

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO NA DENNÍ CHOD OBSAHU A AKTIVITY ENZYMU RUBISCO

IMPACT OF ELEVATED CONCENTRATION OF CARBON DIOXIDE ON DIURNAL CHANGES OF
RUBISCO ACTIVITY AND ITS CONTENT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

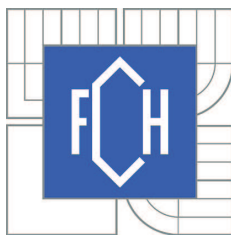
Bc. JANA ZÍTKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0580/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jana Zítková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na denní chod obsahu a aktivity enzymu Rubisco

Zadání diplomové práce:

V teoretické části práce pojednat o základních procesech fotosyntézy, enzymu Rubisco, vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na rostliny a o denním chodu obsahu a aktivity Rubisco u různých druhů rostlin.

V experimentální části sledovat změny obsahu, aktivity a aktivace enzymu Rubisco v průběhu dne u smrku ztepilého v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého. Z průběhu počáteční a celkové aktivity a obsahu Rubisco odvodit mechanismus regulace aktivity tohoto enzymu.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jana Zítková
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V jehlicích smrku ztepilého byly měřeny denní změny počáteční a celkové aktivity i obsahu enzymu ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasy/oxygenasy (Rubisco) v podmínkách normální ($A = 350 \mu\text{mol mol}^{-1}$) a zvýšené ($E = 700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) koncentrace CO_2 . Smrkové jehlice byly odebrány 22. 6. 2010 ve dvouhodinových intervalech od 3:30 do 22:30. Aktivita enzymu Rubisco byla stanovena spektrofotometricky, obsah enzymu Rubisco byl zjištěn metodou SDS-PAGE.

U většiny vzorků byly naměřeny statisticky významně nižší hodnoty aktivit v normální koncentraci CO_2 než ve zvýšené koncentraci CO_2 . Z grafů pro aktivitu lze také vyčíst nepřítomnost nočního inhibitoru CA1P. V době 7:00–17:30 byla aktivita přibližně přímo úměrná intenzitě fotosynteticky aktivní radiace.

Množství enzymu Rubisco bylo statisticky významně vyšší při normální koncentraci CO_2 než při zvýšené koncentraci CO_2 , což dokazuje aklimační depresi množství enzymu Rubisco při dlouhodobém působení zvýšené koncentrace CO_2 .

ABSTRACT

Diurnal changes of initial and total activity and content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) under conditions of ambient ($A = 350 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and elevated ($E = 700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) concentration CO_2 were measured in needles of Norway spruce. Needles of Norway spruce were taken on 22th July in two-hours from 3:30 a. m. till 10:30 p. m. The Rubisco activity was determined by spectrophotometry, the Rubisco content was detected by SDS-PAGE.

The Rubisco activity was in most samples statistically significantly lower in needles cultivated under ambient carbon dioxide than in needles cultivated under elevated carbon dioxide. Diagrams of the Rubisco activity shows absence of night inhibitor CA1P. The Rubisco activity was directly proportional to the intensity of photosynthetically active radiation in time from 7:00 a. m. till 7:30 p. m.

The Rubisco content was statistically significantly higher in needles of Norway spruce cultivated under ambient carbon dioxide than in needles cultivated under elevated CO_2 , which shows acclimation of the Rubisco content during long-term effect of elevated CO_2 concentration.

KLÍČOVÁ SLOVA

aktivita Rubisco, obsah Rubisco, zvýšená koncentrace CO_2 , smrk ztepilý

KEYWORDS

Rubisco activity, Rubisco content, elevated concentration of CO_2 , Norway spruce

ZÍTKOVÁ, J. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na denní chod obsahu a aktivity enzymu Rubisco*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 60 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis

Poděkování: Chtěla bych poděkovat vedoucímu diplomové práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení při vzájemné spolupráci a pomoc při tvorbě této práce.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 FOTOSYNTÉZA	8
2.1.1 <i>Reakce závislé na světle</i>	9
2.1.1.1 Propojení fotosystému I a II	10
2.1.2 <i>Reakce nezávislé na světle</i>	12
2.1.2.1 Fotorespirace	13
2.2 RIBULOZA-1,5-BISFOSFÁTKARBOXYLASA/OXYGENASA (RUBISCO).....	14
2.2.1 <i>Historie enzymu Rubisco</i>	15
2.2.2 <i>Struktura a podjednotky enzymu Rubisco</i>	15
2.2.3 <i>Mechanismus katalýzy a aktivace</i>	16
2.2.4 <i>Karboxylace a oxygenace</i>	17
2.3 VLV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE CO ₂ NA ROSTLINY	18
2.3.1 <i>Přímé účinky koncentrace CO₂ na rostliny</i>	18
2.3.1.1 Rychlost fotosyntézy	18
2.3.1.2 Fotorespirační rychlost.....	21
2.3.1.3 Průduchy a jejich vodivost	21
2.3.1.4 Dýchání a jeho rychlost.....	21
2.3.2 <i>Nepřímé účinky koncentrace CO₂ na rostliny</i>	21
2.3.2.1 Vliv teploty.....	21
2.3.2.2 Růst a vývoj rostlin	22
2.3.2.3 Hospodářský výnos rostlin	22
2.4 VLV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE CO ₂ NA DŘEVINY	23
2.5 METODY STANOVENÍ AKTIVITY RUBISCO	24
2.5.1 <i>Přímé stanovení aktivity Rubisco (in vitro)</i>	24
2.5.1.1 Spektrofotometrická metoda	24
2.5.1.2 Radiometrická metoda.....	25
2.5.2 <i>Nepřímé stanovení aktivity Rubisco (in vivo)</i>	25
2.5.2.1 Gazometrická metoda.....	25
2.6 METODY STANOVENÍ OBSAHU RUBISCO	26
2.6.1 <i>Gelová elektroforéza</i>	26
2.6.2 <i>Metoda PAGE-SDS</i>	27
2.6.3 <i>Kapilární elektroforéza</i>	28
2.6.4 <i>HPLC</i>	29
2.6.5 <i>Imunochemické metody</i>	29
2.6.5.1 Radioimunoprášecí metoda	29
2.6.5.2 Elisa.....	30
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1 MATERIÁL	32
3.2 SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA PRO STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMU RUBISCO	33
3.2.1 <i>Přístroje</i>	33
3.2.2 <i>Chemikálie</i>	33

3.2.3 Příprava roztoků	34
3.2.3.1 Zásobní roztok 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8	34
3.2.3.2 Zásobní roztok 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0	34
3.2.3.3 Aktivační roztok	34
3.2.3.4 Extrakční roztok	34
3.2.3.5 Roztok glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy	34
3.2.3.6 Roztok kreatinfosfokinasy	34
3.2.3.7 Roztok R5P	35
3.2.3.8 Roztok 3-fosfoglycerátkinasy	35
3.2.3.9 Pracovní roztok	35
3.2.4 Extrakce enzymu	35
3.2.5 Měření aktivity	35
3.2.5.1 Počáteční aktivita	35
3.2.5.2 Celková aktivita	35
3.2.6 Výpočet aktivity enzymu Rubisco	36
3.3 SDS-PAGE METODA PRO STANOVENÍ OBSAHU ENZYMU RUBISCO	37
3.3.1 Přístroje	38
3.3.2 Chemikálie	38
3.3.3 Příprava roztoků	38
3.3.3.1 Roztoky pro přípravu gelů	38
3.3.3.2 Pufry	39
3.3.3.3 Roztoky k vizualizaci bílkovin	39
3.3.4 Příprava gelů	39
3.3.4.1 Separační gel	39
3.3.4.2 Zaostřovací gel	40
3.3.5 Příprava standardu	40
3.3.6. Příprava vzorků	41
3.3.7 Elektroforéza	41
3.3.8 Vizualizace bílkovin	41
3.3.9 Vyhodnocení gelů	41
3.3.10 Výpočet hmotnosti enzymu Rubisco	42
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	44
4.1 VÝSLEDKY	44
4.2 DISKUZE	50
5 ZÁVĚR	53
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	54
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	60

1 ÚVOD

Enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco) je nejhojnější protein na Zemi a vytváří jediné kvantitativně významné spojení mezi zásobou anorganického a organického uhlíku v biosféře. Tento enzym katalyzuje karboxylaci D-ribulosa-1,5-bisfosfátu (RuBP) v prvním kroku Calvinova cyklu, popř. může dojít k oxygenaci RuBP, která vede k fotorespiraci. Katalytická účinnost Rubisco je velmi slabá ($k_{\text{cat}} = 2\text{--}12 \text{ s}^{-1}$) a fotosyntetické organismy obsahují až 50 % z celkového množství proteinu, aby se udržela přijatelná rychlost fotosyntézy [63].

Rubisco je klíčový enzym regulace fotosyntézy. Před samotnou katalýzou musí být reversibilně aktivován pomocí CO_2 a Mg^{2+} . Nejdříve se molekula CO_2 naváže uvnitř aktivního místa na ϵ -aminoskupinu lisylového zbytku K201 a dojde k procesu karbamylyace, po kterém následuje rychlé navázání Mg^{2+} . Pro aktivaci *in vivo* je nutná přítomnost aktivasy Rubisco [63].

Aktivita Rubisco závisí na obsahu enzymu a na míře aktivace aktivního místa. Obsah Rubisco se mění během dne v závislosti na obsahu specifických sacharidů (např. glukosy a sacharosy). Tzv. počáteční aktivita Rubisco se měří ihned v extraktech, které byly rychle připraveny a hodnoty této počáteční aktivity jsou menší než hodnoty aktivity celkové, která je měřená po inkubaci s CO_2 a Mg^{2+} . Poměr mezi počáteční a celkovou aktivitou Rubisco se nazývá stupeň aktivace a je mírou karbamylyace enzymu. Inkubací s CO_2 a Mg^{2+} nelze vytěsnit z aktivních míst enzymu pevně vázané inhibitory (např. CA1P a XuBP). Přítomnost těchto sloučenin v aktivních místech enzymu snižuje celkovou aktivitu a naopak, kolísání celkové aktivity je indikátorem inhibice enzymu Rubisco těmito inhibitory [63].

Vědci předpokládají, že do roku 2100 by se měla koncentrace CO_2 zvýšit až na $800 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. Lesní ekosystémy tvoří obrovskou zásobárnu uhlíku, proto změny vznikající následkem zvýšené koncentrace CO_2 mohou způsobit značné globální proměny v koloběhu uhlíku.

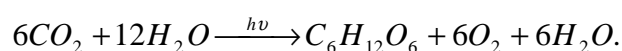
Se zvyšující se koncentrací CO_2 významně roste rychlost fotosyntézy a zároveň dochází k poklesu aktivit fotosyntetického aparátu. Ovšem při dlouhodobém působení oxidu uhličitého na rostliny se rychlost fotosyntézy snižuje v závislosti na vzrůstu koncentrace glukosy a fruktosy, což způsobí represi exprese fotosyntetických genů a následně tzv. aklimaci. Zároveň dochází k poklesu obsahu dusíku, rozpustných bílkovin a obsahu enzymu v listech.

V této diplomové práci byly měřeny denní změny počáteční a celkové aktivity, i obsahu enzymu Rubisco u smrku ztepilého v podmínkách normální a dvojnásobné koncentrace oxidu uhličitého. Vzorky jehlic byly odebírány v experimentálním kultivačním zařízení Centra výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i., které je podpořeno projektem LM2010007 - CzeCOS/ICOS - Národní infrastruktura sledování uhlíku.

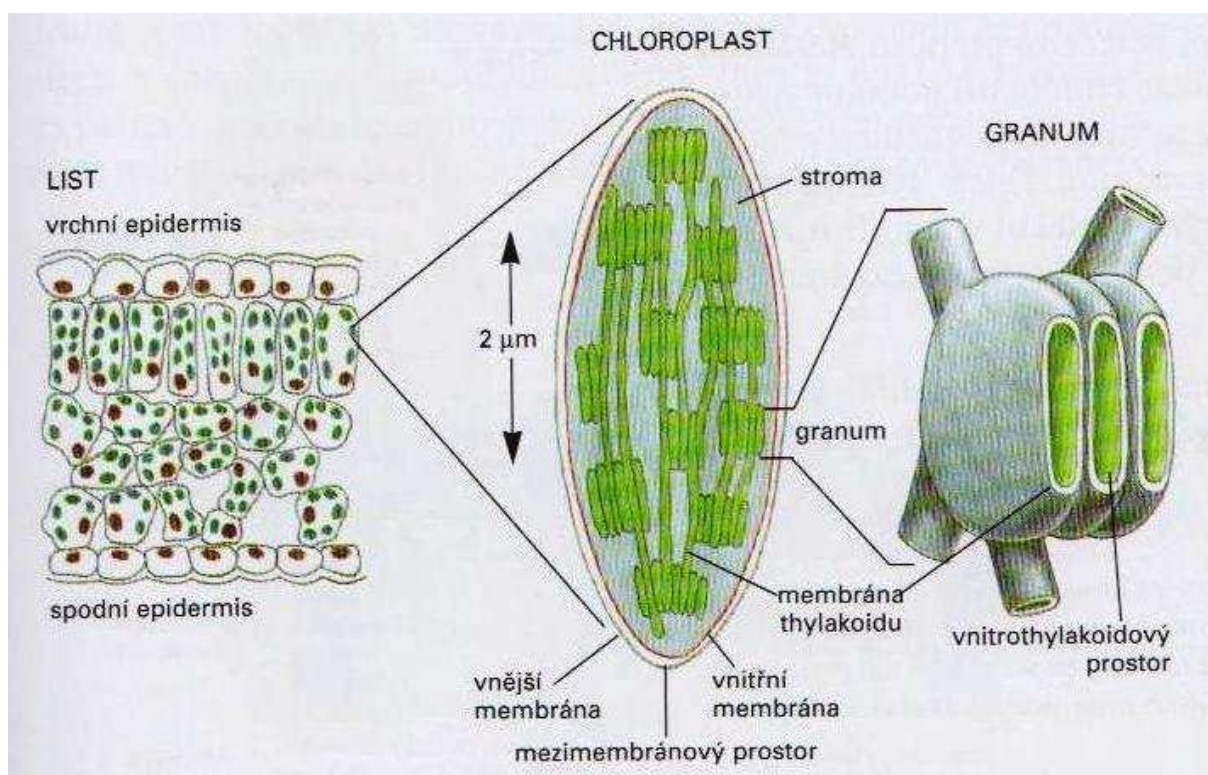
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je nejdůležitější děj probíhající v živé přírodě. Pro fotosyntézu je nepostradatelná světelná energie, která je rostlinami, sinicemi a některými bakteriemi přeměňovaná na energii chemickou. Je to silně endergonická reakce poháněná slunečním zářením, při které z nejjednodušší sloučeniny uhlíku o nízké energii, oxidu uhličitého, vznikají sacharidy s vysokou energií a zároveň dochází k produkci, pro nás nepostradatelného prvku, a to kyslíku [1,2]. Rovnice fotosyntézy je vyjádřena:



U vyšších rostlin a řas probíhá fotosyntéza v chloroplastu (obr. 1) a u prokaryot, které nemají vyhraněné buněčné organely, jsou tyto části buňky nazývány chromatofory. Počet chloroplastů se v buňce velmi liší, může být jeden, ale i 1 000 s rozmanitými velikostmi a tvary [2]. Nejčastěji je v buňkách listů obsaženo asi 20 chloroplastů elipsoidního tvaru asi 5 μm dlouhých. Chloroplasty se vyznačují prostupnou vnější obalovou membránou a naopak neprostupnou vnitřní membránou, které jsou odděleny mezimembránovým prostorem. Vnitřní výplň chloroplastu se nazývá stroma, což je koncentrovaný roztok enzymů. Ve stromatu se nachází třetí soustava membrán tzv. thylakoidy. Thylakoidy jsou na sebe naskládané ploché váčky vytvářející grana. Chloroplast průměrně obsahuje asi 50 gran [1].



Obr. 1: Struktura chloroplastu. (Převzato [3])

Fotosyntéza je rozdělena na dvě na sebe navazující fáze – světelnou a temnostní. Ve světelné fázi dochází k fotochemickému ději, přeměně energie fotonů slunečního záření na energii chemickou. Nejdříve dochází k přeměně energie záření na energii excitovaných elektronů, která se pomocí oxidoreduktas mění na makroergické sloučeniny – ATP (adenosintrifosfát, zdroj chemické energie) a NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukční činidlo) [1].

Světelná reakce probíhá díky fotosyntetickému aparátu, který se skládá ze tří částí:

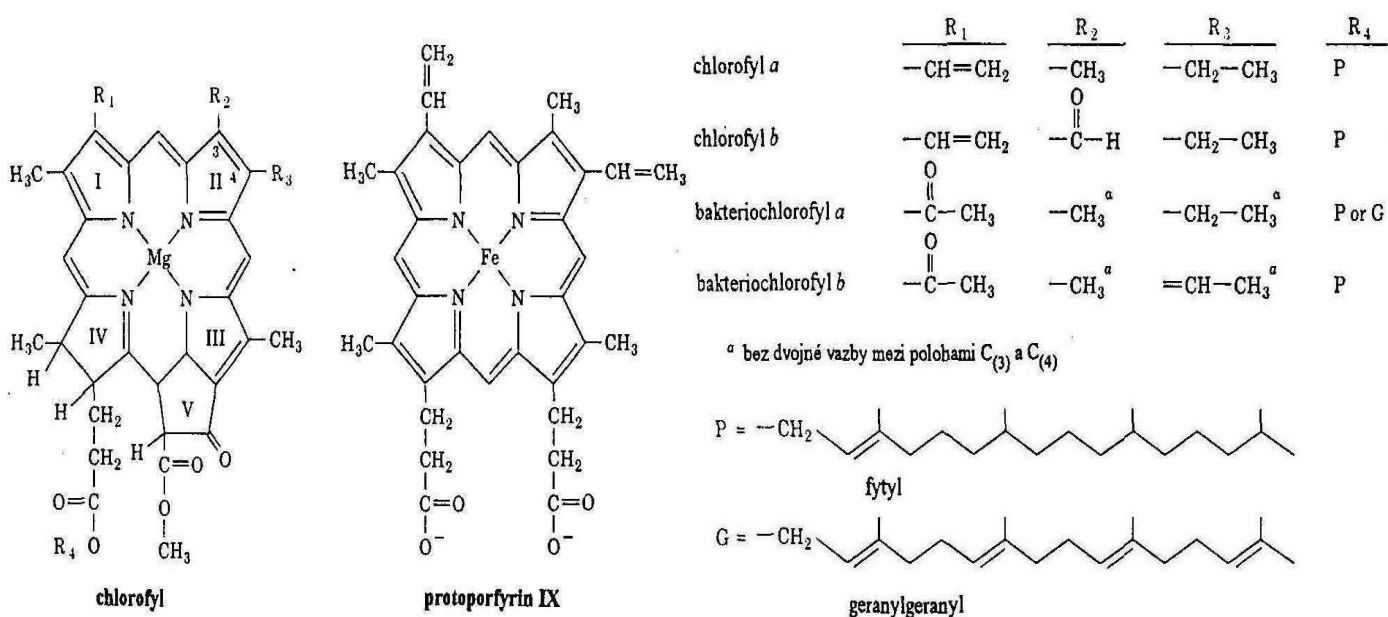
1. fotoreceptory, které obsahují pigmenty absorbující záření,
2. fotosyntetické reakční centrum, kde dochází k přeměně světelné energie na energii elektrickou (= excitace elektronů absorbovaným zářením),
3. řetězec oxidoreduktas, kde dochází k přeměně excitovaných elektronů na energii chemickou (vznik ATP a NADPH) [1].

Temnostní, nebo také temná fáze, probíhá současně se světelnou fází. Temnostní fáze je složena z několika enzymových reakcí využívající ATP a NADPH k redukci CO_2 a H_2O na sacharidy [1].

2.1.1 Reakce závislé na světle

Hlavním fotoreceptorem sluneční energie ve fotosyntéze je chlorofyl (obr. 2). Je to cyklický tetrapyrrol podobný hemu, od kterého se liší několika znaky:

1. centrálním iontem není Fe^{2+} nebo Fe^{3+} , ale ion Mg^{2+} ,
2. chlorofyl obsahuje cyklopentanonový kruh V těsně přiléhající k pyrrolovému kruhu III,
3. chlorofyl *a* (Chl *a*) a chlorofyl *b* (Chl *b*) mají z části redukovaný pyrrolový kruh IV, bakteriochlorofyl *a* (BChl *a*) a bakteriochlorofyl *b* (BChl *b*) mají z části redukované kruhy II a IV,
4. u Chl *a*, Chl *b* a BChl *b* je propionátový postranní řetězec na jádře IV esterifikován fytolem a u BChl *a* je u některých bakterií fytol a nebo geranylgeraniol [2].



Obr. 2: Strukturní vzorec chlorofylu „a“; „b“ a bakteriochlorofylu „a“; „b“. (Převzato [2])

Chlorofyl spolu s doprovodnými barvivy karoteny, xanthofyly; fykoerythrobiliny a fykocyanobiliny pohlcuje světlo a přenáší ho do fotosyntetických reakčních center tvořených chlorofylem *a*. Zde dochází k přeměně energie fotonů na elektrickou energii pomocí přechodu některých elektronů molekuly chlorofylu do hladiny o vyšší energii (centrum má nižší energii excitovaného stavu než okolní molekuly anténních barviv) [1].

Po excitaci elektrony opustí molekuly chlorofylu a ve fotosyntéze procházejí řadou přenašečů o stoupajícím redoxpotenciálu a vrátí se do základního stavu v molekule chlorofylu reakčního centra, která se tak stane schopnou znovu absorbovat fotony. Během cesty řadou přenašečů se část energie excitovaných elektronů použije k výrobě ATP a tento děj nazýváme fotofosforylace. Cyklická fotofosforylace je proces transportu elektronů, který začíná a končí v molekule chlorofylu reakčního centra, který je současně donorem i akceptorem elektronů. V cyklické fotofosforylaci dochází k přeměně světelné energie na energii elektrickou a ta se později transformuje na energii chemickou [1].

