

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium vlivu modifikace struktury elicitinů infestinu a kryptogeinu na modelovém systému tabákové buněčné suspenze

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Antonín Sedlář**
Studijní program: N1406 Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.**
Konzultant: **Mgr. Martina Janků**
Rok: 2018

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 30. 4. 2018

Antonín Sedlář

Tímto bych rád poděkoval doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí literatury a za čas, který mi při zpracování diplomové práce věnovala.

Dále chci poděkovat také Mgr. Martině Janků za všestrannou výpomoc a konzultace při vypracování experimentální části.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Antonín Sedlář
Název práce	Studium vlivu modifikace struktury elicitinů infestinu a kryptogeinu na modelovém systému tabákové buněčné suspenze
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Martina Janků
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Elicitiny jsou malé 10 kDa proteiny produkované fytopatogeny rodu *Phytophthora* a *Pythium*. Elicitiny jsou schopné v některých rostlinách vyvolat obrannou reakci. Po napadení patogenem dochází v rostlinách k prudkému nárůstu produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Hlavním producentem ROS jsou NADPHoxidasy v cytoplazmatické membráně. Aktivita NADPHoxidasy je negativně regulována oxidem dusnatým (NO) prostřednictvím S-nitrosylace. NO reguluje také aktivitu řady dalších enzymů zapojených v metabolismu ROS.

V experimentální části diplomové práce byl studován biologický účinek elicitinů infestinu (Inf), Inf V13K/A14T, Inf V84F, kryptogeinu (Cry), Cry K13V a Cry V84F na modelovém systému tabákových buněčných suspenzí a rostlin. V případě Inf byla vlivem mutací pozorována zvýšená schopnost indukovat produkci ROS, která koresponduje se zvýšenou nekrotickou aktivitou a nadexpresí NADPHoxidasy. U Cry vedla mutace v pozici 13 k mírnému poklesu schopnosti elicítace, naopak mutace V84F vedla k zesílení účinku Cry. Po aplikaci elicitinů (s výjimkou Inf) byly pozorovány dvě fáze produkce ROS. Ke studiu zapojení NADPHoxidasy a NO v mechanismu obranné reakce a produkce ROS po aplikaci elicitinů byl využit inhibitor NADPHoxidasy (DPI), donor NO (GSNO), inhibitor S-nitrosoglutathionreduktasy (N6022) a lapač NO (PTIO). DPI a GSNO částečně inhibovali produkci ROS po aplikaci elicitinů. Aplikace N6022 neměla výraznější vliv na sledované parametry.

Klíčová slova	Elicitiny, infestin, kryptogein, <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi, reaktivní formy kyslíku, oxid dusnatý, NADPHoxidasa, askorbátperoxidasa
Počet stran	94
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Antonín Sedlář
Title	Researching the influence of modifications in the structure of infestin and cryptogein with the use of tobacco cell suspension model system
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Consultant	Mgr. Martina Janků
The year of presentation	2018

Abstract

Elicitins are small 10 kDa proteins produced by phytopathogens of genus *Phytophthora* and *Pythium*. Elicitins are able to induce defense response in some plant species. After invading by pathogens, rapid increase in reactive oxygen species (ROS) production occurs in plants. Main ROS-producing enzyme is NADPH oxidase localized in plasma membrane. Activity of NADPH oxidase is negatively regulated by nitric oxide (NO) via S-nitrosylation. NO also regulates activity of many other enzymes involved in ROS metabolism.

The biological effect of elicitin infestin (Inf), Inf V13K/A14T, Inf V84F, cryptogein (Cry), Cry K13V and Cry V84F on tobacco cell suspensions and plants was studied in the experimental part of this master thesis. Inf mutations led to increased ability to induce ROS production that corresponds with increased necrotic activity and overexpression of NADPH oxidase. In case of Cry, mutation in position 13 led to slight decrease in elicitation ability. On the other hand, mutation V84F led to amplified biological effect of Cry. Two phases of ROS production were observed after application of elicitins (with the exception of Inf). NADPH oxidase inhibitor (DPI), NO donor (GSNO), S-nitrosoglutathione reductase inhibitor (N6022) and NO scavenger (PTIO) were used to research the role of NADPH oxidase and NO in plant defense response mechanism and in elicitin-induced ROS production. DPI and GSNO partially inhibited elicitin-induced ROS production. N6022 didn't have any significant effect on measured parameters.

Keywords	Elicitins, infestin, cryptogein, <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi, reactive oxygen species, nitric oxide, NADPH oxidase, ascorbate peroxidase
Number of pages	94
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod.....	1
2 Současný stav řešené problematiky	2
2.1 Role reaktivních forem kyslíku při obranné reakci rostlin proti patogenům ..2	
2.1.1 Rostlinná NADPHoxidasa.....	2
2.1.1.1 Regulace aktivity NADPHoxidasý	4
2.1.1.2 Subcelulární lokalizace NADPHoxidas.....	7
2.1.1.3 NADPHoxidasý v <i>Nicotiana tabacum</i>	8
2.1.2 Oxidativní vzplanutí při interakci rostlina-patogen.....	8
2.2 Antioxidační mechanismy v rostlinách.....	10
2.2.1 Askorbát-glutathionový cyklus	11
2.2.1.1 Askorbátperoxidasa	12
2.2.1.1.1 Regulace aktivity askorbátperoxidasy	13
2.2.1.2 Monodehydroaskorbátreduktasa.....	15
2.2.1.3 Dehydroaskorbátreduktasa	16
2.2.1.4 Glutathionreduktasa.....	16
2.3 Elicitiny.....	17
2.3.1 Kryptogein.....	18
2.3.1.1 Modifikace ve struktuře kryptogeinu.....	20
3 Experimentální část	26
3.1 Chemikálie.....	26
3.2 Přístrojové vybavení	26
3.3 Rostlinný materiál.....	27
3.3.1 Kultivace rostlinného materiálu	27
3.3.2 Práce s buněčnou suspenzí	28
3.4 Elicitiny.....	28
3.5 Experimentální metody.....	29
3.5.1 Stanovení nekrotické aktivity elicitinů v listech tabáku.....	29
3.5.2 Stanovení viability tabákových buněk.....	29
3.5.2.1 Kolorimetrická metoda s použitím methylenové modři	29
3.5.2.2 Fluorescenční metoda s použitím propidium jodidu	30
3.5.2.3 Fluorescenční metoda s použitím fluorescein diacetátu	30
3.5.3 Stanovení produkce ROS v tabákových buňkách	31
3.5.3.1 Metoda využívající luminolu.....	31

3.5.3.2	Metoda využívající xylenolovou oranž	31
3.5.3.3	Metoda využívající fluorescenční sondy	32
3.5.4	Stanovení aktivity askorbátperoxidasy	32
3.5.4.1	Příprava extraktu.....	32
3.5.4.2	Spektrofotometrické měření aktivity	33
3.5.5	Stanovení aktivity NADPHoxidasy.....	33
3.5.5.1	Příprava extraktu.....	33
3.5.5.2	Spektrofotometrické měření aktivity	34
3.5.6	Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou	35
3.5.7	Stanovení exprese NADPHoxidasy.....	35
3.5.7.1	Izolace a purifikace RNA	35
3.5.7.2	Měření koncentrace a čistoty RNA.....	36
3.5.7.3	Reverzní transkripce	36
3.5.7.4	qPCR.....	36
4	Výsledky	38
4.1	Studium vlivu elicitinů kryptogeinu, infestinu a jejich mutantů na <i>Nicotiana tabacum</i>	38
4.1.1	Nekrotická aktivita elicitinů v tabákových listech	38
4.1.2	Vliv elicitinů na životnost buněčné suspenze <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi	40
4.1.3	Vliv elicitinů na produkci ROS	43
4.1.4	Vliv elicitinů na aktivitu a expresi NADPHoxidasy	45
4.1.5	Vliv elicitinů na aktivitu askorbátperoxidasy	47
4.2	Vliv inhibitoru NADPHoxidasy DPI na působení elicitinů.....	48
4.2.1	Vliv na nekrotickou aktivitu v tabákových listech.....	48
4.2.2	Vliv na životnost buněčné suspenze.....	51
4.2.3	Vliv na produkci ROS	52
4.2.4	Vliv na aktivitu a expresi NADPHoxidasy	53
4.2.5	Vliv na aktivitu askorbátperoxidasy	54
4.3	Vliv donoru oxidu dusnatého GSNO na působení elicitinů	55
4.3.1	Vliv na nekrotickou aktivitu v tabákových listech.....	55
4.3.2	Vliv na životnost buněčné suspenze.....	57
4.3.3	Vliv na produkci ROS	58
4.3.4	Vliv na aktivitu askorbátperoxidasy	59

4.4	Vliv inhibitoru S-nitrosoglutathionreduktasy N6022 na působení elicitinů.	60
4.4.1	Vliv na nekrotickou aktivitu v tabákových listech.....	60
4.4.2	Vliv na životnost buněčné suspenze.....	61
4.4.3	Vliv na produkci ROS	62
4.4.4	Vliv na aktivitu askorbátperoxidasy	63
4.5	Vliv lapáče oxidu dusnatého PTIO na působení elicitinů.....	64
4.5.1	Vliv na nekrotickou aktivitu v tabákových listech.....	64
5	Diskuze	66
5.1	Nekrotická aktivita elicitinů.....	66
5.2	Úloha NADPHoxidasy a ROS v obranné reakci rostlin.....	69
5.3	Úloha oxidu dusnatého v regulaci enzymů metabolismu ROS	72
5.4	Vliv modifikace struktury elicitinů na schopnost elicítace.....	74
6	Závěr.....	77
7	Seznam použité literatury.....	78
8	Seznam použitých zkratk.....	85

Cíle práce:

V teoretické části je cílem diplomové práce vypracování literární rešerše zaměřené na problematiku:

1. charakterizace elicitinu kryptogeinu (původ, mechanismus působení, shrnutí poznatků ze studií zaměřených na charakterizaci mutantních forem kryptogeinu),
2. týkající se úlohy ROS, RNS v reakci rostlin na infekci patogenem se zaměřením na S-nitrosylace.

V experimentální části je cílem práce studium úlohy ROS v mechanismu působení elicitinu infestinu a kryptogeinu a jejich mutantních forem s modifikací v poloze 13 (případně v poloze 84). Při studiu zapojení NADPHoxidasy v produkci ROS bude použit inhibitor DPI, donor NO S-nitrosoglutathion (GSNO) a inhibitor S-nitrosoglutathionreduktasy (N6022). Bude sledován vliv aplikace testovaných látek (elicitiny, GSNO, N6022, PTIO, DPI) na

1. schopnost aktivovat nekrotickou reakci na listech rostlin *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi (nebo cv. Samsun),
2. životnost buněk *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi,
3. produkci ROS,
4. aktivitu/expresi NADPHoxidasy,
5. aktivitu askorbátperoxidasy.

1 Úvod

Obranná reakce rostliny proti patogenům může být doprovázena výrazným nárůstem produkce reaktivních forem kyslíku. Tento jev je označován jako oxidativní vzplanutí. Reaktivní formy kyslíku (ROS) se mohou podílet na přenosu signálu a aktivaci obranných mechanismů, na druhou stranu se jedná o toxické sloučeniny pro živý organismus v závislosti na jejich koncentraci, případně přítomnosti antioxidačních systémů (Lamb a Dixon, 1997).

Hlavním enzymem produkujícím ROS při oxidativním vzplanutí je NADPHoxidasa lokalizovaná v cytoplazmatické membráně. Tento enzym je komplexně regulován řadou mechanismů, mezi něž patří například S-nitrosylace, která aktivitu enzymu inhibuje (Yun *et al.*, 2011).

ROS jsou v rostlinách eliminovány různými mechanismy. Nejvýznamnějším z nich je askorbát-glutathionový cyklus, který slouží k detoxifikaci peroxidu vodíku. Součástí cyklu je enzym askorbátperoxidasa, která se v rostlinách vyskytuje v několika isoformách lokalizovaných v cytosolu, peroxisomech, glyoxysomech, mitochondriích, ve stromatu a thylakoidech chloroplastů (Shigeoka *et al.*, 2002). Aktivita enzymu je regulována procesem S-nitrosylace a nitrace. Studie zabývající se S-nitrosylací askorbátperoxidasy pokázaly jak aktivační (Begara-Morales *et al.*, 2014), tak inhibiční efekt této posttranslační modifikace (de Pinto *et al.*, 2013).

Kryptogein je proteinový elicitor produkovaný patogenem *Phytophthora cryptogea*. Je schopen vázat do své hydrofobní dutiny steroly a mastné kyseliny a přenášet je přes cytoplazmatickou membránu rostlinných buněk (Mikes *et al.*, 1997). Jedná se o bazický protein s vysokou nekrotickou aktivitou. V tabákových buňkách je po jeho aplikaci pozorována alkalizace extracelulárního pH, influx Ca^{2+} iontů, nárůst produkce reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého. Dochází také ke zvýšené expresi obranných genů a indukci systémově získané resistance (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

V řadě studií byl kryptogein použit jako modelový elicitin pro studium souvislostí mezi strukturou elicitinu a jeho biologickou aktivitou. Cílem bylo především objasnit vztah mezi schopností vázat steroly a spouštět obrannou reakci. Pozornost byla tedy věnována modifikacím, u nichž došlo k záměně aminokyselin podílejících se na tvorbě hydrofobní dutiny a interakci se steroly. Jedním z takových mutantů je kryptogein V84F, který i přes neschopnost vázat steroly indukuje produkci ROS (Dokládal *et al.*, 2012).

Podrobně byla studována také mutace K13V, která vedla ke snížené schopnosti proteinu vázat a přenášet steroly a k méně intenzivní produkci ROS u tabákových buněk. Tato záměna způsobuje pokles isoelektrického bodu proteinu a také ztrátu kladného elektrostatického náboje na povrchu molekuly v místě mutace (Hirasawa *et al.*, 2004; Plešková *et al.*, 2011).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Role reaktivních forem kyslíku při obranné reakci rostlin proti patogenům

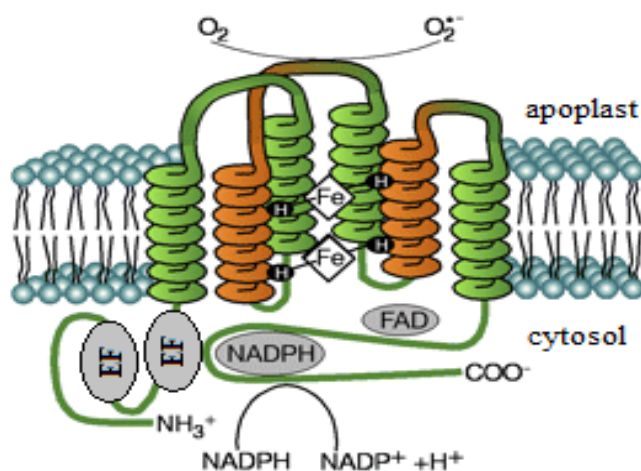
V rostlině dochází po rozpoznání patogena ke spuštění obranné reakce, která je doprovázena prudkým nárůstem produkce ROS. Tento jev je označován jako oxidativní vzplanutí a může probíhat ve dvou fázích. První fáze nastává již několik minut po napadení patogenem a trvá přibližně 1 až 3 hodiny. Produkce ROS v této fázi je nespecifická a může být spojena také s jinými stresovými faktory. Další fáze nastává asi 4 hodiny po napadení patogenem, který obsahuje faktory avirulence specificky rozpoznávané rostlinou. Produkce ROS je ve druhé fázi mnohem intenzivnější a probíhá v delším časovém intervalu. Vysoké hladiny ROS jsou toxické jak pro patogena, tak pro rostlinu. ROS jsou však také součástí přenosu signálu v řadě obranných mechanismů, které rostlině umožňují úspěšně odolávat mnoha nepříznivým faktorům vnějšího prostředí (Baker a Orlandi, 1995; Lamb a Dixon, 1997).

2.1.1 Rostlinná NADPHoxidasa

Jedním z klíčových enzymů produkce ROS po napadení patogenem je NADPHoxidasa, která je lokalizována v cytoplazmatické membráně rostlinné buňky. Tento enzym patří do třídy oxidoreduktas (EC 1.6.3.1) a katalyzuje přenos elektronů z cytosolárního NADPH na molekulu kyslíku v apoplastu. Rostlinné NADPHoxidasy jsou řazeny do rodiny RBOHs (respiratory burst oxidase homologues) a jsou homologní s podjednotkou gp91phox živočišné NADPHoxidasy. Struktura tohoto enzymu je tvořena šesti konzervovanými transmembránovými helixy a dvěma hemovými skupinami (obr. 1). Třetí a pátý helix váže přes 4 histidinová residua hemové skupiny, které jsou klíčové při přenosu elektronů z NADPH přes FAD až na kyslík v apoplastu za vzniku superoxidového radikálu (Sagi a Fluhr, 2006). Enzym je dále tvořen

C-koncovou doménou, kde dochází k navázání NADPH a FAD. N-koncová doména obsahuje motivy EF-ruky a je klíčová při regulaci aktivity NADPHoxidasy.

V genomu *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno celkem 10 RBOHs, které byly označeny jako AtRBOHA-J a které se liší místem exprese v rostlině a citlivostí na vnější faktory prostředí (Torres a Dangl, 2005). Mnoho studií prokázalo zapojení těchto enzymů v řadě procesů v rostlinách. AtRBOHB hraje klíčovou roli ve zrání semen (Müller *et al.*, 2009). AtRBOHC je významný při růstu kořenového vlášení (Foreman *et al.*, 2003). AtRBOHD je lokalizován ve všech částech rostliny a produkuje ROS v odpovědi na biotické i abiotické stresové faktory stejně jako jeho ortology v jiných rostlinných druzích jako je tabák, rýže nebo brambor (Kadota *et al.*, 2015). AtRBOHF je pak důležitý při ustavení tolerance rostliny při salinitním stresu (Jiang *et al.*, 2012). AtRBOHH/J jsou produkovány pouze v květu a v pylu, byla odhalena jejich funkce při růstu pylové láčky (Lassig *et al.*, 2014).

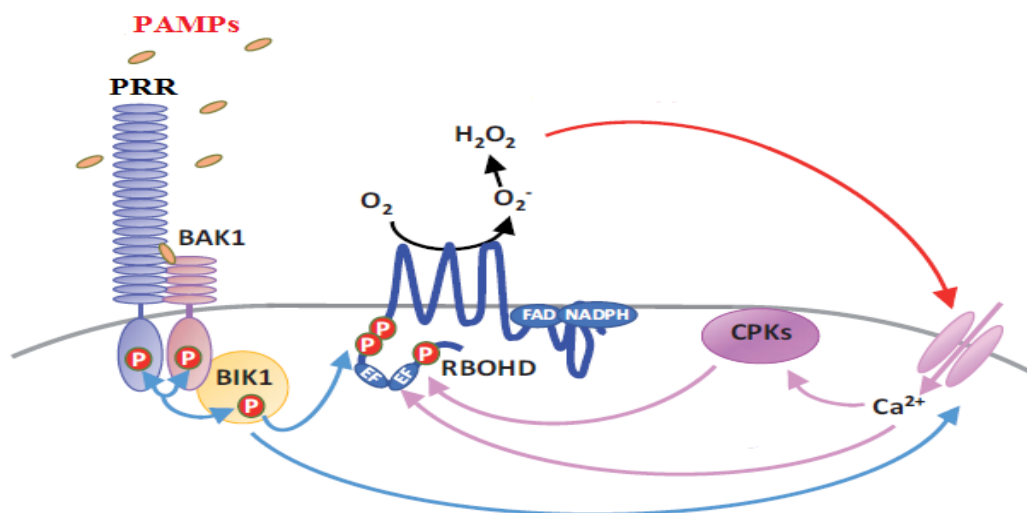


Obr. 1: Rostlinná NADPHoxidasa. Elektrony přecházejí z NADPH přes FAD a hemy až na kyslík, který je přeměňován na superoxidový anion radikál. Struktura proteinu je tvořena 6 transmembránovými helixy. 2 helixy vážou pomocí histidinů 2 molekuly hemu. N-terminální konec obsahuje motivy EF-ruky (převzato ze Sagi a Fluhr, 2006).

2.1.1.1 Regulace aktivity NADPHoxidasy

Aktivita rostlinných NADPHoxidas může být regulována pomocí vápenatých iontů. Ve studii Oda *et al.* (2010) byly u N-terminální domény proteinu OsRBOHB původem z rýže seté nalezeny 2 motivy EF-ruky a dále 2 struktury podobné motivům EF-ruky, které jsou schopné vázat Ca^{2+} ionty. Strukturální změna v proteinu, která je nutná pro spuštění aktivity NADPHoxidasy, byla pozorována při navázání vápenatého iontu pouze na jeden z motivů EF-ruky. Vápenaté ionty jsou schopné působit na tento enzym také přes Ca^{2+} -dependentní proteinkinasy (CPKs). V *A. thaliana* dochází k aktivaci AtRBOHD pomocí CPK5, která fosforyluje seriny v pozicích 39, 148, 163 a 347. U brambor pak byla prokázána fosforylace dvou serinových residuí na StRBOHB za účasti CPK (Kobayashi *et al.*, 2007).

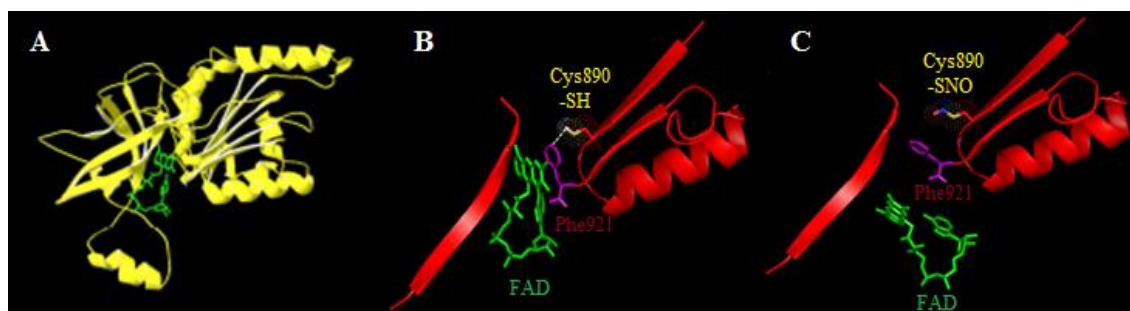
Aktivita NADPHoxidasy je regulována také fosforylací prostřednictvím dalších forem proteinkinas. Bylo zjištěno, že AtRBOHD je fosforylován na serinech v pozicích 39, 339, 343 a 347 a to proteinkinásou BIK1 (botrytis-induced kinase 1), která je součástí receptorového komplexu PRR (pattern recognition receptor; obr. 2). Tento komplex je lokalizován v cytoplazmatické membráně rostlinné buňky a spouští obrannou reakci po rozpoznání patogena (Li *et al.*, 2014).



Obr. 2: Regulace aktivity NADPHoxidasy prostřednictvím Ca^{2+} iontů a proteinkinas. Molekuly spojené s patogenem (PAMPs, například elicitin) jsou rozpoznány specifickými receptory v cytoplazmatické membráně (PRR). Dochází k aktivaci ko-receptoru BAK1 a k fosforylaci proteinkinasy BIK1. Fosforylovaná BIK1 má vyšší afinitu k RBOHD a fosforyluje enzym na několika specifických místech. Fosforylací dochází k aktivaci RBOHD. BIK1 také aktivuje influx Ca^{2+} iontů přes kanálky. Ca^{2+} ionty se vážou na motivy EF-ruky, což vede k aktivaci NADPHoxidasy. Ca^{2+} ionty také aktivují kalcium-dependentní proteinkinasy (CPKs), které fosforylují NADPHoxidasu a zvyšují tak její aktivitu. Zvýšená produkce superoxidového aniontu a peroxidu vodíku může způsobit další influx Ca^{2+} iontů (převzato z Kadota *et al.*, 2015).

Produkce ROS prostřednictvím NADPHoxidas může být ovlivněna MAPK signální dráhou na úrovni transkripce genů. Například rostliny *A. thaliana* overexprimující mitogenem aktivované proteinkinasy 8 (AtMPK8) vykazují sníženou produkci ROS a také sníženou expresi AtRBOHD v reakci na poranění. AtMPK8 je aktivována pomocí vápenatých iontů, které způsobí navázání kalmodulinu na tuto kinasu. Na druhou stranu AtMPK6 dokáže expresi *AtRBOHD* aktivovat (Liu a He, 2016). U *Nicotiana benthamiana* byla sledována aktivace exprese genu *NbRBOHB* (ortolog *AtRBOHD*) pomocí mitogenem aktivovaných proteinkinas SIPK, NTF4 a NTF6 po aplikaci elicitinu infestinu (Asai *et al.*, 2008). MAPKs ovlivňují expresi *NbRBOHB* tak, že aktivují specifické transkripční faktory WRKY (Adachi *et al.*, 2015).

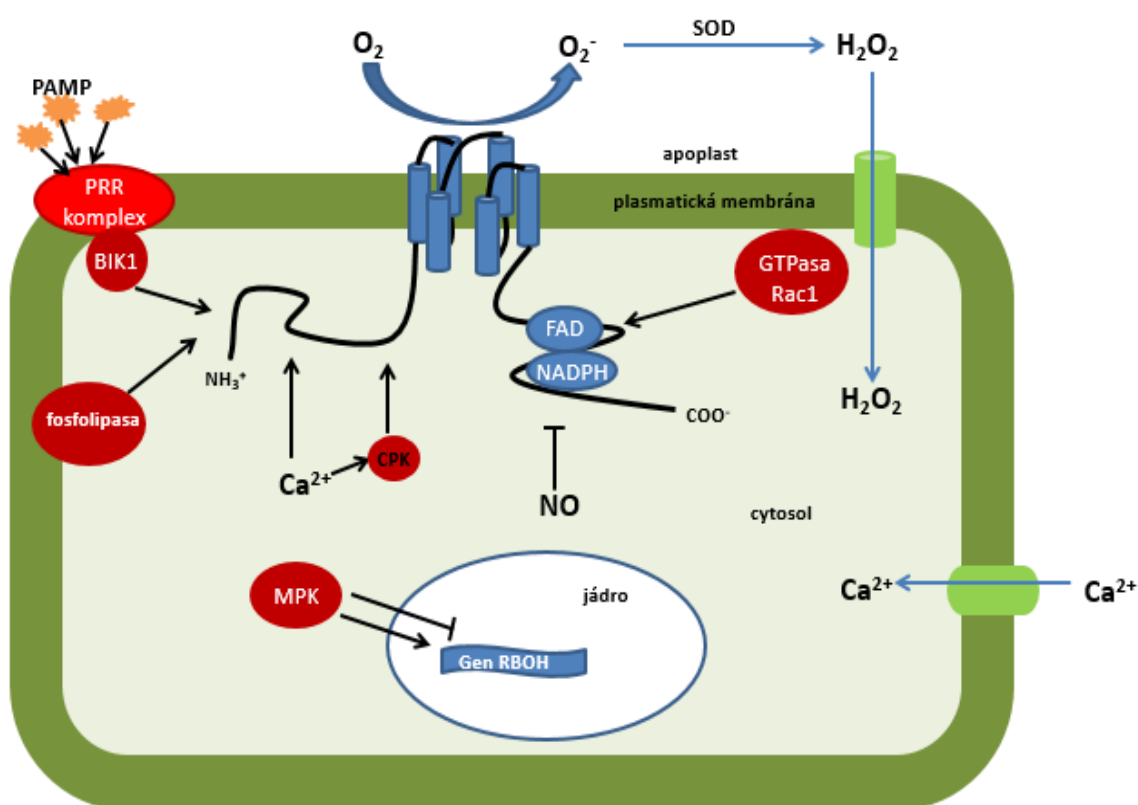
Aktivita RBOH může být ovlivněna hladinou oxidu dusnatého na základě postranlační modifikace S-nitrosylace. U *A. thaliana* byl pozorován vznik S-nitroso skupiny na cysteinovém residuu v pozici 890 enzymu AtRBOHD jak *in vitro* podmínkách, tak *in vivo* po napadení rostliny patogenem. Tato kovalentní modifikace zabrání navázání FAD (obr. 3) a způsobí tak omezení aktivity NADPHoxidasy a produkce ROS, zároveň je také potlačena buněčná smrt (Yun *et al.*, 2011).



Obr. 3: Počítačový model vlivu S-nitrosylace cysteinu 890 na strukturu vazebného místa pro FAD na C-terminálním konci AtRBOHD. A: Model C-terminálního konce AtRBOHD s vazebným místem pro FAD. B: redukovaný cystein 890 stabilizuje vodíkovým můstkem fenylalanin 921, který je důležitý pro navázání FAD. Díky vodíkové vazbě se nachází postranní řetězec fenylalaninu a flavinová skupina FAD v koplánární pozici, což je klíčové pro katalytickou aktivitu enzymu. C: S-nitrosylovaný cystein odpuzuje fenylalanin, který není stabilizován vodíkovým můstkem, tím dochází k sterickému bránění navázání FAD (převzato z Yun *et al.*, 2011).

Na činnost RBOHs mají vliv také malé Rac GTPasy (obr. 4). Studie RBOHB z rýže seté prokázala interakci N-terminální domény tohoto proteinu s GTPasou OsRac1. Navázání této GTPasy musí předcházet tvorba homodimeru RBOHB (Oda *et al.*, 2010). V pylových láčkách tabáku, které konstitutivně exprimovaly GTPasu NtRac5 pak byla naměřena zvýšená produkce ROS (Potocký *et al.*, 2012).

Dalším faktorem ovlivňujícím aktivitu NADPHoxidasy může být fosfolipasa D asociovaná s cytoplasmatickou membránou (obr. 4). Práce Zhang *et al.* (2009) ukazuje, že tato fosfolipasa hydrolyzuje fosfolipidy v membráně za vzniku fosfatidových kyselin, které se následně vážou na postranní řetězce argininů v pozicích 149, 150, 156 a 157 u AtRBOHD. Tím dochází k aktivaci enzymu. Tento mechanismus regulace byl objeven při studiu zavírání průduchů *A. thaliana* po aplikaci abscisové kyseliny.



Obr. 4: Mechanismy regulace rostlinné NADPHoxidasy. Černé šipky značí aktivaci a černé čáry s tupými konci inhibici. NADPHoxidasa je aktivována vápenatými ionty, které se vážou na motivy EF-ruky na N-konci NADPHoxidasy. Aktivaci fosforylací způsobují CPKs (Ca^{2+} dependentní proteinkinasy) a proteinkinasa BIK1, která je asociována s PRR komplexem (receptor rozpoznávající PAMP). PRR komplex reaguje na navázání PAMPs (molekuly asociované s patogenem). K aktivaci přispívá také GTPasa Rac1 a fosfolipasa asociovaná s cytoplasmatickou membránou. Mitogenem aktivované proteinkinasy (MPKs) mohou aktivovat či zastavit expresi genů *RBOH*. NADPHoxidasa je inhibována oxidem dusnatým procesem S-nitrosylace. SOD – superoxid-dismutasa, RBOH – respiratory burst oxidase homologue (přepřacováno podle Liu a He, 2016).

2.1.1.2 Subcelulární lokalizace NADPHoxidas

RBOHD se nachází v cytoplasmatické membráně. Ve studii Noiro *et al.* (2014) byla sledována lokalizace RBOHD v tabákových buňkách BY-2 po elicitaci kryptogeinem. Pomocí fúzního proteinu GFP a imunochemického značení byl tento enzym nalezen v cytoplasmatické membráně v podobě klastrů a také v okrajových částech Golgiho aparátu. Hodinu po aplikaci kryptogeinu byl u buněk pozorován 50% nárůst přítomnosti RBOHDs v cytoplasmatické membráně, naopak v intracelulárních kompartmentech výskyt NADPHoxidas klesal. Výsledky této práce naznačují, že vlivem elicitace dochází v tabákových buňkách ke zvýšené intenzitě přenosu NADPHoxidas z Golgiho aparátu do cytoplasmatické membrány. Produkce ROS v rané fázi obranné reakce je způsobena RBOHs již přítomnými v membráně, následný pokles produkce je způsoben záměnou aktivovaných enzymů za neaktivní z intracelulárních prostor. Přítomnost klastrů NADPHoxidas v cytoplasmatické membráně by pak vysvětlovala výsledky práce Lherminier *et al.* (2009), kde byla u stejných buněk po elicitaci kryptogeinem pozorována produkce ROS pouze v určitých místech na membráně. *In vitro* studie RBOHB z rýže seté (Oda *et al.*, 2010) ukázala schopnost tohoto proteinu tvořit dimer. RBOHD v tabáku pravděpodobně funkční dimery vytváří (Noiro *et al.*, 2014).

Výzkum transgenního huseníčku rolního, u něhož byl RBOHD označen zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) ukázal, že RBOHD se v cytoplasmatické membráně vyskytuje ve formě monomerů a dimerů (Hao *et al.*, 2014). Přídavek inhibitoru vesikulárního transportu odhalil přítomnost RBOHD ve vesikulech a také závislost přítomnosti NADPHoxidas v cytoplasmatické membráně na vesikulárním přenosu. Aplikace inhibitoru NADPHoxidas difenyljenjodonium chloridu (DPI) vedla ke snížení laterální mobility RBOHD v membráně a také k menšímu zastoupení jeho dimerní formy. Naopak nárůst intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů a zvýšená míra fosforylace způsobila zvýšenou mobilitu a zvýšené procentuální zastoupení dimeru RBOHD v cytoplasmatické membráně. Při působení salinitního stresu byla pozorována zvýšená míra degradace tohoto enzymu ve vakuolách.

Byl prokázán také význam membránových mikrodomén v lokalizaci NADPHoxidas. Sterol-deficientní mutanti *A. thaliana* vykazovali nízkou produkci ROS díky znemožnění zacílit NADPHoxidas do cytoplasmatické membrány, která má v případě těchto mutantů odlišné složení (Posé *et al.*, 2009).

Celkově lze tedy soudit, že transport NADPHoxidas z intracelulárních kompartmentů do cytoplazmatické membrány a zpět hraje klíčovou roli při regulaci aktivity těchto enzymů a zachování redoxního potenciálu membrány při vystavení rostliny stresovým faktorům.

