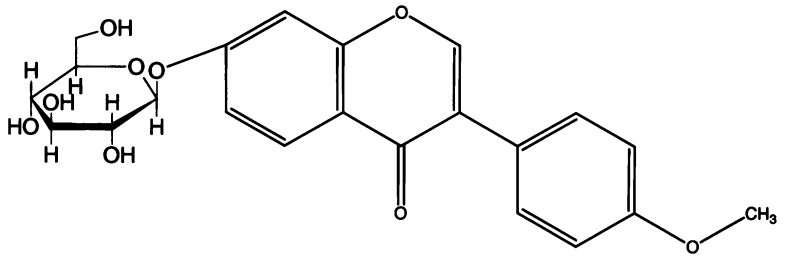
Další skupinou specifických hydrolys tzv. myrozinas jsou glukosinoláty (glukosidy hořčičného oleje- obr. 8). Jsou to thioglukosidy, vyskytující se hojně v čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), či u huseníku rolního (*Arabidopsis thalliana*). Tyto thioglukosidy odpuzují býložravé obratlovce i škůdce z řádu hmyzu.

Mechanismus uvolnění aktivních látek z biologicky neaktivních glukosinolátů je podobný jako u kyanogenních glukosidů. Enzym myrozinasa štěpí thioglykosidickou vazbu za uvolnění D-glukosy. Nestabilní aglykon se může dále přeměnit na celou řadu produktů. Všechny tyto produkty, mezi nimiž lze nalézt těkavé isothiokyanáty, thiokyanáty a organické nitrily, které vykazují výrazný antifungicidní charakter. [2]



Obr. 8: Struktura glukosinolátů [2]

Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny patřící mezi sekundární metabolity rostlin (obr. 9). Tyto sloučeniny vykazují silné antioxidační vlastnosti a působí také jako lapače volných radikálů. Počet hydroxyskupin, přítomnost 2,3-dvojných vazeb a ortodifenolická struktura zvyšují antiradikálové a antioxidační vlastnosti. Glykosylace, která blokuje 3-OH skupinu v C-kruhu, nedostatek hydroxyskupin nebo přítomnost methoxy skupiny v B-kruhu snižují antiradikálové a antioxidační vlastnosti. [9]



Obr. 9: Příklad glukosidu flavonoidů: formononetin glukosid [11]

1.3.2 Glukosidy rostlinných hormonů

Rostlinné hormony jsou látky vyskytující se v rostlinách ve velmi malých množstvích, které ale ovlivňují řadu fyziologických procesů. Změna v koncentraci hormonu má za následek celé spektrum vývojových procesů v rostlině, z nichž mnohé zahrnují interakce s vnějšími faktory.

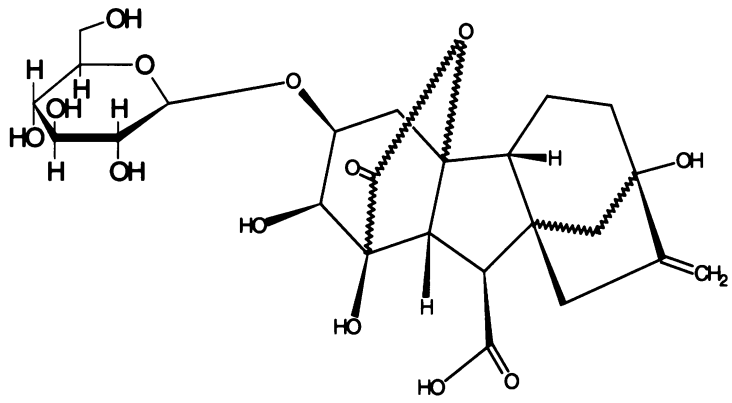
Z chemického hlediska se jedná o velmi různorodé sloučeniny.

Glykosylace (zejména glukosylace) má velký význam pro regulaci aktivity těchto rostlinných komponent. [11]

1.3.2.1 Gibereliny

Gibereliny (GA) patří do skupiny tetracyklických diterpenů, kterých bylo v houbách, meších, kapradinách a vyšších rostlinách identifikováno více než 125.

Gibereliny jsou zapojeny v nejrůznějších procesech rostlinného růstu a vývoje, především pak v procesu kvetení, tvorby plodů a klíčení semen.
Regulace jejich aktivity probíhá u různých rostlinných druhů různě. Většinou dojde k hydroxylaci některé z postranních skupin a fytohormon se inaktivuje. V případě kukuřice (*Zea mays*) dochází k následné glukosylaci této hydroxyskupiny a zachování neaktivní formy hormonu (obr.10). Glukosylace je vratným procesem a slouží k regulaci množství aktivní a neaktivní fromy giberelinů. [11]

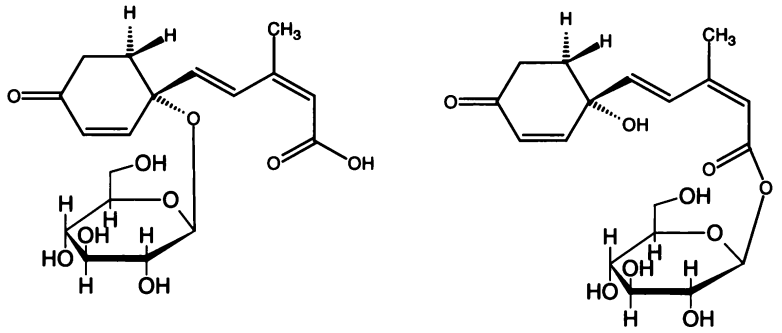


Obr. 10: GA_8-2-O-β-glukosid [11]

1.3.2.2 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je fytohormon, který se podílí na přechodu rostlin do dormance, uplatňuje se také při zrání semen a vývoji tolerance proti vysušení.
ABA má jedno chirální centrum na uhlíku C1´ a v přírodě se vyskytuje pouze ve formě (S)-enantiomeru.

Glukosylace kyseliny abscisové se v rostlinách uplatňuje v hojné míře. Dochází k ní buď na hydroxyskupině vázané na C1´ za vzniku ABA-1´-O-β-glukosidu nebo na karboxylové skupině za vzniku ABA β-glukosylesteru (obr. 11). Tyto konjugáty slouží primárně jako deaktivační produkty kyseliny abscisové, ale mohou se také uplatňovat jako forma její zásoby. [11]



Obr. 11: Nalevo ABA-1´-O-β-glukosid, napravo ABA β-glukosylester [11]

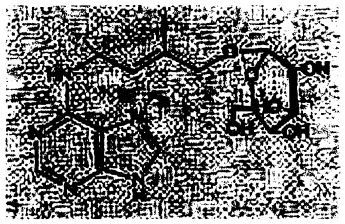
1.3.2.3 Cytokininy

Cytokininy jsou poměrně jednoduché organické sloučeniny vystavěné na základě adeninového skeletu s postranním isopentenylovým řetězcem navázaným na N_6 aminoskupinu adeninu.

Ve spolupráci s auxinem podporují buněčné dělení, ovlivňují diferenciaci buněk a dělení velkých nediferencovaných buněk stonku. Cytokininy samy indukují otevírání průduchů, potlačují auxiny vyvolanou apikální dominanci a inhibují stárnutí rostlinných orgánů, zejména listů.

U cytokininů se uplatňuje dvojí typ glukosylace. Jedním je glukosylace hydroxylové skupiny postranního řetězce, kdy vznikají O-glukosidy a druhým typem je glukosylace na N_9 adeninového kruhu.

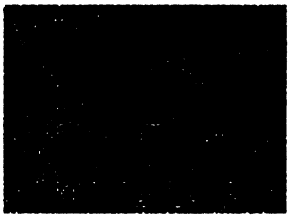
O-glukosidy cytokininů (obr. 12) jsou považovány za metabolicky aktivní zásobní formu těchto hormonů. Tyto glukosidy jsou také nejhojněji se vyskytující forma cytokininů v rostlinných pletivech. Z těchto sloučenin pak po jejich přesunutí do cílové místa účinku mohou být β-glukosidasou jednoduše uvolněny biologicky aktivní formy.



Obr. 12: Příklad O-glukosylovaného cytokininu: O-β-glukosylzeatin [11]

N-glukosidy cytokinů (obr. 13) se nacházejí pouze v některých rostlinách, například v ředkvičkách (*Raphanus sativus L.*), kukuřici (*Zea mays*) nebo v tabáku (*Nicotiana tabacum*).

Na rozdíl od O-glykosidů nejsou biologicky aktivní, pravděpodobně z důvodu rezistence proti enzymatickému štěpení. N-glykosylace zřejmě slouží ke snížení koncentrace biologicky aktivních cytokininů jako odpověď na vnější podněty. [11]



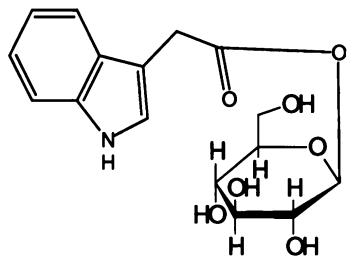
Obr. 13: Příklad N-glykosylovaného cytokininu- 7-β-glukosylzeatin [11]

1.3.2.4 Auxin

Auxin (indolyoctová kyselina, IAA) je rostlinný hormon, který se vyskytuje v submikrogramovém množství. Uplatňuje se v mnoha fyziologických procesech, například apikální dominanci, tropismů, prodlužování stonku nebo indukci dělení buněk kambia.

