UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2006

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE
3233217264

Petra Neuwirthová

OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ PROTEINŮ PŘI STÁRNUTÍ LISTŮ TABÁKU (*NICOTIANA TABACUM* L.)

Petra Neuwirthová

Školitelé: RNDr. Naďa Wilhelmová, CSc.
RNDr. Tomáš Kučera, Csc.

Diplomová práce
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha 2006

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Nadi Wilhelmové, CSc. (ÚEB AV ČR, Praha) a všechny použité prameny jsem řádně citovala."

Praha ... 4. 5. 2006

Podpis ...

Úvodem bych chtěla vyjádřit poděkování především své školitelce RNDr. Nadě Wilhelmové, CSc. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytovala při tvorbě mé diplomové práce.

Mé velké díky patří i Ing. Zuzaně Mýtinové za vytvoření příjemného pracovního prostředí, pomoc v laboratoři a za neutuchají dobrou náladu, kterou kolem sebe šířila.

Ráda bych také poděkovala paní Lence Kolčabové za všestrannou pomoc v laboratoři, Ing. Dagmar Procházkové, PhD. za změření pigmentů v listech tabáku a paní Dagmar Cibochové za pomoc při metodě Western Blot.

V neposlední řadě děkuji mým rodičům za jejich podporu a trpělivost během celého mého studia.

Tato práce byla podporována grantem GAČR č. 522/03/0312.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 6

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED 8

1.1 Stárnutí rostlin a senescence 8
1.2 Regulátory senescence 10
1.2.1 Cytokininy 11
1.2.1.1 Biosyntéza cytokininů 12
1.2.1.2 Hlavní fyziologické účinky cytokininů 13
1.2.1.3 Využití cytokininů v rostlinné výrobě 14
1.3 Iniciace senescence a ROS 15
1.3.1 Typy ROS a jejich metabolismus 18
1.3.1.1 Singletový kyslík 18
1.3.1.2 Superoxidový anionradikál 18
1.3.1.3 Perhydroxylový radikál 19
1.3.1.4 Peroxid vodíku 19
1.3.1.5 Hydroxylový radikál 19
1.4 Oxidační poškození proteinů 21
1.5 Geny spojené se senescenčním syndromem (*SAG*) 24
1.5.1 SAG_{12} 25

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE 27

2. MATERIÁL A METODY 28

2.1 Použité chemikálie 28
2.2 Použité přístroje 29
2.3 Pokusný materiál a jeho kultivace 30
2.3.1 Rostlinný materiál 30
2.3.2 Pěstování tabáku 30
2.4 Dělení pigmentů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) 33
2.4.1 Extrakce pigmentů 33
2.4.2 Dělení pigmentů 33
2.5 Stanovení oxidačního poškození proteinů 34

2.5.1 Stanovení obsahu karbonylových skupin metodou podle Levine et al. (1990) 34
2.6 Stanovení obsahu proteinů 37
2.6.1 Stanovení obsahu proteinů podle Bradfordové (1976) 37
2.6.2 Stanovení obsahu proteinů podle Lowryho 38
2.7 *GUS* barvení 39
2.7.1 *GUS* barvení metodou podle Jeffersona et al. (1987) 39
2.8 SDS-elektroforéza proteinů 40
2.8.1 Izolace rozpustných proteinů pro elektroforézu 40
2.8.2 Příprava gelů 40
2.9 Imunochemické barvení oxidovaných proteinů 42
2.9.1 Izolace vzorků 42
2.9.2 SDS-elektroforéza 42
2.9.3 Metoda tzv. přenosu (z angl. „bloting") proteinů z gelu na membránu - Western Blot 43
2.9.4 Inkubace proteinů s protilátkou 45
2.10 Statistické hodnocení výsledků 46

3. VÝSLEDKY **47**

3.1 Rozdíly mezi kontrolní a transgenní rostlinou *Nicotiana tabacum* L. 47
3.2 Vliv stárnutí na obsah vybraných fotosyntetických pigmentů v listech tabáku 48
3.3 Změny v aktivaci promotoru SAG_{12} detekcí aktivity glukuronidasy (*GUS* barvení) metodou podle Jeffersona et. al. (1987) 51
3.4 Vliv stárnutí na obsah proteinů v listech tabáku 53
3.4.1 Změny v obsahu cytosolických proteinů měřené spektrofotometricky 53
3.4.2 Změny v obsahu a rozdělení cytosolických proteinů zjištěné SDS-elektroforézou 57
3.5 Vliv stárnutí na obsah oxidačně poškozených proteinů v listech tabáku 58
3.5.1 Změny v oxidačním poškození cytosolických proteinů měřené spektrofotometricky 58
3.5.2 Změny v oxidačním poškození rozpustných proteinů zjištěné imunochemickou detekcí 60

4. DISKUZE **62**

5. SOUHRN **68**

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **69**

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
ABA	kyselina abscisová
ACC	kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová
APS	persíran amonný
As	askorbát
ADP	adenosin-5´-difosfát
AMP	adenosin-5´-monofosfát
ATP	adenosin-5´-trifosfát
BAP	6-benzylaminopurin
Bis	N,N´-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin (z angl.- bovine serum albumin)
BHT	butylhydroxytoluen
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	dvojsodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
Fd	ferredoxin
GS	glutaminsynthetasa
GUS	gen pro β-glukuronidasu
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová
IPT	gen pro isopentenyltransferasu
JA	kyselina jasmonová
K	kontrolní rostlina
MDHA	monodehydroaskorbát
MJ	methyljasmonát
$NAD(P)^+$	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)
NAD(P)H	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)
PBS	fosfátový pufr, součást blokovacího pufru pro western bloting
PCD	programovaná buněčná smrt (z angl.- programmed cell death)
PS I a II	fotosystém I a II
RNA	kyselina ribonukleová

ROS	aktivní formy kyslíku (z angl.- reactive oxygen species)
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
S	transgenní rostlina
SAG	senescenční geny (z angl.- senescence-associated genes)
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutasa
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	N,N,N′,N′-tetramethylethylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
Tricine	N-tris(hydroxymethyl)methylglycin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1 STÁRNUTÍ ROSTLIN A SENESCENCE

Stárnutí je přirozený proces, který nakonec vede k odumírání buněk, pletiv, orgánů a celých rostlin. Končí, stejně jako u všech mnohobuněčných organismů, smrtí. V současné době neexistuje obecná teorie stárnutí, nejvíce přijímána je teorie založená na účinku volných radikálů. V roce 1956 navrhl Denham Harman, že volné radikály produkované při aerobní respiraci způsobují oxidační poškození, které se s přibývajícím věkem akumuluje, a je tak příčinou stárnutí a smrti [1,2]. Posledním stádiem stárnutí je senescence.

Listy jsou specializované orgány pro fotosyntézu a rostlina vynaloží mnoho energie a živin na jejich produkci. Po skončení stádia dospělosti, když poklesne jejich fotosyntetická aktivita, přestanou být listy pro rostlinu výhodné. Rostlina se jich postupně zbavuje a listy vstupují do poslední etapy vývoje: senescence. Při ní klesá schopnost fotosyntézy a dochází k postupnému řízenému odbourávání buněčných komponent za účelem přesunu degradačních produktů do mladých rostoucích orgánů, plodů či zásobních pletiv. Jako první jsou odbourávány chloroplasty, které obsahují většinu proteinů. Dále pak peroxisomy a endoplazmatické retikulum. Jádro, které je důležité pro transkripci genů a mitochondrie, která je nezbytná pro poskytování energie, zůstávají celé až do posledního kroku senescence [3,4]. Ubývá chlorofyl, lipidy, proteiny a RNA [5]. Ztráta chlorofylu se vyznačuje tím, že listy začínají žloutnout, a to od okrajů do jejich středu. Tento jev je viditelný na podzim v listnatých lesích. Během senescence dochází k řízeným změnám v buněčné struktuře, metabolismu [6] a expresi genů [7,8]. Dochází k mobilizaci hlavně dusíkatých látek, dále pak sacharidů a minerálních látek. Tato mobilizace je důležitá jak u jednoletých, tak i u vytrvalých rostlin. Letničky, do kterých patří většina zemědělsky významných plodin, ukládají ke konci života všechny látky do vyvíjejících se semen. Vytrvalé rostliny ukládají na konci vegetačního období část živin do zásobních pletiv, aby je mohly využít k růstu v příštím roce [9].

Senescence je zakončena programovanou buněčnou smrtí (PCD) [10,8]. V posledním kroku senescence, když jsou listy kompletně žluté, se začnou objevovat charakteristické znaky apoptózy, jako je kondenzace chromatinu a řetězení DNA [11,12].

Senescence je aktivní proces, vyžadující energii. Ta je dodávaná ve formě ATP a slouží hlavně pro udržování základních životních pochodů v buňce, syntézu specifických RNA a proteinů a pro transport mobilizovaných živin.

Rostliny jsou během svého života vystaveny různým nepříznivým vlivům vnějšího prostředí. Tyto vlivy nazýváme stresové faktory a mohou vyvolat senescenci. Stresové faktory lze rozdělit na biotické (např. poranění herbivorními živočichy, napadení parazity a patogeny) a abiotické. Abiotické faktory lze dále dělit na chemické (např. nedostatek vody, kyslíku, živin, přítomnost toxických látek v půdě) nebo fyzikální (např. UV záření, extrémní teploty).

1.2 REGULÁTORY SENESCENCE

Senescenci urychluje kyselina abscisová (ABA), kyselina jasmonová (JA) a ethylen. Senescenci naopak brzdí gibereliny, auxiny a cytokininy.

ABA je schopná brzdit ve zralých pletivech metabolickou aktivitu a naopak podporuje degradační procesy. Syntéza ABA je vyšší během období s krátkými dny a ještě výrazněji stoupá při nedostatku vody. Tedy za podmínek, které spouštějí a urychlují senescenci [13]. ABA působí i na expresi některých genů ovlivňujících stárnutí. Její účinek se například může projevovat na zvýšení exprese genů, které kódují enzymy rozkládající chlorofyl [14].

JA, methyljasmonát (MJ) a sloučeniny s touto kyselinou související (jasmonáty) jsou skupinou rostlinných růstových regulátorů, které ovlivňují růst a vývoj rostliny. Ovlivňují klíčení, vývoj květů, dozrávání ovoce a semen, a také senescenci [15,16,17]. První pokus, ve kterém byl zjištěn vliv MJ na průběh senescence, byl prováděn s listy ovsa [18,19]. JA může působit v rostlinném organismu i nepřímo jako látka, která zvyšuje tvorbu ethylenu [20].

Mezi nejdůležitější interní regulátory senescence patří rostlinné hormony cytokininy a ethylen [4].

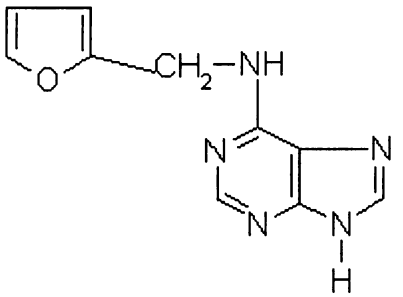
Ethylen byl první známý plynný fytohormon. Jeho koncentrace v buňce je velmi nízká, dána rozpustností v cytoplazmě. V cytoplazmě byla nalezena specifická vazebná místa pro ethylen a předpokládá se, že biologický účinek je zprostředkován vazbou na tyto bílkoviny. U ethylenu je dobře známá jeho regulační úloha v mnoha procesech, jako je klíčení semen, vývoj semenáčků, zrání plodů, defoliace (odlistění) a dozrávání ovoce [21]. Účastní se také odpovědí rostlin na vnější faktory [22,23]. Jeho účast v senescenci může být odvozena z pokusů, kdy inhibice produkce ethylenu oddálila nástup senescence. Transgenní rajčata exprimující „antisense“ geny, které bránily tvorbě enzymů syntetizujících ethylen, vykazovaly opožděnou senescenci listů [24]. U rostlin huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) s mutací, která je činila necitlivými na ethylen, byla senescence rovněž oddálena [25,2].

Snížení hladiny cytokininů v listech může zahájit nástup senescence [26]. A skutečně se ukázalo, že senescence může být iniciována jen tehdy, poklesne-li hladina cytokininů pod jistou úroveň [27,28]. Na druhé straně, aplikace cytokininů na rostliny, nebo i jednotlivé listy oddálila senescenci u mnoha druhů rostlin [29,30]. Výsledky těchto

a dalších pokusů naznačují, že účinek cytokininů se odbývá na transkripční úrovni, a zvýšené koncentrace cytokininů inhibují expresi genů podílejících se na spuštění senescence [31,32]. U transgenních rostlin s vneseným genem *IPT* pro biosyntézu isopentenyltransferasy, a tím zvýšenou koncentrací cytokininů, byla pozorována oddálená senescence [33,34,10].

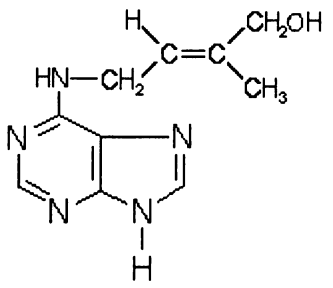
1.2.1 Cytokininy

K objevu cytokininů vedl rozvoj technik rostlinných tkáňových kultur. Buňky v rostlinných explantátech se mohly dělit pouze v přítomnosti určitých látek, které byly podle své hlavní funkce, stimulace buněčného dělení, nazvány cytokininy. Jejich nejbohatším zdrojem je autoklávovaná DNA, ze které byl jako účinná látka izolován a identifikován 6-furfurylaminopurin (6-furfuryladenin, kinetin) [35] (obr. 1).



Obr. 1: ***Kinetin***

Na základě výsledků testování biologické aktivity kinetinu byly cytokininy definovány jako látky, které v přítomnosti auxinu stimulují buněčné dělení. První přirozený (endogenní) cytokinin byl nalezen v nezralém endospermu kukuřice a byl nazván zeatin [36] (obr. 2).



Obr. 2: ***trans-zeatin***

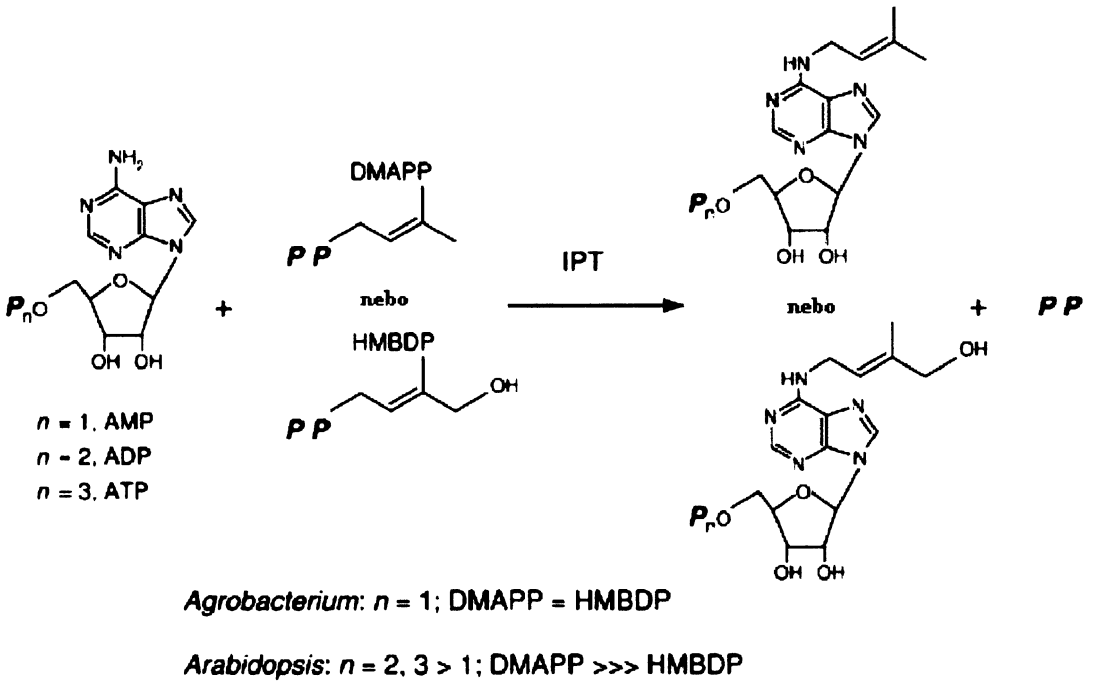
V současné době známe více než 30 přirozených cytokininů. Strukturně všechny vycházejí z adeninu substituovaného na aminoskupině v poloze 6. Tato konfigurace je podmínkou biologické aktivity.

V kulturách *in vitro* byl jako cytokinin nejčastěji používán spolu s kinetinem 6-benzyladenin neboli 6-benzylaminopurin (BAP). Tato látka byla dlouho považována za látku syntetickou. V roce 1972 popsali Horgan *et al.* (1972) výskyt *o*-hydroxybenzyladeninu v listech topolu. Dnes je všeobecně známo, že se benzyladenin a jeho deriváty, nesoucí v poloze *ortho* nebo *meta* benzenového kruhu hydroxylovou skupinu, vyskytují v rostlinách. Podle výskytu v topolu byly nazvány *o*- a *m*-topoliny a obecně je nazýváme aromatické cytokininy. Nejvyšší aktivitu v řadě biotestů vykazuje *m*-topolin (*m*-hydroxybenzyladenin).

Hlavním místem biosyntézy cytokininů jsou kořeny, odkud jsou cytokininy transportovány do nadzemní části xylémem. Přesto však za určitých podmínek se některé části rostlin mohou stát autonomní a pravděpodobně produkovat cytokininy samy. Nejvyšší hladiny cytokininů nacházíme v intenzivně se dělících a rostoucích pletivech. Koncentrace cytokininů může být ovlivněna i dalšími hormony; např. vyšší hladiny auxinu a ethylenu potlačují akumulaci cytokininů [21].

1.2.1.1 Biosyntéza cytokininů

Cytokininy se vyskytují v rostlinách jako volné látky a jako součást některých molekul tRNA. Prvním krokem biosyntézy cytokininů s isoprenoidním řetězcem je prenylace adenosin 5′-fosfátů (AMP, ADP nebo ATP) s dimethylallyldifosfátem nebo hydroxymethylbutenyldifosfátem. Tato reakce je katalyzována enzymem adenosinfosfát-isopentenyltransferasou (*IPT* ; EC 2.5.1.27.) (obr. 3, str. 13). V malé míře se podílí na biosyntéze cytokininů také prenylace tRNA pro leucin a serin. Prenylovaný adenosin se uvolní při degradaci tRNA. Tento zdroj cytokininů byl identifikován nejdříve [37]. Geny pro *IPT* byly izolovány teprve nedávno u *Arabidopsis* [38,39] petunie [40] a chmelu [41]. Akceptorem prenylu u vyšších rostlin je ADP a ATP za vzniku isopentenylribosid-5′-difosfátu nebo isopentenylribosid-5′-trifosfátu, donorem prenylu je dimethylallyldifosfát nebo hydroxymethylbutenyldifosfát. Při syntéze trans-zeatinu se předpokládá hydroxylace postranního řetězce cytochromem P450 [42]. Dalším zdrojem jsou tRNA.



Obr. 3: ***Primární reakce biosyntézy cytokininů u bakterií a vyšších rostlin.***
Reakce je katalyzována *adenosinfosfát-isopentenyltransferasou* (*IPT*). Jako její substráty slouží DMAPP a HMBDP.
DMAPP = dimethylallylpyrofosfát (difosfát), HMBDP = hydroxymethylbutenyldifosfát.
Upraveno podle Sakakibara [43].

1.2.1.2 Hlavní fyziologické účinky cytokininů

Hlavním účinkem cytokininů je stimulace buněčného dělení. Ve všech meristematických, intenzivně se dělících pletivech nacházíme vysoké koncentrace aktivních cytokininů. Cytokininy ovlivňují některé reakce v buněčném cyklu, pravděpodobně simulují některé z kinas. Mají ale také významný vliv na replikaci DNA ve fázi S mitózy: zvyšují množství počátků replikace, tzn. že zkracují replikony, urychlují přepis DNA a synchronizují buněčné dělení v pletivech. Tento účinek cytokininů je ve spojení s účinky auxinů základem regeneračních procesů *in vitro* (a samozřejmě i *in vivo*, např. po poranění). Aplikace cytokininů na rostlinu výrazně zpomaluje stárnutí, což se dá dobře demonstrovat u segmentů listů. Takové segmenty na světle velmi rychle ztrácejí chlorofyl, žloutnou a začíná rozklad nukleových kyselin i proteinů. Aplikace cytokininů proces stárnutí výrazně zpomalí.

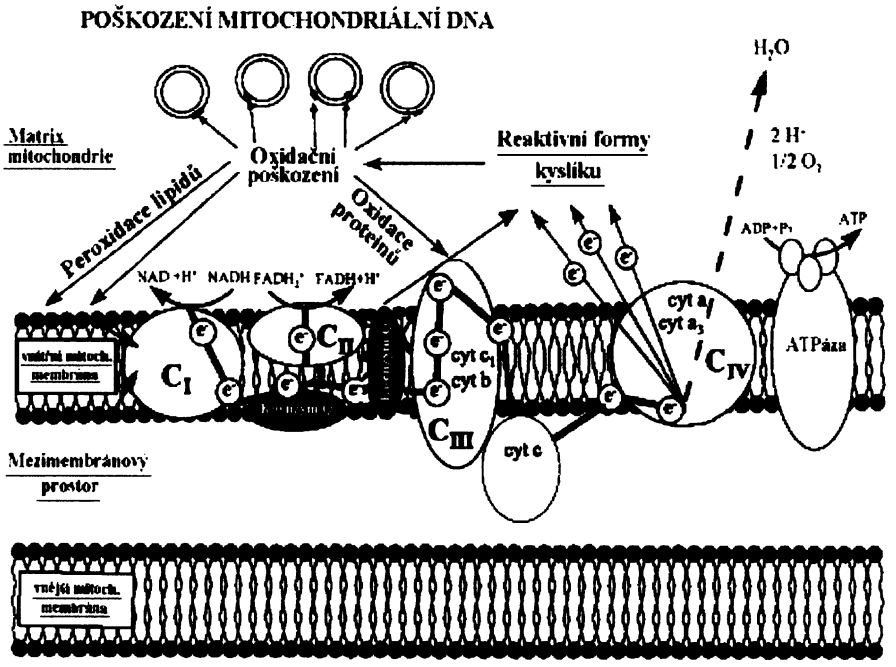
1.2.1.3 Využití cytokininů v rostlinné výrobě

Nejvýznamnější praktickou aplikací cytokininů je jejich využití v rostlinných biotechnologiích jako složek kultivačních médií. Dále se používají pro stimulaci větvení okrasných rostlin. U obilovin zvyšuje aplikace cytokininů v době kvetení počet zrn v klasech. Cytokininy také prodlužují období fotosyntetické produktivity rostlin a zvyšují celkovou produkci biomasy. Perspektivní je rovněž použití cytokininů při zvyšování odolnosti rostlin ke stresovým podmínkám.

1.3 INICIACE SENESCENCE A ROS

Jedním z možných faktorů spuštění senescence je určité nahromadění reaktivních forem kyslíku. Z Harmanovy teorie vyplývá významná úloha volných radikálů *in vivo*. Reaktivní formy kyslíku se označují zkratkou ROS (z angl.- reactive oxygen species). Molekulární kyslík v naší atmosféře je poměrně málo reaktivní, ovšem některými procesy v rostlinách může být přeměněn na mnohem reaktivnější formy. Kolektivní označení „volné radikály", které se někdy v této souvislosti používá není zcela přesné, proto se raději používá termín reaktivní formy kyslíku [21].

ROS vznikají v buňkách obecně jako vedlejší produkty při aerobním metabolismu a jsou ve vyšších koncentracích toxické pro všechny formy života [44]. Vznikají při aerobní respiraci v mitochondriích (obr. 4), při odbourávání mastných kyselin v peroxisomech a při metabolismu xenobiotik, kterého se účastní enzymy obsahující cytochrom P450. Zdrojem ROS mohou být i reakce neenzymové – glykace, Fentonova a Haber-Weissova reakce [2,45].

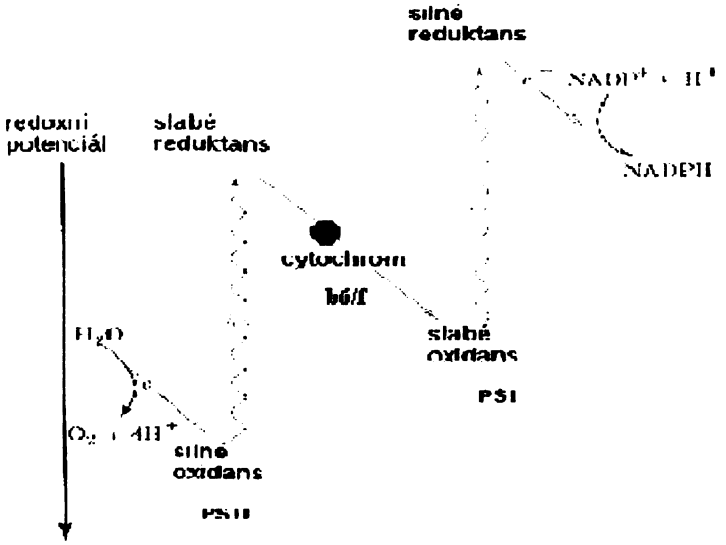


Obr. 4: ***Oxidační poškození způsobená reaktivními formami kyslíku, které vznikají při aerobní fosforylaci v mitochondriích.***
C_I = NADH:ubichonon-oxidoreduktasa, C_{II} = sukcinát: ubichonon-oxidoreduktasa, C_{III} = ubichinol:cytochrom *c*-oxidoreduktasa, C_{IV} = ferrocytochrom *c*:kyslík-oxidoreduktasa (cytochromoxidasa). Převzato ze Srbová [2].

V živočišných buňkách je hlavním zdrojem ROS mitochondriální dýchací řetězec [46,47]. Také v rostlinách je jejich významným zdrojem. Mitochondrie produkují ROS během aerobního metabolismu. Ve vnitřní mitochondriální membráně probíhá současně s přenosem elektronů v respiračním (elektrontransportním) řetězci tvorba ATP. Kolem 95 % kyslíku tkáňových buněk spotřebují mitochondrie, z toho je asi 1-5 % kyslíku neúplně redukováno (převážně na úrovni koenzymu Q) za vzniku ROS a organických volných radikálů [48].

U rostlin pochází většina ROS z fotosystému I (PS I). Při normálním metabolismu je jejich hladina přísně kontrolovaná. Při stresových podmínkách se však produkce ROS mnohonásobně zvyšuje. Zároveň v těchto podmínkách působí jako signální molekuly, jejich prostřednictvím dochází k expresi genů různých složek ochranného systému, např. antioxidačního. Dojde-li k nerovnováze mezi tvorbou prooxidačních molekul a jejich odstraňováním pomocí antioxidačních obranných systémů, nastává oxidační stres. Jeho důsledkem jsou změny v metabolizmu a vznik oxidačního poškození buněčných komponent [49].

Transport elektronů, lokalizovaný v thylakoidních membránách chloroplastů, zahrnuje dva fotosystémy (PS I, PS II), které jsou vzájemně propojeny několika přenašeči elektronů, tzv. „Z schéma“ (obr. 5).

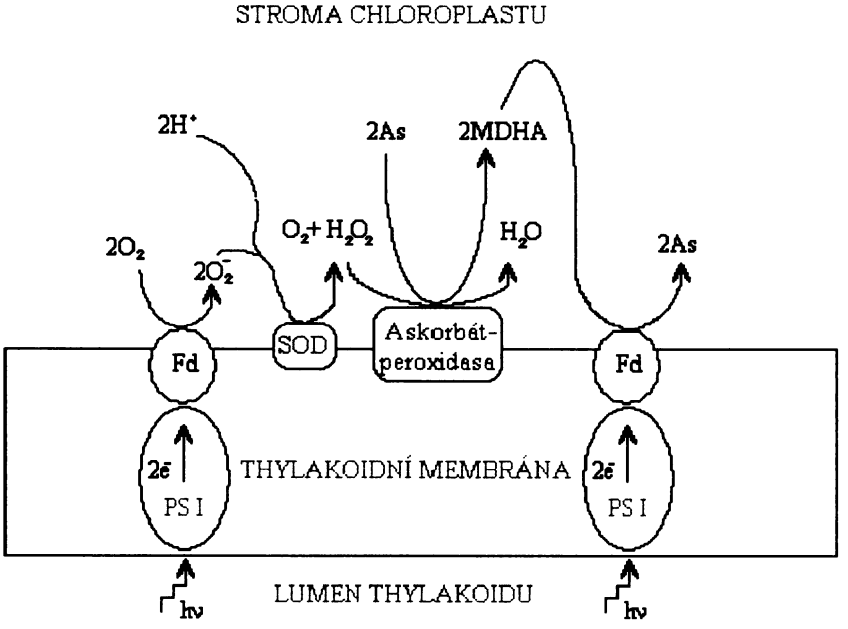


Obr. 5: ***Schéma Z pro fotosyntézu u sinic a rostlin.***
Dva fotosystémy, PSI a PSII, přenášejí elektrony postupně z H_2O na NADPH.
Upraveno podle Voet a Voet [50].

Ve PS II probíhá rozklad vody za uvolnění molekulárního kyslíku [21]. Chlorofyl je zachycením kvanta zářivé energie excitován do singletového stavu. K deexcitaci může dojít trojím způsobem: fluorescencí, využitím excitační energie dále v procesu fotosyntézy, nebo mezisystémovou konverzí, kdy vzniká tripletový excitovaný stav chlorofylu, který může podnítit formování velmi nebezpečného singletového kyslíku [51].

$$\begin{aligned} Chl + hv &\rightarrow {}^1Chl^* \\ {}^1Chl^* &\rightarrow {}^3Chl^* \\ {}^3Chl^* + O_2 &\rightarrow Chl + {}^1O_2 \end{aligned}$$

K fotoredukci molekulárního kyslíku může docházet především ve fotosystému I (Mehlerova reakce). PS I získává elektron pro své reakční centrum z cytochromového komplexu b_6/f Elektron v reakčním centru PS I je po pohlcení světelného kvanta excitován, uvolněn a přes primární přenašeče přenesen na ferredoxin. Ten přímo redukuje $NADP^+$. Při nedostatku akceptoru $NADP^+$ může reagovat s kyslíkem za vzniku superoxidu a peroxidu vodíku v tzv. Mehlerově reakci [21] (obr. 6).



Obr. 6: ***Vznik a odbourání ROS v chloroplastech.***
Fd = ferredoxin, As = askorbát, MDHA = monodehydroaskorbát, SOD = superoxiddismutasa.
Upraveno podle Srbová [2].

Mezi ROS řadíme singletový kyslík $^1O_2$, superoxidový anionradikál $O_2^{\cdot -}$, hydroxylový radikál $OH^{\cdot}$, perhydroxylový radikál $HO_2^{\cdot}$ a peroxid vodíku H_2O_2.

Za normálních podmínek je produkce ROS v buňce nízká. Působí-li na rostlinu stresové faktory, které naruší její buněčnou homeostázu, dochází k výraznému zvýšení aktivních forem kyslíku v buňce. V biologických systémech hrají dvojí roli. Slouží jako signální molekuly pro expresi genů a jako toxické produkty aerobního metabolismu způsobují poškození či zánik buňky [52,53]. ROS mohou inaktivovat enzymy, oxidovat proteiny a poškozovat DNA i RNA. V důsledku uvedených reakcí nastává buněčná smrt. Rostliny vyvinuly účinné obranné systémy, které odstraňují ROS a chrání tak buňky proti oxidačnímu poškození [54,55].

1.3.1 Typy ROS a jejich metabolismus

1.3.1.1 Singletový kyslík

Molekulární kyslík je poměrně málo reaktivní. Jeho aktivace probíhá různými mechanismy. Prvním z nich je obrácení spinu jednoho z nepárových elektronů absorpcí dostatečného množství energie. Ta je získána přenosem excitační energie světelných kvant z pigmentů fotosyntetického reakčního centra [56]. Vzniká velmi reaktivní singletový kyslík $^1O_2$ (obr. 7, str.20).

1.3.1.2 Superoxidový anionradikál

Aktivace kyslíku nastává také jednoelektronovou redukcí, kdy dochází ke tvorbě superoxidového anionradikálu (obr. 7, str. 20). Superoxidový anionradikál je mírně reaktivní. Neprochází přes biologické membrány [54]. Funguje jako oxidační i redukční činidlo. V živých buňkách existuje superoxidový radikál v rovnováze se svou protonovanou formou, perhydroxylovým radikálem. Výskyt jedné či druhé formy závisí na pH, kdy za fyziologických podmínek převládá superoxidový anionradikál.

Ve vodném rozpouštědle, v neutrálním nebo mírně kyselém pH dismutuje superoxidový radikál v obou formách na peroxid vodíku a kyslík [57]. Reakce probíhá samovolně nebo za katalýzy enzymem superoxiddismutasou (SOD).

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

1.3.1.3 Perhydroxylový radikál

Je více hydrofobní než superoxid a může tedy snáze pronikat lipidovou dvojvrstvou membrán, podobně jako H_2O_2 a voda [58]. Tam může odebírat protony z polynenasycených mastných kyselin a lipidových hydroperoxidů, čímž zahajuje oxidaci lipidů [54].

$$H^+ + O_2^{\cdot -} \rightarrow HO_2^{\cdot}$$

1.3.1.4 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku vzniká v organismu při některých metabolických pochodech. Významný je vznik v reakci katalyzované SOD (obr. 6, str. 17). Dále mohou H_2O_2 produkovat různé flavoproteinové oxidasy, které katalyzují dvouelektronový přenos. Patří mezi ně např. monoaminoxidasa, což je enzym vyskytující se na vnitřní mitochondriální membráně. Nebo některé peroxisomální oxidasy [59], například glykolátoxidasa.

Je to poměrně stabilní molekula. Snadno prochází přes buněčnou membránu. V rostlinné buňce může být disproporciován na vodu a kyslík enzymem katalasou nebo být substrátem nespecifických peroxidas. Dále může být detoxikován askorbátperoxidasou (EC 1.11.1.11), která působí spolu s glutathionreduktasou (EC 1.8.1.7) v Halliwellově-Asadově cyklu [57]. Tato reakce je velmi důležitá z hlediska oxidačního stresu.

1.3.1.5 Hydroxylový radikál

Vzniká v postupné tříelektronové redukci molekulárního kyslíku, kdy je produkována nejreaktivnější forma kyslíku – hydroxylový radikál [60].

Může vznikat buď z peroxidu vodíku nebo se tvoří přímou reakcí peroxidu vodíku a superoxidového anionradikálu [61].

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

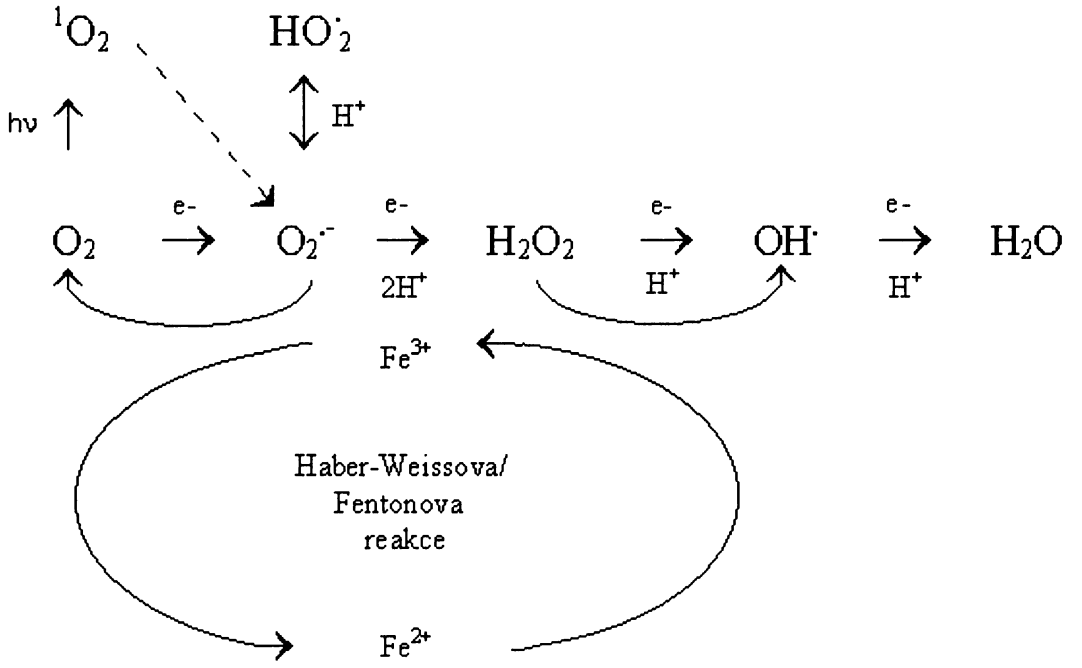
Za normálních podmínek probíhá uvedená reakce pomalu. A tudíž se tvoří takto jen malé množství hydroxylového radikálu. Jeho dostatečné množství se však může tvořit Fentonovou reakcí zahrnující oxidaci přechodných kovů, jako jsou železnaté nebo

měďnaté ionty [62,63]. V přítomnosti superoxidového anionradikálu dochází k Haber-Weissově cyklu:

$$H_2O_2 + Fe^{2+}\ (Cu^{+}) \rightarrow Fe^{3+}\ (Cu^{2+}) + OH^{\cdot} + OH^{-}$$
$$O_2^{\cdot -} + Fe^{3+}\ (Cu^{2+}) \rightarrow Fe^{2+}\ (Cu^{+}) + O_2$$

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + O_2$$

Následná regenerace oxidovaných iontů na jejich redukovaný stav probíhá cestou reakce se superoxidovým radikálem. Hydroxylový radikál je velmi silný oxidant [53]. Je schopný spustit řetězové reakce, při kterých mohou vznikat další nebezpečné sloučeniny, jako jsou alkoxylové a peroxylové radikály. Ty indukují sled reakcí způsobujících peroxidaci lipidů a poškození proteinů [64].



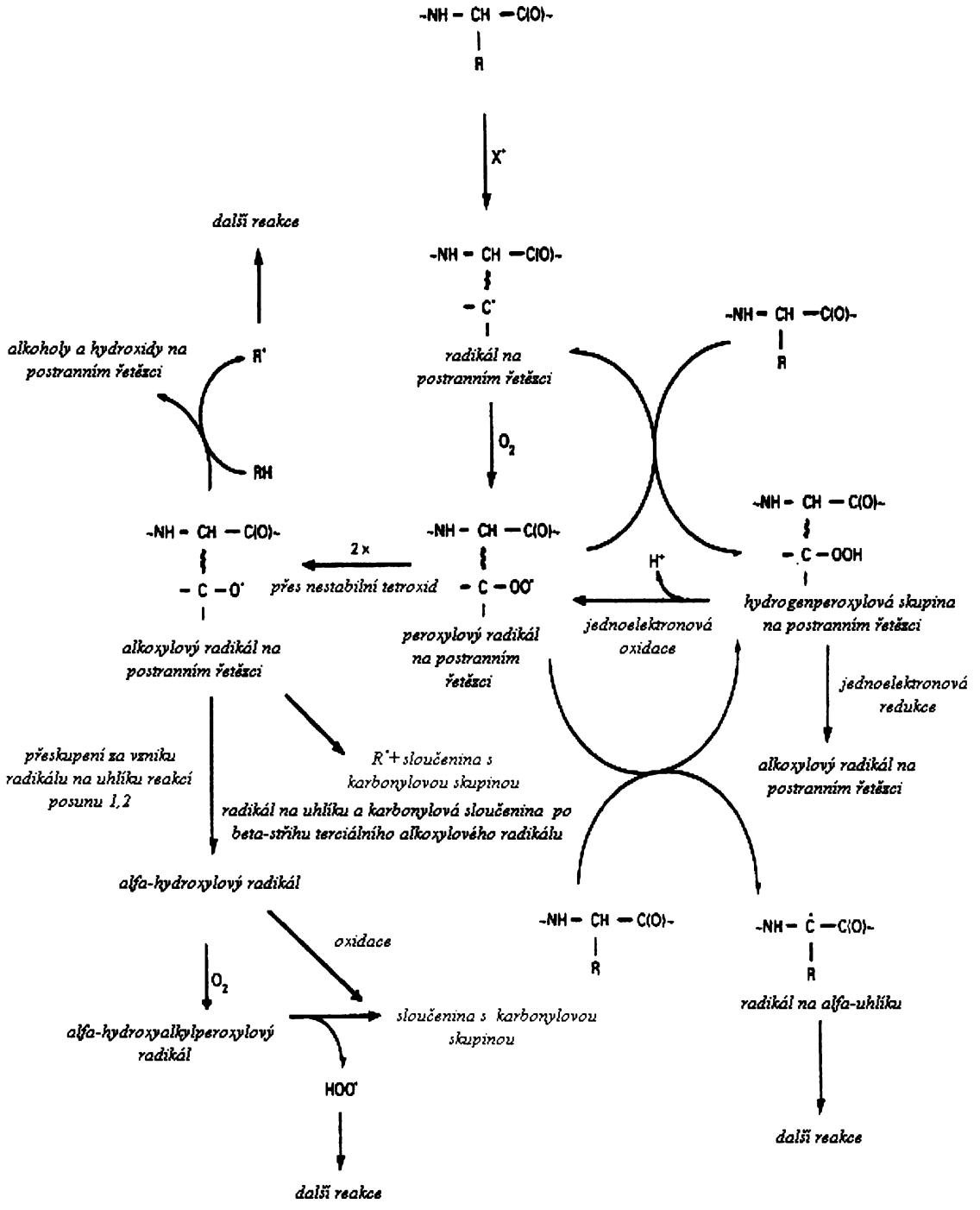
Obr. 7: ***Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu.***
Vyžaduje čtyři elektrony a je vždy doprovázená postupnou jedno až tří elektronovou redukcí, kdy dochází ke tvorbě superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu.
Upraveno podle Piterková [53].