2.1.1.3 NADPHoxidas v *Nicotiana tabacum*

V cDNA knihovně tabákových listů, které byly ošetřeny kryptogeinem, byl nalezen gen pouze pro jedinou isoformu NADPHoxidas, který byl pro svou vysokou homologii s *AtRBOHD* označen jako *NtRBOHD* (Simon-Plas *et al.*, 2002). Tato isoforma NADPHoxidas je zodpovědná za produkci ROS v tabákových buňkách po aplikaci kryptogeinu (Lherminier *et al.*, 2009). V genomu *N. tabacum* byly nalezeny dvě kopie genu *NtRBOHD*, které byly označeny jako *RBOHD1* a *RBOHD2*. *N. tabacum* je allotetraploidní druh vzniklý hybridizací diploidních *N. tomentosiformis* a *N. sylvestris* (Leitch *et al.*, 2008). Tyto diploidní druhy obsahují pouze 1 gen *RBOHD*. Porovnáním sekvencí byla nalezena shoda mezi *RBOHD* z *N. sylvestris* a *RBOHD1*, respektive *RBOHD* z *N. tomentosiformis* a *RBOHD2*. U Genů *RBOHD1* a *RBOHD2* je pak nukleotidová sekvence identická z 96,7 % a aminokyselinová z 98,4 %. Hodinu po aplikaci kryptogeinu k tabákovým buňkám BY-2 byl pozorován nárůst exprese obou homologů (Noirot *et al.*, 2014).

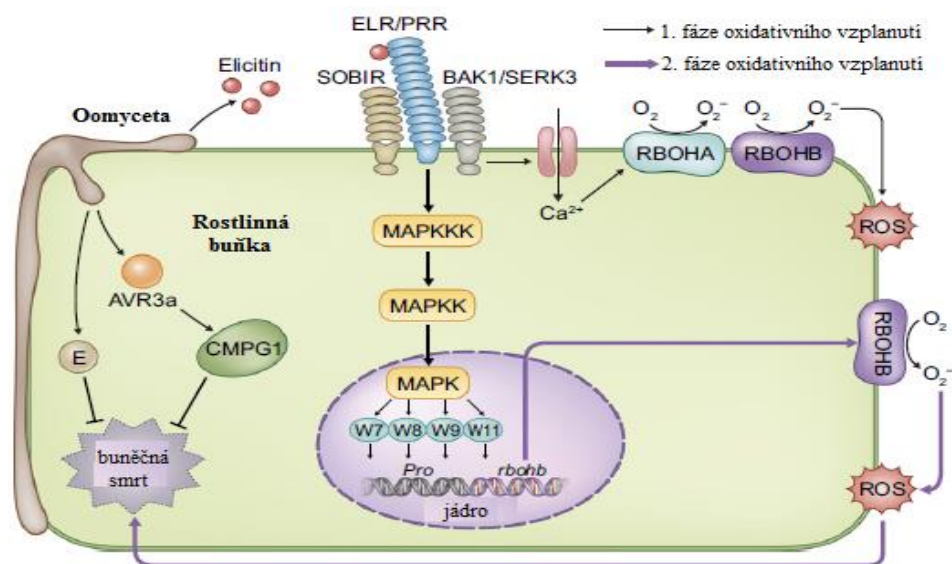
2.1.2 Oxidativní vzplanutí při interakci rostlina-patogen

První linie obranné reakce rostliny proti patogenům je označována jako PTI (pathogen-triggered immunity). Je spuštěna specifickými receptory v membráně (PRR), které rozpoznávají molekuly spojené s patogenem (PAMP). Řada patogenů však produkuje také efektorové molekuly, které tuto linii obranné reakce potlačují. V takovém případě může být u rostliny spuštěna také druhá linie obranné reakce, která je zprostředkována R proteiny, které jsou schopny efektorové molekuly rozeznat. Druhá linie obrany je označována jako ETI (effector-triggered immunity; Jones a Dangl, 2006).

Rozpoznání elicitinů, které vystupují jako PAMPs, je umožněno pomocí transmembránových proteinů BAK1 a SOBIR1 identifikovaných v *Solanum lycopersicum* a *N. benthamiana* (Peng *et al.*, 2015). V *S. microdontum* jsou elicitiny rozpoznávány specifickým receptorem ELR (Du *et al.*, 2015). Receptory spouštějí obrannou reakci, která je doprovázena influxem Ca^{2+} iontů, aktivací NADPHoxidas a první fází oxidativního vzplanutí. V této fázi však nedochází k hypersenzitivní reakci

(Chaparro-Garcia *et al.*, 2011). Receptory také způsobují aktivaci MAPK signální kaskády. Kinasy v této kaskádě fosforylují specifické transkripční faktory WRKY7/8/9/11, což vede ke zvýšené expresi genů *RBOH* a spuštění druhé fáze oxidativního vzplanutí (obr. 5). Tato fáze oxidativního vzplanutí vede k hypersenzitivní reakci (Adachi *et al.*, 2015).

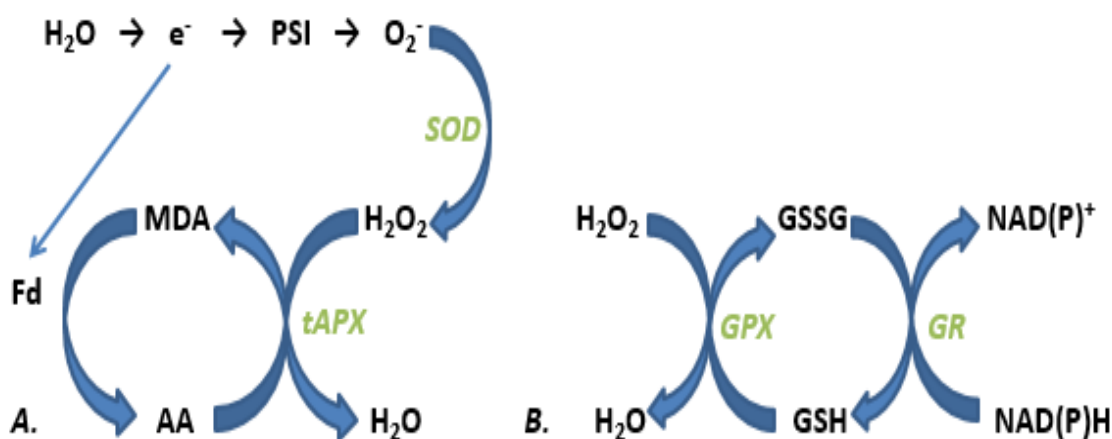
Oomycety rodu *Phytophthora* produkují také efekty. Prozatím byl odhalen molekulární účinek pouze efektoru AVR3a^{KI} z patogenu *Phytophthora infestans*. Tento efektor stabilizuje E3 ubiquitin ligasu CMPG1. To vede k potlačení hypersenzitivní reakce vyvolané infestinem (Gilroy *et al.*, 2011).



Obr. 5: Schéma aktivace produkce ROS prostřednictvím elicitinů. Elicitiny jsou rozpoznávány v *Solanum microdontum* receptorem ELR. Ten je asociován s koreceptory BAK1/SERK3 a SOBIR1. Dochází k influxu Ca²⁺ iontů, aktivaci MAPK kaskády, aktivaci RBOH a k 1. fázi oxidativního vzplanutí. MAPK signální kaskáda aktivuje expresi *RBOH* přes transkripční faktory WRKY. To vede k 2. fázi oxidativního vzplanutí a k spuštění buněčné smrti. Oomyceta *Phytophthora infestans* produkuje efektor AVR3a, který zastavuje buněčnou smrt stabilizací E3 ubiquitin ligasy CMPG1 (převzato z Derevnina *et al.*, 2016).

2.2 Antioxidační mechanismy v rostlinách

ROS způsobují v rostlinných buňkách oxidativní poškození proteinů, lipidů, sacharidů a DNA, což může vést až k buněčné smrti. Jako ochranu před toxickými účinky ROS si rostliny vyvinuly řadu enzymových i neenzymových antioxidačních mechanismů. Řada enzymů a nízkomolekulárních antioxidantů pracuje v součinnosti a vytváří tak metabolické dráhy, které regulují hladiny ROS v rostlinách. Mezi takovéto detoxifikační dráhy patří například cyklus voda-voda, který probíhá v chloroplastech za účasti specifických enzymů. Prvním krokem cyklu je fotooxidace vody na kyslík, elektrony jsou z fotosystému II přenášeny přes další fotosystémy na feredoxin nebo v menší míře na kyslík ve stromatu za vzniku superoxidu, který je převeden superoxiddismutasou (EC 1.15.1.1, SOD) na peroxid vodíku a kyslík. Peroxid vodíku je dále redukován na vodu za katalýzy tylakoidní askorbátperoxidásou (EC 1.11.1.11, obecně APX, dle lokalizace tAPX). Dalším mechanismem zapojeným v detoxifikaci ROS je glutathionperoxidasový cyklus (obr. 6). Neméně významným antioxidačním systémem je také askorbát-glutathionový cyklus, který slouží k efektivní detoxifikaci peroxidu vodíku (Asada, 1999; Mittler, 2002).

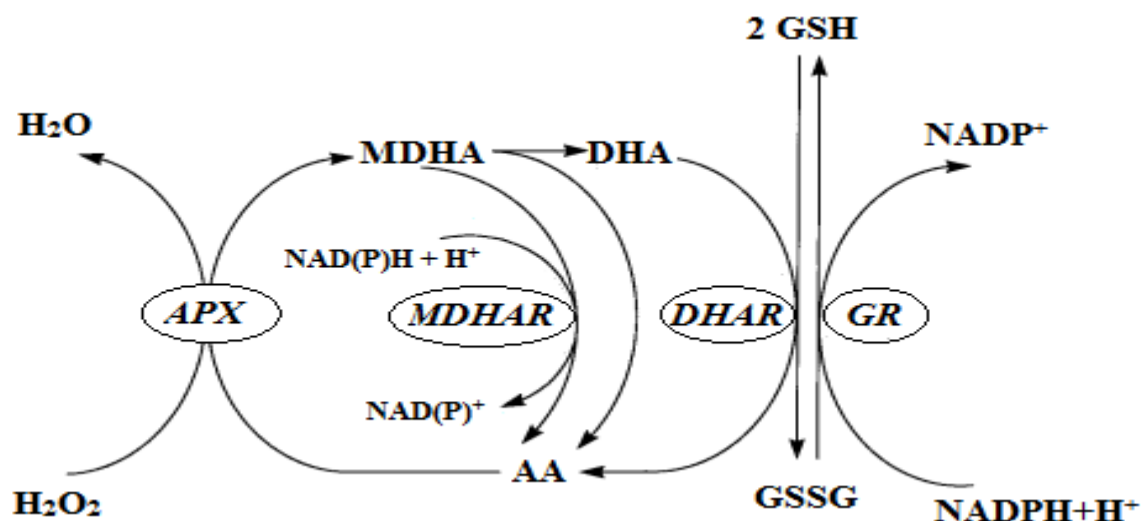


Obr. 6: Příklad antioxidačních cyklů v rostlinách. A: cyklus voda-voda, který eliminuje ROS vznikající v tylakoidech chloroplastů. Superoxid, vznikající ve stromatu chloroplastů po přenosu elektronů z fotosystému I (PSI) na kyslík, je převeden superoxiddismutasou (SOD) na peroxid vodíku a kyslík. Peroxid vodíku je redukován na vodu tylakoidní askorbátperoxidásou (tAPX). Askorbát (AA) je přitom oxidován na monodehydroaskorbát (MDA), který je zpětně redukován ferredoxinem (Fd). B: glutathionperoxidasový cyklus, ve kterém je detoxifikován peroxid vodíku. V procesu je nejprve redukován peroxid vodíku na vodu za současné oxidace glutathionu enzymem glutathionperoxidásou (GPX). V dalším kroku je glutathion opět redukován glutathionreduktásou (GR) za účasti NAD(P)H (přepřacováno podle Mittler, 2002).

2.2.1 Askorbát-glutathionový cyklus

Mezi nejvýznamnější rostlinné antioxidanty patří askorbát a glutathion. Askorbát je substrátem pro enzym APX, který katalyzuje oxidaci askorbátu za současné redukce peroxidu vodíku na vodu. Vznikající monodehydroaskorbát (MDHA) je přeměňován enzymem monodehydroaskorbátreduktasou (EC 1.6.5.4, MDHAR) zpět na askorbát za účasti NAD(P)H (jako donor elektronů může v některých případech vystupovat také cytochrom b nebo ferredoxin). MDHA je nestabilní radikál, který rychle disproportionuje na askorbát a dehydroaskorbát (DHA). DHA je redukován na askorbát enzymem dehydroaskorbátreduktasou (EC 1.8.5.1, DHAR) pomocí redukovaného glutathionu (GSH) jako substrátu. Vytvářený oxidovaný glutathion (GSSG) je v následující reakci přeměněn opět na GSH enzymem glutathionreduktasou (EC 1.6.4.2, GR). Sled těchto reakcí vedoucích k odstranění toxického peroxidu vodíku je označován jako askorbát-glutathionový cyklus (obr. 7).

Tento cyklus je klíčový nejenom pro efektivní detoxifikaci peroxidu vodíku, ale také pro uchování stability enzymu askorbátperoxidasy, který je v nepřítomnosti askorbátu labilní. Enzymy askorbát-glutathionového cyklu jsou lokalizovány v cytosolu, mitochondriích, chloroplastech a peroxisomech (Asada, 1992; Noctor a Foyer, 1998).



Obr. 7: Askorbát-glutathionový cyklus. Disproporcionace monodehydroaskorbátu na dehydroaskorbát a askorbát probíhá neenzymaticky, ostatní reakce jsou katalyzovány enzymy. AA - askorbát, APX - askorbátperoxidasa, DHA - dehydroaskorbát, DHAR - dehydroaskorbátreduktasa, GR - glutathionreduktasa, GSSG - oxidovaný glutathion, GSH - redukovaný glutathion, MDHA - monodehydroaskorbát, MDHAR - monodehydroaskorbátreduktasa (převzato z Noctor a Foyer, 1998).

2.2.1.1 Askorbátperoxidasa

Askorbátperoxidasa (APX) je hemová peroxidasa třídy I, která katalyzuje redukci peroxidu vodíku za současné oxidace dvou molekul askorbátu na monodehydroaskorbát (rovnice 1). V mechanismu katalyzované reakce dochází nejprve k redukci peroxidu vodíku a oxidaci hemového železa za vzniku porfyrinového radikálu (označen jako R) s oxyferrylovou skupinou (rovnice 2). Pro návrat peroxidasy do původního stavu jsou nutné dvě jednoelektronové redukce askorbátem, kdy je nejprve redukován radikál a poté oxyferrylová skupina zpět na trojmocné železo dle rovnice 3 a 4 (Mandelman *et al.*, 1998).

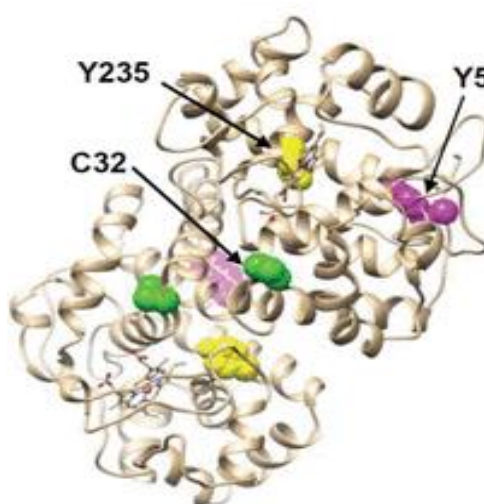
1. $2 \text{ askorbát} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ monodehydroaskorbát} + 2 \text{ H}_2\text{O}$
2. $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{APX (Fe}^{3+}) \text{ R} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{APX (Fe}^{4+=\text{O})} \text{ R}\cdot$
3. $\text{APX (Fe}^{4+=\text{O})} \text{ R}\cdot + \text{askorbát} \rightarrow \text{monodehydroaskorbát} + \text{APX (Fe}^{4+=\text{O})} \text{ R}$
4. $\text{APX (Fe}^{4+=\text{O})} \text{ R} + \text{askorbát} \rightarrow \text{monodehydroaskorbát} + \text{APX (Fe}^{3+}) \text{ R}$

Jedná se o klíčový enzym askorbát-glutathionového cyklu, který se v rostlinných buňkách vyskytuje v několika isoformách. Membránově vázané isoformy jsou lokalizovány v peroxisomech, glyoxysomech (mAPX) a v tylakoidu chloroplastů (tAPX), volné isoformy se nacházejí v cytosolu (cAPX), mitochondriích (mitAPX) a ve stroma chloroplastů (sAPX; Shigeoka *et al.*, 2002). Jednotlivé isoformy APX jsou cíleny do organel podle specifických peptidů nacházejících se na C- nebo N- konci proteinu (Teixeira *et al.*, 2004). mAPX a mitAPX mají shodnou molekulovou hmotnost 31 kDa; tAPX má 37,7 kDa a sAPX 33,2 kDa. cAPX se vyskytuje ve formě homodimeru skládajícího se z podjednotek o molekulové hmotnosti 28 kDa (Shigeoka *et al.*, 2002).

APX je velmi nestabilní, a to zejména v prostředí, kde je koncentrace askorbátu nižší než 20 mikromolární. K inaktivaci však nedochází v anaerobním prostředí. APX je inhibována kyanidy a azidy, které se vážou na atom železa hemové skupiny enzymu, *p*-chloromerkuribenzoátem, který modifikuje thiolové skupiny proteinu, a také specifickými sebevražednými substráty *p*-aminofenolem, hydroxylaminem a hydroxymočovinou. *In vitro* donorem elektronů pro membránově vázané APX může být kromě askorbátu také guajakol a pyrogallol (Asada, 1992). Tento enzym má mnohem vyšší afinitu k peroxidu vodíku (mikromolární koncentrace) než jiné antioxidační enzymy, jako je katalasa nebo superoxiddismutasa (Gill a Tuteja, 2010). Exprese genů pro APX je pletivově specifická a závisí na vývojovém stádiu rostliny, zároveň je také ovlivněna působením stresových faktorů na rostlinu (Caverzan *et al.*, 2012).

2.2.1.1.1 Regulace aktivity askorbátperoxidasy

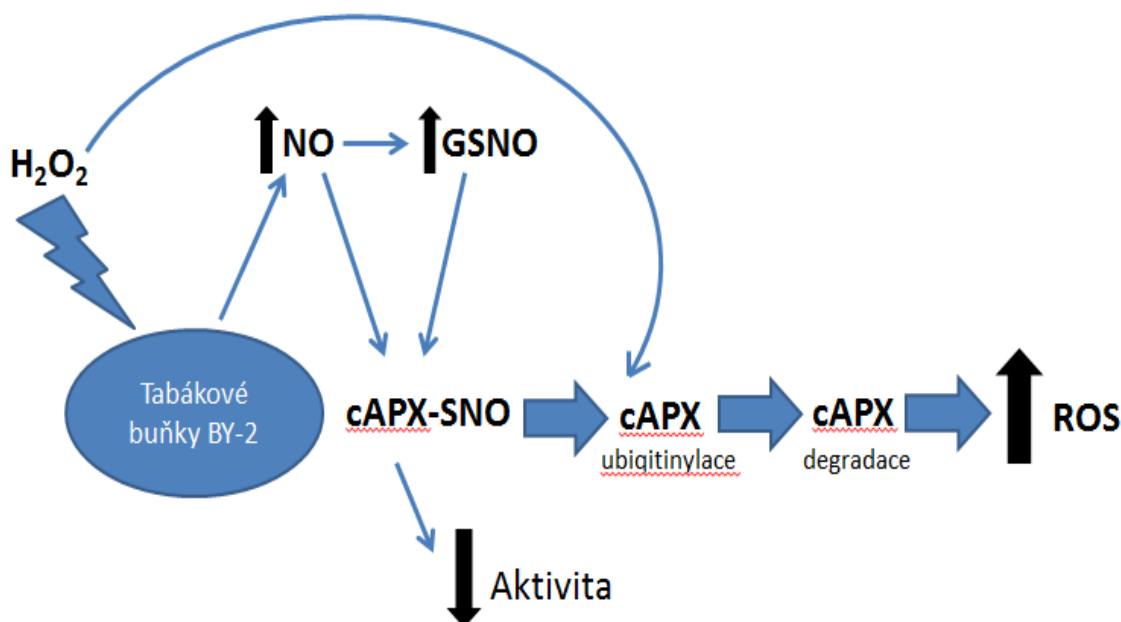
Aktivita APX je regulována prostřednictvím oxidu dusnatého. Huseníček rolní pěstovaný v prostředí syntetického auxinu vykazoval sníženou míru aktivity a nižší podíl S-nitrosylované APX oproti kontrole. Rekombinantní AtAPX pak po působení nitrosylačního činidla CysNO vykazovala vyšší aktivitu (Correa-Aragunde *et al.*, 2013). AtAPX obsahuje pět cysteinových residuí. Další studie (Yang *et al.*, 2015) prokázala S-nitrosylaci dvou cysteinů v pozicích 32 a 49 tohoto enzymu. Nárůst aktivity pak způsobila S-nitrosylace cysteinu 32, modifikace na cysteinu 49 aktivitu enzymu neovlivnila. Oxid dusnatý způsobuje nárůst aktivity také u tří isoform APX z hlízek kořenů sóji (Keyster *et al.*, 2011). *In vitro* studie rekombinantní APX z hrachu prokázala zvýšenou aktivitu tohoto enzymu vlivem S-nitrosylace. Cytosolární forma hrachové APX obsahuje pouze jedno cysteinové residuum v pozici 32, kde dochází k S-nitrosylaci. Dále bylo zjištěno, že k inhibici aktivity APX dochází i vlivem nitrace. Nitrace byla zaznamenána u tyrosinů v pozici 5 a 235 (obr. 8). Byl pozorován také pokles aktivity po přidavku redukovaného glutathionu, což může být způsobeno procesem S-glutathionylace. Byla prokázána S-nitrosylace APX *in vivo* působením salinitního stresu (Begarra-Morales *et al.*, 2014). Chemická modifikace cysteinu 32 v hrachové APX Ellmanovým činidlem zabránila navázání askorbátu a vedla tak ke ztrátě enzymové aktivity. Sníženou aktivitu vykazoval mutantní enzym, kde byl cystein 32 nahrazen za serin (Mandelman *et al.*, 1998).



Obr. 8: Struktura homodimeru cytosolární askorbátperoxidasy z hrachu setého. Na jedné z podjednotek cytosolární askorbátperoxidasy je vyznačen cystein 32, který je S-nitrosylován. Zobrazeny jsou také tyrosiny 5 a 235, na nichž dochází k nitraci (převzato z Begarra-Morales *et al.*, 2014).

V jiné práci je ovšem pozorován naopak pokles aktivity tabákové APX působením donorů NO. Je zde diskutována možnost inhibice navázáním oxidu dusnatého na atom železa hemové skupiny (Clark *et al.*, 2000). Tabákové buňky BY-2 vystavené působení peroxidu vodíku vykazovaly zvýšenou míru S-nitrosylace cAPX a zároveň byl naměřen pokles její aktivity (obr. 9). S-nitrosylace může být také signálem pro ubikvitinylaci a následnou degradaci proteinů. Zvýšená ubikvitinylace enzymu vyvolaná oxidem dusnatým byla v tomto případě potvrzena. Pokles aktivity vlivem S-nitrosylace byl prokázán také *in vitro* inkubací purifikované cAPX s GSNO (S-nitrosoglutathion; de Pinto *et al.*, 2013).

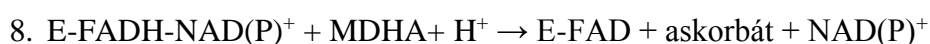
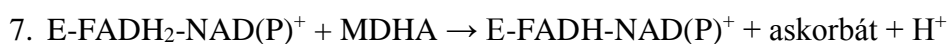
Cystein v pozici 32 je vysoce konzervován v APX různých rostlinných druhů a nachází se ve vazebném místě pro askorbát. Z dosavadních studií je patrné, že APX je v rostlinách regulována zejména přes tento cystein. Tabáková APX obsahuje také další cysteinová residua, jejichž modifikace S-nitrosylací ve výsledku patrně způsobí pokles aktivity enzymu.



Obr. 9: Cytosolární askorbátperoxidasa (cAPX) z tabákových buněk BY-2 je regulována procesem S-nitrosylace. Peroxid vodíku indukuje nárůst hladin oxidu dusnatého (NO) a S-nitrosoglutathionu (GSNO). To vede k S-nitrosylaci cytosolární askorbátperoxidasy (cAPX-SNO) a k poklesu její aktivity. S-nitroso skupina je spolu s oxidačním stresem signálem pro ubikvitinylaci a následnou degradaci enzymu. Pokles koncentrace a aktivity APX vede k akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách (přepřacováno podle de Pinto *et al.*, 2013).

2.2.1.2 Monodehydroaskorbátreduktasa

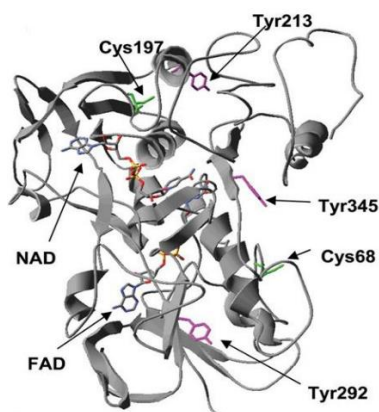
Monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR) patří do třídy oxidoreduktas a katalyzuje reakci dle rovnice 5. MDHAR využívá FAD jako kofaktor. Enzym má větší afinitu k NADH jako donoru elektronů ($K_m = 5 \mu\text{mol/l}$) než k NADPH ($K_m = 22\text{-}200 \mu\text{mol/l}$) a je vysoce specifický pro monodehydroaskorbát. V prvním kroku katalytického cyklu dochází ke dvouelektronové redukci FAD za vzniku přechodového komplexu (rovnice 6). Z redukovaného enzymu jsou poté elektrony převedeny na dvě molekuly monodehydroaskorbátu, kdy v mezikroku vzniká semichinonová forma přechodového komplexu dle rovnic 7 a 8 (Hossain a Asada, 1985; Kobayashi *et al.*, 1995; Sano *et al.*, 1995). Monodehydroaskorbát účastní se reakce je produkován enzymem APX a vzniká také přímou reakcí askorbátu se superoxidovým či hydroxylovým radikálem.



MDHAR se vyskytuje v rostlinných buňkách ve dvou isoformách – cytosolární (47 kDa) a chloroplastová, jejíž molekulová hmotnost je přibližně 55 kDa (Asada, 1999).

Ferredoxin je schopný redukovat monodehydroaskorbát mnohem účinněji než MDHAR pomocí NAD(P)H. V tylakoidech chloroplastů proto dochází k redukci MDHA právě ferredoxinem, který je zde lokalizován (Miyake a Asada, 1994).

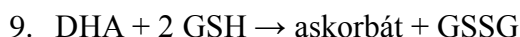
Aktivita MDHAR je regulována oxidem dusnatým. Studie rekombinantní hrachové MDHAR objevila inhibiční efekt S-nitrosylačních a nitračních činidel. S-nitrosylovány byly cysteiny v pozicích 68 a 197, nitrace probíhala u tyrosinů v polohách 213, 292 a 345 (obr. 10). Dle počítačového modelu způsobuje nitrace tyrosinu 345 inhibici enzymové aktivity. Připravená mutantní forma enzymu Y345F pak byla netečná vůči působení nitračního činidla. Tyrosin 345 se nachází v blízkosti histidinu 313, který je zapojený v navázání NAD(P), nitrace tyrosinu tedy pravděpodobně znemožňuje navázání tohoto kofaktoru. Cystein 68 je vysoce konzervovaný u rostlinných MDHAR, a proto patrně dochází k regulaci enzymové aktivity S-nitrosylací právě v této pozici (Begara-Morales *et al.*, 2015).



Obr. 10: Počítačový model monodehydroaskorbátreduktasy z *Pisum sativum*. V modelu enzymu jsou označeny kofaktory FAD a NAD⁺. Zvýrazněna jsou také cysteinová a tyrosinová residua, u nichž dochází k S-nitrosylaci, resp. k nitraci (převzato z Begara-Morales *et al.*, 2015).

2.2.1.3 Dehydroaskorbátreduktasa

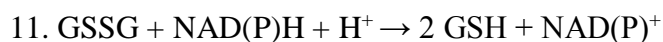
Dehydroaskorbátreduktasa (DHAR) je enzym o molekulové hmotnosti 23 kDa schopný katalyzovat reakci podle rovnice 9. Dehydroaskorbát vzniká spontánní disproportionací monodehydroaskorbátu (rovnice 10). Monodehydroaskorbát je nestabilní radikál, a proto probíhá jeho disproportionace velmi rychle, rychlost této přeměny navíc roste s klesajícím pH v buňce (Asada, 1999).



DHAR je inhibována S-nitrosylací. Touto posttranslační modifikací jsou ovlivněny cysteiny 20 a 147, které jsou klíčové pro katalytickou aktivitu enzymu (Kato *et al.*, 2013).

2.2.1.4 Glutathionreduktasa

Glutathionreduktasa (GR) je flavoproteinová oxidoreduktasa, která je klíčová pro udržení stálé hladiny redukovaného glutathionu v buňkách (rovnice 11). Enzym je lokalizován především v chloroplastech, menší množství se nachází také v cytosolu, mitochondriích a peroxisomech (Edwards *et al.*, 1990). GR byla izolována z mnoha rostlinných druhů jako 100-120 kDa homodimer s molekulovou hmotností podjednotek v rozmezí 53-59 kDa (Romero-Puertas *et al.*, 2006).



Rostlinná GR není významně ovlivněna S-nitrosylací ani nitrací (Begara-Morales *et al.*, 2015).

2.3 Elicitiny

Elicitiny jsou proteinové elicitory původem z organismů rodu *Phytophthora* a *Pythium*. Tyto malé 10 kDa proteiny jsou schopné vázat steroly a mastné kyseliny (Mikes *et al.*, 1998). Jejich společným znakem je konzervovaná doména složená z 98 aminokyselin. Ta je zpevněna třemi disulfidickými můstky a je charakteristická vysokým zastoupením aminokyselin serinu a threoninu, které tvoří až 30 % z celkového počtu aminokyselin. Elicitiny neobsahují tryptofan, histidin, arginin a signální peptid, který je posttranslačně odstraněn. Elicitiny se vážou na specifická vazebná místa na cytoplasmatické membráně (Bourque *et al.*, 1998). Tyto proteiny jsou rozpoznávány některými rostlinami z čeledi lilkovitých, brukvovitých, bobovitých, révovitých a dalších (Derevnina *et al.*, 2016). U tabáku pak elicitory mohou vyvolat různě intenzivní hypersenzitivní reakci (HR) a systémově získanou resistenci (Pernollet *et al.*, 1993).

Elicitiny jsou děleny do tří tříd (tab. 1). První třída zahrnuje elicitory, které obsahují přesně 98 aminokyselin, a je dále dělena na dvě podtřídy. Elicitiny podtřídy Ia jsou kyselé, což je způsobeno menším počtem bazických aminokyselin ve struktuře (2-4 lysiny). Naopak elicitory podtřídy Ib jsou bazické a obsahují 6-7 lysinů. Tyto podtřídy se liší také nekrotickou aktivitou, kdy Ib elicitory jsou mnohem efektivnější při indukci nekrózy než elicitory Ia. Rozdílné schopnosti elicitinů indukovat obrannou reakci jsou spojeny s jejich celkovým elektrickým nábojem, který je ovlivněn zejména pozicí 13 v polypeptidovém řetězci. Vysvětlení je takové, že u elicitinů s kyselým pI je patrně omezená difuze při fyziologickém pH buněčné stěny rostlinné buňky, které se pohybuje okolo 5,8. Elicitiny I třídy jsou poměrně dobře rozpustné ve vodě (až přes 150 mg/ml; Boissy *et al.*, 1999). Do třídy II patří velmi kyselé elicitory s krátkým C-terminálním koncem. Elicitinům podobné proteiny obsahují kromě konzervované domény také C-konec o velikosti 65-101 aminokyselin a jsou řazeny do třídy III (Kamoun *et al.*, 1997a). Dle fylogenetické příbuznosti mohou být elicitory rozděleny do 17 skupin (Jiang *et al.*, 2006a).

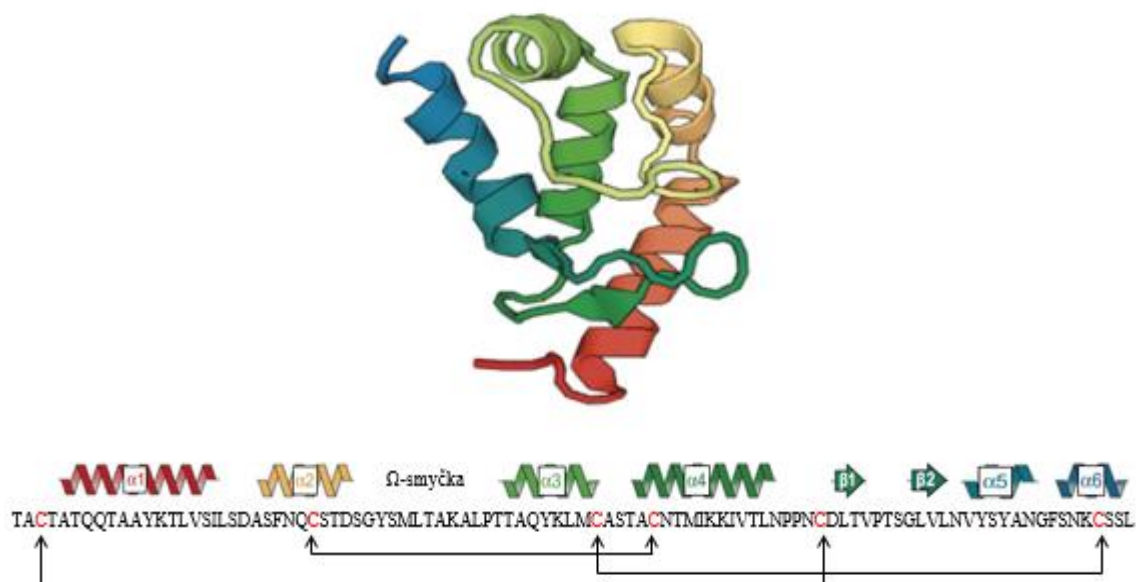
Tab. 1: Jednotlivé třídy elicitinů a jejich charakteristika (převzato z Oswald *et al.*, 2014).

Třída	Počet aminokyselin	Charakteristika	Isoelektrický bod	Zástupce
I α	98	Pozice 13: valin (hydrofobní)	Kyselý (4-5)	Infestin
I β	98	Pozice 13: lysin (hydrofilní)	Bazický (7,5-8,5)	Kryptogein
II	103-104		Velmi kyselý (3,5)	HAE1-cin
III	163-199		Kyselý	Y-megaspermin

2.3.1 Kryptogein

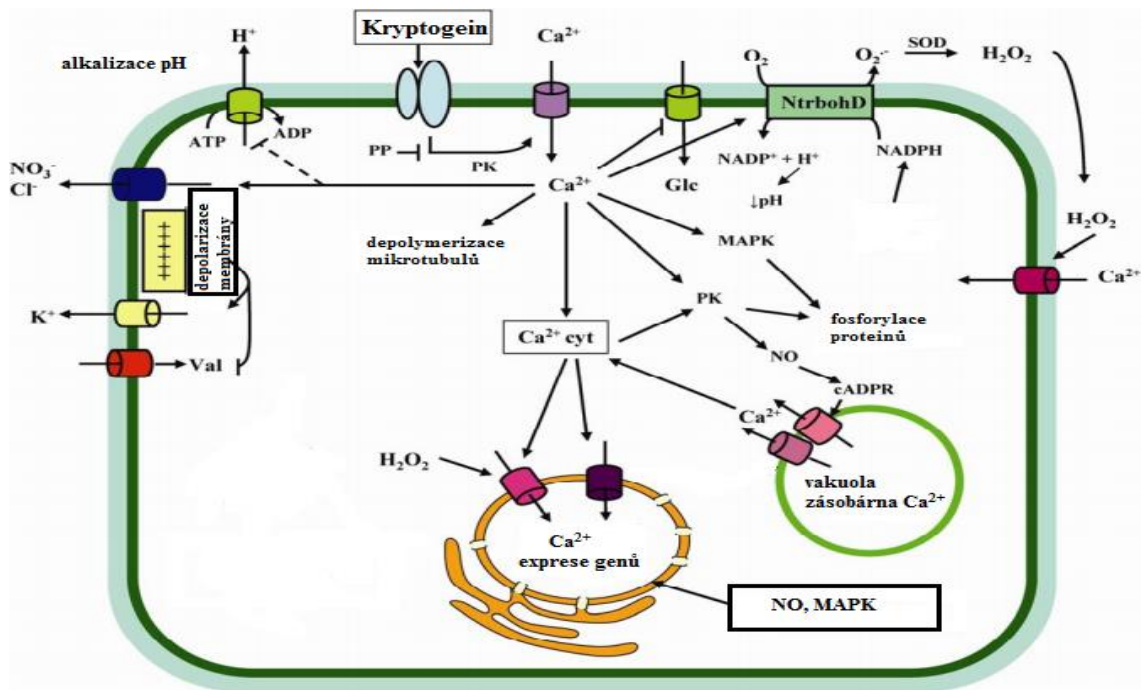
Kryptogein (Cry) je globulární bazický protein produkovaný patogenem *Phytophthora cryptogea*. Jeho molekulová hmotnost je dle MALDI-MS 10 386 kDa. Výsledky z rentgenostrukturní analýzy a NMR tohoto proteinu ukazují, že jeho struktura je tvořena 6 α -helixy, které jsou tvořeny aminokyselinami v pozicích 5-18, 22-30, 44-51, 54-66, 84-89 a 92-97, dvouvláknovým antiparalelním β -skládaným listem (aminokyseliny v pozicích 73-75 a 80-82) a Ω -smyčkou (pozice 33-42; obr. 11). α -helixy tvoří přibližně 56 % celkové struktury Cry. Ve středu proteinu se nachází hydrofobní dutina, která je propojena s povrchem prostřednictvím tunelu. Helixy jsou soustředěny pouze na jedné straně molekuly a vytváří strukturu podobnou opasku. Ω -smyčka a β -skládaný list jsou provázány dvěma vodíkovými můstky a vytváří strukturu podobnou zobáku, která je mezi elicitiny vysoce konzervovaná a je významná pro stabilitu proteinu. Celková struktura je zpevněna také třemi disulfidickými můstky. Kryptogein obsahuje také solný můstek mezi D21-K62, který váže krátkou smyčku mezi helixy 1 a 2 s helixem 4 (Boissy *et al.*, 1996; Fefeu *et al.*, 1997).

Kryptogein je schopný vázat do své hydrofobní dutiny steroly, dokáže je také přenášet přes lipidové membrány (Mikes *et al.*, 1997), může dále vázat také mastné kyseliny (Osman *et al.*, 2001a). Zároveň dokáže odebírat steroly přímo z cytoplazmatické membrány tabákových buněk (Vauthrin *et al.*, 1999). Kryptogein je schopen vytvářet funkční homodimer, který je méně biologicky aktivní (Uhlíková *et al.*, 2016).



Obr. 11: Struktura kryptogeinu. Tento globulární protein je tvořen 6 α -helixy, dvouvláknovým antiparalelním β -skládaným listem a Ω -smyčkou. Struktura je zpevněna disulfidickými můstky, které jsou označeny šipkami. Cysteiny tvořící disulfidické můstky jsou zvýrazněny červeně (převzato z Derevnina *et al.*, 2016).

Kryptogein se váže na 162 a 50 kDa N-glykoproteiny v cytoplazmatické membráně tabákových buněk (Bourque *et al.*, 1999). Po rozpoznání kryptogeinu specifickými receptory v tabákových buňkách dochází k aktivaci proteinkinas. To vede k influxu Ca^{2+} iontů, které aktivují produkci ROS prostřednictvím NADPHoxidas (obr. 12). Pozorována je také alkalizace extracelulárního pH (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000). Dochází k akumulaci fosfatidových kyselin, které také aktivují NADPHoxidasu (Cacas *et al.*, 2016). Kryptogein indukuje také eflux aniontů, který způsobuje depolarizaci cytoplazmatické membrány, což vede k inhibici transportérů aminokyselin (Pugin *et al.*, 1997). Pozorována je také Ca^{2+} -dependentní inhibice transportu glukosy (Bourque *et al.*, 2002). Vlivem kryptogeinu dochází k produkci oxidu dusnatého a peroxodusitanu. ROS spolu s oxidem dusnatým mohou spouštět buněčnou smrt (Kulik *et al.*, 2015). Aktivována je také MAPK signální dráha (Lamotte *et al.*, 2004). V tabákových buňkách dochází vlivem kryptogeinu k akumulaci fytoalexinu kapsidiolu a k expresi obranných genů (Plešková *et al.*, 2011). Kryptogein způsobuje zvýšení fluidity a organizovanosti plasmatické membrány (Gerbeau-Pissot *et al.*, 2014). Kryptogein je schopný indukovat HR a systémově získanou resistenci (SAR) v rostlinách tabáku (Ricci, 1997). Transgenní rostliny tabáku exprimující kryptogein pod inducibilním promotorem jsou více resistantní proti některým houbovým patogenům (Keller *et al.*, 1999).



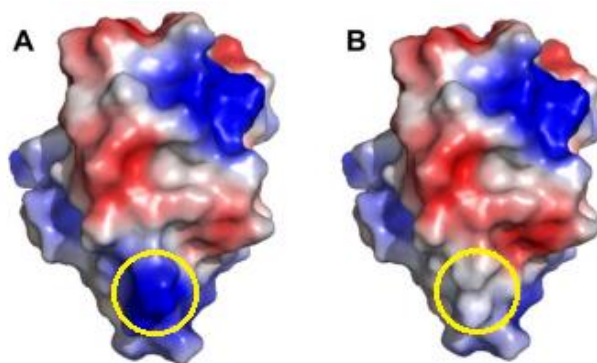
Obr. 12: Přenos signálu v tabákových buňkách po aplikaci kryptogeinu. Po navázání kryptogeinu na receptor jsou inhibovány proteinfosfatasy (PP) a aktivovány proteinkinasy (PK). To vede k influxu vápenatých iontů. Ca^{2+} ionty inhibují transport glukosy (Glc) a aktivují enzym NADPHoxidasu (NtrBOHD) zodpovědný za produkci reaktivních forem kyslíku. Dále dochází k aktivaci mitogenem-aktivované proteinkinasové signální dráhy (MAPK). Pozorován je eflux aniontů a K^+ iontů, depolarizace membrány, depolymerace mikrotubulů, inhibice transportu aminokyselin, alkalizace extracelulárního pH a pokles intracelulárního pH. Prostřednictvím cyklické ADP-ribosy (cADPR) dochází k vyplavení Ca^{2+} iontů z vakuol. Spuštěna je exprese obranných genů (převzato z Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

2.3.1.1 Modifikace ve struktuře kryptogeinu

Studie zaměřené na mutantní formy kryptogeinu měly za cíl odhalit vztah mezi strukturou a biologickým účinkem kryptogeinu, jakožto modelového elicitinu třídy β . Transgenní rostliny produkující mutantní elicitin s vhodnými vlastnostmi pod inducibilním promotorem by mohly být využívány v zemědělství pro zvýšení rezistence proti napadení patogenem. Vhodnými kandidáty pro takovouto transformaci by mohl být například lilek brambor či další rostliny z čeledi lilkovitých, jejichž zemědělská produkce je často decimována patogenem *Phytophthora infestans*.

Ve studii Boissy *et al.*, 1999 byl připraven mutantní kryptogein T1G/A2T/K13H. Tento protein byl krystalován spolu s navázaným ergosterolem uvnitř dutiny. Mutací došlo ke zvětšení hydrofobní dutiny uvnitř proteinu, což bylo způsobeno vystoupením Y87 na povrch proteinu. U tohoto mutantu byla pozorována mírně zvýšená nekrotická aktivita u rostlin tabáku ve srovnání s kryptogeinem.

Některé práce se zaměřily na studium mutantní formy kryptogeinu K13V. Pozice 13 je charakteristická pro I β a I α elicitory a koreluje s jejich nekrotickou aktivitou. Záměna lysinu za valin v této pozici vede ke snížení pI proteinu. Tento mutant má výrazně nižší nekrotickou aktivitu ve srovnání s kryptogeinem (O'Donohue *et al.*, 1995). Mutace vede také k nižší produkci ROS, alkalizace apoplastu tabákových buněk je mírně intenzivnější (Hirasawa *et al.*, 2004). Mutant vykazuje také 2x nižší schopnost vázat steroly a mastné kyseliny. Jeho schopnost přenášet steroly je až 5x nižší a mastné kyseliny nejsou tímto proteinem přenášeny vůbec. V rostlinách tabáku je po aplikaci K13V pozorována méně výrazná indukce SAR proti houbovému patogenu *P. parasitica*, resistance proti bakteriálnímu napadení je však podobná jako při použití kryptogeinu. Po aplikaci K13V dochází k méně intenzivní expresi obranných genů a produkci tabákového fytoalexinu kapsidiolu. Lysin 13 tedy hraje klíčovou roli při přenosu sterolů a mastných kyselin přes membránu, jeho úloha při vázání sterolů je méně významná. K poklesu schopnosti přenášet steroly dochází patrně proto, že záměna v mutantu vede ke ztrátě kladného povrchového náboje v místě mutace a protein tak nemůže správně interagovat s cytoplasmatickou membránou (obr. 13; Plešková *et al.*, 2011).



Obr. 13: Povrchový náboj kryptogeinu a mutantu K13V. Pozice 13 je označena žlutým kruhem. Modrá barva značí kladný povrchový náboj, červená záporný a šedá neutrální. A: model kryptogeinu – povrch proteinu v místě K13 má kladný náboj. B: model mutantu K13V – povrch má ve vyznačené části proteinu neutrální náboj. Pro sestavení modelů byl použit program PyMol v0.99 (převzato z Plešková *et al.*, 2011).

Dále byli studováni také mutanti Y47F, Y47G a Y87F. Residuum tyrosinu 47 vytváří vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou sterolu, dochází také k interakci aromatických kruhů. Náhrada tyrosinu za glycin resp. fenylalanin vede k zániku vodíkového můstku a menší stabilitě komplexu sterol-protein. Při vzniku komplexu protein-sterol dochází k vychýlení tyrosinu 87 z hydrofobní dutiny na povrch proteinu. Tyrosin může být vystaven vodnému prostředí na povrchu molekuly, protože obsahuje hydrofilní hydroxylovou skupinu. Tato aminokyselina byla nahrazena fenylalaninem. Při navázání sterolu do mutantního proteinu Y87F vzniká díky mutaci sterické tření, což vede k nízké stabilitě tohoto komplexu. Ve srovnání s kryptogeinem byla schopnost mutantů vázat steroly nižší, a to v pořadí Y47F, Y47G a Y87F, ve stejném pořadí klesala také schopnost vázat se na cytoplazmatickou membránu tabákových buněk. Mutantní proteiny způsobily u tabákových buněk slabší influx Ca^{2+} iontů a mírnější alkalizaci pH ve srovnání s wild-type kryptogeinem. V rostlinách tabáku pak mutanti vykazovali nižší nekrotickou aktivitu a menší schopnost indukovat SAR (Osman *et al.*, 2001b).

V práci Lochman *et al.*, 2005 byli vytvořeni mutanti, u nichž byly zaměněny aminokyseliny tvořící hydrofobní dutinu proteinu – L15, L19, M35, L36, M59 a I63 (tab. 2). Po navázání sterolu dojde k mírné rotaci leucinu 15. Záměna za tryptofan rotaci znemožní. Leucin 19 vytváří hydrofobní interakci s lysinem 36. Záměna za arginin způsobí změnu elektrostatického náboje v místě mutace a také zvýšení pI proteinu. Leucin 36 vytváří hydrofobní interakce se steroly. Methioniny 35 a 59 po vazbě sterolu rotují a ovlivňují tak velikost hydrofobní dutiny. Isoleucin 63 je konzervován mezi všemi elicitinými a interaguje se steroly. Neprokázal se žádný vztah mezi schopností elicitinů vázat steroly s jejich schopností vyvolat obrannou reakci u rostlin.

Prozkoumány byly také kryptogeiny L41F, V84F, L41F/V84F a L80F/V84F se záměnou v pozicích, které se nacházejí v hydrofobní dutině proteinu a ovlivňují vazbu sterolů. Dle počítačových modelů by záměna leucinu 41 a 80 za objemnou hydrofobní aminokyselinu měla vést k preferenci kryptogeinu vázat steroly. Naopak záměna valinu 84 povede k preferenci vázat mastné kyseliny (Dobeš *et al.*, 2004). Připravené mutantní proteiny nevykazovaly žádnou nebo sníženou schopnost vázat a přenášet mastné kyseliny a steroly (tab. 2). Všechny mutantní kryptogeiny pak byly méně nekroticky aktivní a vedly k mírnější akumulaci kapsidiolu a ROS. Zajímavé vlastnosti měl mutant V84F, který i přes neschopnost vázat steroly indukoval u tabáku produkci ROS a resistenci proti patogenu téměř na stejné úrovni jako kryptogein. To je patrně způsobeno jeho vysokou

afinitou ke specifickým vazebným místům na membráně, která je podobná jako u kryptogeinu a která je v případě zbylých mutantů mnohem nižší (Dokládal *et al.*, 2012).

Kryptogein obsahuje šest lysinových residuí, které jsou zodpovědné za bazický charakter proteinu. Uhlíková *et al.*, 2016 se zabývala úlohou těchto lysinů v biologické aktivitě kryptogeinu. Proto byly připraveny mutantní proteiny, u nichž byly zaměněny lysiny 39, 48, 61, 94 za aminokyseliny, které se nacházejí v těchto pozicích u I α elicitinů (tab. 2). Všechny z mutantů vykazovaly nižší schopnost přenášet steroly, výjimkou byl K94T, který měl tuto schopnost větší. Byla prokázána souvislost mezi schopností mutantů vázat se na molekuly LTP (lipidy přenášející proteiny) a jejich schopností indukovat nekrózu a SAR. I v tomto případě nebyl prokázán vztah mezi vazebnou kapacitou pro steroly a biologickou aktivitou. Ukázalo se také, že nekrotická aktivita elicitinů roste se vzrůstajícím pI.

Tab. 2: Modifikace ve struktuře kryptogeinu a jejich vliv na schopnost elicítace. ↓ - nižší hodnota, ↓↓ - výrazně nižší hodnota, ↑ - vyšší hodnota, = - stejná hodnota, # - nemá tuto vlastnost. LTP – lipidy přenášející proteiny, NA - nekrotická aktivita, ROS - reaktivní formy kyslíku, SAR - systémově získaná rezistence.

Mutace	Strukturní vlastnosti (ve srovnání s kryptogeinem)	Biologická aktivita (ve srovnání s kryptogeinem)	Zdroj
K13V	↓ pI, změna povrchového náboje v místě mutace, ↓ vazba sterolů, ↓ přenos sterolů přes membránu	↑ alkalizace extracelulárního pH, ↓↓ produkce ROS a NA, ↓ akumulace kapsidiolu, ↓ indukce SAR, ↓ exprese obranných genů	O'Donohue <i>et al.</i> , 1995; Hirasawa <i>et al.</i> , 2004; Plešková <i>et al.</i> , 2011
T1G/ A2T/ K13H	Menší konformační změna v Ω-smyčce, zvětšení dutiny uvnitř proteinu	↑ NA	Boissy <i>et al.</i> , 1999
Y47F	Nevzniká vodíková vazba mezi sterolem a fenylalaninem 47, ↓ vazba sterolů	↓ alkalizace extracelulárního pH, ↓ influx Ca ²⁺ iontů, ↓ indukce SAR, = NA	Osman <i>et al.</i> , 2001b
Y47G	Nevzniká vodíková vazba mezi sterolem a glycinem 47, ↓ vazba sterolů	↓ alkalizace extracelulárního pH, ↓ influx Ca ²⁺ iontů, ↓↓ indukce SAR, ↓ NA	
Y87F	Nemožnost vychýlení fenylalaninu 87 směrem ven z hydrofobní dutiny po navázání sterolu, ↓↓ vazba sterolů	# influx Ca ²⁺ iontů, # alkalizace extracelulárního pH, ↓ indukce SAR, ↓ NA	
N93A	Destabilizace lysinu 94 a ovlivnění tyrosinu 47, který tvoří vodíkovou vazbu se steroly, ↓ vazba sterolů	↓ produkce ROS, ↓ alkalizace extracelulárního pH, ↓ NA	Hirasawa <i>et al.</i> , 2004
M35W/ M59W/ I63F	Velké sterické bránění uvnitř proteinu, tím dochází k odpuzování fenylalaninu 63, valinu 84 a zvětšení hydrofobní dutiny, ↑ vazba sterolů, ↓ vazba mastných kyselin	= produkce ROS, = alkalizace extracelulárního pH, ↓ NA	Lochman <i>et al.</i> , 2005
L15W/ L36F	Částečné uzavření vstupního tunelu do hydrofobní dutiny, Neváže steroly ani mastné kyseliny	↓↓ produkce ROS, ↓ alkalizace extracelulárního pH, ↑ NA	
M35F/ M59W	Menší hydrofobní dutina, ↓ vazba sterolů, ↓ vazba mastných kyselin	↓ produkce ROS, = alkalizace pH, ↓ afinita k specifickým receptorům na membráně, ↓ NA	Lochman <i>et al.</i> , 2005; Svozilová <i>et al.</i> , 2009
M35W/ M59W	Menší hydrofobní dutina, # vazba sterolů, ↓ vazba mastných kyselin	↓↓ produkce ROS, ↓ alkalizace extracelulárního pH, ↓ afinita k specifickým receptorům na membráně, ↓ NA	

L19R	↑ pI, změna elektrostatického náboje v místě mutace, # vazba sterolů, ↓ vazba mastných kyselin	# produkci ROS, alkalizaci pH, ↓↓ afinita k specifickým receptorům na membráně, ↑ NA	
L41F	Prodloužení β-vlákna, L41 je vysoce konzervován a je klíčový pro vazbu na vysokoafinitní místo na membráně, = přenos sterolů přes membránu, = vazba sterolů	↓ afinita k specifickým receptorům na membráně, # akumulace kapsidiolu, ↓ produkce ROS, ↓ NA, ↓ indukce SAR	Dokládal <i>et al.</i> , 2012; Sandor <i>et al.</i> , 2016
V84F	↓ přenos sterolů přes membránu, # vazba sterolů	= afinita k specifickým receptorům na membráně, ↓ akumulace kapsidiolu, = produkce ROS, = indukce SAR, ↓ NA	
L41F/ V84F	Prodloužení β-vlákna, residuum je 41 vysoce konzervováno a je klíčové pro vazbu na vysokoafinitní místo na membráně, ↓ přenos sterolů přes membránu, # vazba sterolů	↓ afinita k specifickým receptorům na membráně, # akumulace kapsidiolu, # produkce ROS, # indukce SAR, ↓ NA	
L80F/ V84F	podobné vlastnosti jako V84F	podobné vlastnosti jako V84F	
K39T	↓ pI, ↓ přenos sterolů přes membránu	↓ NA, = indukce SAR	Uhlíková <i>et al.</i> , 2016
K48T	↓ pI, ↓ přenos sterolů přes membránu	↓ NA, = indukce SAR	
K61T/ N70D/ D73G	↓ pI, ↓ přenos sterolů přes membránu	↓ NA, ↓ indukce SAR	
K94T	↓ pI, ↑ přenos sterolů přes membránu	↓ NA, = indukce SAR, ↓ tvorba heterodimeru s LTP	
K39T/ K94T	↓ pI, ↓ přenos sterolů přes membránu	↓ NA, ↓ indukce SAR, # tvorba heterodimeru s LTP	
K48T/ K94T	↓ pI, ↓ přenos sterolů přes membránu	↓ NA, ↓ indukce SAR, ↓ tvorba heterodimeru s LTP	
K39T/ K48T/ K94T	↓ pI, ↓ přenos sterolů přes membránu	↓ NA, ↓ indukce SAR	

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Biotin (Sigma-Aldrich, Německo), Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Sigma-Aldrich, Německo), D-mannitol (Lach-Ner, Česká republika), difenyljenjodonium chlorid (Sigma-Aldrich, Německo), dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo), dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Německo), dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, Německo), dithiotreitol (Sigma-Aldrich, Indie), ethylendiamintetraacetát sodný (Sigma-Aldrich, Německo), fluorescein diacetát (Serva, USA), GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx, Polsko), GSNO (S-nitrosoglutathion, připraven v laboratoři), hydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Německo), chlorid draselný (Lach-Ner, Česká republika), chlorid hořečnatý (Lach-Ner, Česká republika), chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika), chlorid vápenatý (Lach-Ner, Česká republika), kyselina fosforečná (Lachema, Česká republika), kyselina sírová (Lachema, Česká republika), L-cystein (Sigma-Aldrich, Německo), L-glutamin (LOBA CHEMIE, Rakousko), luminol (Sigma-Aldrich, Německo), MES-hydrát (Sigma-Aldrich, USA), methylenová modř (), N6022 (Cayman Chemical, USA), Murashige-Skoog médium s vitamíny dle Gamborga (Sigma-Aldrich, USA), NADPH (Sigma-Aldrich, Německo), pefabloc (Sigma-Aldrich, Německo), polyvinylpolypyrrolidon (Sigma-Aldrich, Německo), PTIO (Sigma-Aldrich, Německo), sacharosa (Sigma-Aldrich, USA), síran draselný (Lachema, Česká republika), Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Švýcarsko), Tris (Sigma-Aldrich, Německo), Xceed qPCR SG 1-step 2x Mix (Institute of Applied Biotechnologies, Česká republika), XTT (Sigma-Aldrich, Německo), xylenolová oranž (Sigma-Aldrich, Německo).

3.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Denver Summit (Denver Instrument, USA), automatické pipety (Eppendorf, Německo), Gel Doc EZ System (BIO RAD, USA), chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), laminární box Bioban-48 (Vetrotecnica, Itálie), magnetická míchačka (IKA, Německo), mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA), minitřepačka 3-D (BIOSAN, Litva), parní sterilizátor (Tuttnauer, Německo), pH metr WTW 526 (inoLab, Německo), předvážky (KERN, Německo), suchá inkubační lázeň (Major Science, USA), světelný mikroskop

Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko), termocyklér gradientový T100 (BIO RAD, USA), termocyklér CFX96 a analyzátor CFX Touch Real-Time (BIO RAD, USA), třepačka chlazená stolní INNOVA (Eppendorf, Německo), vakuová vývěva D-lab (Edwards, USA), vortex V-1 plus (BIOSAN, Litva).

3.3 Rostlinný materiál

Pro realizaci experimentů týkajících se stanovení nekrotické aktivity elicitinů byly použity dva kultivary rostlin *N. tabacum* cv. Xanthi a *N. tabacum* cv. Samsun. Ostatní experimenty byly realizovány s využitím suspenzní kultury buněk *N. tabacum* cv. Xanthi.

3.3.1 Kultivace rostlinného materiálu

Tabákové suspenzní kultury byly kultivovány při teplotě 25 °C a otáčkách 160 rpm na třepačce. Světelný režim byl nastaven na 24 hodin den/0 hodin noc. Buňky byly kultivovány ve sterilních 250 ml Erlenmayerových baňkách obsahujících 100 ml Murashige-Skoog média (Murashige a Skoog, 1962). Pro zajištění dostatečného množství suspenzí pro experimenty byly buňky pravidelně pasážovány. Pasážování probíhalo za sterilních podmínek ve flowbloxu. Pasážováno bylo vždy 25 ml 7 dní staré buněčné suspenze do čerstvého média. Pro experimenty byly použity buněčné suspenze 4 dny po pasážování, kdy se tabáková suspenzní kultura nacházela v exponenciální fázi růstové křivky.

Rostliny tabáku byly pěstovány v květináčích se zahradnickým substrátem. Část rostlin byla pěstována ve skleníku při teplotě 25 °C a druhá část ve fytotronu při teplotě 25 °C a světelných podmínkách 16 hodin den/ 8 hodin noc. V experimentech byly použity 8týdenní rostliny.

Murashige-Skoog médium: 30 g sacharosu, 200 mg glutaminu a 4,4 g směsi Murashige-Skoog média s vitamíny dle Gamborga rozpustit v 900 ml destilované vody, přidat 10 ml zásobního roztoku vitamínů, 1 ml zásobního roztoku kinetinu a 0,8 ml zásobního roztoku 2,4-D. Upravit pH na 5,5-5,7; doplnit do 1 litru destilovanou vodou. Rozlít po 100 ml do Erlenmayerových baněk (250 ml) a autoklávovat.

Zásobní roztok vitamínů: pantothenát vápenatý ($c_m = 300$ mg/l), glycin ($c_m = 200$ mg/l), kyselina listová ($c_m = 50$ mg/l), biotin ($c_m = 5$ mg/l) ve vodě.

Zásobní roztok kinetinu: kinetin ($c_m = 100$ mg/l) ve vodě.

Zásobní roztok 2,4-D: kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová ($c_m = 220$ mg/l) ve vodě.

3.3.2 Práce s buněčnou suspenzí

Při stanovení viability (kapitola 3.5.3) byla buněčná suspenze rozdělena na alikvoty do 50 ml Erlenmayerových baněk. V případě ostatních experimentů byly buňky odsáty z kultivačního média, zváženy a následně resuspendovány v ekvilibračním médiu v poměru 1 g buněk/10 ml média. Poté byly rozděleny na alikvoty do 50 ml Erlenmayerových baněk a ponechány ekvilibrovat na třepačkách v kultivačních podmínkách po dobu 1 hodiny.

Elicitiny byly k buněčným suspenzím aplikovány tak, aby byla jejich výsledná koncentrace 5 nmol/l. Látky modulující obrannou reakci rostlin (DPI, GSNO, PTIO, N6022) byly přidány vždy 10 minut před přidavkem elicitinů.

Pro experimenty v kapitolách 3.5.4, 3.5.5, 3.5.7 byly použity zamražené a nadrcené tabákové buňky. Buněčné suspenze byly po inkubaci s elicitiny a látkami modulujícími obrannou reakci odsáty od ekvilibračního média a zmrazeny v tekutém dusíku. Poté byly buňky za stálého chlazení tekutým dusíkem nadrceny v třecích miskách a rozděleny na alikvoty do plastových mikrozkušavek. Takto homogenizované buňky byly uchovávány při -80 °C.

Ekvilibrační médium: 175 mmol/l mannitol, 0,5 mmol/l CaCl₂, 0,5 mmol/l K₂SO₄, 2 mmol/l MES-hydrát.

3.4 Elicitiny

V předložené práci jsou sledovány účinky elicitinů infestinu (Inf), kryptogeinu (X24, v textu dále uváděna pouze zkratka Cry) a jejich mutantních forem (Inf V13K/A14T, Inf V84F, Cry K13V a Cry V84F) připravených místně řízenou mutagenezí. Elicitiny byly produkovány do extracelulárního prostředí v kvasinkách *Pichia Pastoris* s použitím vektoru pPIC9 a poskytnuty jako vodné roztoky o koncentracích 0,5 – 1 mg/ml Ústavem Biochemie PřF MU v Brně. Proteiny se od elicitinů izolovaných z patogena liší přítomností sekvence EAEA na N-konci molekuly. Tato sekvence má signální funkci a při sekreci proteinů nedošlo k jejímu odštěpení.

3.5 Experimentální metody

3.5.1 Stanovení nekrotické aktivity elicitinů v listech tabáku

Do 4. listu (počítáno odspodu) 8týdenní rostliny *N. tabacum* cv. Xanthi (nebo cv. Samsun) byl ze spodní strany proveden vpich tenkou jehlou. V místě vpichu byl do listu tlakově aplikován roztok elicitinu (100 nmol/l) pomocí plastové injekční stříkačky. Roztok elicitinu byl aplikován pouze do jednoho ze segmentů listu, který je ohraničený hlavní cévou listu a dvěma postranními cévami, které se nacházejí nad sebou. V případě současné aplikace elicitinu a látky modulující obrannou reakci byl připraven roztok obsahující elicitin a danou látku. Jako kontrola byla do jednoho ze segmentů aplikována pouze voda. Po aplikaci elicitinů byla rostlina dále kultivována po dobu 24 hodin. Poté byl list odříznut a vyfotografován. List byl následně umístěn do kádiny s vodou a pro kontrolu vyfocen po dalších 24 hodinách. Míra nekroz byla stanovena v programu ImageJ porovnáním celkové plochy ošetřeného segmentu a plochy, na které byla patrná nekroza.

3.5.2 Stanovení viability tabákových buněk

3.5.2.1 Kolorimetrická metoda s použitím methylenové modři

Methylenová modř (3,7-bis(dimethylamino)fenazathionium chlorid) je barvivo pronikající do všech buněk. V živých buňkách dochází k jeho přeměně reduktasami za vzniku bezbarvé sloučeniny. V mrtvých buňkách jsou tyto enzymy neaktivní, a proto zůstávají mrtvé buňky po aplikaci barviva modře zbarveny (Kwolek-Mírek a Zadrag-Tecza, 2014).

150 μ l buněčné suspenze bylo pipetováno do mikrozkušavek spolu s 40 μ l zásobního roztoku methylenové modři. Buněčná suspenze s methylenovou modří byla v mikrozkušavkách inkubována 60 minut při laboratorní teplotě. Poté byly zkumavky centrifugovány 10 minut při zrychlení 9000 g. Supernatant byl odstraněn a precipitát obsahující tabákové buňky byl promyt 100 μ l PBS pufru a opět centrifugován. Cyklus promytí a centrifugace byl opakován třikrát. Po poslední centrifugaci bylo k precipitátu přidáno 100 μ l PBS pufru. Mikrozkušavky byly ponechány na ultrazvukové lázni 5 minut pro uvolnění barviva z mrtvých buněk. Vzorek byl naposledy centrifugován 10 minut při 9000 g. 100 μ l supernatantu bylo následně převedeno do jamek mikrotitrační destičky. V jamkách byla měřena absorbance při vlnové délce 610 nm. Vzorky byly měřeny v triplicátu a jako blank pro měření absorbance byl použit PBS pufr.

Pro mikroskopické stanovení viability byly buňky ošetřeny methylenovou modří, jak je uvedeno výše. Buňky nebyly vystaveny působení ultrazvuku. Na podložní sklo bylo pipetováno 100 μ l obarvených tabákových buněk v PBS pufru. Vzorek byl zakryt krycím sklíčkem a pozorován ve světelném mikroskopu.

Zásobní roztok methylenové modři: methylenová modř ($c_m = 0,475$ mg/ml) ve vodě.

PBS pufr: 137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 10,1 mmol/l Na₂HPO₄, 1,8 mmol/l KH₂PO₄, pH = 7,3.

3.5.2.2 Fluorescenční metoda s použitím propidium jodidu

Propidium jodid (PI) je fluorescenční barvivo, které se interkaluje do DNA. PI prostupuje pouze přes cytoplazmatické membrány mrtvých buněk, ve kterých se váže na DNA v jádře. Takto obarvené buňky pak červeně fluoreskují (López-Amorós *et al.*, 1995).

Ke 100 μ l buněčné suspenze v jamkách mikrotitrační destičky pro měření fluorescence bylo přidáno 20 μ l pracovního roztoku PI. Po detekci signálu byla fluorescence proměřena znova po 10minutové inkubaci ve tmě při laboratorní teplotě. Vlnová délka excitace/emise byla 535 nm/617 nm. Vzorky byly měřeny v sextuplikátu a v blanku bylo místo buněčné suspenze použito kultivační médium. Změna životnosti po elicitaci buněk byla vypočtena z rozdílu fluorescenčního signálu před a po 10minutové inkubaci jako relativní hodnota vztážená ke kontrolnímu vzorku.

Pro mikroskopické stanovení viability bylo na podložní sklo pipetováno 100 μ l buněčné suspenze a 20 μ l pracovního roztoku PI. Vzorek byl zakryt krycím sklíčkem a inkubován 5 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Poté byl preparát pozorován ve fluorescenčním mikroskopu.

Pracovní roztok PI: 1 μ l zásobního roztoku PI smíchat s 999 μ l Murashige-Skoog média.

Zásobní roztok PI: PI ($c_m = 10$ mg/ml) v 0,1 mol/l K-fosfátovém pufru (pH = 7,2).

3.5.2.3 Fluorescenční metoda s použitím fluorescein diacetátu

Tato metoda využívá fluorescein diacetátu (FDA), který pasivně proniká přes buněčné membrány. V živých buňkách je deacetylován buněčnými esterasami za vzniku fluoresceinu. Živé buňky pak zeleně fluoreskují (Breeuwer *et al.*, 1995).

Do mikrotitrační destičky pro měření fluorescence bylo pipetováno 100 μ l suspenze tabákových buněk. Po přidavku 10 μ l pracovního roztoku FDA byla měřena fluorescence. Po 10minutové inkubaci buněk ve tmě při laboratorní teplotě byla fluorescence změřena

znova. Vlnové délky excitace/emise byly 488 nm/515 nm. Vzorky byly měřeny v sextuplikátu a v blanku bylo místo buněčné suspenze použito kultivační médium. Změna životnosti vlivem elicitace byla vypočtena z rozdílu fluorescenčního signálu před a po 10minutové inkubaci jako relativní hodnota vztažená ke kontrolnímu vzorku.

Pro mikroskopické stanovení viability bylo na podložní sklo pipetováno 100 μl buněčné suspenze a 10 μl pracovního roztoku FDA. Vzorek byl zakryt krycím sklíčkem a inkubován 5 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Poté byl preparát pozorován ve fluorescenčním mikroskopu.

Pracovní roztok FDA: 10 μl zásobního roztoku FDA s 990 μl kultivačního média.

Zásobní roztok FDA: FDA ($c_m = 5 \text{ mg/ml}$) v acetonu.

3.5.3 Stanovení produkce ROS v tabákových buňkách

3.5.3.1 Metoda využívající luminolu

Luminol je oxidován ROS, přičemž dochází k uvolnění světla. V intervalech 15-30 minut byly 135 μl alikvoty buněčné suspenze přidány ke 140 μl reakčního pufru v bílé mikrotitrační destičce pro měření chemiluminiscence. V blanku bylo místo buněčné suspenze použito ekvilibrační médium. Reakce byla zahájena aplikací 25 μl pracovního roztoku luminolu pomocí automatického nástřiku (rychlost průtoku kapilárou byla 250 $\mu\text{l/s}$) v mikrodestičkovém readeru. V jamkách pak byla měřena chemiluminiscence. Měření vzorků probíhalo v duplikátu.

Reakční puf: 175 mmol/l mannitol, 0,5 mmol/l CaCl_2 , 0,5 mmol/l K_2SO_4 , 50 mmol/l MES-hydrát, pH = 6,5.

Pracovní roztok luminolu: 0,3 mmol/l luminol v reakčním pufru.

Zásobní roztok luminolu: 30 mmol/l luminol v DMSO.

3.5.3.2 Metoda využívající xylenolovou oranž

Tato metoda je založena na schopnosti ROS oxidovat železnaté ionty na železité. Vznikající železité ionty vytváří v kyselém prostředí s xylenolovou oranží barevný komplex, který je detekován spektrofotometricky.

V intervalech 15-30 minut byly odebírány do mikrozkušavek 300 μl alikvoty buněčných suspenzí. Suspenze byla centrifugována 15 sekund při 16000 g. Poté bylo převedeno 50 μl supernatantu do mikrozkušavek obsahujících 500 μl reakčního pufru. Směs byla inkubována 30 minut. Následně bylo 100 μl směsi převedeno do jamky

mikrotitrační destičky a na mikrodestičkovém readeru byla měřena absorbance při 560 nm. Jako blank bylo použito 100 μ l ekvilibračního média. Měření vzorků probíhalo v duplikátu (Bindschedler *et al.*, 2001).

Reakční pufr: 1 ml zásobního roztoku Fe^{2+} iontů smíchat s 100 ml roztoku xylenolové oranže.

Zásobní roztok Fe^{2+} iontů: 25 mmol/l $FeSO_4$, 25 mmol/l $(NH_4)_2SO_4$ v 2,5 mol/l H_2SO_4 .

Roztok xylenolové oranže: 125 μ mol/l xylenolová oranž, 100 mmol/l sorbitol.

3.5.3.3 Metoda využívající fluorescenční sondy

Tato metoda používá fluorescenční sondu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetát (H_2DCFDA). Jedná se o nepolární sloučeninu, která difunduje přes cytoplazmatickou membránu buněk. V cytoplazmě je deacetylována buněčnými esterasami za vzniku polární sloučeniny 2',7'-dichlorodihydrofluoresceinu (H_2DCF), která přes membrány neprostupuje. H_2DCF je oxidován intracelulárními ROS za vzniku fluoreskující sloučeniny 2',7'-dichlorofluoresceinu (DCF). Tato sonda reaguje nespecificky s celou řadou ROS. Vlnové délky excitace/emise jsou 490/515 nm (Crow, 1997).

Do mikrotitrační destičky pro měření fluorescence bylo pipetováno 100 μ l suspenze tabákových buněk. Po přidavku 5 μ l pracovního roztoku H_2DCFDA byla měřena fluorescence v 5minutových intervalech po dobu 90 minut. Vlnové délky excitace/emise byly 490 nm/515 nm. Vzorky byly měřeny v sextuplikátu a v blanku bylo místo buněčné suspenze použito ekvilibrační médium. Míra nárůstu fluorescenčního signálu ukazuje na schopnost buněk produkovat ROS v daném časovém intervalu.

Pracovní roztok H_2DCFDA : 168 μ mol H_2DCFDA v ekvilibračním médiu.

3.5.4 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy

3.5.4.1 Příprava extraktu

Do mikrozkušavek s 300 mg nadrcených a zmražených tabákových buněk bylo pipetováno 1,2 ml ledového extrakčního pufru. Vzorky byly promíchány, na 1 minutu umístěny do ultrazvukové lázně a ponechány na ledu 10 minut. V dalším kroku byly vzorky centrifugovány 10 minut při zrychlení 15000 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl převeden do čistých mikrozkušavek a ponechán na ledu pro stanovení aktivity askorbátperoxidasy.

Extrakční pufr: 0,1 mol/l K-fosfátový pufr (pH = 7,0), 2 mmol/l EDTA-Na⁺, 1 % PVPP (w/v), 2 mmol/l DTT, 0,5 mmol/l pefabloc.

3.5.4.2 Spektrofotometrické měření aktivity

Do jamek mikrotitrační destičky bylo postupně pipetováno 150 μ l reakčního pufru, 40 μ l 1,75 mmol/l askorbátu, 50 μ l extraktu a 50 μ l 10 mmol/l peroxidu vodíku. Jako poslední byl do jamek přidán vždy peroxid vodíku. Byl sledován pokles absorbance při vlnové délce 290 nm a teplotě 30 °C po dobu 2 minut v 10sekundových intervalech. Vzorky byly měřeny v triplicátu. V blanku byl místo extraktu použit reakční pufr. Extrakty byly pro potřeby měření ředěny v reakčním pufru 10 - 20krát. Molární extinkční koeficient pro askorbát je 2,8 mmol⁻¹*cm⁻¹.

Reakční pufr: 0,1 mol/l K-fosfátový pufr (pH = 7,0), 2 mmol/l EDTA-Na⁺.

3.5.5 Stanovení aktivity NADPHoxidasy

NADPHoxidasa je membránový enzym katalyzující redukci molekulárního kyslíku na superoxidový radikál za přítomnosti NADPH. Metoda pro stanovení aktivity tohoto enzymu využívá schopnosti vznikajícího superoxidového radikálu (O₂⁻) redukovat tetrazoliové barvivo 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid (XTT) za vzniku žlutě zbarveného formazanu (Kaundal *et al.*, 2012).

3.5.5.1 Příprava extraktu

K 500 mg nadrcených a zmražených tabákových buněk v mikrozkušavkách bylo přidáno 1,4 ml ledového extrakčního pufru. Mikrozkušavky byly krátce vortexovány a poté ponechány 20 minut na ledu. Vzorky byly centrifugovány při 4 °C po dobu 45 minut při zrychlení 10000 g. Z mikrozkušavek byl převeden supernatant do centrifugačních kyvet. Vzorky v kyvetách byly centrifugovány při 4 °C po dobu 1 hodiny při zrychlení 203000 g. Supernatant byl následně odstraněn. Precipitát obsahující membránovou frakci proteinů byl resuspendován v 170 μ l ledového 10 mmol/l Tris-HCl pufru (pH = 7,4) a převeden do čistých mikrozkušavek. Takto připravené vzorky byly uchovávány na ledu a ihned použity pro měření aktivity NADPHoxidasy.

Extrakční pufr: 0,25 mol/l sacharosa, 50 mmol/l HEPES, 3 mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 3,6 mmol/l L-cystein, 0,1 mmol/l MgCl₂, 0,6 % PVPP (w/v), tablety Complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (poměr 100 tablet na litr pufru).

3.5.5.2 Spektrofotometrické měření aktivity

Do jamek mikrotitrační destičky byly pipetovány jednotlivé složky dle tab. 3. Jako poslední byl do jamek přidán roztok XTT. V jamkách byla měřena absorbance při vlnové délce 492 nm a teplotě 30 °C po dobu 20 minut v 40sekundových intervalech. Vzorky byly měřeny v triplikátu. V jamkách může docházet k redukci XTT vlivem membránové frakce i bez přítomnosti NADPH jako substrátu. Proto byly při měření použity 2 blanky – jeden, který neobsahuje NADPH a další, který neobsahuje vzorek. Molární extinční koeficient pro XTT formazan je $2,16 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Tab. 3: Složky reakční směsi pro stanovení aktivity NADPHoxidasy.

Složka	Blank 1	Blank 2	Vzorek
1 mol/l Tris-HCl, pH = 7,5	17,5 μl	17,5 μl	17,5 μl
1 mmol/l XTT	125 μl	125 μl	125 μl
1 mmol/l NADPH	25 μl	---	25 μl
Voda	82,5 μl	102,5 μl	77,5 μl
Membránová frakce	---	5 μl	5 μl

3.5.6 Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 45 μ l destilované vody, 5 μ l extraktu a 200 μ l Bradfordova činidla. Vzorky v jamkách byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byla měřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Vzorky byly měřeny v triplicátu. V blanku byla místo extraktu použita destilovaná voda. Výsledná koncentrace proteinu byla vypočtena z rovnice kalibrační přímky, která byla sestavena z absorbancí vzorků BSA o koncentracích 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 mg/ml (Bradford, 1976).

Bradfordovo činidlo: zředit zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue destilovanou vodou v poměru 1:4 (v/v).

Zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue: 50 mg Coomasie Brilliant Blue G-250, 25 ml 95 % methanol, 50 ml 85 % kyselina fosforečná.

3.5.7 Stanovení exprese NADPHoxidasy

3.5.7.1 Izolace a purifikace RNA

Pro izolaci a purifikaci RNA byl použit GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx). K 100 mg nadrcených a zmražených buněk bylo přidáno 200 μ l LG pufru a 100 μ l RL pufru. LG a RL pufr byly předem smíchány s β -merkapt ethanolem v poměru 100:1. Po přidání stabilizačních pufrů byly vzorky vortexovány 1 minutu a poté centrifugovány při 16000 g po dobu 4 minut. 200 μ l supernatantu bylo převedeno do nových sterilních mikrozkrumavek a k nim přidáno 200 μ l RL pufru. Vzorky byly následně převedeny na žluté kolonky a centrifugovány 2 minuty při 16000 g. K eluátu bylo přidáno 300 μ l ethanolu (96%) a směs byla nanesena na bílé kolonky vázající RNA. Vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 11000 g. Dále bylo na kolonky pipetováno 400 μ l Wash DN1 pufru a proběhla centrifugace 1 minutu při 11000 g. Pro zvýšení čistoty izolované RNA bylo po odlití eluátu na kolonky aplikováno 50 μ l roztoku DNasy I, který byl připraven smísením DNR pufru a zásobního roztoku DNasy I v poměru 50:1. Kolonky s DNasou byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě. Na kolonky bylo naneseno 400 μ l Wash RB1 pufru a proběhla centrifugace 1 minutu při 11000 g. Kolonky byly ještě dvakrát promyty a to nejprve 650 μ l Wash RBW pufru (následovala centrifugace 1 minutu při 11000 g) a poté 350 μ l Wash RBW pufru (následovala centrifugace 2 minuty při 11000 g). Na kolonky bylo naneseno 50 μ l RNase-free vody.

Při centrifugaci 1 minutu při 11000 g došlo k eluci RNA z kolonek. Takto připravené roztoky RNA byly uchovávány při teplotě -80 °C.

3.5.7.2 Měření koncentrace a čistoty RNA

Koncentrace a čistota RNA byly měřeny spektrofotometricky na readeru Synergy H1 s využitím destičky Take3. Byla sledována absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm ve 2 µl vzorků na destičce. Jako blank byla použita sterilní voda a měření vzorků probíhalo v duplikátu. Pro automatický výpočet koncentrace RNA v programu Gene5 je využita absorbance vzorků při 260 nm. Čistota RNA je hodnocena podle poměru A_{260}/A_{280} . Pokud je poměr větší než 2, je RNA ve vzorcích dostatečně přečištěna.

3.5.7.3 Reverzní transkripce

Pro reversní transkripci mRNA na cDNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche). Byla připravena směs o celkovém objemu 11,4 µl, která obsahovala 1 µg izolované RNA, 1 µl Anchored-oligo (dT)18 primeru (50 µmol/l) a RNase-free vodu. Směs byla inkubovaná v termostatu při teplotě 65°C po dobu 10 minut a poté chlazená na ledu. Dále byla ke vzorkům přidána směs o objemu 8,6 µl (4 µl 5x reakční pufr, 0,5 µl Protector RNase inhibitor, 2 µl dNTP mix, 1 µl DTT a 1,1 µl reverzní transkriptasa). Následovala inkubace 30 minut při 45°C. Poté byla inaktivována reverzní transkriptasa inkubací směsi při 85°C po dobu 5 minut. Připravená cDNA byla dále uchována při -20 °C.

3.5.7.4 qPCR

Připravená cDNA byla zředěna sterilní vodou v poměru 1:1. Pro qPCR byl využit Xceed qPCR SG 1-step 2x Mix (Institute of Applied Biotechnologies). Do jamek destičky pro qPCR bylo pipetováno po 9 µl reakční směsi složené z 5 µl Xceed qPCR SG 2x Mix, 1,33 µl 3 µmol/l forward primeru, 1,33 µl 3 µmol/l reverse primeru a 1,34 µl sterilní vody. Poté byl do jamek přidán 1 µl naředěné cDNA. qPCR probíhala dle protokolu uvedeného v tab. 4.

Tab. 4: Protokol pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci.

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95	120	1
Denaturace	95	5	39
Navázání primerů	60	30	39
Elongace	72	30	39
Chlazení	4	∞	1

V předložené práci byly studovány geny pro RBOHD1 a RBOHD2. Jako housekeeping geny byly použity geny pro aktin a EF-1 α . Optimální teplota pro navázání primerů je 60°C. Sekvence primerů jsou uvedeny v tab. 5.

Tab. 5: Sekvence použitých forward a reverse primerů.

Gen	Forward primer	Reverse primer
<i>EF-1α</i>	TGTGATGTTTTGTTTCGGTCT TTA	TCAAAAGAAAATGCAGACAGACTCA
<i>aktin</i>	CCATTCTTCGTTTGGACCTT	TTCTGGGCAAGGGAACCT
<i>RBOHD1</i>	CATCAAACAGCTAAGGAC ACAG	GTACACAATAGGGAGAGTTGGTAGA C
<i>RBOHD2</i>	AGATACCAAGGGAATTAAG AATGTG	GGCACCCATCAAAGAGG

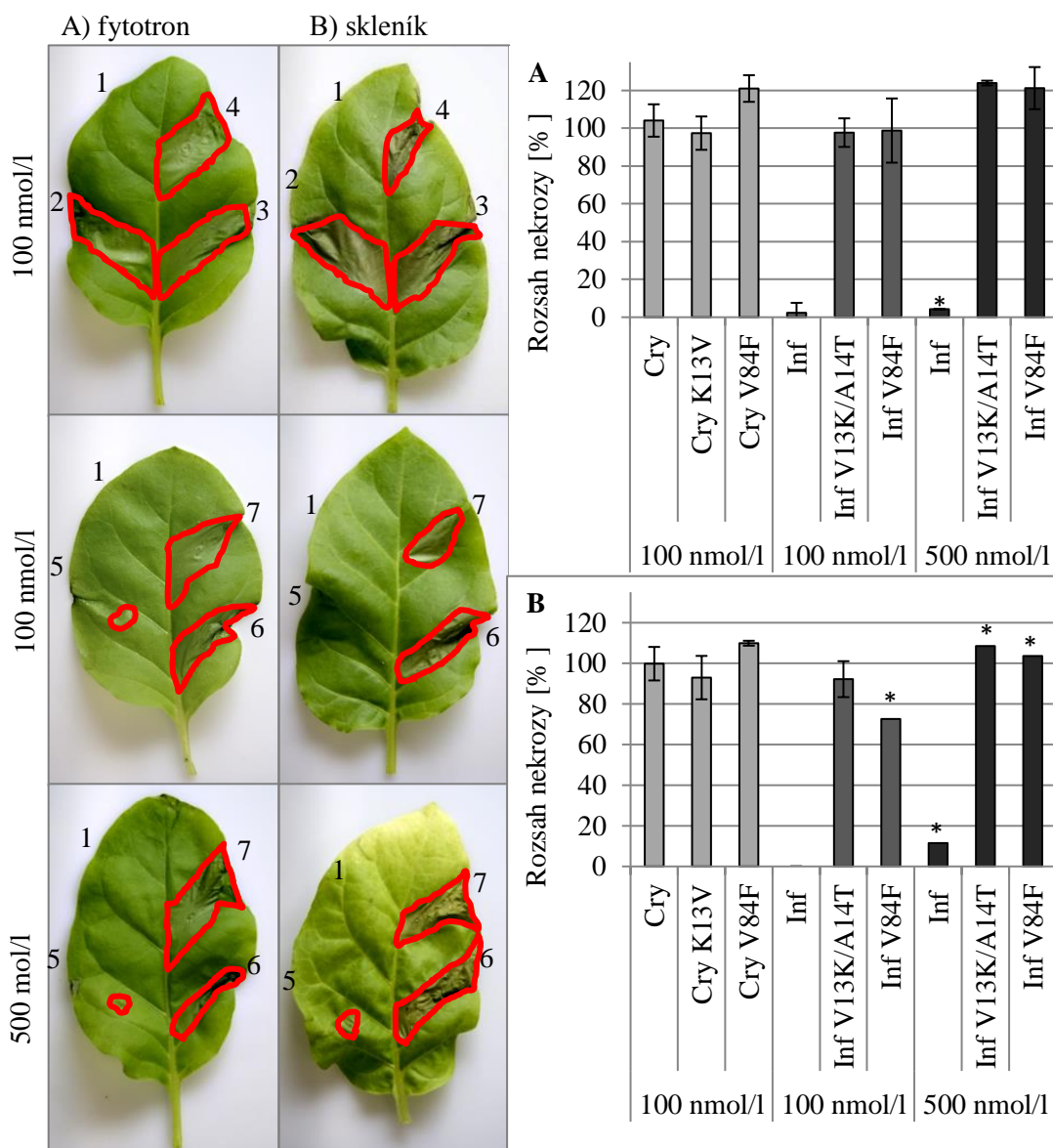
4 Výsledky

4.1 Studium vlivu elicitinů kryptogeinu, infestinu a jejich mutantů na *Nicotiana tabacum*

4.1.1 Nekrotická aktivita elicitinů v tabákových listech

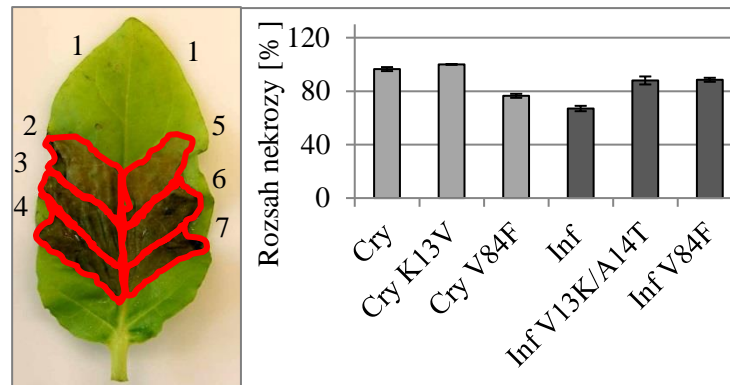
Prvním dílčím úkolem experimentální části diplomové práce bylo stanovení nekrotické aktivity elicitinů Inf, Cry a jejich mutantů na modelových systémech *N. tabacum* L. cv. Xanthi a *N. tabacum* L. cv. Samsun. Byl porovnán jejich účinek na listy rostlin, které byly pěstovány ve skleníku a ve fytotronu. Rostliny z fytotronu jsou pěstovány za kontrolovaných a stabilních teplotních i světelných podmínek, jejich listy jsou citlivější a méně pevné ve srovnání s listy rostlin ze skleníku. Nekrotická aktivita byla fotograficky dokumentována a následně byla pomocí programu Image J vyhodnocena plocha listu odpovídající nekrotické reakci a plocha, do které byl elicitin tlakově infiltrován. Jejich poměr udává intenzitu tvorby nekrozy.

V případě modelové rostliny *N. tabacum* L. cv. Xanthi byl Cry v použité koncentraci 100 nmol/l vysoce nekroticky aktivní (obr. 14). V případě mutantu Cry K13V bylo pozorováno mírné snížení nekrotické aktivity, a naopak u Cry V84F byla nekrotická aktivita zvýšená. Inf v koncentraci 100 ani 500 nmol/l nezpůsobil v listech tabáku téměř žádné nekrozy. Mutace Inf v pozicích 13 a 84 (při použití 100 nmol/l koncentrace) vedla k prudkému vzrůstu nekrotické aktivity. U rostlin pěstovaných ve skleníku po aplikaci 100 nmol/l Inf nebyla detekována žádná nekrotická aktivita, vyšší 500 nmol/l koncentrace Inf způsobila malou nekrotickou reakci. Obecně lze konstatovat, že v celkovém porovnání je míra tvorby nekroz po elicitaci u rostlin pěstovaných ve skleníku nižší než u rostlin z fytotronu.



Obr. 14: Vliv elicitinů na tvorbu nekrozy u *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Fotografická dokumentace tvorby nekroz a grafické vyhodnocení intenzity tvorby nekrozy (plocha s nekrotickou reakcí/plocha s tlakově infiltrovanou látkou). 24 h po aplikaci elicitinů. Rostliny pěstované v A - fytotronu, B - skleníku. Koncentrace elicitinů 100 a 500 nmol/l. Označení aplikovaných látek: 1) voda, 2) Cry, 3) Cry K13V, 4) Cry V84F, 5) Inf, 6) Inf V13K/A14T, 7) Inf V84F. * pouze jedno opakování.

Při realizaci stejného experimentu na druhé modelové rostlině *N. tabacum* L. cv. Samsun byla detekována vysoká nekrotická aktivita po aplikaci všech testovaných elicitinů, tzn. i po elicitaci Inf. Elicitiny v 100 nmol/l koncentraci indukují tvorbu nekroz velmi silně (nekroza na 80-100 % plochy s aplikovaným elicitem). V případě Inf byla nekrotická aktivita na cca 70 % plochy s aplikovaným elicitem (obr. 15).



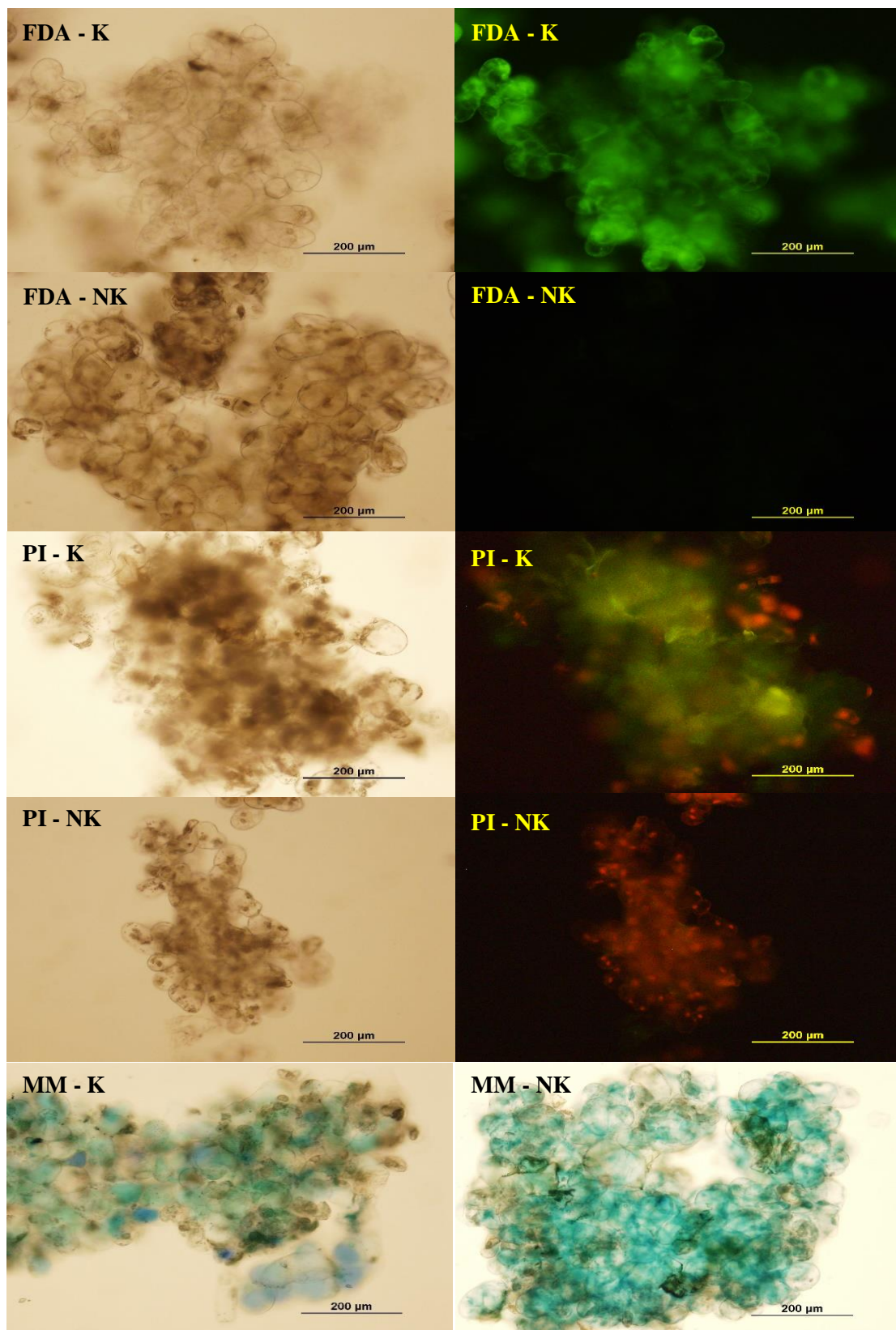
Obr. 15: Vliv elicitinů na tvorbu nekrozy u *N. tabacum* L. cv. Samsun. Fotografická dokumentace tvorby nekroz a grafické vyhodnocení intenzity tvorby nekrozy (plocha s nekrotickou reakcí/ploše s tlakově infiltrovanou látkou). Rostliny pěstované ve skleníku. Koncentrace elicitinů 100 nmol/l. 24 h po aplikaci elicitinů. Označení aplikovaných látek: 1) voda, 2) Cry, 3) Cry K13V, 4) Cry V84F, 5) Inf, 6) Inf V13K/A14T, 7) Inf V84F.

4.1.2 Vliv elicitinů na životnost buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi

Při stanovení viability je cílem určit počet živých a metabolicky aktivních buněk v celkové populaci. Pro určení vlivu elicitinů na životnost buněčné suspenze byly testovány tři různé metody – fluorescenční metoda s FDA, s PI a kolorimetrická metoda využívající methylenové modři. Všechny metody byly testovány v mikroskopickém provedení a s využitím mikrodestičkového readeru.

Tabákové buňky vytvářejí shluky. Při mikroskopickém provedení metod tedy nebylo možné přesně spočítat živé resp. mrtvé buňky (obr. 16). To se ukázalo jako výrazná nevýhoda mikroskopického provedení znemožňující přesné určení vlivu elicitinů na životnost tabákových buněk.

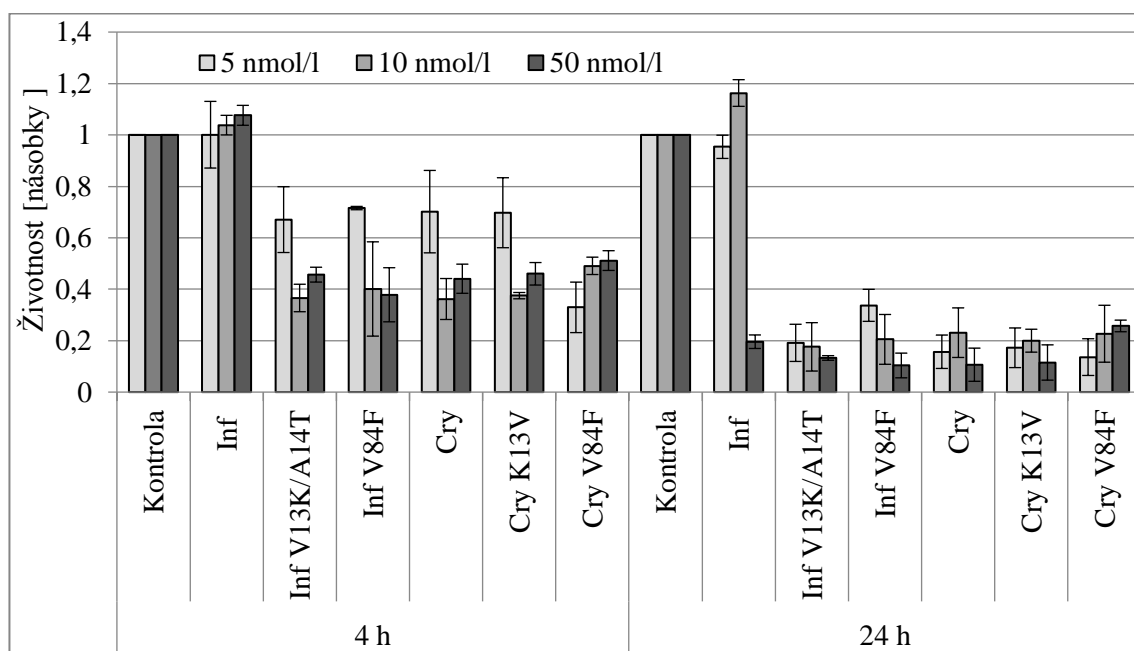
Z tohoto důvodu byly testovány modifikované metody stanovení životnosti buněk s možností detekce na mikrodestičkovém readeru. Metoda s methylenovou modří poskytovala nejednoznačné výsledky, navíc byla časově velmi náročná. Methylenová modř je barvivo pronikající do všech buněk. V živých buňkách dochází k jeho přeměně reduktasami za vzniku bezbarvé sloučeniny. V mrtvých buňkách jsou tyto enzymy neaktivní, proto zůstávají mrtvé buňky po aplikaci barviva modře zbarveny (Kwolek-Mírek a Zadrag-Tecza, 2014). Problémem při provedení této metody může být závěrečné vystavení buněk ultrazvuku, které je potřebné pro následné uvolnění barviva do pufru. Při rozrušení buněk v ultrazvukové lázni může docházet také k uvolnění aktivních reduktas z živých buněk, které mohou modré barvivo redukovat a snižovat tak intenzitu zbarvení měřenou na readeru.



Obr. 16: Mikrofotografie buněčných suspenzí *N. tabacum* L. cv. Xanthi. FDA – barvení živých buněk fluorescein diacetátem, PI – barvení mrtvých buněk propidium jodidem, MM – barvení mrtvých buněk methylenovou modří. K – kontrolní vzorek buněčné suspenze bez aplikace elicitinů. NK – negativní kontrola připravená inkubací buněčné suspenze 5 minut v ultrazvukové lázni. Měřítka 200 μm.

Metoda s PI byla sice časově nenáročná, výsledky jsou však nespolehlivé, navíc je využíváno mutagenní látky. Jako nejvhodnější se nakonec ukázala metoda s FDA, která je rychlá, poskytuje uspokojivé výsledky a dochází ke stanovení životnosti přesně v daném čase.

Metodou s FDA byl testován vliv tří různých koncentrací elicitinů na životnost tabákových buněk v čase 4 a 24 h po elicitaci (obr. 17). Již po aplikaci 5 nmol/l Cry lze pozorovat jeho výrazný negativní vliv na životnost tabákových buněk. Zvýšená koncentrace Cry negativní efekt na životnost zvýšila, což je patrné již 4 h po elicitaci. Jednoznačný negativní efekt Inf na životnost buněk se projevil až 24 h po aplikaci elicitinu, a to v jeho nejvyšší testované koncentraci 50 nmol/l. Mutantní formy Cry K13V, Inf V13K/A14T a Inf V84 měly přibližně podobný negativní účinek na životnost jako Cry. Nejintenzivnější negativní efekt na životnost buněk měl Cry V84F.

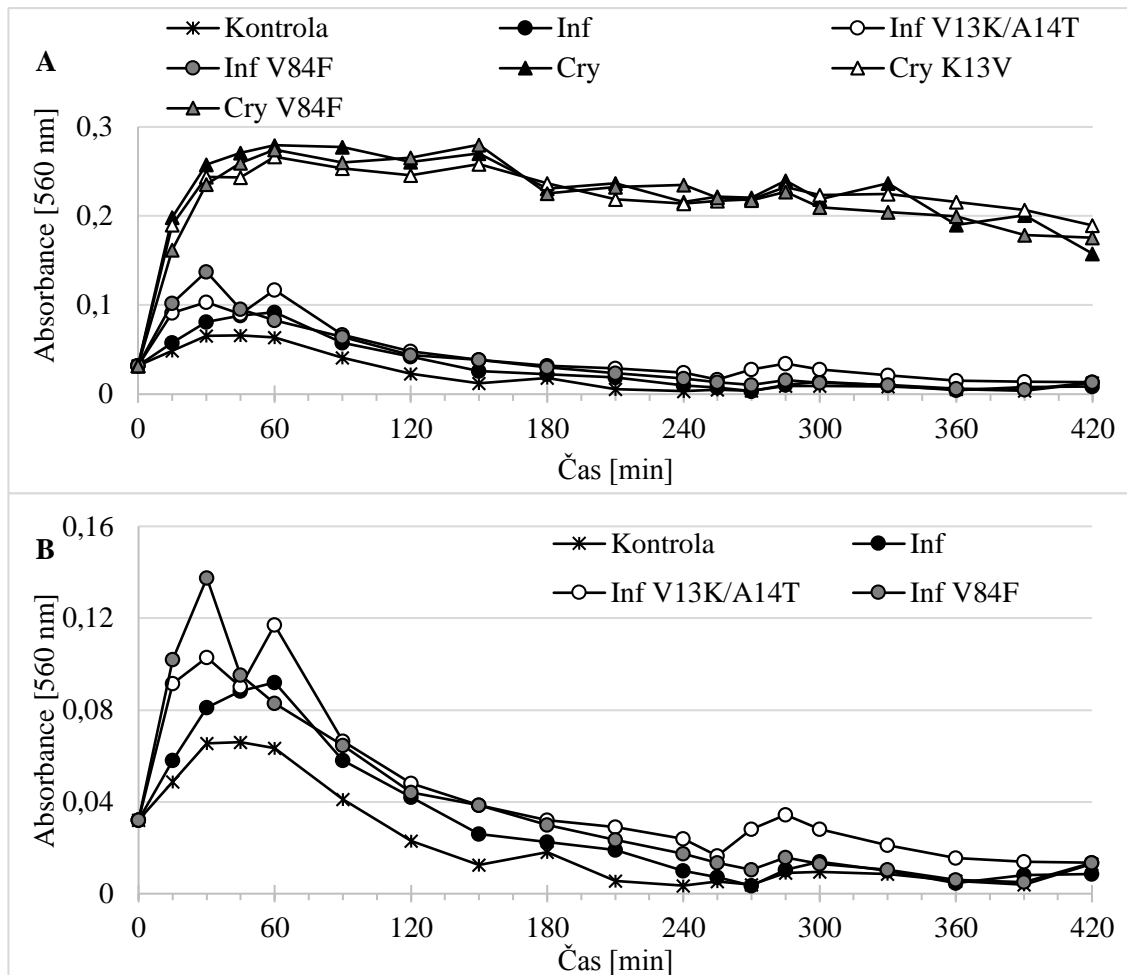


Obr. 17: Vliv elicitinů na životnost buněčné suspenze *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Životnost sledována 4 a 24 h po aplikaci elicitinů metodou s FDA. Elicitiny byly aplikovány v koncentracích 5, 10 a 50 nmol/l.

4.1.3 Vliv elicitinů na produkci ROS

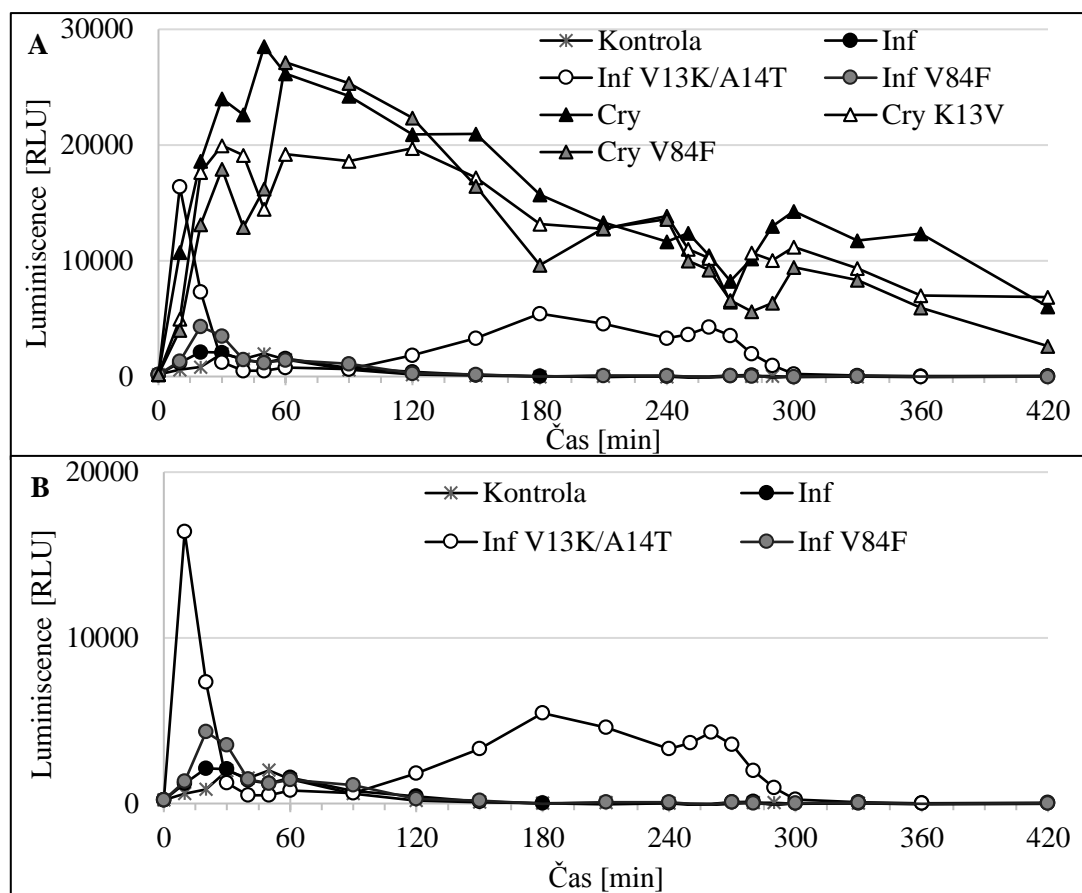
Elicitiny jsou rozpoznávány specifickými transmembránovými proteinovými receptory v tabákových buňkách. Receptory po rozpoznání elicitinů spouští obrannou reakci, která je doprovázena aktivací NADPHoxidas a prudkým nárůstem produkce ROS (Derevnina *et al.*, 2016). Produkce ROS v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi po aplikaci elicitinů byla detekovaná s využitím tří metod: metoda s xylenolovou oranží, metoda s luminolem a metoda s fluorescenční sondou H₂DCFDA.

Metodou s xylenolovou oranží bylo možné pozorovat prudký nárůst produkce ROS již několik minut po aplikaci Cry a jeho mutantů (obr. 18). Vysoká intenzita signálu přetrvává po celou sledovanou dobu (420 minut). Mírný postupný pokles intenzity signálu byl zaznamenán po 150 min od elicitace. Produkce ROS byla po elicitaci Cry K13V lehce snížena v porovnání s efektem Cry (obr. 19A). V případě Inf byl detekován pouze mírný nárůst signálu v rané fázi s maximem cca 60 min po elicitaci. Zvýšení produkce ROS v rané fázi bylo zaznamenáno po aplikaci mutantu Inf V13K/A14T, kdy bylo dosaženo maxima 60 min po elicitaci. Inf V84F měl ještě větší vliv na zvýšení produkce ROS s maximem 30 min po elicitaci. V druhé fázi byl zaznamenán nárůst produkce ROS pouze v případě mutantní formy Inf V13K/A14T a to s maximem 285 min po elicitaci (obr. 19B).



Obr. 18: Vliv elicitinů na produkci ROS v buněčnou suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Detekce xylenolovou oranží. Produkce sledována v intervalech 10-30 min po dobu 420 min. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l. A - Produkce ROS po aplikaci všech sledovaných elicitinů. B -Detailní graf produkce ROS po aplikaci Inf a jeho mutantů.

Metoda detekce ROS s luminolem poskytla obdobné výsledky (obr. 19). U Cry a jeho mutantů jsou patrné dvě maxima produkce ROS v časech 30-50 a 300 minut. Navíc jsou také mnohem zřetelnější rozdíly mezi jednotlivými mutanty, kdy je zřejmé, že schopnost indukovat produkci ROS klesá v pořadí Cry, Cry V84F, Cry K13V, Inf V84F a Inf V13K/A14T. Maximum nárůstu produkce ROS v rané fázi po elicitaci bylo detekováno v případě Inf V84F 10 min, Inf a Inf V13K/A14T cca 20 min, u Cry K13V 30 min, Cry a Cry V84F 50-60 min po aplikaci elicitinů. Metoda s luminolem se tedy ukázala jako mnohem citlivější. Výhodou této metody je, že dochází ke stanovení hladiny ROS prakticky ihned po odebrání buněčné suspenze do jamek mikrotitrační destičky. V případě metody s xylenolovou oranží je odebraný alikvot nejprve inkubován 30 minut s reakčním roztokem pro vznik zbarvení. Vedle reakce ROS s železnatými ionty v roztoku může docházet také k přeměnám ROS, které jsou obecně velmi málo stabilní, a k samovolné oxidaci železnatých iontů.



Obr. 19: Vliv elicitinů na produkci ROS buněčnou suspenzí *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Detekce luminolem. Produkce sledována v intervalech 10-30 min po dobu 420 min. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l. A) Produkce ROS po aplikaci všech sledovaných elicitinů. B) Detailní graf produkce ROS po aplikaci Inf a jeho mutantů.

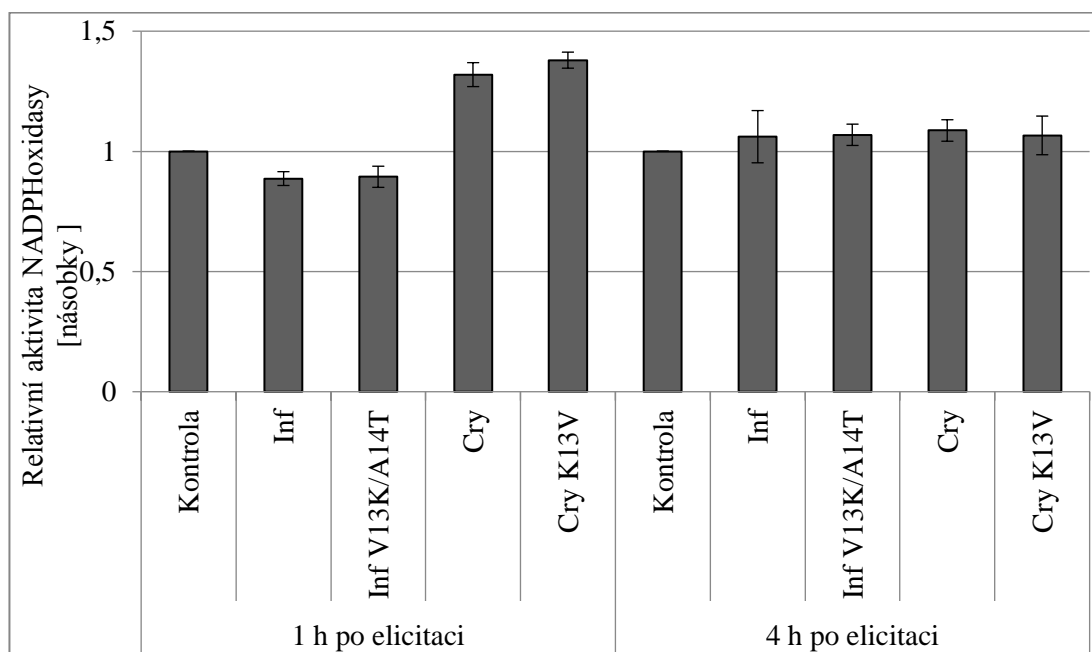
V rámci orientačních experimentů byla stanovována také produkce ROS pomocí fluorescenční sondy H_2DCFDA (výsledky nejsou uvedeny). Během tohoto experimentu byl sledován nárůst fluorescenčního signálu v tabákových buňkách po přidání sondy. Toto uspořádání experimentu neumožňuje stanovit hladinu ROS v konkrétním čase a je možno měřit pouze celkovou schopnost produkce ROS v určitém časovém úseku. Z tohoto důvodu nebyla metoda s H_2DCFDA dále používána.

4.1.4 Vliv elicitinů na aktivitu a expresi NADPHoxidasy

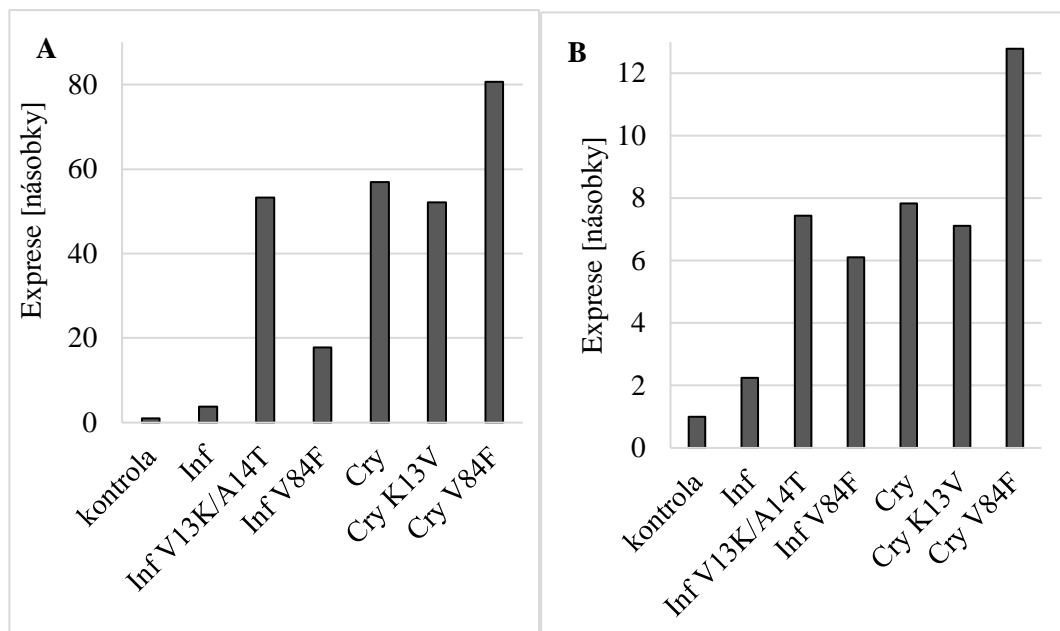
NADPHoxidasa je hlavním enzymem produkujícím ROS při obranné reakci rostliny (Kadota *et al.*, 2015). Bylo provedeno stanovení aktivity NADPHoxidasy metodou s XTT. V následujícím grafu (obr. 20) jsou uvedeny předběžné výsledky stanovení změn aktivity NADPHoxidasy 1. a 4. h po aplikaci elicitinů. Změny v aktivitě NADPHoxidasy po elicitaci neodpovídají významným změnám hladiny ROS detekovaným luminiscenční metodou. Byl zaznamenán pouze nárůst NADPHoxidasy po aplikaci Cry a Cry K13V 1 h

po elicitaci. V pozdější fázi nebyly detekované žádné významné změny NADPHoxidasy. Otázkou, která musí být následně vyřešena, je, zda se jedná o metodický problém na úrovni přípravy vzorku nebo problém v realizaci vlastní detekce NADPHoxidasy. Současně vedle měření aktivity NADPHoxidasy byl stanoven vliv elicitinů na expresi NADPHoxidasy. Získané výsledky korespondují s daty týkajícími se produkce ROS (obr. 21).

Výsledky stanovení exprese dvou isoform NADPHoxidasy (tj. RBOHD1, RBOHD2) v tabákových buňkách ukazují významnou míru nadexprese genu *RBOHD1* i *RBOHD2* 4. h po aplikaci Cry (obr. 21). Mutantní forma Cry K13V indukovala expresi NADPHoxidasy v menší míře, naopak mutant Cry V84F měl ve srovnání s Cry větší schopnost indukovat expresi obou genů *RBOHD*. Inf indukoval expresi obou genů *RBOHD* pouze v malé míře. Naopak mutace Inf V13K/A14T vedla k výrazné indukci exprese *RBOHD*. Mutace v pozici 84 měla obdobný, ale mírnější efekt.



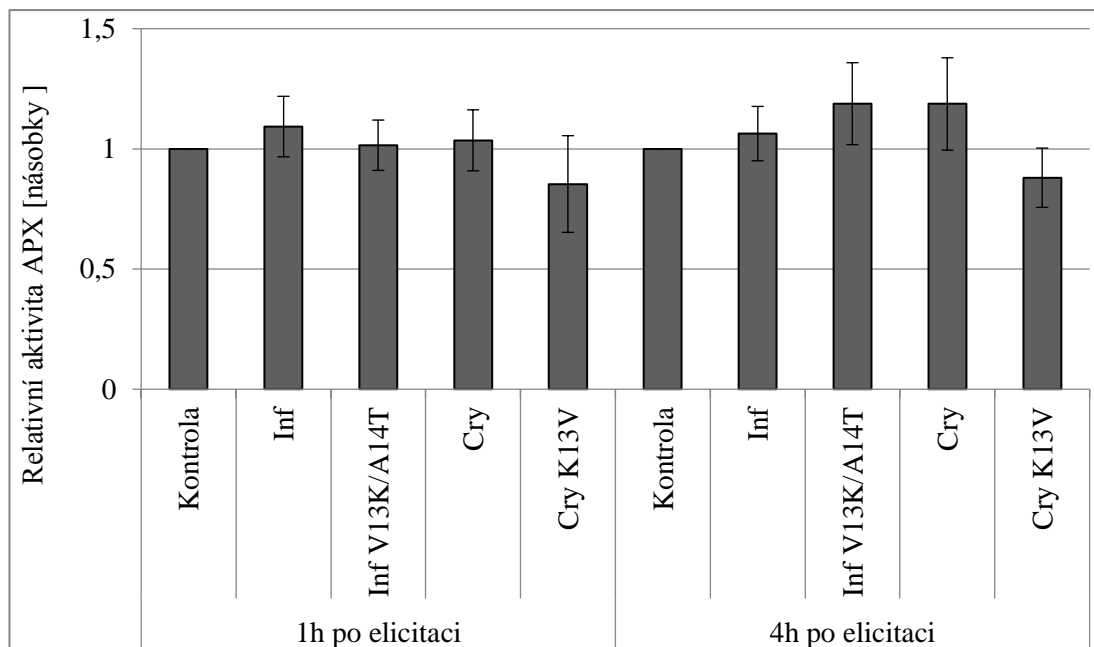
Obr. 20: Vliv elicitinů na aktivitu NADPHoxidasy v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Vzorky 1. a 4. h po aplikaci elicitinů. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l. Měření bylo provedeno v technickém triplicátu.



Obr. 21: Expresse NADPHoxidas v buňkách *N. tabacum* L. cv. Xanthi 4. h po aplikaci elicitinů. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l. A - exprese genu *RBOHD1*, B - exprese genu *RBOHD2*.

4.1.5 Vliv elicitinů na aktivitu askorbátperoxidasy

APX je klíčovým enzymem askorbát-glutathionového cyklu, který se podílí na detoxifikaci ROS v rostlinách. Jedním z cílů diplomové práce bylo stanovit vliv elicítace na změnu APX aktivity v suspenzní kultuře tabákových buněk (obr. 22). V tomto případě byl porovnáván pouze vliv Inf, Cry a jejich mutantních forem s mutací v poloze 13. Do experimentu již nebyly zařazeny mutantní formy elicitinů s mutací v poloze 84. Hodinu po zahájení experimentu nebyl detekován významný efekt elicitinů na APX aktivitu. Pouze po aplikaci Inf byl zaznamenán mírný nárůst APX aktivity a v případě Cry K13V naopak mírný pokles v porovnání s kontrolním experimentem. Čtyři hodiny po elicítaci byla detekována stále mírně zvýšená aktivita APX po aplikaci Inf. Elicitace Inf s mutací v poloze 13 zvýšila APX aktivitu v porovnání s Inf. V případě aplikace Cry byla APX aktivita srovnatelná s hodnotami stanovenými pro elicitin Inf V13K/A14T, tzn. vyšší v porovnání s kontrolou. Naopak aktivita APX po aplikaci Cry K13V byla mírně nižší ve srovnání s kontrolním vzorkem.

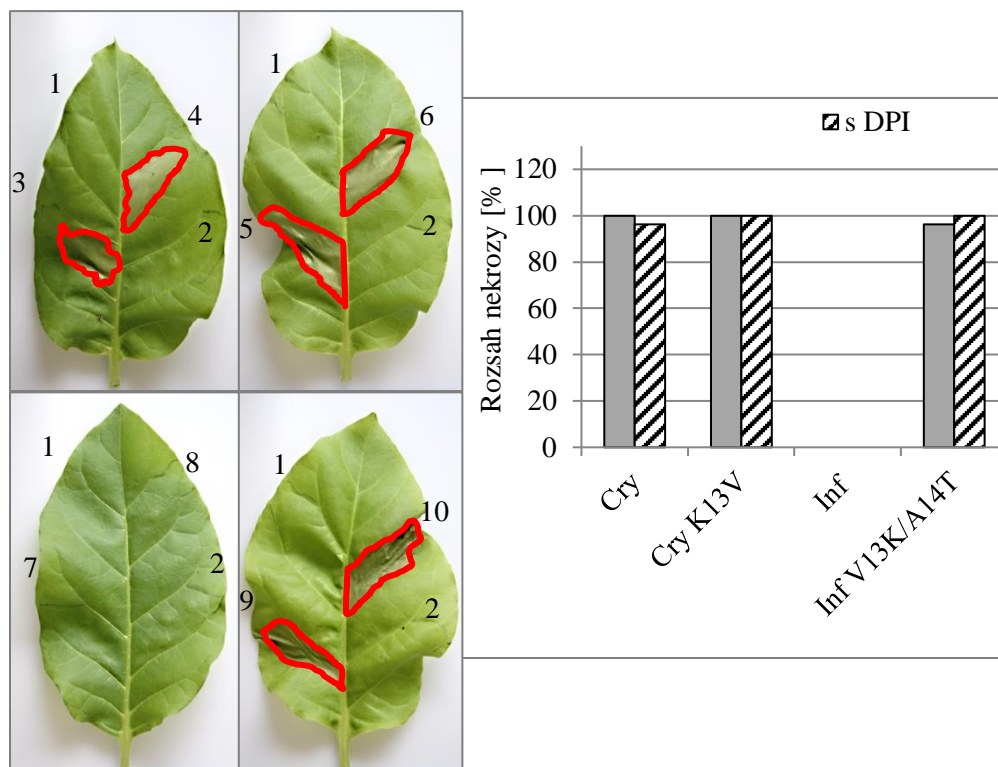


Obr. 22: Vliv elicitinů na aktivitu APX v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Aktivita byla měřena v buňkách 1. a 4. h po aplikaci elicitinů. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l.

4.2 Vliv inhibitoru NADPHoxidasy DPI na působení elicitinů

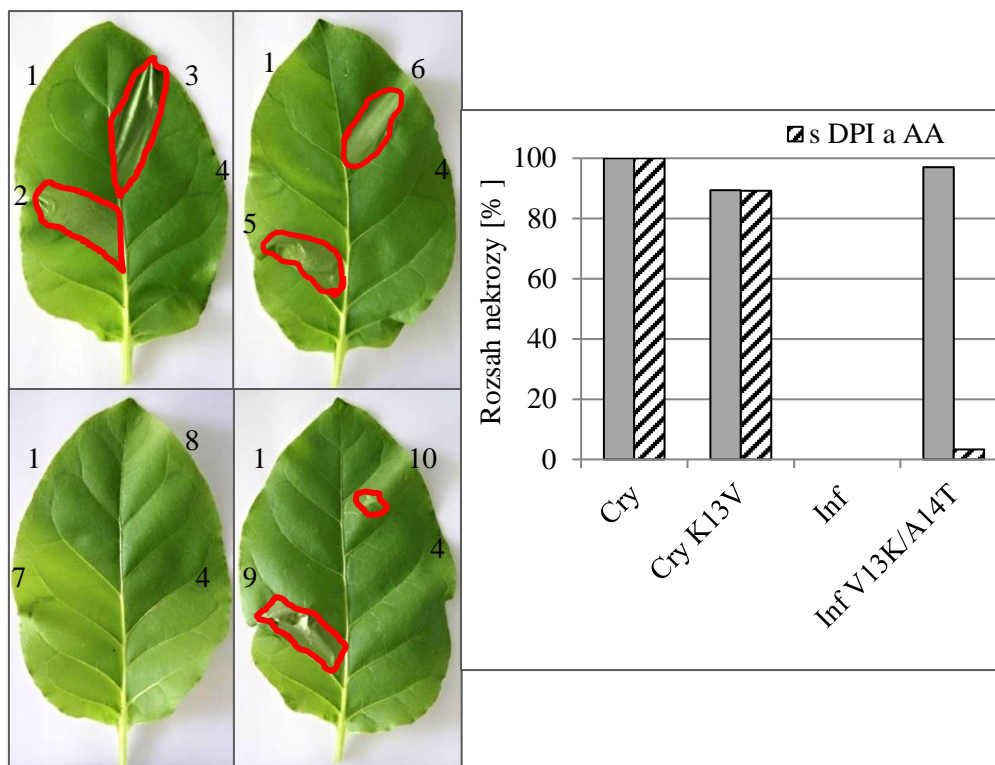
4.2.1 Vliv na nekrotickou aktivitu v tabákových listech

Pro stanovení úlohy NADPHoxidasy v obranné reakci rostlin byl v dalších experimentech testován efekt difenylenjodonium chloridu (DPI), sloučeniny používané v řadě studií jako reverzibilní inhibitor NADPHoxidasy. Nejprve byla testována vhodná koncentrace DPI pro aplikaci do listů v rozmezí 2,5 – 100 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace. Nejvyšší koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ nezpůsobovala v listech ani po 48 hodinách nekrozy, proto byla vybrána pro hodnocení vlivu DPI na nekrotickou aktivitu elicitinů. V listech modelové rostliny *N. tabacum* L. cv. Xanthi pěstované ve skleníku neměla přítomnost 100 $\mu\text{mol/l}$ DPI významný vliv na rozvoj nekroz po aplikaci elicitinů (obr. 23). Obdobný trend byl pozorován také u rostlin pěstovaných ve fytotronu.



Obr. 23: Vliv inhibitoru NADPHoxidasy (DPI) na nekrotickou aktivitu elicitinů u *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Fotografická dokumentace tvorby nekroz a grafické vyhodnocení intenzity tvorby nekrozy (plocha s nekrotickou reakcí/plocha s tlakově infiltrovanou látkou). Rostliny pěstované ve skleníku. 24 h po aplikaci elicitinů. Označení aplikovaných látek: 1) voda, 2) DPI, 3) Cry, 4) Cry + DPI, 5) Cry K13V, 6) Cry K13V + DPI, 7) Inf, 8) Inf + DPI, 9) Inf V13K/A14T, 10) Inf V13K/A14T + DPI. V grafu šrafované označení – aplikace elicitinu s DPI. Koncentrace elicitinů 100 nmol/l a 100 μ mol/l DPI.

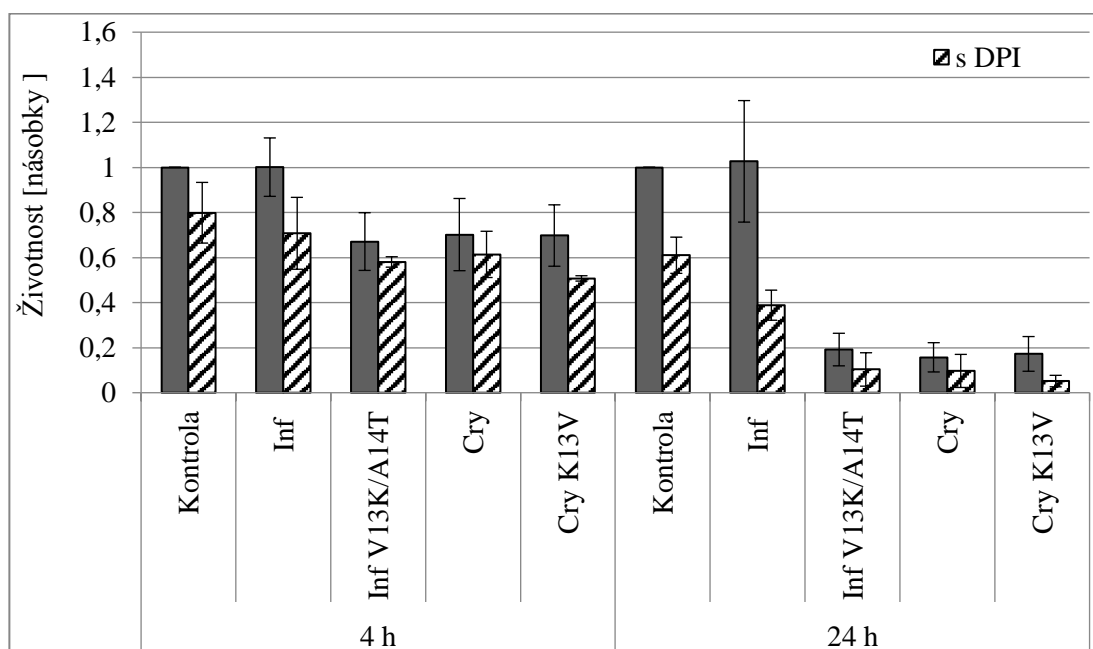
DPI nemělo výrazný vliv na nekrotickou aktivitu elicitinů na listech *N. tabacum* L. cv. Xanthi, proto byla dále testována současná aplikace 100 μ mol/l DPI a 100 μ mol/l askorbátu (AA), což je dobře známý lapač ROS (antioxidant). U rostlin pěstovaných ve skleníku nebyl zaznamenán žádný vliv současné aplikace těchto dvou látek na nekrotickou aktivitu Cry, Cry K13V a Inf. Pouze v případě Inf V13K/A14T nebyly po 24 hodinách patrné téměř žádné nekrotické změny v porovnání s efektem tohoto elicitinu v prostředí jen s DPI (obr. 25). List byl vyfotografován i po 48 hodinách. V tomto čase již došlo k rozvoji nekroz téměř po celé ploše s infiltrovanými elicitiny, DPI a askorbátem.



Obr. 25: Testování vlivu inhibitoru NADPHoxidasy (DPI) a aplikace kyseliny askorbové (AA) na schopnost elicitinů indukovat tvorbu nekrozy u *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Fotografická dokumentace listů, případně tvorby nekroz a grafické vyhodnocení intenzity tvorby nekrozy (plocha s nekrotickou reakcí/ploše s tlakově infiltrovanou látkou). Rostliny pěstované ve skleníku. 24 h po aplikaci elicitinů. Označení aplikovaných látek: 1) voda, 2) Cry, 3) Cry + DPI + AA, 4) DPI + AA, 5) Cry K13V, 6) Cry K13V + DPI + AA, 7) Inf, 8) Inf + DPI + AA, 9) Inf V13K/A14T, 10) Inf V13K/A14T + DPI + AA. V grafu šrafované označení – aplikace elicitinu s DPI a AA. Koncentrace elicitinů 100 nmol/l, 100 μmol/l DPI a 100 μmol/l AA.

4.2.2 Vliv na životnost buněčné suspenze

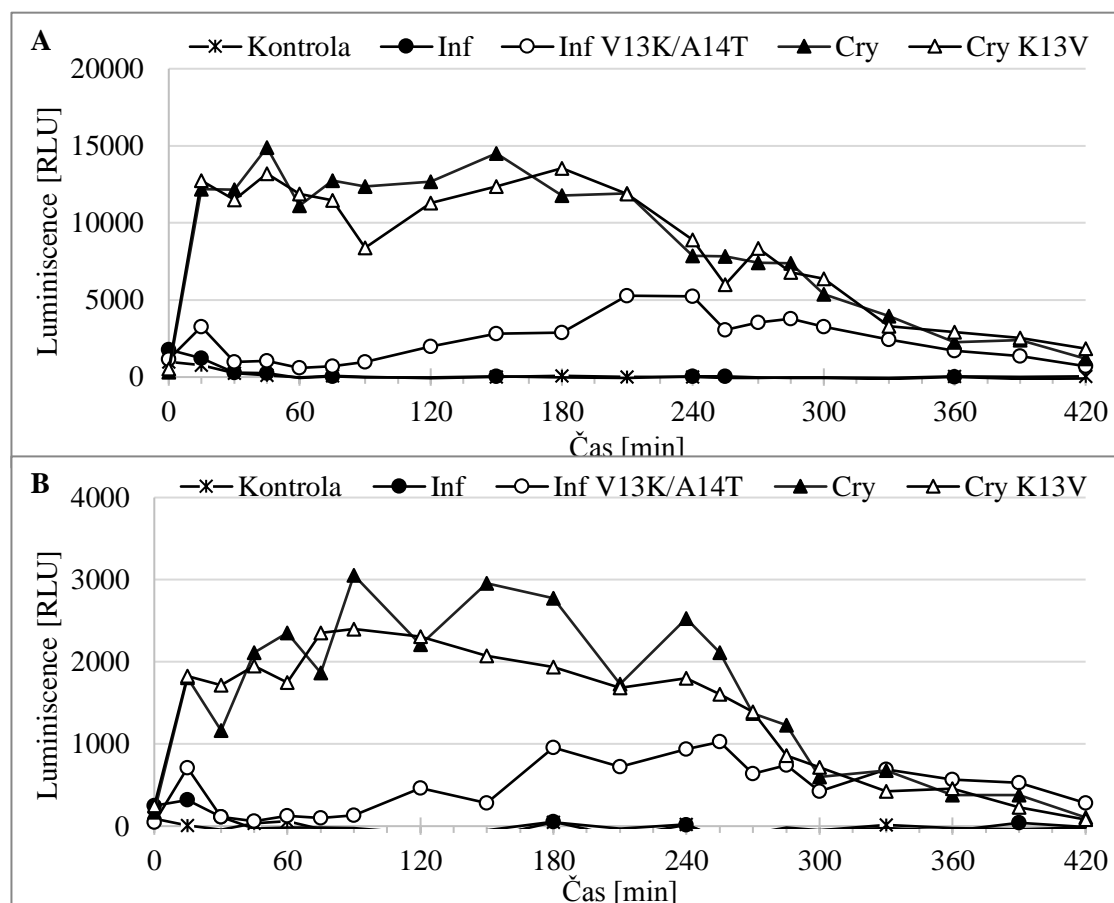
V suspenzních kulturách tabáku byl sledován účinek 5 $\mu\text{mol/l}$ DPI na životnost buněk vystavených působení elicitinů. V orientačních experimentech bylo zjištěno, že vyšší koncentrace DPI, než v následujících experimentech používaná koncentrace 5 $\mu\text{mol/l}$, má výrazný negativní vliv na životnost buněk (výsledky nejsou uvedeny). U všech buněk kontrolních i po aplikaci elicitinů byl pozorován jednoznačný pokles životnosti vlivem DPI (obr. 26). Ve 4. hodině po zahájení experimentu poklesla životnost v kontrolním vzorku po aplikaci DPI cca o 20 % a po 24 h až 40 %. Pokles životnosti po aplikaci Inf a Cry K13V společně s DPI byl cca 30 % (4 h po zahájení experimentu) a cca 60-70 % (24 h po zahájení experimentu) v porovnání s životností po aplikaci daných elicitinů. V případě Cry a Inf V13K/A14T se s DPI prohloubila ztráta životnosti o cca 15 % (4 h po zahájení experimentu) a 35-45 % (24 h po zahájení experimentu) vzhledem k ošetřeným buňkám danými elicitiny.



Obr. 26: Vliv elicitinů a aplikace inhibitoru NADPHoxidasy (DPI) na životnost buněčné suspenze *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Životnost sledována ve 4. a 24. hodině po aplikaci elicitinů metodou s FDA. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l a DPI 5 $\mu\text{mol/l}$. DPI aplikováno 10 minut před přidáním elicitinů. V grafu šrafované označení – aplikace elicitinu s DPI.

4.2.3 Vliv na produkci ROS

Dalším dílčím úkolem diplomové práce bylo studium vlivu DPI na produkci ROS v tabákových buňkách po aplikaci elicitinů. Ve srovnání s buňkami ošetřenými pouze elicitiny poskytovaly tabákové buňky s DPI 3-5násobně nižší luminiscenční signál (obr. 27). Trend indukce produkce ROS zůstal u všech elicitinů s DPI obdobný; schopnost indukovat produkci ROS klesala v pořadí Cry, Cry K13V a Inf V13K/A14T.

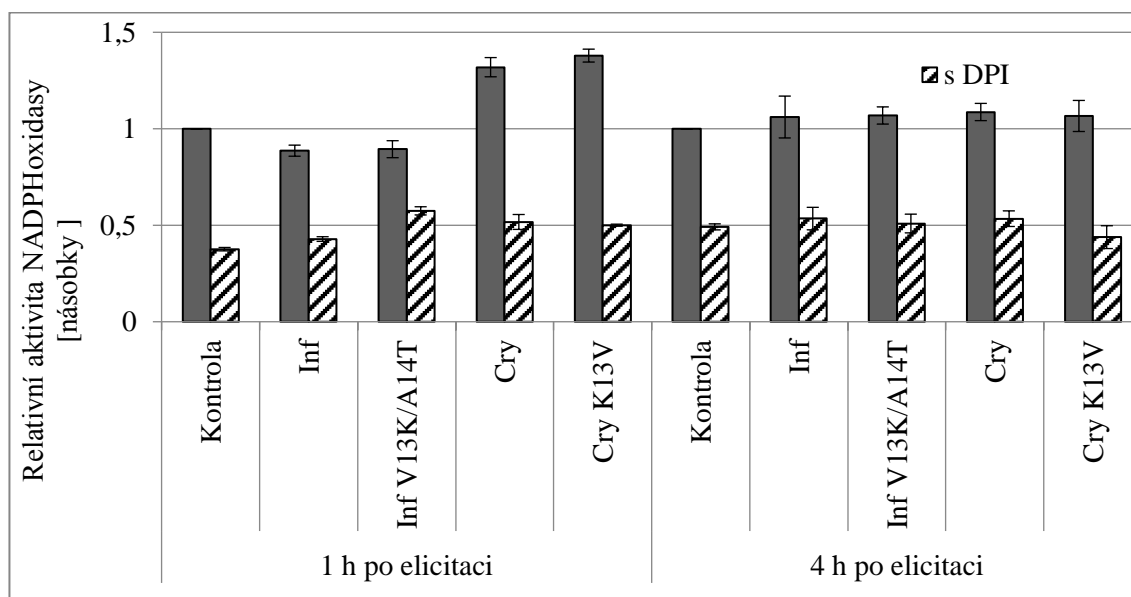


Obr. 27: Vliv inhibitoru NADPHoxidasy (DPI) na schopnost elicitinů indukovat produkci ROS v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Detekce luminolem. Produkce sledována v intervalech 15-30 min po dobu 420 min. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l, DPI 5 μ mol/l. DPI aplikováno 10 minut před přidáním elicitinů. A - produkce ROS po aplikaci elicitinů. B - produkce ROS po aplikaci DPI a elicitinů.

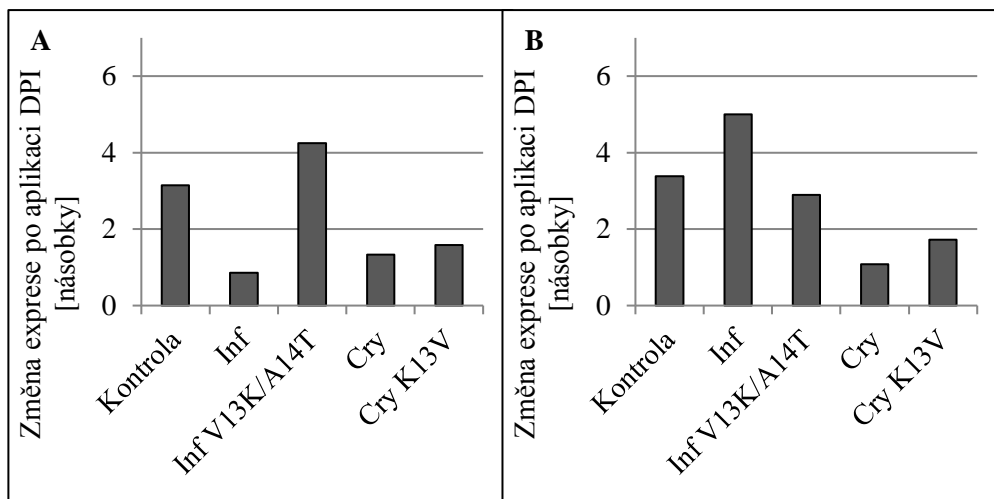
4.2.4 Vliv na aktivitu a expresi NADPHoxidasy

Byly provedeny orientační experimenty stanovení vlivu DPI na aktivitu NADPHoxidasy a expresi genu pro tento enzym. V grafu na obr. 28 je možné vidět, že DPI u všech vzorků způsobilo pokles aktivity enzymu přibližně na polovinu původní hodnoty. Nebyly detekovány významné změny aktivity NADPHoxidasy po aplikaci elicitinů na buněčnou tabákovou suspenzi ovlivněnou přidavkem DPI.

Bylo provedeno také orientační stanovení exprese genů *RBOHD* (obr. 29). Téměř u všech vzorků došlo vlivem DPI k nárůstu exprese genů pro obě isoformy NADPHoxidasy v porovnání s detekovanou expresí v jednotlivých experimentech (kontrolních, po aplikaci testovaných elicitinů). Nejvýraznější nárůst exprese genu *RBOHD2* vlivem DPI byl u buněk ošetřených Inf. Vysoká byla nadexprese také u Inf V13K/A14T a kontrolních vzorků s DPI. Naopak u Inf byl pozorován mírný pokles exprese *RBOHD1*.



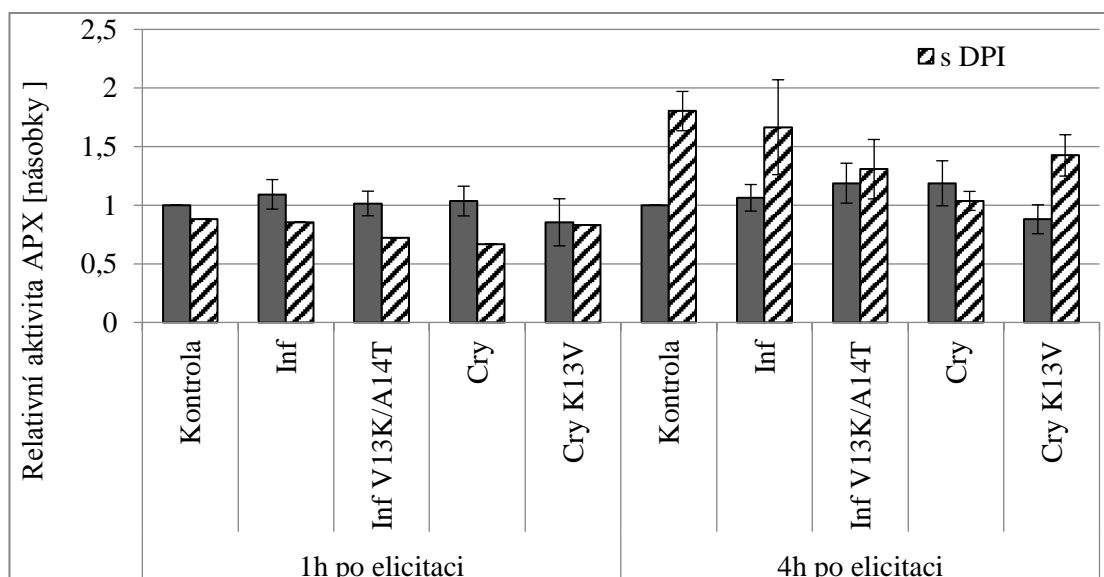
Obr. 28: Vliv elicitinů a aplikace difenyljenodonium chloridu (DPI) na aktivitu NADPHoxidasy v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Aktivita byla stanovena ve vzorcích 1 a 4 h po aplikaci elicitinů. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l, DPI 5 μ mol/l. DPI aplikováno 10 minut před přidáním elicitinů.



Obr. 29: Změna exprese NADPHoxidas v buňkách *N. tabacum* L. cv. Xanthi 4. h po aplikaci elicitinů. Hodnoty jsou vztaženy vždy k úrovni exprese v kontrolních buňkách nebo buňkách ošetřených testovanými elicitiny. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l. A - exprese genu *RBOHD1*, B - exprese genu *RBOHD2*.

4.2.5 Vliv na aktivitu askorbátperoxidasy

Aktivita enzymu 1 h po aplikaci elicitinů byla v přítomnosti DPI snížena o cca 20-35 % s výjimkou působení Cry K13V. Pokles APX aktivity o cca 10 % byl detekován v případě kontrolního vzorku. Čtyři hodiny po aplikaci elicitinů byla detekována o 45-60 % zvýšená APX aktivita u vzorků vystavených působení DPI. V případě Inf V13K/A14T byl efekt DPI minimální (zvýšení aktivity o cca 10 %) a v případě Cry byl zaznamenán pokles APX aktivity o 15 %. Nejvýraznější nárůst APX aktivity v důsledku aplikace DPI k tabákovým buňkám byl detekován u kontrolního vzorku (cca 80 %).



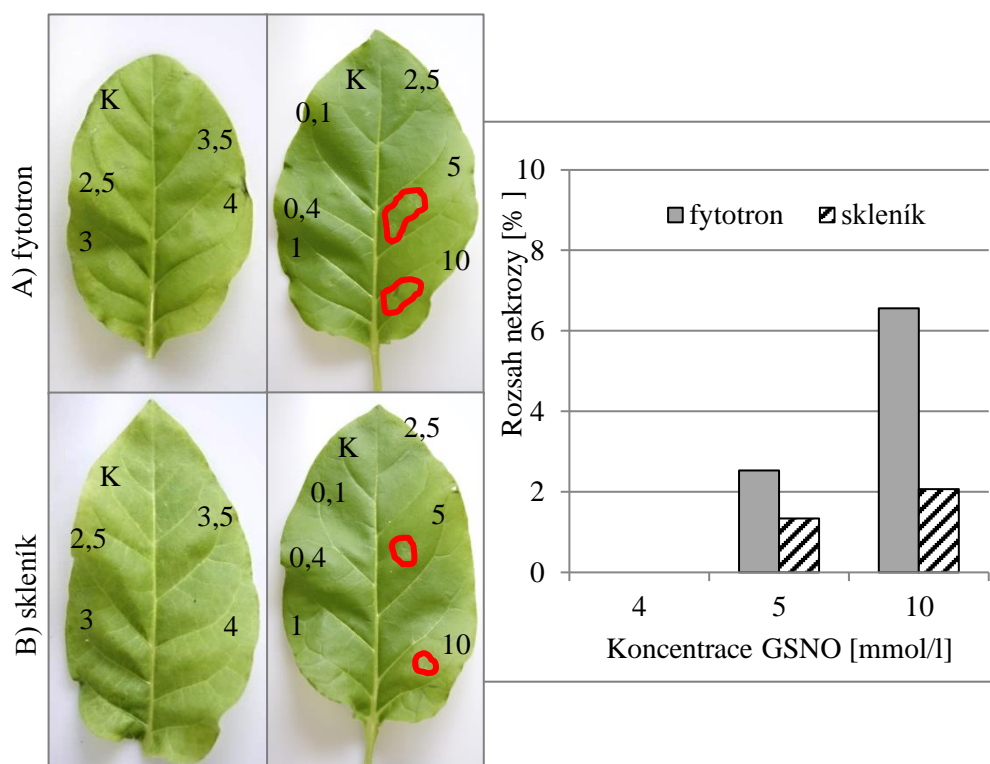
Obr. 30: Vliv aplikace difenyljenodonium chloridu (DPI) a elicitinů na aktivitu APX v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Aktivita byla měřena v buňkách 1 a 4 h po aplikaci elicitinů. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l, DPI 5 μ mol/l. DPI aplikováno 10 minut před přidáním elicitinů.

4.3 Vliv donoru oxidu dusnatého GSNO na působení elicitinů

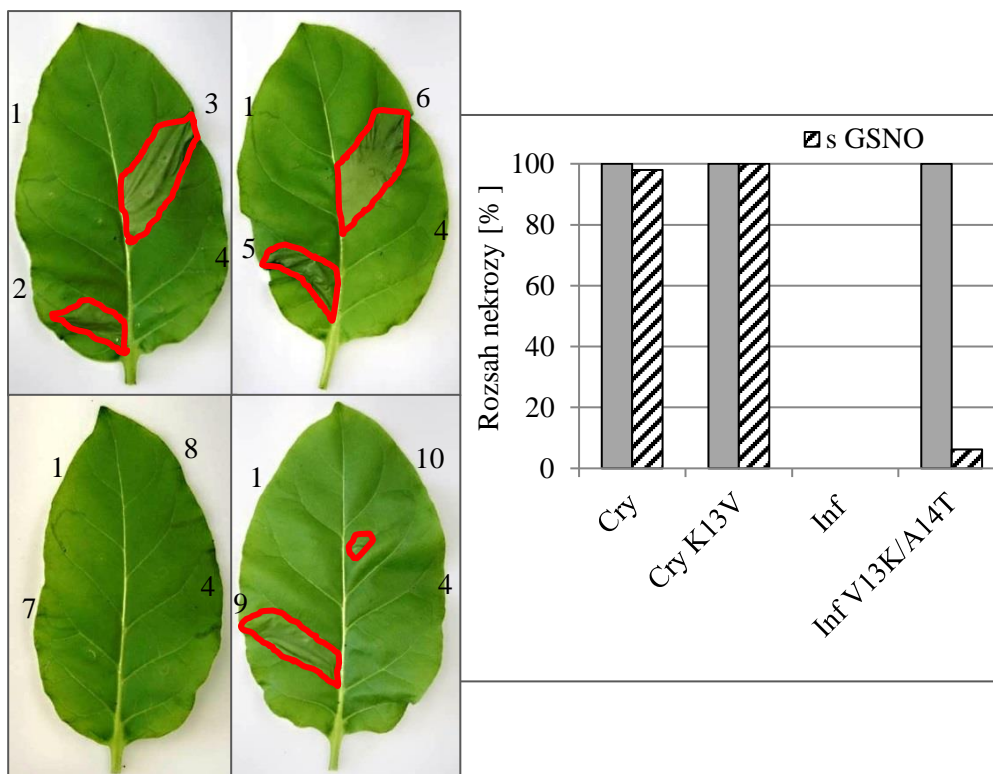
4.3.1 Vliv na nekrotickou aktivitu v tabákových listech

Dalším dílčím úkolem předložené diplomové práce bylo studium vlivu GSNO na obranné mechanismy rostlin vyvolané působením elicitinů. V prvních orientačních experimentech byla testována možná nekrotická aktivita GSNO v koncentraci 1-10 mmol/l. Při použití koncentrace GSNO 5 mmol/l a vyšší byla detekována stopově nekroza. Pro další experimenty byla zvolena koncentrace GSNO 3,5 mmol/l (obr. 31).

Následně byl testován vliv aplikace GSNO o zvolené koncentraci na nekrotické účinky elicitinů. Ukázalo se, že GSNO nijak neovlivňuje nekrotický efekt Cry ani Cry K13V. Naopak u listu ošetřeného Inf V13K/A14T aplikace GSNO tvorbu nekroz 24 hodin po aplikaci elicitinu významně potlačila (obr. 32). Ani po 48 hodinách nedošlo k většímu rozvoji nekrotických ploch v místě aplikace Inf V13K/A14T a GSNO. Obdobný trend byl pozorován u listů rostlin z fytotronu i skleníku.



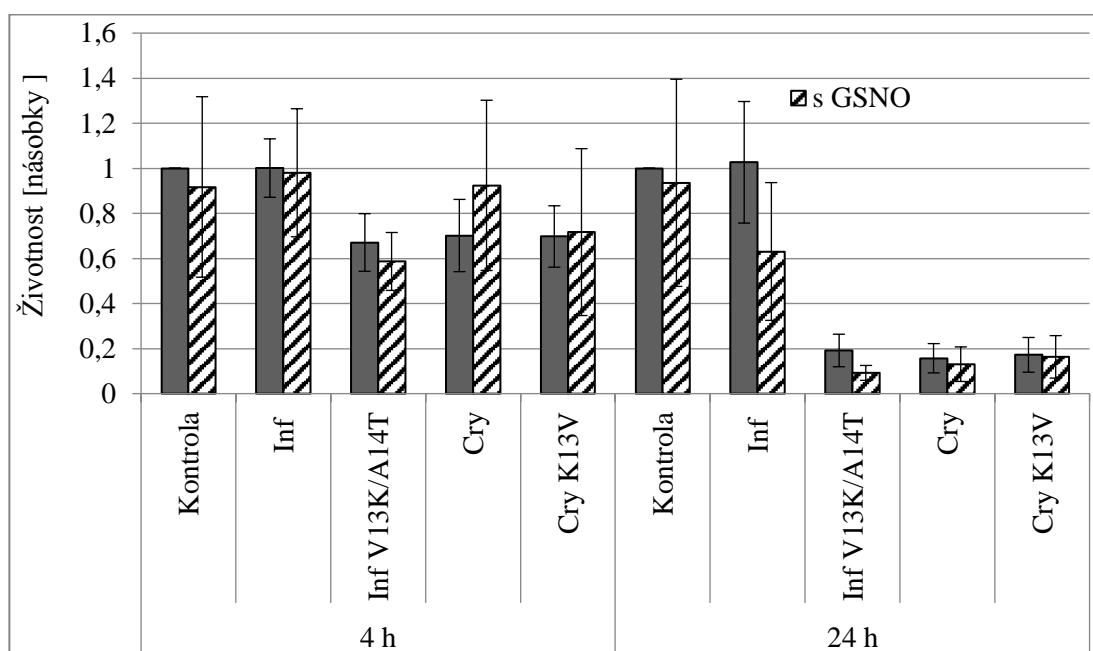
Obr. 31: Testování S-nitrosoglutathionu (GSNO) – tvorba nekrozy u *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Fotografická dokumentace listů, případně tvorby nekroz a grafické vyhodnocení intenzity tvorby nekrozy (plocha s nekrotickou reakcí/plocha s tlakově infiltrovanou látkou). 24 h po aplikaci elicitinů. Rostliny pěstované v A - fytotronu, B - skleníku. Aplikace GSNO o koncentraci 0,1; 0,4; 1; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 10 mmol/l.



Obr. 32: Testování vlivu S-nitrosaglutathionu (GSNO) na schopnost elicitinů indukovat tvorbu nekrozy u *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Fotografická dokumentace listů, případně tvorby nekroz a grafické vyhodnocení intenzity tvorby nekrozy (plocha s nekrotickou reakcí/ploše s tlakově infiltrovanou látkou). Rostliny pěstované ve skleníku. 24 h po aplikaci elicitinů. Aplikace 3,5 mmol/l GSNO, 100 nmol/l elicitin. Označení aplikovaných látek: 1) voda, 2) Cry, 3) Cry + GSNO, 4) GSNO, 5) Cry K13V, 6) Cry K13V + GSNO, 7) Inf, 8) Inf + GSNO, 9) Inf V13K/A14T, 10) Inf V13K/A14T + GSNO.

4.3.2 Vliv na životnost buněčné suspenze

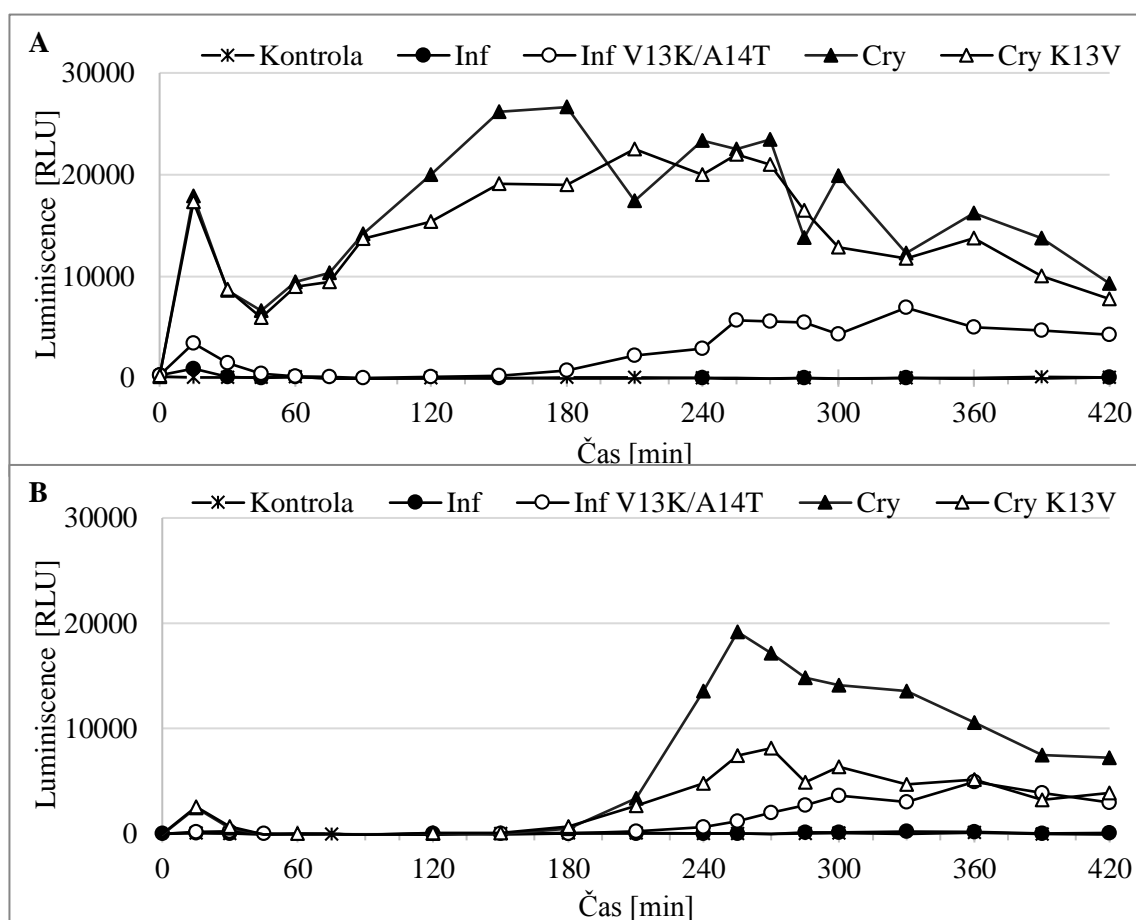
V orientačních experimentech byl nejprve testován možný negativní účinek GSNO na životnost buněčné suspenze v rozmezí 0,1-1 mmol/l koncentrace. Nejvyšší koncentrace 1 mmol/l neměla ani po 24 hodinách negativní vliv na životnost, proto byla vybrána pro hodnocení vlivu GSNO na účinek elicitinů. Čtyři hodiny po aplikaci elicitinů a GSNO k buněčné suspenzi nebyl detekován významný vliv GSNO na životnost buněk kontrolních ani po elicitaci (obr. 33). Měření lze vzhledem k poměrně velkým směrodatným odchylkám považovat spíše za orientační. Pouze u Inf a jeho mutantní formy Inf V13K/A14T byl pozorován negativní vliv GSNO na životnost 24 hodinách po zahájení experimentu.



Obr. 33: Vliv elicitinů a aplikace S-nitrosoglutathionu (GSNO) na životnost buněčné suspenze *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Životnost sledována ve 4. a 24. hodině po aplikaci elicitinů metodou s FDA. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l a GSNO 1 mmol/l. GSNO aplikováno 10 minut před přidáním elicitinů. V grafu šrafované označení – aplikace elicitinu s GSNO.

4.3.3 Vliv na produkci ROS

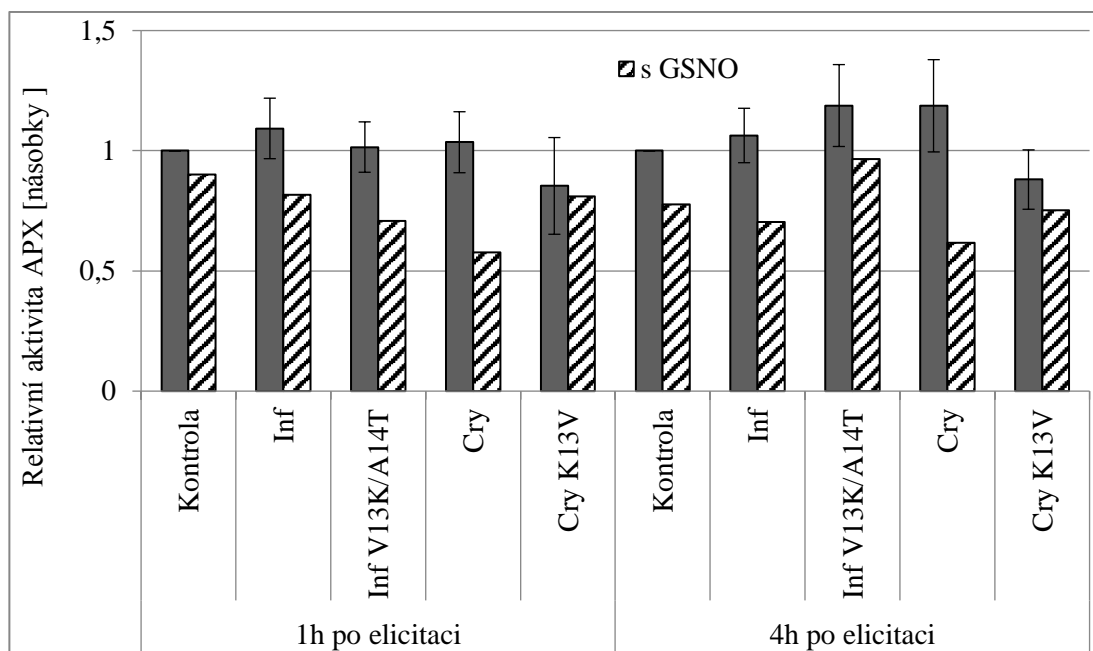
Po aplikaci GSNO k buněčné suspenzi byla téměř zcela potlačena první fáze produkce ROS, ke které dochází působením elicitinů, a to zejména Cry a jeho mutantní formy Cry K13V (obr. 34). Ve vzorcích ošetřených GSNO a elicitinu dochází k nárůstu produkce ROS až od 180 min. Maximální produkce ROS ve druhé fázi po elicitaci Cry byla ve 180 min. U buněk současně ošetřených Cry a GSNO byla doba maximální produkce posunuta k 250 min. V buněčné suspenzi s Cry K13V a GSNO je produkce ROS v druhé fázi přibližně třikrát nižší v porovnání se suspenzí ošetřenou pouze Cry K13V.



Obr. 34: Vliv S-nitrosoglutathionu (GSNO) na schopnost elicitinů indukovat produkci ROS v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Detekce luminolem. Produkce sledována v intervalech 15-30 minut po dobu 420 minut. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l, GSNO 1 mmol/l. GSNO aplikováno 10 minut před přidáním elicitinů. A – produkce ROS po aplikaci elicitinů. B – produkce ROS po aplikaci GSNO a elicitinů.

4.3.4 Vliv na aktivitu askorbátperoxidasy

Obecně lze konstatovat, že aplikace GSNO měla negativní vliv na APX aktivitu u kontrolních buněk i u buněk vystavených působení elicitinů 1 i 4 h po zahájení experimentu. Největší inhibiční efekt GSNO byl pozorován v případě buněk ošetřených Cry a nejmenší v případě elicitace Cry K13V.

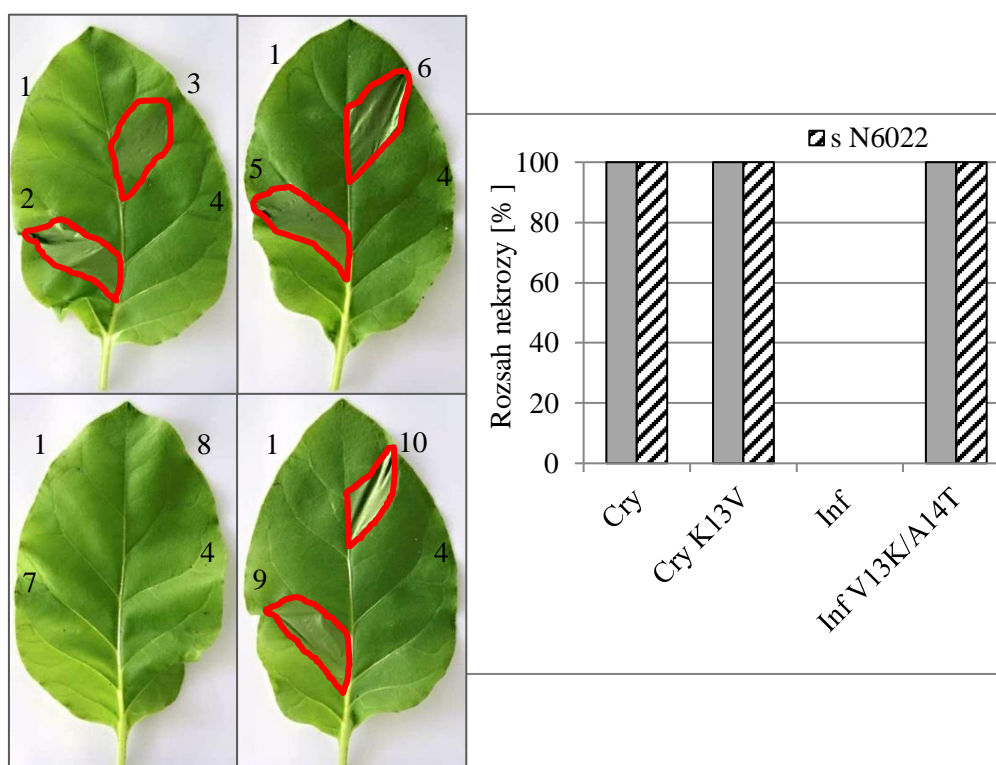


Obr. 35: Vliv aplikace S-nitrosoglutathionu (GSNO) a elicitinů na aktivitu APX v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Aktivita byla měřena v buňkách 1 a 4 h po aplikaci elicitinů. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l, GSNO 1 mmol/l. GSNO aplikováno 10 minut před přidáním elicitinů.

4.4 Vliv inhibitoru S-nitrosoglutathionreduktasy N6022 na působení elicitinů

4.4.1 Vliv na nekrotickou aktivitu v tabákových listech

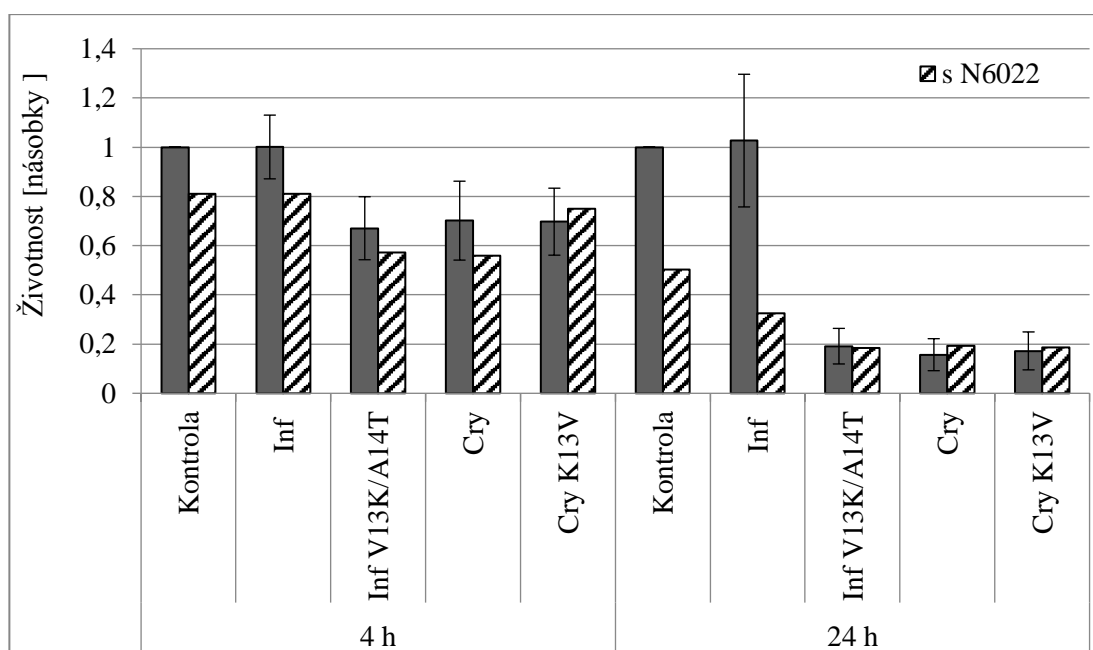
Sloučenina N6022 je prokázaným inhibitorem enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR). GSNOR katalyzuje přeměnu GSNO na oxidovaný glutathion (GSSG) a hydroxylamin. V prvních orientačních experimentech byl testován vliv N6022 na tvorbu nekrozy na listech *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Po aplikaci N6022 ve zvolené koncentraci 0,1 – 100 $\mu\text{mol/l}$ do listu nedocházelo k tvorbě nekrozy. Aplikace inhibitoru N6022 v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ neměla žádný vliv na nekrotickou aktivitu elicitinů v listech rostlin pěstovaných ve fytotronu ani ve skleníku (obr. 36).



Obr. 36: Testování vlivu inhibitoru S-nitrosoglutathionreduktasy (N6022) na schopnost elicitinů indukovat tvorbu nekrozy u *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Fotografická dokumentace listů, případně tvorby nekroz a grafické vyhodnocení intenzity tvorby nekrozy (plocha s nekrotickou reakcí/plocha s tlakově infiltrovanou látkou). Rostliny pěstované ve skleníku. 24 h po aplikaci elicitinů. Aplikace 100 $\mu\text{mol/l}$ N6022, 100 nmol/l elicitin. Označení aplikovaných látek: 1) voda, 2) Cry, 3) Cry + N6022, 4) N6022, 5) Cry K13V, 6) Cry K13V + N6022, 7) Inf, 8) Inf + N6022, 9) Inf V13K/A14T, 10) Inf V13K/A14T + N6022.

4.4.2 Vliv na životnost buněčné suspenze

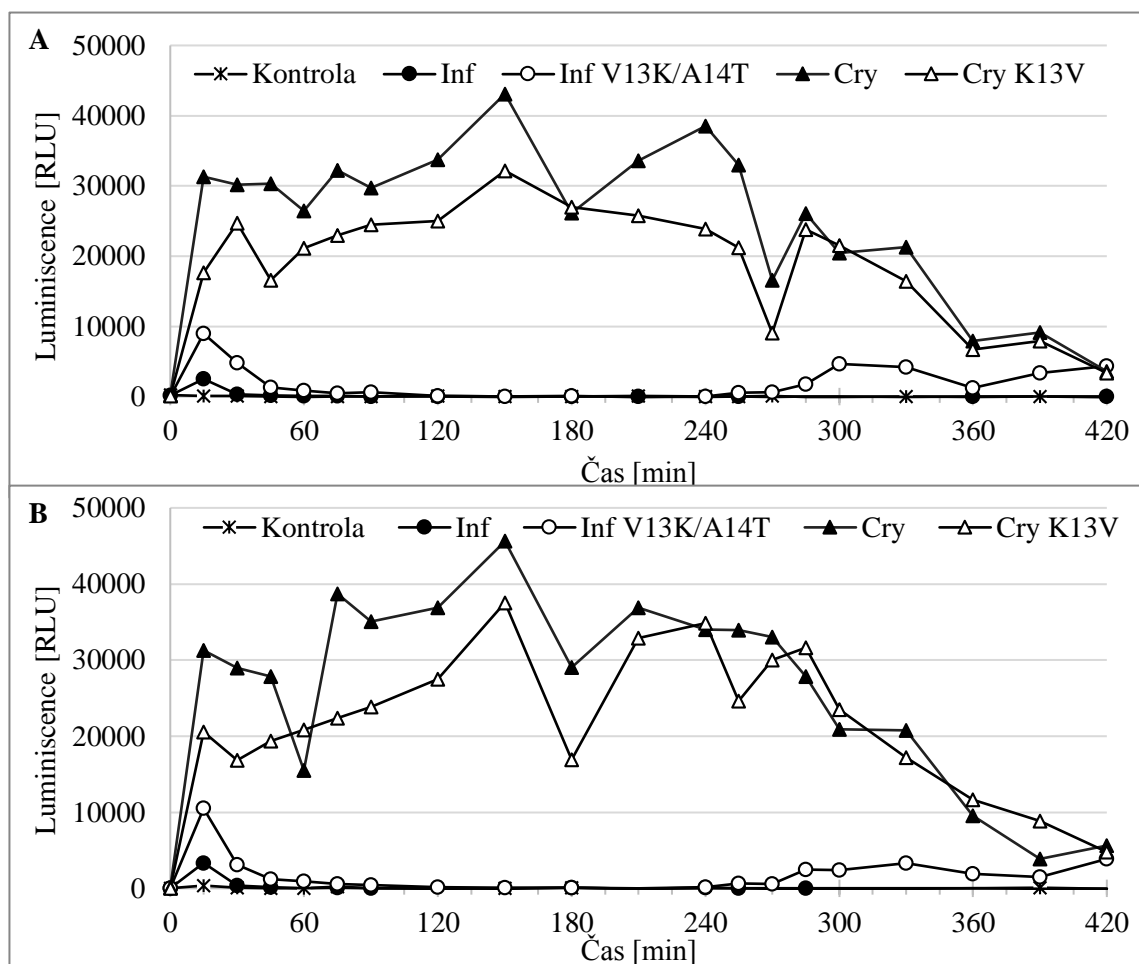
Pro stanovení účinku N6022 na tabákovou buněčnou suspenzi byla vybrána koncentrace 1 $\mu\text{mol/l}$ N6022 podle diplomové práce Jendrišáková (2015), kde aplikace této koncentrace způsobovala pokles GSNOR aktivity v buněčných suspenzích *N. tabacum* L. cv. Xanthi přibližně na 40 % původní aktivity. Aplikace N6022 měla 1 h po zahájení experimentu srovnatelný negativní efekt na kontrolní tabákové buňky i buňky vystavené působení elicitinů. Došlo k cca 20% poklesu životnosti (obr. 37). Vyjímkou byly pouze buňky po aplikaci Cry K13V, jejichž životnost přítomnost N6022 neovlivnila. Po 24 h od aplikace testovaných látek se inhibiční efekt N6022 výrazně prohloubil v případě kontrolních buněk (pokles životnosti o 50%) a u buněk po elicitaci Inf (pokles životnosti o 70%).



Obr. 37: Vliv elicitinů a aplikace inhibitoru S-nitrosoglutathionreduktasy (N6022) na životnost buněčné suspenze *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Životnost sledována ve 4. a 24. hodině po aplikaci elicitinů metodou s FDA. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l a N6022 1 $\mu\text{mol/l}$. N6022 aplikováno 10 minut před přidáním elicitinů. V grafu šrafované označení – aplikace elicitinu s N6022.

4.4.3 Vliv na produkci ROS

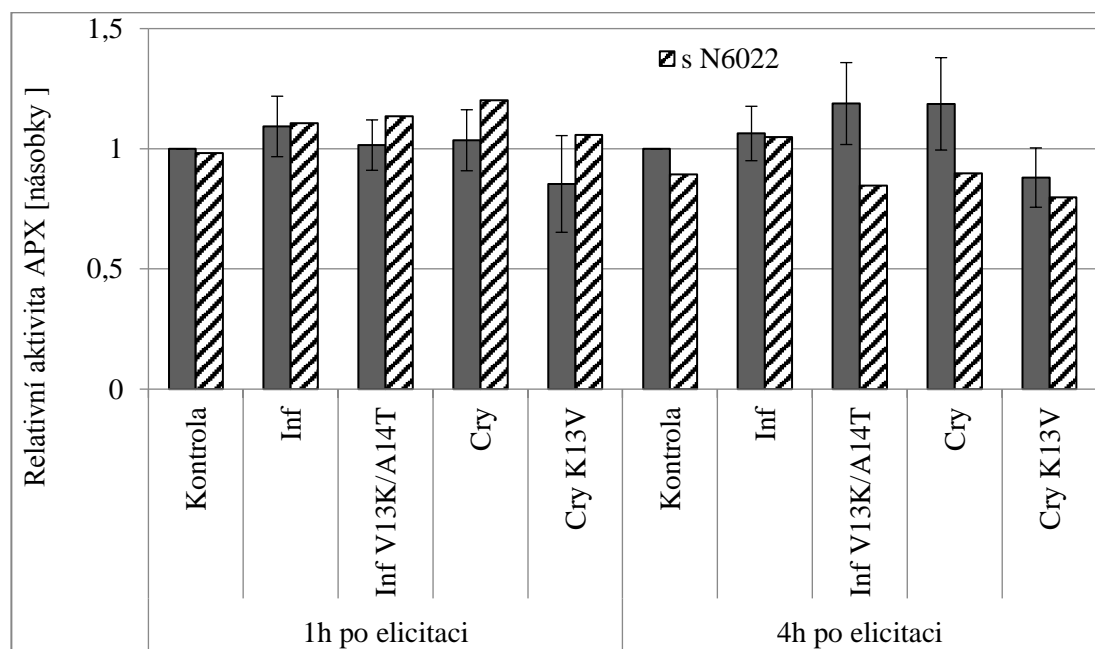
Inhibitor N6022 neovlivnil produkci ROS vyvolanou po aplikaci testovaných elicitinů (obr. 38).



Obr. 38: Vliv inhibitoru S-nitrosoglutathionreduktasy (N6022) na schopnost elicitinů indukovat produkci ROS v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Detekce luminolem. Produkce sledována v intervalech 15-30 minut po dobu 420 minut. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l, N6022 1 μ mol/l. N6022 aplikováno 10 minut před přidáním elicitinů. A - produkce ROS po aplikaci elicitinů. B - produkce ROS po aplikaci N6022 a elicitinů.

4.4.4 Vliv na aktivitu askorbátperoxidasy

Dle orientačních výsledků přítomnost inhibitoru N6022 1 hodinu po aplikaci všech testovaných elicitinů měla pozitivní efekt na aktivitu APX (cca 12-20 % navýšení aktivity APX). Aktivita APX v kontrolních buňkách nebyla ovlivněna přítomností N6022. Ve 4. hodině po elicitaci tabákových buněk byla detekována po aplikaci N6022 naopak snížená aktivita APX (cca o 10-30%). N6022 neměl vliv na APX aktivitu buněk po elicitaci Inf.



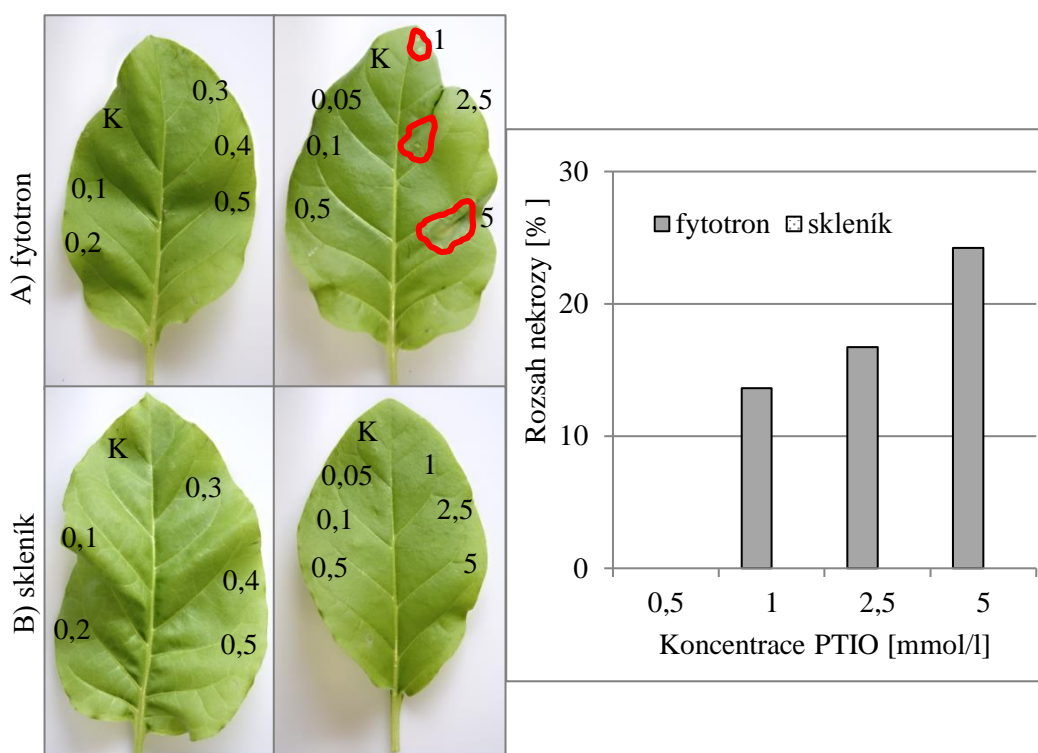
Obr. 39: Vliv aplikace inhibitoru S-nitrosoglutathionreduktasy (N6022) a elicitinů na aktivitu APX v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Aktivita byla měřena v buňkách 1 a 4 h po aplikaci elicitinů. Koncentrace elicitinů 5 nmol/l, N6022 1 μ mol/l. N6022 aplikováno 10 minut před přidáním elicitinů.

4.5 Vliv lapače oxidu dusnatého PTIO na působení elicitinů

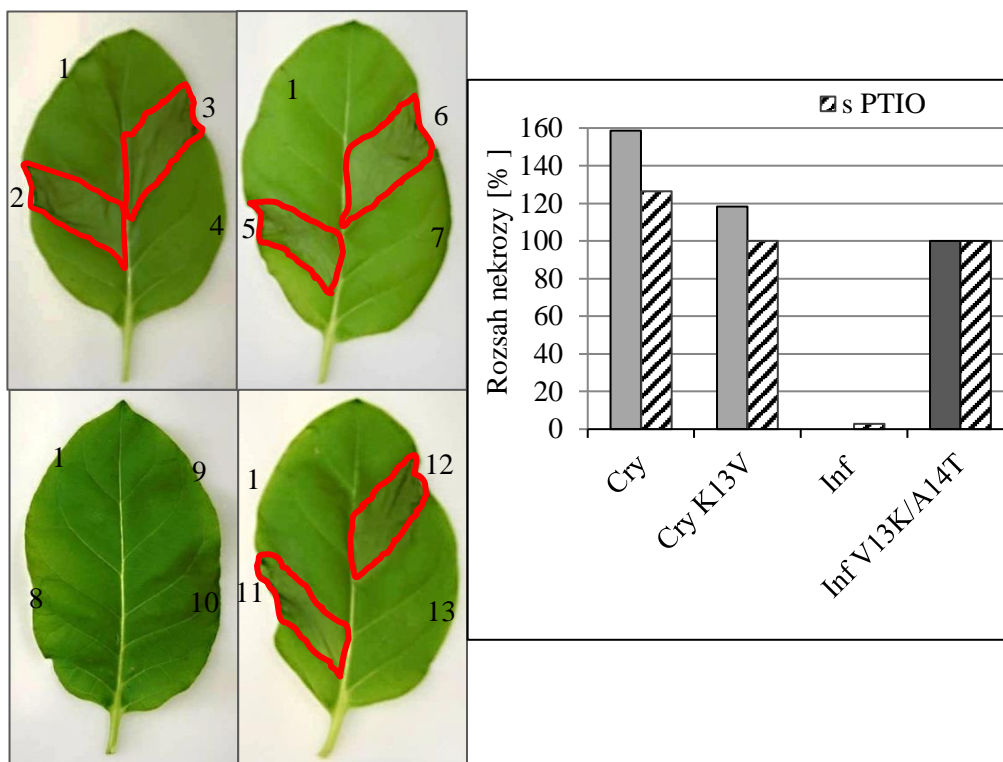
4.5.1 Vliv na nekrotickou aktivitu v tabákových listech

Jako poslední byl testován vliv látky PTIO, lapače oxidu dusnatého. Vysoké koncentrace PTIO způsobovaly v listech tabáku z fytotronu nekrozy, proto byla vybrána jako nejvhodnější koncentrace 0,5 mmol/l (obr. 40).

Byl posouzen vliv 0,5 mmol/l koncentrace PTIO na nekrotické účinky elicitinů. V listech rostlin ze skleníku vedla aplikace PTIO k menšímu rozvoji nekrotické plochy 24 hodin po infiltraci Cry a Cry K13V. Po aplikaci Inf V13K/A14T došlo působením PTIO k úplnému zastavení nekrotického účinku elicitinu. Po 48 hodinách byla plocha s PTIO a Inf V13K/A14T stále bez nekroz a u Cry a Cry K13V k dalšímu rozšíření nekrotické plochy téměř nedošlo. V rostlinách z fytotronu byl účinek PTIO obdobný, u Cry a Cry K13V došlo k mírnému potlačení nekrotického účinku 24 hodin po jejich aplikaci (obr. 41). Při současné aplikaci PTIO a Inf V13K/A14T nebylo pozorováno zastavení nekrotické aktivity.



Obr. 40: Testování lapače oxidu dusnatého (PTIO) – tvorba nekrozy u *N. tabacum* L. cv. Xanthi. 24 h po aplikaci PTIO. Rostliny pěstované v A) fytotronu, B) skleníku. Aplikace PTIO o koncentraci 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2,5; 5 mmol/l.



Obr. 41: Testování vlivu lapače oxidu dusnatého (PTIO) na schopnost elicitinů indukovat tvorbu nekrozy u *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Rostliny pěstované ve fytotronu. 24 h po aplikaci elicitinů. Aplikace 0,5 mmol/l PTIO, 100 nmol/l elicitinů. Označení aplikovaných látek: 1) voda, 2) Cry, 3) Cry + PTIO, 4) PTIO, 5) Cry K13V, 6) Cry K13V + PTIO, 7) Inf, 8) Inf + PTIO 9) Inf V13K/A14T, 10) Inf V13K/A14T + PTIO.

5 Diskuze

5.1 Nekrotická aktivita elicitinů

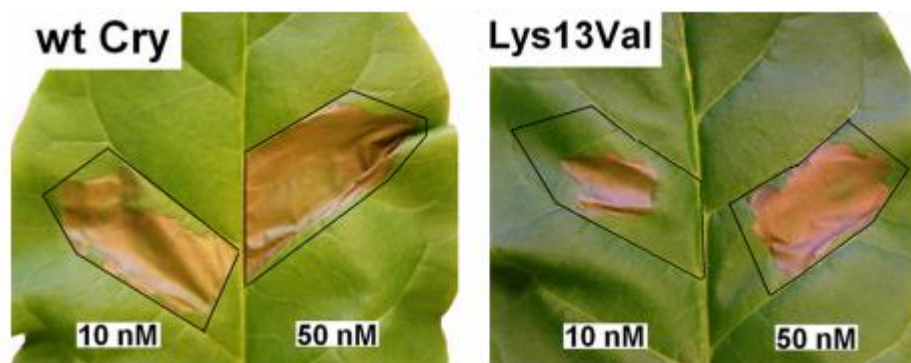
Elicitiny jsou proteinové elicitory produkované organismy rodu *Phytoththora* a *Pythium*. Tyto proteiny jsou rozpoznávány řadou rostlin a jsou schopny aktivovat obrannou reakci (Derevnina *et al.*, 2016). Elicitiny se dělí do tří základních tříd podle délky aminokyselinové sekvence a podtříd dle jejich isoelektrického bodu (Oswald *et al.*, 2014). Třída I zahrnuje elicitory s 98 aminokyselinami. S nekrotickou aktivitou je úzce spojena pozice 13 v primární struktuře elicitinů. Bazické elicitory podtřídy Iβ obsahují v této pozici hydrofobní lysin a jsou vysoce nekroticky aktivní. Kyselé elicitory podtřídy Iα mají nízkou nekrotickou aktivitu a v pozici 13 obsahují hydrofilní valin. Pro indukci nekrozy u tabáku je potřeba aplikovat až stonásobně větší koncentrace elicitinů Iα v porovnání s elicitory Iβ (Pernollet *et al.*, 1993; Fefeu *et al.*, 1997). Nejlépe prostudovanými elicitory jsou Cry a Inf, které jsou původem z patogenu *Phytophthora cryptogea*, respektive *Phytophthora infestans*. Řada publikovaných prací se zabývala studiem vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou elicitinu Cry pomocí přípravy mutantních forem tohoto proteinu (Osman *et al.*, 2001b; Lochman *et al.*, 2005; Plešková *et al.*, 2011; Dokládál *et al.*, 2012; Sandor *et al.*, 2016; Uhlíková *et al.*, 2016).

V předložené diplomové práci byl studován vliv modifikace v poloze 13 a 84 ve struktuře elicitinů Inf a Cry na jejich schopnost indukovat obrannou reakci u rostlin. Jako modelový systém byly použity rostliny a buněčná suspenze *N. tabacum* L. cv. Xanthi, případně rostliny *N. tabacum* L. cv. Samsun. Předložená práce je součástí projektu zaměřeného na studium úlohy NO v obranném mechanismu rostlin po jejich elicítaci. Cílem práce bylo stanovení vlivu elicitinů s rozdílnou strukturou na nekrotickou aktivitu, produkci ROS a možný regulační efekt NO.

Cry je bazický elicitin s vysokou nekrotickou aktivitou a patří do podtřídy Iβ (Fefeu *et al.*, 1997). Po rozpoznání Cry tabákovými buňkami dochází např. k aktivaci proteinkinas, influxu Ca²⁺ iontů, indukci produkce ROS, efluxu aniontů a expresi obranných genů (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Intenzita nekrotického účinku Cry závisí na jeho koncentraci, ale také na typu modelové rostliny (*N. tabacum* L. cv. Xanthi, *N. tabacum* L. cv. Samsun, *N. benthamiana*) a na uspořádání experimentu - tlaková aplikace do listu (Wendehenne *et al.*, 2002), nasávání do listu (Dokládál *et al.*, 2012), aplikace do stonku (Uhlíková *et al.*, 2016) či k buněčné suspenzi (Hirasawa *et al.*, 2004). Na rostlinách *N. tabacum* L. cv. Xanthi byla po 48 h pozorována nekroza téměř na celé

ploše ošetřené 10 a 50 nmol/l Cry (Plešková *et al.*, 2011). Obdobně došlo k nekroze téměř celé plochy 24 h po přímé infiltraci 100 nmol/l Cry do listu *N. tabacum* L. cv. Xanthi (Wendehenne *et al.*, 2002). Dle Hirasawa *et al.* (2004) životnost tabákových buněk BY-2 klesla 4 h po aplikaci 30 nmol/l Cry na přibližně 80 % původní hodnoty, při aplikaci vyšších koncentrací byl nekrotický účinek výraznější (pokles na cca 30 % 4 h po aplikaci 1000 nmol/l Cry). V diplomové práci Jendrišáková (2015) byl pozorován pokles životnosti tabákových buněk (*N. tabacum* L. cv. Xanthi) na 50 % 4 h po aplikaci 5 nmol/l Cry. V práci Kulik *et al.* (2015) byl sledován pokles životnosti přibližně na 50 % 24 hodin po aplikaci 100 nmol/l Cry k buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Obdobný účinek na buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi byl pozorován 24 h po aplikaci 10 nmol/l Cry (pokles životnosti na 60 %; Lochman *et al.*, 2005), 25 nmol/l Cry (pokles životnosti na cca 30 %; Wendehenne *et al.*, 2002), 50 nmol/l Cry (pokles životnosti téměř na 0 %; Lamotte *et al.*, 2004). V našich experimentech byl detekován 4 h po aplikaci 5 nmol/l Cry na buněčnou suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi pokles životnosti na cca 70 % a po 24 h cca 15 %. Výsledky předložené diplomové práce jsou srovnatelné s dosud publikovanými studiemi, které se zabývaly studiem biologické aktivity Cry.

U Cry vede záměna lysinu v pozici 13 za valin ke ztrátě kladného povrchového náboje v místě mutace. Mutant má výrazně sníženou schopnost přenášet steroly přes membrány a vázat je do své hydrofobní dutiny. Ve studii Plešková *et al.* (2011) byl patrný významný rozdíl v nekrotické aktivitě Cry a jeho mutantní formy Cry K13V při použité koncentraci 10 nmol/l v listech 9týdenní rostliny *N. tabacum* L. cv. Xanthi (obr. 42). Při aplikaci koncentrace 50 nmol/l byl nekrotický účinek Cry K13V srovnatelný s Cry. S touto studií korelují výsledky předložené diplomové práce, kdy byl v listech 8týdenních rostlin při použité koncentraci 100 nmol/l pozorován statisticky nevýznamný mírný pokles nekrotického účinku Cry K13V v porovnání s Cry. Ve studii Hirasawa *et al.* (2004) byl 4 h po aplikaci mutantní formy Cry K13V o koncentraci 500 nmol/l pozorován pokles životnosti tabákových buněk BY-2 o přibližně 30%. 4 h po přidavku Cry o koncentraci 500 nmol/l byl pozorován pokles životnosti o 50 %. Životnost byla detekována podobně jako v naší studii spektrofluorimetrickou metodou využívající FDA. Naše výsledky poukazují na výrazný negativní vliv Cry K13V na životnost buněk *N. tabacum* L. cv. Xanthi již při koncentracích 5 nmol/l, který byl srovnatelný s efektem po aplikaci Cry.



Obr. 42: Fotografická dokumentace indukce nekroz po aplikaci elicitinů. Fotografie listů byly pořízeny 24 hodin po aplikaci 10 nmol/l a 50 nmol/l elicitinů (převzato z Plešková *et al.*, 2011).

Ve studii Dokládal *et al.* (2012) bylo zjištěno, že záměna valinu v pozici 84 za fenylalanin vede u Cry ke ztrátě jeho schopnosti vázat steroly. Mutant Cry V84F v suspenzní kultuře *N. tabacum* L. cv. Xanthi indukoval produkci ROS téměř ve stejné míře jako Cry. Mutantní protein v koncentraci 250 nmol/l, aplikovaný nasáváním do listů *N. tabacum* L. cv. Xanthi vykazoval nižší nekrotickou aktivitu než Cry (Dokládal *et al.*, 2012). V naší studii byla naopak pozorována mírně zvýšená nekrotická aktivita po tlakové infiltraci 100 nmol/l Cry V84F do listů *N. tabacum* L. cv. Xanthi v porovnání s aplikací Cry. V případě elicítace *N. tabacum* L. cv. Samsun byla detekována cca o 20 % menší nekrotická aktivita v porovnání s působením Cry. Zvýšený nekrotický účinek Cry V84F na listech *N. tabacum* L. cv. Xanthi byl potvrzen vyšší ztrátou životnosti (o 40 %) 4 h po aplikaci 5 nmol/l Cry V84F k buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi v porovnání s Cry.

Inf je elicitin třídy Ia produkovaný patogenem *P. infestans* a jeho pI má hodnotu 4,7 (Huet *et al.*, 1993). V rostlinách rodu *Solanum* po aplikaci 100 nmol/l Inf nedochází k hypersenzitivní reakci doprovázené nekrotickou aktivitou. U rodu *Nicotiana* však nekrozy v reakci na elicitin byly pozorovány (Kamoun *et al.*, 1997a; Kawamura *et al.*, 2009). V listech rostlin *N. benthamiana* způsobuje Inf v koncentraci 1000 nmol/l nekrozy 3 dny po aplikaci (Yoshioka *et al.*, 2003). 24 hodin po aplikaci 50 nmol/l Inf k tabákovým buňkám BY-2 byl pozorován 4násobný nárůst buněčné smrti ve srovnání s kontrolním vzorkem (Yamamoto *et al.*, 2004). V tabákových buňkách BY-2 byl pozorován mírný nárůst buněčné smrti až 24 hodin po aplikaci 150 nmol/l Inf (Uruma *et al.*, 2009). V předložené diplomové práci byl pozorován negativní vliv Inf na životnost tabákových buněk *N. tabacum* L. cv. Xanthi až při koncentraci 500 nmol/l, kdy po 24 h po aplikaci Inf došlo k 80% ztrátě životnosti. Vliv mutace v poloze 13 a 84 Inf nebyl dosud studován. Obě mutace významně ovlivnily životnost buněk. Bylo pozorováno cca 30% snížení

životnosti 4 h po aplikaci obou mutantních forem Inf. Po 24 h byla ztráta životnosti intenzivnější v případě aplikace Inf V13K/A14T.

Při tlakové infiltraci elicitinů do listů dochází k jejich rozšíření v menší míře také do oblastí 3 mm vzdálených od místa infiltrace (Uhlíková *et al.*, 2016). Toto zjištění koreluje s výsledky předložené práce, kdy byla v některých případech pozorována tvorba nekroz i v oblastech obklopujících infiltrovanou plochu.

5.2 Úloha NADPHoxidasy a ROS v obranné reakci rostlin

Hlavní enzym, který se podílí na produkci ROS za fyziologických podmínek i v reakci na stresové faktory, je NADPHoxidasa. Dalšími enzymy jsou peroxidasy buněčné stěny, oxalátoxidasa a aminoxidasa (Lamb a Dixon, 1997). Produkce ROS po napadení rostliny patogenem probíhá ve dvou fázích, kdy první fázi produkce ROS zajišťují enzymy již přítomné v daném okamžiku v buňce. Další fáze pak závisí na schopnosti rostliny v reakci na patogen aktivovat obranné mechanismy vedoucí k syntéze nových proteinů s enzymovou aktivitou v buňce. Tento jev je označován jako oxidativní vzplanutí (Chai a Doke, 1987). Obě tyto fáze mohou být aktivovány elicitinem. Nejprve dochází k navázání elicitinu na specifický receptor v cytoplazmatické membráně buňky, kdy dojde k influxu Ca^{2+} iontů a aktivaci NADPHoxidasy v membráně. Dále je aktivována MAPK signální dráha, která aktivuje specifické transkripční faktory. Tím dojde k nárůstu exprese genů pro NADPHoxidasy. Nově syntetizované NADPHoxidasy jsou pak zodpovědné za produkci ROS v druhé fázi (Chaparro-Garcia *et al.*, 2011; Adachi *et al.*, 2015; Derevnina *et al.*, 2016; obr. 5). Aktivita NADPHoxidasy může být regulována prostřednictvím vápenatých iontů, fosforylace a NO (Yun *et al.*, 2011; Kadota *et al.*, 2015).

Dvě fáze zvýšení produkce ROS s maximy přibližně v časech 10-60 a 180-300 min byly detekovány po elicitaci buněčné suspenze *N. tabacum* L. cv. Xanthi Cry nebo mutantními formami Cry a Inf v koncentraci 5 nmol/l. V případě aplikace Inf byla detekována pouze první fáze zvýšení produkce ROS. Naše výsledky korelují s daty publikovanými v práci Kulik *et al.*, 2015, kdy byl detekován prudký nárůst produkce ROS v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi 20 minut po aplikaci 100 nmol/l Cry. Výrazný nárůst produkce ROS v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi byl detekován v časech 15-30 min po aplikaci 5, 10 a 50 nmol/l Cry (Pugin *et al.*, 1997; Bourque *et al.*, 1998; Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000; Simon-Plas *et al.*, 2002; Lochman *et al.*, 2005). Noiro *et al.* (2014) detekoval u tabákových buněk BY-2 významný nárůst

produkce ROS již 10 minut po aplikaci 50 nmol/l Cry. Hodinu po jeho aplikaci byla pozorována cca 2násobně zvýšená exprese obou genů *RBOHD1* a *RBOHD2*. V předložené práci bylo stanoveno 4 hodiny po aplikaci elicitinů významné zvýšení exprese genů pro NADPHoxidasy (*RBOHD1* a *RBOHD2*; až 16násobně po elicitaci Cry V84F). Exprese *RBOHD1* byla cca 2-4 násobně vyšší v porovnání s expresí *RBOHD2* v závislosti na typu elicitinu. Podobně jako v práci Noirot *et al.* (2014) jsme detekovali pouze cca 2násobné zvýšení exprese *RBOHD1* a *RBOHD2* hodinu po elicitaci (nepublikované výsledky). V souladu s detekovanými změnami v produkci ROS byla exprese *RBOHD1* a *RBOHD2* po elicitaci Inf nejnižší. V tabákových buňkách BY-2 byla detekována nadprodukce O_2^- 6 hodin po aplikaci 50 nmol/l Inf (Saito *et al.*, 2006). Prudký nárůst produkce ROS byl pozorován 3 hodiny po aplikaci 1000 nmol/l Inf v tabákových buňkách BY-2 (Sasabe *et al.*, 2000). V *N. benthamiana* dochází vlivem Inf k indukci produkce ROS (Asai *et al.*, 2008). Naše výsledky poukazují pouze na mírný nárůst produkce ROS v rané fázi po aplikaci Inf, případně mutantní formy Inf V84F v 5 nmol/l koncentraci. Souvislost mezi intenzitou produkce ROS a snížením životnosti buněčné suspenze lze pozorovat v předložené diplomové práci podobně jako v řadě již publikovaných studií (Hirasawa *et al.*, 2004, Kulik *et al.*, 2015). Cry V84F indukoval produkci ROS v buňkách *N. tabacum* L. cv Xanthi podobně jako Cry. Cry V84F má míru afinity ke specifickým vazebným místům na cytoplazmatické membráně tabákových buněk srovnatelnou s Cry. Schopnost Cry a Cry V84F indukovat produkci ROS a resistenci proti patogenu je tedy patrně spjata s jejich vysokou afinitou k receptorům v cytoplazmatické membráně (Dokládál *et al.*, 2012). U tabákových buněk BY-2 byla potvrzena výrazná aktivace produkce ROS po aplikaci 500 nmol/l Cry, naopak Cry s mutací v poloze 13 způsobil 10-násobně nižší zvýšení hladiny ROS (Hirasawa *et al.*, 2004). V našem experimentu po aplikaci mutantní formy Cry K13V k buňkám *N. tabacum* L. cv Xanthi nebyla pozorována významně snížená produkce ROS v porovnání s působením Cry. Mutace v infestinu v poloze 13 a 84 vedou ke zvýšení jeho schopnosti aktivovat expresi NADPHoxidasy, zároveň mutacemi dochází ke zvýšené tvorbě nekroz v tabákových rostlinách a negativnímu vlivu na životnost buněčné suspenze *N. tabacum* L. cv. Xanthi. V předložené práci se nepodařilo prokázat významné změny v NADPHoxidasové aktivitě po aplikaci elicitinů k buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi. Pouze v případě elicitace Cry a Cry K13V byla detekovaná hodinu po zahájení experimentu zvýšená aktivita tohoto enzymu. Změny v aktivitě NADPHoxidasy 4 h po elicitaci nebyly zaznamenány. Protože

byla jednoznačně prokázána významně zvýšená produkce ROS a exprese genu pro NADPHoxidasu, lze předpokládat problém při přípravě vzorků případně přímo při detekci NADPHoxidasy. V rámci dalšího studia bude nutné stanovení aktivity NADPHoxidasy optimalizovat a znovu proměřit. Po elicitaci nebyly zaznamenány významné změny v APX aktivitě. 4 h po aplikaci Cry a Inf V13K/A14T bylo detekováno mírné navýšení aktivity APX. Minimální vliv Cry a mutantních forem Cry a Inf na aktivaci APX koresponduje s významným snížením životnosti buněčné suspenze a vysokou nekrotickou aktivitou po elicitaci listů v souvislosti s intenzivní produkcí ROS (oxidativní stres).

Inhibitor flavinových oxidoreduktas DPI je schopen inhibovat rostlinné NADPHoxidasy (Pugin *et al.*, 1997). DPI může inhibovat také syntasu oxidu dusnatého, xanthinoxidasu nebo komplex I dýchacího řetězce v mitochondriích (Tazzeo *et al.*, 2009). DPI inhibuje oxidasovou aktivitu rostlinných peroxidas (Frahry a Schopfer, 1998). Zvýšená produkce ROS v tabákových buňkách BY-2 po aplikaci 1000 nmol/l Inf byla potlačena přidavkem 500 nmol/l DPI. 24 hodin po aplikaci této koncentrace Inf byla pozorována vysoká míra buněčné smrti, přítomnost DPI životnost buněk dále snížila (Sasabe *et al.*, 2000). V buňkách *N. tabacum* L. cv. Xanthi došlo vlivem 25 μ mol/l DPI k zastavení produkce ROS po aplikaci 150 nmol/l kryptogeinu (Pugin *et al.*, 1997). Podobný jev byl pozorován i při aplikaci 10 nmol/l kryptogeinu a 10 μ mol/l DPI, respektive 100 nmol/l kryptogeinu a 5 μ mol/l DPI (Simon-Plas *et al.*, 1997; Kulik *et al.*, 2015). Aplikace DPI vede ke snížení laterální mobility RBOHD v cytoplazmatické membráně a k poklesu zastoupení dimerní formy tohoto enzymu (Hao *et al.*, 2014).

Naše výsledky korespondují s již publikovanými daty. Po aplikaci 5 μ mol/l DPI byla detekována pětinasobně snížená produkce ROS, aktivita NADPHoxidasy byla snížena více než na polovinu. Je zajímavé, že 4 h po aplikaci elicitinů byla detekována cca zdvojnásobená exprese genu pro NADPHoxidasu (*RBOHD1* a *RBOHD2*) v reakci na přítomnost DPI. Při aplikaci DPI nebyl pozorován vliv na nekrotickou aktivitu elicitinů, v případě detekce životnosti tabákových buněk byl vliv DPI negativní. Aplikace DPI vedla k mírnému snížení aktivity APX 1 hodinu po elicitaci, naopak 4 hodiny po působení elicitinů byla aktivita vlivem DPI zvýšená.

ROS jsou toxickými produkty metabolismu. Mohou způsobovat oxidaci lipidů, proteinů a DNA, což vede následně k buněčné smrti. V předložené diplomové práci se podařilo prokázat souvislost mezi hladinami ROS a intenzitou buněčné smrti

v tabákových suspenzích po aplikaci elicitinů stejně jako v již publikovaných studiích (Dorey *et al.*, 1999; Sasabe *et al.*, 2000).

5.3 Úloha oxidu dusnatého v regulaci enzymů metabolismu ROS

NO hraje významnou roli v řadě procesů v rostlinách. Po napadení patogenem dochází v rostlinách k prudkému nárůstu produkce NO. Tento plynný radikál vystupuje jako důležitá signální molekula v řadě obranných mechanismů. Bylo prokázáno propojení NO se signálními drahami Ca^{2+} iontů, proteinkinas, ROS, kyseliny salicylové, jasmonové a ethylenu. NO reguluje expresi řady obranných genů a ovlivňuje aktivitu proteinů prostřednictvím S-nitrosylace a nitrace (Kulik *et al.*, 2015). K nadprodukcí NO dochází také vlivem působení elicitinů (Lamotte *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004; Vitecek *et al.*, 2008).

V předložené práci byla studována úloha NO a vzájemný vztah NO a ROS v regulaci obranných mechanismů na modelovém systému *N. tabacum* L. cv. Xanthi s využitím aplikace donoru NO (GSNO), inhibitoru enzymu GSNOR (N6022) a lapače NO (PTIO). Z časových důvodů, způsobených kontaminací tabákové buněčné suspenze, nebyly realizovány všechny plánované experimenty s lapačem NO, které musí být pro kompletní ukončení studie následně doměřeny.

Po aplikaci 1 mmol/l GSNO byla po elicitaci plně zainhibována produkce ROS v první fázi. Aktivita NADPHoxidas může být inhibována S-nitrosylací cysteinu v pozici 890 (Yun *et al.*, 2011). Potvrzení předpokládané negativní regulace NADPH oxidasy S-nitrosylací po elicitaci v prostředí GSNO bude cílem následující studie. V předložené diplomové práci byla v buněčné suspenzi ošetřené GSNO detekovaná po elicitaci pouze druhá fáze produkce ROS, kdy k produkci ROS došlo až 200 min po elicitaci a maxima bylo dosaženo v případě Cry 255 min po zahájení experimentu. Celkově byla produkce ROS výrazně nižší v porovnání s kontrolní buněčnou suspenzí (bez GSNO) vystavenou působení elicitinů. Ve druhé fázi se na produkci ROS podílí nově produkované enzymy s NADPHoxidasovou aktivitou, které vznikají v důsledku aktivace exprese obranných genů po interakci rostlinné buňky s elicitinem, kdy významnou roli vedle kinas, Ca^{2+} iontů má i H_2O_2 . GSNO je nestabilní a na světle se rozkládá. Koncentrace GSNO může být snížena i v důsledku aktivity enzymu GSNOR, kdy z GSNO vzniká oxidovaný glutathion a hydroxylamin. Vlivem NO dochází k S-nitrosylaci řady dalších proteinů zapojených v obranné reakci rostlin. Takovým proteinem je například SABP3 (Salicylic acid-binding protein 3), který je významný

při spuštění signální dráhy kyseliny salicylové. Obdobně je S-nitrosylací proteinu NPR1 inhibována exprese odpovídajících obranných genů (Yu *et al.*, 2014).

NO může ovlivňovat celkové hladiny ROS v buňce také regulací řady enzymů vykazujících antioxidační aktivitu. NO je ovlivněna například aktivita katalasy. NO reguluje také aktivitu enzymů askorbát-glutathionového cyklu jako je APX, MDHAR a DHAR (Begara-Morales *et al.*, 2015). Několik studií pozorovalo zvýšenou aktivitu vlivem NO a S-nitrosylace na APX z hrachu setého, huseníčku rolního a hlízek kořenů sóji (Begara-Morales *et al.*, 2014; Correa-Aragunde *et al.*, 2013; Keyster *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015). Clark *et al.*, 2000 prokázal *in vitro* inhibici tabákové APX a katalasy vlivem donorů NO. *In vivo* inhibice S-nitrosylací byla prokázána v tabákových buňkách BY-2 vystavených teplotnímu stresu a peroxidu vodíku (de Pinto *et al.*, 2013). Tato zjištění odpovídají výsledkům v předložené diplomové práci, kdy byla naměřena snížená aktivita APX 4 hodiny po aplikaci elicitinů a GSNO. Je zajímavé, že aplikace GSNO neovlivnila významně negativní efekt elicitinů na životnost buněk 4 h po elicitaci. Pouze v případě Cry byla životnost v přítomnosti GSNO mírně zvýšená, ale protože měření bylo zatíženo velkou chybou, je nutné tento efekt ověřit. Čtvrtou hodinu po elicitaci byla prokazatelně snížena životnost buněk v prostředí GSNO. NO ovlivňuje také aktivitu peroxiredoxinu II E. Tento enzym přeměňuje peroxodusitan na dusitan. S-nitrosylací je inhibován peroxiredoxin II E, čímž dochází k akumulaci toxického peroxodusitanu (Yu *et al.*, 2014).

NO hraje klíčovou roli při indukci buněčné smrti po aplikaci elicitinů. V tabákových buňkách byl pozorován částečný pokles buněčné smrti indukované Cry nebo Inf vlivem aplikace lapače NO cPTIO (Lamotte *et al.*, Yamamoto *et al.*, 2004; Kulik *et al.*, 2015). Pro vyvolání buněčné smrti je nutná současná nadprodukce NO a ROS; samotný NO není schopen indukovat buněčnou smrt (de Pinto *et al.*, 2002).

Aplikace inhibitoru enzymu GSNOR N6022 významně neovlivnila produkci ROS v tabákových buňkách. Po aplikaci inhibitoru GSNOR lze předpokládat vyšší hladinu NO v buňkách a s tím spojenou větší míru regulace NADPH oxidasy S-nitrosylací. V předběžných experimentech s lapačem PTIO (nepublikované výsledky) nebyl rovněž detekován pokles produkce ROS po elicitaci. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že hladina NO po elicitaci není tak vysoká, aby se podílela významně na negativní regulaci NADPH oxidasy. V práci Kulik *et al.* (2015) byla vlivem 0,5 mmol/l cPTIO detekována zvýšená produkce ROS v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi 40 minut po aplikaci 100 nmol/l Cry. Nepatrný nárůst produkce ROS

byl pozorován také působením 0,5 mmol cPTIO na suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi po aplikaci 50 nmol/l Cry (Lamotte *et al.*, 2004).

V buňkách může docházet také k reakci NO s O_2^- za vzniku toxického peroxodusitanu (ONOO⁻). Peroxodusitan je schopen regulovat aktivitu některých enzymů nitrací. V tabákových buňkách BY-2 byl detekován prudký nárůst produkce ONOO⁻ po aplikaci Inf a současné zvýšené zastoupení nitrovaných proteinů (Saito *et al.*, 2006). Zvýšená produkce ONOO⁻ byla měřena i po aplikaci kryptogeinu k buňkám *N. tabacum* L. cv. Xanthi (Kulik *et al.*, 2015). Negativní regulace nitrací byla pozorována u APX a MDHAR (Begara-Morales *et al.*, 2015). V *A. thaliana* byla po napadení patogenem detekována nitrace proteinů podílejících se na fotosyntéze, glykolýze a asimilaci nitrátu (Ceconi *et al.*, 2009).

V navazujících experimentech by bylo vhodné použít místo PTIO jeho modifikovanou formu cPTIO, která má větší prostupnost do buňky.

5.4 Vliv modifikace struktury elicitinů na schopnost elicitace

Jedním z cílů diplomové práce bylo porovnat účinky bazického (nekrotizujícího) Cry a kyselého Inf a jejich mutantních forem s mutací v poloze 13. Jak vyplývá z přehledné tabulky 6, Inf v buněčné suspenzi *N. tabacum* L. cv. Xanthi neaktivuje produkci ROS, nedochází ke změnám APX aktivity a nebyl zaznamenán vliv na životnost buněk. Po elicitaci bylo detekováno mírné navýšení exprese genu pro NADPH oxidasy, což se ale neprojevovalo na produkci ROS. Cry, který je zástupcem elicitinů Iβ třídy, naopak stimuloval produkci ROS již v první fázi (tj. do 1 h po elicitaci) a ještě větší produkce ROS spojená s významně navýšenou expresí genů pro NADPH oxidasy byla detekovaná v druhé fázi (4 h po elicitaci). Aktivita APX (součást antioxidantního systému) byla pouze mírně zvýšená. V důsledku oxidativního stresu došlo k významnému poklesu životnosti buněk. Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanou charakteristikou Inf a Cry (Kamoun *et al.*, 1997a; Fefeu *et al.*, 1997). Mutace Inf v poloze 13 významně změnila vlastnosti tohoto elicitinu. Byla detekovaná zvýšená produkce ROS v obou sledovaných časech a 4 h po elicitaci byla detekovaná významně zvýšená exprese RBOHD1. Opět lze dát do souvislosti zvýšenou produkci ROS a vysokým snížením životnosti buněk. Mezi Cry a jeho mutantní formou Cry K13V nebyly ve sledovaných parametrech detekovány významné rozdíly.

Tab. 6: Vliv mutací v elicitech Inf a Cry na sledované parametry v časech 1 a 4 h po jejich aplikaci k buněčným suspenzím *N. tabacum* L. cv. Xanthi. *Nepublikované výsledky

	Změna	Inf	Inf V13K/A14T	Cry	Cry K13V
1 h	produkce ROS	-	↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑
	exprese <i>RBOHD1</i> *	↑	↑	-	-
	exprese <i>RBOHD2</i> *	↑	↑	-	-
	aktivity APX	-	-	-	↓
4 h	produkce ROS	-	↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑
	exprese <i>RBOHD1</i>	↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑
	exprese <i>RBOHD2</i>	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑
	aktivity APX	-	↑	↑	↓
	životnosti	-	↓↓	↓↓	↓↓

Reakce kontrolních buněk a buněk ošetřených Inf na inhibitor NADPHoxidasý DPI je srovnatelná (tab. 7). Hodinu po aplikaci DPI došlo ke snížení aktivity APX, která za další tři hodiny byla naopak významně zvýšená. U kontrolních buněk a buněk ošetřených Inf spolu s DPI byla detekována vysoká exprese *RBOHD1/2* ve srovnání s vzorky bez DPI. Zvýšená produkce ROS nebyla detekovaná pravděpodobně v souvislosti s aktivací APX. Přítomnost DPI u buněk po elicitaci Cry, Cry K13V a Inf V13K/A14T snížila produkci ROS, přes tuto skutečnost byla ztráta životnosti po aplikaci DPI ještě prohloubena.

Aplikace GSNO snížila aktivitu APX v kontrolních i elicitovaných buňkách. Největší změny byly detekovány po elicitaci Cry. GSNO potlačilo plně produkci ROS v první fázi, v druhé fázi byla produkce ROS pozorována, ale ve významně nižší intenzitě v porovnání s buňkami bez aplikace GSNO. Efekt aplikace inhibitoru GSNOR (N6022) na sledované parametry byl minimální, pouze v případě Cry a Inf V13K/A14T bylo detekováno snížení APX aktivity.

Nebyly zaznamenány změny v produkci ROS a životnosti buněk. Lze tedy předpokládat, že nedochází k tak významné produkci NO, jejíž hladina je regulována GSNOR, aby došlo k výraznému ovlivnění produkce ROS a následně životnosti buněk po elicitaci.

Tab. 7: Vliv inhibitoru NADPHoxidasy (DPI), donoru oxidu dusnatého (GSNO) a inhibitoru S-nitrosoglutathionreduktasy na produkci ROS, aktivitu APX, životnost a expresi NADPHoxidasy 1 a 4 h po aplikaci elicitinů k buněčným suspenzím *N. tabacum* L. cv. Xanthi.

	Změna	Kontr.	Inf	Inf V13K/A14T	Cry	Cry K13V
DPI/1 h	Změna produkce ROS	-	-	↓↓↓↓	↓↓↓↓	↓↓↓↓
	Změna aktivity APX	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓↓	↓
DPI/4 h	Změna produkce ROS	-	-	↓↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓↓
	Změna exprese <i>RBOHD1</i>	↑↑↑↑	↓	↑↑↑↑↑	↑	↑↑
	Změna exprese <i>RBOHD2</i>	↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑	↑↑
	Změna aktivity APX	↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑	↑	↓↓	↑↑↑↑↑
	Změna životnosti	↓	↓	↓	↓	↓
GSNO/1 h	Změna produkce ROS	-	-	↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓
	Změna aktivity APX	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓↓↓	↓
GSNO/4 h	Změna produkce ROS	-	-	↓↓↓↓↓	↓↓	↓↓↓↓↓
	Změna aktivity APX	↓↓↓	↓↓↓↓↓	↓	↓↓↓↓↓	↓
	Změna životnosti	=	=	↓	=	=
N6022/1 h	Změna produkce ROS	-	-	=	↓	↓
	Změna aktivity APX	↓				
N6022/4 h	Změna produkce ROS	-	-	=	=	=
	Změna aktivity APX	↓↓	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓
	Změna životnosti	↓	↓	↓	↓	=

6 Závěr

Z výsledků experimentální části je možno soudit, že:

- Zvýšená produkce ROS po elicitaci koresponduje s intenzivním poklesem životnosti buněk. (*Cry a mutantní formy Inf a Cry indukovaly produkci ROS a expresi NADPHoxidasy ve dvou fázích v buňkách N. tabacum L. cv. Xanthi a současně významně snížily jejich životnost. Naopak po aplikaci Inf nebyla detekována zvýšená produkce ROS ani změny v životnosti buněk.*)
- Askorbátperoxidasa nehraje významnou roli v regulaci hladiny ROS po elicitaci.
- Mutace v pozici 84 Cry i Inf vedla ke zvýšené produkci ROS spojené s vyšší expresí genů *RBOHD* a následně zvýšené nekrotické aktivitě.
- Byla potvrzena významná role aminokyselin v poloze 13 struktury elicitinů Inf a Cry, ovlivňující schopnost aktivace produkce ROS a s oxidačním stresem spojené ztráty životnosti. (*Mutace Cry v pozici 13 vedla k mírně snížené produkci ROS, což koreluje se sníženou intenzitou exprese genů RBOHD1 a 2 v porovnání s Cry. Mutace Inf v pozici 13 vedla k výraznému nárůstu nekrotické aktivity, která koresponduje se zvýšenou produkcí ROS a nadexpresí genů RBOHD1 a 2 v porovnání s Inf.*)
- Inhibice NADPHoxidasy v přítomnosti DPI vede k výraznému poklesu produkce ROS, což ukazuje na klíčovou roli tohoto enzymu v obranné reakci po rozpoznání elicitinů.
- Inhibice produkce ROS v rané fázi po aplikaci elicitinů v přítomnosti GSNO poukazuje na významnou úlohu NO při regulaci metabolismu ROS, pravděpodobně na úrovni regulace aktivity NADPHoxidasy S-nitrosylací.
- Inhibitor GSNOR neměl výraznější vliv na buněčnou smrt ani produkci ROS po aplikaci elicitinů. Otázkou zůstává, zda intenzita produkce NO po elicitaci je dostatečná a může ovlivnit proces produkce ROS např. S-nitrosylací NADPHoxidasy (lze ověřit v experimentech s lapačem NO cPTIO a detekcí intenzity S-nitrosylace metodou Biotin-Swich).

7 Seznam použité literatury

- Adachi H., Nakano T., Miyagawa N., Shihama N., Yoshioka M., Katou Y., Yaeno T., Shirasu K., Yoshioka H. (2015): WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell* **27**, 2645-2663.
- Asada K. (1992): Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**, 235-241
- Asada K. (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 601-639.
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H. (2008): MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell* **20**, 1390-1406.
- Baker C. J., Orlandi E. W. (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **33**, 299-321.
- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., López-Jaramillo J., Padilla M. N., Carreras A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2014): Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **65**, 527-538.
- Begara-Morales J. C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Mata-Pérez, Valderrama R., Padilla M. N., López-Jaramillo J., Luque F., Corpas F. J., Barroso J. B. (2015): Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **66**, 5983-5996.
- Bindschedler L. V., Minibayeva F., Gardner S. L., Gerrish C., Davies D. W., Bolwell G. P. (2001): Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺. *New Phytologist* **151**, 185-194.
- Boissy G., de la Fortelle E., Kahn R., Huet J. C., Bricogne G., Pernollet J. C., Brunie S. (1996): Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* **4**, 1429-1439.
- Boissy G., O'Donohue, Gaudemer O., Perez V., Pernollet J. C., Brunie S. (1999): The 2,1 Å structure of an elicitor-ergosterol complex: a recent addition to the sterol carrier protein family. *Protein Science* **8**, 1191-1199.
- Bourque S., Ponchet M., Binet M. N., Ricci P., Pugin A., Lebrun-Garcia A. (1998): Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. *Plant Physiology* **4**, 1317-1326.
- Borque S., Lemoine R., Sequeira-Legrand A., Fayolle L., Delrot S., Pugin A. (2002): The elicitor cryptogein blocks glucose transport in tobacco cells. *Plant Physiology* **130**, 2177-2187.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Breeuwer P., Drocourt J. L., Bunschoten N., Zwietering M. H., Romnouts F. M., Abee T. (1995): Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1614-1619.
- Cacas J. L., Gerbeau-Pissot P., Fromentin J., Cantrel C., Thomas D., Jeannette E., Kalachova T., Mongrand S., Simon-Plas F., Ruelland E. (2016): Diacylglycerol kinases activate tobacco NADPH oxidase-dependent oxidative burst in response to cryptogein. *Plant, Cell and Environment* **40**, 585-598.
- Caverzan A., Passaia G., Barcellos Rosa S., Werner Ribeiro C., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M. (2012): Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* **35**, 1011-1019.
- Ceconni D., Orzetti S., Vandelle E., Rinalducci S., Zolla L., Delledonne M. (2009): Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **30**, 2460-2468.
- Chai H. B., Doke N. (1987): Activation of the potential of potato leaf tissue to react hypersensitively to *Phytophthora infestans* by cytosporic germination fluid and the enhancement of this potential by calcium ions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1**, 27-37.

- Chaparro-Garcia A., Wilkinson R. C., Gimenez-Ibanez S., Findlay K., Coffley M. D., Zipfel C., Rathjen J. P., Kamoun S., Schornack S. (2011): The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is required for basal resistance against the late blight pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* **6**, e16608.
- Clark D., Durner J., Navarre D. A., Klessig D. F. (2000): Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 1380-1384.
- Correa-Aragunde N., Foresi N., Delledonne M., Lamattina L. (2013): Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3339-3349.
- de Pinto M. C., Tommasi F., de Gara L. (2002): Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiology* **130**, 698-708.
- de Pinto M. C., Locato V., Sgobba A., Romero-Puertas M. C., Gadaleta C., Delledonne M., de Gara L. (2013): S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signalling in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* **163**, 1766-1775.
- Derevnina L., Dagdas Y. F., de la Concepcion J. C., Bialas A., Kellner R., Petre B., Domazakis E., Du J., Wu C. H., Lin X., Aguilera-Galvez C., Cruz-Mireles N., Vleeshouwers V. G., Kamoun S. (2016): Nine things to know about elicitors. *New Phytologist* **212**, 888-895.
- Dobeš P., Kmuníček J., Mikeš V., Damborský J. (2004): Binding of fatty acids to β -cryptogein: quantitative structure-activity relationship and design of selective protein mutants. *Journal of Chemical Information and Computer Science* **44**, 2126-2132.
- Dorey S., Kopp M., Geoffroy P., Fritig B., Kauffmann S. (1999): Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiology* **121**, 163-171.
- Dokládál L., Obořil M., Stejskal K., Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J. (2012): Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2203-2215.
- Du J., Verzaux E., Chaparro-Garcia A., Bijsterbosch G., Keizer L. C., Zhou J., Liebrand T. W., Xie C., Govers F., Robatzek S., van der Vossen E. A., Jacobsen E., Visser R. G., Kamoun S., Vleeshouwers V. G. (2015): Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature Plants* **1**: 15034.
- Edwards E. A., Rawsthorne S., Mullineaux P. M. (1990): Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**, 278-284.
- Fefeu S., Bouaziz S., Huet J. C., Pernollet J. C., Guittet E. (1997): Three-dimensional solution structure of β cryptogein, a β elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein science* **6**, 2279-2284.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D., Davies J. M., Dolan L. (2003): Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**, 442-446.
- Frahry G., Schopfer P. (1998): Inhibition of O₂-reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyleioidonium. *Phytochemistry* **48**, 223-227.
- García-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006): Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 711-724.
- Gerbeau-Pissot P., Der C., Thomas D., Anca I. A., Grosjean K., Roche Y., Perrier-Cornet J. M., Mongrand S., Simno-Plas F. (2014): Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Physiology* **164**, 273-286.
- Gill S. S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909-930.
- Gilroy E. M., Taylor R. M., Hein I., Boevink P., Sadanandom A., Birch P. R. J. (2011): CMPG1-dependent cell death follows perception of diverse pathogen elicitors at the host plasma

- membrane and is suppressed by *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a. *New Phytologist* **190**, 653-666.
- Hao H., Fan L., Chen T., Li R., Li X., He Q., Botella M. A., Lin J. (2014): Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate rbohD dynamics and activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 1729-1745.
- Hirasawa K. I., Amano T., Shioi Y. (2004): Lipid-binding form is a key conformation to induce a programmed cell death initiated in tobacco BY-2 cells by a proteinaceous elicitor of cryptogein. *Physiologia Plantarum* **121**, 196-203.
- Hossain M. A., Asada K. (1985): Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 12920-12926.
- Huet J. C., Sallé-Tourne M., Pernollet J. C., (1993): Amino acid sequence and toxicity of the α elicitin secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 302-304.
- Jendřišáková T. (2015): *Reaktivní formy dusíku v obranném mechanismu rostlin*. Diplomová práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Jiang R. H. Y., Tyler B. M., Whisson S. C., Hardham A. R., Govers F. (2006a): Ancient origin of elicitin gene clusters in *Phytophthora* genomes. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 338-351.
- Jiang C., Belfield E. J., Mithani A., Visscher A., Raquoussis J., Mott R., Smith J. A. C., Harberd N. P. (2012): ROS-mediated vascular homeostatic control fo root-to-shoot soil Na delivery in *Arabidopsis*. *Embo Journal* **31**, 4359-4370.
- Jones J. D. G., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kadota Y., Shirasu K., Zipfel C. (2015): Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant Cell Physiology* **56**, 1472-1480.
- Kamoun S., van West P., de Jong A. J., de Groot K. E., Vleeshouwers V. G. A. A., Govers F. (1997a): A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **1**, 13-20.
- Kamoun S., Lindqvist H., Govers F. (1997b): A novel class of elicitin-like genes from *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 1028-1030.
- Kato H., Takemoto D., Kawakita K. (2013): Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant. *Physiologia Plantarum* **148**, 371-386.
- Kaundal A., Rojas C. M., Mysore K. S. (2012): Measurement of NADPHoxidase activity in plants. *Bio-protocol* **2**(20): e278. DOI: 10.21769/BioProtoc.278.
- Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshioka H., Kamoun S., Takahashi H. (2009): Jasmonic acid- and ethylene-mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato. *Journal of Phytopathology* **157**, 287-297.
- Keller H., Pamboukdjian N., Ponchet M., Poupet A., Delon R., Verrier J. L., Roby D., Ricci P. (1999): Pathogen-induced elicitin production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *The Plant Cell* **11**, 223-235.
- Keyster M., Klein A., Egbichi I., Jacobs A., Ludidi N. (2011): Nitric oxide increases the enzymatic of three ascorbate peroxidase isoforms in soybean root nodules. *Plant Signal Behaviour* **6**, 956-961.
- Kobayashi K., Tagawa S., Sano S., Asada K. (1995): A direct demonstration of the catalytic action of monodehydroascorbate reductase by pulse radiolysis. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 27551-27554.
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoo K., Doke N., Yoshioka H. (2007): Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* **19**, 1065-1080.
- Kulik A., Noirot E., Grandperret V., Bourque S., Fromentin J., Salloignon P., Truntzer C., Dobrowolska G., Simon-Plas F., Wendehenne D. (2015): Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogein signalling. *Plant, Cell and Environment* **38**, 331-348.
- Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. (2014): Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research* **14**, 1068-1079.

- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A., Wendehenne D. (2004): Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* **135**, 516-529.
- Lamb C., Dixon R. A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 251-275.
- Lässig R., Gutermuth T., Bey T. D., Konrad K. R., Romeis T. (2014): Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *The Plant Journal* **78**, 94-106.
- Lecourieux-Ouaked F., Pugin A., Lebrun-Garcia A. (2000): Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 821-829.
- Leitch I. J., Hanson L., Lim K. Y., Kovarik A., Chase M. W., Clarkson J. J., Leitch A. R. (2008): The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Annals of Botany* **101**, 805-814.
- Lherminier J., Elmayan T., Fromentin J., Tantaoui Elaraoui K., Vesa S., Morel J., Verrie J-L., Cailleteau B., Blein J-P., Simon-Plas F. (2009) NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 868-881.
- Li L., Li M., Yu L., Zhou Z., Liang X., Liu Z., Cai G., Gao L., Zhang X., Wang Y., Chen S., Zhou J-M. (2014): The FLS2-Associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase rbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* **15**, 329-338.
- Liu Y., He C. (2016): Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Reports* **35**, 995-1007.
- Lochman J., Kašparovský T., Damborský J., Osman H., Marais A., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J. P., Mikeš V. (2005): Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry* **44**, 6565-6572.
- López-Amorós R., Comas J., Vives-Rego J. (1995): Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2521-2526.
- Mandelman D., Jamal J., Poulos T. L. (1998): Identification of two electron-transfer sites in ascorbate peroxidase using chemical modification, enzyme kinetics and crystallography. *Biochemistry* **37**, 17610-17617.
- Mikes V., Milat M. L., Ponchet M., Ricci P., Blein J. P. (1997): The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *Acta Crystallographica., Section D: Biological Crystallography* **58**, 1442-1447.
- Mikes V., Milat M. L., Ponchet M., Panabières F., Ricci P., Blein J. P. (1998): Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochemical and Biophysical research communications* **245**, 133-139.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **9**, 405-410.
- Miyake C., Asada K. (1994): Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiology* **35**, 539-549.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* **15**, 473-497.
- Müller K., Carstens A. C., Linkies A., Torres M. A., Leubner-Metzger G. (2009): The NADPH-oxidase AtRbohB plays a role in *arabidopsis* seed after-ripening. *New Phytologist* **184**, 885-897.
- Noctor G., Foyer C. H. (1998): Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.
- Noirot E., Der C., Lherminier J., Robert F., Moricova P., Kieu K., Leborgne-Castel N., Simon-Plas F., Bouhidel K. (2014): Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5011-5022.

- Oda T., Hashimoto H., Kuwabara N. (2010): Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 1435-1445.
- O'Donohue M. J., Gousseau H., Huet J. C., Tepfer D., Pernollet J. C. (1995): Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding beta-cryptogein, an elicitor produced by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Molecular Biology* **27**, 577-586.
- Osman H., Mikes V., Milat M. L., Ponchet M., Marion D., Prangé T., Maume B. F., Vauthrin S., Blein J. P. (2001a): Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Letters* **1**, 55-58.
- Osman H., Vauthrin S., Mikes V., Milat M. L., Panabières F., Antoine M., Brunie S., Maume B., Ponchet M., Blein J. P. (2001b): Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2825-2834.
- Oswald W., Fleischmann F., Rigling D., Coelho A. C., Cravador A., Diez J., Dalio R. J., Jung H. M., Pfanz H., Robin C., Sipos G., Solla A., Cech T., Chanbery A., Diamandis S., Hansen E., Jung T., Orlikowski L. B., Parke J., Prospero S., Werres S. (2014): Strategies of attack and defence in woody plant-*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology* **44**, 169-190.
- Peng K. C., Wang C. W., Wu C. H., Huang C. T., Liou R. F. (2015): Tomato SOBIR1/EVR homologs are involved in elicitor perception and plant defense against the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**, 913-926.
- Pernollet J. C., Sallantin M., Sallé-Tourne M., Huet J. C. (1993): Elicitor isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**, 53-67.
- Plešková V., Kašparovský T., Obořil M., Ptáčková N., Chaloupková R., Ladislav D., Damborský J., Lochman J. (2011): Elicitor-membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**, 321-328.
- Posé D., Casanedo I., Borsani O., Nieto B., Rosado A., Taconnat L., Ferrer A., Dolan L., Valpuesta V., Botella M. A. (2009): Identification of the *Arabidopsis* dry2/sqe1-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *The Plant Journal* **59**, 63-76.
- Potocký M., Pejchar P., Gutkowska M., Jimenez-quesada M. J., Potocká A., de Dios Alché J., Kost B., Žárský V. (2012): NADPH oxidase activity in pollen tube is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1654-1663.
- Pugin A., Frachisse J.-M., Tavernier E., Blligny R., Gout E., Douce R., Guern J. (1997): Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *The Plant Cell* **9**, 2077-2091.
- Ricci P. (1997): Induction of the hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins: The case of elicitors. In: *Plant-Microbe Interactions* (Stacey G., Keen N. T., eds.), Springer, New York, U.S.A., 53-75.
- Romero-Puertas M. C., Corpas F. J., Sandalio L. M., Leterrier M., Rodríguez-Serrano M., del Río L. A., Palma J. M. (2006): Glutathione reductase from pea leaves response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist* **170**, 43-52.
- Sagi M., Fluhr R. (2006): Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* **141**, 336-340.
- Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (2006): Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* **47**, 689-697.
- Sandor R., Der C., Grosjean K., Anca I., Noirot E., Leborgne-Castel N., Lochman J., Simon-Plas F., Gerbeau-Pissot. (2016): Plasma membrane order and fluidity are diversely triggered by elicitors of plant defence. *Journal of Experimental Botany* **67**, 5173-5185.
- Sano S., Miyake C., Mikami B., Asada K. (1995): Molecular characterization of monodehydroascorbate radical reductase from cucumber overproduced in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 21354-21361.

- Sasabe M., Takeuchi K., Kamoun S., Ichinose Y., Govers F., Toyoda K., Shiraishi T., Yamada T. (2000): Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *European Journal of Biochemistry* **267**, 5005-5013.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. (2002): Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1305-1319.
- Simon-Plas F., Rustérucchi C., Milat M. L., Humbert C., Montillet J. L., Blein J. P. (1997): Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogin. *Plant, Cell and Environment* **20**, 1573-1579.
- Simon-Plas F., Elmayan T., Blein J. P. (2002): The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *The Plant Journal* **31**, 137-147.
- Svozilová Z., Kašparovský T., Skládal P., Lochman J. (2009): Interaction of cryptogin with its binding sites in tobacco plasma membrane studied using the piezoelectric biosensor. *Analytical Biochemistry* **390**, 115-120.
- Tazzeo T., Worek F., Janssen L. J. (2009): The NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium is also a potent inhibitor of cholinesterases and the internal Ca²⁺ pump. *British Journal of Pharmacology* **158**, 790-796.
- Teixeira F. K., Menezes-Benavente L., Margis R., Margis-Pinheiro M. (2004): Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *Journal of Molecular Evolution* **59**, 761-770.
- Torres M. A., Dangl J. L. (2005): Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 397-403.
- Uhlíková H., Obořil M., Klemková J., Šedo O., Zdráhal Z., Kašparovský T., Skládal P., Lochman J. (2016): Elicitor-induced distal systemic resistance in plant sis mediated through the protein-protein interactions influenced by selected lysine residues. *Frontiers in Plant Science* **7**, 59.
- Uruma S., Shibata Y., Takemoto D., Kawakita K. (2009): N,N-dimethylsphingosine, an inhibitor of sphingosine kinase induces phytoalexin production and hypersensitive cell death of *Solanaceae* plants without generation of reactive oxygen species. *Journal of General Plant Pathology* **75**, 257-266.
- Vauthrin S., Mikes V., Milat M. L., Ponchet M., Maume B., Osman H., Blein J. P. (1999): Elicitors trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1419**, 335-342.
- Vitecek J., Reinohl V., Jones R. L. (2008): Measuring NO production by plant tissues and suspension cultured cells. *Molecular Plant* **1**, 270-284.
- Wendehenne D., Lamotte O., Frachisse J. M., Barbier-Brygoo H., Pugin A. (2002): Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *The Plant Cell* **14**, 1937-1951.
- Yamamoto A., Katou S., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (2004): Involvement of nitric oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension culture. *Journal of General Plant Pathology* **70**, 85-92.
- Yang H., Mu J., Chen L., Feng J., Hu J., Li L., Zhou J. M., Zuo J. (2015): S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiology* **167**, 1604-1615.
- Yoshioka H., Numata N., Nakajima K., Katou S., Kawakita K., Rowland O., Jones J. D. G., Doke N. (2003): *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **15**: 706-718.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S. H., Loake G. J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* **202**, 1142-1156.
- Yun B-W., Feechan A., Yin M., Saidi N. B. B., Le Bihan T., Yu M., Moore J. W., Kang J-U. Kwon E., Spoel S. H., Pallas J. A., Loake G. J. (2011): S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264-268.
- Zhang Y., Zhu H., Zhang Q., Li M., Yan M., Wang R., Wang L., Welti R., Zhang W., Wang X. (2009): Phospholipase Dα1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity

and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*.
Plant Cell **21**, 2357-2377.

8 Seznam použitých zkratek

2,4-D	2,4-dichloroocetová kyselina
APX	askorbátperoxidasa
BAK1	brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1
BIK	botrytis-induced protein kinase 1
BSA	bovinní sérový albumin
cADPR	cyklická adenosindifosfátribosa
CPK	Ca ²⁺ -dependentní proteinkinasa
Cry	kryptogein
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DPI	difenylenjodonium chlorid
DTT	dithiotreitol
ELR	elicitin response
ETI	effector-triggered immunity
Fd	ferredoxin
FDA	fluorescein diacetát
GFP	zelený fluorescenční protein
GPX	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukovaný glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonová kyselina
Inf	infestin
LTP	lipid transfer proteins
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MDHA	monodehydroaskorbát
MES	4-Morfolinethansulfonová kyselina
MPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
N6022	1-[4-(aminokarbonyl)-2-methylfenyl]-5-[4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl]-1H-pyrrol-2-propanoová kyselina
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate-buffered saline
PI	propidium jodid
PK	proteinkinasa
PRR	pattern recognition receptor
PTI	pathogen-triggered immunity
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl 3-oxid
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
RBOH	respiratory burst oxidase homologue
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
SAR	systemic acquired resistance
SOBIR1	suppressor of BAK1 interacting receptor-like kinase 1
SOD	superoxiddismutasa
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid