

ENZYMY HATCHOVA-SLACKOVA CYKLU V C₃ ROSTLINÁCH

HELENA RYŠLAVÁ
a VERONIKA DOUBNEROVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
rysl@natur.cuni.cz

Došlo 1.7.10, přijato 9.11.10.

Klíčová slova: fosfoenolpyruvátkarboxylasa; NADP-malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační); pyruvát, fosfát dikinasa; regulace; stres rostlin

Obsah

1. Úvod
2. C₄ cesta fotosyntetické fixace CO₂
3. Fosfoenolpyruvátkarboxylasa PEPC
4. NADP-malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) NADP-ME
5. Pyruvát, fosfát dikinasa PPK
6. Kooperace nefotosyntetických isoform PEPC, NADP-ME a PPK
7. Závěr

1. Úvod

Vznik oxgyenní fotosyntézy způsobil změnu ve složení atmosféry – snížení zastoupení CO₂ a zvýšení O₂. Tato skutečnost ovlivnila funkci hlavního fotosyntetického enzymu ribulosabisfosfátkarboxylasy/oxygenasy (Rubisco, EC 4.1.1.39), který má vedle karboxylační aktivity také aktivitu oxygenasovou, vedoucí k fotorespiraci a snížení fotosyntetické účinnosti. Fotosyntetizující organismy byly tedy nuceny vyvinout mechanismus, který by zvýšil koncentraci CO₂ v blízkosti aktivního centra Rubisco (CCM – CO₂ concentrating mechanism)¹. V sinicích, řasách a vodních vyšších rostlinách hrají důležitou roli přenašeče HCO₃⁻, CO₂ a enzym karbonátanhydrasa (EC 4.2.1.1)²⁻⁴. Další možností je tzv. C₄ a CAM (Crassulacean acid metabolism) cesta fixace CO₂, která zvyšuje koncentraci CO₂ v blízkosti Rubisco pomocí přídatných metabolických drah katalyzovaných fosfoenolpyruvátkarboxylasou (PEPC, EC 4.1.1.31); NADP-dependentní malátdehydrogenasou (NADP-MDH, EC 1.1.1.82); NADP-dependentní malátdehydrogenasou (oxaloacetát dekarboxylační) (NADP-ME, EC 1.1.1.40) a pyruvát, fosfát dikinasou (PPDK, EC 2.7.9.1)⁵. Cyklus byl objeven M. D. Hatchem a C. R.

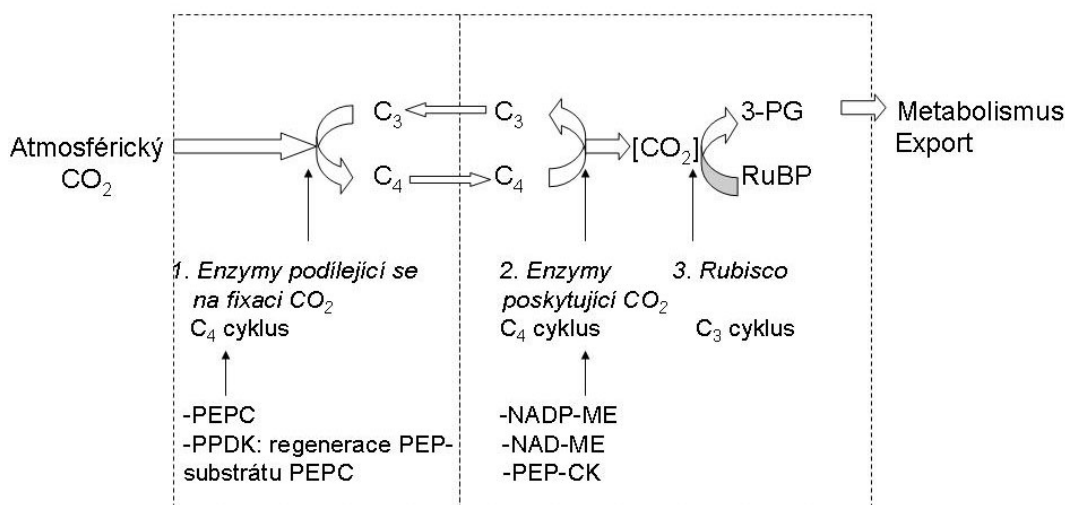
Slackem⁶ v roce 1966, funkce fotosyntetických isoform tak byla objasněna, avšak zájem o nefotosyntetické isoformy jednotlivých enzymů přítomné i v „obyčejných“ C₃ rostlinách trvá do současnosti. Hlavním důvodem může být souvislost PEPC, NADP-ME a PPK s obrannými odpověďmi rostlin vůči stresu a rozdíly ve způsobu jejich regulace.