Hladina auxinů v rostlinách je udržována několika procesy. IAA je doplňována syntézou z L-tryptofanu a netryptofanových prekurzorů a hydrolýzou auxinových konjugátů. IAA se inaktivuje různými konjugacemi a katabolickými procesy.

V kukuřici je hlavní cestou inaktivace auxinu glukosylace na karboxylové skupině postranního řetězce za vzniku 1-O-(indol-3-acetyl)-β-glukosy (obr.14). Její isomery pak mohou být zpětně přeměněny na aktivní IAA pomocí 6-O-IAA-glukosa-hydrolasy.

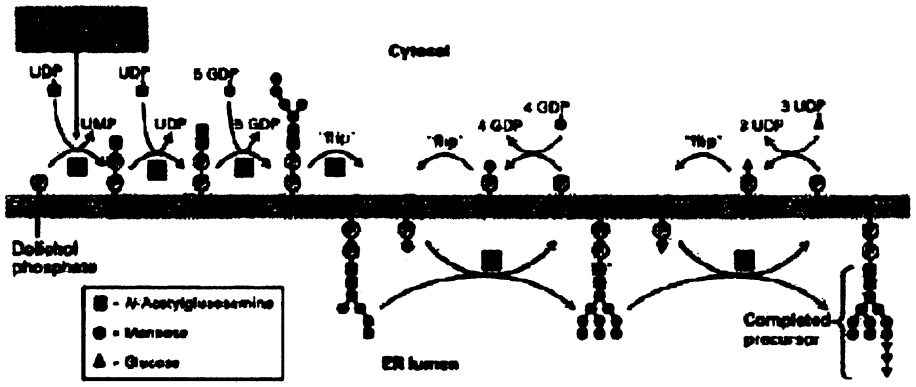


Obr. 14: 1-O-(indol-3-acetyl)-β-glukosa

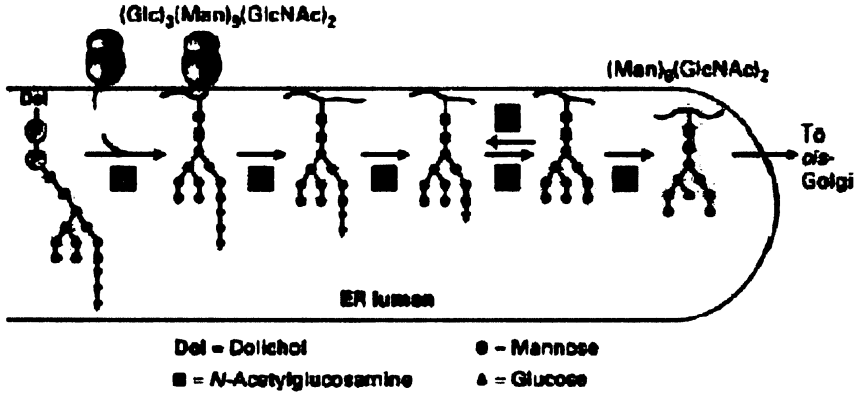
1.3.3 Posttranslační úpravy N-vázaných oligosacharidů v glykoproteinech

Posttranslační úpravy proteinů zahrnují v buňkách celou sérii různých reakcí, odehrávajících se v různých částech buňky. První část úprav se odehrává v endoplazmatickém retikulu a jejich výsledkem je tvorba prekurzoru $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$-PP-dolicholu (obr. 15). Tento prekurzor slouží jako donor oligosacharidů pro specifické asparaginové zbytky v proteinu. Tento proces probíhá současně s translací.

Druhou částí posttranslačních úprav je odštěpení 3 molekul glukosy z oligosacharidového řetězce pomocí membránových glukosidas I a II (obr.16) a následným transportem do Golgiho aparátu, kde sloučenina podléhá dalším úpravám. [12]



Obr. 15: Tvorba prekurzoru $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$-PP-dolicholu [13]



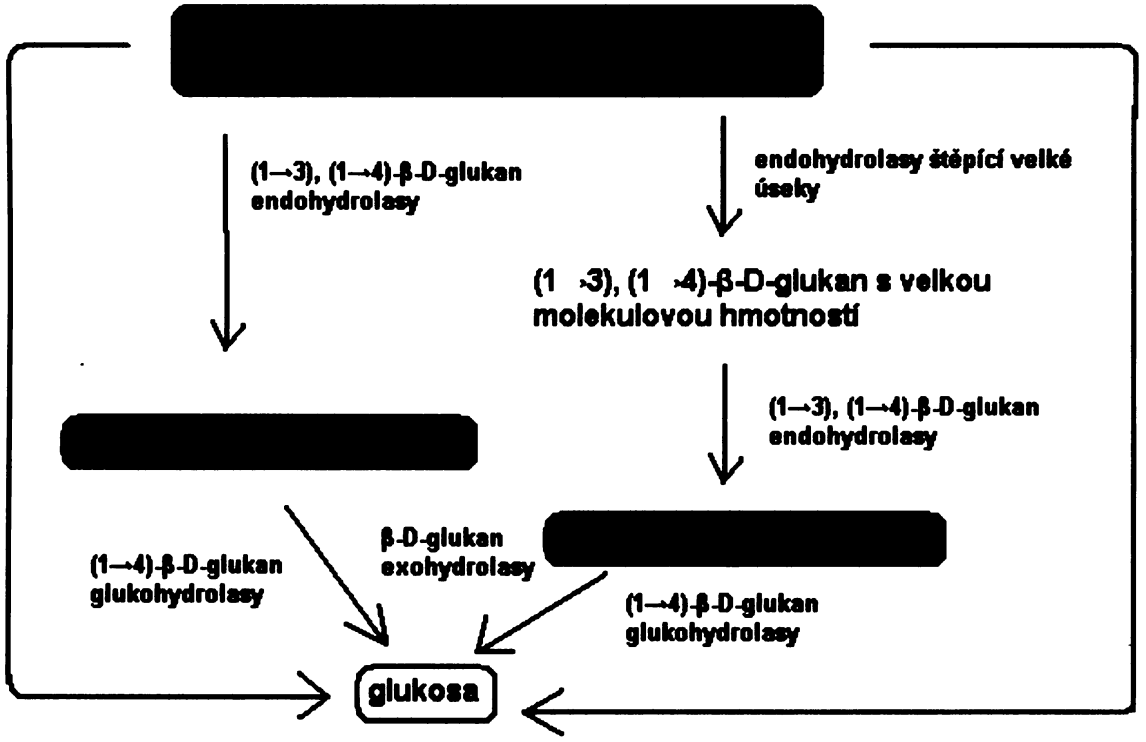
Obr. 16: Postupné odštěpování glukosových monomerů pomocí glukosidasy I a II [13]

1.3.4 Degradace buněčné stěny

Hlavní složkou buněčné stěny rostlin je celulosa. β-glukosidasa se podílí na štěpení oligomerů celulosy při jejím rozvolňování během růstu a úpravách buněčné stěny.

V obilovinách (*Poaceae*) důležitou komponentu buněčné stěny tvoří (1→3) a (1→4)-β-D-glukany. Na depolymeraci (1→3) a (1→4)-β-D-glukanů v klíčících obilkách a na částečné hydrolýze polysacharidů v prodlužujících se vegetativních pletivech se podílí řada glykosid endo- a exo hydrolas.

Na odbourávání se podílí tři typy enzymů- (1→3), (1→4)-β-D-glukan endohydrolasy, které odštěpují tri- a tetrasacharidy s redukujícími zbytky. Tyto sacharidy mohou být dále degradovány β-D-glukan exohydrolasami nebo (1→4)-β-D-glukan glukohydrolasami/β-glukosidasami až na jednotlivé molekuly glukosy. Proces je zobrazen na obrázku 17. [14]



Obr. 17: Enzymatická hydrolýza buněčné stěny obilovin [14]

1.3.5 β-glukosidasy- podíl na dřevnatění rostlin

Lignin je druhá nejvíce rozšířená organická látka v biosféře, která tvoří hlavní součást buněčných stěn dřevin. Je to komplexní polymer sestávající se ze tří skořicových alkoholů. Jedním z nich je koniferol, který se mimo lignin akumuluje především v době jarní reaktivace kambia nahosemenných rostlin ve formě glukosidu koniferinu. Systém skořicových alkoholů a specifické β-glukosidasy je považován za klíč k lignifikaci (dřevnatění). V průběhu lignifikace dochází ke štěpení glykosidické vazby, přičemž volné skořicové alkoholy polymerují za vzniku ligninu. [2]

Přehled literatury k zadanému tématu

Crozier, A., Kamiya, Y., Bishop, G., Yokota, T.: Biosynthesis of Hormones and Elicitor molecules v knize Biochemistry and molecular biology of plants, Courier Companies, Maryland, 2002

Rotrekl V.: Chem. Listy 92, 883-893 (1998)

Voet D., Voet J.: Enzymatic catalysis v knize Biochemistry, Wiley International Edition, USA, 2004

Jenkins J., Legio L. L., Harris G., Pickersgill R.: FEBS Lett. 362, 281 (1995)

Vetter J.: Toxicon 38, 11-36 (2000)

Chen Z., Malamy J., Henning J., Conrath U., Sánchez-Casas P., Silva H., Ricigliano J., Klessig F. D.: Proc. Natl. Acad. Sci 92, 4134-4137 (1995)

Sroka Z.: Z Naturforsch [C] 60, 833-843 (2005)

Miller A. D.: Alt. Med. Rev. 1, 103-111, (1996)

Hrnova M., Fincher G. B.: Plant Mol. Biol. 47, 73-91 (2001)

Cíl práce:

1. Literární přehled funkce β-glukosidasy v rostlinách
2. Příprava emulzinu z mandlí
3. Optimalizace měření kinetických parametrů β-glukosidasy pro účely praktických cvičení z biochemie

2 Materiál a metody

2.1 Materiál

Mandlová zrna

2.2 Chemikálie

Akrylamid- Sigma, USA

Bradfordovo činidlo- Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R,G- Sigma, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS)- Serva, Německo

Fast Blue B- Sigma, USA

Fast Blue BB- Sigma, USA

Fast Red Violet LB- Sigma, USA

p-nitrofenyl- α-D-galaktosid- Sigma, USA

p-nitrofenyl-β-D-galaktosid- Sigma, USA

p-nitrofenyl-β-D-N-acetylglukosamin- Sigma, USA

p-nitrofenyl-α-D-glukosid- Sigma, USA

p-nitrofenyl-β-D-glukosid- Sigma, USA

p-nitrofenyl-α-D-mannosid- Sigma, USA

Standardní proteiny pro SDS elektroforézu o molekulové hmotnosti 36 000 až 205 000- Sigma, USA

Ostatní chemikálie- Lachema, ,ČR

2.3 Pufry

0,1 M borátový pufr, pH = 9

0,1 M citrátový pufr, pH = 4,1

0,1 M citrátový pufr, pH = 5

2.4 Přístroje

Analytické váhy 100A- Denver Instrument Company, USA

Centrifuga Jetřich, Německo

Elektroforetická souprava- Biometra, Německo

pH metr- Denver Instrument Company, USA

Spektrofotometr Ultrospec 2100- Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

2.5 Metody a pracovní postupy

2.5.1 Příprava emulzinu

Mandlová zrna jsem homogenizovala v mixéru, promyla nadbytkem toluenu, aby došlo k jejich odtučnění. Takto upravenou směs jsem nechala extrahovat přes noc v 1% roztoku síranu zinečnatého při 5°C. Po dvanácti hodinách jsem preparát přefiltrovala přes gázu. Filtrát jsem vysrážela 0,2% roztokem taninu. Směs jsem centrifugovala 15 minut při 2210 x g. Odstranila jsme sediment a supernatant jsem opět vysrážela, tentokrát 2,9 % roztokem taninu. Směs jsem znovu centrifugovala 15 minut při 2210 x g. Supernatant jsem odstranila a sediment jsem promyla přibližně 400 ml acetonu. Vzniklou sraženinu jsem nechala sušit v exikátoru nad koncentrovanou kyselinou sírovou. Po vysušení jsem získaný emulzin rozdrtila v třecí misce na prášek. [15]

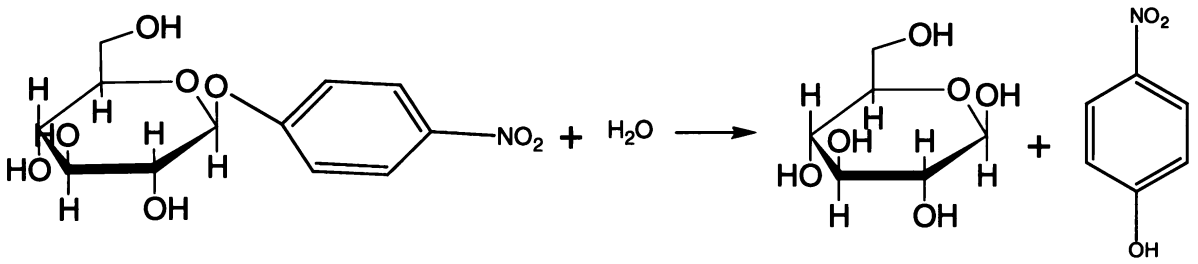
2.5.1.1 Stanovení koncentrace proteinů v emulzinu

Množství proteinů obsažených v emulzinu jsem určila metodou podle Bradfordové. Metoda je založena na vzniku modrého komplexu barviva (Coomassie Brilliant Blue R,G) a proteinů rozpuštěných ve vzorku, což způsobí změnu absorpčního maxima z původních 465 nm na 595 nm.

Připravila jsem si roztok emulzinu (60 mg emulzinového prášku rozetřeno se 2 ml destilované vody a přefiltrováno přes filtrační papír), který jsem 8x naředila. 33,3 µl tohoto roztoku jsem smíchala v mikrozkumavce s 1 ml Bradfordova činidla. Směs jsem nechala stát 20 minut. Poté jsem změřila absorbanci roztoku na spektrofotometru při 595 nm.[16] Výslednou hodnotu jsem porovnala s kalibrační křivkou pro hovězí sérový albumin (BSA) v koncentračním rozsahu 0 až 1,4 mg/ml.

2.5.2 Princip měření β-glukosidasové aktivity

β-glukosidasy jsou schopné specificky štěpit glykosidovou vazbu β-D-glukosidů podle rovnice:



Obr. : Štěpení p-nitrofenyl-β-D-glukosidů β-glukosidasou

Reakci lze sledovat stanovováním přírůstku některého z produktů. Jako substrát lze použít p-nitrofenyl-β-D-glukosid, který při inkubaci s β-glukosidasou odštěpuje p-nitrofenol, který lze v alkalickém prostředí stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm. Enzymová reakce probíhá v kyselém prostředí, zastavuje se přidáním bazického 0,1 M borátového pufru o pH 9. Reakční směs obsahuje 50 µl 0,1 M citrátového pufru o vhodném pH, 50 µl roztoku substrátu o koncentraci 0,4 M a 100 µl roztoku emulzinu o koncentraci 0,04 $mg.ml^{-1}$. [15]

2.5.2.1 Stanovení aktivit jednotlivých glykosidas obsažených v emulzinu

Připravila jsem si roztok emulzinu rozetřením 2 mg práškového emulzinu ve 2 ml destilované vody a následným přefiltrováním přes filtrační papír. Do mikrozkumavek jsem napipetovala 50 µl 0,1 M citrátového pufru o pH 4,1; 50 µl 0,4 M substrátů (p-NP-β-D-glukosid, p-NP-α-D-glukosid, o-NP-β-D-galaktosid, p-NP-α-D-galaktosid, p-NP-α-D-mannosid a p-NP- β-N-acetylglukosamin) a 100 µl roztoku emulzinu. Po 10 minutách jsem enzymové reakce zastavila přidáním 800 µl 0,1 M borátového pufru o pH 9. Na spektrofotometru jsem měřila absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 405 nm.

2.5.2.2 Stanovení množství produktu reakce katalyzované β-glukosidasou v závislosti na čase

Odvážila jsem 2 mg emulzinu a rozetřela jsem je v třecí misce se 2 ml destilované vody. Směs jsem přefiltrovala přes filtrační papír a naředila 1:25 (100 µl filtrátu v 2500 µl destilované vody). Do mikrozkumavek jsem napipetovala 50 µl 0,1 M citrátového pufru o pH 4,1, 50 µl 0,4 M substrátu (p-nitrofenyl-β-D-glukosid) a 100 µl roztoku emulzinu.

Reakce jsem zastavovala postupně po 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 30 a 40 minutách přidáním 800 µl 0,1 M borátového pufru o pH 9. Na spektrofotometru jsem měřila absorbance vzorků při 405 nm.

2.5.2.3 Měření závislosti rychlosti reakce katalyzované β-glukosidasou na koncentraci substrátu

Připravila jsem si roztok emulzinu stejným postupem jako v odstavci 2.5.2.1. Připravila jsem si roztok substrátu (p-NP-β-D-glukosid) o koncentraci 0,4 M.

Do mikrozkumavek jsem postupně napipetovala 50 µl 0,1 M citrátového pufru o pH 4,1; 50 µl roztoku substrátu o koncentraci 0-2,5 $mmol.l^{-1}$ a záhájila reakci přidáním 100 µl roztoku emulzinu. Po deseti minutách jsem reakci zastavila přidáním 800 µl 0,1 M borátového pufru o pH 9. Na spektrofotometru jsem měřila absorbance vzorků při 405 nm.

