

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra biochemie

---

**STUDIUM NADP – DEPENDENTNÍ MALÁTDEHYDROGENASY**  
**DEKARBOXYLAČNÍ**

Bakalářská práce

Praha 2006

Lucie Potůčková

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

---

**STUDIUM NADP – DEPENDENTNÍ MALÁTDEHYDROGENASY**

**DEKARBOXYLAČNÍ**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: Mgr. Veronika Doubnerová

Praha 2006

Lucie Potůčková

## Prohlášení

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

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

V Praze dne.....*16. 2006*.....

.....*Klára Šabatová*.....  
podpis

Především bych chtěla poděkovat RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., která mě výborně vedla po celou dobu svou odbornou radou a pomocí.

Mé největší poděkování patří Mgr. Veronice Doubnerové za všestrannou pomoc při řešení problémů spjatých s experimentální částí práce.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

a	enzymová aktivita
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
C <sub>3</sub> rostliny	rostlina, u které je prvním fotosyntetickým produktem 3-fosfoglycerát (tříuhlíkatá sloučenina)
C <sub>4</sub> rostliny	rostlina, u které je prvním fotosyntetickým produktem oxalacetát (čtyřuhlíkatá sloučenina)
CAM	Crassulacean acid metabolism
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraacetát
g	tíhové zrychlení (g = 9,80665)
Hsp 70	protein indukovaný teplotním stresem (heat shock protein)
NAD (NADH)	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NADP (NADP)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NADP – ME	NADP depentní malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)
OAA	oxalacetát
PEPC	fosfoenolpyruvátcarboxylasa
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
PVP	polyvinilpolypyrrolidon
RPM	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylenethylendiamin
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan

# OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>3</b>
1.1. Obecná charakteristika NADP-ME .....	3
1.2. Struktura NADP-ME.....	4
1.3. Výskyt NADP-ME .....	4
1.4. Funkce fotosyntetické formy PEPC .....	5
1.4.1. Calvinův cyklus.....	5
1.4.2. CAM metabolismus.....	6
1.5. Rostlinný NADP-ME .....	6
1.6. Živočišný NADP-ME .....	8
<b>2. Cíl práce</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Experimentální část</b> .....	<b>9</b>
3.1. Rostlinný materiál .....	9
3.2. Živočišný materiál.....	9
3.3. Chemikálie .....	9
3.4. Přístroje .....	10
3.5. Izolační postup NADP-ME ze semen kukuřice .....	11
3.5.1. Příprava extraktu .....	11
3.5.2. Srážení síranem amonným .....	11
3.5.3. Dialýza.....	11
3.5.4. Ionexová chromatografie.....	12
3.5.5. Gelová chromatografie .....	12
3.5.6. Afinitní chromatografie .....	12
3.6. Měření enzymové aktivity NADP-ME .....	13
3.7. Stanovení množství bílkovin.....	13
3.8. Elektroforetické metody .....	14
3.8.1. Příprava vzorků pro elektroforetické separace .....	14
3.8.2. Elektroforéza nativní a v SDS prostředí.....	14
3.8.3. Detekce aktivity NADP-ME po elektroforéze.....	15
3.8.4. Detekce proteinů v gelu.....	15

<b>4. Výsledky</b> .....	<b>16</b>
4.1. Izolace enzymu NADP-ME ze semen kukuřice.....	16
4.2. Sledování hodnot aktivity NADP-ME v průběhu izolačního postupu.....	16
4.3. Sledování obsahu proteinů v průběhu izolace pomocí elektroforetické separace v přítomnosti SDS .....	19
4.4. Zjištění isoenzymového složení kukuřičného NADP-ME nativní elektroforézou..	21
4.5. Přítomnost živočišného NADP-ME v různých tkání kapra obecného .....	24
4.6. Sledování obsahu proteinů v různých tkáních kapra obecného elektroforetickými metodami .....	26
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>29</b>
<b>6. Závěr</b> .....	<b>32</b>
<b>7. Použitá literatura</b> .....	<b>33</b>

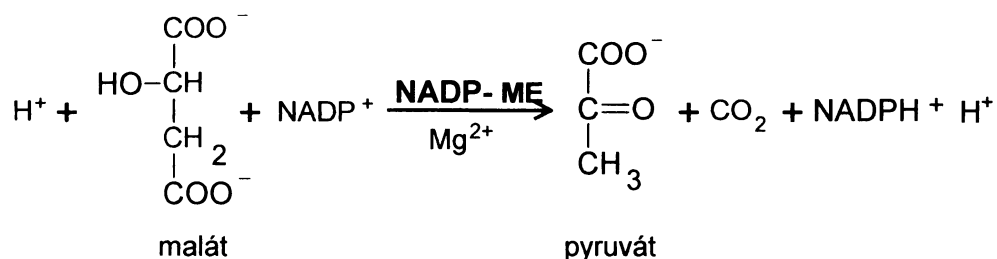
# 1. Úvod

## 1.1. Obecná charakteristika NADP-ME

NADP–dependentní malátdehydrogenasa dekarboxylační EC 1.1.1.40, dále jen NADP-ME, (z angl. malic enzyme).

Je vysoce rozšířený enzym, přítomný v živočišných a rostlinných tkáních, také v prokaryotických a v eukaryotických mikroorganismech, kde hraje roli v různých metabolických drahách. Katalyzuje dekarboxylaci L–malátu za vzniku pyruvátu, oxidu uhličitého a NADPH (a) [ 1, 2 ]:

(a)



Enzym také může katalyzovat dekarboxylaci oxalacetátu (b) nebo mít funkci reduktasy  $\alpha$ -ketokarboxylové kyseliny (c):



Substrátem NADP-ME je malát, koenzymem je  $\text{NADP}^+$  a kofaktory jsou dvojmocné kationty kovů, jejichž přítomnost je nezbytná. Účinnými kofaktory jsou dvojmocné kationty např.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  [ 2 ].



## 1.2. Struktura NADP-ME

NADP-ME je protein složený z identických podjednotek. Např. u *Arabidopsis thaliana* byly popsány 4 isoformy, z nichž 3 cytosolové mají relativní molekulovou hmotnost odpovídající hexameru či oktameru a čtvrtá plastidová isoforma se vyskytuje v rovnováze tetramer/ dimer [18]. Z mnoha studií vyplývá, že NADP-ME je ve formě tetrameru [2, 4, 9]. V zelených listech kukuřice pak relativní molekulová hmotnost chloroplastové isoformy odpovídá 62 000, stejně jako v listech cukrové třtiny [5, 20]. V *Aloe arborescent* byl popsán NADP-ME o velikosti 65 000 [3], v kosmatci křišťálovém (*Mesembryanthemum crystallinum*), který je zástupcem CAM rostlin, má NADP-ME molekulovou relativní hmotnost 64 000 [1].

V  $C_4$  stromu *Haloxylon persicum* byla popsána chloroplastová isoforma NADP-ME o velikosti 67 000 [1]. Protein o relativní molekulové hmotnosti 72 000 nalezený pouze pomocí protilátek v etiolovaných listech kukuřice [5], ve stoncích pšenice [4], v *Ricinus communis* [15], či ve vodní rostlině *Egeria densa* [21], byl později identifikován jako Hsp 70 (heat shock protein), který interaguje s NADP-ME a byl mylně považován za isoformu [19]. Lidský NADP-ME přítomný v cytoplazmě (např. buněk kůže) a matrixu mitochondrií je homotetramer s relativní molekulovou hmotností jedné podjednotky 64 000 [9].

## 1.3. Výskyt NADP-ME

NADP-ME je velmi rozšířený enzym, přítomný ve všech typech rostlin [1]. Také distribuce NADP-ME v různých rostlinných orgánech je velmi rozmanitá. Tento enzym byl nalezen v květech, plodech, semenech, kořenech a speciálních zásobních orgánech, stejně tak v listech [6]. Velmi vysoká aktivita chloroplastové isoformy NADP-ME byla objevena v listech některých  $C_4$  rostlin (nazvaných NADP-ME typy  $C_4$  druhů) jako je kukuřice, cukrová třtina a čirok [1]. V listech  $C_4$  rostlin hraje hlavní roli při fotosyntéze, poskytuje  $CO_2$  pro Calvinův cyklus. Nedochází tak ke ztrátám fotorespirací [7]

## 1.4. Funkce fotosyntetické formy PEPC

Jednou z nejdůležitějších rolí NADP – ME v rostlinách je poskytování CO<sub>2</sub> pro ribulosu–1,5-bisfosfátkarboxylasu/oxygenasu (Rubisko) v redukčním pentosofosfátovém cyklu [2].

### 1.4.1. Calvinův cyklus

Calvinův cyklus využívá většina rostlin a řas. První reakcí Calvinova cyklu je zachycení anorganického CO<sub>2</sub> a jeho zabudování do struktury organické sloučeniny, kterou je ribulosa-1,5-bisfosfát (RuBP). Tato reakce je katalyzována ribulosou–1,5-bisfosfátkarboxylasu/oxygenasou (Rubisko) vyskytující se v chloroplastech. Dále několika přeměnami vzniká šestiuhlíkatý intermediát, který se velmi rychle přeměňuje na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Podle tohoto stabilního produktu, tříuhlíkaté sloučeniny, se rostliny využívající mechanismus Calvinova cyklu nazývají **rostliny C<sub>3</sub>**. Fosfolycerát se dále ve dvou krocích přeměňuje na glycerinaldehyd-3-fosfát, což je klíčová sloučenina Calvinova cyklu. Glycerinaldehyd-3-fosfát se několika reakcemi přemění na glukosu-6-fosfát [ 8 ].