V necyklickém toku elektronů se energie, získaná světlem excitovaných elektronů, uloží do makroergické sloučeniny – NADPH. Necyklickým tokem je nazýván proto, že se excitované elektrony nevrací zpět do molekuly chlorofylu, ale jsou využívány k redukci NADP^+ a následně musí být chlorofyl uveden do původního stavu elektrony z oxidace nějaké vhodné sloučeniny. Necyklický tok je oxidoredukční proces, ve kterém dochází k přenosu dvou atomů vodíku ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) z redukovaného donoru na oxidovaný akceptor NADP^+ (donorem atomů vodíku je u vyšších rostlin voda) [1].

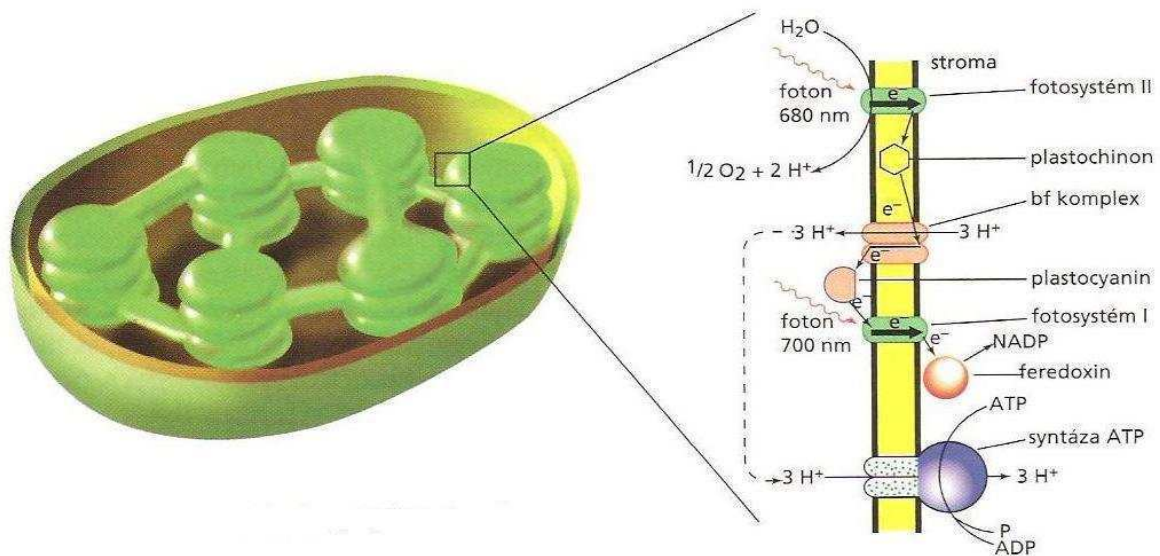
2.1.1.1 Propojení fotosystému I a II

Oxygenní fotosyntéza, ve které vzniká kyslík, je složena ze dvou fotosystémů zapojených za sebou. Ve fotosystému I (PSI) vzniká silné reduktans, které redukuje NADP^+ a současně slabé oxidans. Ve fotosystému II (PSII) vzniká silné oxidans, které oxiduje H_2O a současně slabé reduktans. Fotosystémy I a II (obr. 3) jsou propojeny a tvoří dvoustupňový proces, ve kterém slabé reduktans redukuje slabé oxidans. Oxygenní fotosyntéza probíhá na třech transmembránových bílkovinných komplexech, které jsou spojeny pohyblivými přenašeči elektronů. Jako první transmembránový bílkovinný komplex je PSII, dále komplex cytochromů b_6/f a poslední PSI. Cesta elektronu z H_2O na NADP^+ prochází nejprve přes plastochinon, který se redukuje na plastochinol a propojuje PSII s komplexem cytochromů b_6/f . Z komplexu cytochromů jsou elektrony přenášeny pomocí pohyblivé bílkoviny plastocyaninu [2].

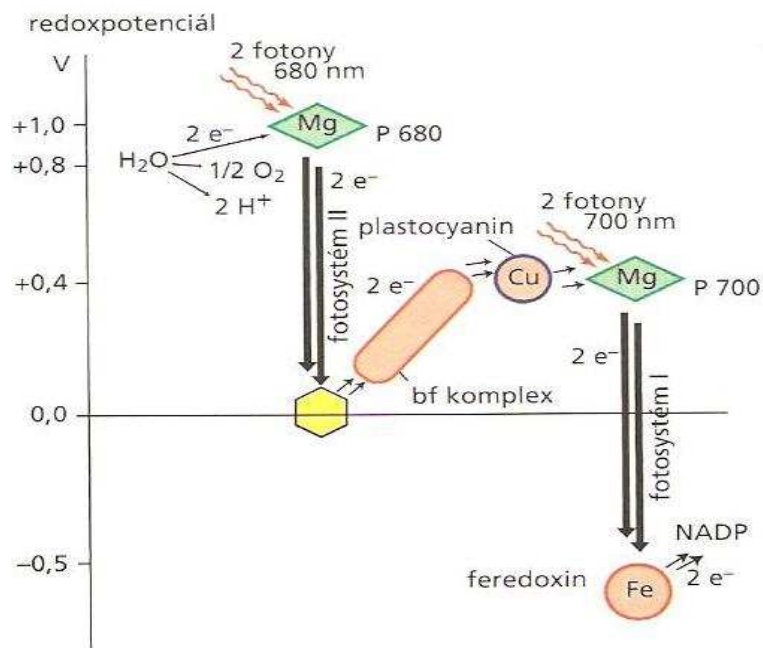
Pro vytvoření jedné molekuly O_2 se musí oxidovat dvě molekuly vody, tak získáme čtyři elektrony. Pro přenos jednoho elektronu z H_2O na NADP^+ proběhnou dva fotochemické děje. V PSII komplexu jsou obsaženy čtyři ionty manganu vázané na bílkovinu a dojde mezi nimi k vytvoření katalytického komplexu, tj. kyslík vyvíjející komplex (OEC-oxygen-evolving complex). OEC naváže dvě molekuly vody, ze kterých postupně odebírá elektrony a protony, a v posledním kroku dojde k uvolnění O_2 . OEC mezitím prochází oxidací přes několik stavů, které nazýváme S-stavy a pravděpodobně představují kombinaci iontů manganu o různém mocenství Mn^{3+} , Mn^{4+} , Mn^{5+} . Dojde k uvolnění kyslíku a zároveň vymrštění elektronu, který prochází řetězcem přenašečů a zredukuje plastochinon na plastochinol. Ten následně redukuje

komplex cytochromů b_6/f a dochází k přenosu elektronů na plastocyanin. Pomocí plastocyaninu vymrštěný elektron prochází řetězcem přenašečů a necyklickou cestou redukuje posléze NADP^+ na NADPH . V cyklickém přenosu se elektron vrátí zpět na komplex cytochromů b_6/f a zúčastní se přenosu protonů přes membránu. Větší část elektronů putuje necyklickou cestou, která začíná rozpustným ferredoxinem. Dochází k redukci NADP^+ katalyzovanou ferredoxin- NADP^+ -reduktasou a vzniká NADPH . V cyklické dráze dochází k přenosu protonů přes thylakoidní membránu a může zde dojít ke zvýšení množství vzniklého ATP v poměru ke vznikajícímu NADPH [2].

a)



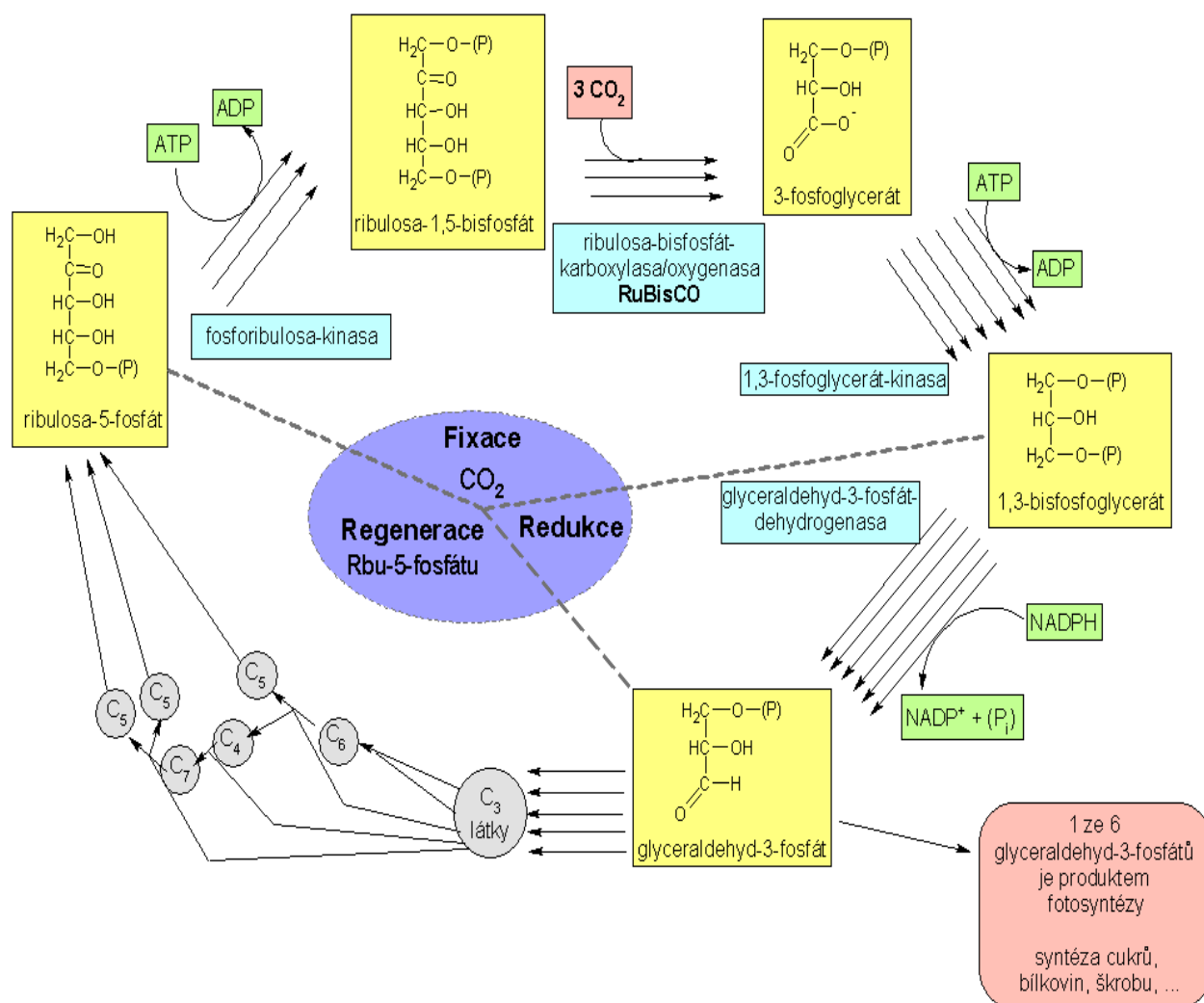
b)



Obr. 3: Fotosystém I a II: a) přenos energie a elektronů, b) fotosyntetický tok elektronů s redoxpotenciály. (Převzato [5])

2.1.2 Reakce nezávislé na světle

Temnostní fáze je biosyntéza sacharidů z CO_2 za pomoci redukčního činidla NADPH a energie ATP. Tato fáze probíhá ve tmě, dokud se nespotřebují zásoby ATP a NADPH. Biosyntéza sacharidů je umístěna v kapalně části chloroplastu (stroma) a v cytosolu a zahrnuje několik enzymových reakcí. Mezi nejznámější patří hexosafosfátový – pentosafosfátový cyklus, tzv. Calvinův cyklus (obr. 4) [1].



Obr. 4: Calvinův cyklus. (Převzato [4])

Calvinův cyklus se rozděluje na dvě fáze, a to na fázi produkční a regenerační. V produkční fázi reagují tři molekuly CO_2 a tři molekuly ribulosa-5-fosfátu za vzniku šesti molekul glyceralddehyd-3-fosfátu, zároveň se spotřebuje šest molekul NADPH a devět molekul ATP. Jedna molekula glyceralddehyd-3-fosfátu je použita na biosyntézu glukosy a ostatních pět molekul je použito v druhé fázi cyklu. V regenerační fázi, jak už bylo řečeno, tedy reaguje pět molekul glyceralddehyd-3-fosfátu, ze kterých postupným přeskupováním vzniká pět molekul ribulosa-5-fosfátu (touto sloučeninou cyklus začínal). Tato druhá fáze probíhá již bez dodání energie ATP nebo redukčních ekvivalentů NADPH [2].

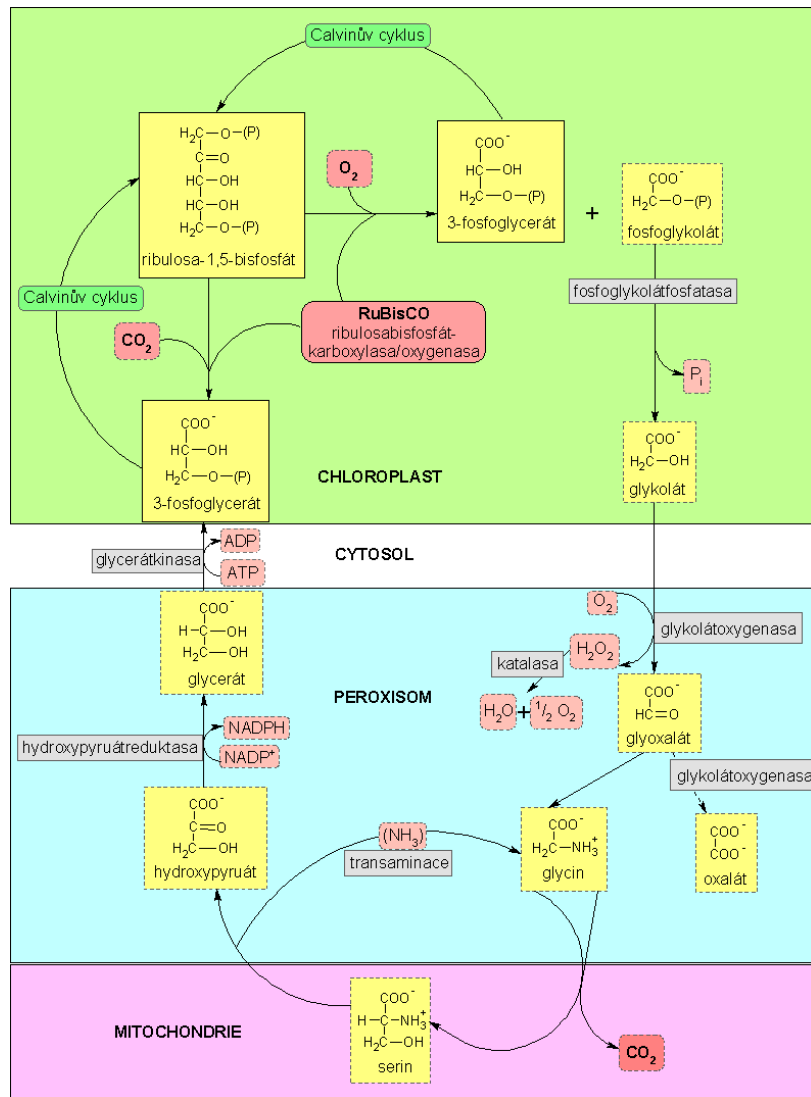
Většina reakcí v Calvinově cyklu se vyskytuje i v jiných metabolických drahách, např. v glykolýze nebo pentosovém cyklu. Fosforibulokinas, ribulosabisfosfátkarboxylasa a sedoheptulosabisfosfatasa jsou enzymy, které nemají protějšek v živočišných tkáních [2].

Oxid uhličitý je převáděn z energeticky chudé a neaktivní molekuly na aktivovanou redukovatelnou formu tím, že reaguje s ribulosa-1,5-bisfosfátem na 3-fosfoglycerát. Tuto reakci katalyzuje naprosto nepostradatelný, nejvýznamnější a nejrozšířenější enzym celé biosféry, a to ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa [2].

Calvinův cyklus je využíván rostlinami k fixaci CO₂, tyto rostliny se nazývají C₃-rostliny, protože prvním produktem asimilace je tříuhlíková sloučenina, a to 3-fosfoglycerát. Ovšem některé, převážně tropické rostliny jsou schopné fixovat CO₂ i jiným způsobem. Jejich meziproduktem je oxalacetát, který je přeměňován na malát nebo aspartát, jedná se tedy o čtyřuhlíkaté sloučeniny, C₄-rostliny. Rostliny z čeledi tučnolistých mají metabolismus CAM (Crassulacean Acid Metabolism), ve kterém se spojují C₃ i C₄-karboxylační systémy [1].

2.1.2.1 Fotorespirace

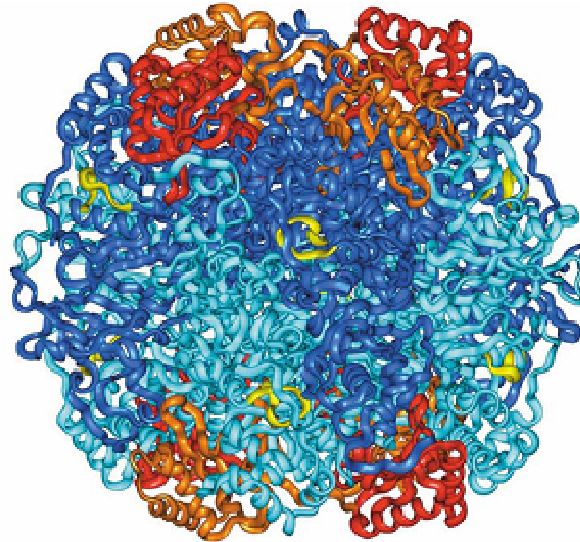
V 60. letech minulého století bylo zjištěno, že rostliny na světle spotřebovávají O₂ a vyvíjejí CO₂ ještě jinou cestou kromě oxidační fosforylace. Pokud je ve vzduchu nízká koncentrace CO₂ a naopak vysoká koncentrace O₂, může dojít k tomu, že fotorespirace převládá nad fotosyntézou. Fotorespirací (obr. 5) se rozumí spotřeba O₂ a uvolňování CO₂. Tento proces je také nazýván světelné dýchání a je umožněn druhou katalytickou aktivitou ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy, která vede ke vzniku fosfoglykolátu. Ten je v peroxisomech, přeměňován účinkem O₂ na glyoxylát. Vznikající peroxid vodíku je rozložen katalasou na H₂O a O₂. Část glyoxalátu se oxiduje na oxalát a ze zbytku glyoxalátu vzniká glycin. V mitochondriích dvě molekuly glycinu zkondenzují na serin a vzniká ještě CO₂. Takto získaný CO₂ je uvolňovaný při fotorespiraci. Serin se v peroxisomech přemění na hydroxypyruvát a dále je redukován na glycerát, který v cytosolu fosforyluje na 3-fosfoglycerát a takto se vrací do chloroplastu a zapojuje se do Calvinova cyklu. Během těchto složitých reakcí dochází ke spotřebě ATP a NADPH. Fotorespirace pro rostlinu znamená ztrátu, ale zároveň pravděpodobně slouží k ochraně fotosyntetického aparátu před poškozením fotooxidačními reakcemi. Bylo zjištěno, že CO₂ a O₂ mezi sebou soutěží jako substrát pro ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasu. Při vysokém poměru CO₂/O₂ enzym působí jako karboxylasa a při nízkém poměru CO₂/O₂ jako oxygenasa. Název enzymu byl na základě toho zjištění změněn na ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa a postupně se pro něj vžila zkratka Rubisco [2].



Obr. 5: Fotorespirace. (Převzato [23])

2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)

Enzym Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa) je nejhojnější protein na Zemi. Jako vstupní brána CO_2 do biosféry, tvoří Rubisco základ pro život na Zemi. Rubisco je velmi málo účinný enzym pro karboxylaci. Může za to jeho velmi malá molekulární aktivita (pouze několik molekul přeměněných za sekundu), nízká afinita k atmosférickému CO_2 a využití O_2 jako alternativního substrátu pro fotorespiraci. Tato skutečnost je kompenzována vysokým obsahem enzymu Rubisco v rostlinách (u některých rostlin až 50 %) [19].