2.5.2.4 Stanovení pH optima β-glukosidasy

Připravila jsem si roztok emulzinu stejným postupem jako v předchozích kapitolách. Dále jsem si připravila 12 Mc Ilvanových pufrů líšících se pH (2,8; 3,29; 3,97; 4,57; 5,12; 5,71; 5,99; 6,46; 6,61; 6,89; 7,09 a 7,81). Do mikrozkumavek jsem napipetovala 50 µl těchto 0,1 M pufrů, 50 µl 0,4 M substrátu (p-NP-β-D-glu) a reakci zahájila přidáním 100 µl roztoku emulzinu. Reakci jsem zastavila po 10 minutách přidáním 800 µl 0,1 M borátového pufru o pH 9. Na spektrofotometru jsem změřila závislost absorbancí vzorků na pH roztoku při 405 nm.

2.5.2.5 Stanovení Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti reakce β-glukosidasy

Při tomto pokusu jsem postupovala stejně jako při měření závislosti rychlosti reakce katalyzované β-glukosidasou na koncentraci substrátu, ale tentokrát jsem použila 0,1 M citrátový pufr o pH 5, což je optimální pH pro β-glukosidasu.

2.5.2.6 Měření vlivu glukosy na aktivitu β-glukosidasy

Do mikrozkumavek jsem napipetovala 50 µl 0,1 M citrátového pufru, 50 µl substrátu (p-NP-β-D-glu) o výsledné koncentraci 1 a 2,5 M a 50 µl roztoku glukosy o výsledné koncentraci 0, 10, 50 a 100 mM. Reakci jsem zahájila přidáním 50 µl roztoku emulzinu o koncentraci 0,04 $mg.ml^{-1}$. Rekce jsem zastavila po deseti minutách přidáním 800 µl 0,1 M borátového pufru. Na spektrofotometru jsem změřila absorbanci všech vzorků při 405 nm.

2.5.2.7 Stanovení pH stability β-glukosidasy

Do 12 mikrozkumavek jsem pipetovala 900 µl Mc Ilvanových 0,1 M pufrů o různých pH (viz. stanovení pH optima) a 100 µl roztoku emulzinu (10 mg emulzinového prášku rozetřeno se 2 ml destilované vody a přefiltrováno). Takto připravenou směs jsem nechala inkubovat v lednici při 8°C.

Měřila jsem aktivitu enzymu po 5 hodinách, 5 dnech, 28 dnech a 39 dnech.
Do mikrozkumavek jsem pipetovala 50 µl 0,1 M citrátového pufru o pH 5, 50 µl 0,4 M roztoku substrátu a 100 µl inkubovaného roztoku emulzinu. Reakci jsem zastavila přidáním 800 µl 0,1 M borátového pufru o pH 9. Na spektrofotometru jsem měřila absorbanci vzorků při 405 nm.

2.5.3 Nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza je metoda při které dochází k dělení makromolekul (proteinů, nukleových kyselin, atd.) na základě jejich velikosti, elektrického náboje a dalších fyzikálních vlastností. Molekuly se pohybují gelem díky působícímu elektrickému poli. [17]

Při nativní elektroforéze v polyakrylamidovém gelu jsem postupovala podle Leeho.[18] Připravila jsem 6 % separační gel a 3 % zaostřovací gel. Připravila jsem si vzorek- 10 mg emulzinového prášku jsem rozetřela ve 2 ml destilované vody, přefiltrovala a poté jsem odebrala 0,5 ml roztoku emulzinu a přidala do něj 0,1 g sacharosy. Do jamek jsem postupně pipetovala 10, 20 a 30 µl vzorku. Do elektroforetického pufru jsem přidala několik kapek bromfenolové modři, pro detekci čela elektroforézy. Elektroforézu jsem

zpočátku prováděla při napětí zdroje 70 mV. Po dosažení hranice separačního gelu jsem napětí zvýšila na 150 mV a elektroforézu nechala probíhat dokud čelo nedosáhlo hranice gelu. Po ukončení elektroforézy jsem gel rozřezala na čtyři díly. Tři díly jsem nechala půl hodiny inkubovat v citrátovém pufru o pH 5. Čtvrtý díl jsem vložila do Petriho misky, přidala 20 ml 0,1 M citrátového pufru o pH 5 obsahující substrát (24 mg 6-brom-2-naftyl-β-D-glukopyranosu v 1 ml DMSO) a přidala 20 mg barviva Fast Blue BB. Proužky gelu po inkubaci jsem přendala do Petriho misek a barvení jsem zopakovala stejným postupem. Použila jsem barvy Fast Blue B, Fast Blue BB a Fast Red Violet LB salt. Po vytvoření barevných proužků jsem gely uchovala v destilované vodě.

2.5.4 Elektroforéza v prostředí SDS

Elektroforéze v prostředí SDS je elektroforetická metoda, která využívá dělení látek pouze na základě jejich molekulové hmotnosti a využívá se k dělení proteinů. SDS (dodecylsulfát sodný) je anionaktivní detergent, který nese záporný náboj. Bílkoviny se pohybují v gelu podle velikosti.[17]

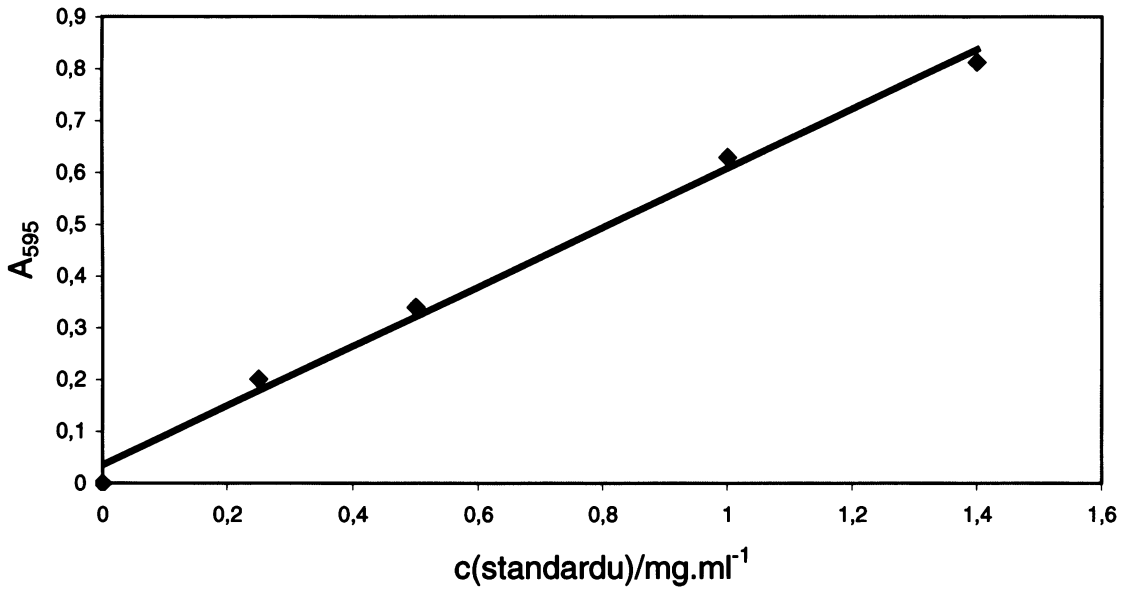
Proteiny se detekují pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue, které vytváří s proteiny modrý komplex.

Při SDS elektroforéze jsem postupovala podle Laemmliho.[19] Vzorek jsem připravila rozpuštěním 2,5 mg emulzinu ve 100 µl destilované vody a jeho následnou centrifugací 5 minut při 16600 x g. 50 µl supernatantu jsem smíchala s 50 µl vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Použila jsem 3 % zaostřovací gel a 6 % separační gel. Elektroforézu jsem prováděla při napětí zdroje 70 mV, po dosažení hranice separačního gelu jsem napětí zvýšila na 150 mV. Po ukončení elektroforézy jsem gely barvila Coomassie Brilliant Blue, po vytvoření zřetelných proužků jsem gely odbarvila směsí voda, ethanol a kyselina octová v poměru 62:25:10.