Existuje i jiná cesta fixace CO<sub>2</sub>, která využívá čtyřuhlíkaté meziproducty. Podle toho se tyto rostliny nazývají **C<sub>4</sub> rostliny**. Zde je primárním akceptorem CO<sub>2</sub> fosfoenolpyruvát (PEP) a produktem je oxalacetát (OAA), reakci katalyzuje enzym fosfoenolpyruvátkarboxylasa. Oxalacetát může být metabolizován dvojím způsobem, buď na aspartát nebo na malát, podle čehož se C<sub>4</sub> rostliny rozdělují na malátové a aspartátové. Dekarboxylace čtyřuhlíkatého intermediátu může být katalyzována NADP-dependentní malátdehydrogenasou dekarboxylační, NAD-dependentní malátdehydrogenasou dekarboxylační nebo fosfoenolpyruvátkarboxykinasou. CO<sub>2</sub> pak vstupuje do Calvinova cyklu [ 8 ].

Dosud bylo objeveno více než 100 druhů rostlin využívajících C<sub>4</sub> fixaci CO<sub>2</sub>. Jedná se o rostliny žijící v oblastech s horkým klimatem – v tropech, pouštích. Jsou to především tropické trávy, cukrová třtina a kukuřice. Otázkou je, proč tyto rostliny fixují CO<sub>2</sub> prostřednictvím fosfoenolpyruvátu a vzápětí opět CO<sub>2</sub> uvolňují a využívají normálním způsobem Calvinův cyklus. Důvodem je zvýšení účinnosti fixace CO<sub>2</sub> v oblastech s vysokou sluneční radiací, s vysokými teplotami a omezenou dodávkou

vody. V těchto podmínkách je fixace  $\text{CO}_2$  u  $\text{C}_4$  rostlin vůči  $\text{C}_3$  rostlinám asi dvojnásobná. Jedním z důvodů je i schopnost PEPC využívat nižší koncentrace  $\text{CO}_2$ , než Rubisko.  $\text{C}_4$  rostliny jsou vhodně anatomicky uzpůsobeny ke své činnosti. Mezi povrchovými buňkami epidermu se nacházejí dvě vrstvy odlišných buněk – buňky mezofylové, které fixují  $\text{CO}_2$  mechanismem  $\text{C}_4$  a buňky pochev svazků cévních mechanismem  $\text{C}_3$  [ 8 ].

#### 1.4.2. CAM metabolismus

Je typ asimilace, při kterém se uplatňují  $\text{C}_4$  i  $\text{C}_3$  fixační mechanismy. Pro rostliny z čeledi tučnolistých je charakteristický rytmus den/noc v obsahu  $\text{C}_4$ -karboxylových kyselin, zejména malátu. Přes noc se hromadí produkt fixace, malát, vznikající při  $\text{C}_4$ -cestě z OAA a ukládá se do vakuol. Ve dne dochází k jeho dekarboxylaci a uvolněný  $\text{CO}_2$  vstupuje do Calvinova cyklu. V CAM typu rostlin fixuje atmosferický kyslík během noci. Během následujícího dne je  $\text{CO}_2$  uvolněn jako zdroj uhlíku pro Rubisko [ 8 ].

#### 1.5. Rostlinný NADP–ME

Fotosyntetické NADP–ME se nacházejí v  $\text{C}_4$  rostlinách a to v chloroplastech v buňkách pochev cévních svazků a cytoplazmě CAM rostlin, zatímco nefotosyntetické NADP–ME, vyskytující se v různých rostlinách, jsou buď plastidické nebo cytoplazmatické. U rostlin existuje několik isoform, které lze dělit podle účasti na fotosyntéze a lokalizaci v buňce[ 1 ]:

##### 1. $\text{C}_{4(1)}$ –NADP–ME

Tato isoforma se nachází v některých  $\text{C}_4$  rostlinách jako je například kukuřice, cukrová třtina a čirok , kde je využívána pro dekarboxylaci malátu v buňkách pochev cévních svazků v chloroplastech. Produkt  $\text{CO}_2$  je fixován v Rubisko. Tato isoforma byla nejvíce studována v kukuřičných listech.

##### 2. $\text{C}_{4(2)}$ –NADP–ME

Je nefotosyntetická isoforma NADP–ME vyskytující se v plastidech  $\text{C}_4$  rostlin byla identifikována v jednoděložné kukuřici a v dvouděložné *Flaveria bidentis*.

V kukuřici, byl  $C_{4(2)}$ -NADP-ME izolován z etiolovaných listů a kořenů (tj. listy a kořeny pěstované za tmy, bez možnosti fotosyntézy). Tento enzym souvisí s obrannou odpovědí rostliny.

### 3. $C_{4(3)}$ -NADP-ME

V  $C_4$  rostlinách se NADP-ME vyskytuje v cytoplazmě.

### 4. $CAM_{(1)}$ -NADP-ME

Některé CAM rostliny používají tento cytoplazmatický NADP-ME spolu s mitochondriálním NADP-ME k dekarboxylaci malátu, který je uskladněn během noční fixace ve vakuolách. Uvolněný  $CO_2$  pak vstupuje do pentosofosfátového cyklu ve dne. Je fotosyntetickou formou NADP-ME. Přestože má tento enzym analogickou funkci jako  $C_{4(1)}$ -NADP-ME, tak se oba enzymy liší v buněčné lokalizaci.

### 5. $CAM_{(2)}$ -NADP-ME

Je nefotosyntetická isoforma NADP-ME nalezená v některých fakultativních a obligátně fakultativních CAM rostlinách jako je kosmatec křišťálový (*Mesembryanthemum crystallinum*) nebo *Aloe arborescens*. Kosmatec křišťálový přechází z  $C_3$  metabolismu na CAM pouze v případě, je-li vystaven solnému stresu či stresu suchem.

### 6. $C_{3(1)}$ -NADP-ME

Je nefotosyntetická isoforma NADP-ME nacházející se v cytoplazmě některých  $C_3$  rostlin jako jsou fazole, topol, grep, rajčata a *Apium graveolens*. NADP-ME v tkáních rajčat a grepu byl nalezen v respiračním řetězci během dozrávání plodů, kde je poskytovatelem pyruvátu a/nebo NADPH jako substrátu pro respiraci.

### 7. $C_{3(2)}$ -NADP-ME

Je plastidická forma NADP-ME vyskytující se v  $C_3$  rostlinách jako jsou rýže, rajčata, ovocné plody [ 1 ].

## 1.6. Živočišný NADP–ME

Ve tkáních savců byly popsány tři isoformy NADP-ME. Dvě isoformy jsou mitochondriální : NADP-dependentní isoforma (EC 1.1.1.40) a mitochondriální isoenzym (EC 1.1.1.39), který může využívat jak NADP<sup>+</sup> tak i NAD<sup>+</sup>, ale efektivněji pracuje s NAD<sup>+</sup>. Třetí isoforma je cytoplazmatická (EC 1.1.1.40) [ 9 ].

Cytosolový NADP-ME je zařazován mezi lipogenní enzymy, je exprimován v játrech a tukové tkáni, kde poskytuje NADPH pro biosyntézu mastných kyselin s dlouhým řetězcem a steroidů. Tento enzym může být indukován dietou bohatou na sacharidy [11].

Mitochondriální NADP-ME (EC 1.1.1.40) se nachází ve tkáních s nízkou schopností dělení buněk např. v srdci, svalech a mozku. U cytosolové isoformy NADP-ME z holubích jater je známa krystalová struktura [13].

## 2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo izolovat rostlinný homogenní enzym NADP–dependentní malátdehydrogenasu dekarboxylační (EC 1.1.1.40) ze semen kukuřice pro přípravu protilátek proti NADP-ME imunizací králíka.

Zjistit zastoupení tohoto enzymu v různých tkáních kapra obecného.

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Rostlinný materiál

Kukuřice setá (*Zea mays*)

#### 3.2. Živočišný materiál

Kapr obecný

#### 3.3. Chemikálie

Akrylamid – Sigma, USA, p.a.

ATP – Sigma, USA, 98%

Bradfordovo činidlo – Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R 250, G 250 – Sigma, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS) – Serva, Německo, p.a.

Dithiothreitol (DDT) - Sigma, USA, p.a.

L-malát -. Sigma, USA, 99%

NADP – Sigma, USA, 96%

N,N,N',N', – tetramethylenethylendiamin (TEMED) – Serva, Německo, 99%

N,N'-metylen-bis-akrylamid – Serva, Německo, p.a.

Nitroblue tetrazolium chlorid – Sigma, USA, p.a.

Polyvinylpolypyrrolidon (PVP) – Sigma, USA, 99%

Phenazin methosulfát – Sigma, USA, p.a

Standardní proteiny pro SDS elektroforesu o relativní molekové hmotnosti 36 000-205 000 – Sigma, USA

Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Serva, Německo 99%

Ostatní chemikálie – Lachema, ČR

### **3.4. Přístroje**

Analytické váhy 100 A – Denver instrument Company, USA

Spektrofotometr Ultrospec 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

Centrifuga – Hettich, Německo

Elektroforetická souprava – Biometra, Německo

PH metr Ultrabasic UB 10 – Denver instrument Company, USA

Elektromagnetická míchačka KMO 2 basic – Labortechnik, Německo

### **3.5. Izolační postup NADP-ME ze semen kukuřice**

#### **3.5.1. Příprava extraktu**

Po homogenizaci (pomocí mixéru) semen kukuřice se extrahovalo přesně zvážené množství kukuřičné moučky (přibližně 100 g) s trojnásobným množstvím chlazeného extrakčního pufru A obsahujícího 100 mmol l<sup>-1</sup> Tris- HCl (pH 7,8), 1 mmol l<sup>-1</sup> DTT, 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, 5 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol. K homogenátům byl přidán 1 g PVP a poté byly centrifugovány při 9000 RPM (9400 x g) při 4°C po dobu 30 minut. Supernatant byl označen jako hrubý extrakt.