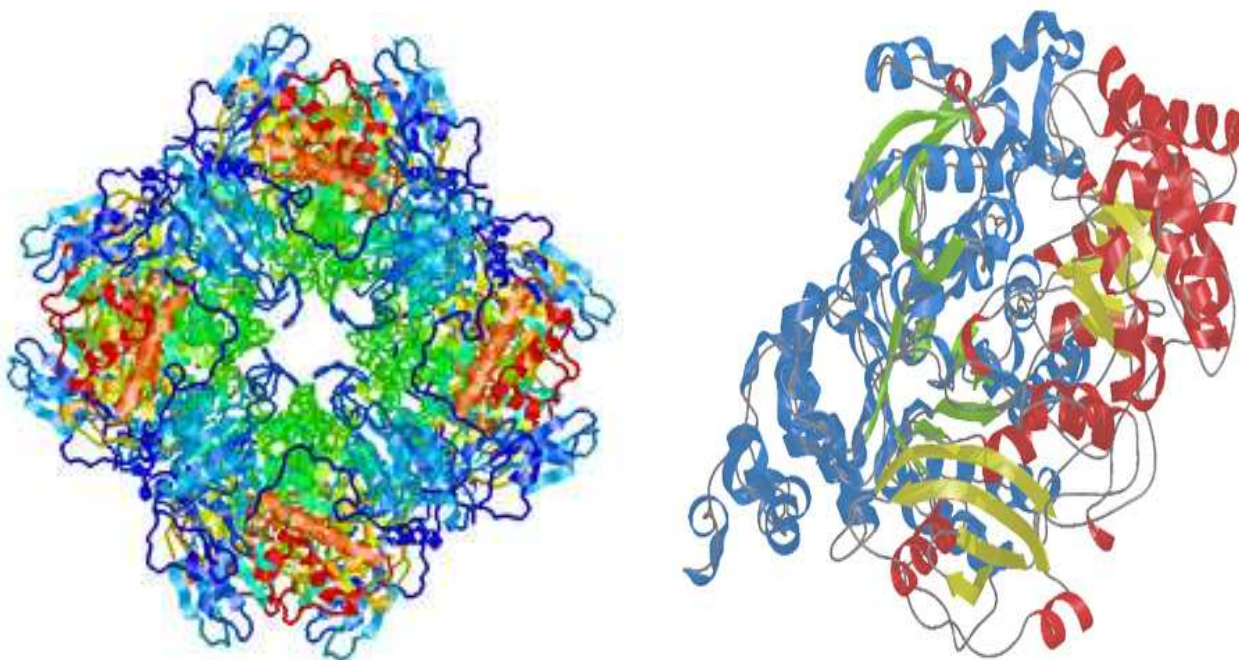
Obr. 6: Enzym Rubisco ve špenátu. Velké podjednotky jsou zobrazeny tmavě a světle modrou barvou a malé podjednotky červenou a oranžovou. Aktivní místo je vyznačeno žlutou barvou. (Převzato [19])

2.2.1 Historie enzymu Rubisco

Jako první objevili enzym Rubisco Wildman a Bonner [6] v roce 1947 pomocí elektroforézy v listech rostlin. Neměli žádné ponětí o jeho funkci a nazvali ho protein Frakce I. Další studie dokázaly, že 3-fosfoglycerát, který byl označen jako první produkt fotosyntézy, ukazuje na existenci enzymu, který dokáže katalyzovat karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu [7,8,9]. Enzymatickou aktivitu objevil u Frakce I o několik let později Trown [6]. Bowes et al. [10], Andrews et al. [11] a Lorimer et al. [12] objevili druhou aktivitu enzymu, a to oxygenaci ribulosa-1,5-bisfosfátu na 2-fosfoglykolát a na 3-fosfoglycerát. Z pozorování, které prováděli Rutner a Lane [13], určili, že se Rubisco skládá ze dvou odlišných podjednotek a z dalších studií [14,15,16,17] vyplynulo, že podjednotky jsou zakódovány a syntetizovány v různých částech buňky. Toto dále vedlo k objevu mechanismu syntézy proteinů uvnitř chloroplastu [18].

2.2.2 Struktura a podjednotky enzymu Rubisco

Rubisco patří strukturně mezi největší enzymy s celkovou molekulovou hmotností 560 kDa. V přírodě se vyskytují dvě významnější formy Rubisco. Forma I, která se nachází ve vyšších rostlinách, řasách, sinicích a v mnoha autotrofních bakteriích, se skládá z 8 velkých L podjednotek (53 kDa) a 8 malých S podjednotek (14 kDa). Tato forma vytváří hexadekamer L_8S_8 (obr. 6). Forma II, která se v převážné většině nachází u obrněnek a některých autotrofních bakterií, včetně obligátních anaerobů, se skládá pouze z L podjednotek a vytváří dimer L_2 (obr. 7). V řasách a vyšších rostlinách se Rubisco vyskytuje v chloroplastech. L podjednotky jsou zakódované v genomu chloroplastu a syntetizovány na ribosomech v chloroplastu. S podjednotky jsou kódovány nukleárními genomy, syntetizovány jako prekursor polypeptidů v cytosolu a importovány do chloroplastu pomocí ATP-dependentních reakcí [2]. Posttranslační reakcí jsou malé dílčí podjednotky přidány k chaperonům velkých podjednotek a dojde k vytvoření holoenzymu [19].



Obr. 7: Vlevo je zobrazena Forma I, vpravo Forma II. (Převzato [20,21])

2.2.3 Mechanismus katalýzy a aktivace

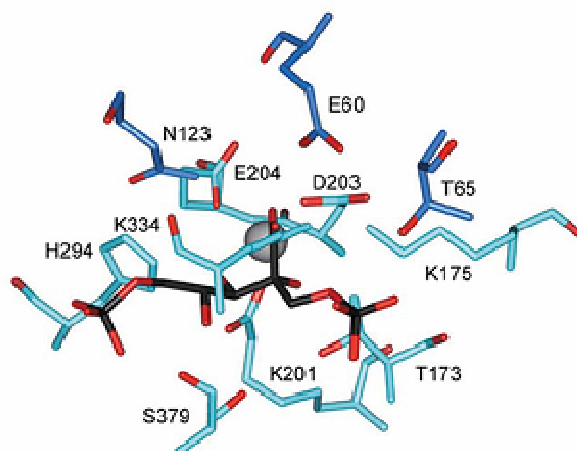
Aby enzym Rubisco vykazoval katalytickou aktivitu, musí být aktivován. Katalytické centrum (obr. 8) se aktivuje navázáním molekuly CO_2 , která se liší od molekuly substrátu oxidu uhličitého vázaného během karboxylace. Aktivační molekula CO_2 je kovalentně připojena jako karbamát na ϵ -aminoskupinu specifického lisylového zbytku K201. Následně musí dojít ke stabilizaci kovovými ionty Mg^{2+} , aby mohlo dojít v aktivním místě k přeměně ribulosa-1,5-bisfosfátu na produkty [6, 22]. Tato aktivace je katalyzována enzymem aktivasa Rubisco, pro jehož funkci je důležitá hydrolýza ATP. Hydrolýzou ATP dojde k aktivaci aktivasy a při následném navázání na enzym Rubisco i k její aktivaci. Po skončení reakce se aktivasa stává opět neaktivní.

Opačným způsobem, tedy jako inhibitor, působí 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát (CA1P). CA1P se naváže na Rubisco a dochází k blokaci aktivního místa a zároveň k zastavení katalýzy. CA1P působí převážně za sníženého světla, jde především o noční inhibitor. Naproti tomu aktivasa je enzym aktivující se světlem, který vrací zpět aktivitu enzymu Rubisco [22]. Jako další inhibitory mohou působit xylulosa-1,5-bisfosfát (XuBP) a 3-keto-arabinitol-1,5-bisfosfát (3-KABP) [28].

Správnou aktivitu enzymu ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy ovlivňuje hned několik faktorů:

- Je to především hodnota pH, kdy vykazuje své ostré optimum při hodnotě 8,0. Po osvětlení se hodnota pH zvyšuje z 7,0 na 8,0 důsledkem přenosu protonů do dutiny thylakoidů.
- Při osvětlení dochází k odtoku iontů Mg^{2+} (hořečnaté ionty aktivitu enzymu stimulují) do thylakoidů, který je vyrovnáván odtokem iontů do stromatu.
- Allostericky aktivuje NADPH vytvořený po osvětlení v PSI.
- Ve tmě dochází k syntéze 2-karboxyarabinitol-1-fosfátu (CA1P), který aktivitu velmi inhibuje [2].

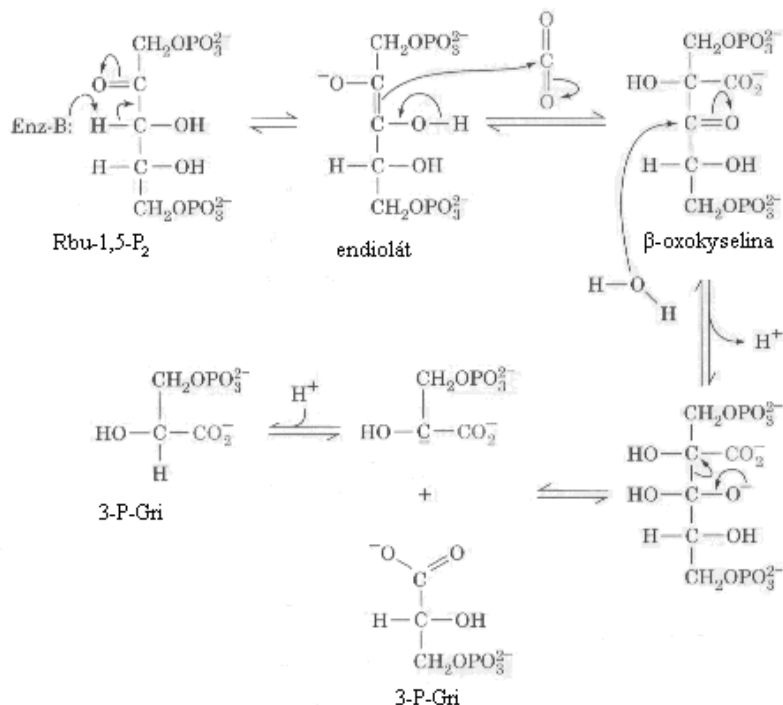
Základní strukturní uspořádání aktivního místa bylo zjištěno pomocí krystalografických studií. Katalytické centrum enzymu je obsaženo ve velké podjednotce a je enzymově aktivní i pokud nejsou obsaženy malé podjednotky. Zda mají malé podjednotky regulační úlohu (jako u jiných enzymů) se zatím nepodařilo prokázat, jejich funkce doposud není známá [2].



Obr. 8: Strukturní uspořádání aktivního místa. (Převzato [19])

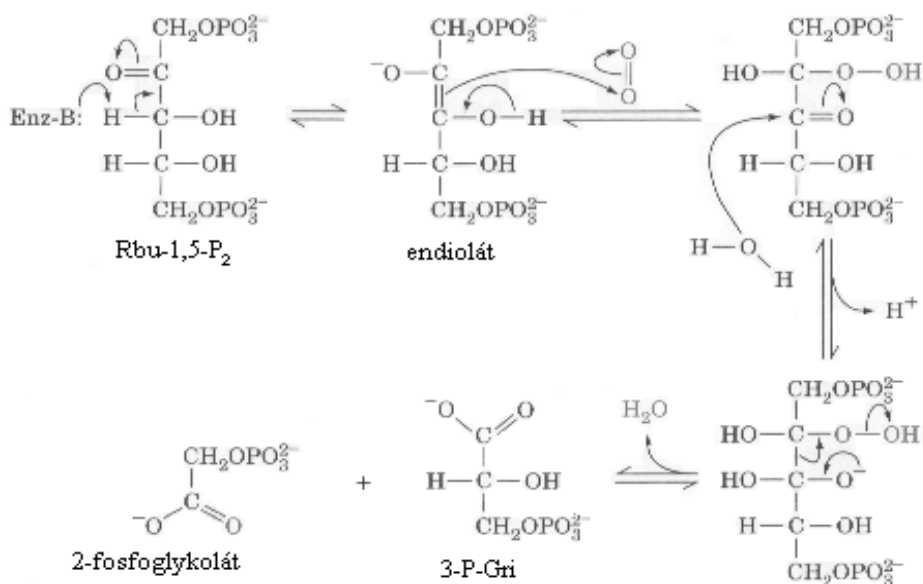
2.2.4 Karboxylace a oxygenace

Karboxylace (navázání CO_2 a začátek Calvinova cyklu) i oxygenace (navázání O_2 a příčina vzniku fotorespirace) jsou reakce, které jsou katalyzované enzymem Rubisco. V prvním kroku, který je pro obě reakce stejný, vzniká endiolát. Při karboxylaci (obr. 9) dochází k navázání CO_2 a ke vzniku 3-keto-2-karboxyarabinitol, který je následně hydratován.



Obr. 9: Pravděpodobná karboxylační reakce katalyzovaná enzymem ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasou (Rbu-1,5-P₂). V reakci vzniká nejprve endiolový meziprodukt, z kterého následně vzniká 2-oxokyselina a reakcí s vodou z něho vzniká 3-fosfoglycerát (3-P-Gri). (Převzato [2])

Z hydratované sloučeniny 3-keto-2-karboxyarabinitolu vzniká následně první 3-fosfoglycerát a následující protonizace vede ke vzniku další molekuly 3-fosfoglycerátu, který dále reaguje v Calvinově cyklu popsáném v kapitole 2.1.2. [22]. Oxygenací (obr. 10), jako první společný produkt, vzniká endiolát, který se po navázání O₂ a hydrataci přemění na fosfoglycerát a fosfoglykolát, jímž začíná tzv. glykolátová cesta. Obě molekuly jsou zapojeny v procesu fotorespirace, který je již popsán v kapitole 2.1.2.1.



Obr. 10: Pravděpodobná oxygenasová reakce katalyzovaná enzymem ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasou. V reakci vzniká nejprve endiolový meziprodukt, z kterého následně vzniká 2-fosfoglykolát a 3-fosfoglycerát. (Převzato [2])

2.3 Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na rostliny

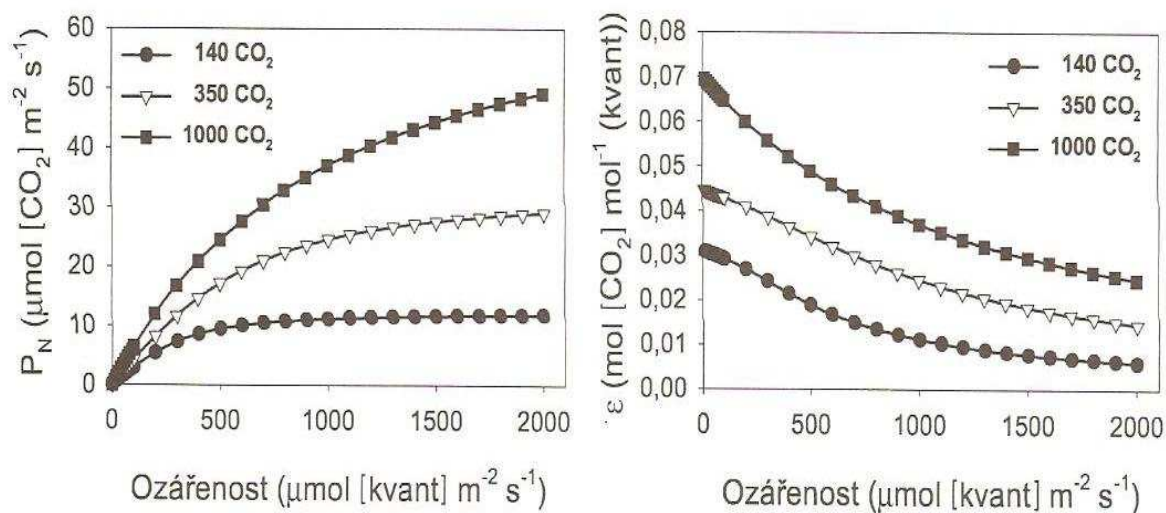
2.3.1 Přímé účinky koncentrace CO₂ na rostliny

Studium vlivu zvýšené koncentrace CO₂ na rostliny je důležité především z hlediska účinků budoucí atmosféry na hospodářské plodiny a celé ekosystémy. Neustále se zvyšující koncentrace CO₂ nebude hrát roli pouze ve sklenících, pařeništích, ale také v porostech polních plodin a zejména v lesích či sadech. Mezi přímé účinky zvýšené koncentrace CO₂ patří zejména změny v rychlosti fotosyntézy, fotorespirace, vodivosti průduchů a v poslední době se ukazuje i vliv na rychlost mitochondriální respirace.

2.3.1.1 Rychlost fotosyntézy

Se zvyšující se koncentrací oxidu uhličitého významně roste rychlost fotosyntézy, která je dále ovlivňována intenzitou ozáření. Rychlost fotosyntézy roste se zvyšující se ozářeností. Obr. 11 zobrazuje vliv ozáření na rychlost fotosyntézy při různých koncentracích CO₂. Z grafů lze vyčíst, že vyšší koncentrace CO₂ působí výrazná zvýšení rychlosti fotosyntézy zejména při vyšších ozářenítech. Vliv zvýšeného CO₂ je i prokazatelný při nižších

ozářenostech, které jsou především během dne po rozednění a před setměním. Nedostatek ozářenosti u rostlin je hlavně dopoledne, odpoledne a také u spodních pater hustých porostů.

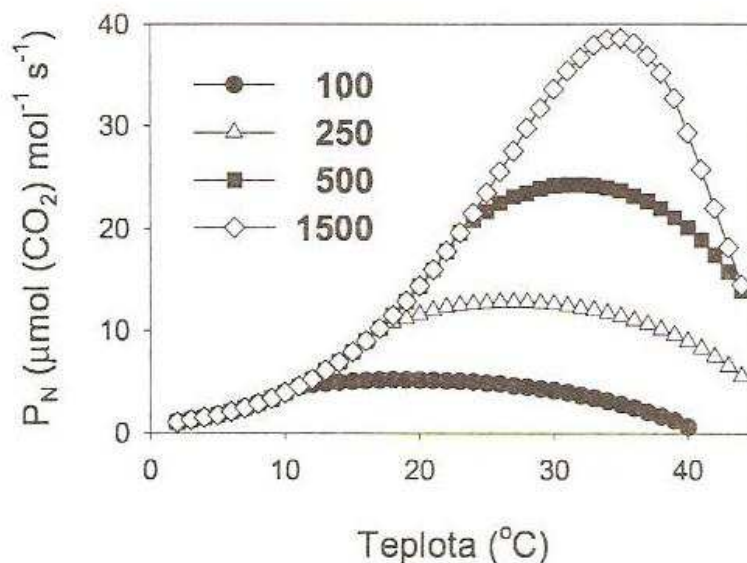


Obr. 11. Vliv ozářenosti na rychlost fotosyntézy P_N (obr. vlevo). Vpravo je účinnost ozářenosti ve fotosyntéze vyjádřené kvantovým výtěžkem ε , při různé koncentraci CO_2 . (Převzato [24])

Při dlouhodobějším působení CO_2 na rostliny se rychlost fotosyntézy snižuje v porovnání s rychlostí fotosyntézy rostlin, které byly pěstované při obvyklé koncentraci CO_2 . Pokles rychlosti fotosyntézy při dlouhodobé kultivaci rostlin ve zvýšené koncentraci CO_2 je nazýván aklimace. Přitom dochází k poklesu obsahu dusíku, rozpustných bílkovin a Rubisco v listech. Další znak rostlin spojený se zvýšenou koncentrací CO_2 je schopnost efektivně využívat zvýšenou produkci sušiny. Při zvýšené koncentraci CO_2 dochází k omezení aktivit fotosyntetického aparátu. Při dlouhodobějším pěstování rostlin v běžných podmínkách a při okolní koncentraci CO_2 odpovídá rychlost tvorby asimilátů kapacitě transportních drah i aktivitě příslušných sinků. A naopak, při zvýšené koncentraci CO_2 přesahuje rychlost tvorby asimilátů možnosti jak jejich transportu, tak i využívání v sinku. A důsledkem toho dochází k hromadění sacharosy v cytosolu, která je transportována do vakuoly a zde invertasou rozštěpena na glukosu a fruktosu. Glukosa a fruktosa jsou zpětně transportována do cytosolu a dochází k nárůstu jejich koncentrace, což způsobuje represi exprese fotosyntetických genů [24,29,32]. To má za následek pokles rychlosti fotosyntézy – tzv. aklimaci.

Problematika přizpůsobení rostlin při jejich dlouhodobé kultivaci ve zvýšené koncentraci CO_2 není dosud docela známa. Aklimace je zapříčiněna především dvěma důvody, a to že rostlina není schopna využít nadbytečné asimiláty a že při vyšších koncentracích CO_2 stačí menší množství enzymu Rubisco pro fotosyntézu [24].

Dalším důležitým parametrem ovlivňujícím rychlost fotosyntézy a spojeným se zvýšenou koncentrací CO_2 , je vliv teploty. S vyšší koncentrací CO_2 se teplotní optimum přesouvá k vyšším teplotám a toto optimum je potom menší a užší (obr. 12).



Obr. 12: Závislost rychlosti fotosyntézy P_N na teplotě ($^{\circ}\text{C}$) při různých ozářenostech, jejichž hodnoty jsou uvedeny v grafu. (Převzato z [24])

Důležitou veličinou popisující enzym Rubisco je specifitní faktor, který udává poměr rychlosti karboxylace k rychlosti oxygenace při stejných koncentracích CO_2 a O_2 . Se zvyšováním teploty dochází k silnému poklesu specifitního faktoru: s větším poklesem rozpustnosti CO_2 k O_2 a poklesu afinity rubisco k CO_2 k afinitě O_2 . Účinek CO_2 se zvyšuje s rostoucí teplotou, který je způsoben poklesem specifitního faktoru [24].

Z dosavadních studií vyplývá, že interakce změny koncentrace CO_2 a změny teploty má na rychlost fotosyntézy velmi různorodý vliv. Při zvýšené koncentraci CO_2 se podílí na růstu rostlin a její maximální rychlosti fotosyntézy více při vyšších teplotách než při nízkých.

Pomocí několika studií byly odvozeny závěry, které popisují společné působení změny teploty a koncentrace CO_2 na rychlost fotosyntézy:

- zvyšující se koncentrace CO_2 zvyšuje rychlost fotosyntézy více při vyšších, nežli při nižších teplotách,
- posunutí optima rychlosti fotosyntézy při saturaci k vyšším teplotám, může zvýšení koncentrace CO_2 výrazně zvýšit rychlost fotosyntézy listu při vyšších teplotách,
- při zvýšené koncentraci CO_2 se teplotní optimum posouvá k vyšším teplotám jen v podmínkách teplého klimatu s vysokými ozářenostmi, v oblastech nízkých zeměpisných šířek a během slunných dnů ve středních zeměpisných šířkách,
- rychlost fotosyntézy celého porostu způsobuje menší interakci vlivu teploty a koncentrace CO_2 , protože většina listů v porostu se nachází v podmínkách relativně nižší ozářenosti,
- při nižších ozářenostech nebo na stinných lokalitách a při zatažené obloze ve vyšších zeměpisných šířkách, zvyšuje vyšší koncentrace CO_2 i rychlost fotosyntézy, teplotní optimum zůstává nízké [24].

2.3.1.2 Fotorespirační rychlost

Inhibice fotorespirace je způsobena snížením koncentrace O_2 na 5 % a méně nebo dvojnásobným až trojnásobným zvýšením koncentrace CO_2 . Vyšší koncentrace CO_2 působí na list dvojnásobným způsobem, především zvýšením rychlosti karboxylace a zároveň fotosyntézy a také se zvyšuje poměr koncentrací CO_2/O_2 , který inhibuje fotorespiraci a s tím spojené ztráty CO_2 [24].

2.3.1.3 Průduchy a jejich vodivost

Změna koncentrace CO_2 v atmosféře ovlivňuje míru otevřenosti průduchů, která zase modifikuje jejich vodivost. Zvýšení koncentrace CO_2 způsobuje u většiny rostlin zmenšení vodivosti průduchů. Drake et al. [25] publikovali závěry 41 pokusů s 28 druhy rostlin a zjistili, že průměrné snížení vodivosti průduchů při zdvojnásobení atmosférické koncentrace CO_2 je asi 20 %. Pokles vodivosti vyvolaný zvýšením koncentrace CO_2 kolem listu nemusí vést k poklesu rychlosti čisté fotosyntézy, protože zároveň se zvyšuje gradient koncentrace CO_2 mezi atmosférou a místem karboxylace, což fotosyntézu stimuluje. Významný je pak poměr mezi změnou vodivosti a změnou gradientu CO_2 a také jestli dojde k poklesu nebo zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy. Se sníženou rychlostí transpirace se modifikují jednotlivé složky energetické bilance listů a to se objevuje ve změně teploty. Prozatím nebylo potvrzeno, že by docházelo k aklimaci vodivosti průduchů během dlouhodobé kultivace rostlin při zvýšené koncentraci CO_2 [24].

2.3.1.4 Dýchání a jeho rychlost

Rychlost dýchání je v poměru s rychlostí čisté fotosyntézy relativně malá. Okamžité ztráty uhlíku dýcháním se rovnají obvykle méně než 10 % zisku C paralelně probíhající fotosyntézou. Dýchání je i přesto proces zcela závislý na celkové bilanci uhlíku v rostlině. Dýchání rostlin se uskutečňuje nejen v noci, kdy fotosyntéza neprobíhá, ale i přes den, kdy rychlost denního dýchání jsou nižší než rychlost dýchání v noci. V období vegetace se obvykle zvyšuje podíl nefotosyntetizujících struktur, které se účastní zejména na udržovací složce dýchání. Vlivem CO_2 na rychlost mitochondriálního dýchání lze rozpoznat:

- přímý vliv, při kterém dochází ke snížení rychlosti dýchání při expozici zvýšené koncentrace CO_2 ,
- nepřímý vliv, který způsobí aklimaci rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO_2 [24].

2.3.2 Nepřímé účinky koncentrace CO_2 na rostliny

Zkoumání vlivu zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny by bylo mnohem jednodušší, kdyby se dalo omezit pouze na výše uvedené přímé působení. Rostliny ovšem reagují na další vnější podněty celou řadou dalších reakcí a změnou struktur.

2.3.2.1 Vliv teploty

Teplota značným způsobem ovlivňuje působení zvýšené koncentrace CO_2 . S fotosyntézou dále ještě souvisí zvýšené teplotní optimum. S teplotou se snižuje hodnota kvantového

výtěžku fotosyntézy, tedy počtu molů CO_2 fixovaného absorpcí jednoho molu fotonů. Toto zvýšení je ovlivňováno teplotou. Příkladem může být změna koncentrace CO_2 z $350 \mu\text{mol mol}^{-1}$ na $650 \mu\text{mol mol}^{-1}$ při 10°C zvýší kvantový výtěžek jen o 4 %, avšak při teplotě 28°C již o 25 % [24]. S rostoucí teplotou narůstá i kompenzační ozáření, tj. hodnota ozáření, kdy příjem a výdej CO_2 v listu je v rovnováze. Při zvýšené koncentraci CO_2 , zvláště při vyšších teplotách, se kompenzační ozáření snižuje. Zvýšená koncentrace CO_2 i zvýšená teplota podporují průběh vývoje, navozují dřívější senescenci a zkracují tak celé vegetační období. Dochází k rychlejšímu vývoji mnoha plodin, urychlený růst se týká především listů, odnoží a následně také květů a plodů a tím se zároveň vytváří více sinků. Při nízkých teplotách dochází ke snížení růstu, může dojít k výraznému poklesu fotosyntetické produkce (aklimace), protože se snižuje množství a aktivita sinku, a to převážně z nově diferencovaných a rostoucích orgánů [24,31].

Se změnou teploty a zvýšenou koncentrací CO_2 je spojeno několik parametrů. Dochází ke změně energetické bilance listů nebo porostu. Zvýšená koncentrace CO_2 snižuje vodivost průduchů, tím klesá transpirace a dochází ke změně teploty rostliny. Dalším bodem je bilance příjmu a výdeje CO_2 rostlinou. Teplota ovlivňuje i rychlost dýchání [24].

Zvýšená koncentrace CO_2 se podílí na vlivu rychlosti fotosyntézy také obsahem minerálních látek v rostlině. Velmi mimořádné zastoupení v minerálních látkách zaujímá dusík. V rostlinách má dusík největší zastoupení, je přítomen ve všech bílkovinách, tedy i enzymech. Dusík má důležitou roli pro tvorbu a hromadění organických látek v rostlinách. Je možné, že při kultivaci rostlin v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 omezuje nedostatečná dostupnost N v raných fázích samotné zvýšení produkce sušiny. Může to dojít až k omezení růstu výnosů [24].

Rubisco je nejrozšířenější enzym na zeměkouli. Tento enzym obsahuje podstatnou část dusíku v listech. Se zvýšenou koncentrací CO_2 dochází k poklesu dusíku v listech o 15 až 20 % [24], který by mohl být způsobený neschopností kořenů se vyrovnat se zvýšenými požadavky na příjem dusíku. Dojde ke zvýšení účinnosti využití dusíku rostlinami [24].

2.3.2.2 Růst a vývoj rostlin

Zvýšená koncentrace CO_2 může prodlužovat nebo zkracovat délky jednotlivých fází růstu a vývoje. Závěry potvrdily zrychlení individuálního vývoje rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO_2 . Nejsou známy přímo nějaké mechanismy, které by ovlivňovaly růstové hormony, ale spíše jde o nepřímé důsledky změn v poměru mezi produkcí asimilátů ve zdrojích a jejich potřebou pro sink. Vliv je i na celkovou délku vegetace, která se při zvýšené teplotě i zvýšené koncentraci CO_2 zkracuje [24].

2.3.2.3 Hospodářský výnos rostlin

Všeobecně u všech hospodářských plodin je v důsledku zvýšené koncentrace CO_2 výnos zvýšen o 25 %. Přitom existuje rozdíl mezi C3 a C4 rostlinami. U C3 rostlin činí zvýšení výnosu 23%, u C4 rostlin pouze 14 % [24]. Kimball [26] dále uvádí, že zdvojnásobení

koncentrace CO₂ z tehdejších 330 μmol mol⁻¹ na 660 μmol mol⁻¹ může na naší planetě zvýšit výnos až o 33 %.

Během několika desítek let se podařilo sesbírat velmi důležitá data o vlivu zvýšené koncentrace CO₂ na výnos především u obilnin. Zvýšená koncentrace CO₂ prokazatelně zvyšuje výnos, autoři si zároveň uvědomují velký vliv nových kultivarů, aplikací průmyslových hnojiv, ochrany proti plevelům, chorobám a škůdcům nebo závlah [24].

2.4 Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na dřeviny

Lesy jsou nenahraditelným zdrojem surovin i energie pro průmysl, ale zároveň tvoří významnou součást krajiny. Při prováděných pokusech se většinou na lesní porosty dlouho zapomínalo, hlavně z toho důvodu, že studie s nimi jsou mnohem nákladnější. Výzkumy zkoumající vliv CO₂ na dřeviny s sebou přinášejí i mnohá další rizika. Dlouhá délka života a výška kmenů znesnadňuje provádění pokusů v jejich přirozeném prostředí. Délka měření musí odpovídat délce jejich života a tedy prováděné studie by měly být dostatečně dlouhé. Stromy nejsou homogenní skupinou rostlin a to do jisté míry také komplikuje výzkum.

Pro jednotlivá měření se nejčastěji uplatňují květy či vaky, otevřené komory, uzavřené komory s cirkulací vzduchu a systém FACE (Free Air CO₂ Enrichment). Systém FACE se ukázal jako nejlepší metoda k minimalizaci mikroklimatu. Ovšem zanedbatelné nejsou také nevýhody, kterými jsou např. technicky náročné parcely a ekonomická stránka [24].

Základním problémem, který je středem zkoumání pro většinu dlouhodobých studií s dřevinami, spočívá v tom, zdali lesní ekosystémy budou při zvyšující se koncentraci CO₂ zvyšovat také množství ukládaného uhlíku. Je otázkou, do jaké míry je suchozemská vegetace sinkem či zdrojem CO₂. V oblastech mírného pásma se v lesních společenstvech ukládá více CO₂, než kolik je z nich uvolňováno zpátky do atmosféry. Narůst akumulovaného uhlíku v lesních porostech může být také způsoben přirozenou depozicí dusíkatých sloučenin, jejichž množství se v posledních letech zvyšuje.

Zvýšená koncentrace CO₂ zvýší rychlost fotosyntézy až o 50 % až 60 %, ovšem nejsou k dispozici jednoznačné hodnoty o možných rozdílech mezi listnatými a jehličnatými stromy. Z důvodu sezónních změn obsahu nestrukturních polysacharidů není vhodné pro odhad produkce biomasy měření rychlosti fotosyntézy. Předpoklad je takový, že zvýšení koncentrace CO₂ zvýší účinnost fotosyntézy zejména snížením rychlosti fotorespirace, a to i při menší spotřebě dusíku vyvolané poklesem obsahu Rubisco [24]. Zvýšená koncentrace CO₂ ovlivňuje rychlost fotosyntézy pouze v počátečních fázích růstu dřevin. Touto problematikou, která se obtížně srovnává s dalšími studiemi, se např. zabývali Prasad et al. [30]. Tito autoři uvádějí ve své studii vliv zvýšeného CO₂ na čirok a tvrdí, že mladší (10–35 dní po setí) listy byly větší až o 37 % než starší (13–50 dní po setí), které byly větší pouze o 23 %.

U dřevin ve studii Saxe et al. [27] nebyla aklimace potvrzena, zvýšená rychlost fotosyntézy v důsledku zvýšené koncentrace CO₂ zůstávala stejná i při několikaleté kultivaci stromů. V některých studiích, kde byla aklimace dokázána, mohla být způsobena nedostatečným objemem kořenového substrátu nebo nedostatkem minerálních živin [24].

2.5 Metody stanovení aktivity Rubisco

Aktivita enzymu Rubisco se stanovuje metodou přímou nebo nepřímou. Mezi nejznámější metody přímé patří spektrofotometrická a radiometrická a mezi metody nepřímé gazometrická. Další metodou je např. chemiluminiscence, kterou ve své studii na stanovení enzymu Rubisco u *Symbiodinium* sp. uvádí Lilley et al. [33].

Obecně aktivita je udávána jako rychlost katalyzované reakce. Základní jednotkou je 1 katal [kat], který udává takové množství enzymu, jež přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu za standardních podmínek. Aktivita Rubisco je závislá na světle, a proto v mnoha rostlinách je při nízké ozářenosti velmi nízká, ale zvýšením světelného záření aktivita stoupá [34].

Jak popisují ve své studii Gerard et al. [35], stanovení aktivity Rubisco je velmi náročné. Aktivita Rubisco je regulovatelná a potlačena různorodostí sloučenin a zároveň tím, že se vyskytuje ve více formách. Příliš nízké hodnoty aktivity Rubisco naměřené *in vitro* jsou přisuzovány neúplné extrakci, inhibici polyfenoly, polysacharidy, proteázami nebo substrátem.

Stanovení aktivity enzymu Rubisco se dá vyjádřit nespecifickou a specifickou aktivitou. Nespecifická aktivita udává látkové množství asimilovaného oxidu uhličitého za sekundu na jednotkovou plochu listu [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$] nebo látkové množství asimilovaného oxidu uhličitého za minutu na jednotkovou hmotnost listu [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$]. Specifická aktivita vyjadřuje látkové množství asimilovaného oxidu uhličitého za minutu na jednotkovou hmotnost enzymu Rubisco [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$].

2.5.1 Přímé stanovení aktivity Rubisco (*in vitro*)

2.5.1.1 Spektrofotometrická metoda

Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu Rubisco je založeno na spřažení prvních tří reakcí Calvinova cyklu. Přitom dochází k fixaci CO_2 na ribulosa-1,6-bisfosfát (RuBP) za vzniku 3-fosfoglycerátu a k následné redukci této sloučeniny NADH na glycerinaldehyd-3-fosfát. Oxidace NADH na NAD^+ je doprovázena změnou absorpance při 340 nm. Současná metoda stanovení aktivity vychází ze studie Lilleyho et al. [36]. Jako základní pufrů se mohou používat N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina (HEPES), tris (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) a N,N-bis-2-hydroxyethylglycin (BICIN) o pH 7,7–8,2. Aktivace enzymu Rubisco probíhá pomocí $10 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ KHCO}_3$ a $20 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ MgCl}_2$. Spektrofotometrická metoda je nenáročná, ale menší komplikací může být časová prodleva mezi karboxylační reakcí a oxidací NADH, která je kompenzována přidáním ATP do systému, který regeneruje reakční směs. ATP regenerující systém tvoří fosfokreatin, pomocí kterého dochází k odstranění ADP v reakční směsi [37].

Pro měření aktivity enzymu Rubisco je důležité změřením počáteční a celkové aktivity. Počáteční aktivita se získá ihned po extrakci enzymu, je to aktivita, která byla přítomná v živém organismu. Její hodnota se značně odvíjí od podmínek, ve kterých byl vzorek

odebírán. Celková aktivita se následně měří po 10–15 minutách a s důležitým přídatkem CO₂ a Mg²⁺ iontů. Po přidání CO₂ a Mg²⁺ iontů dojde k aktivaci některých aktivních míst a následně je reakce iniciována přídatkem substrátu a měřena absorbance.

Gerard et al. [35] srovnávají metodu spektrofotometrickou s radiometrickou a uvádí jejich výhody a nevýhody. Aktivita Rubisco stanovená spektrofotometrickou metodou dává v hrubých extraktech vyšší výsledky než při radiometrickém stanovení. Autoři uvádějí, že tyto rozdíly jsou nejspíše způsobeny metodologickými rozdíly v aktivaci, dobou trvání zkoušky a zatížením extraktu. Kdyby tyto proměnné byly stejné, spektrofotometrie a radiometrie by měly vykazovat porovnatelné výsledky. Gerard et al. [35] také uvádějí výhody spektrofotometrie, což jsou krátká doba trvání a nenáročné vybavení laboratoře. Spektrofotometrie poskytuje okamžité výsledky a zahrnuje relativně jednoduché kalkulace. Hlavní nevýhodou metody je nízká citlivost ve srovnání s radiometrickou metodou [35].

2.5.1.2 Radiometrická metoda

Radiometrická metoda je založena na asimilaci radioaktivně označené molekuly uhlíku ¹⁴CO₂, přidané ve formě NaH¹⁴CO₃, na molekulu ribulosa-1,5-bisfosfátu. Před přidáním radioaktivně značené molekuly ¹⁴CO₂, musí být ze směsi odstraněn veškerý CO₂ a endogenní uhličitany. Poté se do reakce přidá známé množství ribulosa-1,5-bisfosfátu nebo extrakt aktivovaného enzymu. Tím dojde k nastartování reakce, která se přibližně po 1 minutě zastaví přídatkem HCl. Volný a označený CO₂ se ze směsi kvantitativně odstraní a pomocí spektrometrie s kapalným scintilátorem se změří radioaktivita produktů odpovídající množství asimilovaného ¹⁴CO₂ [35,38,39].

2.5.2 Nepřímé stanovení aktivity Rubisco (*in vivo*)

2.5.2.1 Gazometrická metoda

Gazometrické metody se poměrně ve velké míře používají ke stanovení fotosyntetické aktivity rostlin. Výhodou této metody, při použití moderních komerčních přístrojů, je rychlé nedestruktivní měření, které umožňuje měření celkové bilance uhlíku v rostlině. Je založena na stanovení výměny CO₂ a vodní páry mezi asimilačním aparátem rostlin a její okolní atmosférou. Princip metody spočívá v absorpci CO₂ a vodní páry v infračervené oblasti, měří se pokles koncentrace CO₂ v okolí rostliny vyvolaný fotosyntetickou fixací molekul CO₂. Příjem resp. výdej CO₂ asimilujícím pletivem se zobrazí změnou koncentrace CO₂ v atmosféře obklopující měřený objekt. Změna koncentrace je měřena infračerveným analyzátozem (IRGA). Pro stanovení této změny je důležité, aby byl asimilující objekt umístěn do asimilační komory neboli listové kyvety. Kyveta je vzduchotěsně a elektronicky propojena s IRGA a na kyvetu se přiloží zdroj fotosynteticky aktivní radiace. Podle zapojení infračerveného analyzátoru plynů (IRGA) se dělí měřící aparatura na:

- Uzavřený (cirkulační typ)
- Otevřený (průtočný typ) [40,41].

2.6 Metody stanovení obsahu Rubisco

2.6.1 Gelová elektroforéza

Princip elektromigračních (elektroforetických) metod je založen v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, které vzniká vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Vzorek je nadávkován a kationty migrují k zápornému pólu, anionty naopak ke kladnému pólu a neutrálně nabitě částice se nepohybují. Na základě odlišné rychlosti migrace složek vzorku se v průběhu separace tvoří oddělené zóny jednotlivých složek.

Základní vlastností nabitě částice je elektroforetická pohyblivost μ , která udává rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Rychleji se oddělují částice s vyšší elektroforetickou pohyblivostí a s menší pohyblivostí se opožďují. Rychlost, kterou se ion v elektrickém poli pohybuje, může být vyjádřena vztahem:

$$v = \mu \cdot E$$

v... rychlost iontu

μ ... elektroforetická pohyblivost

E... intenzita elektrického pole

Na částice při průchodu okolním médiem působí síly vnitřního tření. A výsledný pohyb je rovnováhou mezi silou působící na ionty v elektrickém poli a silou vnitřního tření:

$$F_{el.p.} = q \cdot E$$

$$F_{vnř.tř.} = -6\pi\eta r v$$

μ = síla elektrického pole $F(E)$

$F(F)$... síla vnitřního tření

v... rychlost iontu

η ... viskozita roztoku

r... poloměr iontu

q... náboj iontu

Během elektroforézy se ustálí rovnováha, která se dá vyjádřit rovnováhou mezi silou elektrického pole a silou vnitřního tření. Při rovnováze se obě síly rovnají, ale mají opačný směr. Mobilitu iontu pak následně vyjadřujeme vztahem:

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

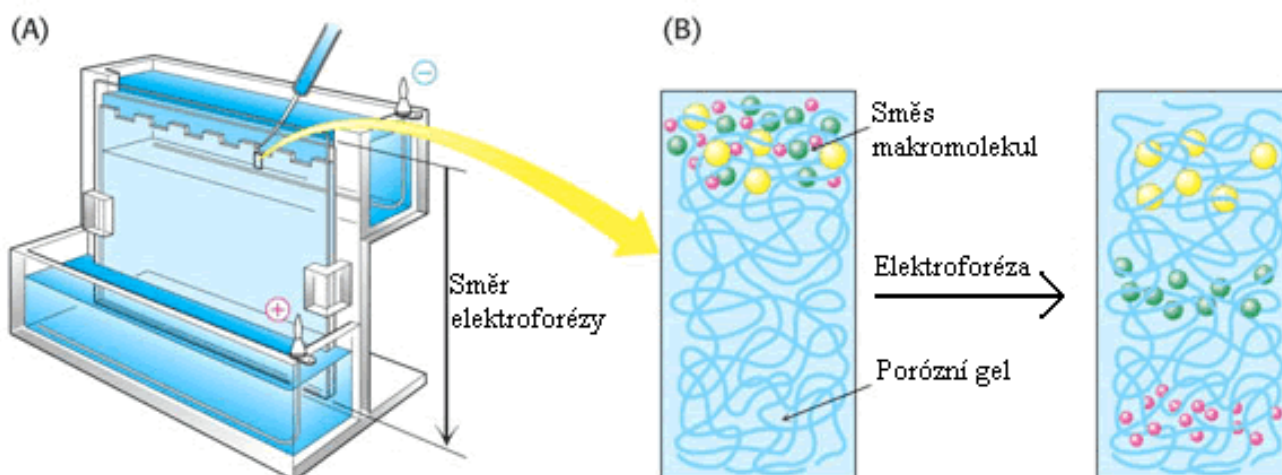
Z předchozí rovnice lze vyčíst, že malé částice s velkým nábojem mají velkou mobilitu, zatímco velké částice s malým nábojem mají mobilitu malou. Efektivní elektroforetická pohyblivost, tedy mobilita, kterou skutečně při elektroforéze naměříme, bývá menší než teoretická mobilita a je závislá na pH a použitém pufru. Dobrou separaci látek docílíme tehdy, pokud budou mít separované látky dostatečně odlišné efektivní elektroforetické pohyblivosti [42,43].

pufry je velmi důležitá pro celkový výsledek dělení. Předností je vytvářet takové pH, které udrží největší rozdíly ve specifickém náboji dělených složek bílkovinné směsi [43].

Jak už bylo řečeno nejpoužívanější úpravou PAGE metody je elektroforéza v přítomnosti SDS (SDS-PAGE). Základem metody je schopnost bílkovin vázat dodecylsulfát sodný (SDS) v množství asi 1,4 mg na 1 gram bílkoviny. Přítomnost SDS udává proteinům uniformní záporný náboj a důsledkem toho dojde k pohybu proteinů k anodě, který se odvíjí od jejich velikosti. Metoda SDS-PAGE je využívána ke stanovení relativní molekulové hmotnosti neznámé bílkoviny. Nejrychleji gelem budou putovat molekuly s nejnižší molekulovou hmotností a jako poslední budou odděleny molekuly s nejvyšší M_r (viz obr. 14) [43].

Pro dokončení stanovení je nutné, aby se rozdělené bílkoviny detekovaly (vizualizovaly). Pro vizualizaci se používají barviva, která se vážou na molekuly bílkovin, např. Amidočern 10B, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ponceau S. Poté musí dojít k odbarvení nespecificky vázaného přebytečného barviva. Následně je gel vyhodnocen [43].