3 Výsledky

3.1 Příprava emulzinu

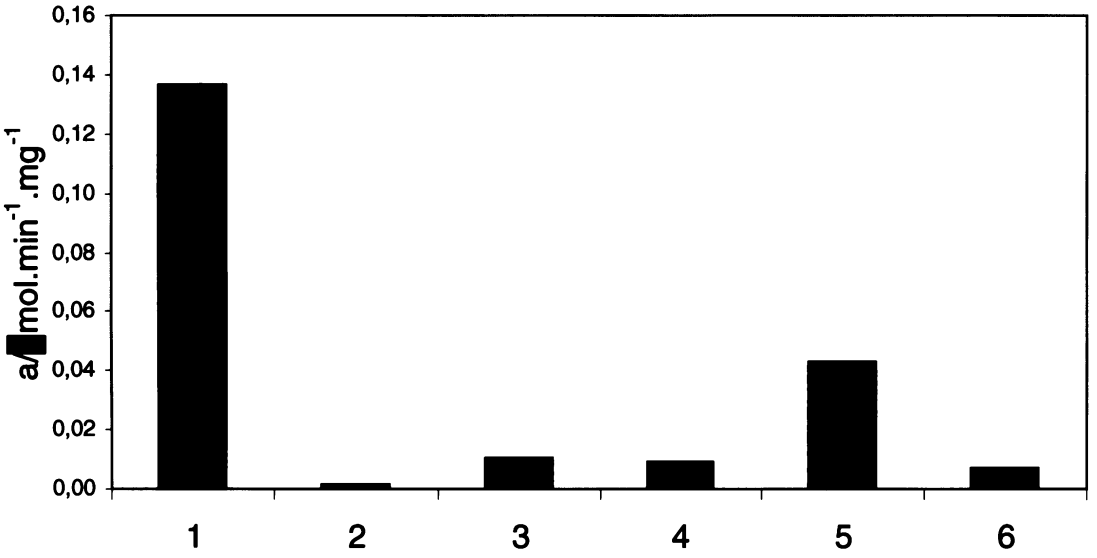
Z 800 g mandlí jsem postupem uvedeným v kapitole 2.5.1. získala 4,43 g emulzinu. V tomto preparátu jsem zkoumala množství bílkovin podle Bradfordové.[16] Porovnáním s kalibrační křivkou pro hovězí sérový albumin (viz. obr.18) a následným přepočtem na původní zředění vzorku mi vyšlo, že roztok emulzinu (60 mg emulzinu v 1 ml destilované vody) obsahuje 9,2 mg/ml proteinů, což je 15 %.



Obr. 18: Kalibrační křivka pro hovězí sérový albumin

3.2 Stanovení aktivity glykosidas v emulzinu

Stanovila jsem aktivitu dalších glykosidas přítomných v emulzinu. Aktivitu β-glukosidasy, α-glukosidasy, β-galaktosidasy, α-galaktosidasy, α-mannosidasy a β-hexosaminidasy jsem stanovila za přítomnosti příslušných p-nitrofenylglykosidů a měřila absorbanci uvolněného p-nitrofenylu při 405 nm za laboratorní teploty a pH 4,1. Největší aktivitu jsem naměřila pro β-glukosidasu, kde aktivita tohoto enzymu vykazuje hodnotu 0,137 μmol . min^{-1} na 1 mg emulzinu. Nejmenší aktivitu má naopak α-glukosidasa, kde hodnota aktivity tohoto enzymu je 0,001 μmol . min^{-1}. mg^{-1} (viz. obr. 19).



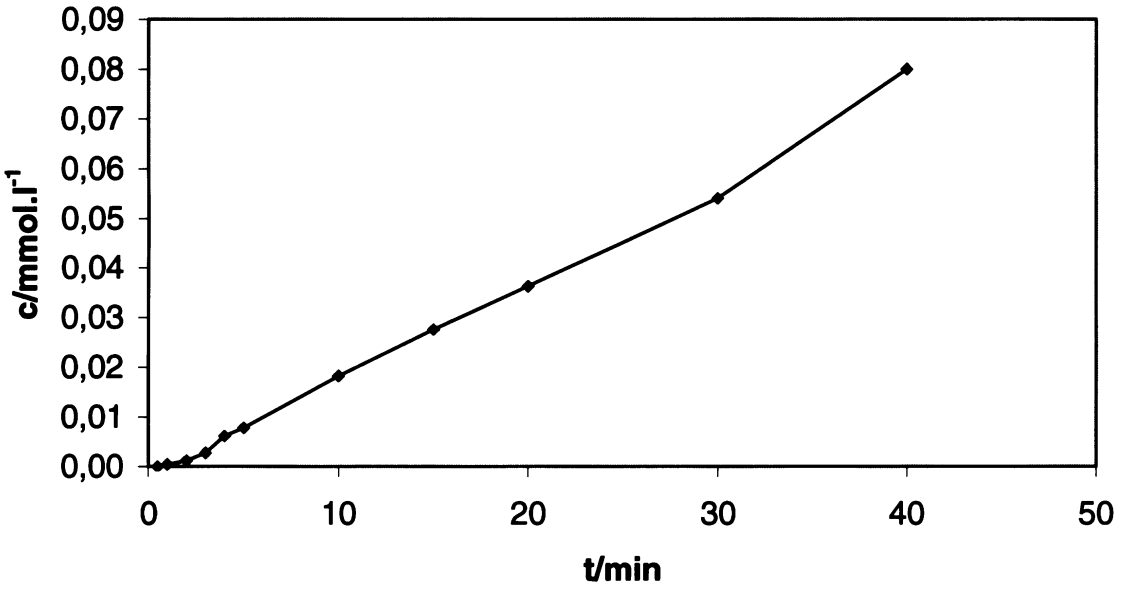
Obr. 19: Aktivity jednotlivých glykosidas obsažených v emulzinu

1... β-glukosidasa, 2...α-glukosidasa, 3... β-galaktosidasa, 4... α-galaktosidasa, 5... α-mannosidasa, 6... β-hexosaminidasa

3.3 Optimalizace stanovení aktivity β-glukosidasy

3.3.1 Závislost tvorby produktů reakcí katalyzovaných β-glukosidasou na čase

Sledovala jsem, jak se tvoří množství produktu vytvořeného reakcí katalyzovanou β-glukosidasou za 40 minut. Z obr. 20 vyplývá, že za 40 minut trvání reakce je přírůstek produktů lineární a za tuto dobu nedochází ke zpomalení přírůstku produktů, což souvisí s naředěním emulzinu, jehož koncentrace byla 0,04 $mg.ml^{-1}$.

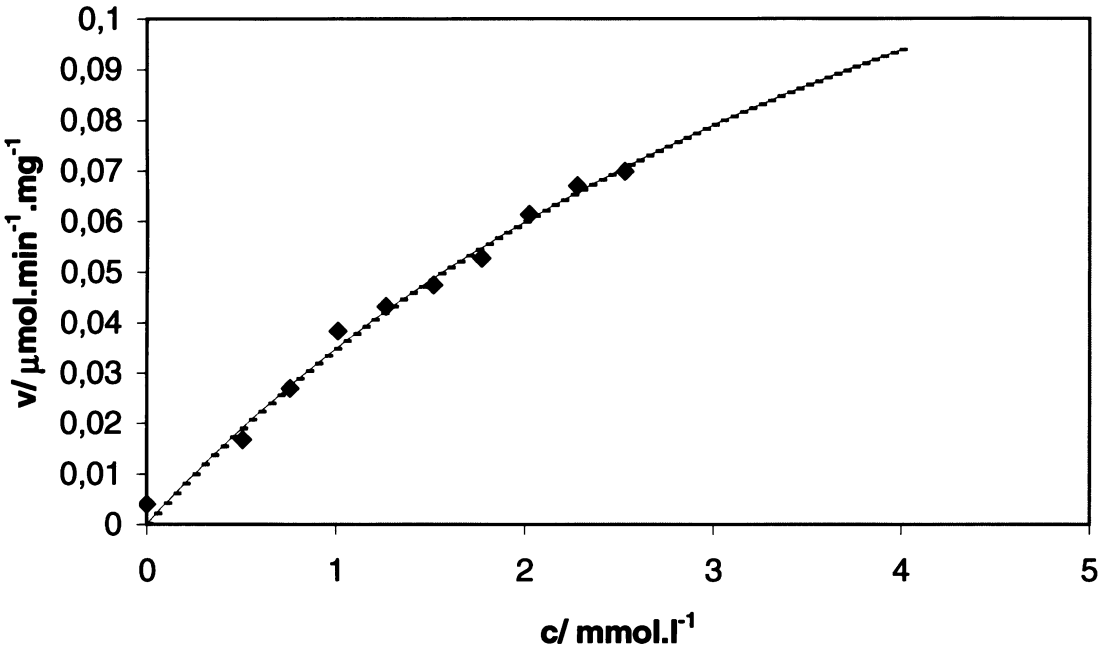


Obr. 20: Závislost koncentrace p-nitrofenolu na čase

3.3.2 Závislost rychlosti reakce katalyzované β-glukosidasou na koncentraci substrátu

Při tomto stanovení jsem sledovala závislost rychlosti reakce katalyzované β-glukosidasou na koncentraci substrátu (p-nitrofenyl-β-D-glukosid). Tato závislost má tvar hyperboly. Z této závislosti lze zjistit Michaelisovu konstantu odpovídající koncentraci substrátu, při níž je limitní rychlost reakce poloviční. Hodnota Michaelisovy konstanty K_m pro β-glukosidasu je 5,2 $mmol.l^{-1}$ a maximální rychlost reakce V_{max} 0,22 $\mu mol . min^{-1} . mg^{-1}$emulzinu.