Po odebrání několika čerstvých kapřích vzorků ( jikry, játra, tuk, nervy, svaly, srdce, žábry) se vzorky homogenizovaly s dvojnásobným množstvím extrakčního pufru A obsahujícího 100 mM Tris – HCl (pH 7,8). K jaterní tkáni byl přidán pouze jednonásobek pufru . Měkké tkáně a orgány byly homogenizovány pomocí třecí misky, tvrdé tkáně byly homogenizovány pomocí homogenizátoru. Dále, stejným způsobem byl homogenizován (ve třecí misce) s dvojnásobným množstvím pufru vzorek listu kukuřice. Vzorek listu kukuřice byl zředěn sedmkrát. Poté byly vzorky centrifugovány při 15 000 RPM (16 600 x g) při 4°C po dobu 15 minut.

#### **3.5.2. Srážení síranem amonným**

Dle celkového objemu supernatantu získaného po první centrifugaci byl vzorek srážen síranem amonným do 0 – 35% nasycení. Poté byla provedena opět centrifugace při 9000 RPM při 4°C po dobu 30 minut.

Dále bylo provedeno dle celkového objemu supernatantu další srážení síranem amonným do 35 – 55% nasycení. Opět byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Po resuspendaci sedimentů v pufru B byla změřena aktivita při 340 nm v pětkrát zředěném vzorku.

#### **3.5.3. Dialýza**

Sedimenty získané po srážení síranem amonným v rozsahu 35-55% nasycení byly resuspendovány na celkový objem 8 ml pufrům B , který obsahoval 25 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7,8), 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> DTT; 1 mmol.l<sup>-1</sup> , EDTA, 5% glycerolu a dialyzovány v 1 l pufru B při 4 °C přes noc.



### 3.5.4. Ionexová chromatografie

Chromatografie na měničích iontů neboli ionexová chromatografie je určena pro separaci látek nesoucích náboj. Při výměně iontů se ionty, které jsou elektrostaticky vázány k pevnému a chemicky inertnímu podkladu reversibilně vyměňují za ionty z roztoku. Afinita iontů k ionexu není stejná, ale závisí na velikosti náboje a na poloměru hydratovaného iontu [ 26 ].

Odsolený vzorek po dialýze byl aplikován na sloupec DEAE- celulosy (o velikosti 1,5 x 10 cm) ekvilibrovaný pufrem B. Po promývání pufrem B byla provedena eluce lineárním gradientem NaCl v pufru B (0-300 mmol.l<sup>-1</sup>) průtokovou rychlostí 1 ml/min. Ve všech frakcích byla změřena absorbance při 280 nm a ve vybraných frakcích aktivita NADP–ME při 340 nm . Slité aktivní frakce byly sraženy síranem amonným do 0 – 80% nasycení a poté byly centrifugovány při 9000 RPM při 4°C po dobu 30 minut. Sedimenty byly resuspendovány v minimálním množství pufru B (100 µl) a aplikovány na sloupec Sephacrylu S300.

### 3.5.5. Gelová chromatografie

GPC (z angl Gel permeation chromatography) je metoda dělení látek podle velikosti a tvaru jejich molekul tzv. molekulově síťový efekt. Někdy se uplatňuje i adsorpce dělených látek na povrchu gelu. Stacionární fáze je tvořena nerozpustným inertním gelem, který obsahuje póry. Velké molekuly nemohou proniknout do pórů gelu a jsou unášeny mobilní fází. Malé molekuly difundují do pórů gelu a jsou tak zpomalovány oproti molekulám velkým. Látky se eluují z kolony podle klesající molekulové hmotnosti[ 26 ].

Gelová chromatografie byla provedena na sloupci Sephacrylu S300 (velikost 1,5 x 30 cm). Eluce probíhala pufrem B průtokovou rychlostí 0,1 ml/min. V eluovaných frakcích byla změřena absorbance při 280 nm a stanovena aktivita NADP–ME při 340 nm.

### 3.5.6. Afinitní chromatografie

Je speciální metoda izolace biologicky aktivních látek. Využívá výjimečné biologické schopnosti některých látek – afinantů, ligandů či afinantních ligandů – specificky a reverzibilně vázat jiné látky. Afinant se kovalentní vazbou naváže na

vhodný nerozpustný inertní nosič. Princip dělení analytů při afinitní chromatografii: kolona se naplní nosičem s navázaným afinantem (v našem případě 2'5'ADP Sepharosa působí jako koenzym  $\text{NADP}^+$  enzymu NADP-ME) [26]. Enzym NADP-ME se v přítomnosti substrátu malátu a kofaktoru  $\text{Mg}^{2+}$  zachytí, látky bez afinity k použitému afinantu projdou kolonou nezadrženy. Eluce probíhá puforem, který potřebný malát a  $\text{Mg}^{2+}$  neobsahuje [23].

Chromatografická kolona (1 x 8 cm) obsahující nosič 2'5'ADP Sepharosy byla ekvilibrována adsorpčním puforem, který byl tvořen puforem B s  $5\text{mmol.l}^{-1}$  malátem. Po aplikaci vzorku, do kterého byl přidán  $5\text{mmol.l}^{-1}$  malát byla kolona opět promývána puforem B s  $5\text{mM}$  malátem. Eluce byla provedena puforem C ( tj. pufr B bez obsahu  $\text{Mg}^{2+}$ ) [23]. V eluovaných frakcích byla změřena absorbance při  $280\text{nm}$  a poté byla stanovena aktivita NADP-ME při  $340\text{nm}$ . NADP-ME aktivní frakce byly slity.

### 3.6. Měření enzymové aktivity NADP-ME

Enzymová aktivita NADP-ME v extraktu byla stanovena spektrofotometricky z rozdílu naměřených hodnot absorbance při  $340\text{nm}$  za dobu 3min. Měřeno bylo na spektrofotometru Ultrospec 2100 délka kyvety  $1\text{cm}$ , objem reakční směsi  $1\text{ml}$ . Reakce byla vždy odstartována přidáním příslušného množství substrátu.

Pro stanovení aktivity enzymu NADP-ME bylo využito reakce, v níž je malát, za spotřeby NADP, tímto enzymem dekarboxylován a vzniká pyruvát, oxid uhličitý a NADPH. Vznik redukovaného NADPH se projeví vzrůstem absorbance.

Reakční směs pro stanovení aktivity NADP-ME obsahovala vždy  $50\mu\text{l}$  extraktu, dále:  $100\text{mmol l}^{-1}$  Tris- HCl pufru ( $\text{pH } 7,4$ ),  $10\text{mmol l}^{-1}$  malát sodný,  $2\text{mmol l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0,2\text{mmol l}^{-1}$   $\text{NADP}^+$ .

### 3.7. Stanovení množství bílkovin

Bílkoviny byly stanoveny metodou Bradfordové, která je založena na změně absorpčního maxima ze  $465\text{nm}$  na  $595\text{nm}$  barvy Brilliant Blue po vytvoření komplexu

s proteinem. Množství proteinů se stanovuje spektrofotometricky při 595 nm. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 0,25 - 1,4 mg.ml<sup>-1</sup> [22].

### **3.8. Elektroforetické metody**

#### **3.8.1. Příprava vzorků pro elektroforetické separace**

Pro nativní elektroforézu byly připraveny extrakty z tkání a orgánů kapra obecného a extrakty listů a semen kukuřice. Vzorky byly nanесeny po 25  $\mu$ l ve 20% sacharose pomocí Hamiltonovy stříkačky.

Pro elektroforézu v SDS prostředí byl nanесen hrubý extrakt i extrakt po dialýze (pětkrát zředěný) v poměru 1:1 se vzorkovým pufrem, obsahujícím 130mM Tris – HCl pufr (pH 6,8), 100mM DTT, 70mM SDS, 20% glycerol, 0,005% bromfenolovou modř. Extrakty po DEAE-ionexové chromatografii, po gelové chromatografii a po afinitní chromatografii byly nejdříve sraženy: 200  $\mu$ l (resp. 300  $\mu$ l u afinitní chromatografie) s ledovým ethanolem, poté centrifugovány 15 000 RPM (16 600 x g), 15 min při 4°C a sedimenty byly resuspendovány s 15  $\mu$ l destilované vody a s 15  $\mu$ l vzorkového pufru a poté kvantitativně aplikovány.

#### **3.8.2. Elektroforéza nativní a v SDS prostředí**

Nativní elektroforéza byla provedena za účelem následné detekce NADP–ME enzymu v rostlinných a živočišných tkáních [10].

Nativní elektroforéza byla provedena v 6% separačním gelu (V = 15 ml), který obsahoval 6% akrylamidu a N,N'-methylen-bis (akrylamid); 3,8 ml 1,5 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl pufru (pH 8,8); 0,15 ml 10% glycerolu; 0,15 ml 10% persíranu amonného a 0,012 ml TEMED.