Pro stanovení obsahu enzymu Rubisco je SDS-PAGE nejčastěji využívanou metodou. Ve své studii ji použil např. Besford [45] nebo Ferreira et al [46].



Obr. 14: Metoda PAGE-SDS. (Převzato [44])

2.6.3 Kapilární elektroforéza

Základem kapilární elektroforézy je princip popsáný v kapitole 2.6.2. Nezbytnou součástí je kapilára, kterou vede proud. Kapiláry jsou vyrobeny z taveného křemene a na povrchu mají polyamidový povlak. Nejčastěji je 25–100 cm dlouhá o vnitřním průměru 50 a 75 μm . Konce kapilár jsou následně ponořeny do zásobníků s platinovými elektrodami, mezi které je aplikováno napětí 10–30 kV. Nejčastější je spektrofotometrický detektor, kdy se sleduje absorpce ultrafialového záření. Z elektroforegramu je možné odečíst kvalitu určenou polohou píku a kvantitu určenou výškou píků [42].

Elektroosmotický tok vzniká na základě toho, že stěny kapilár obsahují silanolové skupiny, které se v kontaktu s roztoky o vyšším pH disociují. Disociací vzniká záporný náboj na stěně, ke které je přitažena vrstva kovových iontů základního elektrolytu a vzniká dvojvrstva, tzv.

Sternova vrstva. Kladně nabitě ionty, které jsou blíže středu kapiláry vytváří difúzní vrstvu. Po zavedení napětí dochází k pohybu těchto kationtů ke katodě. Kationty bývají silně hydratovány a dohromady s asociovanými molekulami vody dochází k toku celého roztoku k detektoru umístěného před katodou. Tento jev je označován jako elektroosmóza a tok jako elektroosmotický tok (EOF – ElectroOsmotic Flow). Elektroosmotický tok neunáší pouze kationty, ale i anionty. Nejrychleji ke katodě putují kationty, o něco pomaleji anionty v závislosti na jejich elektroforetické pohyblivosti a stejnou rychlostí jako EOF se pohybují neutrální částice [42].

Kapilární elektroforézu použili se své práci např. Komudini et al. [48] pro stanovení obsahu enzymu Rubisco ve špenátu. Podle těchto autorů je tato metoda lepší pro stanovení obsahu, než nejčastěji používaná konvenční metoda SDS-PAGE. Jako nevýhody metody SDS-PAGE uvádí časové nároky, úpravu vzorků i poměrně nedostatečné kvantitativní stanovení Rubisco a jeho součástí. Naopak, výhodou kapilární gelové elektroforézy je především rychlejší separace, rychlejší analýza díky real-time detektoru, menší množství vzorku a rozpouštědla, vysoké rozlišení, přesná kvantifikace a možnost detekce menších nečistot. Kapilární elektroforézy použili rovněž Warren et al. [49] např. pro stanovení Rubisco v blahovičníku.

2.6.4 HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) je metoda k dělení velkého množství organických sloučenin. Na koloně se stacionární fází dochází k separaci složitých směsí látek, které je urychleno čerpáním elučního činidla pod vysokým tlakem. Mobilní fází v HPLC je kapalina, jejíž průtok je zajišťován vysokým tlakem (jednotky až desítky 10^6 Pa). K dělení dochází na základě vzniku slabých vazeb mezi složkami mobilní fáze (vzorek) a stacionární fází (kolona). Vzorek se dávkuje ve velmi malých množstvích (10^{-6} l) a k detekci je potřeba velmi citlivých detektorů, které umožní kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Signál z detektoru je následně vyhodnocen počítačem [50,51].

Mezi velké výhody HPLC se řadí především velká oblast použitelnosti přes ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární (až 80 % všech známých látek lze analyzovat HPLC). Další výhodou je ovlivňování dělení látek pomocí různého složení mobilní fáze. Nevýhodou bývá označována náročnější instrumentace a ve srovnání např. s plynovou chromatografií i složitější mechanismus separace látek [50,51]. Pro stanovení obsahu Rubisco není metoda HPLC často používaná.

2.6.5 Imunochemické metody

Tyto metody jsou založeny na využití reakce protilátky jako specifických vazebných činidel a antigenu.

2.6.5.1 Radioimunosrážecí metoda

Radioimunosrážecí metody patří mezi poměrně často používané pro stanovení obsahu Rubisco. Získaný enzym Rubisco se aktivuje přidáním HCO_3^- a Mg^{2+} a následně je inkubován

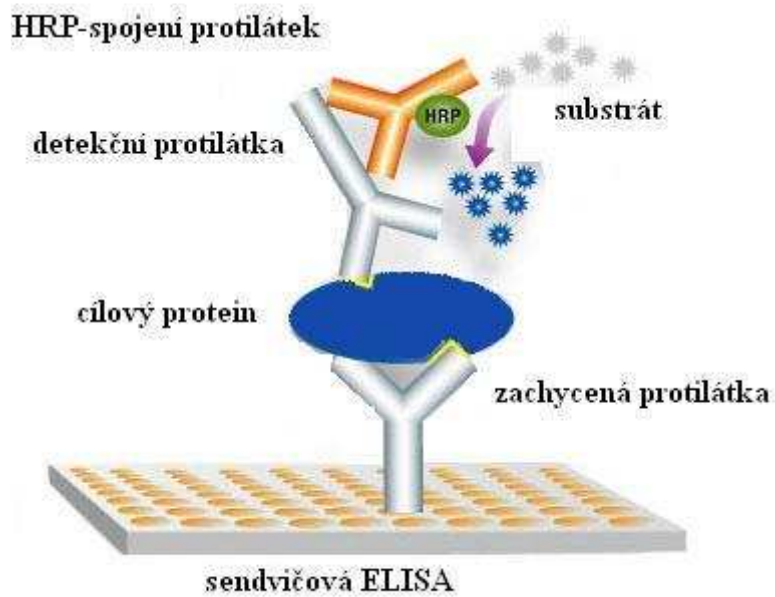
^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátem a protilákovým sérem se specifickou afinitou k enzymu Rubisco. Vznikající sraženina Rubisco- ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfát-protilátka se zachytí na polysulfonový filtr a promyta od přebytku ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu. Množství Rubisco je přímo úměrné úrovni radiace vyzářené sraženinou. Pro vyhodnocení metody je nutné ji kalibrovat na standard Rubisco [52]. Jiang et al. [64] použili tuto metodu pro stanovení obsahu Rubisco v rýži.

2.6.5.2 Elisa

ELISA – enzymově spřažené imunochemické stanovení (enzyme linked immunosorbent assay) je velmi důležitá imunoanalýza. Detekce je založená na přeměně chromogenního substrátu určitým enzymem, který je ve formě konjugátu s antigenem nebo protilátkou. Komplex protilátky s antigenem je navázán na pevný povrch, nejčastěji to bývá plastová mikrotitrační destička. Po navázání na inertní pevný nosič se přidá roztok se stanovovaným proteinem. Vzniklý komplex protein-protilátka se označí další protilátkou, která je specifická pro daný protein, k němuž je kovalentně navázán nějaký enzym, který se lehce stanoví. Odmytím nenavázané protilátky s enzymem se určí aktivita navázaného enzymu v komplexu protilátka-protein-protilátka-enzym, která je úměrná množství přítomného stanovovaného proteinu. Podle způsobu provedení se ELISA dělí na metodu přímou, nepřímou, kompetitivní, sendvičovou [53,54].

Pro detekci antigenu (např. virus, bakterie; rekombinantní peptid, protein; jiný antigen) se používá přímá ELISA. Protilátka je pro detekci značena a po promytí nadbytku protilátky se přidá chromogenní substrát pro vytvoření zbarvení a nebo se změří fluorescence. U nepřímé metody dochází k imobilizaci antigenu, který se nejprve inkubuje s primární protilátkou a její nadbytek je vymyt. Sekundární protilátka se váže na primární protilátku a nadbytek je opět odstraněn vymytím. Pozitivní reakce proběhne, pokud je ve vzorku přítomna primární protilátka. Podmínkou u této metody je, že sekundární protilátka neváže imobilizovaný antigen a ani nezůstane na stěnách mikrotitrační destičky [53].

U sendvičového stanovení se vyskytují dvě možnosti provedení, a to se záchytem antigenu nebo se záchytem protilátky. Při záchytem antigenu je protilátka imobilizována. Následně se přidá antigen a dochází k vymytí jeho nadbytku. V posledním kroku dojde k přidání značené protilátky, která se váže na zachycený antigen. Podmínky provedení jsou stejné jako u nepřímého stanovení, kdy značená protilátka nesmí reagovat s imobilizovanou protilátkou. U varianty se záchytem protilátky dochází k imobilizaci protilátky, která váže protilátky ze vzorku. Po vymytí dochází k přidání specifického antigenu a anti-antigenem, který vytváří signál. Značená protilátka může reagovat s protilátkou pouze v přítomnosti antigenu a zároveň nesmí vznikat nespecifická vazba s pevnou fází. U kompetitivní ELISA se měřené sérum inkubuje dohromady se značeným anti-antigenem. Antigen je navázán na nosič a platí, že čím více protilátky je v séru, tím vzniká silnější zbarvení. U této metody je nutné provádět standardizaci [53].



Obr. 15: Sendvičová ELISA. (Převzato [55])

Ve své studii použil ke stanovení obsahu enzymu Rubisco v různých odrůdách ječmene metodu ELISA Metodiev et al. [56]. Imunochemická metoda ELISA poskytuje poměrně rychlé, přesné a snadné stanovení množství Rubisco v listech rostlin a zároveň se řadí mezi nejcitlivější metody.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Vzorky jehlic smrku ztepilého (*Picea abies* L.) pro stanovení denního chodu obsahu a aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂ byly odebrány na experimentálním ekologickém pracovišti Centra výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i. na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydách (obr. 16). Pracoviště je vybudované v nadmořské výšce 908 m. Smrky jsou kultivovány ve dvou minisférách. V první minisféře je normální koncentrace CO₂ 350 μmol mol⁻¹ a je označována jako A (ambient). Ve druhé minisféře je koncentrace CO₂ zdvojnásobená, tedy 700 μmol mol⁻¹ a je značena E (elevated). V každé kultivační sféře je vysázeno 56 smrků, roční spotřeba CO₂, který je skladován v kapalné formě v zásobníku, činí asi 10⁵ kg.



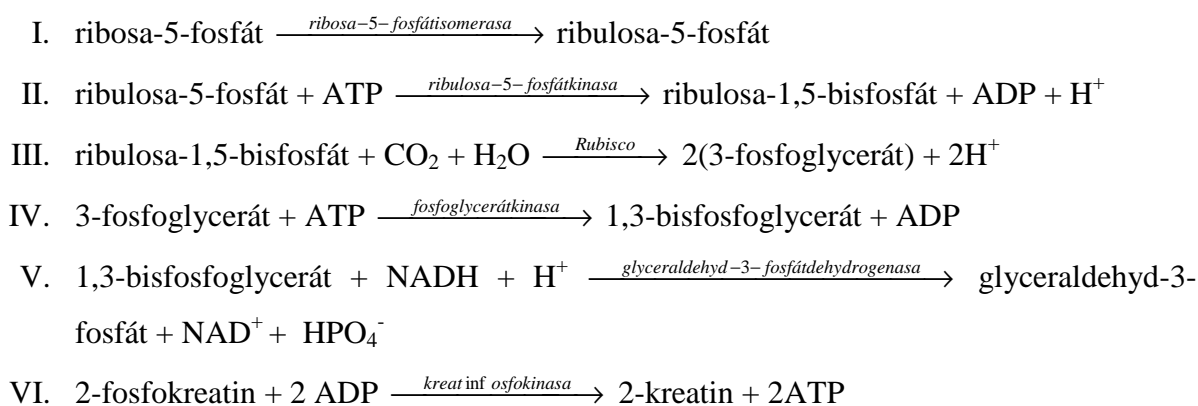
Obr. 16: Experimentální ekologické pracoviště na Bílém Kříži. (Převzato [57])

Smrkové jehlice byly odebrány 22. 6. 2010 v čase od 3:30 do 22:30 po dvouhodinových intervalech. Z každé minisféry byly v daný čas odebrány dvě sady vzorků. Jedna sada vzorků po pěti ($n = 5$) pro spektrofotometrické stanovení enzymu Rubisco a druhá sada po třech vzorcích ($n = 3$), ve kterých byl stanoven obsah enzymu. Při odběru vzorků byly jednoleté jehlice odštíženy pomocí nůžek, vytvořen směsný vzorek a naváženo přibližně 60–80 mg. Následně byly jehlice vloženy do mikrozkuřavky Eppendorf a vloženy do termosky

s kapalným dusíkem. Po převozu byly vzorky uchovávány do zpracování v hlubokomrazícím boxu při teplotě -70 °C na Fakultě chemické v Brně.

3.2 Spektrofotometrická metoda pro stanovení aktivity enzymu Rubisco

Aktivita enzymu Rubisco byla stanovena metodou Lilleyho a Walkera [36] s extrakcí podle Besforda [58]. Pro stanovení počáteční aktivity bylo využito metody podle Heringové [59]. Jako substrát byl použit ribosa-5-fosfát, který byl přeměněn pomocí enzymů obsažených v extraktu na ribulosa-1,5-bisfosfát^(I, II). Dále byl do reakce přimíchán KHCO_3 uvolňující CO_2 a zároveň aktivující enzym Rubisco. Pro aktivaci enzymu Rubisco byly rovněž nutné ionty Mg^{2+} , které jsou přidány ve formě MgCl_2 . Jako konečný produkt vzniká glycerinaldehyd-3-fosfát^(V). Aby nedocházelo k inhibici enzymu fosfoglycerátkinasy, musel být přebytek ADP fosforylován na ATP. Hodnota počáteční a celkové aktivity Rubisco byla zjištěna podle Lambertova-Beerova zákona z úbytku absorbance při oxidaci NADH^(V). Následující reakce zobrazují postup stanovení aktivity Rubisco založené na třech reakcích Calvinova cyklu.



3.2.1 Přístroje

Analytické váhy - BBL32 firmy BOECO Germany, max. 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg.

pH metr - HI 221, Hanna Instruments.

Centrifuga – MLW T52.1.

Absorpční spektrofotometr - Hélios γ firmy Spectronic Unicam, rozsah 190–1100 nm.

3.2.2 Chemikálie

3-fosfoglycerátkinasa (Sigma-Aldrich)

ATP – adenosin-5'-trifosfát (Sigma-Aldrich)

BSA – bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich)

DTT – dithiothreitol (Sigma-Aldrich)

Fosfokreatin (Sigma-Aldrich)

Glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (Sigma-Aldrich)

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina (Sigma-Aldrich)

KHCO_3 – hydrogenuhličitan draselný (Sigma-Aldrich)

KOH – hydroxid draselný (Penta)

Kreatinfosfokinasa (Sigma-Aldrich)

MgCl₂ – chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich)
Na₂EDTA – ethylendiamintetraoctan disodný (Sigma-Aldrich)
NADH – β-nikotinamidadeninukleotid (Sigma-Aldrich)
Polyvinylpyrrolidon (Sigma-Aldrich)
R5P – ribosa-5-fosfát (Sigma-Aldrich)

3.2.3 Příprava roztoků

3.2.3.1 Zásobní roztok 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8

V přibližně 800 ml vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a 0,372 g Na₂EDTA. Po rozpuštění všech látek bylo upraveno pH pomocí KOH ($c = 3 \text{ mol l}^{-1}$) na 7,8. Následně byl roztok převeden do odměrné baňky na 1000 ml a vodou doplněn po rysku. Roztok zůstává stálý, uchovává se při laboratorní teplotě a byl použit pro přípravu extrakčního roztoku.

3.2.3.2 Zásobní roztok 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0

V přibližně 800 ml vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a 0,438 g Na₂EDTA. Po rozpuštění všech látek bylo upraveno pH pomocí KOH ($c = 3 \text{ mol l}^{-1}$) na 8,0. Následně byl roztok převeden do odměrné baňky na 1000 ml a vodou doplněn po rysku. Roztok zůstává stálý, uchovává se při laboratorní teplotě a byl použit pro přípravu pracovního a aktivačního roztoku.

3.2.3.3 Aktivační roztok

V 50 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 0,2285 g MgCl₂ v HEPES-KOH, pH 8,0.
V 50 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 0,3003 g KHCO₃ v HEPES-KOH, pH 8,0.
Oba roztoky jsou stálé a uchovávají se při laboratorní teplotě.

3.2.3.4 Extrakční roztok

V 200 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 0,156 g DTT, 0,096 g MgCl₂ a 0,4 g BSA v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 7,8. Roztok je nutné uchovávat při teplotě 4 °C. Získaný roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 1 mM Na₂EDTA, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂ a 0,2 % BSA.

3.2.3.5 Roztok glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasy

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6 mg glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasy. Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

3.2.3.6 Roztok kreatinfosfokinasy

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 byly rozpuštěny 2 mg kreatinfosfokinasy. Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

3.2.3.7 Roztok R5P

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6,2 mg glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy. Roztok se uchovává při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.8 Roztok 3-fosfoglycerátkinasy

K měření byl použit komerčně vyráběný roztok 3-fosfoglycerátkinasy. Roztok je nutné uchovávat při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.9 Pracovní roztok

V 25 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 8,0:

0,005 g NADH

0,02 g DTT

0,0325 g fosfokreatinu

0,0475 g ATP

47,5 μl 3-fosfoglycerátkinasy

250 μl roztoku kreatinfosfokinasy

250 μl roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy.

Získaný roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 1 mM Na_2EDTA , 0,25 mM NADH, 5 mM DTT, 5 mM fosfokreatinu, 3,5 mM ATP, 80 nkat 3-fosfoglycerátkinasy, 80 nkat kreatinfosfokinasy a 80 nkat glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě a zůstává stálý maximálně 6 hodin.

3.2.4 Extrakce enzymu

Přibližně 60–80 mg smrkových jehlic bylo spolu s mořským pískem rozdrceno v třecí misce. Po přidání 5 ml extrakčního roztoku a asi půl lžičky polyvinylpolypyrrolidonu byla směs 30 s homogenizována. Výsledná suspenze byla nalita do centrifugační zkumavky a po 1 minutě odstředování byl získán extrakt. Tento extrakt byl následně použit k určení počáteční a celkové aktivity. Extrakt rychle stárne, a proto bylo nutné ho zpracovat co nejrychleji.

3.2.5 Měření aktivity

3.2.5.1 Počáteční aktivita

Počáteční aktivita byla proměřována v optické kyvetě, do které bylo přidáno 50 μl aktivačního roztoku MgCl_2 a 50 μl aktivačního roztoku KHCO_3 . Dále bylo napipetováno 20 μl extraktu, 850 μl pracovního roztoku a 30 μl R5P roztoku. Roztok byl promíchán a měřen pokles absorbance v 30 s intervalech po dobu 6 minut při vlnové délce 340 nm.

3.2.5.2 Celková aktivita

Celková aktivita byla proměřována v optické kyvetě, do které bylo přidáno 50 μl aktivačního roztoku MgCl_2 a 50 μl aktivačního roztoku KHCO_3 a 20 μl extraktu. Takto připravený roztok byl promíchán a 15 minut inkubován při laboratorní teplotě. Po uplynutí 15 minut bylo

napipetováno 850 μl pracovního roztoku a 30 μl ribosa-5-fosfátu. Roztok byl promíchán a měřen pokles absorbance v 30 s intervalech po dobu 6 minut při vlnové délce 340 nm.

3.2.6 Výpočet aktivity enzymu Rubisco

Celkem bylo změřeno pro stanovení aktivity 50 vzorků, vždy 5 pro daný čas. Z naměřených hodnot absorbance byly získány hodnoty A, ze kterých byl vypočítán úbytek absorbance za 30 s (ΔA). Následně pomocí Lambert-Beerova zákona byla vypočítána aktivita enzymu.

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \varepsilon \cdot l \cdot \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

kde A je absorbance, t je čas [s], ε je molární absorpční koeficient [$\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}$], l je délka optické dráhy [cm], c je koncentrace [mol l^{-1}].

Aktivita enzymu byla zjištěna z rychlosti úbytku substrátu (CO_2):

$$\Delta n = \frac{\Delta A \cdot V}{2 \cdot \varepsilon \cdot l}$$

kde V je objem vzorku [μl]. Pro daný výpočet byla hodnota ε pro NADH $6300 \text{ cm}^2 \text{mmol}^{-1}$ a optická dráha kyvety byla 1 cm.

Příklad výpočtu pro počáteční aktivitu:

Tab. 1 Stanovení počáteční aktivity enzymu Rubisco ve vzorku A 3:30 (4)

t [s]	ΔA
0	
30	0,0040
60	0,0040
90	0,0040
120	0,0030
150	0,0030
180	0,0040
210	0,0040
240	0,0040
270	0,0040
300	0,0040
330	0,0040
Průměr ΔA [min^{-1}]	0,0038
Aktivita [$\mu\text{mol CO}_2 \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]	1,5231

Aktivita v 20 μl extraktu (pro převod ze 30 sekundového intervalu na minuty, byla průměrná absorbance vynásobena dvěma):

$$\Delta n = \frac{\Delta A \cdot V}{2 \cdot \varepsilon \cdot l} = \frac{2 \cdot 0,0038 \cdot 1000}{2 \cdot 6300 \cdot 1} = 6,0317 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1}$$

Aktivita v celém objemu extraktu (5 ml):

$$\Delta n = \frac{5 \cdot 6,0317 \cdot 10^{-4}}{0,02} = 1,5079 \cdot 10^{-1} \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1}$$

Aktivita Rubisco vztažená na jednotkovou hmotnost jehlic:

$$\Delta n = \frac{1,5079 \cdot 10^{-1}}{0,099} = 1,5231 \mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$$

Stanovení specifické aktivity enzymu Rubisco

Specifická aktivita byla získána z poměru aktivity a množství enzymu Rubisco.

$$n_{\text{spec.}} [\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}] = \frac{\Delta n [\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]}{m [\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}]}$$

Příklad výpočtu počáteční specifické aktivity v čase 3:30 pro vzorek A (1):

$$n_{\text{spec.}} = \frac{1,3833}{33,75} \cdot 1000 = 41,00 \mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$$

Stanovení stupně aktivace

Stupeň aktivace byl získán z poměru počáteční a celkové aktivity.

$$\text{Stupeň aktivace} [\%] = \frac{a_{\text{poč.}}}{a_{\text{celk.}}} \cdot 100$$

Příklad výpočtu stupně aktivace v čase 3:30 pro vzorek A :

$$s.a. = \frac{1,55}{1,74} \cdot 100 = 89,08 \%$$

3.3 SDS-PAGE metoda pro stanovení obsahu enzymu Rubisco

Pro stanovení obsahu enzymu Rubisco bylo využito metody Damervalové et al. [60] a Rogerse et al. [61], která byla upravena Hlaváčkem [62].