1.4 OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ PROTEINŮ

V buňce dochází k různým oxidačním modifikacím proteinů. Patří sem oxidace sulfhydrylových skupin, síťování proteinů, reakci proteinů s aldehydy, modifikaci postranních řetězců a fragmentaci peptidů. Oxidační modifikace na skeletu aminokyselin v proteinech se projeví vzrůstem počtu karbonylových skupin v molekule proteinu. Takto změněné proteiny mohou vyvolat pokles fyziologických funkcí a navodit tak vznik patologických stavů a projevy stárnutí.

Mírná oxidace může generovat množství odlišných modifikací aminokyselinových zbytků v proteinech bez rozštěpení peptidové vazby. K H_2O_2 jsou zejména citlivé některé enzymy Calvinova cyklu, enzymy s thiolovými skupinami jsou citlivé i k $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ a $^1O_2$. [65]. Ireverzibilní modifikace aminokyselinových zbytků jsou katalyzovány ionty přechodných kovů (Fe^{3+}, Cu^{2+}), které jsou zachycovány ve vazebných místech proteinů. Při oxidační modifikaci katalyzované kovy vzniká o-, či m-tyrosin z fenylalaninu a dityrosin z tyrosinu. Z tyrosinu může kromě dityrosinu vznikat i 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA) [66]. DOPA má redukční účinky a pravděpodobně se účastní redukce přechodných kovových iontů, které mohou spustit další radikálové reakce [67]. Methionin lze oxidovat na methioninsulfoxid, který je zpětně redukován methioninsulfoxireduktasou, tato reakce představuje důležitý obranný mechanismus buňky proti oxidačnímu stresu. Oxidační produkty lze zjistit u většiny aminokyselinových zbytků v poškozených proteinech [68,2].

Nejčastějším produktem oxidace proteinů jsou však sloučeniny s karbonylovou skupinou, aldehydy a ketony, vznikající na postranních řetězcích aminokyselin [69]. Radikál na postranním řetězci reaguje s kyslíkem za vzniku nestabilního peroxylového radikálu, který se dále rozpadá na alkoxylové radikály. Štěpením alkoxylových radikálů se tvoří karbonylový radikál a sloučenina s karbonylovou skupinou (obr. 8, str.22).



Obr. 8: ***Hlavní radikálové reakce probíhající na postranních aminokyselinových řetězcích při oxidaci proteinů za přítomnosti kyslíku.***
Sloučeniny, podle nichž se určuje míra oxidačních modifikací, jsou vyznačeny červeně.
Upraveno podle Dean [66].

Oxidační poškození proteinů a následné hromadění karbonylových skupin je považováno za jeden z důležitých projevů stárnutí a bylo popsáno od prokaryot přes rostliny až po živočichy. U člověka se postupný růst vyskytuje jak v průběhu přirozeného stárnutí, tak během řady onemocnění, jako jsou Alzheimerova a Parkinsonova choroba [70]. U rostlinné senescence byl nárůst karbonylů popsán například v hlízkách sóji [71], či v okvětních lístkách listopadky *Dendranthema morifolium*, kde obsah poškozených proteinů vzrostl dvakrát a obsah ROS dokonce devětkrát [72]. Proteiny, u nichž dojde v důsledku reakce s volnými radikály ke změně konformace, jsou navíc snadněji dostupné pro různé proteasy [73]. Jednotlivé proteasy jsou značně specifické. Proteiny se velmi liší v citlivosti na poškození volnými radikály [74]. Během stárnutí klesá celkový obsah proteinů v buňce a to pravděpodobně jak v důsledku jejich snížené syntézy, tak díky intenzivnější proteolysy [59]. Nejvíce proteinů obsahují v rostlinné buňce chloroplasty, a tak je přirozené, že se stárnutím klesá i velikost a počet těchto organel. Ještě před úplným rozložením celého chloroplastu dochází k degradaci chlorofyl-proteinových komplexů a enzymu Rubisco (ribulosa-1,6-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa). Rubisco je klíčový enzym v asimilaci uhlíku během fotosyntézy [75]. V temné fázi fotosyntézy katalyzuje připojení CO_2 k molekule ribulosa-1,5-bisfosfátu a následné rozštěpení vzniklého meziproduktu na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Kromě této karboxylační reakce katalyzuje i oxygenační reakci. Oxygenasovou aktivitou tohoto enzymu dochází k fotorespiraci. Po navázání kyslíku na ribulosa-1,5-bisfosfát vzniká nestálý meziprodukt s pěti atomy uhlíku, který se rozpadá na dva produkty, 3-fosfoglycerát a 2-fosfoglykolát. Modifikace a odbourávání Rubisco je poměrně dobře prostudované [75,76].

1.5 GENY SPOJENÉ SE SENESCENČNÍM SYNDROMEM (*SAG*)

Je známo, že celý proces senescence je geneticky řízený, proto se během senescence zachovává jádro, kde dochází k transkripci genů. Genům, spojeným se senescencí říkáme senescenční geny (senescence-associated genes) a značíme je zkratkou *SAG*. V průběhu senescenčního syndromu se jimi kódované proteiny uplatňují jako efektory nebo regulátory. Všeobecně tyto geny můžeme dělit do dvou tříd. První třídu tvoří typické geny senescence. mRNA těchto *SAG*ů se v rostoucích listech nevyskytuje a může být detekována pouze v průběhu senescence. Druhou třídu tvoří geny, jejichž mRNA se nachází i v rostoucích listech, a během senescence se jejich množství ještě zvýší [32]. Do první třídy řadíme např. SAG_{12} a SAG_{13} z *Arabidopsis thaliana* [10], a LSC_{54} z *Brassica napus* [77]. SAG_{12} a SAG_{13} se nevyskytují jen v listech, ale k jejich expresi dochází i ve stoncích, okvětních lístcích, pestících.

*SAG*y byly identifikovány v mnoha rostlinách. Např. již v zmiňované *Arabidopsis thaliana* [78,79,7,80] a *Brassica napus* [77], dále pak v ječmeni [81], kukuřici [82], ředkvičce [83] a rajčeti [84,85].

Porovnáním sekvencí *SAG*ů byla zjištěna jejich enzymatická funkce. Jsou to geny kódující degradační enzymy jako např: RNAasy [79], proteinasy [78,7,85], lipasy [86] a glutaminsynthetasy (GS) [87]. GS se podílejí při senescenci na syntéze glutaminu z NH_4^+. V listech jsou známy dvě glutaminsynthetasy: cytosolická GS1 a v chloroplastech se vyskytující GS2.

Zajímavou skupinu *SAG* tvoří metalothioneiny, které v organizmech plní detoxikační funkci. Během stárnutí se mohou uplatňovat při degradaci metaloproteinů, kdy dochází k uvolňování potencionálně nebezpečných kovových iontů, které jsou vychytávány metalothioneiny. Takovým proteinem je např. výše zmiňovaný LSC_{54}.

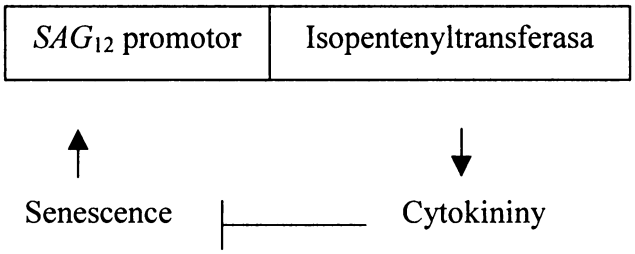
Ve stárnoucích rostlinách také stoupá exprese genu kódujícího oxidasu kyseliny aminocyklopropankarboxylové (ACC), která se účastní biosyntézy ethylenu.

Jedna skupina *SAG* tvoří v rostlinách geny kódující cysteinové proteasy. Proteasová aktivita těchto genů nebyla zjištěna, ale třída cysteinových proteas je dobře prozkoumaná a všechny tyto SAGy ukazují silnou podobnost jejich konzervativních motivů s motivy skupiny známých proteas. Takže přítomnost proteasové aktivity je reálná. V rajčatech byly objeveny dvě cysteinové proteasy C14/SENU2 a SENU3 [88]. V *Arabidopsis* byla

nalezena cysteinová proteasa SAG_2, jejíž DNA je velmi podobná DNA SENU3 [78,85]. Jinou cysteinovou proteasou izolovanou z *Arabidopsis* je SAG_{12}.

1.5.1 *SAG*$_{12}$

K expresi tohoto genu dochází pouze během přirozené senescence. Nebyl detekován při pokusech s indukovanou senescencí stresy např. pomocí tmy, přidáním ethylenu nebo přidáním ABA. Začne se aktivovat až v okamžiku, kdy list vstupuje do senescence. Na tuto práci byly použity tabáky s vneseným chimerickým genem. Promotor *SAG*$_{12}$ (P_{SAG12}), na nějž se připojí *IPT* (gen pro *isopentenyltransferázu*, která se účastní biosyntézy cytokininů), vytvoří konstrukt P_{SAG12}-*IPT* [10]. Promotor P_{SAG12} byl izolován z *Arabidopsis thaliana*. *IPT* byla izolována z bakterie *Agrobacterium*. Na počátku senescence může tento promotor aktivovat expresi *IPT*, tím se zvýší koncentrace cytokininů, které zabrání nástupu senescence v listu. Inhibice senescence zmírní expresi *IPT*, protože promotor přestává být aktivní (obr. 9). P_{SAG12}-*IPT* byl do buněk listu tabáku vložen pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Jiným způsobem je ostřelování jader (úseky DNA, které nás zajímají se rozštípnou, navážou se na částečky zlata a vstřelí se do rostliny nebo třeba přímo do listu).



Obr. 9: ***Inhibice senescence zvýšenou koncentrací cytokininů.***
Upraveno podle Gan a Amasino [32].

Transgenní rostliny byly porovnávány se svými kontrolami. Po 12 týdnech došlo u kontrol k viditelné senescenci. Dolní (nejstarší) listy začaly žloutnout od krajů ke středům. U transgenních rostlin nebyly po uplynutí této doby viditelné žádné známky senescence. Když kontrolní rostliny odkvetly a senescence byla pozorována u všech listů, transgenní rostliny byly stále zelené a pokračovaly v produkci květů [10].

Místo genu *IPT* se používá k pokusům i reportérový gen *GUS*, což je gen pro β-glukuronidasu. Vyskytuje se pouze v bakteriích a na rozdíl od *IPT* je detekovatelný. Tam kde je aktivní promotor SAG_{12} nastane syntéza β-glukuronidasy a ta katalyzuje hydrolýzu vhodného glukuronidového substrátu za tvorby modré indigové sraženiny, která se dá v pletivech snadno detekovat.

CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit:

1. Zda, kdy a jakým způsobem dochází v průběhu senescence listů tabáku ke změnám obsahu cytosolických proteinů a v jejich distribuci.

2. Zda a kdy dochází v průběhu senescence listů tabáku k nárůstu oxidačního poškození proteinů.

3. Jakým způsobem je ovlivněno oxidační poškození cytosolických proteinů cytokininy.

4. Zda lze nalézt korelaci mezi oxidačním poškozením proteinů a nástupem senescence listu.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH) – (Fluka)

4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová kyselina (Hepes) – (Fluka)

Aceton – (Lachema)

Acetonitril – (Lachema)

Agar – (Sigma-Aldrich)

Akrylamid (AA) – (Sigma-Aldrich)

Bromfenolová modř – (Sigma-Aldrich)

Butylhydroxytoluen (BHT) – (Lachema)

Činidlo Bradfordové – (Sigma-Aldrich)

Činidlo Coomassie Brilliant Blue G-250 – (Fluka)

Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4) – (Lachema)

DL-Dithiothreitol (DTT) – (Sigma-Aldrich)

Dodecylsulfát sodný (SDS) – (Koch-Light)

Dvojsodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA neboli chelaton III) – (Lachema)

Ethanol – (P-LAB a.s.)

Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) – (Sigma-Aldrich)

Folinovo fenolové činidlo – (Penta)

Glycerol (1,2,3-propantriol) – (Fluka)

Guanidin hydrochlorid – (Sigma-Aldrich)

Hovězí sérový albumin (BSA) – (Koch-Light)

Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4) – (Lachema)

Hydroxid sodný (NaOH) – (Lachema)

Inositol – (Sigma-Aldrich)

Kanamycin – (Sigma-Aldrich)

Kyselina 6-aminokapronová – (Sigma-Aldrich)

Kyselina chlorovodíková – (Spolchemie a.s.)

Kyselina octová – (Penta)

Kyselina trichloroctová (TCA) – (Fluka)

Leupeptin – (Sigma-Aldrich)

Methanol – (Lachema)

Molekulové hmotnostní standardy pro SDS elektroforézu – (Sigma-Aldrich)

Murashige a Skoog směs solí (kat. č. M 5524) – (Sigma-Aldrich)

N-tris(hydroxymethyl)methylglycin (Tricin) – (Sigma-Aldrich)

N,N´-methylen-bis-akrylamid (Bis) – (Fluka)

N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamin (TEMED) – (Sigma-Aldrich)

Octan ethylnatý (ethylacetát) – (Lachema)

Pepstatin A – (Sigma-Aldrich)

Persíran amonný (APS) – (Fluka)

Sacharosa – (P-LAB a.s.)

Síran měďnatý ($CuSO_4$ x 5 H_2O) – (Lachema)

Streptomycin sulfát – (Sigma-Aldrich)

Thiamin – (Sigma-Aldrich)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) – (Sigma-Aldrich)

Triton X-100 – (Sigma-Aldrich)

Tween-20 (polyoxyethylensorbitan monolaurát) – (Sigma-Aldrich)

Uhličitan sodný (Na_2CO_3) – (Lachema)

Uhličitan hořečnatý ($MgCO_3$) – (Lachema)

Vínan sodno-draselný – (Lachema)

X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glukuronid cyklohexylamin) – (Fluka)

Chemikálie byly zakoupeny u firem:

Fluka Chemie AG (Švýcarsko)

Koch- Light Laboratories Ltd. (Velká Británie)

Lachema (ČR)

Penta (ČR)

P-LAB a.s. (ČR)

Sigma-Aldrich (USA)

Spolchemie a.s. (ČR)

2.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Homogenizátor Turrax (IKA, Německo)

Spektrofotometr U-3300 (HITACHI, Japonsko)
Centrifuga Biofuge 28 RS (HERAEUS, Německo)
Centrifuga Universal 16 R (HETTICH, Německo)
Elektroforetická komůrka SE 260 (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENT, USA)
pH-metr Jenway 3510 (JENWAY, England)
Termostat Dri Block DB.3 (TECHNE, England)
Inkubátor Plus II (GALLENKAMP, England)
Horkovzdušný autokláv Chirana PS 20 A (Československo)
Flow Box - „Clean Air" Type DLF 360 (Holandsko)
Přístroj na elektroforézu OMNI-BIO (Brno)
Systém HPLC (SPECTRA-PHYSICS, USA)
Kolona s reverzní fází Sepharon SGX C18 (TESSEK, ČR)
Skener Genius Color page HRP s prosvěcovacím dia nástavcem (GENIUS)

2.3 POKUSNÝ MATERIÁL A JEHO KULTIVACE

2.3.1 Rostlinný materiál

Pro experimenty jsem použila listy dvanáct týdnů starého tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). V tomto vývojovém stádiu byly nejstarší listy kontrolních rostlin žluté, senescentní (obr. 10, str. 32). Pěstovala jsem jak kontrolní, tak transgenní rostliny s pozměněnou koncentrací cytokininů. První skupina transgenních rostlin obsahovala promotor SAG_{12} s *IPT* genem pro isopentenyltransferasu. Druhá skupina transgenních rostlin obsahovala promotor SAG_{12} s *GUS* genem pro β-glukuronidasu. Obě skupiny transgenních rostlin byly připraveny Prof. Sushengem Ganem a Prof. Richardem M. Amasinem, Department of Biochemistry, 420 Henry Mail, University of Winsconsin, Madison, USA.

2.3.2 Pěstování tabáku

Sterilizace semen:

Semínka jsem odsypala do skleněné trubičky. Ta byla na jednom konci zakryta 4 vrstvami gázy, připevněné nití. Horní konec trubičky jsem potom také překryla gázou a

převázala nití. Poté jsem s ní provedla sterilizaci. Nejprve jsem ji ponechala v 70 % ethanolu po dobu 1 minuty a následně jsem ji přenesla do 100 ml směsi 30 % Sava se 3 kapkami Tween-20 na dobu 10 minut. Pak jsem ji 3x propláchla ve sterilní vodě (autoklávovaná destilovaná voda). Takto desinfikovaná semena jsem poté používala pro výsev.

Příprava agarového media:

Tabulka 1: ***Složení agarového media pro pěstování tabáků ze semen***

Murashige a Skoog směs	4,6 g
Agar	8 g
Sacharosa	15 g
Zásobní roztok vitamínů	10 ml
Kanamycin	50 mg

Jeden litr agarového media jsem připravila podle tabulky 1. Medium jsem vždy připravovala čerstvé. Pro pěstování kontrolních rostlin jsem použila téhož media, ale bez přídavku kanamycinu. Zásobní roztok vitaminů obsahoval 5 g inositolu a 500 mg thiaminu v 500 ml destilované vody. Po rozpuštění jsem jej sterilizovala 20 minut při tlaku 120 kPa v horkovzdušném autoklávu Chirana PS 20 A. K pozdějšímu použití jsem ho uchovávala při 4 °C. pH agarového media jsem upravila na 5,8 pomocí HCl, sterilizovala 20 minut při tlaku 120 kPa v autoklávu a nakonec jsem medium rozlila po 20 ml do Petriho misek o průměru 10 cm, které jsem po obvodu zalepila chirurgickou páskou. Agar jsem nechala ztuhnout a vychladnout.

Výsev a pěstování:

Na povrch agaru v Petriho miskách o průměru 10 cm jsem dala sterilizovaná semínka (asi 20 ks do jedné misky), misky jsem označila a opět oblepila po obvodu chirurgickou páskou. Výsev jsem prováděla ve sterilním „Flow boxu". Semenáčky jsem pěstovala měsíc v kultivační místnosti při 16ti hodinové světelné periodě, osvětlení 80 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ a teplotě 25 °C.

Po třech týdnech jsem asi 1,5 cm vysoké rostliny přesadila do umělohmotných stolních skleníčků do půdního (rašelinného) substrátu a další měsíc je pěstovala při 220 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ a teplotě 25 °C. Rostliny jsem každý den zalévala destilovanou vodou.

Sedm týdnů staré rostliny jsem přesadila do květináčů o průměru 12 cm a přemístila je do skleníku, ve kterém byla teplota udržována na 22 °C. Rostliny jsem denně zalévala destilovanou vodou a dvakrát týdně živným Hewittovým roztokem.

Složení Hewittova živného roztoku:

4 mM $Ca(NO_3)_2$, 4 mM KNO_3, 1,5 mM $MgSO_4$, 1,33 mM $NaHPO_4$, 0,5 mM $FeNa_2EDTA$, 10 μM $MnSO_4$, 0,5 μM $CuSO_4$, 1 μM $ZnSO_4$, 30 μM H_3BO_3, 0,1 mM NaCl, 0,5 μM Na_2MoO_4.

Sklizeň:

12 týdnů po výsevu jsem rostliny sklidila. Z každého listu jsem odstřihla hlavní cévy, listy jsem zvážila, a poté je jednotlivě zmrazila v tekutém dusíku. Označila jsem je číselně směrem od kořenů k vrcholu a uchovávala je k dalšímu použití při -70 °C.

Obr. 10: ***Pokusný materiál – rostlina tabáku Nicotiana tabacum*** *L.*
Vlevo je transgenní rostlina tabáku s vneseným konstruktem P_{SAG12}-*IPT*.
Vpravo je kontrolní rostlina tabáku.

2.4 DĚLENÍ PIGMENTŮ POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

2.4.1 Extrakce pigmentů

Zvážené listy tabáku (cca 1 g čerstvé hm.) jsem lyofilizací zbavila vody a do doby použití jsem je skladovala při -20 °C. Ke vzorkům jsem přidala 0,03 g uhličitanu hořečnatého, který zneutralizuje kyseliny a zabraňuje uvolňování hořčíku z chlorofylu a rozetřela je v 0,2 ml acetonu s 0,1 % butylhydroxytoluenem (BHT, antioxidant). Suspenzi jsem zředila 0,5 ml acetonu a centrifugovala při 5000g, 2 min, 22 °C. Čirý supernatant jsem přelila do čisté mikrozkumavky. Sediment jsem resuspendovala v 0,5 ml acetonu, a pak znova centrifugovala. Supernatant obsahující vyextrahované pigmenty jsem přilila k prvnímu supernatantu do mikrozkumavky. Aceton jsem odpařila proudem plynného dusíku. Takto jsem vzorky uchovávala v uzavřené mikrozkumavce v mrazáku až do jejich analýzy. Před analýzou pomocí HPLC jsem pigmenty rozpustila v 0,05 ml acetonu. Vzorky jsem odebrala z jedné rostliny kontrolní i transgenní a provedla jsem dva nástřiky téhož vzorku. Uveden je průměr obou měření.

2.4.2 Dělení pigmentů

Obsah pigmentů jsem analyzovala na systému HPLC při vlnové délce 445 nm. K dělení pigmentů jsem použila kolonu s reverzní fází Sepharon SGX C18 o rozměrech 150 x 3 mm a o průměru částic 5 μm. Dávkovací smyčka pro nanesení vzorků měla objem 0,01 ml, průtoková rychlost kolonou činila 1 cm^3 za 1 min. Mobilní fází byl lineární gradient mezi směsí A (acetonitril:methanol:voda v poměrech 80:12:6) a B (methanol) podle tabulky 2.

Tabulka 2: ***Střídání mobilních fází při stanovování fotosyntetických pigmentů pomocí HPLC.***

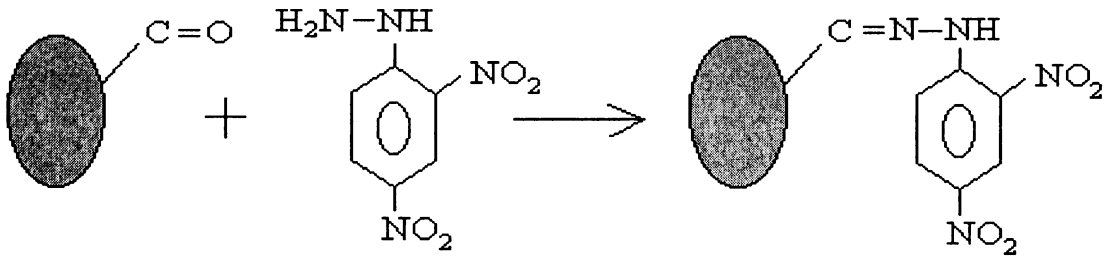
Retenční čas (min)	Mobilní fáze
0 – 8	100 % A
8 – 12	Gradient 50 % A 50 % B
12 – 25	100 % B

Hodnoty z detektoru jsem přepočítala podle kalibračních křivek na odpovídající hodnoty obsahu pigmentů (μg g^{-1} čerstvé hm.).

2.5 STANOVENÍ OXIDAČNÍHO POŠKOZENÍ PROTEINŮ

2.5.1 Stanovení obsahu karbonylových skupin metodou podle Levine et al. (1990).

Tato metoda [89] je založená na schopnosti 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) vázat se na karbonylové skupiny proteinů. Vzniká dinitrofenylhydrazon, který se stanovuje spektrofotometricky při 365 nmm (obr. 11). Karbonylové skupiny vznikají na aminokyselinových řetězcích proteinů při jejich reakci s volnými kyslíkovými radikály. Množství karbonylových skupin vypovídá o míře oxidačního poškození proteinů.



Obr. 11: ***Schematické znázornění vazby DNPH na karbonylovou skupinu proteinu.***
Šedě je znázorněn protein s karbonylovou skupinou.
Upraveno podle Frank [90].

Z mrazícího boxu jsem odebrala vzorek tabákových listů, který byl uchováván při -70 °C. Aby nedošlo k rozmrazení vzorku, přenášela jsem ho v tekutém dusíku. Odvážila jsem cca 1 g, zkřehlý vzorek rozdrtila a nasypala do plastové kyvety. Přidala jsem k němu izolační pufr s inhibitory proteas pH 7,0 v poměru 1 g vzorku: 5 ml pufru. Obsah kyvety jsem rozmixovala na přístroji Turrax. Homogenizovala jsem 10 sekund při 100 otáčkách za minutu. Vzniklý homogenát jsem přefiltrovala přes 8 vrstev gázy do centrifugačních kyvet, které jsem chladila ledem.

Kyvety jsem umístila do vychlazené centrifugy Biofuge 28 RS a nechala centrifugovat při 11 800 ot. (= 15 000 g), 25 min, 4 °C. Touto centrifugací došlo k oddělení rozpustné části proteinů od části membránové. Sediment jsem odstranila. Ze supernatantu jsem odebrala cca 100 μl do mikrozkumavky na stanovení obsahu rozpustných proteinů (metoda podle Bradfordové). Dále bylo nutné odstranit nukleové kyseliny. Proto jsem

k 9 dílům supernatantu (2,7 ml) přidala 1 díl (0,3 ml) 10 % streptomycinsulfátu v 50 mM HEPES- pH 7,2. Streptomycin totiž váže a sráží nukleové kyseliny. Kyvety jsem nechala stát 15 min na ledu a občas jsem jejich obsah protřepala. Pak jsem je dala opět centrifugovat při 11 800 ot. (= 15 000 g), 10 min, 4 °C. Sediment jsem i tentokrát odstranila.

Supernatant jsem odpipetovala do čtyř mikrozkumavek. Do každé jsem napipetovala 500 µl supernatantu a přidala k tomu 500 µl 20 % kyseliny trichloroctové (TCA), aby se vysrážely proteiny. Mikrozkumavky jsem dala centrifugovat v centrifuze Universal 16 R při 14 000 ot. (= 22 130 g), 15 min, 4 °C. Supernatant jsem odstranila.

K sedimentu jsem přidala 500 µl 10 mM DNPH v 2 M HCl. Jednu mikrozkumavku jsem vedla jako blank, zbylé tři mikrozkumavky jako triplikát na barvení DNPH. Do blanku jsem tedy místo DNPH přidala 500 µl HCl. Sraženinu jsem v mikrozkumavkách pořádně rozetřela a nechala 1 hodinu inkubovat při pokojové teplotě. Každých 15 min jsem mikrozkumavky protřepala. Po jedné hodině jsem do každé mikrozkumavky přidala 500 µl 20 % TCA, promíchala a dala centrifugovat při 14 000 ot. (= 22 130 g), 5 min, 21 °C. Supernatant jsem odstranila a k sedimentu jsem napipetovala 1 ml směsi ethanol-ethylacetát (1:1). Tím se odstranilo volné barvivo (DNPH). Obsah mikrozkumavek jsem zamíchala a nechala stát při laboratorní teplotě 10 min. Poté je centrifugovala při 14 000 ot. (= 22 130 g), 5 min, 21 °C. Toto promytí pomocí ethanol-ethylacetátu jsem zopakovala třikrát.

Nakonec jsem k sedimentu přidala 600 µl 6 M guanidinu. Vzorky jsem inkubovala 15 min při 37 °C. Tím došlo k rozpuštění proteinů. Mikrozkumavky jsem nechala centrifugovat při 14 000 ot. (= 22 130 g), 5 min, 21 °C. Sediment jsem odstranila a supernatant nalila do spektrofotometrické mikrokyvety. Blank jsem umístila jako referenci a absorbanci vzorků měřila při vlnové délce 365 nm. K výpočtu obsahu karbonylových skupin jsem použila molární absorpční koeficient $\varepsilon = 22\ 000\ M^{-1}.cm^{-1}$. Koncentraci jsem vypočítala podle vzorce:

$$c\ (nmol\ ml^{-1}) = A_{365}\ (vzorek\text{-}blank) \times 10^6/\varepsilon$$

Konečný výsledek je vyjádřen jako nmol karbonylu na mg proteinu.

Složení izolačního pufru pH 7,0:

Celkový objem 500 ml:

fosfátový pufr:	305 ml	0,2 M Na_2HPO_4	
	195 ml	0,2 M NaH_2PO_4	
navážky:	2 mM EDTA (chelaton III)		0,372 g
	PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid)		0,0002g
	Leupeptin		0,0002g
	Pepstatin A		0,0002g

Složení roztoku streptomycinu v HEPES:

Celkový objem 100 ml - 50 mM HEPES pH 7,2 1,192 g

- 10 % streptomycinsulfát 11,11 g

HEPES se na přesné pH roztoku upraví přidáním HCl na pH metru – možno udělat víc do zásoby.

10 mM DNPH (2,4-dinitrofenylhydrazin):

10 mM DNPH - 0,198 g do 100 ml 2 M HCl

Složení 6 M guanidinu:

Celkový objem 500 ml - 20 mM fosfát KH_2PO_4 pH 2,3 1,361 g

Titruje se pomocí koncentrované TFA (kyselina trifluoroctová).

Do 100 ml fosfátu se přidá 57,32 g guanidinu.

2.6 STANOVENÍ OBSAHU PROTEINŮ

2.6.1 Stanovení obsahu proteinů podle Bradfordové (1976)

Tato metoda [91] mi sloužila ke stanovení obsahu cytosolických proteinů. Je založena na změně absorpčního maxima barvy Coomassie Brilliant Blue G-250 po jejím navázání na protein. Tato změna se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm.

Pro každé měření jsem sestrojila novou kalibrační křivku pro koncentrace 0 až 8,70 μg/ml. Od každé koncentrace jsem udělala triplikáty. Zkumavku s koncentrací 0 jsem udělala čtyřikrát. Třikrát na měření, jednou do reference. Jako standard jsem použila hovězí sérový albumin (BSA). Činidlo s Coomassie Brilliant Blue G-250 se musí nechat stát ve tmě a pipetovat, až bude mít pokojovou teplotu.

Do zkumavek jsem postupně pipetovala činidla podle tabulky 3.

Tabulka 3: ***Kalibrační křivka na stanovení obsahu proteinů podle Bradfordové***

BSA [μl]	**H_2O** [μl]	**činidlo** [μl]	**konc.bílkovin** [μg ml^{-1}]
0	800	200	0
1	799	200	1,45
2	798	200	2,90
3	797	200	4,35
4	796	200	5,80
5	795	200	7,25
6	794	200	8,70

Zkumavky jsem poté promíchala, ale opatrně, aby jejich obsah nezačal pěnit. Po 5 minutách jsem změřila absorbanci vzorků na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm.

Stejným způsobem jsem pak měřila jednotlivé vzorky z listů tabáku. K 5 μl vzorku jsem přidala 795 μl H_2O a 200 μl činidla s Coomassie Brilliant Blue G-250. Koncentraci proteinů ve vzorkách jsem odečetla z kalibrační křivky.

2.6.2 Stanovení obsahu proteinů podle Lowryho

Metodu podle Lowryho modifikovanou Millerem (1959) [92] jsem použila také pro stanovení cytosolických proteinů. Jako zásobní roztoky jsem použila:

A: 10 % Na_2CO_3 v H_2O 50 g Na_2CO_3 + 450 ml H_2O

B: 0,5 % $CuSO_4$ x H_2O v 1 % vínanu (draselno-sodném):

1 % vínan NaK v H_2O 1 g vínanu + 99 ml H_2O

0,5 g $CuSO_4$ + 99,5 ml vínanu

Fehlingův roztok: 10 dílů A + 1 díl B (musí se dělat vždy čerstvý)

Folinovo činidlo: ředí se vodou 1 díl koncentrovaného činidla + 6 dílů H_2O (lze udělat do zásoby)

Nejdříve jsem sestrojila kalibrační křivku pro koncentrace 0 – 20 $\mu g.ml^{-1}$, která se dělá vždy při nových roztocích. Jako základní roztok jsem použila 10 mg BSA na 10 ml 0,5 M NaOH. Každou zkumavku jsem pipetovala třikrát, podle tabulky 4.

Tabulka 4: ***Kalibrační křivka na stanovení obsahu proteinů podle Lowryho***

Koncentrace proteinů [$\mu g.ml^{-1}$]	0	1	2	5	10	20
BSA [µl]	-	10 4 x řed.	10 2 x řed.	25 2 x řed.	25	50
0,5 M NaOH [ml]	0,5	0,49	0,49	0,475	0,475	0,45

2 x ředěný BSA: 1 ml koncentrovaného BSA + 1 ml 0,5 M NaOH
4 x ředěný BSA: 0,5 ml 2 x ředěného BSA + 0,5 ml 0,5 M NaOH

Do takto připravených zkumavek jsem přidala 0,5 ml Fehlingova roztoku, promíchala a nechala jsem je inkubovat 10 min při pokojové teplotě. Potom jsem přidala 1,5 ml zředěného Folinova činidla, opět promíchala a nechala inkubovat 10 min tentokrát při 50 °C. Zkumavky jsem poté nechala vychladnout a na spektrofotometru jsem měřila absorbanci při vlnové délce 750 nm.

Stejným postupem jsem měřila i vzorky. Do zkumavky jsem napipetovala 10 µl vzorku a přidala k němu 0,49 ml 0,5 M NaOH. Dále jsem postupovala jako při proměřování kalibrační křivky.

2.7 *GUS* BARVENÍ

2.7.1 *GUS* barvení metodou podle Jeffersona et al. (1987)

Pro zjištění aktivity promotoru SAG_{12} jsem pěstovala za stejných podmínek transgenní tabáky s vneseným genem *GUS* kontrolovaným promotorem SAG_{12}. *GUS* je gen pro β-glukuronidasu a na rozdíl od *IPT* je detekovatelný. Používá se jako „reportérový" gen. Jako substrát se používá X-gluc. Tento substrát po enzymatické hydrolýze poskytuje ve vodě rozpustný indoxylový intermediát, který po oxidativní dimerizaci poskytuje modrou sraženinu. Ta vzniká v místě exprese genu *GUS*, tedy tam, kde je aktivován jeho promotor a syntetizuje se aktivní glukuronidasa [93].

Ze spodních listů rostliny jsem vykrojila korkovrtem devět terčíků, z každého listu tři. Jeden terčík ze špičky listu, druhý ze středu a třetí z báze listu. Terčíky jsem vykrojila jak z transgenní rostliny, tak z její kontroly. Vložila jsem je do mikrozkumavek předem vypláchnutých ethanolem. Odvážila jsem 3,33 mg substrátu X-gluc a přilila k ní 10 ml pufru (50 mM fosfátový pufr pH 7,2 + 0,01 % Triton). Přes filtr jsem do mikrozkumavek přefiltrovala 1,5 ml pufru se substrátem. Mikrozkumavky s listovými terčíky jsem dala do exikátoru a infiltrovala je pod sníženým tlakem do té doby, než se začaly dělat bublinky, cca 5 min. Poté jsem mikrozkumavky dala inkubovat na 72 hodin, při 37 °C, za neustálého třepání. Když terčíky zmodraly, mikrozkumavky jsem vyndala, odsála substrát Pasteurovou pipetou a nalila místo ní aceton. Ten jsem vyměňovala do té doby, než se z terčíku vymyl chlorofyl. Terčíky jsem uchovávala v ethanolu.

2.8 SDS-ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ

2.8.1 Izolace rozpustných proteinů pro elektoforézu

Z mrazícího boxu jsem odebrala vzorky kontrolních i transgenních tabákových listů č. 2, 6, 10, které byly skladovány při -70 °C. Aby nedošlo k rozmrazení vzorků, uchovávala jsem je v tekutém dusíku. Odvážila jsem z každého listu cca 0,8 g, zkřehlý vzorek jsem rozdrtila a nasypala do skleněného homogenizátoru. Přidala jsem k němu 2 ml izolačního pufru s DTT pH 7,0 a provedla homogenizaci. Vzniklý homogenát jsem přefiltrovala přes 8 vrstev gázy do plastové kyvety a dala jej centrifugovat na centrifugu Biofuge 28 RS při 11 800 ot. (= 15 000 g), 25 min, 4 °C. Z kyvety jsem opatrně odebrala supernatant, abych nezvířila sediment. Do 3 mikrozmumavek jsem napipetovala 300 µl supernatantu a přidala k němu 300 µl kys. trichloroctové (TCA). Mikrozkumavky jsem potom dala centrifugovat na centrifugu Universal 16 R při 14 000 ot. (= 22 130 g), 15 min, 4 °C. Supernatant jsem odstranila a ke sraženině přidala 300 µl HCl. Mikrozkumavky jsem nechala inkubovat hodinu při laboratorní teplotě, pak jsem je dala centrifugovat při 14 000 ot. (= 22 130 g), 5 min, 21 °C. Supernatant jsem opatrně slila a sraženinu nechala 45 min inkubovat při 50 °C ve 200 µl 12 % SDS. Mikrozkumavky jsem poté nechala vychladnout a jejich obsah zneutralizovala přidáním 66,6 µl 2 M Tris/30 % glycerol (w/v). Vzorky jsem zamrazila v tekutém dusíku a uchovávala je v mrazáku při - 20 °C. Jejich absorbanci jsem měřila na spektrofotometru při 280 nm.

2.8.2 Příprava gelů

Použila jsem diskontinuální elektroforézu. Je to metoda pro zvýšení citlivosti (rozlišení) u elektroforézy. Transportní gel je rozdělen na více částí s různým pH. Výsledkem je vytvoření ostřejších proužkových obrazců.

Použila jsem vertikální elektroforetickou komůrku SE 260 HOEFER. Velikost gelu byla 10 x 8 x 0,15 cm. Složení gelů je popsáno pomocí písmen T a C podle Hjertena. T (total) značí celkovou koncentraci obou monomerů, tj. AA (akrylamid) a Bis (N,N´-methylen-bis-akrylamid). C (crosslinker) udává relativní koncentraci látky, která zprostředkuje zesíťování., tedy Bis.

Připravila jsem si 25 ml separačního gelu (10 % T, 2,6 % C) podle tabulky 5, str. 41.

Tabulka 5: ***Složení separačního gelu pro diskontinuální SDS-ELFO***

AA + Bis	30,8 % T; 2,6 % C	8,3 ml
Gelový pufr (10 %)	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,6 ml
10 % SDS		250 µl
H_2O		10 ml
10 % (w/v) APS	(persíran amonný) – čerstvý	125 µl
TEMED	(N,N,N′,N′-tetramethylethylendiamin)	8,3 µl

AA = akrylamid, Bis = (N,N′-methylen-bis-akrylamid)

Po 5 minutách jsem gel převrstvila vodou pomocí kapátka, zakryla parafilmem a nechala přes noc polymerovat v lednici. Ze ztuhlého separačního gelu jsem slila vodu, osušila ho pomocí filtračního papíru a převrstvila zaostřovacím gelem, do kterého jsem vnořila hřeben s 10 zuby. 10 ml zaostřovacího gelu jsem připravila podle tabulky 6.

Tabulka 6: ***Složení zaostřovacího gelu pro diskontinuální SDS-ELFO***

AA + Bis	30,8 = T; 2,6 % C	1,33 ml
Gelový pufr (4 %)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS		100 µl
H_2O		6 ml
10 % (w/v) APS	(persíran amonný) – čerstvý	50 µl
TEMED	(N,N,N′,N′-tetramethylethylendiamin)	5 µl

Zaostřovací gel jsem nechala polymerovat 45 minut při laboratorní teplotě. Poté jsem uvolnila skla s gelem uprostřed a ze zaostřovacího gelu jsem vyndala hřeben. Skla jsem upevnila do elektroforetické komůrky a o druhé poloviny jsem proti nim umístila samotné sklo. Za gel i sklo jsem nalila 150 ml katodového pufru [1 M Tris-HCl, 1 M Tricine, 1 % SDS (w/v); pufr je 10krát koncentrovaný a před použitím se ředí, tzn. 15 ml pufru + 135 ml H_2O].

Mikrostříkačkou jsem nanesla do jednotlivých jamek v gelu vzorky a standardy o známe molekulové hmotnosti. Nanášela jsem 50 µl vzorku a 10 µl standardu. Do komůrky jsem poté nalila 300 ml anodového pufru [2 M Tris-HCl, pH 8,9; pufr se taky 10 krát ředí, tzn. 30 ml pufru + 270 ml H_2O]. Po uzavření komůrky jsem aparaturu

přemístila do lednice, aby nedošlo k přehřátí gelu a zapojila ji do zdroje. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí a měla dvě fáze. Napětí bylo prvních 30 minut 80 V, aby se vzorky zaostřily do separačního gelu. Poté jsem hodnotu zvýšila na 150 V a tyto podmínky jsem ponechala až do konce elektroforézy, tj. asi hodinu, dokud čelo se standardy nedoputovalo na konec gelu.

Potom jsem gel uvolnila ze skel a vložila ho do Petriho misky s fixačním roztokem [50 % methanol, 10 % kyselina octová (v/v)]. Po jedné hodině jsem dala gel přes noc do barvící lázně [60 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 ve 100 ml 10 % kyselině octové]. Přebytečnou barvu jsem vymyla v 10 % kyselině octové, kterou jsem často vyměňovala. V 10 % kyselině octové jsem obarvené gely i skladovala a to v lednici při 4 °C.

2.9 IMUNOCHEMICKÉ BARVENÍ OXIDOVANÝCH PROTEINŮ

2.9.1 Izolace vzorků

Vzorky jsem izolovala stejně, jako v kapitole 2.8.1. Po odstranění supernatantu jsem však ke sraženině přidala do tří mikrozkumavek místo HCl 300 µl DNPH. Jednu mikrozkumavku od každého vzorku vedla jako blank.

2.9.2 SDS-elektroforéza

Proteiny jsem po inkubaci s DNPH rozdělila na elektroforéze. Před nanesením na gel jsem vzorky ještě smíchala v poměru 1:1 se solubilizačním pufrem, jejíž složení uvádí tabulka 7. Vzorky jsem 1 minutu povařila ve vodě a nechala je vychladnout.

Tabulka 7: ***Složení solubilizačního pufru***

Gelový pufr pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	4 ml
Glycerol	2,5 g
Bromfenolová modř	2 mg
DTT	0,31 g

Doplnit do 10 ml destilovanou vodou.

Při přípravě gelů a SDS-elektroforézy jsem postupovala stejně jako v kapitole 2.8.2. Výše popsaným postupem jsem si připravila k dalším pokusům dva gely. Do jednoho jsem mikrostříkačkou nanášela 80 μg vzorků bez obsahu DNPH. Tento gel jsem po skončení elektroforézy vložila do vaničky s fixačním roztokem a po hodině jsem ho nechala přes noc barvit v Coomassie Brilliant Blue G-250. Do druhého gelu jsem nanášela 80 μg vzorků s DNPH. Tento gel jsem po skončení elektroforézy opláchla v destilované vodě a použila na metodu tzv. přenosu (Western Blot).

2.9.3 Metoda tzv. přenosu (z angl. „blotting") proteinů z gelu na membránu - Western blot

Pro přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu jsem používala přístroj OMNI-BIO pro polosuchý přenos. Výhodou tohoto postupu je rychlost a snadnost přenosu ve srovnání s klasickým zařízením pro přenos mokrou cestou. Rovněž se minimalizuje množství použitého pufru. Grafitové elektrody blotovací komůrky jsem už od rána polévala destilovanou vodou, aby byly dobře nasáknuté. Na katodu jsem postupně skládala tři vrstvy speciálního filtračního papíru smočeného katodovým pufrem. Dávala jsem pozor, aby mezi jednotlivými vrstvami filtračního papíru nebyly vzduchové bubliny. Dále jsem přiložila gel, který obsahoval rozdělené vzorky s DNPH, ne něj nitrocelulózovou membránu (*Serva*, Německo, velikost pórů 0,45 μm). Tu jsem předtím navlhčila destilovanou vodou. Membránu jsem překryla jednou vrstvou filtračního papíru navlhčeného anodovým pufrem č. 1. Na něj jsem přiložila další dvě vrstvy filtračního papíru navlhčených anodovým pufrem č. 2. Opět jsem dbala na to, aby mezi jednotlivými vrstvami nebyly vzduchové bubliny. Komůrku jsem uzavřela deskou s anodou, pro zlepšení kontaktu jednotlivých vrstev jsem ji zatížila a zapojila do zdroje. Přenos probíhal dvě hodiny při stálém proudu o hodnotě 0,8 mA/cm^2 membrány. Po skončení přenosu proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu, jsem blotovací komůrku odpojila od zdroje. Gel jsem dala barvit do barvící lázně obsahující 60 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 a 100 ml 10 % kyseliny octové. Gel jsem v této lázni nechala přes noc. Potom jsem jej odbarvila jako v kap. 2.7.1. Membránu jsem dala do vaničky s blokovacím pufrem (0,3 ml/cm^2 membrány) a nechala ji stát do druhého dne v lednici při 4 °C. Blokovací pufr zablokuje volná vazebná místa na membráně.

Složení katodového pufru:

Celkový objem 100 ml:

25 mM Tris-HCl	0,3 g
40 mM kyselina 6-aminokapronová	0,5 g
methanol	20 ml

Složení anodového pufru č. 1:

Celkový objem 100 ml:

0,3 M Tris-HCl	3,6 g
methanol	20 ml

Složení anodového pufru č. 2:

Celkový objem 100 ml:

25 mM Tris-HCl	0,3 g
methanol	20 ml

Složení PBS-T pufru pH 7,4:

Celkový objem 500 ml:

fosfátový pufr:	210 ml	0,2 M Na_2HPO_4
	40 ml	0,2 M NaH_2PO_4
navážky:	Tween-20	0,25 g

Složení blokovacího pufru:

Do 250 ml PBS-T pufru se přidá 2,5 g BSA.

2.9.4 Inkubace proteinů s protilátkou

Pro imunochemickou detekci proteinů obsahujících karbonylové skupiny jsem použila soupravu OxyBlot™ S7150 (*Chemicon international,* USA, Kanada) s primární králičí protilátkou proti DNPH a sekundární kozí protilátkou proti této králičí protilátce.

Membránu jsem vyndala z blokovacího pufru. První protilátku jsem smíchala s blokovacím pufrem v poměru 1:150. Na membránu 10 x 10 cm se potřebuje 15 ml této směsi. Membránu jsem nechala inkubovat v této směsi 1 hodinu na třepačce. Poté jsem ji dvakrát opláchla pufrem PBS-T a 15 minut jsem ji v tomto pufru inkubovala na třepačce. Membránu jsem pak promývala 2 x 5 minut opět pufrem PBS-T. Naředila jsem druhou protilátku s blokovacím pufrem v poměru 1:300. Na membránu 10 x 10 cm se potřebuje 15 ml této směsi. Inkubace s touto druhou protilátkou trvala 1 hodinu za neustálého třepání. Opět jsem membránu promyla pufrem PBS-T stejně jako po inkubaci s první protilátkou. Všechny úkony jsem prováděla při laboratorní teplotě. Namíchala jsem chemiluminiscenční činidlo a kápla 1-2 ml do Petriho misky. Potom jsem do této misky položila osušenou membránu tak, aby strana s proteiny byla v kontaktu s chemiluminiscenčním činidlem. V temné komoře jsem po jedné minutě membránu vytáhla, nechala z ní odkapat zbytky činidla a takto ošetřenou membránu jsem zabalila do potravinářské fólie. Dávala jsem pozor, aby při zabalení nevznikly vzduchové bubliny. Membránu jsem přiložila na RTG film, zatížila ji a zakryla černou látkou. Film jsem nechala exponovat 5 minut. Poté jsem film umístila do vývojky na tak dlouhou dobu, dokud se na filmu nezačaly objevovat dobře viditelné proužky (cca 2 minuty). Film jsem vyjmula, opláchla jej destilovanou vodou a nakonec vložila na 2 minuty do ustalovače. Takto vyvolaný film jsem pak důkladně opláchla pod proudem tekoucí vody a nechala ho zavěšený oschnout na vzduchu. Membránu jsem osušila a uložila ji do lednice při 4 °C. Takto ošetřená membrána se může používat opakovaně.

Všechny elektroforetické separace jsem opakovala třikrát. Pro dokumentaci rozdělení rozpustných bílkovin a oxidovaných proteinů jsem gely i film skenovala na prosvěcovacím skeneru při rozlišení 300 dpi.

2.10 STATISTICKÉ HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Experimentální data jsem zpracovala v programu EXCEL. Statistické hodnocení jsem provedla v programu NCSS 6.0 Jr pomocí analýzy variace (ANOVA) a Scheffého testu. Statistickou průkaznost jsem testovala na pětiprocentní hladině pravděpodobnosti ($p< 0,05$).

3. VÝSLEDKY

3.1 ROZDÍLY MEZI KONTROLNÍ A TRANSGENNÍ ROSTLINOU *NICOTIANA TABACUM* L.

Kontrolní i transgenní rostliny (obsahující konstrukt P_{SAG12}-*IPT*) jsem pěstovala za stejných podmínek ve skleníku po dobu 12 týdnů. Růst a vývin obou typů rostlin byl nejprve shodný. Po 12 týdnech byly kontrolní i transgenní rostliny stejně veliké, měly stejný počet listů, ale lišily se jejich barvou. Spodní (nejstarší) listy kontrolních rostlin začaly v tomto stáří žloutnout, tzn. začaly být senescentní. Jejich horní listy však byly ještě zelené. Transgenní rostliny měly všechny listy zelené (obr. 12).

Obr. 12: ***Srovnání kontrolní a transgenní rostliny Nicotiana tabacum L.***
Kontrolni rostlina je umístěna vpravo.
Transgenní rostlina s vneseným konstruktem P_{SAG12}-*IPT* je umístěna vlevo.

3.2 VLIV STÁRNUTÍ NA OBSAH VYBRANÝCH FOTOSYNTETICKÝCH PIGMENTŮ V LISTECH TABÁKU

Během přirozeného stárnutí dochází u tabáku k postupnému žloutnutí a svrašťování listů. Tento jev lze pozorovat u spodních listů kontrolních rostlin. Tento viditelný projev senescence je způsoben úbytkem obsahu chlorofylu.

Změny obsahu chlorofylů *a+b* v listech tabáku různého stáří popisuje obrázek 13, str. 49. U kontrolních i transgenních rostlin je jasně vidět pokles chlorofylů od nejmladších listů (listy č. 11) k nejstarším (listy č. 1). Nejvíce chlorofylů *a+b* obsahovaly nejmladší listy kontrolních rostlin. Nejméně jich obsahovaly nejstarší listy kontrolních rostlin. U transgenních rostlin byl pokles obou chlorofylů pozvolný, u kontrolních rostlin byl pokles prudší.

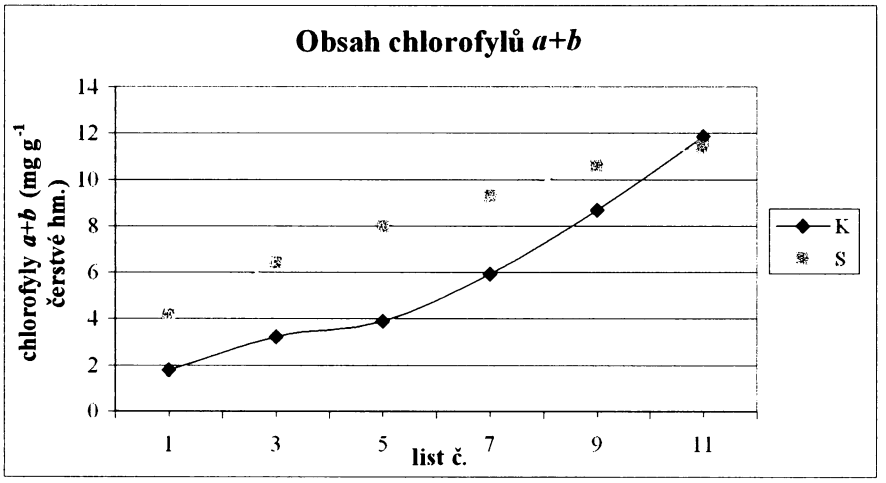
V případě poměrů chlorofylů *a/b* došlo u obou typů rostlin tabáku k jejich poklesu v závislosti na stáří. U kontrolních rostlin byl tento poměr vyšší než u transgenních rostlin, pouze u nejstarších listů (listy č. 1) mírně klesla jeho hodnota pod hodnotu nalezenou v transgenních rostlinách. U transgenních rostlin klesal poměr chlorofylů *a/b* mnohem pozvolněji oproti kontrolním rostlinám (obr. 14, str. 49).

Odlišnosti mezi jednotlivými typy tabáků jsem zaznamenala u obsahu pigmentů xantofylového cyklu, tedy v součtu obsahů koncentrací violaxantinu, anteraxantinu a zeaxantinu. Celkový obsah pigmentů xantofylového cyklu u obou typů rostlin v závislosti na stáří zobrazuje obrázek 15, str. 50. Koncentrace těchto pigmentů byla vyšší v transgenních rostlinách a to ve všech jejich listech. V nejmladších listech transgenních rostlin bylo dvakrát více pigmentů xantofylového cyklu než v nejmladších listech kontrolních rostlin. U kontrolních rostlin byl úbytek pigmentů v závislosti na stáří listů nejprve pozvolný, u listu č. 7 došlo k většímu poklesu pigmentů a od listu č. 5 se již jejich obsah nijak výrazně neměnil. U transgenních rostlin došlo nejprve k prudkému poklesu obsahu xantofylů, ale od listu č. 7 již byl tento pokles mírnější.

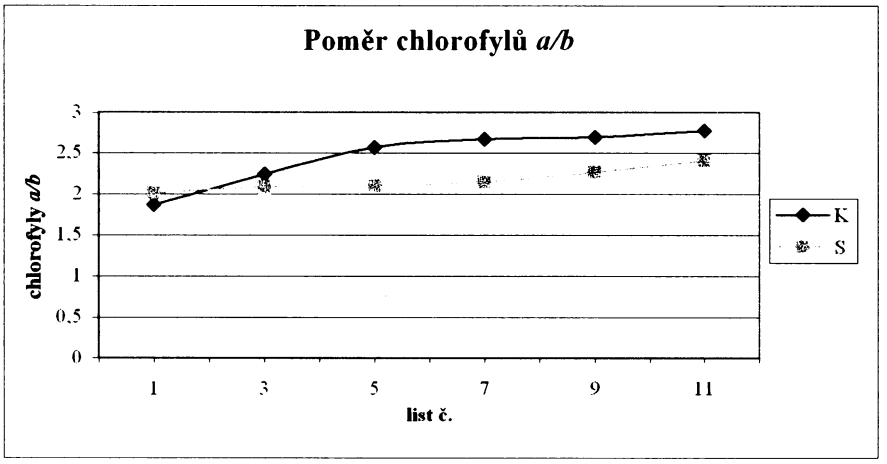
Postupnou přeměnou violaxantinu na zeaxantin, za účasti enzymu violaxantindeepoxidasy, se rostlina brání účinkům nadměrné ozářenosti. Rozsah této přeměny se vyjadřuje jako míra (stupeň) deepoxidace (DEPS). Změny ve stupni deepoxidace závislé na stárnutí jsou shrnuty v obrázku 16, str. 50. U nejmladších listů kontrolních rostlin (listy č. 11) byl stupeň deepoxidace čtyřikrát menší, než tomu bylo u nejmladších listů transgenních rostlin. Poté došlo ke zvýšení míry deepoxidace. Nejvyšších

hodnot dosahovala u listů č. 3, pak nastal její pokles. Stupeň deepoxidace byl v nejstarších listech (listy č.1) kontrolních rostlin třikrát menší než v nejstarších listech transgenních rostlin. U transgenních rostlin měla křivka vyjadřující míru deepoxidace jiný průběh. Míra deepoxidace se nejprve snižovala. Nejmenší hodnoty dosáhla u listu č. 7. Potom došlo k jejímu nárustu.

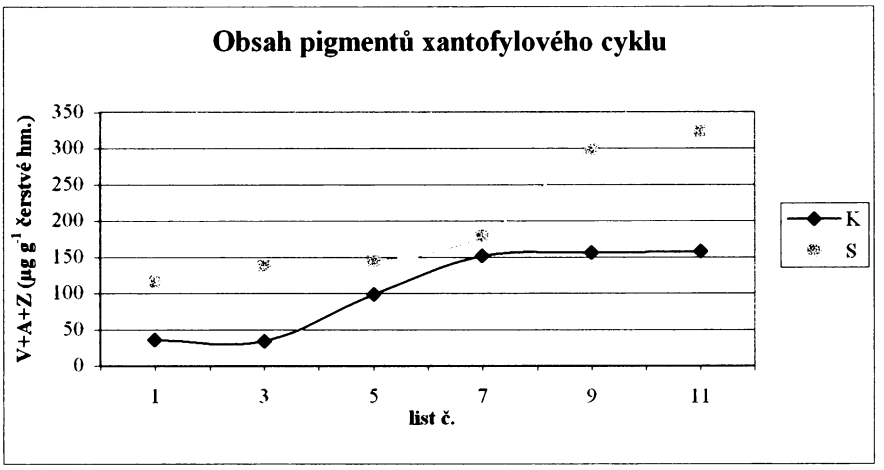
Obrázek 17, str. 51 zobrazuje vývoj obsahu β-karotenu během stárnutí. Křivky vyjadřující úbytek β-karotenu během stárnutí měly u obou typů rostlin obdobný průběh. Nejmladší listy obou typů rostlin (listy č. 11) obsahovaly nejvíce β-karotenu. Od listu č. 5 byl jeho úbytek pozvolný a od listů č. 3 došlo opět k jeho zvýšení. Nejméně β-karotenu obsahovaly nejstarší listy (listy č. 1) obou typů rostlin. Transgenní rostliny obsahovaly ve všech svých listech více β-karotenu než měly odpovídající listy kontrolních rostlin.



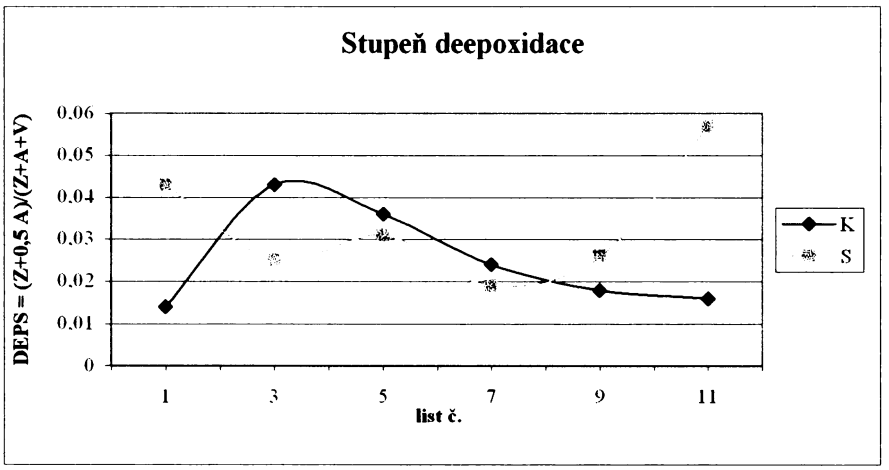
Obr. 13: ***Obsah chlorofylů a+b během stárnutí listů tabáku.***
K = kontrolní rostliny, S = transgenní rostliny
Listy jsou číslovány odspoda rostlin (nejstarší list - list č.1, nejmladší list - list č.11)



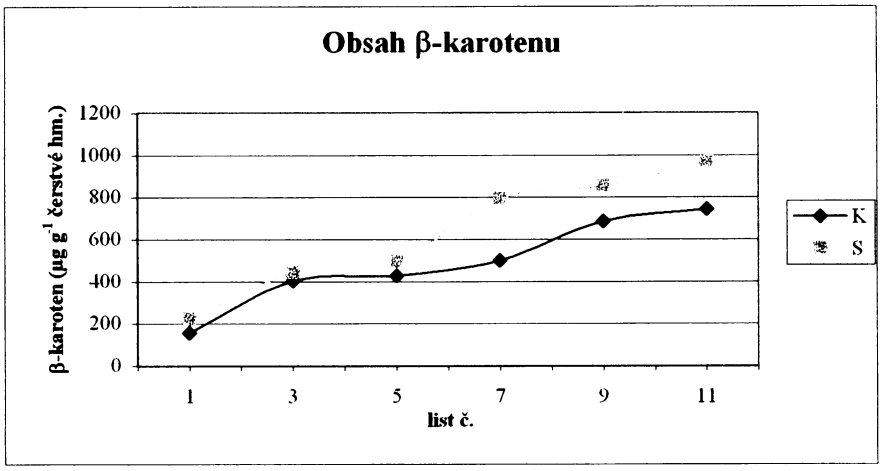
Obr. 14: ***Poměr chlorofylů a/b během stárnutí listů tabáku.***
K = kontrolní rostliny, S = transgenní rostliny
Listy jsou číslovány odspoda rostlin (nejstarší list - list č.1, nejmladší list - list č.11)



Obr. 15: ***Obsah pigmentů xantofylového cyklu během stárnutí listů tabáku.***
K = kontrolní rostliny, S = transgenní rostliny
Listy jsou číslovány odspoda rostlin (nejstarší list - list č.1, nejmladší list - list č.11)



Obr. 16: ***Stupeň deepoxidace (DEPS) během stárnutí listů tabáku.***
K = kontrolní rostliny, S = transgenní rostliny
Listy jsou číslovány odspoda rostlin (nejstarší list - list č.1, nejmladší list - list č.11)



Obr. 17: ***Obsah β-karotenu během stárnutí listů tabáku.***
K = kontrolní rostliny, S = transgenní rostliny
Listy jsou číslovány odspoda rostlin (nejstarší list - list č.1, nejmladší list - list č.11)

3.3 ZMĚNY V AKTIVACI PROMOTORU SAG_{12} DETEKCÍ AKTIVITY GLUKURONIDASY (*GUS* BARVENÍ) METODOU PODLE JEFFERSONA et al. (1987)

K tomuto pokusu jsem použila jednu kontrolní a jednu transgenní rostlinu tabáku s vneseným genem *GUS* pod kontrolou promotoru SAG_{12}. Po dvanácti týdnech pěstování jsem u těchto transgenních tabáků pozorovala žloutnutí nejstarších listů, podobně jako v kontrolách. Oba typy rostlin měly shodně 8 listů. Z rostlin jsem však použila jen jejich čtyři nejstarší listy, tj. listy č.1, 2, 3 a 4. Z každého listu jsem vykrojila korkovrtem tři terčíky. Jeden ze špičky, druhý ze středu a třetí z báze listu. Pokus jsem opakovala dvakrát se stejným výsledkem.

Na obr. 18, str. 52 jsou jasně vidět rozdíly v barvě listových terčíků. Terčíky z kontrolní rostliny jsou bílé, terčíky z transgenní rostliny jsou modré. Tuto modrou barvu způsobuje oxidativní dimerizaci vzniklý indoxylový intermediát, který se tvoří enzymatickou hydrolýzou substrátu X-gluc. Na terčících jak z kontrolní tak transgenní rostliny se místy vyskytuje i zelená barva, což je nevymytý chlorofyl. Při delším promývání v acetonu by se pravděpodobně i tato zelená barva vymyla a zbyly by jen čistě bílé terčíky u kontrolních a čistě modré terčíky u transgenních rostlin.

Obr. 18: ***Změny v aktivaci promotoru SAG_{12} pomocí GUS barvení.***
V horní řadě jsou terčíky z kontrolní rostliny. Ve spodní řadě jsou terčíky z transgenní rostliny s vneseným genem *GUS*.
V levých Petriho miskách jsou terčíky z listů č.1. V prostředních Petriho miskách jsou terčíky z listů č.2 a v pravých Petriho miskách jsou terčíky z listů č.3.
První terčík zleva v jakékoliv misce je ze špičky, druhý z střední části a třetí z báze listů.

Porovnávala jsem terčíky z různých částí listové čepele. Je vidět, že promotor genu SAG_{12}, který řídí expresi glukuronidasy v tomto pokusu nebo genu IPT je exprimován i v listech, které ještě nejsou zcela senescentní (žluté).U terčíku z transgenních rostlin je dále vidět, že terčíky vykrojené z báze listů (v Petriho miskách vpravo) jsou více modře zbarvené než terčíky ze špičky a středu listů. U mladších listů (list č. 4 a výše) zabarvení nebylo pozorováno (výsledky nejsou ukázány).

3.4 VLIV STÁRNUTÍ NA OBSAH PROTEINŮ V LISTECH TABÁKU

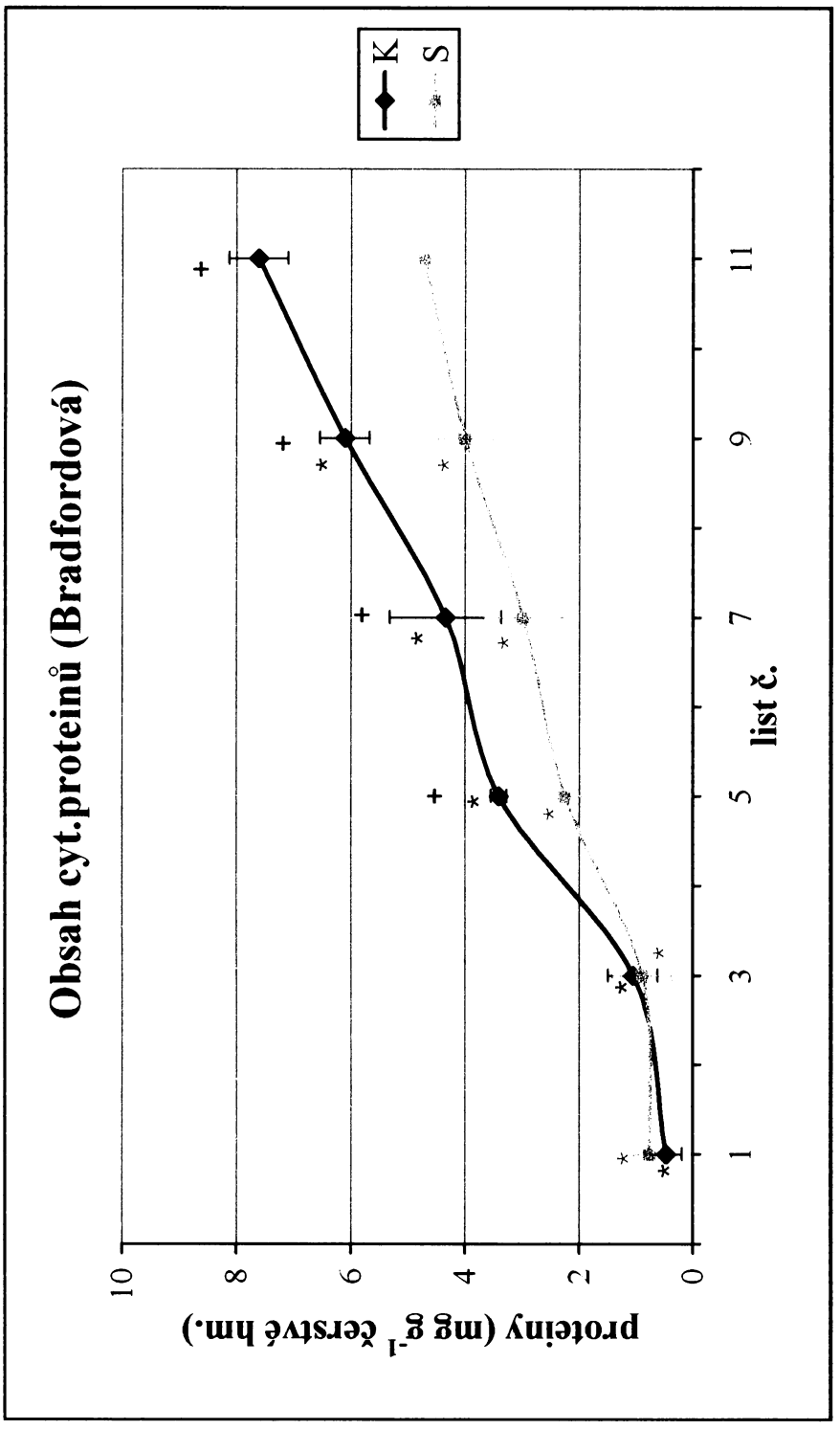
3.4.1 Změny v obsahu cytosolických proteinů měřené spektrofotometricky

V cytosolické buněčné frakci jsem zjišťovala, jakým způsobem dochází během senescence listů tabáku ke změnám v obsahu proteinů. Obsah cytosolických proteinů jsem měřila třemi odlišnými metodami. Metodou podle Bradfordové (A_{595}), metodou podle Lowryho (A_{750}) a metodou měření absorbance při 280 nm. U všech metod jsem došla k podobným výsledkům. Jen výsledky měření absorbance při 280 nm poskytovaly nižší hodnoty. K pokusům jsem používala čtyři kontrolní a čtyři transgenní rostliny tabáku. Odebrala jsem z každé rostliny vždy liché listy. Nejstarším listům jsem přiřadila č.1. Výsledky měření jsem poté zprůměrovala.

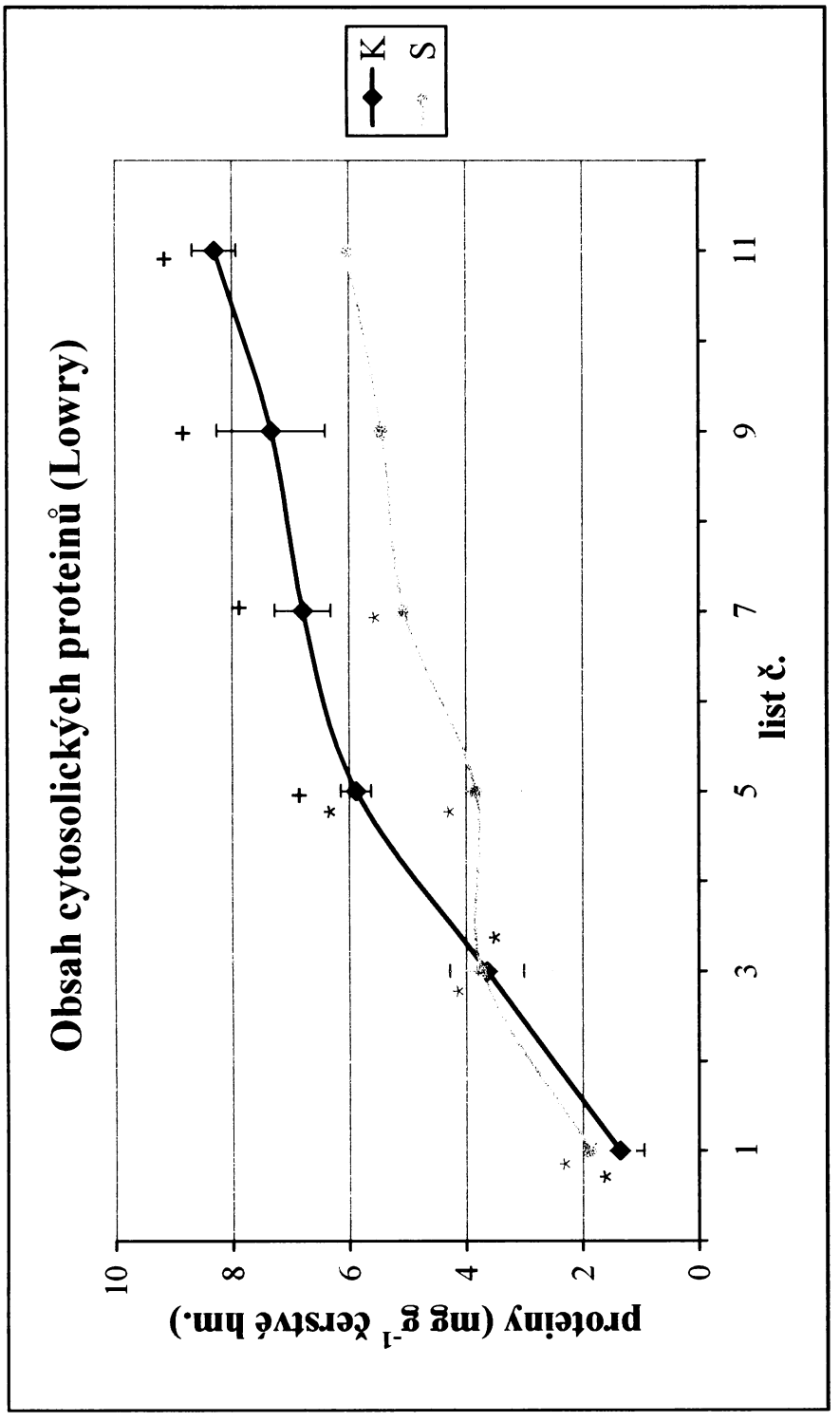
Křivky na obr. 19, str. 54 ilustrují úbytek cytosolických proteinů během přirozené senescence, měřený metodou podle Bradfordové. Změny koncentrace proteinů v kontrolních rostlinách znázorňuje modrá křivka, v transgenních rostlinách červená křivka. U nejstarších listů (listy č.1) byla nejnižší, u nejmladších listů (listy č. 11) byla nejvyšší koncentrace cytosolických proteinů. Nejstarší listy transgenních rostlin obsahovaly více cytosolických proteinů než nejstarší listy kontrolních rostlin. Od třetího listu se poměr proteinů v kontrolních a transgenních rostlinách změnil, listy kontrolních rostlin obsahovaly více proteinů než listy transgenních rostlin, tato změna však nebyla statisticky významná.

Křivky na obr. 20, str. 55 znázorňují úbytek cytosolických proteinů během přirozené senescence, měřený metodou podle Lowryho. Změny koncentrace proteinů v kontrolních rostlinách znázorňuje modrá křivka, v transgenních červená křivka. I v tomto pokusu obsahovaly měly listy transgenních rostlin vyšší koncentraci cytosolických proteinů než listy kontrolních rostlin. A stejně tak jako u metody měření podle Bradfordové se poměr proteinů v kontrolních a transgenních rostlinách změnil. Listy kontrolních rostlin obsahovaly více proteinů než listy transgenních rostlin.

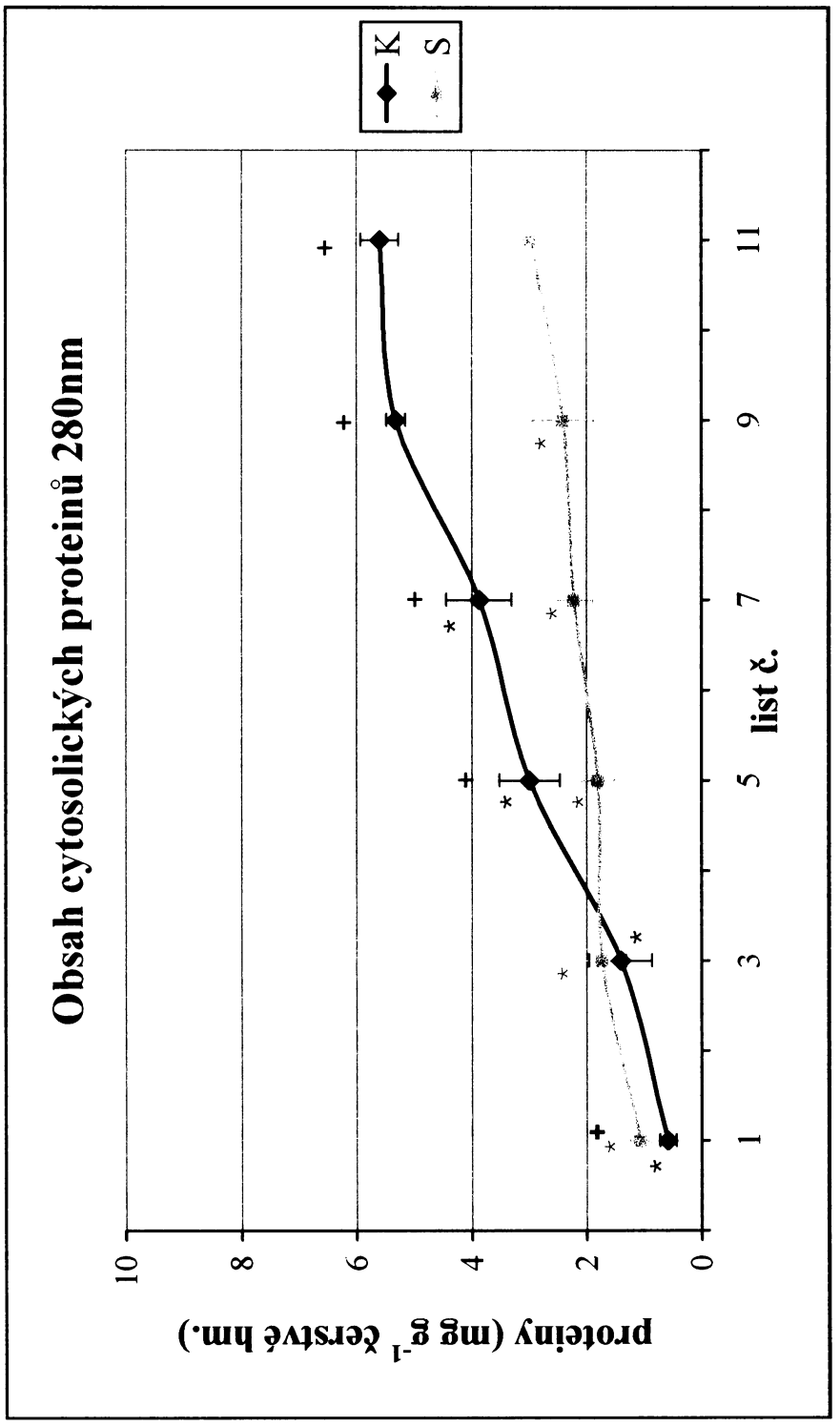
Křivky na obr. 21, str. 56 znázorňují úbytek cytosolických proteinů během přirozené senescence, zjištěný metodou měření absorbance při 280 nm. Také při tomto pokusu jsem zjistila, že koncentrace cytosolických proteinů v nejstarších listech byla vyšší u transgenních rostlin, kdežto jejich koncentrace v nejmladších listech byla vyšší u kontrolních rostlin.



Obr. 19: ***Obsah cytosolických proteinů během stárnutí listů tabáku vyjádřený v mg g^{-1} čerstvé hmotnosti, zjištěný metodou podle Bradfordové.***
Zobrazené hodnoty jsou průměrem ze čtyř měření +/- střední chyba, listy jsou číslovány odspoda rostlin (nejstarší list - list č. 1, nejmladší list - list č.11).
K = kontrolní rostliny, S = transgenní rostliny (rostliny tabáku s vloženým konstruktem P_{SAG12}-*IPT*)
Hvězdička označuje statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) od odpovídajícího mladého listu.
Křížek označuje statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi kontrolní a transgenní rostlinou.



Obr. 20: ***Obsah cytosolických proteinů během stárnutí listů tabáku vyjádřený v mg g^{-1} čerstvé hmotnosti, zjištěný metodou podle Lowryho.***
Zobrazené hodnoty jsou průměrem ze čtyř měření +/- střední chyba, listy jsou číslovány odspoda rostlin (nejstarší list - list č. 1, nejmladší list - list č.11).
K = kontrolní rostliny, S = transgenní rostliny (rostliny tabáku s vloženým konstruktem P_{SAG12}-*IPT*)
Hvězdička označuje statisticky významné rozdíly ($p< 0,05$) od odpovídajícího mladého listu.
Křížek označuje statisticky významné rozdíly ($p< 0,05$) mezi kontrolní a transgenní rostlinou.



Obr. 21: ***Obsah cytosolických proteinů během stárnutí listů tabáku vyjádřený v mg g^{-1} čerstvé hmotnosti, zjištěný metodou měření absorbance při 280 nm.***
Zobrazené hodnoty jsou průměrem ze čtyř měření +/- střední chyba, listy jsou číslovány odspoda rostlin (nejstarší list - list č. 1, nejmladší list - list č.11).
K = kontrolní rostliny, S = transgenní rostliny (rostliny tabáku s vloženým konstruktem P_{SAG12}-*IPT*)
Hvězdička označuje statisticky významné rozdíly ($p< 0,05$) od odpovídajícího mladého listu.
Křížek označuje statisticky významné rozdíly ($p< 0,05$) mezi kontrolní a transgenní rostlinou.

3.4.2 Změny v obsahu a rozdělění cytosolických proteinů zjištěné SDS-elektroforézou

Pro přesnější určení změn v zastoupení jednotlivých cytosolických proteinů v kontrolních a transgenních rostlinách během stárnutí listů jsem provedla elektroforézu na 10 % SDS-polyakrylamidovém gelu. K pokusům jsem použila listy č. 2, 6 a 10 z jedné kontrolní a jedné transgenní rostliny tabáku. Doba pěstování rostlin byla 12 týdnů. Cytosolické proteiny jsem izolovala postupem uvedeným v kapitole 2.8.1.

Obr. 22: ***Elektroforetické rozdělení cytosolických proteinů z kontrolní a transgenní rostliny.***
Proteiny byly rozdělené na 10 % SDS-polyakrylamidovém gelu a obarvené v Coomassie Brilliant Blue G-250. Šipky označují molekulové hmotnostní standardy a jejich velikost v kDa.
Žlutou šipkou v gelu je znázorněný protein o velikosti 66 kDa, jehož obsah během stárnutí vzrůstá. Červené šipky v gelu označují proteiny, jejichž obsah se stárnutím klesá.
Nanášeny byly stejné objemy vzorků (50 µl), které odpovídaly 25 mg čerstvé hmotnosti jednotlivých listů.

Obrázek 22 ukazuje rozdělení cytosolických proteinů kontrolní a transgenní rostliny na 10 % SDS-polyakrylamidovém gelu. Do první jamky jsem nanesla 10 µl směsi markerů. Poté jsem nanášela vzorky jednotlivých listů kontrolní a transgenní rostliny. Od každého vzorku jsem do jamky napipetovala vždy 50 µl. To odpovídá stejnému množství čerstvé hmotnosti. Z obrázku 22 je patrné, že nejvíce proteinů obsahují nejmladší listy (listy č. 10) a nejméně proteinů je v nejstarších listech (listy č. 2). V mladých listech

je nejvíce zastoupený protein o velikosti 63 kDa. Zajímavý je protein o velikosti 66 kDa, jehož obsah se se senescencí zvyšuje. Na obr. 22, str. 57 je znázorněný žlutou šipkou. Ostatní proteiny ubývají s věkem listu.

3.5 VLIV STÁRNUTÍ NA OBSAH OXIDAČNĚ POŠKOZENÝCH PROTEINŮ V LISTECH TABÁKU

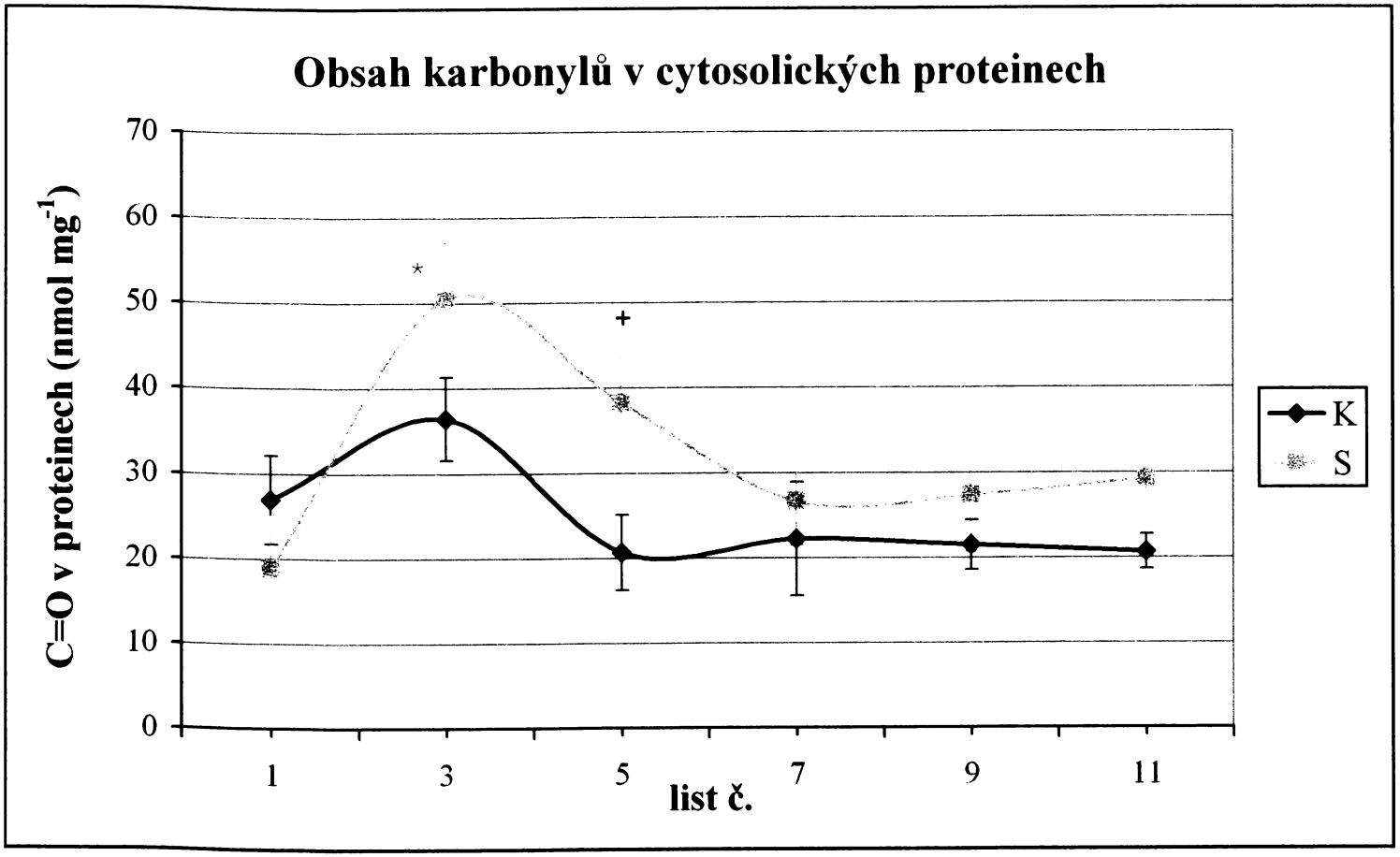
3.5.1 Změny v oxidačním poškození cytosolických proteinů měřené spektrofotometricky

V buněčné cytosolické frakci jsem zjišťovala, zda během senescence listů tabáku dochází ke změnám v oxidačním poškození proteinů. Oxidační poškození proteinů jsem měřila spektrofotometricky jako obsah karbonylů, vyjádřený jako nmol karbonylů na mg proteinů.

Ke stanovení obsahu cytosolických proteinů jsem použila metodu měření při 280 nm na spektrofotometru Hitachi U-3300. Cytosolické proteiny jsem izolovala postupem uvedeným v kapitole 2.8.2. Pokusy jsem prováděla vždy ze čtyřmi kontrolními a čtyřmi transgenními rostlinami. Odebírala jsem jen liché listy, tj. list č. 1, 3, 5, 7, 9 a 11.

Na obr. 24, str. 59 jsou znázorněné křivky, které odpovídají průměrným hodnotám jednotlivých měření. Změny koncentrace oxidačně poškozených proteinů v transgenních rostlinách znázorňuje červená křivka. Změny koncentrace oxidačně poškozených proteinů v kontrolních rostlinách znázorňuje modrá křivka. Obě křivky mají podobný průběh.

V nejmladších listech kontrolních rostlin bylo méně karbonylových skupin než v jejich nejstarších listech. U transgenních rostlin tomu bylo naopak, jejich nejmladší listy obsahovaly více karbonylových skupin než jejich nejstarší listy. Potom došlo u obou typů rostlin k nárůstu karbonylových skupin. Nejvíce karbonylových skupin bylo u transgenních i kontrolních rostlin v listech č.3, pak jejich počet klesal. V nejstarších listech (listy č.1) bylo u transgenních rostlin nejméně oxidovaných proteinů. Nejstarší listy kontrolních rostlin obsahovaly těchto proteinů cca 1,5x více.



Obr. 24: ***Obsah karbonylů v cytosolických proteinech během stárnutí listů tabáku v nmol C=O mg^{-1} proteinu.***

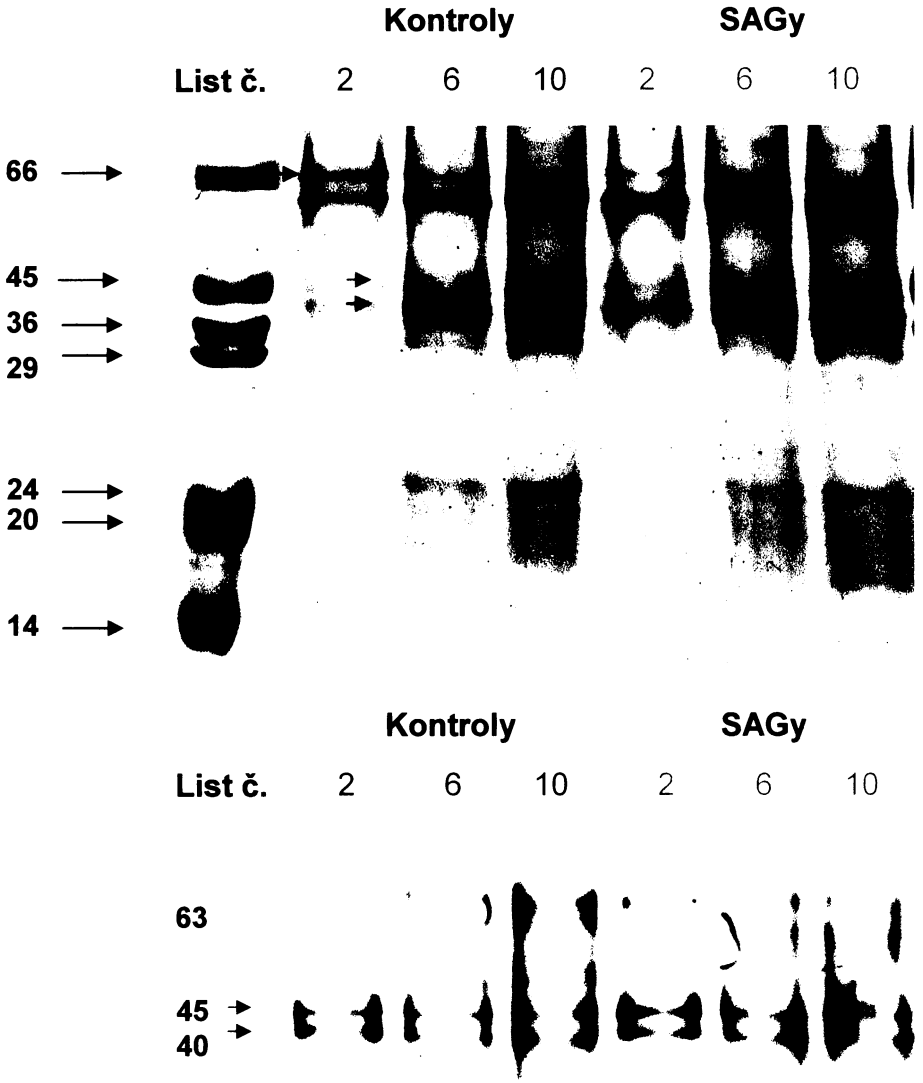
Zobrazené hodnoty jsou průměrem ze čtyř měření +/- střední chyba, listy jsou číslovány odspoda rostlin (nejstarší list - list č. 1, nejmladší list - list č.11).
K = kontrolní rostliny, S = transgenní rostliny (rostliny tabáku s vloženým konstruktem P_{SAG12}-*IPT)*
Hvězdička označuje statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) od odpovídajícího mladého listu.
Křížek označuje statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi kontrolní a transgenní rostlinou.

3.5.2 Změny v oxidačním poškození rozpustných proteinů zjištěné imunochemickou detekcí

Pro přesnější určení změn v zastoupení proteinů s karbonylovými skupinami jsem provedla jejich imunochemické barvení protilátkou proti DNPH. Cytosolické proteiny jsem izolovala postupem uvedeným v kapitole 2.9.1. Od každého vzorku jsem nanesla 60 μg proteinů. Obsah proteinů jsem zjistila těsně před nanesením vzorků na gel metodou měření při 280 nm po solubilizaci v SDS.

Změny ve složení cytosolických proteinů kontrolních a transgenních rostlin během stárnutí ilustruje horní část obrázku 24, str. 61. Proteinové spektrum se nejvíce lišilo u nejstarších listů kontrolní rostliny, kde byl nejvíce zastoupen protein o velikosti 66 kDa (na obrázku je znázorněn černou šipkou). U ostatních listů obou typů rostlin byl nejhojněji zastoupen protein o velikosti 63 kDa (na obrázku je znázorněn žlutou šipkou).

Spodní část obrázku ukazuje, jak se v listech tabáku během stárnutí měnilo oxidační poškození cytosolických proteinů. Detekovala jsem tři oxidačně poškozené proteiny. U proteinu 45 kDa (na obrázku je znázorněn zelenou šipkou) docházelo v průběhu stárnutí rostlin k jeho úbytku, míra jeho oxidačního poškození se však zvyšovala. Přesně stejný průběh vykazoval i protein 40 kDa (na obrázku je znázorněn červenou šipkou). U proteinu o velikosti 63 kDa (na obrázku je znázorněn žlutou šipkou) docházelo v průběhu stárnutí rostlin také k jeho úbytku, ale na rozdíl od předcházejících dvou proteinů se míra jeho oxidačního poškození snižovala. Největší oxidační poškození vykazoval tento protein u nejmladších listů kontrolních rostlin.



Obr. 24: ***Imunochemická detekce oxidačně poškozených cytosolických proteinů z kontrolní a transgenní rostliny.***

Na horním snímku je celkové spektrum cytosolických proteinů na 10 % SDS-polyakrylamidovém gelu obarvené pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250. Spodní snímek ukazuje tytéž vzorky po imunochemickém barvení za použití protilátky proti DNPH.

Černé šipky na okraji gelu označují molekulové hmotnostní standardy a jejich velikost v kDa. Od každého vzorku bylo naneseno 60 μg proteinů.

Barevnými šipkami jsou označeny proteiny, u kterých roste míra oxidačního poškození během stárnutí.

Žlutá šipka označuje protein o velikosti 63 kDa.

Zelená šipka označuje protein o velikosti 45 kDa.

Červená šipka označuje protein o velikosti 40 kDa.

4. DISKUZE

Senescence listu představuje poslední část ve vývoji orgánu, během níž dochází k postupnému řízenému odbourávání jednotlivých buněčných komponent [14]. Viditelným příznakem senescence jsou změny v zastoupení fotosyntetických pigmentů, které se projevují jako žloutnutí. U kontrolních rostlin tabáku byla senescence dobře viditelná po 12 týdnech pěstování. Rostlina začala žloutnout od spodních listů. Listy transgenních rostlin zůstaly zelené.

Předtím, než je možné detekovat známky senescence elektronovou mikroskopií, objeví se postupný úbytek koncentrace chlorofylu [94]. V chloroplastech izolovaných z různě starých děloh dýně klesaly s narůstajícím věkem fotosyntetické aktivity [95]. Progresivní ztráta fotosyntetických funkcí byla pozorována v listech mnoha jednoletých rostlin, jako je okurka [96], ječmen [97], kukuřice [98], nebo sója [99]. Při senescenci jsou nejprve odbourávány chlorofyly a později ubývá také obsah karotenoidů, které v buňkách plní ochrannou úlohu [100]. Většinou dochází také k poklesu poměru chlorofylů *a/b*, jelikož chlorofyl *a* je odbouráván rychleji než chlorofyl *b* [101]. Obě tyto teorie se mi podařilo potvrdit. Pokles chlorofylů *a+b* v průběhu stárnutí jsem zaznamenala jak u kontrolních tak transgenních rostlin. Obsah chlorofylů klesal rychleji u kontrolních rostlin a v jejich nejstarších listech dosahoval polovičních hodnot než u nejstarších listů transgenních rostlin. Důvodem může být zvýšená produkce cytokininů v transgenních rostlinách, která brání senescenci a tím i odbourávání chlorofylů. Pokles poměru chlorofylů *a/b* v listech kontrolních rostlin během stárnutí byl větší než u transgenních rostlin, kde klesal jen pozvolna.

Karotenoidy, mezi které patří pigmenty xantofylového cyklu a β-karoten, jsou pigmenty absorbující v modré oblasti spektra a chrání rovněž fotosyntetický aparát před nadměrným zářením. Působí tedy ochranně proti oxidačnímu stresu. Za přispění enzymu violaxantindeepoxidasy se violaxantin postupně přeměňuje přes anteraxantin na zeaxantin, který je schopný disipace přebytečné energie. Kromě toho karotenoidy přímo zhášejí singletový kyslík nebo tripletový chlorofyl [102]. V nejmladších listech transgenních rostlin jsem naměřila dvakrát větší obsah pigmentů xantofylového cyklu než u kontrolních rostlin. Míra deepoxidace vykazovala u transgenních rostlin velkou hodnotu jak v nejmladších, tak nejstarších listech, přesně naopak tomu bylo u kontrolních rostlin, kde

jsem naměřila v jejich nejmladších i nejstarších listech hodnotu míry deepoxidace nejmenší. U transgenních rostlin byl také průkazně vyšší obsah β-karotenu.

Transgenní rostliny obsahovaly opoti kontrolním rostlinám vložený konstrukt P_{SAG12}-*IPT*. SAG_{12} se exprimuje výhradně s nástupem senescence a kóduje cysteinovou proteasu. Na počátku senescence aktivuje v transgenních rostlinách tento promotor gen pro *isopentenyltransferasu,* která zvýší v listech biosyntézu cytokininů. Zvýšená koncentrace cytokininů poté inhibuje senescenci. Pro zjištění aktivity tohoto promotoru byly vyvinuty transgenní tabáky, kde je místo genu *IPT* vložen reportérový gen *GUS*, který kóduje β-glukuronidasu izolovanou z bakterií (*Agrobacterium tumefaciens*). Tam kde je aktivní promotor SAG_{12} nastane syntéza β-glukuronidasy. Ta poté katalyzuje hydrolýzu vhodného glukuronidového substrátu za tvorby modré indigové sraženiny. Změnu zbarvení lze pozorovat pouhým okem.

Z výsledků pokusů vyplývá, že promotor genu SAG_{12}, který řídí expresi glukuronidasy, je exprimován i v listech, které ještě nejsou zcela senescentní (žluté). Dalším zjištěním je, že promotor SAG_{12} je exprimován v ploše listu různě. Nejvíce ho vždy obsahují báze listů. To však nemusí odrážet rozdíly v expresi *GUS*, ale spíše rozdíly v relativním množství cytopasmy přítomné v buňkách. K podobným výsledkům dospěla i Grbić [103]. Tyto závěry podpořila i mikroskopickými studiemi.

Během senescence se rostlina snaží využívat co nejvíce živin z senescentních (fotosynteticky neaktivních) orgánů. V životě rostlin bývá limitujícím faktorem růstu nedostatek dusíku, který může rostlina získat z odbouraných proteinů. Pokles koncentrace proteinů pozorovaný v senescenci je výsledkem jednak zvýšené degradace i snížené syntézy [104,9]. S tímto zjištěním se shodují i má měření provedená na cytosolické frakci listů tabáku. Obsah cytosolických proteinů jsem měřila pro srovnání třemi odlišnými metodami. Metodou podle Bradfordové, metodou podle Lowryho a metodou měření absorbance při 280 nm. Všechny tři metody potvrdily, že obsah cytosolických proteinů během stárnutí klesá. Kontrolní rostliny obsahovaly v mladých listech více proteinů, než transgenní rostliny. V nejstarších listech transgenních rostlin však bylo proteinů více. To pravděpodobně souvisí s omlazením listu v důsledku zvýšené syntézy cytokininů. Tyto výsledky jsou ve shodě se zpomalenou degradací chlorofylu. Oba tyto parametry se zároveň používají jako markery senescence v nejstarších listech transgenních tabáků, tedy na rozdíl od kontrol senescence nenastala.

Pro bližší určení obsahu cytosolických proteinů jsem extrakty z listů nanesla na gel. Po proběhnutí elektroforézy došlo k rozdělení jednotlivých proteinů. V kontrolních rostlinách podle našich zjištění ubývají všechny cytosolické proteiny s věkem listu. Výjimku tvoří protein o velikosti 66 kDa, který představuje nějaký protein spojený se senescencí. V nejstarších listech je ho nejvíce. Při srovnání nejstarších listů kontrolních a transgenních rostlin je patrné, že transgenní rostliny obsahují všech proteinů více s výjimkou proteinu o velikosti 66 kDa.

V buňkách dochází během přirozeného i urychleného stárnutí k hromadění ROS. K jejich hromadění dochází jak díky zvýšení jejich produkce, tak v důsledku selhávání antioxidačních mechanismů [44,105]. ROS jsou vysoce reaktivní a délka jejich života se pohybuje v řádu mikro- až nanosekund. Měření jejich obsahu v živých systémech je proto obtížné. Pro buňku je směrodatné, zda dokáže hladinu ROS regulovat a tím zabránit oxidačnímu poškození důležitých makromolekul. Určování obsahu oxidačně modifikovaných makromolekul se proto používá jako nepřímá metoda k měření množství ROS a míry oxidačního stresu. Ve většině prací, které se týkají rostlinné senescence, se jako míra oxidačního poškození uvádí peroxidace lipidů měřená thiobarbiturovým testem [106,107,108] či tvorba fluorescenčních pigmentů [109,110,111,112] a podstatně méně informací je známo o oxidačních modifikacích nukleových kyselin a proteinů. Rostoucí podíl oxidačně poškozených proteinů v souvislosti se stárnutím byl dokumentován na mnoha živočišných systémech [70]. Já jsem se ve své práci pokoušela zjistit, zda a v jaké míře dochází k oxidačním modifikacím proteinů během senescence rostlin tabáku. Oxidační poškození proteinů jsem měřila pomocí DNPH vázajícího se na karbonylové skupiny a jejich obsah jsem měřila spektrofotometricky jako koncentraci vzniklého dinitrofenylhydrazonu.

Množství oxidačně modifikovaných cytosolických proteinů u obou rostlin tabáku nebylo nejvyšší u starých listů, v kterých byla právě iniciována senescence, jak dokazují pokusy zjišťující aktiviti promotoru SAG_{12}. Nejvyšší koncentraci jsem zaznamenala u třetích listů odspoda rostliny (list č.3). Zajímavé je, že u nejstarších listů pak množství oxidovaných proteinů pokleslo. To zřejmě souvisí s masivním odbouráváním proteinů v nejstarších listech. Přednostně jsou odbourávány právě oxidované proteiny. Desimone a kolektiv prokázali, že se oxidačně poškozená Rubisco stala substrátem pro chloroplastové proteasy [113]. Cytosolické oxidované proteiny se odbourávají v proteasomech [20]. Průběh koncentrace oxidovaných proteinů tak má charakter signálu pro spuštění

senescence. Podobně zjistili Johanson a kolegové, že dochází k výraznému poklesu oxidovaných proteinů ve starých listech *Arabidopsis* těsně před rozkvětem [114]. Podobný průběh změn koncentrací oxidovaných proteinů jsem pozorovala i u transgenních rostlin. Zdá se, že hladina cytokininů nemá vliv na hladinu oxidovaných proteinů, jejich metabolismus je pravděpodobně řízen nezávisle na hladině cytokininů, ale souvisí s věkem listu.

Pro přesnější určení změn v zastoupení proteinů s karbonylovými skupinami jsem provedla jejich imunochemické barvení protilátkou proti DNPH pro další stanovení pomocí metody Western Blot. Cytosolické proteiny jsem izolovala několika postupy (neuvedeno), z nichž jako nejsprávnější se jevil postup popsaný v kapitole 2.9.1. Během izolace jsem zjistila, že při srážení proteinů pomocí TCA dochází k jejich úbytku, proto jsem počet srážení omezila na jedno. Dále jsem hledala nejvhodnější metodu pro zjištění obsahu cytosolických proteinů ve vzorích před nanášením na gel. Roztok bílkovin totiž obsahuje řadu sloučenin, které různým způsobem a různou měrou ovlivňují jednotlivá stanovení koncentrace bílkovin. Obsah cytosolických proteinů jsem měřila na počátku izolace, a pak na konci izolace. Proteiny jsem měřila všemi třemi metodami tzn. metodou podle Bradfordové, metodou podle Lowryho a měřením absorbance při 280 nm. Výsledky jednotlivých metod se značně lišily. Abych mohla rozhodnout, která metoda dává nejpřesnější výsledky, provedla jsem izolaci se známou koncentrací BSA. Navážila jsem 10 g BSA a rozpustila jej v 10 ml fosfátového pufru s inhibitory pH 7. Změřila jsem jeho koncentraci všemi metodami na začátku izolačního postupu a totéž jsem udělala na konci izolačního postupu.

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 10, str. 66. První sloupec tabulky srovnává správnost použitých metod. Počáteční koncentrace vzorku měla být 1 mg ml^{-1}. Nejbližší hodnotu (1,16 mg ml^{-1}) jsem naměřila metodou měření absorbance při 280 nm. Druhý sloupec tabulky srovnává naměřené koncentrace po provedení izolačního postupu a tedy zároveň zahrnuje ztrátu bílkovin během procedury. Ukázalo se, že výsledky měření metodou podle Lowryho i metodou podle Bradfordové jsou špatné. Podle Lowryho by se počet proteinů během izolace zvyšoval, což je nepravděpodobné. Výsledky měření metodou podle Bradfordové nelze považovat za pravdivé z důvodu velkého rozptylu hodnot kalibrační křivky. Proto jsem při dalších izolacích měřila cytosolické proteiny metodou měření při 280 nm. Z těchto měření vyplývá, že v průběhu izolace dochází k významnému úbytku v obsahu proteinů oproti původnímu extraktu a to cca na třetinu.

Tabulka 10: Výsledky měření koncentrace BSA před a po skončení izolačního procesu

	konc. BSA před provedením izol. postupu mg ml^{-1}	konc. BSA po provedení izol. postupu mg ml^{-1}
Metoda podle Lowryho	0,73	1,2
Metoda podle Bradfordové	0,64	0,44
Metoda A_{280}	1,16	0,36

V posledních letech se díky metodě imunochemického barvení protilátkou proti DNPH navázanému na karbonylové skupiny zjistilo, že oxidační poškození proteinů v důsledku stresu i stárnutí není sledem náhodných reakcí, ale že mezi jednotlivými proteiny existují kvalitativní rozdíly. Tento fakt podporuje teorii o senescenci jako o geneticky řízeném procesu. Oxidační modifikace proteinů souvisejí se ztrátou jejich funkčnosti, což bylo dokumentováno především u různých enzymů v živočišných systémech [115,116,117] a tím přispívají k poruchám buněčného metabolismu. U rostlin byla tato metoda použita k detekci oxidačního poškození thylakoidních proteinů z listů pšenice vystavené působení sucha. Listy stresovaných rostlin vykazovaly nižší účinnost PS II, sníženou aktivitu elektrontransportního řetězce a zvýšený obsah karbonylových skupin v proteinech thylakoidních membrán [118]. Imunochemická detekce oxidačně modifikovaných proteinů umožňuje získat informace o kvantitativních i kvalitativních změnách, proto jsem ji použila také ve své práci a výsledky jsem porovnala se spektrofotometrickými měřeními.

Jako oxidačně poškozené proteiny jsem identifikovala tři proteiny o velikostech 40, 45 a 63 kDa. I přesto, že obsah proteinů o velikosti 40 a 45 kDa během senescence v listech ubýval, zvyšovala se míra jejich oxidačního poškození. Nejvíce proteinu o velikosti 63 kDa obsahovaly překvapivě mladé listy kontrolních rostlin. Je to možné vysvětlit tím, že se ho vyskytuje v buňkách velké množství a nemůže být tak rychle odbouráván.

U živočichů je průběh koncentrace oxidovaných proteinů poněkud odlišný. Jejich koncentrace se stárnutím roste [2]. V živočišných buňkách se na odbourávání poškozených proteinů za podmínek oxidačního stresu aktivně podílí proteasomový komplex 20S. Pokud se oxidační stres zvýší a obsah poškozených proteinů příliš vzroste, dojde k navázání takto modifikovaných proteinů na proteasomový komplex 20S a tím k jeho nevratné inhibici [119]. Podobný multikatalytický proteinasový komplex byl prokázán i v rostlinách [120]. Jelikož u listů tabáku do jistého věku množství oxidovaných proteinů nepřibývá, jsou zřejmě rychle odbourávány. Zvýšením oxidačního stresu u starých listů může dojít k inhibici proteasomového komplexu. Tím se oxidované proteiny nahromadí. To může být signálem k navození senescence v těchto listech. Tak se rozběhne řízený degradační proces, ve kterém pak jsou všechny buněčné komponenty, včetně oxidovaných proteinů, postupně odbourávány.

5. SOUHRN

V průběhu senescence listů tabáku dochází ke změnám obsahu cytosolických proteinů. Pomocí tří spektrofotometrických metod a SDS-elektroforézy jsem zjistila, že celkový obsah cytosolických proteinů klesá v listech v závislosti na jejich stárnutí. Nejvíce proteinů tedy obsahují mladé listy, nejméně staré listy tabáku. Zastoupení jednotlivých proteinů se však v závislosti na stáří mění. Koncentrace většiny cytosolických proteinů v listech s věkem klesá, ale mohou se vyskytovat i proteiny, které se při senescencí syntetizují. V mém případě takovýmto proteinem byl cytosolický protein o velikosti 66 kDa. Kontrolní rostliny obsahovaly v mladých listech více proteinů, než transgenní rostliny, ve starých listech byl ale tento poměr obrácený. To pravděpodobně souvisí s omlazením listů transgenních rostlin v důsledku zvýšené syntézy cytokininů. Tyto výsledky se shodují i se zpomalenou degradací chlorofylů.

Během přirozené senescence listů tabáku dochází také k nárůstu celkového obsahu oxidačně poškozených cytosolických proteinů. Výsledky spektrofotometrického stanovení ukázaly, že průběh koncentrace oxidovaných proteinů má charakter signálu pro spuštění senescence. V nejstarších listech nebylo nejvíce oxidovaných proteinů, protože už v nich docházelo k jejich odbourávání, tzn. už v nich probíhala senescence. Transgenní rostliny vykazovaly obdobné hodnoty, jako kontrolní rostliny. Proto se zda, že metabolismus oxidovaných proteinů je pravděpodobně řízen nezávisle na hladině cytokininů a souvisí s věkem listu.

Pouze tři proteiny vykazovaly oxidační poškození, jak prokázala metoda Western blot. Protein o velikosti 63 kDa byl pozorován u mladých kontrolních rostlin, dva proteiny o velikostech 45 a 40 kDa byly patrné vždy a jejich množství rostlo s věkem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Harman, D.**: J. Gerontol. **2**: 298, (1956)

2. **Srbová, M., Wilhelmová, N., Wilhelm, J.**: Biol. listy **66** (3): 203-220, (2001)

3. **Quirino, B.F., Noh, Y.S., Himelblau, E., Amasino, R.M.**: Trends Plant Sci. **5**: 278-282, (2000)

4. **Smart, C.M.**: New Phytol. **126**: 419-448, (1994)

5. **McCabe, M.S., Garratt, L.C., Schepers, F., Jordi, W. J.R.M., Stoopen, G.M., Davelaar, E., van Rhijn, J.H., Power, J.B., Davey, M.R.**: Plant Physiol. **127**: 505-516, (2001)

6. **Thomas, H., Stoddart, J.L.**: Annu. Rev. Plant. Physiol. **31**: 83, (1980)

7. **Lohman, K.N., Gan, S., John, M.C., Amasino, R.M.**: Physiol. Plant. **92**: 322, (1994)

8. **Yoshida, S.**: Plant Biol. **6:** 79-84, (2003)

9. **Buchanan-Wollaston, V.**: J. Exp. Bot. **48** (307): 181-199, (1997)

10. **Gan, S., Amasino, R.M.**: Science **270**: 1986-1988, (1995)

11. **Delorme, V.G.R., McCabe, P.F., Kim, D.J., Leaver, C.J.**: Plant Physiol. **123**: 917-927, (2000)

12. **Simeonova, E., Sikora, A., Charzynska, M., Mostowska, A.**: Protoplasma **214**: 93-101, (2000)

13. **Macháčková, I.**: v knize Fyziologie rostlin (Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šeánek, J. ed.), Academia, Praha, str. 240-285, (1998)

14. **Grabau, L.J.**: v knize Handbook of Plant and Crop Physiology, (Pessarakli, M. ed.), Marcell Dekker, New York - Bassel – Hong Kong, str. 461-481 (1995)

15. **Sembdner, G., Parthier, B.**: Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. **44**: 569-589, (1993)

16. **Creelman, R.A., Mullet, J.E.**: Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. **48**: 355-381, (1997)

17. **Wasternack, C., Hause, B.**: Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. **72**: 165-221, (2002)

18. **Ueda, J., Kato, J.**: Plant Physiol. **66**: 246-249, (1980)

19. **Ueda, J., Kato, J., Yamane, H., Takahashi, N.**: Physiol. Plant. **52**: 305-309, (1981)

20. **Vick, B.A., Zimmerman, D.C.**: Plant Physiol. **75**: 458-461, (1984)

21. **Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J.**: Fyziologie rostlin, Academia, Praha (2003)

22. **Zarembinski, T.I., Theologis, A.**: Plant Mol. Biol. **26**: 1579, (1994)

23. **Morgan, W., Drew, M.C.**: Physiol. Plant. **100**: 620-630, (1997)

24. **John, I., Drake, R., Farrel, A., Cooper, W., Lee, P., Horton, P., Grierson, D.**: Plant J. 7: 483, (1995)

25. **Grbic, V., Bleecker, A.B.**: Plant J. **8**: 595, (1995)

26. **Noodén, L.D., Singh, S., Lethan, D.S.**: Plant Physiol. **93**: 33,(1990)

27. **Van Staden, J., Cook, E.L., Noodén, L.D.**: v knize Senescence and Aging in Plants, (Noodén, L.D., Leopold, A.C. ed.), Academic Press, San Diego – New York – Boston – London – Sydney – Tokyo – Toronto, str. 281-328, (1988)

28. **Ananieva, K., Malbeck, J., Kamínek M., v. Staden, H.**: Physiol. Plant. **122**: 133-142, (2004)

29. **Richmond, A.E., Lang, A.**: Science **125**: 650-651, (1957)

30. **Pell, E.J., Dann, M.S.**: v knize Response of Plants to Multiple Stresses (Mooney, H.A., Winner, W.E., Pell, E.J. ed.), Academic Press, San Diego, str. 189-204, (1991)

31. **Buchanan-Wollaston, V.**: J. Exp. Bot. **48**: 181, (1997)

32. **Gan, S., Amasino, R.M.**: Plant Physiol. **113**: 313-319, (1997)

33. **Hewelt, A., Prinsen E., Schell, J., Van Onckelen, H., Schmulling, T.**: Plant J. **6**: 879-891, (1994)

34. **Smart, C.M., Scofield, S.R., Bevan, M.W., Dyer, T.A.**: Plant Cell **3**: 647-656, (1991)

35. **Miller, C.O., Skoog, F., van Saltza, M.H., Strong, F.M.**: J. Am. Chem. Soc. **77**: 1392, (1955)

36. **Letham, D.S.**: Phytochemistry **12**: 2445, (1973)

37. **Skoog, F., Armstrong, D.J., Cherayil, J.D., Hampel, A.E., Bock, R.M.**: Science **154**, 1354-1356, (1966)

38. **Kakimoto, T.**: Plant Cell Physiol. **42**: 677-685, (2001)

39. **Takei, K., Sakakibara, H., Sugiyama, T.**: J. Biol. Chem. **276**: 26405-26410, (2001)

40. **Zubko, E., Adams, C.J., Macháčková, I., Malbeck, J., Scollan, C., Mayer, P.**: Plant J. **29**: 797-808, (2002)

41. **Sakano, Y., Okada, Y., Matsunaga, A., Suwama, T., Kaneko, T., Ito, K., Noguchi, H., Abe, I.**: Phytochemistry **65**: 2439-2446, (2004).

42. **Takei, K., Yamaya, T., Sakakibara, H.**: J. Biol. Chem. **279**: 41866-41872, (2004)

43. **Sakakibara, H.**: Plant Hormones **72**: 271-287, (2005)

44. **Strother, S.**: Gerontology **34**: 151-156, (1988)

45. **Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M.**: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 7915, (1993)

46. **Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P., Schubert, D.**: J. Cell Biol. **141** (6): 1423-1432, (1998)

47. **Ferri, K.F., Kroemer, G.**: Nature Cell Biol. **3**: 255-263, (2001)

48. **Lee, H.C., Wei, Y.H.**: J. Biomed. Sci. **4**: 319, (1997)

49. **Bartosz, G.**: Acta Physiol. Plant. **19** (1): 47-64, (1997)

50. **Voet, D., Voet, J.G.**: v knize Biochemie, Victoria publishing, Praha, str. 671, (1990)

51. **Hladík, J., Sofrová, D.**: Biol. listy **55**: 18,(1990)

52. **Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., Hancock, J.T.**: Exp. Bot. **53**: 1237, (2002)

53. **Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P.**: Chem. listy **99**: 455-466, (2005)

54. **Vranová, E., Inzé, D., van Breusegem, F.**: J. Exp. Bot. **53**: 1227, (2002)

55. **Inzé, D., van Montagu, M.**: Curr. Opin. Biotechnol. **6**: 153, (1995)

56. **Scandalios, J.G.**: Adv. Genet. **28**: 1, (1990)

57. **Wojtaszek, P.**: Biochem. J. **322**: 681, (1997)

58. **Takahashi, M., Asada, K.**: Arch. Biochem. Biophys. **266**: 558-556, (1983)

59. **Thompson, J.E., Legge, R.L., Barber, R.F.**: New Phytol. **105**: 317- 344, (1987)

60. **Winston, G.W.**: v knize Stress Responses in Plans, Wiley-Liss, str. 57, (1990)

61. **Haber, F., Weiss, J.**: Proc. R. Soc. London, Ser. A **147**: 332, (1934)

62. **Fenton, H.J.H.**: J. Chem. Soc. **65**: 899, (1894)

63. **Fenton, H.J.H.**: Proc. Chem. Soc. **25**: 224, (1899)

64. **Kappus, H.**: v knize Oxidative Stress, (Sies, H. ed.) Academic Press, New York – London, str. 273-309, (1985)

65. **Asada, K.**: v knize Photosynthesis and the Enviroment, (Neil, R.B. ed.), Kluwer Academic Publisher Printed, Netherlands, str. 123-150, (1996)

66. **Dean, R.T., Gieseg, S., Davies, M.J.**: Trends J. Int. Biochem. Mol. Biol. **18**: 437-441, (1993)

67. **Gieseg, S.P., Simpson, J.A., Charlton, T.S., Duncan, M.W., Dean, R.T.**: Biochemistry **32**: 4780-4786, (1993)

68. **Davies, M.J., Fu, S., Wang, H., Dean, R.T.**: Free Rad. Biol. Med. **27**: 1151, (1999)

69. **Valentine, J.S., Wertz, D.L., Lyons, T.J., Liou, L.L., Goto, J.J., Gralla, E.B.**: Curr. Opin. Chem. Biol. **2**: 253-262, (1998)

70. **Levine, R.L., Stadtman, E.R.**: Exp. Gerontol. **36**: 1495-1502, (2001)

71. **Evans, P.J., Gallesi, D., Mathieu, Ch., Hernandez, M.J., de Felipe, M., Halliwell, B., Puppo, A.**: Planta **208**: 73-79, (1999)

72. **Bartoli, C.G., Simontacchi, M., Montaldi, E.R., Puntarulo, S.**: Plant. Sci. **129**: 157-165, (1997)

73. **Wolff, S.P., Dean, R.T.**: Biochem. J. **234**: 399-403, (1986)

74. **Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L.**: Physiol. Plant. **100**: 224-233, (1997)

75. **Mae T., Kai N., Makino A., Ohira K.**: Plant Cell Physiol. **25** (8): 333-336, (1984)

76. **Hidema J., Makino A., Kurita Y., Mae T., Ojima K.**: Plant Cell Physiol. **33** (8): 1209-1214, (1992)

77. **Buchanan-Wollaston, V.**: Plant Physiol. **105**: 839-846, (1994)

78. **Hensel, L.L., Grbic, V., Baumgarten, D.A., Bleecker, A.B.**: Plant Cell **5**: 553- 564, (1993)

79. **Taylor, C.B., Bariola, O.A., Delcardayre, S.B., Raines, R.T., Green, P.J.**: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 5118-5122, (1993)

80. **Oh, S.A., Lee, S.Y., Chung, I.K., Lee, C.H., Nam, H.G.**: Plant Mol. Biol. **30**: 739-754, (1996)

81. **Becker, W., Apel, K.**: Planta **189**: 74-79, (1993)

82. **Smart, C.M., Hosken, S.E., Thomas, H., Greaves, J.A., Blair, B.G., Schuch, W.**: Physiol. Plant. **93**: 673-682, (1995)

83. **Azumi, Y., Watanabe, A.**: Plant Physiol. **95**: 577-583, (1991)

84. **Davies, K.M., Grierson, D.**: Planta **179**: 73-80, (1989)

85. **Drake, R., John, I., Farrell, A., Cooper, W., Schuch, W., Grierson, D.**: Plant Mol. Biol. **30**: 755-767, (1996)

86. **Ryu, S.B., Wang, X.**: Plant Physiol. **108**: 713-719, (1995)

87. **Watanabe, A., Hamada, K., Yokoi, H.**: Plant Mol. Biol. **26**: 1807-1817, (1994)

88. **Weaver, L.M., Himelblau, E., Amasino, R.M.**: v knize Genetic Engeneering, (Setlow, J.K. ed.), Plentum press, New York, str. 215-234, (1997)

89. **Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R.**: Methods Enzymol. **186**: 464-478, (1990)

90. **Frank, J., Pompella, A., Biesalski, H.K.**: Free Rad. Biol. Med. **29** (11): 1096-1105, (2000)

91. **Bradford, M.M.**: Anal. Biochem. **72**: 248-254, (1976)

92. **Miller, G.L.**: Anal. Biochem. **31**: 964, (1959)

93. **Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W.**: EMBO J. **6**: 3901-3907, (1987)

94. **Huber, D.J., Newman, D.W.**: J. Exp. Bot. **27**: 490, (1976)

95. **Harnischfeger, G.**: Z. Pflanzenphysiol. **71**: 301, (1974)

96. **Callow, J.A.**: New Phytol. **73**: 13, (1974)

97. **Friedrich, J.W., Huffaker, R.C.**: Plant Physiol. **65**: 1103, (1980)

98. **Crafts-Brandner, S.J., Below, F.E., Wittenbach, V.A., Harper, J.E., Hageman, R.H.**: Plant Physiol. **74**: 368, (1984)

99. **Ford, D.M., Shimbles, R.**: Plant Physiol. **86**: 108, (1988)

100. **Niyogi, K.K.**: Plant Mol. Biol. **50**: 333-359, (1999)

101. **Grover, A., Mohanty, P.**: v knize Photosynthesis: Photoreactions to Plant Produstivity, (Abrol, Y.P., Mohanty, P., Govidjee ed.), Kluwer Academic Press, Dordrecht - Boston – London, str. 225-255, (1993)

102. **Demming-Adams, B., Adams W.W.**: Trends Plant Sci. **1**: 21-26, (1996)

103. **Grbić, V.**: Physiol. Plant. **116**: 416-421, (2002)

104. **Skadsen, R.W., Cherry J.H.**: Plant Physiol. **71**: 861-868, (1983)

105. **Procházková, D., Sairam D.K., Srivastava, G.C., Singh, D.V.**: Plant Sci. **161**: 765-771, (2001)

106. **Kunert, K.J., Ederer, M.**: Physiol. Plant. **65**: 85-88, (1985)

107. **Hung, K.T., Kao, Ch.H.**: Plant Growth Regul. **24**: 17-21, (1998)

108. **Chang, Ch.J., Kao, Ch.H.**: Plant Growth Regul. **25**: 11-15, (1998)

109. **Wilhelm, J., Wilhelmová, N.**: Photosynthetica **15**: 55-60, (1981)

110. **Pauls, K.P., Thompson, J.E.**: Plant Physiol. **75**: 1152-1157, (1984)

111. **Düggelin, T., Bortlik, K., Gut, H., Matile P., Thomas H.**: Physiol. Plant. **74**: 131-136, (1988)

112. **Düggelin, T., Schellemberg, M., Bortlik, K., Matile, P.**: J. Plant Physiol. **133**: 492-497, (1988)

113. **Desimone, M., Wagner, E., Johanningmeier, U.**: Planta **205**: 459-466, (1998)

114. **Johansson, E., Olsson, O., Nyström, T.**: J. Biol. Chem. **279** (21): 22204-22208, (2004)

115. **Cabiscol, E., Levine, R.L.**: J. Biol. Chem. **270** (24): 14742-14747, (1995)

116. **Cabiscol, E., Piulats, E., Echaves, P., Herrero, E., Ros, J.**: J. Biol. Chem. **275** (35): 27393-27398, (2000)

117. **Das, N., Levine, R.L., Orr, W.C., Sohal, R.S.**: Biochem. J. **360**: 209-216, (2001)

118. **Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Beltrano, J., Guiamet, J.J., Araus, J.L.**: Physiol. Plant. **108**: 398-404, (2000)

119. **Davies, K.J.A.**: Biochemie **83**: 301-310, (2001)

120. **Van Nocker, S., Deveraux, Q., Rechsteiner, M., Viestra, R.D.**: Proc. Natl. Acad. Sci. **93**: 856-860, 1996.

„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