Dále byl použit 3% zaostřovací gel ( V = 4 ml), který obsahoval 3% akrylamid a N,N'-methylen-bis (akrylamid); 0.5 ml 1 5 mmol l<sup>-1</sup> Tris- HCl pufru (pH 6.8); 0.04 ml 10% glycerolu; 0.008 ml TEMEDU a 0.04 ml 10% persíranu amonného.

Použitý elektroforetický pufr obsahoval 18,8 g glycinu; 3g Tris a 10 ml 10% glycerolu ve 1000 ml destilované vody.

Před spuštěním elektroforézy bylo aplikováno do jamek 25  $\mu$ l vzorku ve 20% sacharose pomocí Hamiltonovy srůkačky. Elektroforetické dělení nejprve probíhalo při 70 V, po dosažení hranice separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 140 V [10].

SDS elektroforéza byla provedena podle Laemmliho [14 ] v 10% separačním gelu ( V = 15 ml), který obsahoval 10% akrylamid a N,N'-metylen-bis (akrylamid); 3,8 ml 1,5 mmol l<sup>-1</sup> Tris- HCl pufru (pH 8,8), 10% persíran amonný, 0,006 ml TEMEDU, 0,15 ml 10% SDS.

A v 5% zaostřovacím gelu ( V = 5 ml) obsahujícím 5% akrylamid a N,N'-metylen-bis (akrylamid); 0,63 ml 1 mmol l<sup>-1</sup> Tris- HCl pufru (pH 6,8); 0,05 ml 10% SDS; 0,05 ml 10% persíranu amonného a 0,005 ml TEMEDU.

Extrakty a standardní bílkoviny byly povařeny 5 min na vodní lázni, poté byly dávkovány po 10  $\mu$ l pomocí Hamiltonovy stříkačkou do elektroforetických jamek. Elektrodotový pufr obsahoval 18,8 g glycinu, 3 g Tris, 1g SDS v 1000 ml destilované vody. Elektroforetická separace probíhla při stejném napětí jako u nativní elektroforézy.

### **3.8.3. Detekce aktivity NADP–ME po elektroforéze**

Detekce NADP–ME probíhala za laboratorní teploty ve 20 ml inkubační lázni obsahující 8 ml 250 mmol . l<sup>-1</sup> Tris- HCl pufru (pH 7,4); 2 ml 100 mmol.l<sup>-1</sup> L – malátu; 2ml 100 mmol . l<sup>-1</sup> chloridu hořečnatého; 30 mg NADP<sup>+</sup> ; 2 ml 1 mg/ml nitroblue tetrazolium ; 50  $\mu$ l phenazin methosulfate [24].

### **3.8.4. Detekce proteinů v gelu**

Detekce proteinů probíhala v lázni obsahující 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250; 425 ml ethanolu; 50 ml methanolu; 100 ml kyseliny octové a 425 ml destilované vody. Po dostatečné vizualizaci následovalo několikanásobné odbarvování roztokem obsahující methanol, kyselinu octovou a redestilovanou vodu v poměru 25 :10 :65.

## 4. Výsledky

### 4.1. Izolace enzymu NADP-ME ze semen kukuřice

Ze semen kukuřice byl podle izolačního postupu izolován enzym NADP-ME, jehož aktivita byla měřena po jednotlivých izolačních krocích. Byla tedy změřena aktivita hrubého extraktu, aktivita NADP-ME v resuspendovaných sedimentech po srážení síranem amonným, aktivita NADP-ME ve vzorku po dialýze, aktivita NADP-ME po ionexové chromatografii na sloupci DEAE-celulose, aktivita NADP-ME po gelové chromatografii a aktivita NADP-ME po afinitní chromatografii. Výsledky jsou uvedeny ve formě izolační tabulky (Tab. 1).

Aktivita sledovaného enzymu byla jednak vyjádřena na jednotku objemu a jednak na množství bílkovin přítomných v extraktech tedy jako specifická aktivita. Množství bílkovin bylo stanoveno metodou podle Bradfordové. Obr. 7 znázorňuje kalibrační přímku, podle které bylo určeno množství bílkovin ve vzorcích. V každém izolačním kroku bylo vypočítáno celkové množství proteinu. Výsledky jsou uvedeny ve formě tabulky (Tab.1) .

### 4.2. Sledování hodnot aktivity NADP-ME v průběhu izolačního postupu

Celkové množství proteinů po jednotlivých izolačních krocích postupně klesalo z 543 mg proteinu až na 1 mg proteinů (Tab. 1). Naopak specifická aktivita v průběhu izolace stoupala.

Prvním izolačním krokem bylo měření aktivity v hrubém extraktu ze semen kukuřice. V tomto vzorku bylo velké množství bílkovin a specifická aktivita byla nízká (Tab. 1).

Po srážení síranem amonným nejdříve do 0-35% nasycení a poté do 35-65% nasycení se výrazně snížilo množství celkových bílkovin ve vzorku (Tab. 1). Dalším izolačním krokem byla dialýza. Aktivita vzorku po dialýze byla měřena v pětkrát zředěném vzorku.

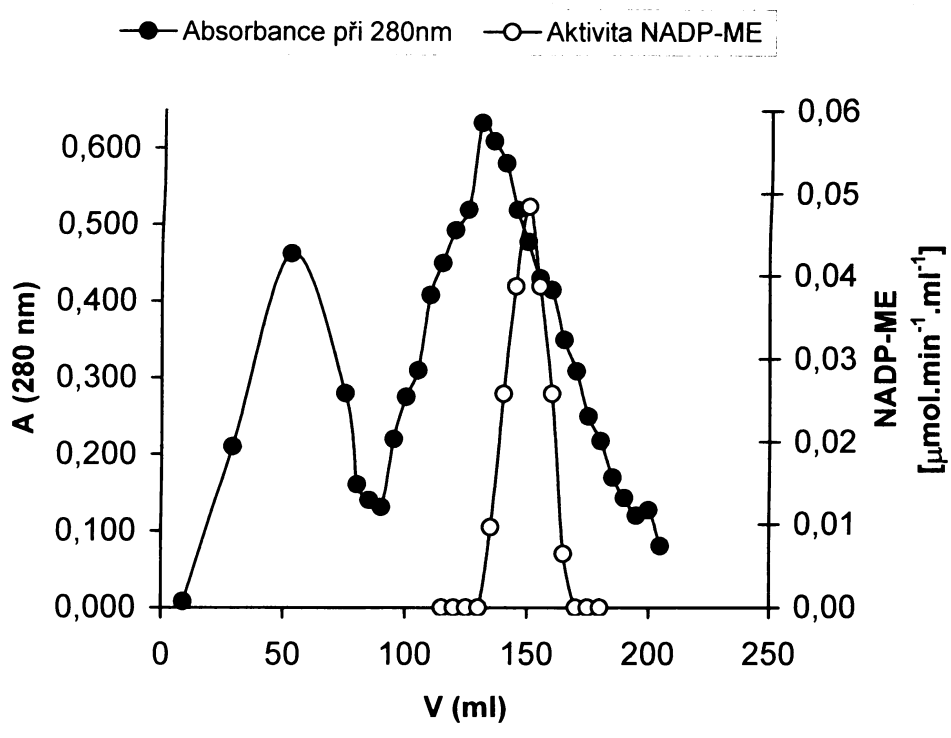
Při ionexové chromatografii na sloupci DEAE-celulose se enzym NADP-ME eluoval na konci gradientu 0,3 mol. l<sup>-1</sup> NaCl. Po ionexové chromatografii se změnila absorbance ve všech frakcích při 280 nm. Ve frakcích, které vykazovaly vysokou

absorbanci byla změřena aktivita NADP-ME při 340 nm. Závislost absorbance a aktivity na elučním objemu NADP-ME znázorňuje graf (Obr. 1 ). Chromatografický vrchol má zde symetrický průběh, což nasvědčuje o přítomnosti jedné isoformy. Také při gelové chromatografii došlo k eluci NADP-ME v jedné frakci (Obr. 2).

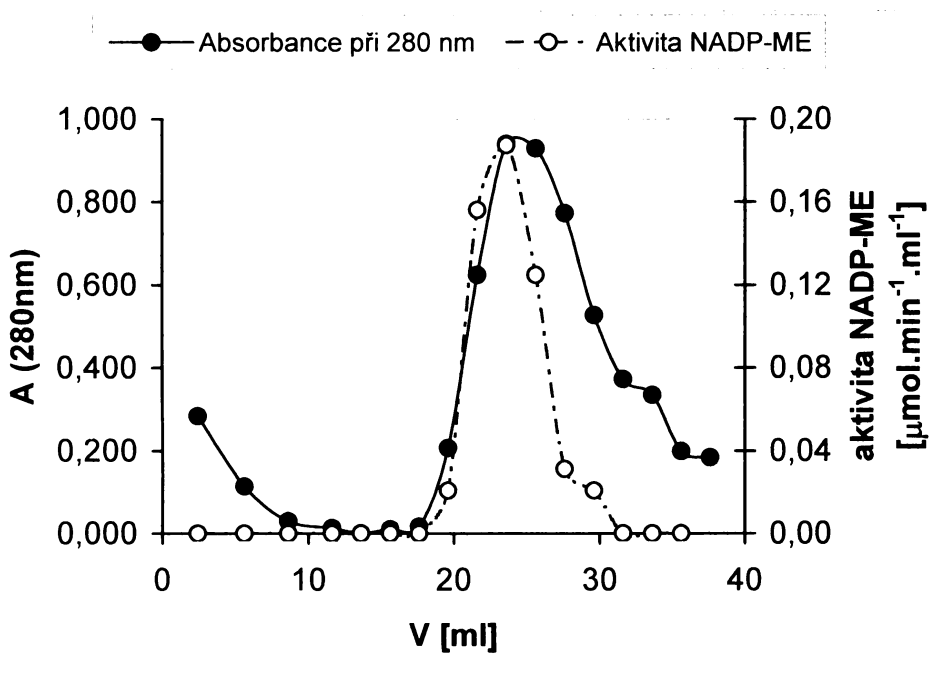
Posledním isolačním krokem byla afinitní chromatografie na sloupci 2'5'ADP Sepharosy. Při tomto procesu došlo k výraznému načištění vzorku, množství celkových bílkovin značně kleslo (Obr. 3, Tab. 1).

Izolační krok	aktivita	V	celk. aktivita	Množství bílkovin	Specifická aktivita	Celkové množství proteinu
	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	[mg/ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]	[mg]
<b>hrubý extrakt</b>	0,023	186	4,200	2,92	<b>0,0077</b>	543
<b>po srážení</b>	0,339	8,5	2,879	16,25	<b>0,0208</b>	138
<b>po dialýze</b>	0,258	11	2,839	11,60	<b>0,0222</b>	128
<b>po ionexové chrom.</b>	0,039	40	1,548	1,06	<b>0,0365</b>	42
<b>po gelové chrom.</b>	0,048	18	0,871	1,08	<b>0,0448</b>	19
<b>po afinitní chrom.</b>	0,055	9	0,494	0,10	<b>0,5458</b>	1

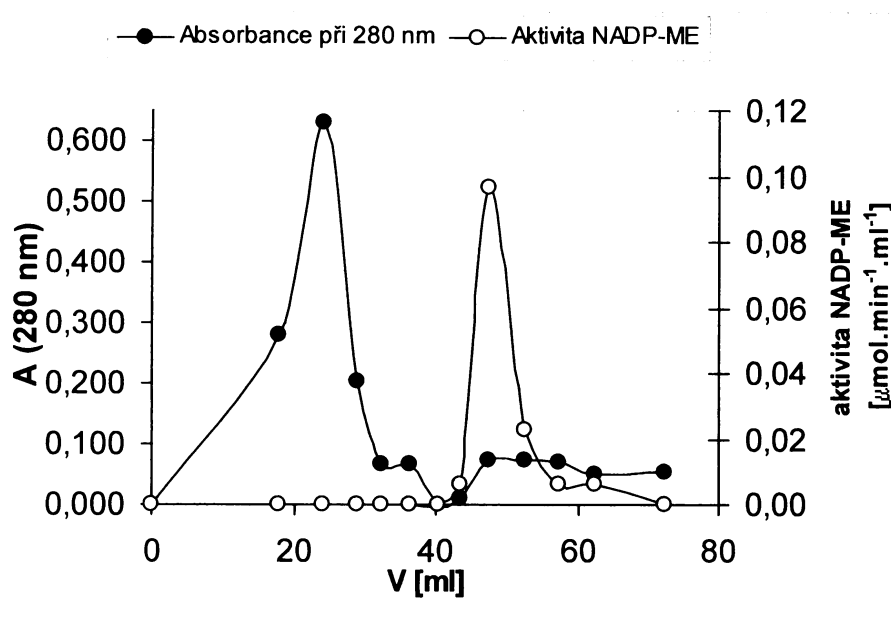
**Tabulka 1:** Izolační tabulka enzymu NADP-ME ze semen kukuřice přítomná v jednotlivých purifikačních krocích. Pro jednu izolaci bylo použito 100 g kukuřičné moučky.



**Obr.1:** Separace NADP-ME ionexovou chromatografií na sloupci DEAE-celulosity



**Obr.2:** Separace NADP-ME gelovou chromatografií na nosiči Sephakryl S300



**Obr.3:** Separace NADP-ME afinitní chromatografií na sloupci 2'5'ADP-Sepharosy

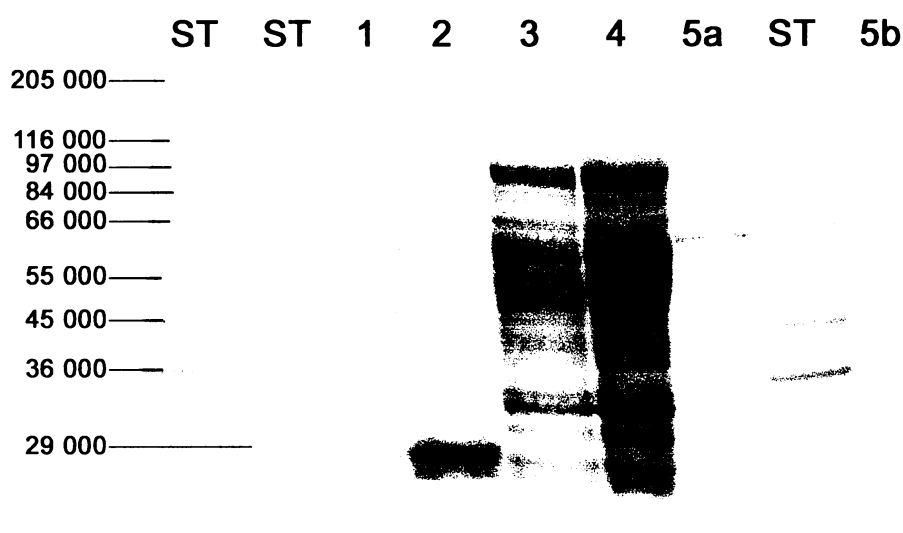
#### 4.3. Sledování obsahu proteinů v průběhu izolace pomocí elektroforetické separace v přítomnosti SDS

Se vzorkem hrubého extraktu ze semen kukuřice a dalšími 4 vzorky získanými během jednotlivých izolačních kroků byla provedena elektroforetická separace v přítomnosti SDS. Vzhledem k množství bílkovin bylo třeba vzorek po srážení síranem amonným a následné dialýze 5x zředit, zatímco vzorky po chromatografiích naopak zakonzentrovat.

Z Obr. 4 je patrné, že v hrubém extraktu (dráha 1), vzorku po srážení síranem amonným a následné dialýze (dráha 2), vzorku po ionexové chromatografii (dráha 3) a ve vzorku po gelové chromatografii (dráha 4) je přítomno mnoho proužků, což značí vysoký obsah kontaminujících proteinů. V posledním izolačním kroku došlo k velkému načištění a vzorek po afinitní chromatografii obsahuje pouze jeden proužek (dráha 5). K určení relativní molekulové hmotnosti proteinu, který odpovídá tomuto proužku byl použit program Elfoman (Obr. 5), podle kterého byla s pomocí standardních proteinů a



načištění a vzorek po afinitní chromatografii obsahuje pouze jeden proužek (dráha 5). K určení relativní molekulové hmotnosti proteinu, který odpovídá tomuto proužku byl použit program Elfoman (Obr. 5), podle kterého byla s pomocí standardních proteinů a relativní molekulové pohyblivosti určena relativní molekulová hmotnost izolovaného proteinu 65 000.



**Obr.4:** Elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS v 10% polyakrylamidovém gelu

ST: Standardní proteiny o relativní molekulové hmotnosti 29 000 – 205 000

**Dráha 1:** Vzorek hrubého extraktu semen kukuřice (42  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)

**Dráha 2:** Vzorek po srážení síranem amonným, 35–55% nasycení a po následné dialýze (39  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)

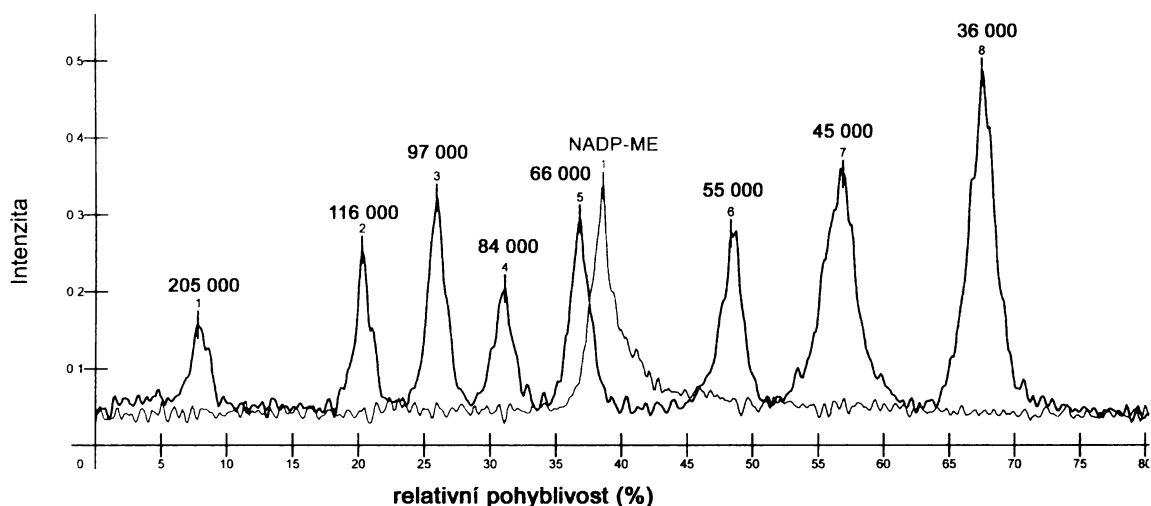
**Dráha 3:** Vzorek po ionexové chromatografii na nosiči DEAE-celulose (96  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)

**Dráha 4:** Vzorek po gelové chromatografii na nosiči Sephacryl S300 (188  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)

**Dráha 5:** Vzorek po afinitní chromatografii na sloupci 2'5'ADP Sepharose 4B

A – NADP-ME aktivní frakce (48  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)

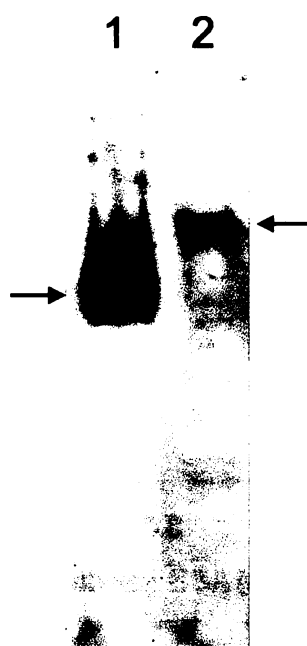
B – nezachycená frakce (210  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)



**Obr. 5 :** Zjištění relativní molekulové hmotnosti proteinu získaného izolací. Vyhodnocení bylo provedeno po SDS elektroforéze z obr. 4 pomocí programu Elfoman. Černá křivka odpovídá standardním proteinům. Modrá křivka odpovídá vzorku NADP-ME po afinitní chromatografii na sloupci 2'5'ADP-Sepharosy.

#### 4.4. Zjištění isoenzymového složení kukuřičného NADP-ME nativní elektroforézou

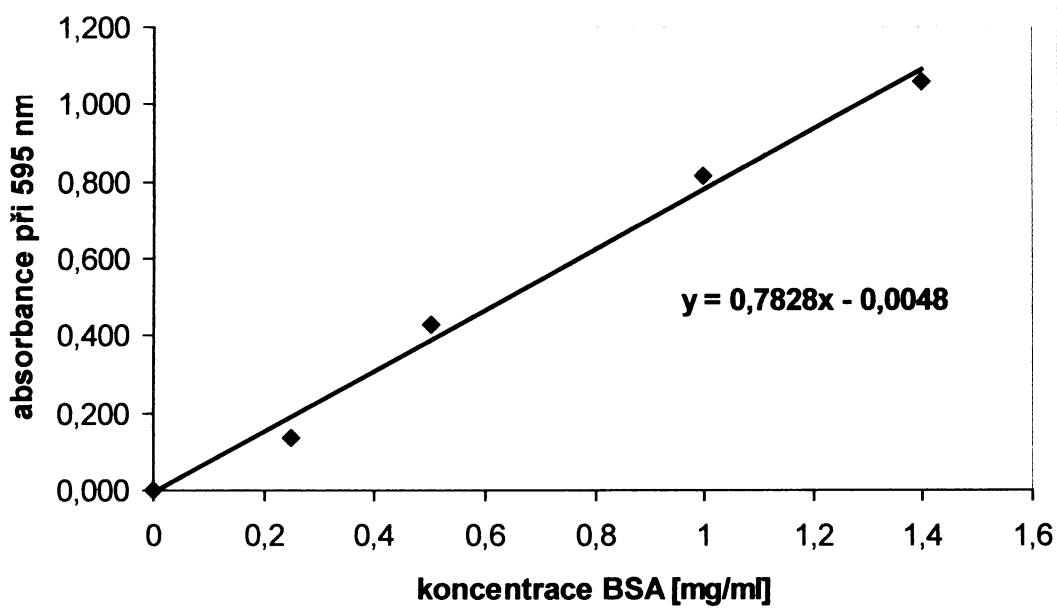
V hrubých extraktech z listů a semen kukuřice byl po nativní elektroforéze specificky detekován NADP-ME (Obr.6). Ve vzorku z listů kukuřice (dráha 1) je patrný jeden výrazný proužek, který svědčí o vysoké aktivitě NADP-ME a dva slabší proužky s menší relativní pohyblivostí. Ty by mohly znamenat přítomnost agregátů enzymu NADP-ME v listech kukuřice. V semenech kukuřice (dráha 2) je patrný pouze jeden proužek, pravděpodobně odpovídající jednomu isoenzymu.



**Obr.6:** Detekce aktivity NADP-ME po nativní elektroforéze v 6% polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek

**Dráha 1:** hrubý extrakt z listů kukuřice (292  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)

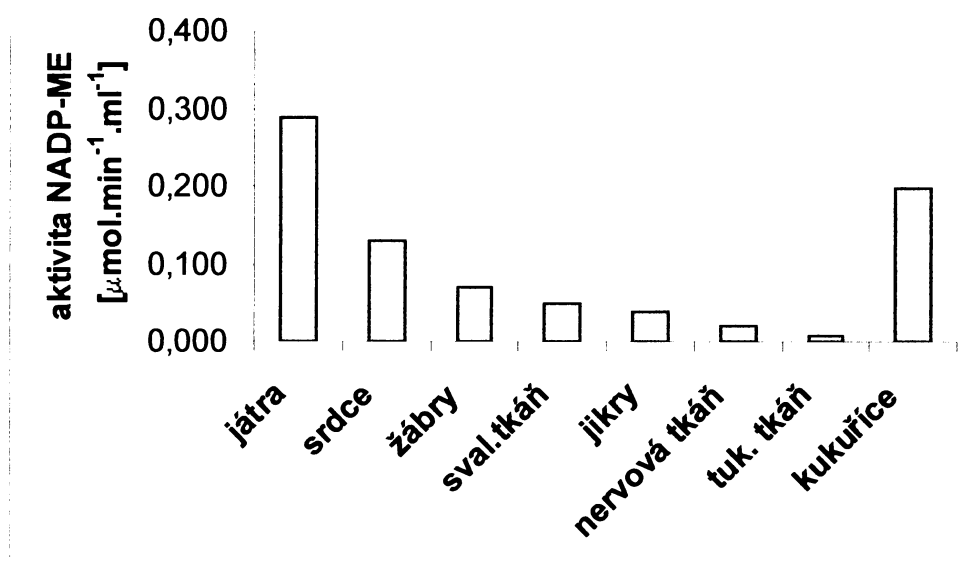
**Dráha 2:** hrubý extrakt ze semen kukuřice (58  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)



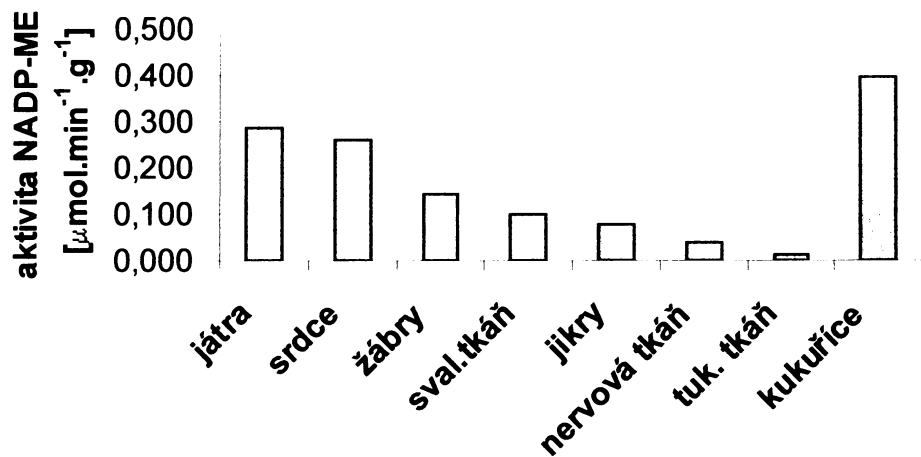
**Obr. 5:** Kalibrační přímka pro stanovení bílkovin metodou podle Bradfordové s použitím standardu BSA o koncentraci 0,25-1,4 mg/ml.

#### 4.5. Přítomnost živočišného NADP-ME v různých tkání kapra obecného

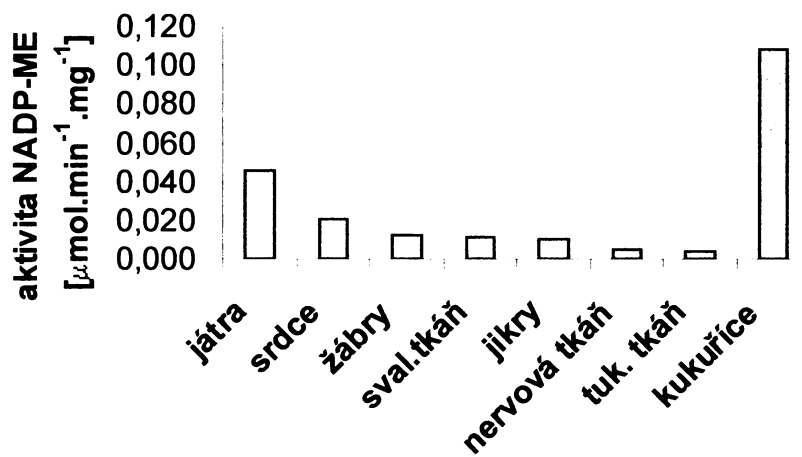
Ve tkáních z kapra obecného (jikry, játra, tuk, nervy, svaly, srdce, žábry) a ve srovnávacím vzorku z listu kukuřice byla stanovena aktivita NADP-ME, která byla přepočítána na jednotku objemu vzorku (Obr. 8), vztažena na čerstvou hmotnost (Obr. 9) a množství bílkovin, tedy vyjádřena jako specifická aktivita (Obr. 10). Ze všech obrázků vyplývá, že nejvyšší aktivita živočišného NADP-ME byla zjištěna v játrech a srdci, v listech kukuřice byla aktivita také vysoká. Množství rozpustných bílkovin bylo ve všech tkáních kromě tukové tkáně vyšší než v kukuřici (Obr.11).



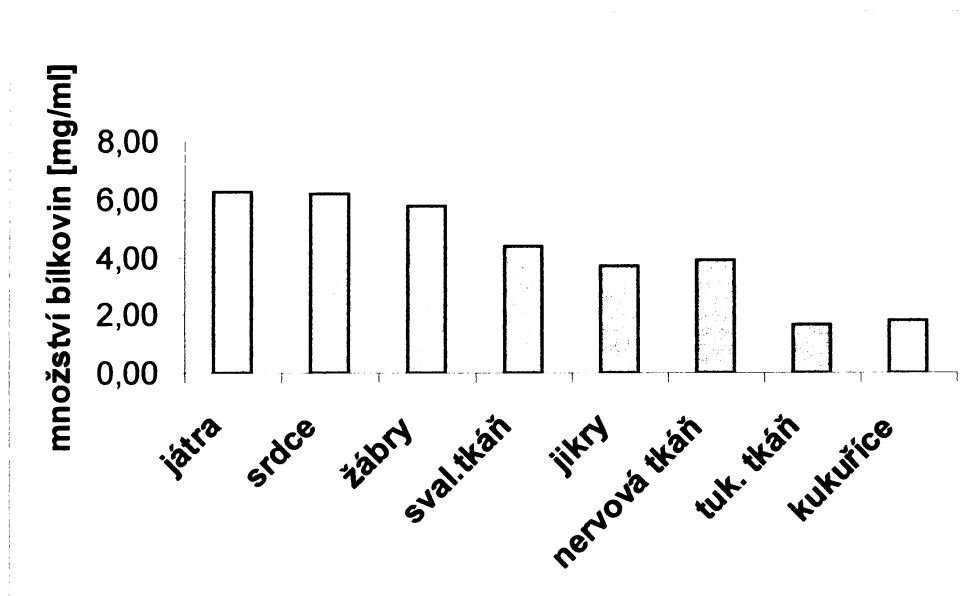
**Obr. 8:** Aktivita NADP-ME vztažená na jednotku objemu vzorku v jednotlivých tkáních z kapra obecného a v listech kukuřice.



**Obr. 9:** Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost vzorku v jednotlivých tkáních z kapra obecného a v listech kukuřice.



**Obr.10:** Specifická aktivita NADP-ME v jednotlivých tkáních z kapra obecného a v listech kukuřice.

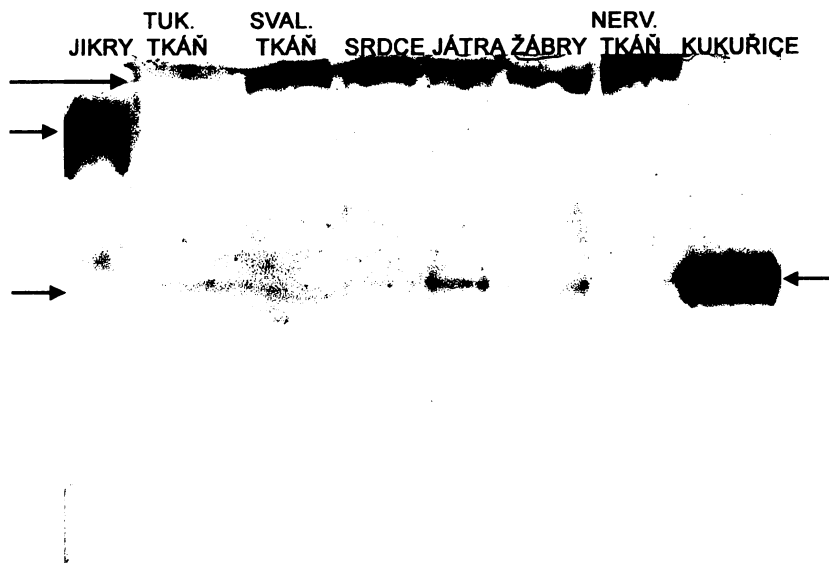


**Obr.11:** Množství rozpustných bílkovin v jednotlivých tkáních z kapra obecného a v listech kukuřice.

#### **4.6. Sledování obsahu proteinů v různých tkáních kapra obecného elektroforetickými metodami**

Přítomnost enzymu NADP-ME v různých tkáních kapra obecného byla ověřena pomocí specifické detekce tohoto enzymu po provedené nativní elektroforéze. Inkubační gelu v reakční směsi se vytvořily dva proužky: jeden s velmi malou elektroforetickou pohyblivostí, druhý v úrovni proužku kukuřice. U vzorku jiker měl enzym větší pohyblivost. Jak naznačují šipky (Obr. 12).

Obsah proteinů ve vzorcích z kapra byl sledován pomocí SDS elektroforézy (Obr. 13).



**Obr. 12 :** Elektroforetická separace proteinů v nativním prostředí v 6% PAGE

- Dráha 1:** Vzorek hrubého extraktu z kapřích jiker (74 $\mu$ g rozpustných bílkovin živočišného extraktu)
- Dráha 2:** Vzorek hrubého extraktu z tukové tkáně (34 $\mu$ g rozpustných bílkovin živočišného extraktu)
- Dráha 3:** Vzorek hrubého extraktu ze svalové tkáně (88  $\mu$ g rozpustných bílkovin živočišného extraktu)
- Dráha 4:** Vzorek hrubého extraktu ze srdce (124  $\mu$ g rozpustných bílkovin živočišného extraktu)
- Dráha 5:** Vzorek hrubého extraktu z jater (125  $\mu$ g rozpustných bílkovin živočišného extraktu)
- Dráha 6:** Vzorek hrubého extraktu z žáber (115  $\mu$ g rozpustných bílkovin živočišného extraktu)
- Dráha 7:** Vzorek hrubého extraktu z nervové tkáně (78  $\mu$ g rozpustných bílkovin živočišného extraktu)
- Dráha 8:** Vzorek hrubého extraktu z listu kukuřice (36  $\mu$ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)





**Obr.13 č:** Separace vzorků tkání kapra obecného elektroforézou v prostředí SDS v 10% polyakrylamidovém gelu

**ST:** Standardní proteiny o relativní molekulové hmotnosti 29 000 – 97 000

**Dráha 1:** Vzorek hrubého extraktu z kapřích jiker (19  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin živočišného extraktu)

**Dráha 2:** Vzorek hrubého extraktu z tukové tkáně (18  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin živočišného extraktu)

**Dráha 3:** Vzorek hrubého extraktu ze svalové tkáně (22  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin živočišného extraktu)

**Dráha 4:** Vzorek hrubého extraktu ze srdce (31  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin živočišného extraktu)

**Dráha 5:** Vzorek hrubého extraktu z jater (32  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin živočišného extraktu)

**Dráha 6:** Vzorek hrubého extraktu z žáber (28  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin živočišného extraktu)

**Dráha 7:** Vzorek hrubého extraktu z nervové tkáně (18  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin živočišného extraktu)

**Dráha 8:** Vzorek hrubého extraktu z listu kukuřice (9  $\mu\text{g}$  rozpustných bílkovin rostlinného extraktu)

## 5. Diskuze

NADP-dependentní malátdehydrogenasa (dekarboxylační) EC 1.1.1.40 (NADP-ME, z angl. malic enzyme) je enzym, který se vyskytuje v eukaryotických i prokaryotických mikroorganismech, v rostlinných i živočišných buňkách [2]. NADP-ME se nachází ve všech typech rostlin. Nejdůležitější funkce rostlinného NADP-ME spočívá především v tom, že se poskytováním CO<sub>2</sub> u některých C<sub>4</sub> rostlin (kukuřice, cukrová třtina, čirok dvojbarevný) a CAM rostlin (Aloe, kosmatec křišťálový) podílí na fotosyntéze [1, 2]. Mezi další funkce, které plní i u C<sub>3</sub> rostlin, u kterých se na fotosyntéze nepodílí, patří regulace buněčného pH, podíl na zrání plodů a obranných mechanismech rostlin, případně další anaplerotické funkce [1, 2]. U živočichů je NADP-ME důležitý tím, že poskytuje NADPH pro lipogenezi. Jeho přítomnost byla nalezena v játrech, tukové tkáni, v srdci, svalech a v mozku [9, 11, 12, 13].

Stejně tak u rostlin je výskyt NADP-ME velmi široký. Nachází se v listech, stoncích, květech, plodech i kořenech [6].

Hlavním úkolem mé bakalářské práce byla izolace rostlinného NADP-ME, který by mohl být dále použit pro přípravu protilátek proti NADP-ME imunizací králíka. Jako zdroj enzymu byla použita semena kukuřice, jelikož kukuřice patří mezi C<sub>4</sub> rostliny s NADP-ME typem fotosyntézy. Přestože v hrubých extraktech ze semen kukuřice (Tab. 1 ) byla aktivita nižší než v hrubých extraktech z listů kukuřice (Obr. 10 ), byla pro izolaci vybrána semena. Důvodem je nepřítomnost enzymu Rubisko v semenech. Naopak v listech je Rubisko majoritním enzymem a jeho úplná separace je velmi obtížná, což by mohlo znamenat značnou kontaminaci izolovaného NADP-ME. Pracovala jsem s jemně rozemletými semeny v kukuřičnou moučku, kterou jsem extrahovala chlazeným extrakčním pufrem, aby nedocházelo ke ztrátě aktivity denaturací. K izolaci jsem použila 4 separační kroky zahrnující precipitační metodu (srážení síranem amonným z 35-55% nasycení) jako první krok izolace, kterým se vzorek zbavil nerozpustných součástí a části bílkovin a 3 chromatografické metody (ionexovou, gelovou a afinitní chromatografií). Z chromatogramů je patrné (Obr. 1, 2, 3), že při všech chromatografických separacích se NADP-ME eluoval jako jeden symetrický vrchol, což naznačuje přítomnost jedné izofomy. Provedla jsem celkem 3 izolace NADP-ME, při čemž jsem získala 27 ml enzymového preparátu o specifické aktivitě 0,548 μmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>, obsah bílkovin byl v jednotlivých izolacích byl okolo

0,1 mg/ml. Hodnota specifické aktivity NADP-ME zhruba odpovídá specifické aktivitě NADP-ME nalezené v izolačních protokolech v literatuře [15, 16, 17]. Například purifikovaný enzym NADP-ME z *Ricinus communis* měl specifickou aktivitu 0,613  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  [15], NADP-ME z plodů rajčete získaný rovněž pomocí 2'5'-ADP Sepharosy měl specifickou aktivitu 0,51  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  [16]. O něco vyšší aktivitu měl NADP-ME izolovaný z listů kukuřice (71  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), avšak posledním krokem byla v tomto případě pouze gelová chromatografie [17]. Elektroforetická separace v přítomnosti SDS naznačuje čistotu mnou získaného enzymového preparátu (Obr. 4). Zatímco v hrubém extraktu a po prvních třech separačních krocích je přítomno mnoho proužků, které znamenají přítomnost většího množství proteinů, po 4. separačním kroku – afinitní chromatografii je patrný pouze jeden proužek, což svědčí o účinnosti afinitní chromatografie (Obr. 4 dráha 5a) a čistotě získaného preparátu. 2'5'-ADP-Sepharosa působí jako koenzym  $\text{NADP}^+$ , který v přítomnosti substrátu malátu a koenzymu  $\text{Mg}^{2+}$  afinitně váže NADP-ME, zatímco všechny ostatní látky, které nemají afinitu k  $\text{NADP}^+$  procházejí nezachycené (Obr 4 dráha 5b obsahující mnoho proužků). Elučním puforem bez obsahu  $\text{Mg}^{2+}$  a malátu byl NADP-ME eluován v jedné frakci, která po elektroforetické separaci obsahovala pouze 1 proužek, jehož relativní molekulová hmotnost byla pomocí standardů stanovena na 65 000. To je podobné relativní molekulové hmotnosti 66 000 zjištěného u nefotosyntetického enzymu z kukuřice [25].

Nativní elektroforézou s následnou detekcí aktivity NADP-ME byl v hrubém extraktu ze semen kukuřice zjištěn jeden proužek, který by odpovídal přítomnosti jedné isoformy. Isoforma ze semen kukuřice měla nižší elektroforetickou pohyblivost než isoforma přítomná v hrubém extraktu z listů kukuřice, oproti které byla také méně aktivní, což se projevilo slabším proužkem (Obr 6.)

V další části méj bakalářské práce jsem se zabývala živočišným NADP-ME z kapra obecného. Z literatury je známo, že se vyskytuje především v játrech. Např. byl NADP-ME izolován z holubích jater a byla získána jeho krystalová struktura [13]. Také lidský NADP-ME vstupuje do popředí zájmu především díky souvislosti se změnou jeho aktivity v tumorových buňkách [11, 12]. Měřením aktivity v hrubých extraktech jsem zjistila přítomnost NADP-ME v játrech, srdci, žlábrách, svalové tkáni, v jikrách a také v nervové a tukové tkáni kapra obecného (obr.8) Nejvyšší aktivita NADP-ME byla podle předpokladu nalezena v játrech a srdci. Výsledek měření aktivity NADP-ME *in*

*vitro* potvrdila i specifická detekce NADP-ME v gelu po provedené nativní elektroforéze. U všech vzorků kromě jiker se objevil jeden proužek s větší elektroforetickou pohyblivostí srovnatelnou s elektroforetickou pohyblivostí NADP-ME z hrubého extraktu listů kukuřice a druhý proužek s velmi malou pohyblivostí, přítomný na začátku separačního gelu (obr 12 ). To by mohlo souviset buď se špatnou schopností hrubých extraktů tkání obsahujících kontaminující látky (např. tuky) elektroforeticky se dělit v nativním stavu nebo s tvorbou agregátů NADP-ME. U jiker je patrný jeden proužek, který je o něco dále od začátku gelu. Také po SDS elektroforéze denaturující vzorek je patrné, že některé vzorky (např. vzorek z jater) se nerozdělily v jednotlivé proužky (obr.13 ). U jiných vzorků (ze svalové tkáně, ze srdce) je rozdělení proteinů vyhovující. Práce s živočišným NADP-ME by proto vyžadovala další optimalizaci přípravy vzorků.

Avšak důkaz přítomnosti enzymu NADP-ME v tkáních kapra, především v játrech, a to v poměrně vysoké koncentraci (Obr. 11 ) otevírá nové možnosti studia živočišného NADP-ME v naší laboratoři.

## 6. Závěr

1. Ze semen kukuřice jsem připravila jsem 27 ml enzymového preparátu obsahujícího NADP-ME o specifické aktivitě  $0,548 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ .
2. Po elektroforetické separaci v prostředí SDS bylo patrné, že tento enzymový preparát obsahuje pouze jeden proužek odpovídající podle standardních proteinů relativní molekulové hmotnosti 65 000, což odpovídá proteinu NADP-ME z kukuřice.
3. V různých tkáních kapra obecného (játrech, srdci, jikrách, žábrách, v nervové, tukové a svalové tkáni) jsem měřením aktivity a specifickou detekcí NADP-ME po nativní elektroforéze zjistila přítomnost enzymu NADP-ME.

## 7. Použitá literatura

- [ 1 ] Drincovich, M.F., Casati, P., Andreo, C.S.: FEBS Letters 490, 1 – 6 (2001)
- [ 2 ] Edwards, G.E., Andreo, C.S.: Phytochemistry 31, 1845-1857 (1992)
- [ 3 ] Honda, H., Akagi, H., Shimada, H.: Gene 243, 85-92 (2000)
- [ 4 ] Spampinato, C.P., Casati, P., Andreo, C.S.: Biochim. Biophys. Acta 1383, 245-252 (1998)
- [ 5 ] Maurino, V.G; Drincovich, M.F; ; Andreo, C.S.: Biochem. and Mol. Biol. Int. 38, 239-250 (1996)
- [ 6 ] Wedding, R.T.: Plant Physiol. 90, 367 – 371 (1989)
- [ 7 ] Maurino, V.G; Seigo, M.; ; Andreo, C.S.: Drincovich, M.F: Plant. Mol. Biol. 45, 409-420 (2001)
- [ 8 ] Barthová, J. : Biochemie základní kurz, Univerzita Karlova Praha (1999).
- [ 9 ] Bukato, G.; Kochan, Z.; Šwierczynsky, J.: Int. J. Biochem. Cell Biol. 27, 47-54 (1995)
- [ 10 ] Lee, D.H., Lee, Ch.B.: Plant Science 159, 75 - 85 (2000)
- [ 11 ] Loeber, G., Dworkin, M.B., Infante, A., Ahorn, H.: Febs Letters 344, 181-186, (1994)
- [ 12 ] Moreadith, R.W., Lehninger, A.L.: J. Biol. Chem. 259, 6215-6221, (1984)
- [ 13 ] Yang, Z., Zhang, H., Hung, H., Kuo, Ch., Tsai, L., Yuan, H., Chou, W., Chang, G., Tong, L.: Protein Science 11, 332-341, (2002)
- [ 14 ] Leammi, U.K.: Nature 227, str. 680 – 685 (1970)
- [ 15 ] Colombo, S.L., Andreo, C.S., Podestá, F.E.: Physiol. Plant. 101, 821-826 (1997)
- [ 16 ] Goodenough, P.W., Prosser, I.M., Young, K.: Phytochemistry 24, 1157 – 1162 (1985)
- [ 17 ] Asami, S., Inoue, K., Matsumoto, K., Murachi, A., Akazawa, T.: Arch. Biochem. Biophys. 194, 503-510 (1979)
- [ 18 ] Wheeler, M.C.G., Tronconi, M.A., Drincovich, M.F., Andreo, C.S., Flüge, U.I., Maurino, V.G.: Plant. Physiol. 139, 39-51 (2005)
- [ 19 ] Lara, M.V., Drincovich, M.F., Müller, G.L., Maurino, V.G., Andreo, C.S.: Plant Cell Physiol. 46, 997-1006 (2005)
- [ 20 ] Iglesias, A.A., Andreo, C.S.: Plant Physiol. 92, 66-72 (1990)
- [ 21 ] Casati, P., Lara, M.V., Andreo, C.S.: Plant. Physiol. 123, 1611-1621 (2000)
- [ 22 ] Bradford, M.M.: Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)
- [ 23 ] Skorkowski, E.F., Storey, K.B.: J. Chrom. 389, 427-432 (1987)
- [ 24 ] Maurino, V.G., Saigo, M., Andreo, C.S., Drincovich, M.F.: Plant Mol. Biol. 45, 409 – 420 (2001)

- [25] Saigo, M., Bologna, F.P., Maurino, V.G., Detarsio, E., Andreo, C.S., Drincovich, M.F.: *Plant Mol. Biol.* 55, 97-107 (2004)
- [26] Coufal, P., *Separáční metody, přednáška na P .F UK v Praze (2005-2006)*