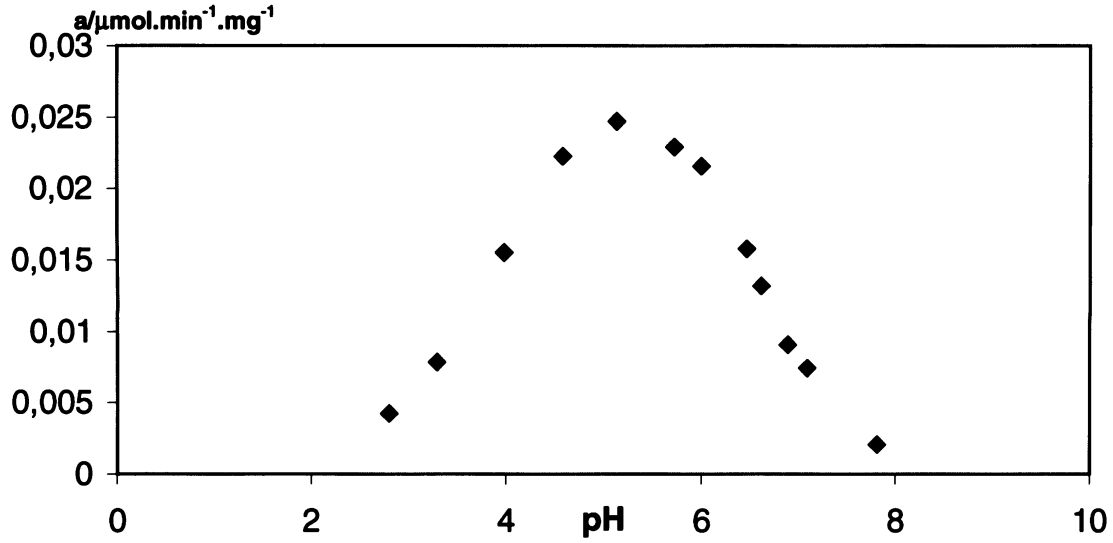
V grafech body vyznačené modrými čtverečky odpovídají naměřeným experimentálním hodnotám, zelená křivka vznikla na základě vypočítaných hodnot Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti reakce nelineární regresí rovnice Michaelis- Mentenové.



Obr. 21: Závislost rychlosti reakce katalyzované β-glukosidasou na koncentraci substrátu (p-NP- β-D-glukosid)

3.3.3 Stanovení pH optima β-glukosidasy

Rychlost většiny enzymatických reakcí závisí na pH prostředí, ve kterém jsou tyto reakce uskutečňovány. Při tomto experimentu jsem zkoumala vliv pH na aktivitu β-glukosidasy. Jak je zřejmé z obr. 22, závislost má tvar zvonu a pH optimum β-glukosidasy je 5. β-glukosidasa vykazuje 50 % aktivitu ještě v intervalu pH 4,5 – 6,5.



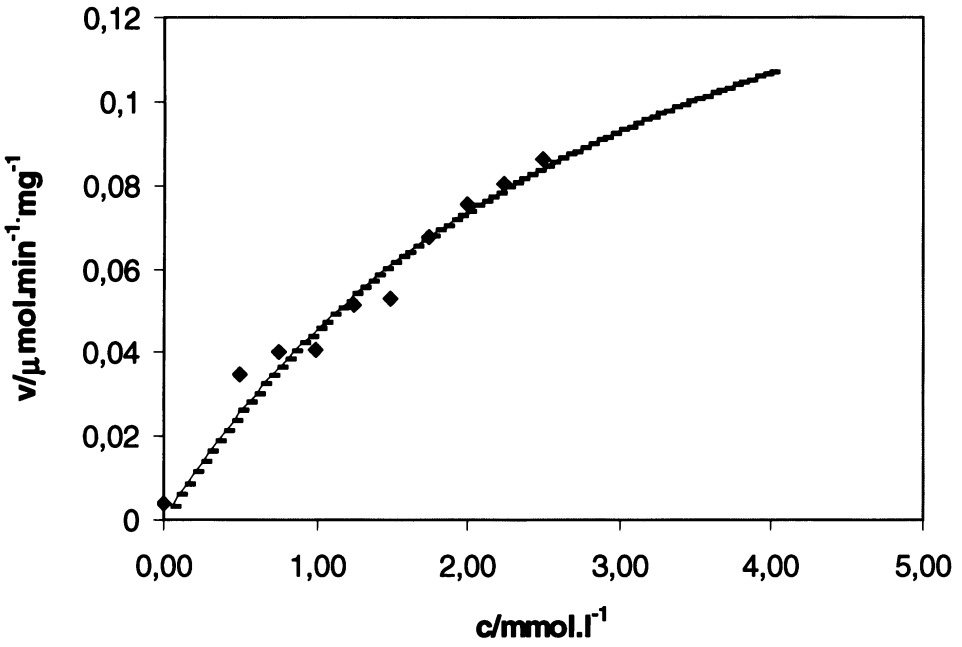
Obr. 22: Závislost aktivity β-glukosidasy na pH prostředí

Po ukončení těchto měření, jsem zjistila vhodné podmínky pro další stanovení. Jako optimální dobu reakce používám v dalších experimentech 10 minut a pH reakčního pufru 5.

3.4 Stanovení Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti reakce β-glukosidasy

Sledovala jsem závislost aktivity β-glukosidasy na koncentraci substrátu v prostředí jejího pH optima (pH 5). Michaelisova konstanta K_m je v porovnání s prostředím o pH 4,1 nižší a má hodnotu 3,2 mmol.l^{-1}. Maximální rychlost reakce V_{max} má hodnotu 0,19 µmol . min^{-1} . mg^{-1}emulzinu.

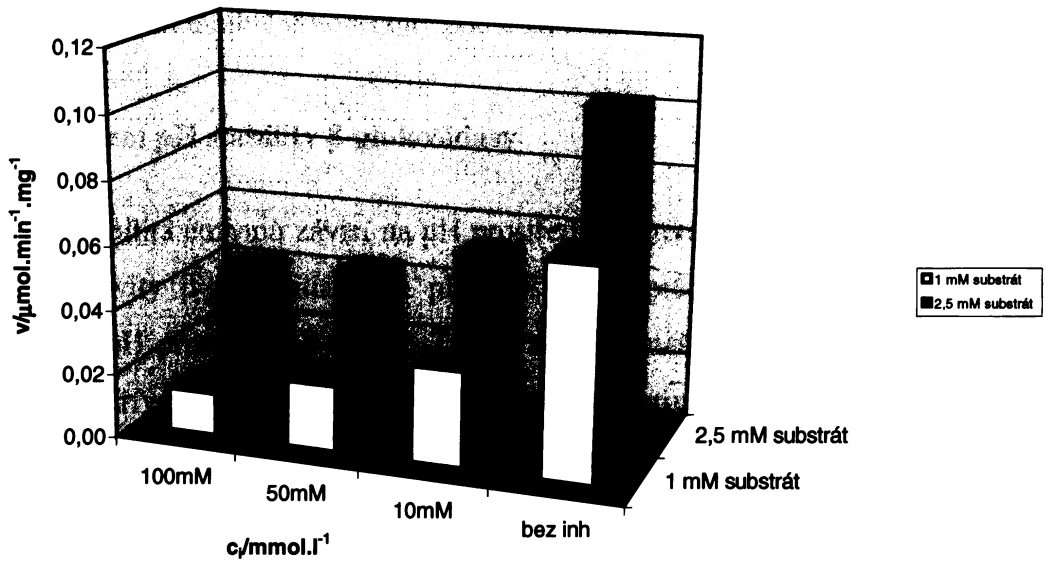
Na obr. 23 označují modré čtverečky naměřené experimentální hodnoty a růžová křivka vznikla na základě vypočítané hodnoty Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti reakce nelineární regresí rovnice Michaelis- Mentenové.



Obr. 23: Závislost rychlosti reakce β-glukosidasy na koncentraci substrátu

3.5 Vliv glukosy na aktivitu β-glukosidasy

Při tomto měření jsem zkoumala vliv různě koncentrovaného roztoku D-glukosy (10 mM, 50 mM a 100 mM) na rychlost reakce katalyzované β-glukosidasou (viz. obr. 24).