2. C₄ cesta fotosyntetické fixace CO₂

Některé rostliny se před 85–65 miliony lety přizpůsobily suchému, horkému prostředí s vysokými světelnými intenzitami pomocí přídatných metabolických drah známých jako Hatchův a Slackův cyklus⁷. Ten přináší oproti přímé fotosyntetické fixaci CO₂ Calvinovým cyklem, ke které dochází u přibližně 95 % rostlin (tzv. C₃ rostlin), několik výhod, ačkoliv na úkor dalších energetických nákladů v podobě ATP. Výhodou PEPC je schopnost využívat nižší koncentrace CO₂ než Rubisco, navíc v podobě HCO₃⁻. C₄ rostlina má nižší ztráty vody transpirací a nižší ztráty fotosyntézy fotorespirací oproti C₃ (cit.⁵). V C₄ rostlinách (např. v kukuřici, cukrové třtině, čiroku, prosu) probíhá primární fixace CO₂ za katalýzy PEPC v mesofylových buňkách; čtyřuhlíkatý metabolit L-malát nebo L-aspartát je transportován do buněk pochev svazků cévních, kde probíhá dekarboxylace pomocí NADP-ME nebo fosfoenolpyruvátkarboxykinasy (PEPCK, EC 4.1.1.49) nebo NAD-dependentní malátdehydrogenasy dekarboxylační (NAD-ME, EC 1.1.1.39). Uvolněný CO₂ je v těchto buňkách znovu fixován pomocí Rubisco již obvyklým způsobem. Tříuhlíkatý metabolit v podobě pyruvátu (nebo alaninu) se vrací do mesofylových buněk a za katalýzy PPK je regenerován PEP, primární akceptor CO₂ (obr. 1, cit.⁵).

Důležitou podmínkou pro fungování cyklu je prostorové či časové oddělení karboxylační a dekarboxylační reakce. Prostorové oddělení mezi buňky mesofylové a buňky pochev cévních svazků je u C₄ rostlin umožněno jejich zvláštní tzv. věnčitou (neboli Kranz) anatomii listu. V CAM rostlinách, mezi které patří především sukulenty, ale také tropické rostliny, např. některé orchideje, je primární a sekundární fixace CO₂ oddělena časově; CO₂ je vázán PEPC v průběhu noci, kdy není teplota okolního prostředí tak vysoká a mohou být otevřeny průduchy, aniž by docházelo k velkým ztrátám vody. Produkt fixace CO₂ L-malát je poté skladován ve vakuole a ve dne je pak dekarboxylován za katalýzy NADP-ME a CO₂ znovu fixován Rubisco^{5,6,2,63}.

V nedávné době bylo zjištěno, že C₄ cesta fixace CO₂ může probíhat i v jedné buňce, která je rozdělena na dvě části umožňující oddělení primární fixace CO₂ a dekarboxylace spolu s Calvinovým cyklem. Takovým příkladem je



Obr. 1. C₄ cesta fixace CO₂ (převzato z cit.⁸ a upraveno); PEPC, fosfoenolpyruvátkarboxylasa; C₄, čtyřuhlíkatý meziprodukt L-malát nebo L-aspartát; NADP-ME, NADP-malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační); PEPCK, fosfoenolpyruvátkarboxykinasa; NAD-ME, NAD-dependentní malátdehydrogenasa dekarboxylační; Rubisco, ribulosabisfosfátkarboxylasa/oxygenasa; RuBP, ribulosa-1,5-bisfosfát; 3-PG, 3-fosfoglycerát; C₃, tříuhlíkatý meziprodukt pyruvát nebo alanin; PPK, pyruvát, fosfát dikinasa (PPDK)

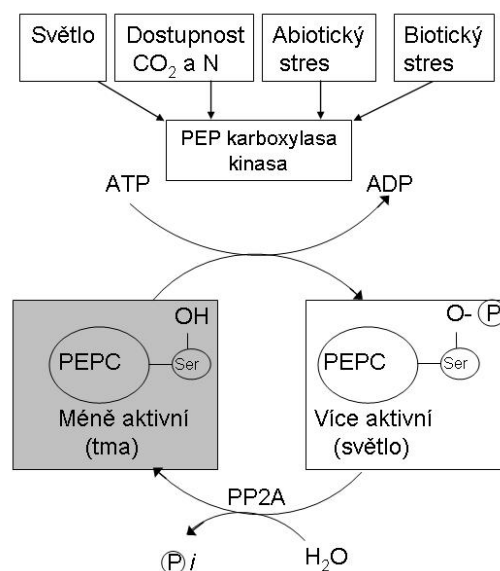
rostlina *Suaeda aralocaspica*, která má protáhlé buňky; v části přiléhající k epidermis probíhá primární fixace CO₂ za vzniku čtyřuhlíkaté sloučeniny a v části buňky blízké k cévním svazkům, která je bohatá na chloroplasty, probíhá dekarboxylace a Calvinův cyklus. V rostlině *Bienertia cycloptera* probíhají obdobné biochemické pochody, avšak v kulovitých buňkách s velkými mezibuněčnými prostory probíhá primární fixace v periferních oblastech, dekarboxylace pak ve středu⁸.

3. Fosfoenolpyruvátkarboxylasa

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (PEPC) je cytosolový enzym, který se vyskytuje ve všech vyšších rostlinách, zelených řasách a mikroorganismech, avšak nebyl nalezen u živočichů a hub. Katalyzuje ireverzibilní β -karboxylaci fosfoenolpyruvátu v přítomnosti HCO₃⁻ a dvojmocného kationtu (Mg²⁺, Mn²⁺) za vzniku oxaloacetátu a P_i. Tato reakce je silně exergonická. PEPC je citlivě regulována na mnoha úrovních, mezi důležité inhibitory patří L-malát a aktivátory D-glukosa-6-fosfát⁹⁻¹¹. Další způsob regulace představuje fosforylace serinového zbytku v blízkosti N-konce. Tato fosforylace je katalyzována specifickou PEPC kinasou (obr. 2, cit.¹²). Je to nejmenší známá proteinkinasa, která obsahuje jen katalytickou doménu bez regulačních oblastí. Její aktivita v buňce je regulována syntézou *de novo*. V C₄ rostlinách se na této regulaci podílí především světlo, v C₃ rostlinách je situace složitější, záleží také na dostupnosti CO₂, dusíku a na dalších vlivech (obr. 2, cit.¹²⁻¹⁴).

Fosforylace PEPC znamená změnu kinetických parametrů enzymu; fosforylovaný enzym má vyšší maximální

rychlost reakce, je méně citlivý vůči inhibici L-malátem a více citlivý vůči aktivaci D-glukosa-6-fosfátem¹². Tyto změny však neplatí obecně, např. fosforylovaná i nefosforylovaná forma PEPC z listů tabáku se neliší v hodnotě I₅₀ pro L-malát, pro PEPC ze semen kukuřice byla zjištěna po defosforylaci změna závislosti rychlosti reakce na koncen-



Obr. 2. Regulace aktivity PEPC fosforylací pomocí specifické PEPC kinasy (převzato z cit.¹² a upraveno); fosforylace PEPC specifickou PEPC kinasou znamená změnu kinetických parametrů enzymu; fosforylovaný enzym má vyšší maximální rychlost reakce. Defosforylaci PEPC katalyzuje fosfátasa 2A (PP2A)

traci PEP z hyperbolické na sigmoidální^{15,16}.

Zatímco fotosyntetická PEPC má klíčovou úlohu v primární fixaci CO₂, pro nefotosyntetickou PEPC jsou předpokládány následující funkce: *i*) doplňování intermediátů citrátového cyklu, *ii*) asimilace dusíku a biosyntéza aminokyselin, *iii*) malátové kvašení, *iv*) spolu s NAD-MDH udržování stálého pH v buňce, *v*) udržování elektro-neutrality, *vi*) spolu s NAD-MDH a NADP-ME produkce redukčních ekvivalentů NADPH, *vii*) opětovná fixace respirovaného CO₂ (cit.^{10,17}).

PEPC je v rostlinách přítomna ve formě malé genové rodiny¹⁸. V C₄ rostlinách je ve fotosyntetických částech vysoká aktivita fotosyntetické isoformy PEPC, ve všech rostlinách se vyskytují isoformy, které plní anaplerotické funkce. V C₃ rostlině huseničku rolním (*Arabidopsis thaliana* L.) byly nalezeny tři isoformy homologické s dalšími rostlinnými PEPC a jedna, která vykazovala vyšší podobnost s bakteriální PEPC¹⁸. Bakteriální typ PEPC byl objeven také v rýži (*Oryza sativa* L.)¹⁸, v semenech skočce obecného (*Ricinus communis* L.)¹⁹ a v semenech ječmene (*Hordeum vulgare* L.)²⁰.

Některé rostliny mohou měnit typ fotosyntézy v závislosti na ontogenetickém vývoji či okolních podmínkách. Příkladem takové rostliny je kosmatec křišťálový (*Mesembryanthemum crystallinum*), kde dochází vlivem zvýšené koncentrace solí ke změně metabolismu z C₃ na CAM. Tato změna je provázána zvýšením aktivity PEPC a její syntézou *de novo*^{21,22}.

Porušení vodní rovnováhy rostlin způsobené suchem, chladem či zasolenou půdou vede rovněž ke zvýšení aktivity PEPC^{23–25}. Zvýšená aktivita PEPC byla zjištěna i v souvislosti s nedostatkem některých živin či esenciálních prvků²⁶, s nedostatkem fosfátu^{27–29} a s nedostatkem Fe^{30,31}. Za hypoxických podmínek byla zvýšena aktivita PEPC v rostlinách rýže³²; ozon způsobil zvýšení aktivity PEPC v jehlicích borovice, avšak za současného působení sucha, kdy jsou uzavřeny průduchy a ozon nepronikne dovnitř, ke zvýšení aktivity nedošlo³³.

Biotický stres způsobený virovou infekcí působí řadu metabolických změn: snížení fotosyntézy, snížení aktivity Rubisco, zvýšení aktivity antioxidantních enzymů a také zvýšení aktivity PEPC, a to především pomocí zvýšení její fosforylace^{15,34,35}.

Zvýšení aktivity PEPC v rostlinách za stresových podmínek pravděpodobně souvisí se zvýšenou produkcí L-malátu, který vzniká po redukcí oxaloacetátu. Malát vedle dalších látek působí jako osmolytikum, což je důležité při všech typech stresu, které porušují vodní rovnováhu rostliny^{23–25}. Malát může být ve zvýšené míře sekretován kořeny, je-li v rostlině nedostatek fosfátu nebo dalších živin^{27–29}. Stejný mechanismus používá rostlina i v přítomnosti toxických kovů v půdě³⁶. PEPC spojuje metabolismem sacharidů s metabolismem aminokyselin a proteinů, tato skutečnost může být pro rostlinu za stresu, kdy je nárok na syntézu proteinů vyšší, důležitá.

Přesný mechanismus zvýšení aktivity PEPC v rostlině jako reakce na stres není znám, ale důležitou roli hraje zvýšení fosforylace molekuly PEPC^{15,33}.

4. NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační)

NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) (NADP-ME, z angl. malic enzyme) v přítomnosti koenzymu NADP⁺ a dvojmocného kationtu (nejčastěji Mg²⁺ nebo Mn²⁺) katalyzuje oxidační dekarboxylaci L-malátu za vzniku pyruvátu, CO₂ a NADPH^{37,38}. NADP-ME může také katalyzovat dvě další reakce. Může působit jako oxaloacetátdekarboxylasa nebo redukovat α -oxokarboxylové kyseliny (v přítomnosti koenzymu NADPH). NADP-ME katalyzuje také reverzibilní reakci, v opačném směru se tvoří L-malát a NADP⁺, avšak mnohem menší rychlostí³⁹. Výskyt NADP-ME je velmi široký; tento enzym se nachází v prokaryotických i eukaryotických mikroorganismech, ve všech typech rostlin (C₃, C₄ i CAM) a v živočišných tkáních včetně člověka. Struktura rostlinných i živočišných NADP-ME je převážně tetramerní, s relativní molekulovou hmotností jedné podjednotky 62 000–67 000 (cit.^{38,40}).

Regulace fotosyntetických isoform NADP-ME se uskutečňuje inhibicí nadbytkem substrátu (L-malátu), ke které naopak u nefotosyntetických isoform z C₃ rostlin většinou nedochází³⁸. Další regulace se uskutečňuje prostřednictvím aktivátorů a inhibitorů, ke kterým patří sukcinát, α -oxoglutarát, oxaloacetát a fruktosa-1,6-bisfosfát³⁷. NADP-ME je také regulována pH^{37,38}.

Regulace nefotosyntetické isoformy NADP-ME je studována méně. V klíčící C₃ rostlině *Ricinus communis* byla NADP-ME aktivována sukcinátem, koenzymem A, acetylkoenzymem A a palmitoylkoenzymem A (cit.⁴¹). Aktivace těmito metabolity může souviset se syntézou vyšších mastných kyselin. V rostlině tabáku *Nicotiana tabacum* L. byly jako inhibitory NADP-ME zjištěny energeticky bohaté látky GTP, ATP, ADP. Intermediáty citrátového cyklu, látky spojené s lipogenezí a aminokyseliny neměly na aktivitu NADP-ME vliv, metabolity glykolýzy pouze mírný. Funkce NADP-ME v listech tabáku má pravděpodobně souvislost s energetickou bilancí rostliny⁴².

Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku je rovněž ovlivňována kofaktory (dvojmocnými kationty kovů). Vhodnými kofaktory NADP-ME z listů tabáku byly Mg²⁺ (100 % aktivity), Mn²⁺ (140 % aktivity), Co²⁺ (59 %), Ni²⁺ (54 %) a Zn²⁺ ionty (20 % aktivity oproti Mg²⁺)⁴³. V závislosti na přítomném kofaktoru se měnila afinita NADP-ME vůči L-malátu, zatímco afinita NADP-ME vůči NADP⁺ nebyla přítomností různých kofaktorů ovlivněna⁴³.

Pro nefotosyntetickou isoformu NADP-ME, přítomnou ve všech rostlinách, jsou předpokládány tyto funkce: *i*) poskytování NADPH pro biosyntetické procesy (např. biosyntézu tuků, ligninu, fytoalexinů), *ii*) poskytování NADPH jako koenzymu některých antioxidantních enzymů, *iii*) spolu s PEPC podíl na udržování intracelulárního pH, *iv*) dehydrogenace pyruvátu na acetyl-Co A a jeho další využití³⁷.

Rostlinná NADP-ME je enzym kódovaný malými genovými rodinami^{7,44}. V modelových C₃ rostlinách se

známým genomem *Arabidopsis thaliana* L.⁴⁴ a *Oryza sativa* L.⁷ byly nalezeny geny pro tři cytosolové a jednu plastidovou isoformu NADP-ME. V tabáku i pšenici byl nalezen jeden gen pro cytosolovou a jeden gen pro plastidovou isoformu^{39,45}. Expresse jednotlivých genů se liší v různých orgánech, vývojových stádiích i v odpovědi na stres, stejně jako regulace jednotlivých isoform^{7, 9,44–46}.

Také aktivita NADP-ME je studována v souvislosti se stresem. Zvýšení aktivity, popřípadě zvýšení množství proteinu NADP-ME bylo zjištěno v souvislosti se solným stresem v CAM i C₃ rostlinách^{7,47–49}. Také sucho zvýšilo aktivitu a/nebo expresi NADP-ME (cit.^{25,50,51}). Zvýšená aktivita NADP-ME spolu se zvýšenou expresí byla pozorována v kořenech kukuřice po působení celulasu, jasmónátu a houbového elicitoru⁵², v listech kukuřice vystavených UV-B záření⁵³.

Biotický stres způsobený virovou infekcí *Y virem bramboru* způsobil v rostlinách tabáku zvýšení aktivity (cit.^{35,54}), exprese a mRNA cytosolové isoformy NADP-ME, zatímco chloroplastová isoforma nebyla tímto stresem ovlivněna⁵⁵.

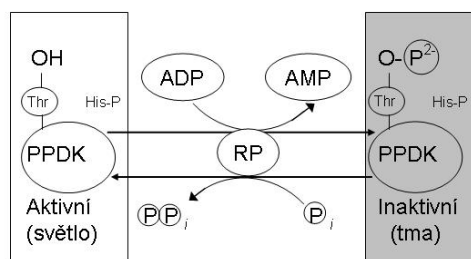
Význam NADP-ME v rostlinách za stresových podmínek je především v produkci redukčních ekvivalentů NADPH nutných pro biosyntézu fytoalexinů a dalších obranných látek, pyruvát může být navíc využit pro biosyntézu lipidů na opravy poškozených membrán. NADPH také slouží jako koenzym antioxidantních enzymů⁶¹.

5. Pyruvát, fosfátdikinasa

Posledním enzymem, který v C₄ rostlinách uzavírá cyklus fotosyntetické fixace CO₂, je pyruvát, fosfát dikinasa (PPDK). V přítomnosti ATP a anorganického fosfátu katalyzuje regeneraci fosfoenolpyruvátu z pyruvátu. Současně se tvoří AMP a PP_i (cit.⁵⁶). Tento enzym je přítomen ve všech rostlinách, avšak v C₃ pouze v malém množství⁵⁷. Fotosyntetická isoforma PPDK je lokalizována v chloroplastech, nefotosyntetická isoforma je přítomna v cytoplasmě. V C₃ rostlinách byla detegována aktivita PPDK v chloroplastech i cytoplasmě s podobnými vlastnostmi⁵⁸.

Vzhledem k tomu, že fotosyntetický enzym limituje rychlost celého C₄ cyklu, je aktivita PPDK (C₃ i C₄ rostlin) regulována světlem pomocí reverzibilní fosforylace. Jak aktivaci defosforylací, tak inaktivaci fosforylací katalyzuje bifunkční regulační protein PPDK (obr. 3, cit.⁵⁹). Další zvláštností tohoto regulačního proteinu je skutečnost, že k fosforylaci využívá ADP místo ATP a k defosforylaci je nutná přítomnost fosfátu, ze kterého vzniká pyrofosfát (obr. 3, cit.^{57,59}).

Byla prokázána souvislost PPDK se stresem; v kořenech rýže se zvýšila aktivita PPDK působením rostlinného hormonu kyseliny abscisové, polyethylenglykolu, hypoxie, chladu a zvýšené koncentrace soli³². Rovněž biotický stres způsobený virovou infekcí způsobil zvýšenou aktivitu PPDK v listech tabáku^{35,54}.



Obr. 3. Regulace aktivity PPDK fosforylací (převzato z cit.⁵⁹); aktivita PPDK (C₃ i C₄ rostlin) je regulována světlem pomocí reverzibilní fosforylace bifunkčním regulačním proteinem PPDK (RP), který katalyzuje jak aktivaci defosforylací, tak inaktivaci fosforylací

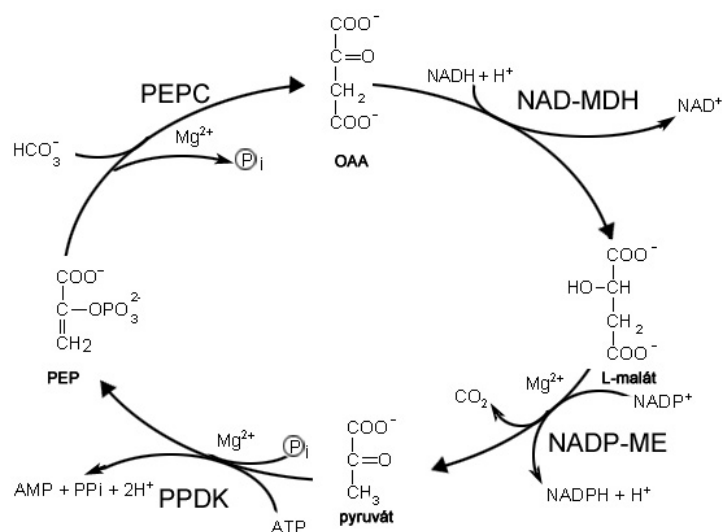
6. Kooperace nefotosyntetických isoform PEPC, NADP-ME a PPDK

Bylo zjištěno, že v rostlinách dochází při některých typech stresu, jako např. sucho, ale i v průběhu virové infekce, ke snížení rychlosti fotosyntézy a uzavírání průduchů. Za těchto podmínek byla zjištěna zvýšená aktivita PEPC, NADP-ME i PPDK v listech i kořenech tabáku^{35,54}.

Na obr. 4 je uveden cyklus, který by mohly katalyzovat enzymy PEPC, NAD-MDH, NADP-ME a PPDK i v C₃ rostlinách. V tomto cyklu je sice spotřebována energie ve formě ATP, avšak zároveň vznikají redukční ekvivalenty NADPH na úkor NADH. Zůstává otázkou, zda v C₃ rostlinách může tento cyklus poskytovat CO₂ pro Calvinův cyklus, obdobně jako v C₄ rostlinách. Při uzavírání průduchů se stává pravděpodobně pro rostlinu limitující množství CO₂. Za těchto podmínek je však zdrojem CO₂ pro PEPC respirace nebo fotorespirace spíše než CO₂ z vnějšího prostředí. Zdrojem CO₂ může být také L-malát transportovaný z neautotrofních částí rostliny, který je dekarboxylován pomocí NADP-ME. L-Malát jako zdroj CO₂ pro Calvinův cyklus v C₃ rostlinách uvažují i jiní autoři⁶⁰. Pro rostlinu může být výhodné i zvýšení průtoku metabolitů jen částí tohoto cyklu, protože umožňuje propojení základních metabolických drah.

7. Závěr

Regulace aktivity enzymů v buňce je důležitá nejen za fyziologických podmínek, ale především za podmínek nefyziologických, stresových. Mechanismus odpovědi rostliny na stres je v poslední době intenzivně studován, avšak menší pozornost je věnována změnám v primárním metabolismu rostlin za podmínek stresu; změna toku metabolitů jednotlivými metabolickými drahami je důležitá, jak už pro mobilizaci energetických zdrojů pro syntézu obranných látek, tak k udržení metabolismu ve „stavu nouze“. Z dosavadních výsledků výzkumu vyplývá, že enzymy PEPC, NADP-ME a PPDK se podílejí na přizpůsobení



Obr. 4. Předpokládané metabolické dráhy v C₃ rostlinách vystavených stresu; PEPC, fosfoenolpyruvátcarboxylasa; NAD-MDH, NAD-malátdehydrogenasa; NADP-ME, NADP-malátdehydrogenasa (oxaloacetát-dekarboxylační); PPKK, pyruvát, fosfátidkinasa; PEP, fosfoenolpyruvát; OAA, oxaloacetát

rostlinného metabolismu stresovým podmínkám. Poznání těchto změn je důležité pro hodnocení a výběr zemědělsky využívaných rostlin a jednotlivých kultivarů pro pěstování za podmínek stresu.

Autoři děkují za podporu následujícím grantům: MSM0021620808 a IM0505.

LITERATURA

- Raven J. A., Cockell C. S., De La Rocha C. L.: *Philos. Trans. R. Soc. London, B Biol. Sci.* 363, 2641 (2008).
- Badger M.: *Photosynth. Res.* 77, 83 (2003).
- Badger M. R., Price G. D.: *J. Exp. Bot.* 54, 609 (2003).
- Price G. D., Badger M. R., Woodger F. J., Long B. M.: *J. Exp. Bot.* 59, 1441 (2008).
- Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. (ed.): *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 2000.
- Hatch M. D., Slack C. R.: *Biochem J.* 101, 103 (1966).
- Chi W., Yang J., Wu N., Zhang F.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1865 (2004).
- Edwards G. E., Franceschi V. R., Voznesenskaya E. V.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 173 (2004).
- O'Leary M. H.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 297 (1982).
- Andreo C. S., Gonzalez D. H., Iglesias A. A.: *FEBS Lett.* 213, 1 (1987).
- Stiborová M.: *Photosynthetica* 22, 240 (1988).
- Izui K., Matsumura H., Furumoto T., Kai Y.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 69 (2004).
- Chollet R., Vidal J., O'Leary M. H.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 273 (1996).
- Lepiniec L., Vidal J., Chollet R., Gadal P., Cretin C.: *Plant Sci.* 99, 111 (1994).
- Muller K., Doubnerová V., Synková H., Čerovská N., Ryšlavá H.: *Biol. Chem.* 390, 245 (2009).
- Černý M., Doubnerová V., Müller K., Ryšlavá H.: *Biochimie* 92, 1362 (2010).
- Latzko E., Kelly G. J.: *Physiol. Vég.* 21, 805 (1983).
- Sanchez R., Cejudo F. J.: *Plant Physiol.* 132, 949 (2003).
- O'Leary B., Rao S. K., Kim J., Plaxton W. C.: *J. Biol. Chem.* 284, 24797 (2009).
- Feria A. B., Alvarez R., Cochereau L., Vidal J., Garcia-Maurino S., Echevarria C.: *Plant Physiol.* 148, 761 (2008).
- Hofner R., Vazquez-Moreno L., Winter K., Bohnert H. J., Schmitt J. M.: *Plant Physiol.* 83, 915 (1987).
- Thomas J. C., De Armond R. L., Bohnert H. J.: *Plant Physiol.* 98, 626 (1992).
- Gonzalez M. C., Sanchez R., Cejudo F. J.: *Planta* 216, 985 (2003).
- Sanchez R., Flores A., Cejudo F. J.: *Planta* 223, 901 (2006).
- Doubnerová V., Miedzinska L., Dobrá J., Vaňková R., Ryšlavá H.: nepublikované výsledky.
- Sugiharto B., Sugiyama T.: *Plant Physiol.* 98, 1403 (1992).
- Penalzoa E., Munoz G., Salvo-Garrido H., Silva H., Corcuera L. J.: *J. Exp. Bot.* 56, 145 (2005).
- Gregory A. L., Hurley B. A., Tran H. T., Valentine A. J., She Y. M., Knowles V. L., Plaxton W. C.: *Bio-*

- chem. J. 420, 57 (2009).
29. Toyota K., Koizumi N., Sato F.: *J. Exp. Bot.* 54, 961 (2003).
 30. Nisi P. D., Zocchi G.: *J. Exp. Bot.* 51, 1903 (2000).
 31. Lopez-Millan A. F., Morales F., Andaluz S., Gogorceña Y., Abadía A., De Las Rivas J., Abadía J.: *Plant Physiol.* 124, 885 (2000).
 32. Moons A., Valcke R., Van Montagu M.: *Plant J.* 15, 89 (1998).
 33. Fontaine V., Cabane M., Dizengremel P.: *Physiol. Plant.* 117, 445 (2003).
 34. Synková H., Semoradová Š., Schnablová R., Müller K., Pospíšilová J., Ryšlavá H., Malbeck J., Čeřovská N.: *Plant Sci.* 171, 607 (2006).
 35. Ryšlavá H., Müller K., Semoradová Š., Synková H., Čeřovská N.: *Photosynthetica* 41, 357 (2003).
 36. Ermolayev V., Weschke W., Manteuffel R.: *J. Exp. Bot.* 54, 2745 (2003).
 37. Edwards G. E., Andreo C. S.: *Phytochemistry* 31, 1845 (1992).
 38. Drincovich M. F., Casati P., Andreo C. S.: *FEBS Lett.* 490, 1 (2001).
 39. Müller G. L., Drincovich M. F., Andreo C. S., Lara M. V.: *Plant Cell Physiol.* 49, 469 (2008).
 40. Bukato G., Kochan Z., Swierczynski J.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27, 47 (1995).
 41. Colombo S. L., Andreo C. S., Podestá F. E.: *Physiol. Plant.* 101, 821 (1997).
 42. Doubnerová V., Potůčková L., Müller K., Ryšlavá H.: *J. Serb. Chem. Soc.* 74, 893 (2008).
 43. Ryšlavá H., Doubnerová V., Müller K., Baťková P., Schnablová R., Liberda J., Synková H., Čeřovská N.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 72, 1420 (2007).
 44. Wheeler M. C., Tronconi M. A., Drincovich M. F., Andreo C. S., Flügge U. I., Maurino V. G.: *Plant Physiol.* 139, 39 (2005).
 45. Fu Z. Y., Zhang Z. B., Hu X. J., Shao H. B., Ping X.: *C. R. Biol.* 332, 591 (2009).
 46. Wheeler M. C., Arias C. L., Tronconi M. A., Maurino V. G., Andreo C. S., Drincovich M. F.: *Plant Mol. Biol.* 67, 231 (2008).
 47. Cushman J. C., Bohnert H. J.: *Photosynth. Res.* 34, 103 (1992).
 48. Sun S. B., Shen Q. R., Wan J. M., Liu Z. P.: *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 35, 423 (2003).
 49. Valderrama R., Corpas F. J., Carreras A., Gomez-Rodriguez M. V., Chaki M., Pedrajas J. R., Fernandez-Ocana A., Del Rio L. A., Barroso J. B.: *Plant Cell Environ.* 29, 1449 (2006).
 50. Guo P. G., Baum M., Grando S., Ceccarelli S., Bai G. H., Li R. H., Von Korff M., Varshney R. K., Graner A., Valkoun J.: *J. Exp. Bot.* 60, 3531 (2009).
 51. Synková H., Valcke R.: *Physiol. Plant.* 112, 513 (2001).
 52. Maurino V. G., Saigo M., Andreo C. S., Drincovich M. F.: *Plant Mol. Biol.* 45, 409 (2001).
 53. Casati P., Drincovich M. F., Edwards G. E., Andreo C. S.: *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 1187 (1999).
 54. Doubnerová V., Janošková M., Synková H., Šubr Z., Čeřovská N., Ryšlavá H.: *Gen. Appl. Plant Physiol.* 33, 123 (2007).
 55. Doubnerová V., Müller K., Čeřovská N., Synková H., Spoustová P., Ryšlavá H.: *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3583 (2009).
 56. Hatch M. D., Slack C. R.: *Biochem J.* 106, 141 (1968).
 57. Chastain C. J., Xu W., Parsley K., Sarath G., Hibberd J. M., Chollet R.: *Plant J.* 53, 854 (2008).
 58. Chastain C. J., Heck J. W., Colquhoun T. A., Voge D. G., Gu X. Y.: *Planta* 224, 924 (2006).
 59. Chastain C. J., Fries J. P., Vogel J. A., Randklev C. L., Vossen A. P., Dittmer S. K., Watkins E. E., Fiedler L. J., Wacker S. A., Meinhover K. C., Sarath G., Chollet R.: *Plant Physiol.* 128, 1368 (2002).
 60. Hibberd J. M., Quick W. P.: *Nature* 415, 451 (2002).
 61. Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P.: *Chem. Listy* 99, 455 (2005).
 62. Kamlar M., Uhlík O., Kohout L., Harmatha J., Macek T.: *Chem. Listy* 104, 93 (2010).
 63. Kamlar M., Uhlík O., Chlubnová I., Kohout L., Harmatha J., Ježek R., Šanda M., Pišvejcová A., Macek T.: *Chem. Listy* 104, 215 (2010).
- H. Ryšlavá and V. Doubnerová** (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague*): **Enzymes of the Hatch-Slack Cycle in C₃ Plants**
- Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31), NADP-dependent malic enzyme (NADP-ME, EC 1.1.1.40) and pyruvate phosphate dikinase (PPDK, EC 2.7.9.1) are the enzymes that participate in reactions of the Hatch-Slack cycle in C₄ plants. The isoforms of these enzymes, which do not participate in photosynthesis, are present in all plants including the C₃ plants. This review is focused on the occurrence, gene families, regulation and possible functions of the above mentioned enzymes. PEPC is inhibited by L-malate, activated by D-glucose 6-phosphate and regulated by phosphorylation catalysed with specific PEPC kinase. Phosphorylated PEPC is characterized by a higher reaction rate, higher sensitivity to activation and lower sensitivity to inhibition. Similarly, PPDK is regulated by a specific PPDK regulatory protein, a most unusual bifunctional protein kinase/protein phosphatase. The function of PEPC in C₃ plants is replenishment of the citric acid cycle with intermediates, thus providing carbon skeletons for amino acid synthesis. PEPC in cooperation with malate dehydrogenase and NADP-ME produces NADPH for biosynthesis of fatty acids and specific defence compounds such as phytoalexins. The enhanced activities of PEPC, NADP-ME and PPDK under stress of various types could be a sign of their involvement in plant response to stress.