3.3.1 Přístroje

Analytické váhy - BBL32 firmy BOECO Germany, max. 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg.

Centrifuga – MLW T52.1.

Vortex – Stuart SA8

Termoblok – BIO TDB-100 firmy BIOSAN

Přístroj pro elektroforézu – POWER PAC HC, BIO-RAD.

Třepačka - LT2 Kavalier a. s.

3.3.2 Chemikálie

Akrylamid (Sigma-Aldrich)

N,N'-methylenbisakrylamid (Serva)

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich)

HCl – kyselina chlorovodíková (Lach-Ner)

SDS – dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich)

Peroxodisíran amonný (Serva)

Bromfenolová modř Na sůl (Serva)

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

Glycin (Serva)

DTT – dithiothreitol (Sigma-Aldrich)

Glycerol (Sigma-Aldrich)

2-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich)

Methanol (Penta)

Brilantní modř G 250 – Coomassie (Serva)

Kyselina octová (Lach-Ner)

Ethanol (Lachema)

Butanol (Lachema)

D-ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa (Sigma-Aldrich)

3.3.3 Příprava roztoků

3.3.3.1 Roztoky pro přípravu gelů

Roztok A:

Ve 100 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 30 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu. Roztok je nutné uchovávat při teplotě 4 °C.

Roztok B:

V 50 ml vody bylo rozpuštěno 18,16 g TRIS, dále bylo pomocí koncentrované HCl upraveno pH na 8,8 a roztok byl doplněn vodou na 100 ml. Roztok je nutné uchovávat při teplotě 4 °C.

Roztok C:

V 50 ml vody bylo rozpuštěno 18,16 g TRIS, dále bylo pomocí koncentrované HCl upraveno pH na 6,8 a roztok byl doplněn vodou na 100 ml. Roztok je nutné uchovávat při teplotě 4 °C.

Roztok D:

Ve 100 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 10 g SDS. Roztok je nutné uchovávat v temnu.

Roztok E:

V 1 ml vody bylo rozpuštěno 0,1 g peroxidisíranu amonného. Roztok se připravuje pro každé měření čerstvý.

Roztok F:

V 1 ml vody bylo rozpuštěno 10 mg bromfenolové modři. Roztok je nutné uchovávat při teplotě 4 °C.

TEMED:

Komerčně dodávaný roztok.

3.3.3.2 Pufry

Elektrodový pufr:

Ve 1000 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycinu. Roztok je nutné uchovávat při teplotě 4 °C a tento roztok je možno využívat opakovaně.

TRIS pufr:

Ve 450 ml vody bylo rozpuštěno 3,76 g TRIS, 10 g SDS, 5,02 g DTT a 50 ml glycerolu. Dále bylo pH upraveno pomocí koncentrované HCl na pH 6,8 a roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

Vzorkový pufr:

Byl připraven smícháním 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkaptoethanolu. Roztok je nutné uchovávat při teplotě 4 °C.

3.3.3.3 Roztoky k vizualizaci bílkovin

Stabilizační roztok:

Byl připraven smícháním 100 ml methanolu a 400 ml vody.

Barvicí roztok:

Byl připraven smícháním 0,5 g Coomassie Blue, 450 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody.

Odbarvovací roztok:

Byl připraven smícháním 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody.

3.3.4 Příprava gelů

Skla použitá na elektroforézu byla očištěna vodou a odmašťovacím prostředkem. Dále byla omyta destilovanou vodou a vyleštěna ethanolem. Elektroforetická skla byla připravena do stojanu tak, aby silnější sklo bylo vzadu. Spodní okraje skel byly na gumové podložce a přimáčknutím skel do podložky bylo zabráněno případnému protečení gelu. K měření byl připraven 8 % separační gel a 5 % zaostřovací gel. Gely bylo nutné připravovat v rukavicích, protože akrylamid je vysoce toxický.

3.3.4.1 Separační gel

Automatickými pipetami byly připraveny do kádinky následující objemy roztoků podle tab. 2.

Tab. 2 Množství roztoků potřebné k přípravě 8 % separačního gelu

Roztok	Objem [ml]
H ₂ O	4,6
A	2,7
B	2,5
D	0,1
E	0,14
TEMED	0,006

Roztok E a TEMED byly napipetovány do kádinky až jako poslední před samotným nalitím mezi skla. Roztok byl nalit tak, aby zůstalo asi 2 cm od horního okraje volné pro zaostřovací gel. Na roztok mezi skly byl nalit butanol, který vyrovná hladinu gelu a zároveň brání odpařování vody.

3.3.4.2 Zaostřovací gel

Automatickými pipetami byly připraveny do kádinky následující objemy roztoků podle tab. 3.

Tab. 3 Množství roztoků potřebné k přípravě 5 % zaostřovacího gelu

Roztok	Objem [ml]
H ₂ O	2,1
A	1,0
C	0,38
D	0,03
E	0,03
TEMED	0,003

Zaostřovací gel byl přidán až po ztuhnutí gelu, slití butanolu a několikanásobným promytí gelu destilovanou vodou. Roztok E a TEMED byly opět napipetovány až jako poslední před samotným nalitím gelu mezi skla. Gel byl navrstven na separační gel až po okraj a ihned do něj byl dán elektroforetický hřebínek. Hřebínek byl z gelu vyndán až před samotným nanášením vzorků a bylo možné mít gel připravený maximálně den dopředu uchovávaný v ledničce.

3.3.5 Příprava standardu

Pro přípravu standardu bylo nutné v mikrozkuhavce Eppendorf smíchat 0,5 mg D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy a 1 ml vzorkového pufru (0,5 mg ml⁻¹). Směs byla důkladně promíchána a na 5 minut vložena do termobloku při teplotě 100 °C. Po vychladnutí byl standard uchovávan v mrazničce při teplotě -18 °C do dalšího měření.

3.3.6. Příprava vzorků

Každý vzorek byl postupně rozdrcen v třecí misce spolu s mořským pískem. Do rozdrceného vzorku jehlic byly přidány 2 ml TRIS pufru. Vzorek byl důkladně homogenizován a suspenze byla následně vložena do centrifugy a přibližně asi 1 minutu odstředována. Z připraveného extraktu bylo odebráno 0,5 ml a spolu s 0,5 ml vzorkového pufru dáno do zkumavky Eppendorf. Dále bylo pokračováno jako při přípravě standardu. Směs byla důkladně promíchána a na 5 minut vložena do termobloku při teplotě 100 °C. Po vychladnutí byly vzorky uchovávány v mrazničce při teplotě -18 °C do stanovení hmotnosti enzymu Rubisco.

3.3.7 Elektroforéza

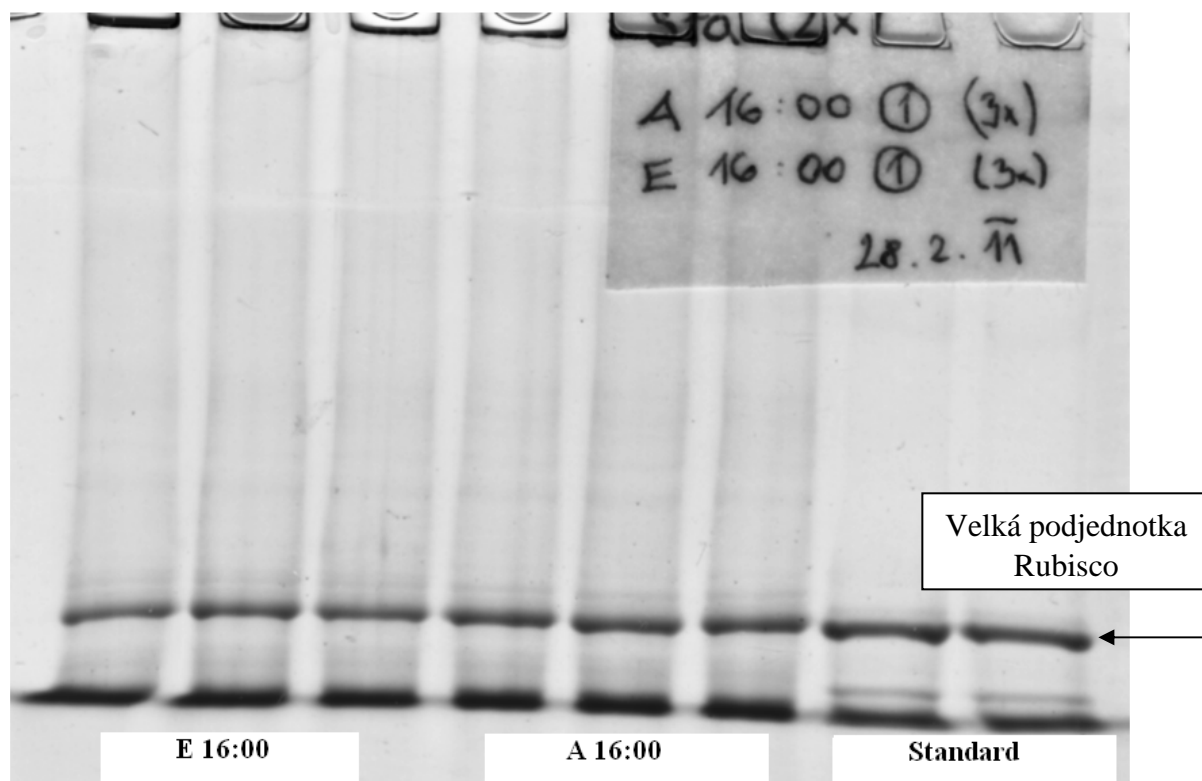
Elektroforetická skla s gelem byla vyjmuta ze stojanu, odstraněny zbytky gelů ze skel a opatrně byl vytažen hřebínek. Takto připravený gel byl vložen do stojanu na elektroforézu, silnějším sklem ven a důkladně upevněn. Do prostoru mezi skly byl nalit elektrodový pufr a zjištěno zda protéká nebo ne. Stojan se skly byl vložen do elektroforetické nádoby, která byla následně z poloviny naplněna elektrodovým pufrem. Automatickými pipetami s dlouhými špičkami byly dávkovány vzorky a standard. Vždy byl nadávkován do první jamky standard (10 µl) a následně třikrát jeden vzorek (10 µl). Připravená aparatura byla připojena ke zdroji o napětí 80 V. V průběhu probíhající elektroforézy bylo nutné kontrolovat zda je dostatečné množství elektrodového pufru ve vnitřním prostoru mezi skly, pokud ne, byl dolit. Samotná elektroforéza trvala přibližně 2 hodiny.

3.3.8 Vizualizace bílkovin

Po proběhnutí elektroforézy byla skla vyjmuta ze stojanu a vložena do misky s destilovanou vodou tak, aby silnější sklo směřovalo směrem nahoru. Špachtlí byla skla od sebe oddělena a opatrně vytažena z misky, aby nedošlo k roztržení gelu. Destilovaná voda byla slita a následně na gel byl nalit stabilizační roztok a 5 minut stabilizován na třepačce. Stabilizační roztok byl slit a gel byl převrstven barvicím roztokem, který byl ponechán na třepačce 30 minut. Po obarvení gelu byl roztok znovu slit a nejprve promyt použitým odbarvovacím roztokem. Nakonec byl na gel použit čistý odbarvovací roztok, který byl ponechán 90 minut na třepačce. Po odstranění odbarvovacího roztoku byl gel několikrát promyt destilovanou vodou, vložen na silné elektroforetické sklo a obalen potravinářskou fólií, která ho chrání před odpařováním vody a vysycháním. Hotové gely byly vloženy do lednice a skladovány do samotného vyhodnocení při teplotě 4 °C. Vizualizaci bílkovin bylo nutné provádět v rukavicích, protože akrylamid je vysoce toxický.

3.3.9 Vyhodnocení gelů

Připravené gely byly neskenovány a vypočítána hmotnost enzymu Rubisco programem počítačovým programem Science Lab 2006 Multi Gauge, ver3.1, fy FUJIFILM. Pro výpočet byly zóny velkých podjednotek převedeny na píky a integrací byly zjištěna jejich plocha. Množství enzymu Rubisco bylo odvozeno porovnáním plochy zóny jednotlivých vzorků a plochy zóny standardu (obr. 17). Aby bylo možno dobře vypočítat množství enzymu a eliminovat různé faktory nepřesností, byl standard Rubisco nanášen na každý gel.



Obr. 17 Připravený gel pro vyhodnocení programem Science Lab 2006 Multi Gauge, ver3.1.

3.3.10 Výpočet obsahu enzymu Rubisco

Obsah enzymu Rubisco byl vypočten z poměru plochy stanovovaného vzorku, plochy standardu Rubisco (o známé koncentraci) a hmotnosti vzorku.

Příklad výpočtu pro stanovení obsahu enzymu Rubisco:

Tab. 4 Stanovení obsahu enzymu Rubisco ve vzorku 3:30 A (3)

Vzorek	Plocha [m ²]	Hmotnost [g]	c [mg g ⁻¹]
Standard	101961,71	-	-
3:30	64008,47	0,073	16,99
3:30	64823,48	0,073	17,53
3:30	63488,09	0,073	16,99

Jako standard byl použit roztok D-ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasa 0,5 mg ml⁻¹.

Hmotnost enzymu v 1 ml 2x zředěného extraktu (0,5 ml extraktu a 0,5 ml vzorkového pufru):

$$m = \frac{64008,47}{101961,71} \cdot 0,5 = 0,31 \text{ mg}$$

Hmotnost enzymu v 1 ml neředěného extraktu:

$$m = 2 \cdot 0,31 = 0,62 \text{ mg}$$

Hmotnost enzymu v celém objemu extraktu (2 ml):

$$m = 2 \cdot 0,62 = 1,24 \text{ mg}$$

Obsah enzymu v 1 g čerstvého vzorku:

$$c = \frac{1,24}{0,073} = 16,99 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$$

Obecný vzorec pro výpočet standardu enzymu Rubisco:

$$c = \frac{P_{\text{vzorku}} \cdot c_{\text{st}} \cdot 4}{P_{\text{st}} \cdot m_{\text{jehlic}}} = \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$$

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Výsledky

Tab. 5 Hodnoty počáteční aktivity, celkové aktivity a aktivace enzymu Rubisco v podmínkách normální (A) a zvýšené koncentrace (E) CO₂ jehlic smrku ztepilého odebírané 22. 6. 2010.

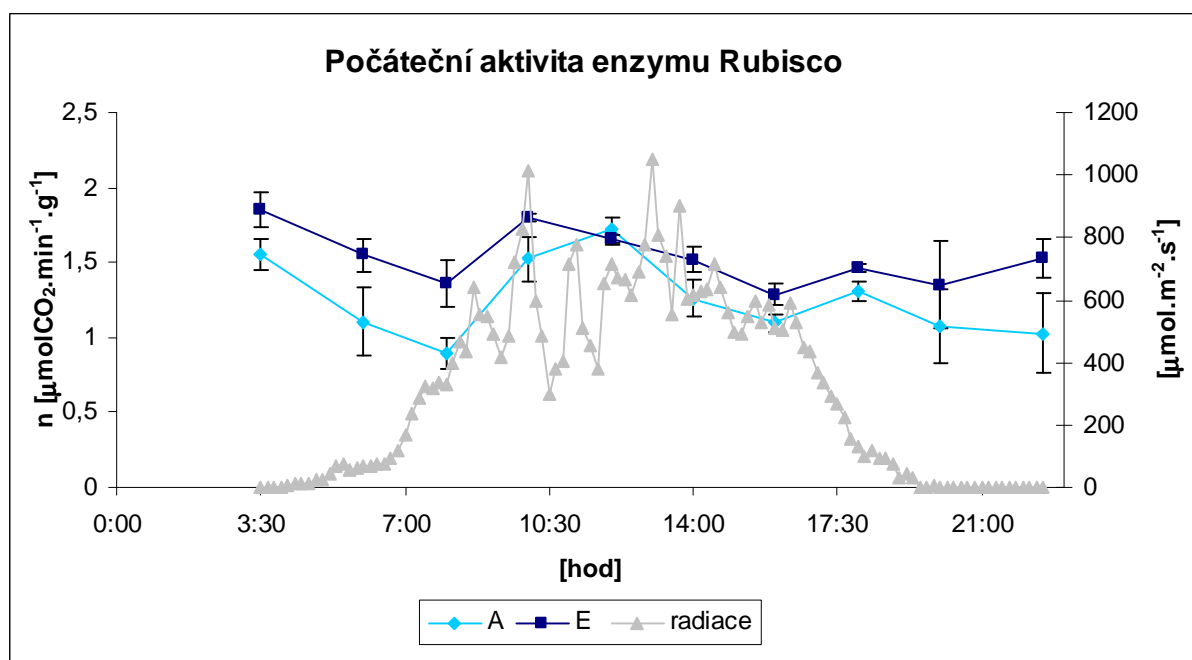
Vzorky	Δn poč. [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]		Δn celk. [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]		aktivace [%]	
	A	E	A	E	A	E
3:30	1,55	1,86	1,75	2,13	88,96	87,07
6:00	1,10	1,55	1,51	1,88	73,12	82,20
8:00	0,89	1,36	1,33	1,65	66,97	82,58
10:00	1,52	1,80	1,84	1,91	82,63	94,07
12:00	1,72	1,65	1,89	1,70	91,31	97,07
14:00	1,26	1,52	1,62	1,65	77,76	91,67
16:00	1,10	1,29	1,39	1,50	78,65	86,13
18:00	1,31	1,46	1,77	1,87	73,81	78,21
20:00	1,08	1,35	1,37	1,58	78,65	85,84
22:30	1,03	1,53	1,55	1,61	66,31	94,80
max. hodnota	1,72	1,86	1,89	2,13	91,31	97,07
min. hodnota	0,89	1,29	1,33	1,50	66,31	78,21

Tab. 6 Hodnoty specifické počáteční aktivity, specifické celkové aktivity a obsahu enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂ jehlic smrku ztepilého odebírané 22. 6. 2010.

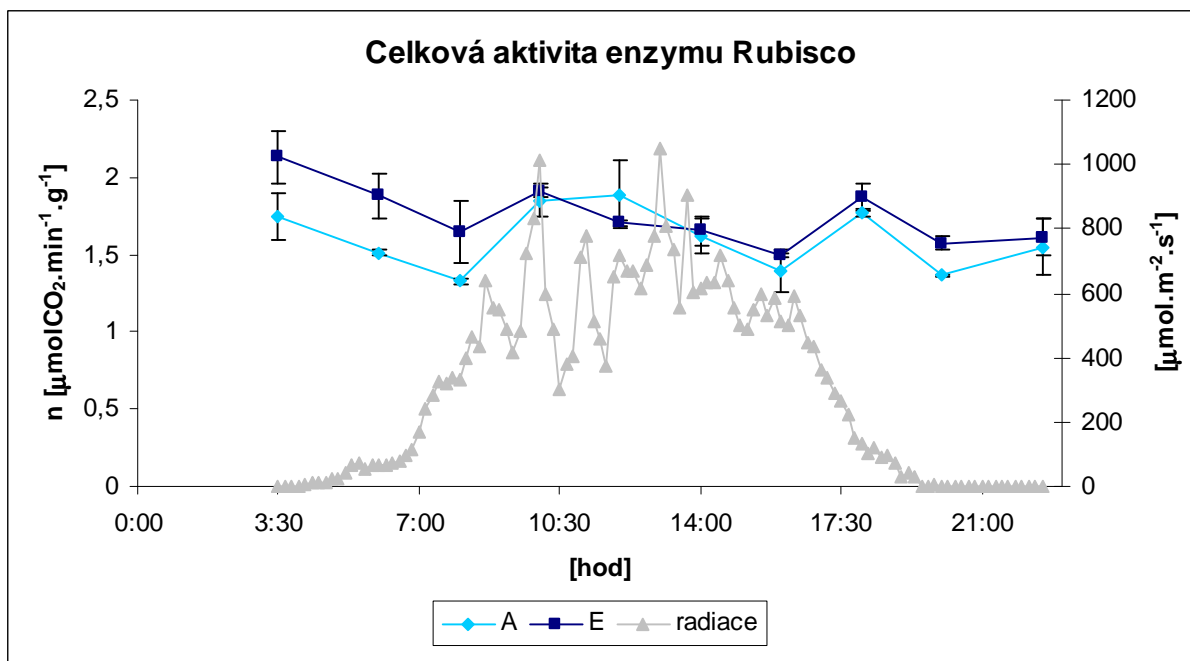
Vzorky	$\Delta n_{\text{spec.}} \text{ poč.}$ [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]		$\Delta n_{\text{spec.}} \text{ celk.}$ [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]		obsah [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]	
	A	E	A	E	A	E
3:30	92,02	140,35	106,22	161,19	16,87	13,22
8:00	81,16	179,78	121,19	217,70	10,95	7,58
12:00	96,80	150,58	106,01	155,12	17,79	10,98
16:00	59,05	87,63	75,08	101,74	18,56	14,71
20:00	48,75	89,96	61,99	104,80	22,06	15,04
22:30	56,80	110,80	85,67	116,88	18,07	13,81
max. hodnota	96,80	179,78	121,19	217,70	22,06	15,04
min. hodnota	48,75	87,63	61,99	101,74	10,95	7,58

Tab. 7 Hodnoty fotosynteticky aktivní radiace dne 22. 6. 2010.

Čas [hod]	Radiace [$\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]
3:30	0
6:00	67,40
8:00	330,87
10:00	1011,20
12:00	717,76
14:00	612,63
16:00	511,48
18:00	132,61
20:00	0
22:30	0
max. hodnota	1048,55
min. hodnota	0

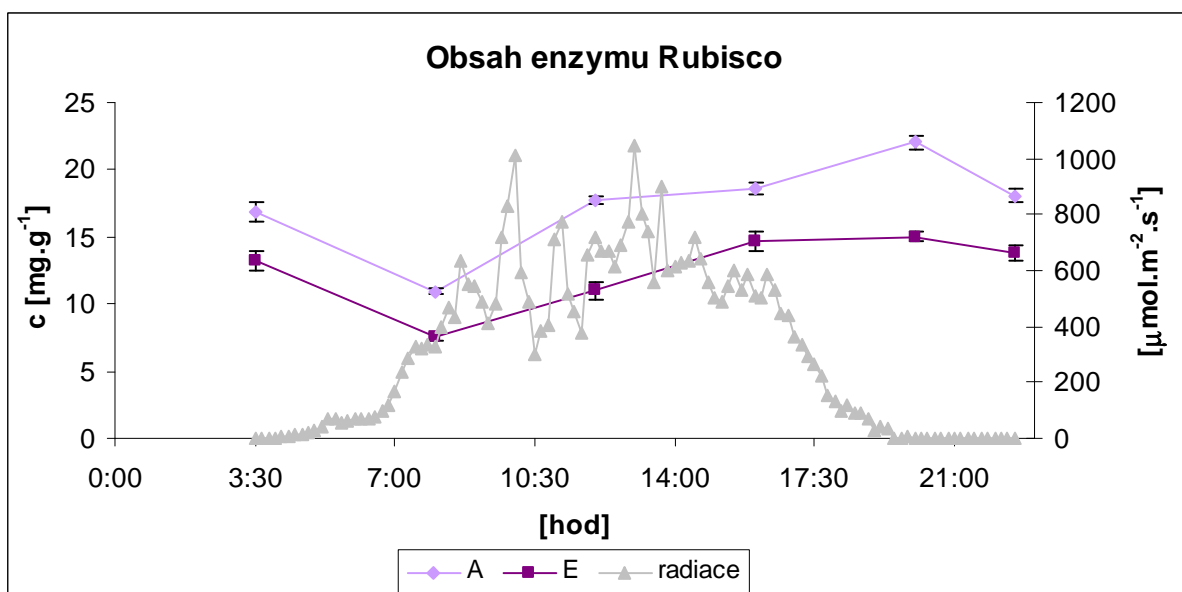


Obr. 18 Počáteční aktivita enzymu Rubisco vztažená na jednotkovou hmotnost jehlic smrku ztepilého v podmínkách normální koncentrace CO_2 (A) a zvýšené koncentrace CO_2 (E) v závislosti na změně ozáření během dne.



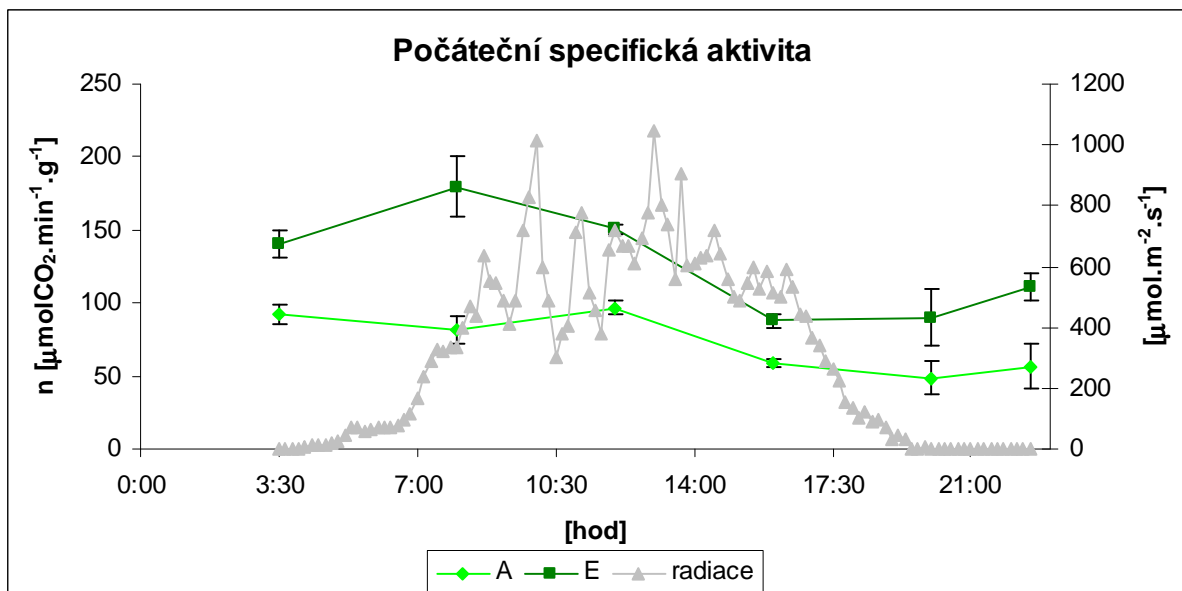
Obr. 19 Celková aktivita enzymu Rubisco vztažená na jednotkovou hmotnost jehlic smrku ztepilého v podmínkách normální koncentrace CO_2 (A) a zvýšené koncentrace CO_2 (E) v závislosti na změně ozáření během dne.

Z obr. 18 a 19 je zřejmé, že u většiny vzorků varianty E byly naměřeny statisticky významně vyšší hodnoty aktivity Rubisco nežli u varianty A. V čase 10:00 byla počáteční aktivita u obou variant významně vyšší než v 8:00 (o 41,4 % v A a o 24,4 % v E). Pro celkovou aktivitu došlo v čase mezi 8:00-10:00 ke zvýšení o 27,7 % v A a o 13,6 % v E. V době 8:00–16:00 kopírovala počáteční a celková aktivita u obou variant přibližně změny ozáření.

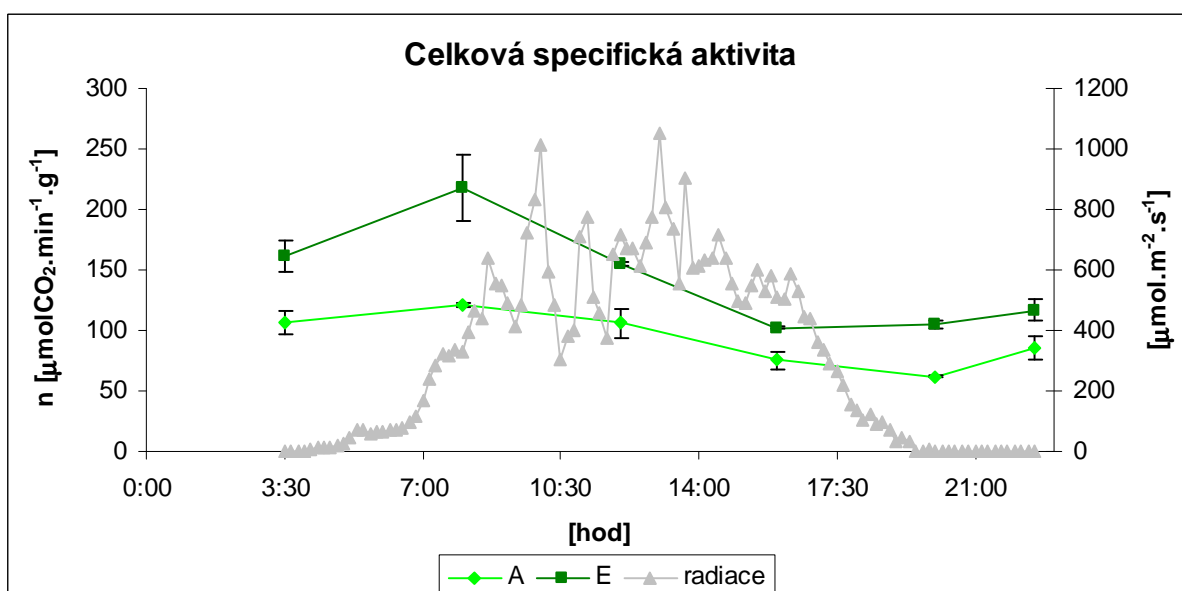


Obr. 20 Obsah enzymu Rubisco jehlic smrku ztepilého v podmínkách normální koncentrace CO_2 (A) a zvýšené koncentrace CO_2 (E) v závislosti na změně ozáření během dne.

Z obr. 20 ukazuje, že obsah enzymu Rubisco v jehlicích smrku zteplého byl vyšší při normální koncentraci CO_2 než při zvýšené koncentraci CO_2 a všechny rozdíly během denního chodu byly statisticky významné. Největší rozdíl byl naměřen v čase 12:00, kdy obsah Rubisco v A byl o 38,3 % vyšší než v E. Tyto výsledky dokazují aklimační depresi obsahu enzymu Rubisco při dlouhodobém působení zvýšené koncentrace CO_2 .

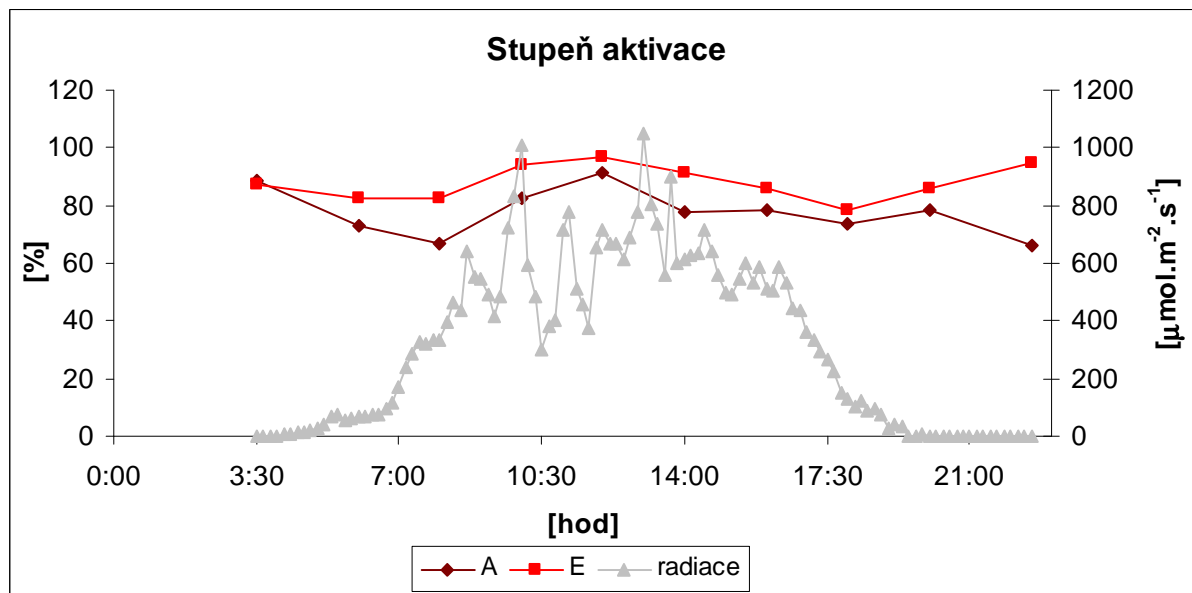


Obr. 21 Počáteční specifická aktivita enzymu Rubisco vztažená na jednotkovou hmotnost jehlic smrku zteplého v podmínkách normální koncentrace CO_2 (A) a zvýšené koncentrace CO_2 (E) v závislosti na změně ozáření během dne.



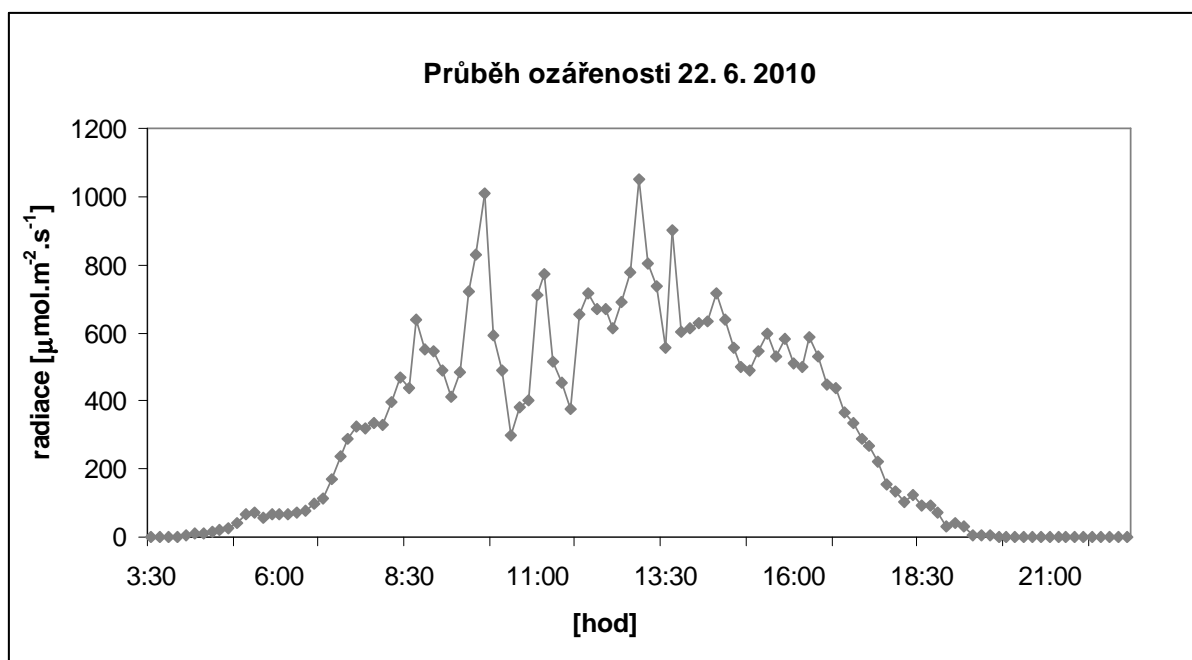
Obr. 22 Celková specifická aktivita enzymu Rubisco vztažená na jednotkovou hmotnost jehlic smrku zteplého v podmínkách normální koncentrace CO_2 (A) a zvýšené koncentrace CO_2 (E) v závislosti na změně ozáření během dne.

Z obr. 21 a 22 lze vyčíst, že u všech vzorků jehlic byly naměřeny statisticky významné rozdíly mezi denním chodem počáteční i celkové specifické aktivity u smrku ztepilého v normální koncentraci CO₂ a zvýšené koncentraci CO₂. V čase od 3:30 do 8:00 dochází k mírnému nárůstu specifické aktivity a od 8:00 mají křivky pro A i E klesající tendenci. Největší statisticky významný rozdíl byl naměřen v čase 8:00, kdy v A byla počáteční specifická aktivita o 55 % a celková specifická aktivita o 44 % nižší než v E.



Obr. 23 Stupeň aktivace enzymu Rubisco jehlic smrku ztepilého v podmínkách normální koncentrace CO₂ (A) a zvýšené koncentrace CO₂ (E) v závislosti na změně ozáření během dne .

Na obr. 23 je vidět stupeň aktivace enzymu Rubisco v jehlicích u smrku ztepilého v normální koncentraci CO₂ a zvýšené koncentraci CO₂. Stupeň aktivace byl v normální koncentraci CO₂ nižší než ve zvýšené koncentraci CO₂. Během denního chodu při zvýšené koncentraci CO₂ docházelo do 12:00 k mírnému nárůstu, od této hodiny do 18:00 měla křivka naopak klesající tendenci a od 18:00 do konce měření došlo opět ke zvýšení. Při normální koncentraci CO₂ křivka do 8:00 klesala, do 12:00 je viditelný značný nárůst a od 12:00 došlo znovu k poklesu až do konce měření. Graf stupně aktivace ukazuje značný vliv ozáření, která je nejvíce zřejmá v čase od 8:00–16:00.



Obr. 24 Průběh ozáření během 22. 6. 2010 při odběru vzorků jehlic smrku ztepilého pro stanovení aktivity a obsahu enzymu Rubisco.

Při odběru vzorků jehlic smrku ztepilého dne 22. 6. 2010 nebylo slunečné počasí, ale pouze difúzní slunce. Obloha byla zatažená, spíše oblačná s občasnými přeháňkami. Toto je patrné také z naměřených hodnot ozáření, které vykazují nižší hodnoty než při jasně slunném dni. Při jasném a slunečném dni vykazuje křivka také většinou jedno maximum ve 12:00. Do této doby má křivka většinou poměrně velký nárůst a od 12:00 dochází opět k poklesu hodnot ozáření. Z obr. 18–23 je zřejmé přibližné kopírování křivky ozáření jak pro počáteční aktivitu, celkovou aktivitu a stupeň aktivace v době mezi 8:00–16:00 hod.

4.2 Diskuze

Aktivita Rubisco závisí na obsahu tohoto enzymu, obsahu pevně vázaných inhibitorů a na karbamylaci aktivního místa. Aktivita enzymu se mění v čase v závislosti na teplotě, ozáření, koncentraci CO₂, obsahu fosforečnanu a přítomnosti inhibitorů v aktivním místě. Inhibitory enzymu Rubisco značně snižují aktivitu tím, že se váží na karbamylované Rubisco a brání katalýze. Vazba substrátu RuBP do nekarbamylovaného enzymu zamezí karbamylaci lysylového zbytku podstatného pro aktivaci [63]. Celková aktivita se mění během dne kvůli působení inhibitorů a získá se po kompletní aktivaci CO₂ a Mg²⁺. Rozdíl mezi počáteční a celkovou aktivitou Rubisco je mírou karbamylace.

Naměřené hodnoty počáteční aktivity v jehlicích smrku ztepilého během dne byly v rozmezí 0,89–1,72 μmol CO₂ min⁻¹ g⁻¹ u varianty A a 1,29–1,86 μmol CO₂ min⁻¹ g⁻¹ u varianty E. Hodnoty celkové aktivity byly v rozmezí 1,33–1,89 μmol CO₂ min⁻¹ g⁻¹ pro variantu A a 1,50–2,13 μmol CO₂ min⁻¹ g⁻¹ pro variantu E.

Křivka pro počáteční aktivitu v normální koncentraci CO₂ (A) i pro zvýšenou koncentraci CO₂ (E) vykazuje dvě maxima a křivky přibližně kopírují svůj tvar. Počáteční aktivita je v A statisticky významně nižší než v E. Nejprve od 3:30 do 8:00 došlo ke značnému poklesu aktivity, od 8:00 do 12:00 následoval značný nárůst a v 12:00 první maximum (v E první maximum již 10:00). Od 12:00 (resp. v E od 10:00) došlo k poklesu (polední deprese) a od 16:00 do 18:00 mají křivky opět stoupající charakter. V 18:00 mají obě křivky druhé maximum a od této doby až do konce měření dochází spíše k poklesu hodnot. Stejný průběh se dvěma maximy v čase 9:00 a 17:00 naměřili Hrstka et al. [63]. Autoři uvádějí velmi nízkou počáteční aktivitu před východem slunce v 6:00 a stupeň aktivace byl v této době pouze 62 %. Se stoupající ozářeností se zvyšovala i počáteční i celková aktivita. Od 9:00 až do 13:00 došlo v jejich experimentu ke snížení aktivity (polední deprese). Další autoři zmiňující z počátku dne pokles aktivity a polední depresi jsou např. Jiang et al. [64], kteří sledovali denní chod aktivity Rubisco u rýže. Pérez et al. [65] zmiňují studii u jarní pšenice a uvádí, že počáteční aktivita je nižší během dne než celková aktivita kvůli deaktivaci Rubisco. Celková aktivita byla zvýšená na počátku dne především v závislosti na koncentraci CO₂.

Ve studii [66] uvádí Sinha et al., že polední deprese vzniká snížením intenzity fotosyntézy i vodivosti průduchů a je spojována s vysokým deficitem tlaku par, vysokou teplotou a značným ozářením. I přes výše zmíněné příčiny, není polední deprese přesně zcela objasněna. Sinha et al. [66] zmiňují, že v několika případech je i patrné snížení účinnosti karboxylace, přestože vnitřní koncentrace CO₂ zůstane konstantní. Na druhé straně může nepravidelné uzavírání průduchů během dne snížit lokálně vnitřní koncentraci CO₂ a následně inhibovat fotosyntézu. Pons et al. [69] zkoumali ve své práci polední depresi v tropickém deštném pralese u stromu *Eperua grandiflora*. Autoři se své práci uvádí, že zvýšením teploty listu dochází ke zvýšení rozdílu tlaku par mezi listem a vzduchem, tím dojde ke snížení vodivosti průduchů a snížení dostupnosti CO₂ v chloroplastech. Toto označují jako hlavní nepřímý faktor zvýšené teploty přispívající k polední depresi. Jako přímý negativní faktor zvýšené teploty a vzniku polední deprese udávají snížení karboxylační aktivity Rubisco. Snížením karboxylační aktivity Rubisco vztažené k oxygenaci a snížení afinity k CO₂ při zvýšené teplotě je kompenzováno částečně zvýšením karboxylační kapacity [69]. Snížená vodivost průduchů může vést ke snížení počáteční aktivity *in vitro*. V našem experimentu

jsme však naměřili snížení počáteční i celkové aktivity, což svědčí o tom, že polední deprese byla vyvolána přítomností denních pevně vázaných inhibitorů (např. XuBP) na aktivních místech Rubisco.

U rostlin s CA1P (např. *Phaseolus vulgaris*) je všechn CA1P při svítání navázán na aktivní místo enzymu a celková aktivita je proto velmi nízká. V přirozených podmínkách je CA1P degradováno se stoupající ozářeností a zmizí přibližně po 10 min působení radiace. S klesající ozářeností večer a v noci množství CA1P naopak stoupá, což se projeví poklesem celkové aktivity. Nízké hodnoty celkové aktivity v noci a při svítání u některých rostlin tedy signalizují vliv CA1P. Z naměřených výsledků je patrné, že u smrku nemá noční inhibitor CA1P významný vliv [67].

Obsah enzymu Rubisco se mění během dne mnohem pomaleji, nežli jeho aktivita, a to se zpožděním 5–7 hodin za déletrvající změnou radiace. Po celou dobu bylo u naměřených vzorků statisticky významně vyšší množství Rubisco v A než v E. Ze získaných výsledků je patrný pokles obsahu Rubisco v čase od 3:30–8:00 jak u normální koncentrace CO₂, tak u zvýšené koncentrace CO₂. Od 8:00 dochází ke značnému nárůstu křivky u obou koncentrací a udržení přibližně stejných hodnot obsahu až do konce měření. Podobné výsledky uvádí Wang et al. [68], který prováděl měření v rýži a zmiňuje počáteční zvýšení obsahu Rubisco v době od 6:00–8:00 a opět přibližně stejné hodnoty obsahu až do konce měření.

Specifická aktivita byla získána z poměru aktivity a množství enzymu. Pro celkovou i počáteční specifickou aktivitu měly křivky podobný průběh a po celou dobu byly staticky nižší hodnoty během normální koncentrace CO₂ než u dvojnásobné koncentrace CO₂ a to jak pro počáteční, tak i celkovou specifickou aktivitu. Od počátku měření do 8:00 je určitý nárůst, následně křivka má klesající tendenci a od 20:00 do konce měření je u většiny křivek zaznamenám další mírný nárůst. I Peréz et al. [65] uvádí zvýšení specifické aktivity koncem noci a ráno. V práci je také zmíněno zvýšení specifické aktivity na konci dne u rostlin vzrostlých v normální koncentraci CO₂, která je způsobená jen pomalým uvolňováním inhibitoru z aktivních míst Rubisco.

Aktivace enzymu Rubisco byla vypočtena jako poměr počáteční aktivity k celkové aktivitě a odpovídá rozsahu karbamylyace aktivního místa. V experimentu byly naměřeny poměrně vysoké aktivace v rozmezí 66–97 %. Během denního chodu křivky stupňů aktivace u variant A a E přibližně kopírovaly svůj průběh. K největšímu poklesu došlo v 8:00 a v 22:30, obdobný pokles aktivace uvádí např. Peréz et al. [65]. Pokles aktivace během poledne, který byl zaznamenán i v našem měření, objevili také Sinha et al. [66] a udávají, že vyplývá z dekarbamylyace enzymu. V práci Sinha et al. [66] je také uveden vzestup aktivace po 16:00. Autoři rovněž zmiňují, že např. ve špenátu se karbamylyace Rubisco zvyšuje se zvýšením radiace a naopak, ke konci dne dojde i ke snížení karbamylyace.

V zobrazených grafech je uveden také vliv ozářenosti na počáteční aktivitu, celkovou aktivitu, počáteční specifickou aktivitu, celkovou specifickou aktivitu, aktivaci a obsahu enzymu Rubisco. Aktivita enzymu Rubisco závisí na ozářenosti s jistým zpožděním. Pokud tedy v našem experimentu byla v 10:10 hodnota ozářenosti 1011,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a v 10:20 tato hodnota klesla skoro na polovinu, tedy na 594,51 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, je pravděpodobné, že aktivita

Rubisco bude v 10:20 relativně vysoká. Jak bylo popsáno v práci Servaites et al. [70], se zvyšující se ozářeností vzrůstá počáteční aktivita, stav aktivace, fotosyntéza. Servaites et al. popisují nárůst počáteční aktivity v dopoledních hodinách se zvyšující se ozářeností a ustálení hodnot počáteční aktivity při hodnotě ozáření nad $1,2 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Při poklesu hodnoty ozáření pod tuto úroveň došlo zároveň ke snížení počáteční aktivity. U celkové aktivity se hodnoty také zvyšovaly, ale po zbytek dne zůstaly přibližně stejné. Nižší hodnota celkové aktivity byla ovlivněná kvůli menšímu množství Rubisco. Také u aktivace byl nalezen podobný vliv ozáření. Zvyšující se hodnoty ozáření také ovlivňuje noční inhibitor CA1P, jehož množství se po rozednění minimalizuje. Úroveň poklesu CA1P se odvíjí od stoupající radiace a obráceně, pokud dojde k poklesu radiace, zvýší se CA1P. Z naměřených výsledků vyplývá, že ozáření značným způsobem ovlivňuje aktivitu enzymu. Od 8:00–10:00, kdy byl největší nárůst ozáření, došlo také k největšímu nárůstu aktivity, a od této doby přibližně do 16:00 nastává opět pokles aktivity v závislosti na ozáření. Množství enzymu nebylo tak ovlivněno ozářeností, obsah enzymu Rubisco, v porovnání s aktivitou, nedokáže odpovídat tak rychle změnou hodnot na velké rozdíly v ozáření během dne.

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo určit změny aktivity, obsahu a aktivace enzymu Rubisco v průběhu dne u smrku ztepilého v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého. Z průběhu počáteční aktivity, celkové aktivity a obsahu Rubisco odvodit mechanismus regulace aktivity tohoto enzymu.

Vzorky jehlic pro stanovení denního chodu obsahu a aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂ byly odebírány na experimentálním ekologickém pracovišti Bílý Kříž Centra výzkumu globální změny AV ČR v Moravskoslezských Beskydech. Stromy zde rostou ve dvou minisférách. V první minisféře je normální koncentrace CO₂ 350 μmol mol⁻¹ a je označována jako A (ambient). Ve druhé minisféře je koncentrace CO₂ zdvojnásobena, tedy 700 μmol mol⁻¹ a je značena E (elevated). Smrkové jehlice byly odebírány 22. 6. 2010 ve dvouhodinových intervalech od 3:30 do 22:30 hod.

Aktivita enzymu Rubisco byla zjištěna metodou Lilleyho a Walkera [36] s extrakcí podle Besforda [58]. Pro stanovení počáteční aktivity bylo využito metody podle Heringové [59]. Obsah enzymu Rubisco byl změřen metodou podle Damervalové et al. [60], Rogerse et al. [61] a Hlaváčka [62].

Hodnoty počáteční a celkové aktivity u většiny vzorků kultivovaných při zvýšené koncentraci CO₂ byly významně vyšší než u vzorků rostoucích v normální koncentraci CO₂. Zdá se tedy, že zvýšená koncentrace oxidu uhličitého stimuluje aktivitu Rubisco. Během dne došlo ke snížení aktivit (polední deprese), přičemž u varianty E nastala polední deprese dříve než u varianty A. U všech vzorků jehlic, které byly proměřovány, byla počáteční i celková specifická aktivita statisticky významně nižší v normální koncentraci CO₂, než ve zvýšené koncentraci CO₂.

Obsah enzymu Rubisco byl při zvýšené koncentraci CO₂ statisticky významně nižší než při normální koncentraci (aklimační deprese). Denní chod obsahu Rubisco vykazoval zpoždění 5–7 hodin na trvalejší změny radiace.

Stupeň aktivace udává rozsah karbamylation aktivního místa. V normální koncentraci CO₂ byl nižší než ve zvýšené koncentraci CO₂ a křivky přibližně kopírovaly svůj tvar.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Vodrážka Z.: *Biochemie*, 2. vyd. Praha: Academia, 1999. 474 s. ISBN 80-200-0438-6.
- [2] Voet D., Voetová J.G.: *Biochemie*, 1. vyd. Praha: Victoria Publishing a.s., 1995. 1362 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [3] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Základy buněčné biologie (Essentials Cell Biology)*, 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, s. r. o., 2005. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- [4] *Commons.wikimedia.org* [online]. 2007 [cit. 2010-11-03]. Calvin cycle. Dostupné z WWW: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Calvin_cycle_\(cs\).png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Calvin_cycle_(cs).png)>.
- [5] Rosypal S. a kol.: *Nový přehled biologie*, 1. vyd. Praha: Scientia, spol. s r.o., 2003. 797 s. ISBN 80-7183-268-5.
- [6] Leegood R. C., Sharkey T. D., Caemmerer S.: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, 1. vyd. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 624 s. ISBN 0-7923-6143-1.
- [7] Calvin M., Massini P.: The path of carbon in photosynthesis. XX. The steady state. *Experientia* 8: 445–457, 1952.
- [8] Quayle J. R., Fuller R. C., Benson A. A., Calvin M.: Enzymatic carboxylation of ribulose diphosphate. *J. Amer. Chem. Soc.* 76: 3610–3611, 1954.
- [9] Weissbach A., Smyrniotis P. Z., Horecker B. L.: Pentose phosphate and CO₂ fixation with spinach extracts. *J. Amer. Chem. Soc.* 76: 3611–3612, 1954.
- [10] Bowes G., Ogren W. L., Hageman R. H.: Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45: 716–722, 1971.
- [11] Andrews T. J., Lorimer G. H., Tolbert N. E.: Ribulose diphosphate oxygenase. I. Synthesis of phosphoglycolate by fraction-1 protein of leaves. *Biochemistry* 12: 11–18, 1973.
- [12] Lorimer G. H., Andrews T. J., Tolbert N. E.: Ribulose diphosphate oxygenase. II. Further proof of reaction products and mechanism of action. *Biochemistry* 12: 18–23, 1973.
- [13] Rutner A., Lane M.: Nonidentical subunits of ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28: 531–537, 1967.
- [14] Blair G., Ellis R.: Protein synthesis in chloroplasts. I. Light driven synthesis of the large subunits of fraction I protein by isolated pea chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 319: 223–234, 1974.
- [15] Gooding L., Roy H., Jagendorf A.: Immunological identification of nascent subunits of wheat ribulose biphosphate carboxylase on ribosomes of both chloroplast and cytoplasmic origin. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 324–335, 1973.

- [16] Smith M. A., Criddle S., Peterson L., Huffaker R. C.: Synthesis and assembly of ribulose biphosphate carboxylase enzyme during greening of barley plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 165: 494–504, 1974.
- [17] Roy H., Patterson R., Jagendorf A.: Identification of the small subunits of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase as a product of wheat leaf cytoplasmic ribosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 64–73, 1976.
- [18] Chua N-H., Schmidt G.: Post-translational import into intact chloroplasts of a precursor to the small subunits of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 6110–6114, 1978.
- [19] Spreitzer R. J., Salvucci M. E.: Rubisco: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 449–475, 2002.
- [20] *Zum.de* [online]. 1997 [cit. 2010-11-24]. Treibhauseffekt. Dostupné z WWW: <<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/13/bs13-68.htm>>.
- [21] *Dbs.umt.edu* [online]. 2010 [cit. 2010-11-24]. Scott Miller Lab. Dostupné z WWW: <http://dbs.umt.edu/research_labs/millerlab/research.html>.
- [22] Hartman F. C., Harpel M. R.: Structure, function, regulation, and assembly of D -ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 197–234, 1994.
- [23] *Photorespiration_cycle* [online]. 2007 [cit. 2011-03-09]. [Http://commons.wikimedia.org](http://commons.wikimedia.org). Dostupné z WWW: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Photorespiration_cycle_\(cs\).png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Photorespiration_cycle_(cs).png)>.
- [24] Nátr L.: *Koncentrace CO₂ a rostliny*, 1. vyd. Praha: ISV, 2000. 257 s. ISBN 80-85866-62-5. >.
- [25] Drake B. G., Gonzales-Meler M. A., Long S. P.: More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 609–639, 1997.
- [26] Kimball B. A.: *Carbon dioxide and agricultural yield: An assemblage and analysis of 770 prior observations*. WCL Report 14, Water Conserv. Lab., ARS USDA Phoenix, 1983b.
- [27] Saxe H., Ellsworth D. S., Heath J.: Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *New Phytol.* 139: 395–436, 1998.
- [28] Portis A. R., Jr.: Regulation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 415–37, 1992.
- [29] Zhang D.-Y., Chen G.-Y., Gong Z.-Y., Chen J., Yong Z.-H., Zhu J.-G., Xu D.-Q.: Ribulose-1,5-biphosphate regeneration limitation in rice leaf photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant Science* 175: 348–355, 2008.

- [30] Prasad P. V. V., Vu J. C. V., Boote K. J., Allen L. H. Jr.: Enhancement in leaf photosynthesis and upregulation of Rubisco in the C₄ sorghum plant at elevated growth carbon dioxide and temperature occur at early stages of leaf ontogeny. *Functional Plant Biology* 36: 761–769, 2009.
- [31] Sharkey T. D., Badger M. R., Caemmerer v. S., Andrews T. J.: Increased heat sensitivity of photosynthesis in tobacco plants with reduced Rubisco aktivace. *Photosynthesis Res.* 67: 147–156, 2001.
- [32] Zhang D.-Y., Chen G.-Y., Chen J., Yong Z.-H., Zhu J.-G., Xu D.-Q.: Photosynthetic acclimation to CO₂ enrichment related to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylation limitation in wheat. *Photosynthetica* 47 (1): 152–154, 2009.
- [33] Lilley R. McC., Ralph P. J., Larkum A. W. C.: The determination of activity of the enzyme Rubisco in cell extracts of the dinoflagellate alga *Symbiodinium* sp. by manganese chemiluminescence and its response to short-term thermal stress of the alga. *Plant, Cell and Environment* 33: 995–1004, 2010.
- [34] Lan Y., Mott K. A.: Determination of Apparent K_m Values for Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) Activase Using the Spectrophotometric Assay of Rubisco Activity. *Plant Physiol.* 95: 604–609, 1991.
- [35] Gerard V. A., Driscoll T.: A spectrophotometric assay for rubisco activity: application to the kelp *Laminaria saccharina* and implications for radiometric assays. *J. Phycol.* 32: 880–884, 1996.
- [36] Lilley R. M., Walker D. A.: An improved spectrophotometric assay for ribulosebisphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Acta* 358: 226–229, 1974.
- [37] Lorimer G. H., Badger M. R., Andrews T. J.: The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism and physiological implications. *Biochemistry* 15: 529–536, 1976.
- [38] Reid C. D., Tissue D. T., Fiskus E. L., Strain B. R.: Comparison of spectrophotometric and radioisotopic methods for the assay of Rubisco in ozone-treated plants. *Physiol. Plant.* 101: 398–404, 1997.
- [39] Ward D. A., Keys A. J.: A comparison between the coupled spectrophotometric and uncoupled radiometric assay for RuBP carboxylase. *Photosynthesis Res.* 22: 167–171, 1989.
- [40] *Habilitation_Kalina* [online]. 2005 [cit. 2011-03-17]. Biofyzika.upol.cz. Dostupné z WWW: <http://biofyzika.upol.cz/further/habilitation/Habilitation_Kalina.pdf>.
- [41] *Gazometrie* [online]. 2008 [cit. 2011-03-17]. [Http://www.sci.muni.cz](http://www.sci.muni.cz). Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/gazometrie.pdf>>.
- [42] Klouda P.: *Moderní analytické metody*, 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2

- [43] *Vutbr.cz* [online]. 2009 [cit. 2011-04-19]. Gelová elektroforéza. Dostupné z WWW: <https://www.vutbr.cz/elearning/file.php/95735/Navod_ISA-gelova_elektroforeza.doc>.
- [44] *Proteins_purification* [online]. 2002 [cit. 2011-03-18]. [Http://www.imb-jena.de](http://www.imb-jena.de). Dostupné z WWW: <http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html>.
- [45] Besford R. T.: The greenhouse effect: Acclimation of Tomato plants growing in high CO₂, relative changes in Calvin cycle enzymes. *J. Plant Physiol.* Vol. 136: 458–463, 1990.
- [46] Ferreira R. B., Esquivel M. G., Teixeira A. R.: An accurate method to quantify ribulose biphosphate carboxylase content in plant tissue. *Plant, Cell Environ.* 23: 1329–1340, 2000.
- [47] *Protein_methods* [online]. 2005 [cit. 2011-03-18]. [Www.siumed.edu](http://www.siumed.edu). Dostupné z WWW: <http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-19.jpg&imgrefurl=http://www.siumed.edu/~bbartholomew/course_material/protein_methods.htm&usg=__RChyY-dLexWznpQgvZxcMBpTWms=&h=784&w=1266&sz=78&hl=cs&start=0&zoom=1&tbnid=_2nbs7tszbJTBM:&tbnh=121&tbnw=195&ei=ixqDTYCTNMXOsgbV4ZGuAw&prev=/images%3Fq%3DTEMED%26um%3D1%26hl%3Dcs%26biw%3D1259%26bih%3D596%26tbs%3Disch:1&um=1&itbs=1&iact=rc&dur=547&oei=ixqDTYCTNMXOsgbV4ZGuAw&page=1&ndsp=18&ved=1t:429,r:1,s:0&tx=128&ty=37>.
- [48] Nicholas K. U. K. G., Forney Ch. F., Paulson A. T.: A Rapid Capillary Gel Electrophoresis Method for the Quantitative Determination of Rubisco in Spinach. *Phytochemical Analysis* 13: 39–44, 2002.
- [49] Warren Ch. R., Chen Zu-L., Adams M. A.: Effect of N source on concentration of Rubisco in *Eucalyptus diversicolor*, as measured by capillary electrophoresis. *Physiologia Plantarum* 110: 52–58, 2000.
- [50] Sommer L.: *Základy analytické chemie II*, 1. vyd. Brno: VITIUM, 2000. 348 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [51] Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*, 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 266 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [52] Kobza J., Seemann J. R.: Mechanisms for the light-dependent regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and photosynthesis in intact leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3815–3819, 1989.
- [53] *Imunometody* [online]. 2006 [cit. 2011-03-29]. [Www.upol.cz](http://www.upol.cz). Dostupné z WWW: <<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/Imunometody.pdf>>.
- [54] Klouda P.: *Základy biochemie*, 1. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2000, 156 s. ISBN 80-86369-00-5.

- [55] *Elisa* [online]. 2009 [cit. 2011-03-29]. Microscopesblog.com. Dostupné z WWW: <<http://www.microscopesblog.com/2009/08/elisa.html>>.
- [56] Metodiev M., Demirevska-Kepova K.: Rubisco Quantitation in Leaves of Different Barley Varieties by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Exp. Bot.* 43: 155–158, 1992.
- [57] *FotoEEP* [online]. 1997 [cit. 2011-03-30]. Frailea.chmi.cz. Dostupné z WWW: <<http://frailea.chmi.cz/meteo/CBKS/sbornik03/foto/fotoEEP/image016.jpg>>.
- [58] Besford R. T.: Some properties of ribulose biphosphate carboxylase extracted from Tomato leaves. *J. Exp. Bot.* 35: 495–504, 1984.
- [59] Heringová P.: Aktivita enzymu Rubisco u smrku ztepilého v průběhu dne. Diplomová práce VUT, Brno, 2004.
- [60] Damerval C., Vienne D., Zivy M., Thiellement H.: Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seeding proteins. *Electrophoresis* 7: 52–54, 1986.
- [61] Rogers A., Ellsworth D. S., Humphries S. W.: Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated CO₂. *Journal of Experimental Botany* 52: 1555–1561, 2001.
- [62] Hlaváček V.: *Stanovení obsahu enzymu Rubisco v listech*. Bakalářská práce VUT, Brno 2011.
- [63] Hrstka M., Urban O., Petruš E., Babák L.: Diurnal regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and its content in Norway spruce needles. *Photosynthetica* 45(3): 334–339, 2007.
- [64] Jiang D. A., Hirasawa T., Ishihara K.: The difference of Diurnal Changes in Photosynthesis in Rice Plants with Different Root Activities Induced by Soluble Starch Application to the Soil. *Jpn. J. Crop Sci.* 63 (3): 539–545, 1994.
- [65] Pérez P., Morcuende R., Molino I. M., Martínez – Carrasco R.: Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmetal and Experimental Botany* 53: 13–27, 2005.
- [66] Sinha A. K., Shirke P. A., Pathre U., Sane P. V.: Midday depression in photosynthesis: Effect on sucrose-phosphate synthase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in leaves of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. *Photosynthetica* 34 (1): 115–124, 1997.
- [67] Portis A. R., Jr.: The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *Journal of Experimental Botany* 46: 1285–1291, 1995.
- [68] Wang N.-Y., Jiang D.-A., Hong J., Zhang F., Weng X.-Y.: Diurnal Changes of Rubisco and RCA Activities and Their Cellular Localization in Rice. *Acta Botanica Sinica* 45 (9): 1076–1083, 2003.

[69] Pons T. L., Welschen R. A. M.: Midday depression of net photosynthesis in the tropical rainforest tree *Eperua grandiflora*: contributions of stomatal and internal conductances, respiration and Rubisco functioning. *Tree Physiology* 23: 937–947, 2003.

[70] Servaites J. C., Torisky R. S. Chao S. F.: Diurnal changes in ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activity and activation state in leaves of field-grown soybeans. *Plant science Letters* 35: 115–121, 1984.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

3-KABP	3-keto-arabinitol-1,5-bisfosfát
3-P-Gri	3-fosfoglycerát
A (ambient)	normální koncentrace CO ₂
AA	akrylamid
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BChl <i>a, b</i>	bakteriochlorofyl <i>a, b</i>
BICIN	N,N-bis-2-hydroxyethylglycin
BIS	N,N'-methylen-bis-akrylamid
BSA	bovinní sérový albumin
CAIP	2-karboxyarabinitol-1-fosfát
CAM (Crassulacean Acid Metabolism)	
DTT	dithiothreitol
E (elevated)	zvýšená koncentrace CO ₂
ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	enzymově spřažené imunochemické stanovení
EOF (Electroosmotic Flow)	elektroosmotický tok
FACE (free Air CO ₂ Enrichment)	obohacení volného vzduchu oxidem uhličitým
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina
HPLC (high Performance Liquid Chromatography)	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Chl <i>a, b</i>	chlorofyl <i>a, b</i>
IRGA	infračervený analyzátor
Na ₂ EDTA	ethylendiamintetraoctan disodný
NAD ⁺ , NADH	β-nikotinamidadenindinukleotid a jeho redukováná forma
NADP ⁺ , NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát a jeho redukováná forma
OEC (oxygen-evolving complex)	kyslík vyvíjející komplex
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
R5P	ribosa-5-fosfát
Rbu-1,5-P ₂	ribulosa-1,5-bisfosfát
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N'-tetramethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
XuBP	xylulosa-1,5-bisfosfát