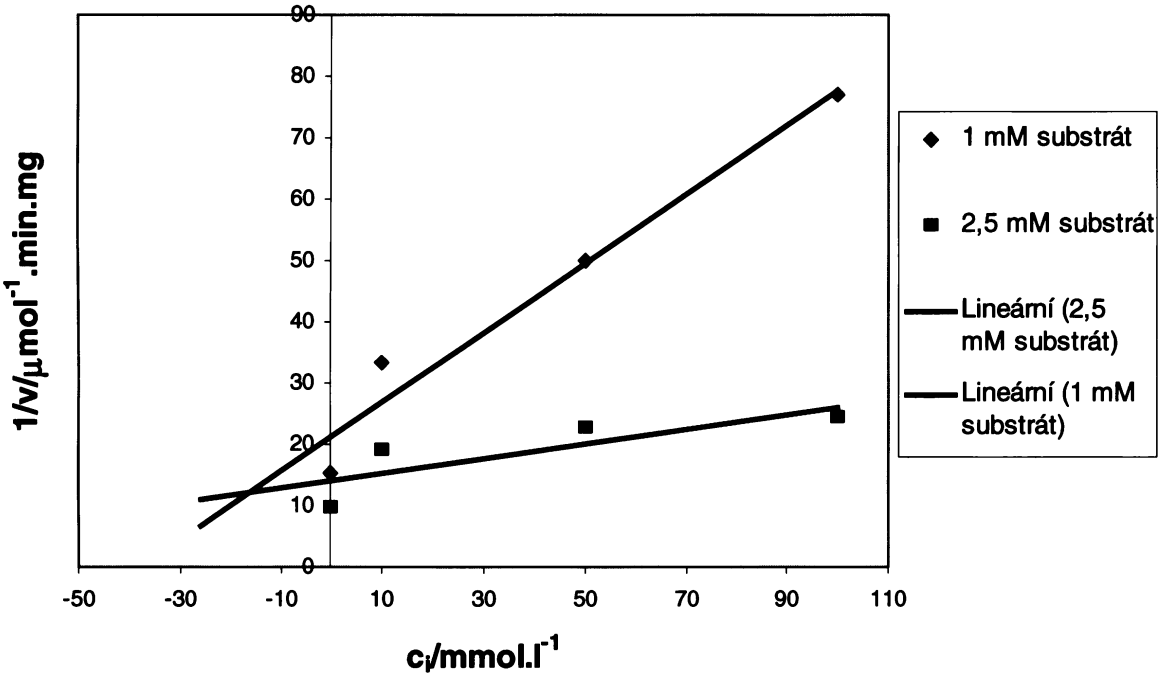


Obr. 24: Vliv glukosy na aktivitu β-glukosidasy

Z obrázku 24 je patrné, že dochází k inhibici při obou použitých koncentracích substrátu. Se stoupající koncentrací glukosy je aktivita β-glukosidasy menší.

Na základě vynesení převrácené hodnoty rychlosti reakce katalyzované β-glukosidasou na koncentraci inhibitoru podle Dixona [20] jsem zjistila inhibiční konstantu K_i glukosy, která má hodnotu 15,9 mM (obr. 25).

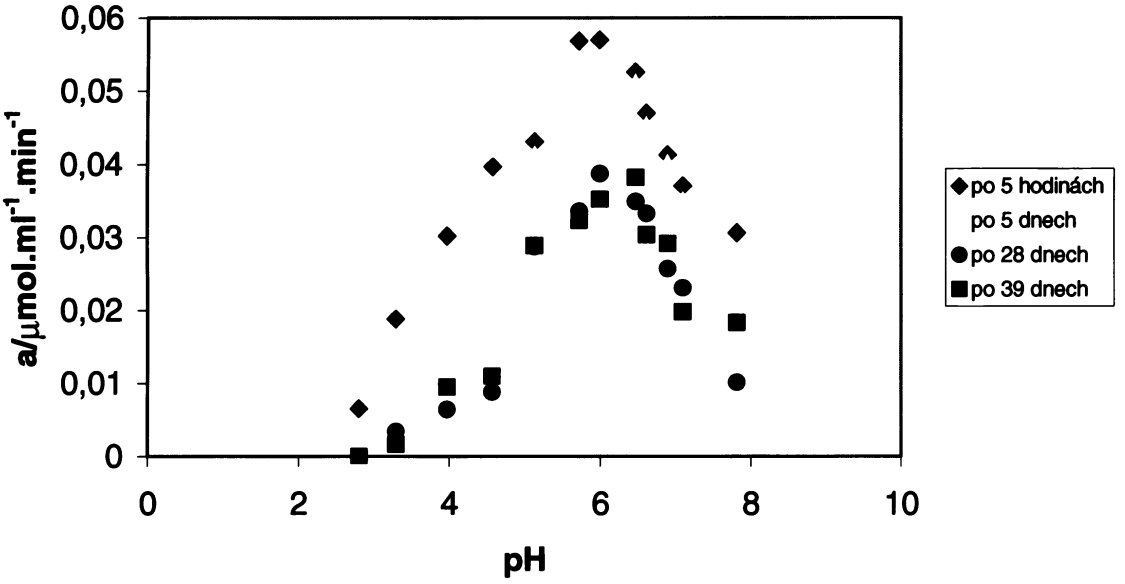
Typ inhibice je pravděpodobně kompetitivní, ale přesné určení typu inhibice a inhibiční konstanty by vyžadovalo podrobnější kinetickou studii.



Obr. 25: Stanovení inhibiční konstanty podle Dixona

3.6 Stanovení pH stability β-glukosidasy

Stabilita enzymů závisí na pH prostředí ve kterém jsou skladovány. Měřila jsem závislost aktivity β-glukosidasy na pH prostředí v průběhu dvou měsíců. Enzym byl inkubován v pH prostředí od 2,8 do 7,81 a aktivita měřena při pH optimu. Jak vyplývá z obr. 26, nejdříve byla aktivita nejvyšší v okolí pH optima enzymu, ale postupem času se nejvyšší aktivita posouvala k hodnotám pH mezi 6 a 6,5. Nejrychleji aktivita klesala v kyselém prostředí.



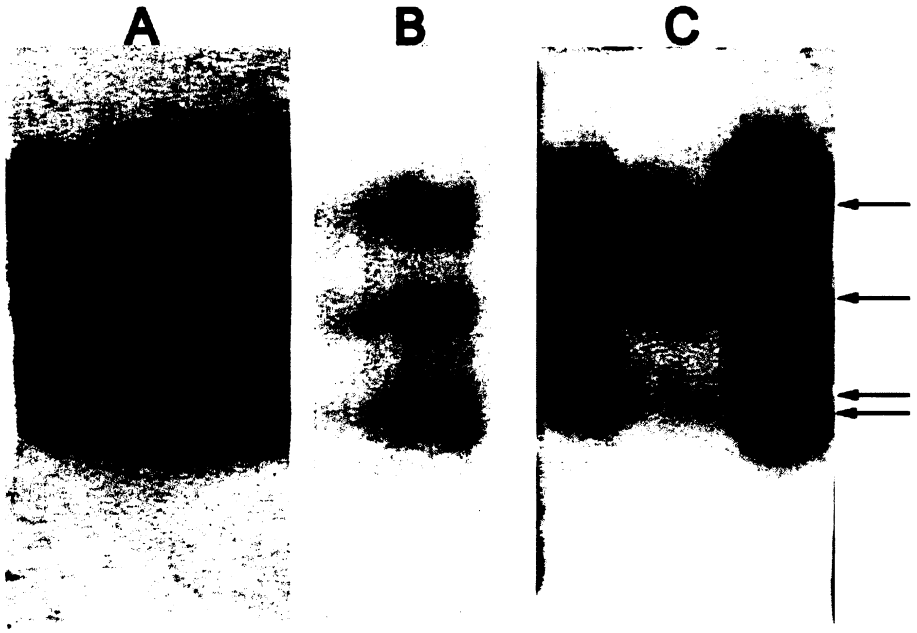
Obr. 26: Závislost stability β-glukosidasy na pH prostředí . Hodnoty označené modrými kosočtverečky byly získány po 5 hodinách inkubace, žlutými trojúhelníčky po 5 dnech, hnědými kolečky po 28 dnech a růžovými čtverečky po 39 dnech

3.7 Studium isoenzymů β-glukosidasy

Po elektroforetické separaci za nativních podmínek jsem detekovala aktivitu β-glukosidasy.

Vzorky jsem pipetovala do jamek v množství 10, 20 a 30 µl. Při detekci aktivity β-glukosidasy jsem použila substrát 6-brom-2-naftyl-β-D-glukopyranosid, který s diazoniovou solí poskytuje nerozpustný komplex. Testovala jsem barvy: Fast Blue B, Fast Blue BB a Fast Red Violet. V gelu jsou patrné fialové proužky, což znamená, že β-glukosidasa z mandlí se vyskytuje ve více isoformách. Tři jsou výrazné, mají tedy větší

zastoupení, jedna je minoritní. Výsledky dokumentuje obr. 27.

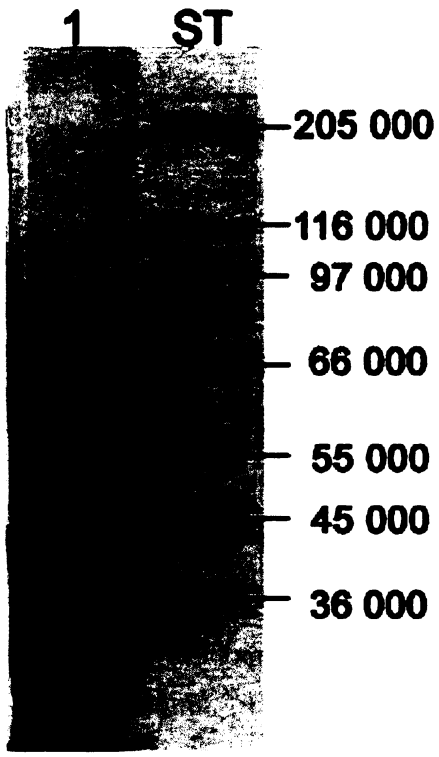


Obr. 27: Detekce aktivity β-glukosidasy v gelu s použitím Fast Blue BB (A), Fast Blue B (B) a Fast Red Violet (C). Šipky označují přítomnost β-glukosidasové aktivity.

Nejvhodnějším barvivem je Fast Blue BB, kdy jsou proužky nejvíce zřetelné.

3.8 Elektroforéza v prostředí SDS

Při SDS elektroforéze jsem sledovala proteiny obsažené v emulzinu. Jak je zřejmé z obr. 27, emulzin obsahuje velké množství proteinů. Majoritní proteiny mají relativní molekulovou hmotnost 60 kDa. Je možné, že protein o relativní molekulové hmotnosti 60 kDa odpovídá podjednotce β-glukosidasy. Dobře patrné jsou proteiny o relativní molekulové hmotnosti 36-66 kDa.



Obr. 28: Přítomnost proteinů v emulzinu- pravý proužek obsahuje standard s proteiny o molekulové hmotnosti 36-205 kDa, levý proteiny v emulzinu

4 Diskuze

Emulzin z mandlí je běžným zdrojem glykosidas. Je velmi dobře znám pro svůj vysoký obsah β-glukosidasy. Ta v mandlových semenech štěpí kyanogenní glukosidy za vzniku kyanovodíku, který semena chrání před patogenními organismy nebo býložravci.

Kromě β-glukosidasy obsahuje emulzin ještě další glykosidasy jako například α-mannosidasu, β-galaktosidasu a β-hexosaminidasu. Jejich množství je však proti β-glukosidase méně než třetinové. α-glukosidasa a α-galaktosidasa se v emulzinu téměř nevyskytují (obr. 19).[25]

Kinetické parametry enzymu β-glukosidasy byly stanoveny za použití substrátu p-nitrofenyl-β-D-glukosidu. Hodnota Michaelisovy konstanty K_m byla určena na 3,2 mmol.l^{-1}, maximální rychlost reakce V_{max} na 0,19 μmol . min^{-1} . mg^{-1} emulzinu, což odpovídá 1,24 μmol . min^{-1} . mg^{-1} proteinů. pH optimum β-glukosidasy je 5 a enzym má 50 % aktivitu v rozmezí pH 4,5-6,5 a vykazuje poměrně velkou pH stabilitu.

Získané výsledky se téměř shodují s dříve získanými poznatky o β-glukosidase.[21] Za shodných podmínek tj. při použití stejného substrátu a teploty reakce byla hodnota Michaelisovy konstanty K_m stanovena na 2,89 mmol.l^{-1} a maximální rychlost reakce V_{max} na 0,636 μmol . min^{-1} . mg^{-1}. pH optimum bylo určeno na 5,2. [21]

Hodnota Michaelisovy konstanty je vůči p-nitrofenylglukosidu poměrně vysoká. Přirozené substráty β-glukosidasy jsem nezkoumala a předpokládám, že afinita k těmto sloučeninám bude vyšší.

Při zkoumání vlivu glukosy na rychlost reakce katalyzovanou β-glukosidasou jsem zjistila, že glukosa v nižších koncentracích nemá na rychlost reakce podstatný vliv. Proto jsem pracovala s koncentracemi glukosy 10 mM, 50 mM a 100 mM. Po vynesení závislosti převrácené hodnoty rychlosti reakce na koncentraci glukosy podle Dixona jsem zjistila, že glukosa funguje pravděpodobně jako kompetitivní inhibitor, což se shoduje s v minulosti získanými poznatky. [21] Inhibiční konstantu K_i jsem stanovila na 15,9 mmol.l^{-1}, což se ale neshoduje s dříve získanou inhibiční konstantou vynesením podle Lineweaver-Burka, která má hodnotu 210 mmol.l^{-1}. Přesnější stanovení K_i by vyžadovalo práci s větším počtem koncentrací substrátu i glukosy jako inhibitoru.

Při nativní elektroforéze se v polyakrylamidovém gelu vytvořily čtyři proužky. Z předchozích studií vyplývá, že β-glukosidasa se vyskytuje nejméně ve 3 isoenzymech.[22]

Z elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek nelze jasně určit, zda se jedná o jednotlivé isoenzymy, o monomerní jednotky nebo jejich agregáty.

Vzhledem k tomu, že β-glukosidasa byla stabilní po dobu 39 dnů, jedná se o enzym vhodný do praktických cvičení z biochemie. Postupy uvedené pro zjištění specifické aktivity, pH závislosti a závislosti na koncentraci substrátu budou součástí praktických cvičení z biochemie. Aktivita enzymu je natolik vysoká, že enzym je snadno detekovatelný při elektroforéze v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek.

5 Souhrn

Byla zjištěna majoritní přítomnost enzymu β-glukosidasy v emulzinu připraveného z mandlí. Ostatní zkoumané glykosidasy jsou v emulzinu zastoupeny v mnohem menší míře.

Byly zjištěny kinetické parametry enzymu β-glukosidasy. Michaelisova konstanta K_m má hodnotu 3,2 $mmol.l^{-1}$, limitní rychlost reakce V_{max} je 1,24 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ proteinů. Enzym má pH optimum 5.

Glukosa je pravděpodobně kompetitivním inhibitorem reakce katalyzované β-glukosidasou. Inhibiční konstanta má hodnotu 15,9 $mmol.l^{-1}$.

Z elektroforetické separace za nativních podmínek vyplývá přítomnost více isoenzymů. Na elektroforeogramu jsou zřetelné čtyři proužky, tři jsou majoritní a jeden je minoritní.

Seznam použité literatury

1. www.expasy.ch/cgi-bin/enzyme-search-ec
2. Rotrekl V.: Chem. Listy 92, 883-893 (1998)
3. Voet D., Voet J.: Enzymatic catalysis v knize Biochemistry, Wiley International Edition, USA, 2004
4. Jenkins J., Legio L. L., Harris G., Pickersgill R.: FEBS Lett. 362, 281 (1995)
5. Durand P., Fabrega S., Henrissat B., Mornon J.-P., Lehn P.: Hum. Mol. Genetics 9, 967-977 (2000)
6. Vetter J.: Toxicon 38, 11-36 (2000)
7. Chen Z., Malamy J., Henning J., Conrath U., Sánchez-Casas P., Silva H., Ricigliano J., Klessig F. D.: Proc. Natl. Acad. Sci 92, 4134-4137 (1995)
8. Enyedi A. J., Yalpani N.,Silverman P., Raskin I.: Proc. Natl. Acad. Sci 89, 2480-2484 (1992)
9. Sroka Z.: Z Naturforsch [C] 60, 833-843 (2005)
10. Miller A. D.: Alt. Med. Rev. 1, 103-111, (1996)
11. Crozier, A., Kamiya, Y., Bishop, G., Yokota, T.: Biosynthesis of Hormones and Elicitor molecules v knize Biochemistry and molecular biology of plants, Courier Companies, Maryland, 2002
12. Kaushal G. P., Pastuszak I., Hatanaka K., Elbein A. D.: J. Biol. Chem. 265, 16271 (1990)
13. Bezouška K.: Přednáška: Translace; Buněčný transport, skládání a postranslační úpravy proteinů
14. Hrnova M., Fincher G. B.: Plant Mol. Biol., 47, 73-91 (2001)
15. Barthová, J.; Sofrová, D.; Tichá, M.: Základní praktikum z biochemie, skriptum PřF UK Praha, str. 163-164 (1984)
16. Bradford, M. M: Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)
17. Krajhanzl A., Hladík J. a kol.: Biochemické metody- Návody k pokročilým praktickým cvičením, skriptum PřF UK Praha (1991)
18. Lee, D. H.; Lee, C. B.: Plant Sci. 159, 75-85 (2000)
19. Laemmli, U. K.: Nature 227, 680-685 (1990)
20. Dawes A. D.: Enzymová kinetika v knize Kvantitativní problémy v biochemii, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1965

21. Heyworth R., Walker P. G.: Biochem. J. 83, 331-335 (1962)
22. Grover A. K., Macmurchie D. D., Cushley R. J.: Biochym. Biophys. Acta 482, 98-108 (1977)
23. He S., Withers S. G.: J. Biol. Chem. 272, 24864-24867 (1997)
24. Schwartz J., Sloan J., Lee Y. C.: Arch. Biochem. Biophys. 137, 122-127 (1970)
25. Lee, Y., C.: Methods Enzymol. 28, 699-702 (1972)

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

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka