UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Úloha oxidu dusnatého v obranné reakci po aplikaci elicitinů k suspenzním kulturám tabáku

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	**Tereza Jendrišáková**
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.**
Termín odevzdání práce:	6. 5. 2013

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 6. 5. 2013

Ráda bych poděkovala paní doc. RNDr. Lence Luhové, PhD. za příjemné a odborné vedení, cenné rady a poskytnutí materiálů a konzultací potřebných k vypracování této bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala slečně Mgr. Pavle Moricové za všestrannou pomoc, trpělivost a ochotu při vypracování experimentální části a všem zaměstnancům Katedry biochemie za vstřícný přístup během zpracování experimentální části.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Tereza Jendrišáková
Název práce	Úloha oxidu dusnatého v obranné reakci po aplikaci elicitinů k suspenzním kulturám tabáku
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013

Abstrakt

Oxid dusnatý (NO) je významná signální molekula v živých organismech, která aktivuje obrannou odpověď po napadení rostliny patogenem. Cílem této bakalářské práce bylo otestovat vliv aplikace vybraných elicitinů v průběhu obranné reakce na metabolismus reaktivních forem dusíku v suspenzní kultuře tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) se zaměřením na sledování změn aktivity enzymu *S*-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR). Elicitiny jsou velmi účinné elicitory - látky, které vyvolávají obrannou reakci v interakci rostlina-patogen. Pro studium byly zvoleny čtyři elicitiny: kryptogein (rekombinantní protein X24 - elicitin, připravený expresí genu pro kryptogein v kvasince *Pichia pastoris*), mutanty kryptogeinu L41F a V84F (opět rekombinantní proteiny) a elicitin oligandrin izolovaný z *Pythium oligandrum.* Zvýšená produkce NO a současně i GSNOR aktivita jsou charakteristické pro dělení a růst buněk (kontrolní experiment). Naopak změna produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a je u kontrolních buněk minimální. Toxický účinek kryptogeinu a jeho mutantu V84F je spojen s významně zvýšenou produkcí ROS a s tím spojeným oxidativním stresem vedoucím k destrukci buněk. Naopak produkce NO nebyla aktivována a v korelaci s poklesem životnosti buněk byla naopak snížena. Byl pozorován malý vliv oligandrinu a elicitinu L41F na růst, dělení a životaschopnost buněk. Na rozdílný mechanismus účinku oligandrinu a mutantu L41F poukazují rozdílné změny v produkci NO a aktivitě GSNOR po aplikaci daných elicitinů. Nitrace proteinů byla zaznamenána zejména po aplikaci elicitinu oligandrinu.

Klíčová slova	Elicitiny, kryptogein, oligandrin, oxid dusnatý, ROS, RNS, *S*-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR), Nicotiana tabacum L. cv. Xanthi
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Tereza Jendrišáková
Title	The role of nitric oxide in defence responses after elicitin application to tobacco cell suspension
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2013

Abstract

Nitric oxide (NO) is an important signaling molecule in living organisms which activates the immune response after invading plant pathogen. The aim of this work was to test the effect of application of some elicitins on the metabolism of reactive nitrogen species during defensive reactions in suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi), focusing on changes in the activity of the enzyme *S*-nitrosoglutathione reductase (GSNOR). Elicitins are very effective elicitors - substances that trigger the defense response in plant-pathogen interaction. For this study four elicitins were selected: cryptogein (recombinant protein X24 - elicitin, prepared by expression of the gene for cryptogein in yeast *Pichia pastoris*), mutants of cryptogein L41F and V84F (also recombinant proteins) and elicitin oligandrin isolated from *Pythium oligandrum*. Increased production of NO and also the activity of GSNOR enzyme are characteristic of cell growth and division (control experiment). On the other side, change of reactive oxygen species (ROS) production is minimal in control cells. Toxic effect of cryptogein and V84F mutant is associated with a significantly increased production of ROS and related oxidative stress, leading to cell destruction. On the contrary, NO production was not activated but rather reduced, which correlates with a decrease in cell viability. Little effect of oligandrin and elicitin L41F on growth, division and cell viability was observed. The different mechanisms of action of oligandrin and L41F mutant are observed in the different changes in NO production and activity of GSNOR enzyme after application of the elicitins. Nitration of proteins was observed especially after application of elicitin oligandrin.

Keywords	Elicitins, cryptogein, oligandrin, nitric oxide, ROS, RNS, *S*-nitrosoglutathione reductase (GSNOR), *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

Cíle práce		-8-
TEORETICKÁ ČÁST		-9-
1.	Abiotický a biotický stres u rostlin	-10-
2.	Patogeneze	-11-
2.1.	Obecný úvod	-11-
2.2.	Interakce rostliny s patogenem	-12-
3.	Elicitory	-13-
3.1.	Základní charakteristika	-13-
3.2.	Interakce elicitor-rostlina	-15-
3.3.	Elicitiny	-15-
3.3.1.	Kryptogein	-16-
3.3.1.1	Mutantní formy kryptogeinu	-18-
3.3.2.	Oligandrin	-20-
4.	Reaktivní formy dusíku a kyslíku	-21-
4.1.	Obecná charakteristika	-21-
4.2.	Reaktivní formy kyslíku	-22-
4.2.1.	Odbourávání ROS	-23-
4.3.	Oxid dusnatý	-25-
4.3.1.	Vznik NO	-27-
4.3.1.1	Enzymy podílející se na produkci NO	-27-
4.3.1.2	Neenzymová produkce NO	-29-
5.	*S*-nitrosoglutathionreduktasa	-29-
5.1.	Obecná charakteristika	-29-
5.2.	Struktura a funkce GSNOR	-30-
5.3.	Úloha GSNOR v reakci rostlin na biotický stres	-33-
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST		-34-
6.	Materiál a přístroje	-35-
6.1.	Chemikálie	-35-
6.2.	Přístroje a experimentální vybavení	-36-
6.3.	Rostlinný materiál	-36-
6.3.1.	Kultivace buněčných suspenzí tabáku	-36-

7. Metody -38-
7.1. Elicitace buněčných kultur tabáku -38-
7.2. Stanovení životnosti buněčné suspenze -38-
7.3. Stanovení produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku -39-
7.4. Měření optické hustoty buněk -40-
7.5. Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR -40-
7.5.1. Příprava buněčného extraktu -40-
7.5.2. Přečištění buněčného extraktu -41-
7.5.3. Měření aktivity GSNOR -41-
7.6. Stanovení proteinů metodou Bradfordové -41-
7.6.1. Příprava roztoků pro stanovení proteinů -42-
7.7. Nativní PAGE elektroforéza (detekce GSNOR) -42-
7.7.1. Příprava vzorků pro nativní PAGE elektroforézu -42-
7.7.2. Roztoky pro nativní PAGE -43-
7.8. SDS-PAGE -43-
7.8.1. Příprava vzorků pro SDS-PAGE -44-
7.8.2. Roztoky a pufry pro SDS-PAGE -44-
7.9. Western blot s následnou imunodetekcí -45-
7.9.1. Roztoky a pufry pro Western blot -46-
8. Výsledky a diskuse -46-
8.1. Vliv elicitinů na životnost buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi -47-
8.2. Vliv elicitinů na optickou hustotu buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi -49-
8.3. Vliv elicitinů na produkci reaktivních forem kyslíku buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi -50-
8.4. Vliv elicitinů na produkci reaktivních forem dusíku buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi -51-
8.5. Vliv elicitinů na aktivitu *S*-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi -53-
8.6. Western blot analýza změn zastoupení GSNOR a intenzity nitrace proteinů po aplikaci elicitinů -54-
9. Závěr -56-

Seznam zkratek -57-
Seznam použité literatury -58-

CÍLE PRÁCE

I. V teoretické části bylo cílem bakalářské práce vypracovat literární rešerši zaměřenou na problematiku úlohy oxidu dusnatého v obranném mechanismu rostlin v průběhu patogenese a to zejména na reakci rostlin na jednu ze skupin elicitorů tzv. elicitiny.

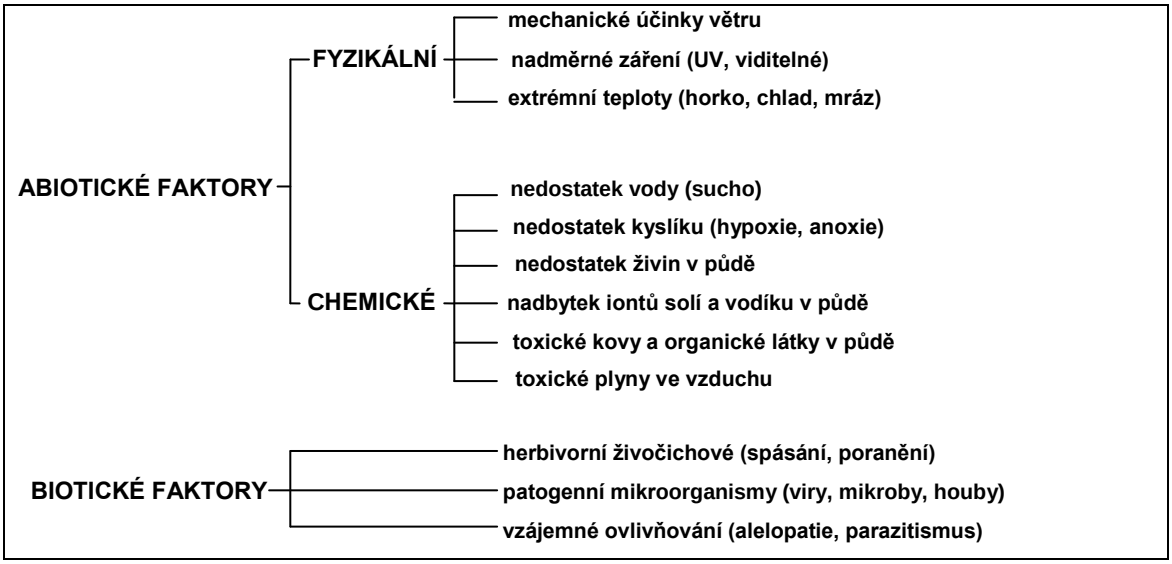
II. V experimentální části bylo cílem otestovat vliv aplikace vybraných elicitinů v průběhu obranné reakce na metabolismus reaktivních forem dusíku v suspenzní kultuře tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) se zaměřením na sledování změn aktivity *S*-nitrosaglutathionreduktasy. Byl sledován vliv na:

a) produkci reaktivních forem dusíku a kyslíku
b) aktivitu *S*-nitrosoglutathionreduktasy
c) intenzitu nitrace proteinů

TEORETICKÁ ČÁST

1. Abiotický a biotický stres u rostlin

Rostliny jsou v průběhu celého života neustále vystavovány měnícím se podmínkám prostředí s řadou environmentálních faktorů. Působení nepříznivých vlivů závažně ohrožujících rostlinu jsou označována jako stresové faktory neboli stresory. Podle povahy stresového faktoru se jedná o biotický nebo abiotický stres (Obr. 1). Biotický stres u rostlin je aktivován biotickými faktory, jako je např. působení hmyzu či patogenních organismů (Thakur & Sohal, 2013). Za abiotický stres fyzikální povahy jsou zodpovědné např. extrémní změny teplot, nadměrné záření, případně mechanické poškození rostlin. Abiotický stres může být dále vyvolán působením chemických faktorů, např. přítomností toxických kovů nebo plynů v půdě, nedostatkem vody, živin nebo kyslíku (Procházka et al., 1998). Stres můžeme dále rozlišovat podle délky působení na krátkodobý a dlouhodobý. Také jej lze dělit dle intenzity na slabý, silný až chronický stres způsobující značné škody, které mohou vést k buněčné a rostlinné smrti (Lichtenthaler, 1996).

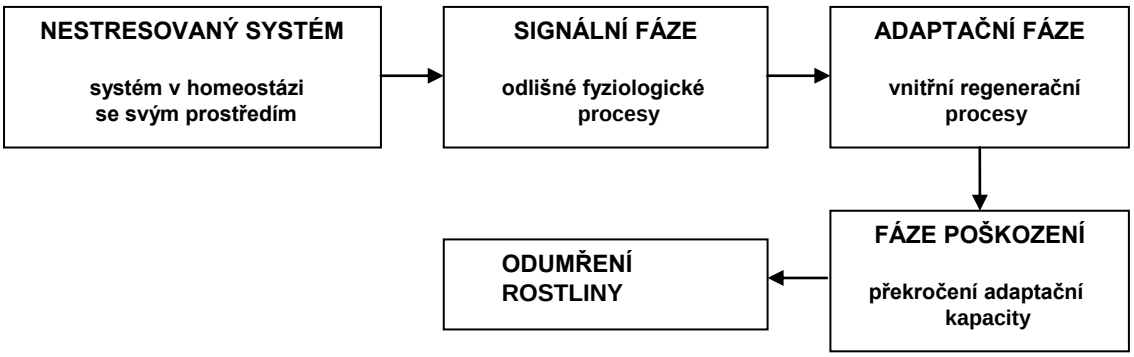


Obr. 1: Přehled biotických a abiotických faktorů (přepracováno z Procházka et al., 1998)

Okamžitě po zahájení působení stresového faktoru nastává fáze signální neboli poplachová, kdy dochází k narušení buněčných struktur a funkcí. Pokud není intenzita působení stresoru letální, dochází v rostlině k mobilizaci kompenzačních mechanismů vedoucích ke zvýšení odolnosti rostlin a nastává fáze rezistence neboli

adaptační. Přetrvává-li však intenzivní nebo chronické působení stresoru, rostlina přechází do fáze poškození a vyčerpání a může dojít až k odumření rostliny (Obr. 2).

Přisedlý způsob života rostlinám neumožňuje únik před působením stresorů. Adaptace rostliny na nové podmínky je možná zvýšením odolnosti vůči stresu (Procházka et al., 1998).



Obr. 2: Reakce rostliny na stresové působení. Počínaje signální fází při napadení patogenu může při letálních dávkách stresoru dojít přes fázi poškození až k odumření rostliny (přepracováno z Procházka et al., 1998).

2. Patogeneze

2.1. Obecný úvod

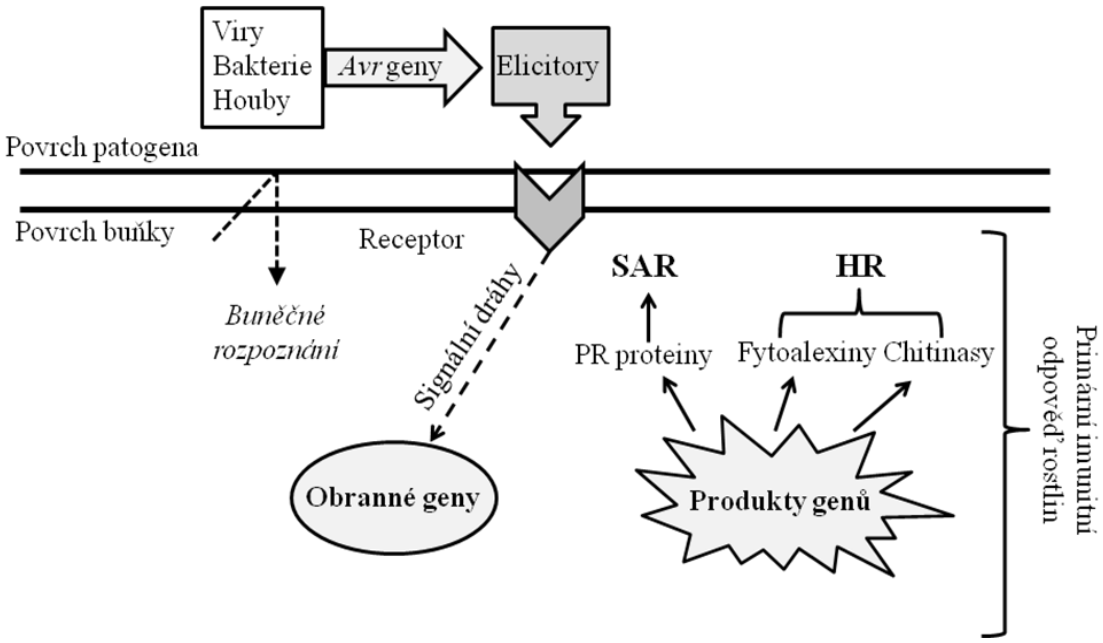
Působení patogenních organismů je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících život rostliny. Patogeny jsou buněčné nebo nebuněčné organismy, které jsou schopny způsobit onemocnění na jednom nebo více hostitelích. Mezi patogeny řadíme například bakterie, viry, houby, oomycety, hlístice nebo hmyz (Garcia-Brugger et al., 2006). Patogeneze je proces, který vyjadřuje komplex interakcí mezi patogenem a hostitelem, který může vyústit v chorobné stavy ohrožující život. Rostliny si vytvořily na ochranu před napadením patogenem a šířením infekce množství obranných mechanismů, které označujeme jako specifické či nespecifické. Skupina nespecifických mechanismů zahrnuje antimikrobiální sekundární metabolity, mechanické bariéry či proteiny, které zabraňují průniku patogenu do buňky (Jones & Dangl, 2006). Do specifických obranných mechanismů řadíme děje sloužící k eliminaci patogenu. U rostlin i zvířat se při aktivaci obranné reakce uplatňuje patogen-asociovaný molekulární model PAMP (patogen associated molecular patterns). Je to receptorový

komplex na povrchu buněk patogenů, kterým je umožněno rozpoznávání hostitelskou buňkou (Boller, 1995).

2.2. Interakce rostliny s patogenem

Útoky patogenů na rostliny jsou rozpoznávány prostřednictvím sloučenin - elicitorů spouštějících obranné reakce rostliny. Schopnost rozpoznat patogen závisí na genetické výbavě jak rostliny, tak patogena. Tuto schopnost popisuje model „gen-for-gen“ (Flor, 1942; Flor 1971). Patogeny obsahují geny avirulence (*Avr* geny), které buď přímo produkují bílkovinu (např. elicitin) nebo kódují enzymy, které katalyzují tvorbu elicitoru. Hostitelská buňka naopak obsahuje geny resistence (R geny). V případě, že rostlina obsahuje gen rezistence (označován „R“) a patogen gen avirulence (*Avr*) jedná se o tzv. inkompatibilní reakci (Obr. 3) (Mejía-Teniente et al., 2010). Patogen napadne rostlinu, je však rozpoznán a rostlina reaguje např. hypersenzitivní reakcí (nekrózou pletiva) v místě napadení, což je forma rostlinné programované buněčné smrti (Heath, 1998). Pokud naopak u patogenu nebo rostliny daný gen chybí, hovoříme o tzv. kompatibilní interakci (Buchanan et al, 2000). Patogen není rozpoznán rostlinnou buňkou, pronikne do rostliny, kde se dále množí a způsobí postupnou likvidaci hostitele.

Úspěšná obrana rostlin závisí na včasném rozpoznání patogena rostlinou a okamžité indukci obranné odpovědi (Dokládal et al., 2012). Ta se může projevit již v prvních minutách až do několika hodinového trvání při působení elicitoru. Obranná reakce může zahrnovat například změny ve stavbě plasmatické membrány, fosforylaci proteinů nebo produkci oxidu dusnatého či reaktivních forem kyslíku (Garcia-Brugger et al., 2006).



Obr. 3: Interakce rostlina-patogen. Primární imunitní odpověď rostliny (převzato z Mejía-Teniente et al., 2010)

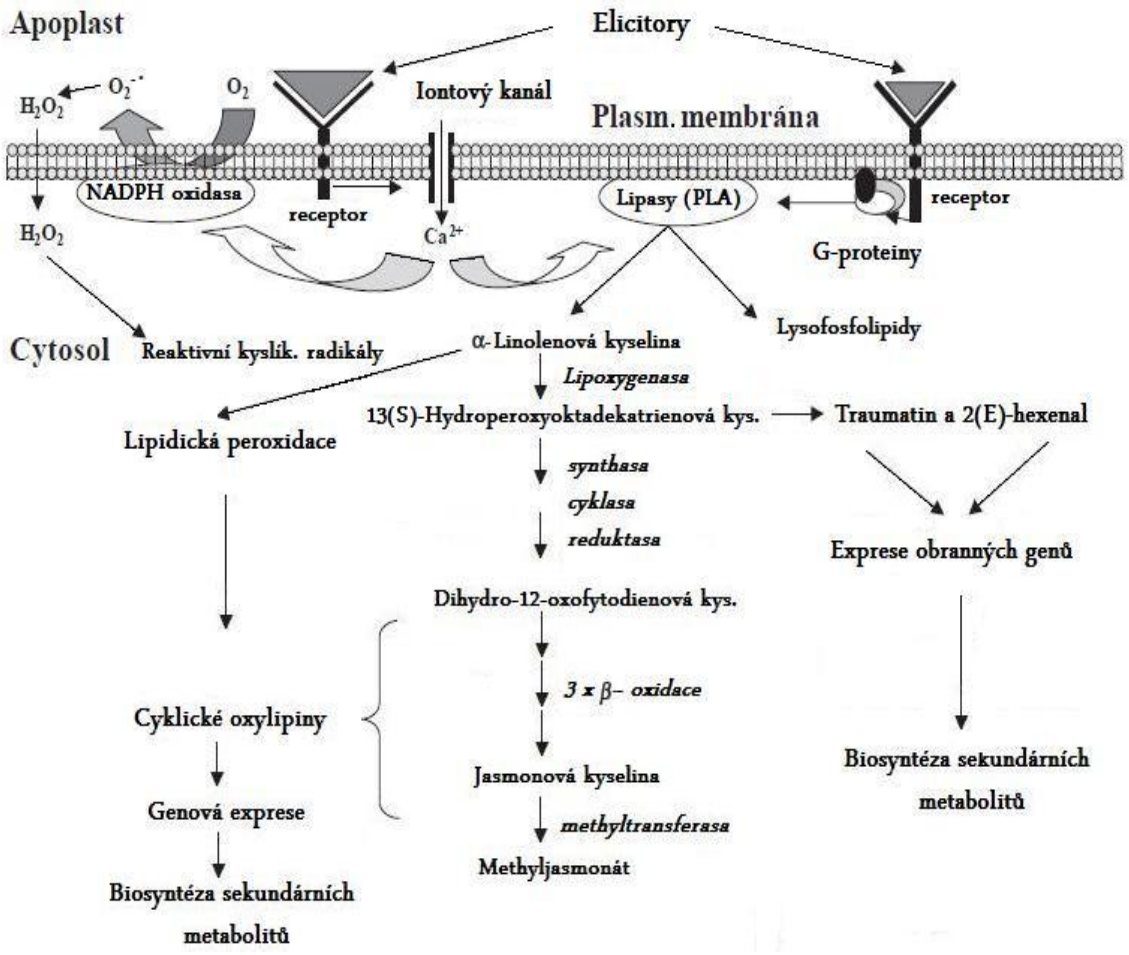
3. Elicitory

3.1. Základní charakteristika

Elicitory jsou obecně nízkomolekulární látky schopné vyvolat kaskádu reakcí vedoucích k tvorbě obranných genů rostliny (Lyon et al., 1995). Z chemického hlediska jsou to látky velmi rozmanité. Mohou být jak polymerního, tak i oligomerního či monomerního charakteru. Původně byly definovány N. T. Keenem jako induktory biosyntézy fytoalexinu (Keen, 1975). Mezi elicitory řadíme například peptidy, proteiny, β – glukany, oligogalakturany, lipopolysacharidy či mastné kyseliny. Exogenní elicitory jsou patogenního původu. Elicitory endogenní jsou látky uvolněné rostlinou po napadení patogenem. Do této kategorie patří hlavně glykoproteiny a oligosacharidy (Akimoto et al., 1999), které mohou působit v rostlině jako důležitý regulační signál v procesu rostlinného vývoje a růstu (Pei, 2006).

Elicitory se dále dělí na obecné či specifické. Obecné elicitory zahrnují fragmenty buněčných stěn (např. glukany) nebo nízkomolekulární látky (mastné kyseliny a steroly). Specifické elicitory jsou charakteristické pro daný typ patogenu (Jones & Dangl, 2006). Elicitory interagují v rostlině s R proteiny, které jsou produkovány R geny, což jsou geny rostlinné resistence vůči patogenům. R protein je většinou receptor. Ten je v těsném spojení s buněčnou stěnou a zajišťuje možný

kontakt elicitoru s povrchem rostlinné buňky (Obr. 4). Po interakci elicitoru s receptorem je spuštěna kaskáda reakcí vedoucích k tvorbě obranných genů, syntéze sekundárních metabolitů a některých rostlinných hormonů, jako je např. kyselina jasmonová (Zhao et al., 2005).



Obr. 4: Schéma mechanismu působení elicitorů, spuštění obranné reakce vedoucí k syntéze kyseliny jasmonové: Elicitory jsou rozpoznávány prostřednictvím receptorů umístěných na plasmatické membráně (nebo v cytoplasmě), ty mohou dále aktivovat iontové kanály, NADPH oxidasu, G-proteiny či fosfolipasy (PLA). Fosfolipasy hydrolyzují fosfolipidy (např. fosfatidylcholin - PC) za uvolnění mastných kyselin, ty pak mohou být prekurzorem pro syntézu kyseliny jasmonové nebo jsou oxidovány pomocí ROS. Kyselina jasmonová je nejdůležitějším signálem sekundárního metabolismu rostlin (přepracováno ze Zhao et al., 2005)

3.2. Interakce elicitor - rostlina

Signální transdukce elicitorů je součtem mnoha jednotlivých reakcí vedoucích k tvorbě účinné obrany. Rozpoznání elicitoru rostlinnými buňkami vede k řadě obranných reakcí, které můžeme dělit na ranou a pozdní fázi (Zhao et al., 2005). Do obranných reakcí rané fáze řadíme například tok iontů přes plasmatickou membránu (Ca^{2+}, Cl^-, K^+), depolarizaci membrány, aktivaci G-proteinů, zvýšenou aktivitu proteinkinas a fosfolipas, syntézu toxických ROS (peroxidu vodíku H_2O_2 a superoxidového aniontu O_2^-), produkci NO a lipidickou peroxidaci. Pozdní fáze je charakterizována syntézou sekundárních metabolitů a signálních molekul (kyselina salicylová, jasmonová, ethylen), expresí PR proteinů jako jsou např. chitinasy, peroxidasy nebo glukanasy, či strukturními změnami buněčné stěny (Radman et al., 2003).

3.3. Elicitiny

Elicitiny jsou malé přírodní proteinové elicitory s molekulovou hmotností přibližně 10 kDa (Ponchet et al., 1999). Elicitiny jsou sekretovány zástupci rodů *Phytophthora* (Ricci et al., 1998) a *Pythium* z řádu *Pythiales* oddělení *Oomycet* (Ponchet et al., 1999, Panabières, 1997). V tabulce 1 jsou uvedeny zástupci elicitinů obou rodů. Elicitiny obsahují obvykle 98 aminokyselin a strukturně se velmi podobají. Struktura elicitinů je tvořena pěti α-helixy, jedním β-skládaným listem a ω-smyčkou (Plešková et al., 2011). Struktura ω-smyčky je velice flexibilní a hraje důležitou roli při vazbě sterolů (Dokládal et al., 2012). Hydrofóbní dutina se nachází v jádře proteinu a je propojena tunelem s povrchem proteinu (Gooley, 1998). Elicitiny obsahují šest cysteinových residuí, které tvoří tři disulfidické můstky. Ve struktuře elicitinů chybí aminokyseliny tryptofan, histidin a arginin, naopak aminokyseliny threonin a serin jsou zastoupeny až z 30 % (Ponchet et al., 1999).

Na základě izoelektrického bodu (pI) můžeme rozdělit elicitiny na zásadité (β-elicitiny) s pI větším než 7,5 a kyselé (α-elicitiny) s pI do 5. Na rozdíl do bazických elicitinů jsou kyselé elicitiny sekretovány všemi druhy rodu *Phytophthora*, bazické pouze některými. Liší se také v součtu celkového náboje, kdy zásadité elicitiny obsahují šest pozitivně nabitých lysinových residuí, zatímco kyselé pouze 2-4 residua (Ponchet et al., 1999). Lysinový zbytek na pozici 13 má významnou roli v nekrotické aktivitě β-elicitinů, α-elicitiny obsahují na této pozici hydrofóbní valinový zbytek. Kladný

náboj má také velmi významnou roli při vazbě lipidů, nemá však vliv na vazbu sterolu do dutiny proteinu (Plešková et al., 2011). Elicitiny nevykazují žádnou proteasovou, β-glukonasovou a fosfolipasovou, či jinou enzymovou aktivitu (Lochman et al., 2005).

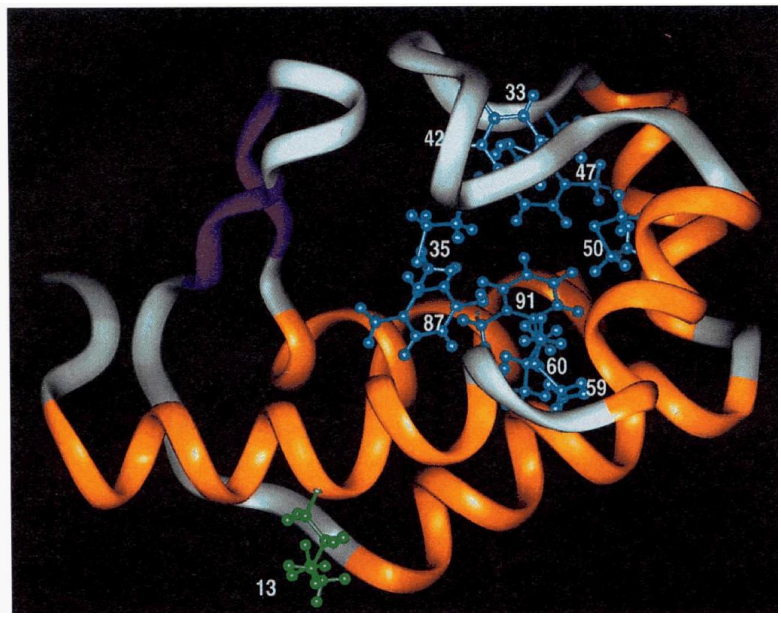
Tab. 1: Zástupci rodů *Phytophthora* a *Pythium* (Ponchet et al., 1999; Yu, 1995; Panabières et al, 1997; Lascombe et al., 2007)

Elicitin	Oomyceta
Bra1	*Phytophthora brassicae*
Capsicein	*Phytophthora capsici*
Cinnamomin	*Phytophthora cinnamomi*
Citrophthorin	*Phytophthora citrophthora*
Drechslerin	*Phytophthora drechsleri*
Infestin	*Phytophthora infestans*
Kaktorein	*Phytophthora cactorum*
Kryptogein	*Phytophthora cryptogea*
Megaspermin	*Phytophthora megasperma*
Parasiticein	*Phytophthora parasitica*
Ram1	*Phytophthora ramorum*
Sojein 1-4 (SOJA-1-4)	*Phytophthora sojae*
Marsipin	*Pythium marsipium*
Oedochilin	*Pythium oedochilum*
Oligandrin	*Pythium oligandrum*
POD-1, POD-2 a POS-1	*Pythium oligandrum*
Sylvaticin	*Pythium sylvaticum*
Vexiny-Vex1, Vex 2	*Pythium vexans*

3.3.1. Kryptogein

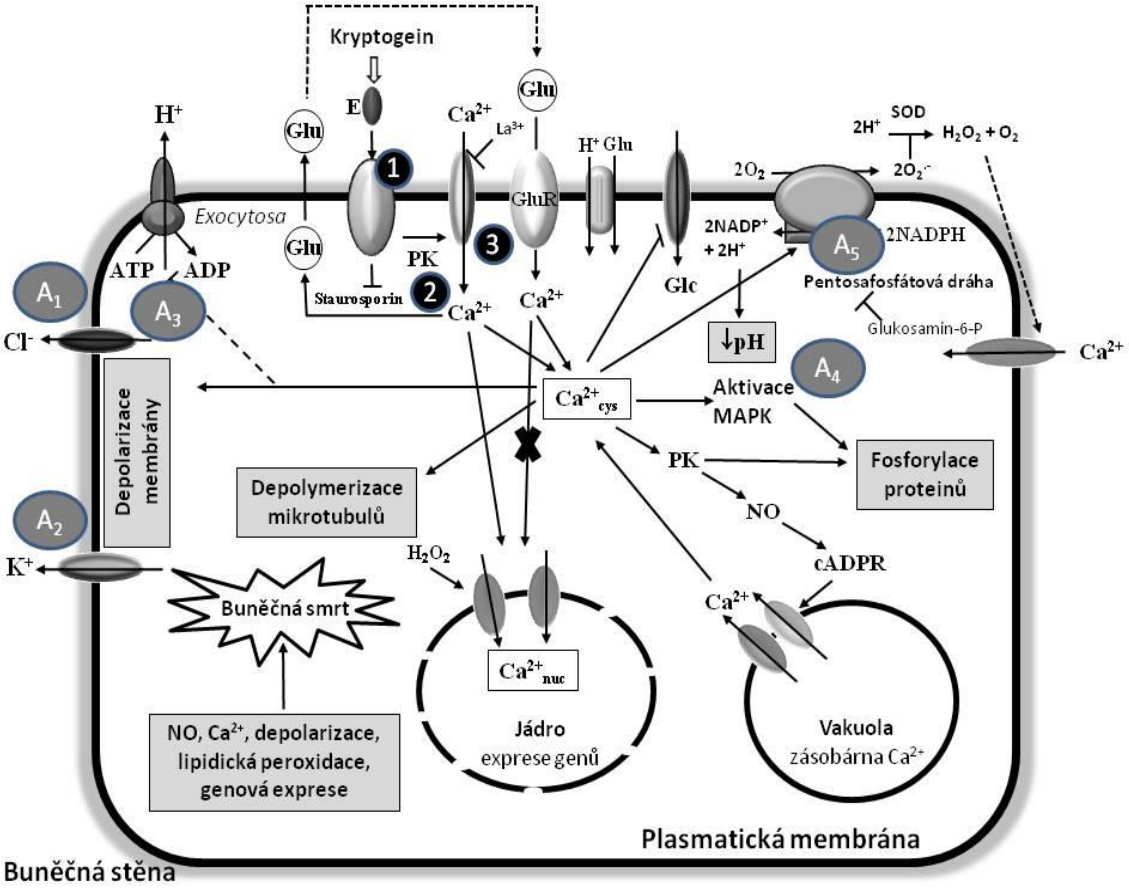
Kryptogein (Obr. 5) je proteinový elicitor (elicitin) sekretovaný fytopatogenní oomycetou *Phytophthora cryptogea*, která způsobuje nekrózu na listech tabáku (*Nicotiana tabacum L. cv.* Xanthi) (Lebrun-Garcia, 1998). Kryptogein má globulární strukturu a řadí se do skupiny β-elicitinů (Gooley, 1998). Jeho molekulová hmotnost stanovená metodou MALDI-MS má hodnotu 10 386 Da (Dokládal et al., 2012).

Koncentrace potřebná pro vyvolání specifických symptomů je u kryptogeinu přibližně 100-200 nM.



Obr. 5: Struktura β-kryptogeinu vytvořená na základě třídimensionální NMR: Postranní řetězce reziduí 33, 42, 47, 60, 87, 90 a Met 35, 50, 59 hydrofóbního jádra jsou značeny modře. Lysinový zbytek na pozici 13 (zeleně) má významnou roli v nekrotické aktivitě β-elicitinů (převzato z Fefeu, 1997).

Aplikace kryptogeinu k buněčné suspenzi vyvolává tzv. hypersenzitivní reakci (HR), což je unikátní obranný systém rostlin (Hirasawa et al., 2005). Kryptogein je rozpoznán přes specifické receptory v plazmatické membráně, které obsahují heterodimerický *N*-glykoprotein s podjednotkami o velikosti 162 a 50 kDa. Prvním krokem před navázáním elicitinu na receptor na plasmatické membráně rostlin je tvorba komplexu se sterolem, kterým je např. ergosterol. Rozpoznání kryptogeinu rostlinnou buňkou má za následek např. fosforylaci proteinů, aktivaci MAP kinas, inhibicí proteinkinas, spuštění syntézy ROS stejně tak jako inhibici transportu glukosy, inhibici H^+-ATPasové pumpy či alkalizaci extracelulární tekutiny (Obr. 6) (Dokládal et al., 2012). Po aplikaci kryptogeinu dochází k produkci ethylenu a kumulaci fytoalexinů, např. kapsidiolu (Lochman et al., 2005). U kryptogeinu nebyla nalezena žádná enzymová aktivita.



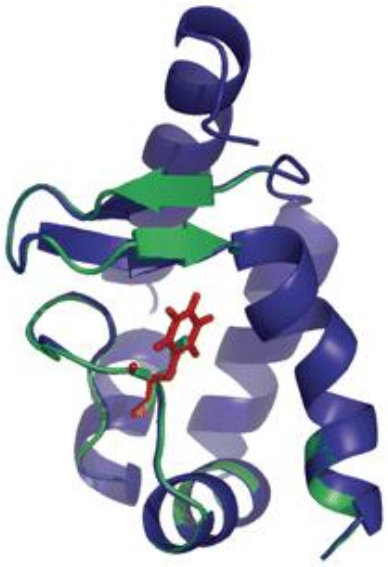
Obr. 6: Model signální kaskády indukované kryptogeinem v buněčných suspenzích tabáku: V prvním kroku (1) interaguje kryptogein s receptorem. Následuje fosforylace proteinů (2) a zvýšený příjem Ca^{2+} iontů (3) rostlinnou buňkou. Ca^{2+} ionty aktivují mnoho dalších membránových proteinů např. chloridový (A_1) či draselný (A_2) kanál - následuje depolarizace plasmatické membrány; dále aktivují NADPH oxidasu (A_5) a MAP kinasy (A_4). Naopak dochází k inaktivaci H^+-ATPasové pumpy (A_3). Aktivace NADPH oxidasy (A_5) má za následek produkci ROS, alkalizaci extracelulární tekutiny a acidifikaci cytosolu. Pentosafosfátová dráha regeneruje NADPH jako zdroj elektronů NADPH oxidasy, inhibovat ji lze přídavkem glukosamin-6-P. Staurosporin inhibuje fosforylaci a La^{3+} ionty inhibují příjem Ca^{2+} iontů (přepracováno z Lebrun-Garcia, 1999).

3.3.1.1. Mutantní formy kryptogeinu

Pro studium vlastností kryptogeinu bylo připraveno místně řízenou mutagenezí několik mutantních forem. Jedná se o modifikaci residuí aminokyselin zodpovědných za vazbu sterolů, fosfolipidů nebo obou těchto sloučenin, aniž by však nastaly změny v místě ω-smyčky či v celé proteinové struktuře (Dokládal et al., 2012).

Protein X24 je elicitin připravený expresí genu pro kryptogein v kvasince *Pichia pastoris.* Liší se od nativní formy kryptogeinu izolovaného z *P. cryptogea* přítomností sekvence EAEA na N-konci molekuly. Tato sekvence se neodštěpí při sekreci, zajišťuje transport proteinů do extracelulárního prostoru a lehce snižuje jeho biologickou aktivitu.

Elicitin L41F by připraven záměnou malé nepolární aminokyseliny leucinu v místě 41 za objemnější aminokyselinu fenylalanin (Obr. 7). Tato mutace výrazně snižuje schopnost vazby k plasmatické membráně a syntézu ROS. Molekulová hmotnost tohoto mutantu byla stanovena na 10 418 Da.



Obr. 7: Mutantní forma kryptogeinu L41F: Malý nepolární leucin byl zaměněn za objemnější hydrofóbní fenylalanin (převzato z Dokládal et al., 2012)

Mutant V84F s nahrazeným valinem v pozici 84 za objemnější fenylalanin má výrazně sníženou schopnost vázat steroly, naopak v přenosu fosfolipidů a ve všech dalších parametrech je tento mutant a jeho vlastnosti velmi podobný kryptogeinu (WT). Molekulová hmotnost mutantu V84F byla určena metodou MALDI MS přibližně na 10 433 Da. Rezistence vyvolaná mutantem V84F byla srovnatelná s kryptogeinem (WT) (Dokládal et al., 2012). Změny vlastností jsou shrnuty v tabulce (Tab. 2).

Tab. 2: Srovnání vlastností kryptogeinu (wild type) a jeho mutantů L41F a V84F. Kapsidiol je antimikrobiální látka patřící mezi fytoalexiny. Schopnost syntézy kapsidiolu se vztahuje ke schopnosti elicitinů syntetizovat ROS a souvisí s nekrotickou aktivitou (přepracováno z Dokládal et al., 2012).

Mutace	DHE přenos	NBD-PC přenos	Vazba k PM	Syntéza ROS	Akumulace kapsidiolu	Indukce resistence
Wild type	+++	+++	+++	+++	+++	+++
V84F	+	+++	+++	+++	++	+++
L41F	+++	++	+	+	-	+

Vysvětlivky: DHE (7-dehydroergosterol), NBD-PC (fosfatidylcholin značený nitrobenzoxadiazolem), PM (plasmatická membrána), ROS (reaktivní formy kyslíku)

3.3.2. Oligandrin

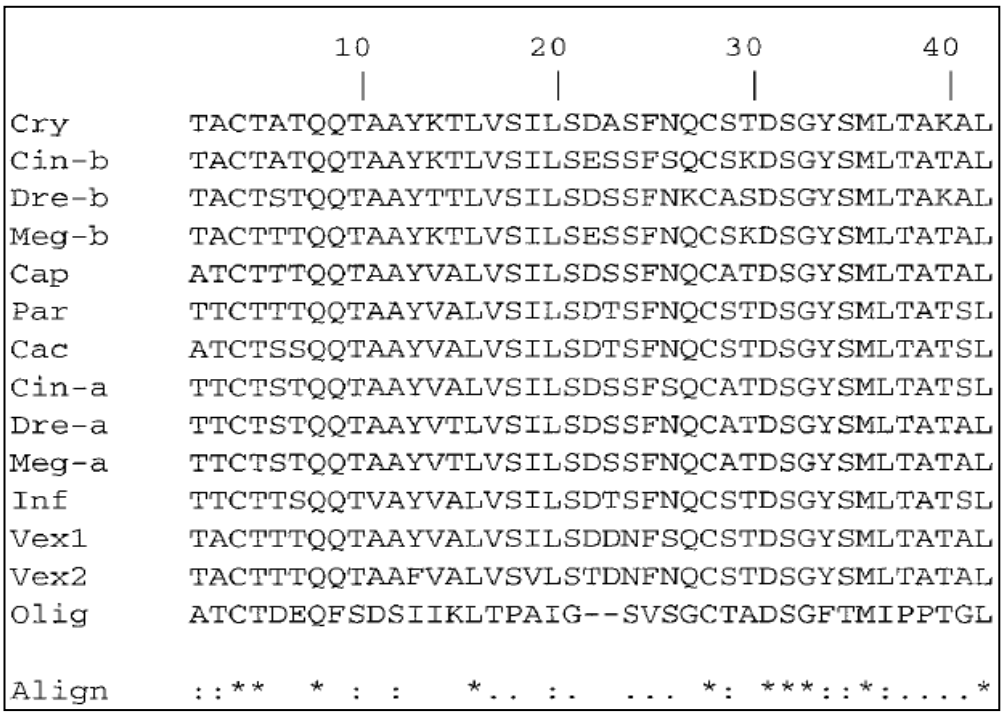
Oligandrin je extracelulární nízkomolekulární protein - elicitin produkovaný fytopatogenní oomycetou *Pythium oligandrum* (Lherminier et al., 2003). Tato oomyceta produkuje kromě oligandrinu také další tři proteinové elicitory (elicitiny): POD-1, POD-2 a POS-1, což jsou proteiny buněčné stěny. POS-1 je velikostí podobný POD1 a jejich sekvence je stejná prvních dvacet aminokyselin (Masunaka et al., 2010).

Izoelektrický bod oligandrinu je 4,5, řadíme ho tedy mezi α-elicitiny (kyselé). Molekulová hmotnost je přibližně 10 kDa a obsahuje 100 aminokyselin. Má charakteristickou N-koncovou sekvenci. Při stanovení této N-terminální sekvence oligandrinu byla nalezena podobnost se třinácti elicitiny sekretovanými některými druhy *Phytophthora* a *Pythium* (Obr. 8). Na rozdíl od jiných elicitinů však oligandrin nevyvolává u hostitelské rostliny hypersenzitivní reakci spojenou s nekrotickou aktivitou, což je spojeno s rozdílným pořadím aminokyselin v sekvenci (Picard et al., 2000). Indukuje však expresi obranných genů spojených s tvorbou kyseliny jasmonové a ethylenu, jež hrají důležitou roli v resistenci vůči chorobám (Kawamura et al., 2009).

Analýza sekvence oligandrinu ukázala největší zastoupení aminokyselin treoninu a serinu (30 %), naopak aminokyseliny tryptofan, arginin a histidin zcela chyběly.

Oligandrin indukuje rezistenci vůči *P. parasitica* v rajčeti *(Lycopersicon esculentum),* pro které je specifický. Tento elicitin také vyvolává systematickou rezistenci vůči rodu *Fusarium* (srpatka). U rostlin rajčat infikovaných parazitem *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* bylo po aplikaci oligandrinu nalezeno

menší poškození rostliny a také byla zaznamenána redukce symptomů vadnutí v přítomnosti tohoto elicitinu (Radman et al., 2003).



Obr. 8: Srovnání aminokyselinové sekvence oligandrinu (Olig) a některých dalších elicitinů z rodu *Phytophthora* a *Pythium*: hvězdička (*) značí 10 residuí aminokyselin identických pro všechny elicitiny (tvoří 24,4 %), dvojtečka (:) značí devět aminokyselin s velkou shodou (21,9 %) a tečka (.) značí velmi malou podobnost v aminokyselinovém složení (10 aminokyselinových residuí, 24,4 %).

Vysvětlivky: **Cry** značí kryptogein (*Phytophthora cryptogea*), **Cin-a,b** pak kyselou a bazickou formu elicitinu cinnamominu (*Phytophthora cinnamomi*), **Dre-a,b** značí kyselou a bazickou formu dreschlerinu (*Phytophthora drechsleri*), **Meg-a,b** označuje kyselý a bazický elicitin megaspermin (*Phytophthora megasperma*). **Cap** značí kyselý elicitin capsicein (*Phytophthora capsici*), ***Par**,* kyselý elicitin (*Phytophthora parasitica*), **Cac***,* kyselý elicitin kaktorein (*Phytophthora cactorum*), **Inf** značí kyselý elicitin infestin (*Phytophthora infestans*) a **Vex1, Vex2** označuje kyselé elicitiny vexiny (*Pythium vexans*) (převzato z Picard et al., 2000).

4. Reaktivní formy dusíku a kyslíku

4.1. Obecná charakteristika

Reaktivní formy dusíku (RNS) a kyslíku (ROS) jsou důležité molekuly v rostlinných systémech. Mají významnou roli v obranném mechanismu rostlin jako

signální molekuly. Zvýšená koncentrace ROS a RNS spojená s reakcí na působení stresových faktorů může mít toxické účinky na rostlinnou buňku. K produkci ROS i RNS dochází i za fyziologických podmínek. Rostliny musí obsahovat systémy, které umožní deaktivaci či odbourání ROS a RNS a udržení jejich hladiny v rostlinném organismu na určité úrovni (Procházka et al., 1998).

4.2. Reaktivní formy kyslíku

Úloha reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) má v živých organismech nezastupitelný význam. Dříve byly ROS považovány pouze jako nebezpečné produkty vznikající při působení stresového faktoru, které byly odstraňovány působením antioxidačních systémů. Dnes je již však známa signální funkce těchto molekul, které zprostředkovávají obranné odpovědi na biotický a abiotický stres a kontrolují programovanou buněčnou smrt (Neill et al., 2002; Vera-Estrella et al., 1994). ROS vznikají také za fyziologických podmínek jako toxické meziprodukty aerobního metabolismu. Mezi ROS vyskytující se v rostlinách patří všechny redukované či aktivované formy atmosférického kyslíku (O_2), které vznikají excitací O_2 na singletový kyslík (O_2^1) či přenosem jednoho, dvou nebo tří elektronů na O_2. Jmenovitě se jedná o peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový anion-radikál ($O_2^{\bullet-}$), hydroxylový ion (OH^-), hydroxylový radikál ($OH^\bullet$) a perhydroxylový radikál ($O_2H^\bullet$) (Mittler, 2002). Na rozdíl od atmosférického kyslíku mohou ROS neomezeně oxidovat buněčné komponenty, což může vést až k destrukci buňky (Neill et al., 2002).

Produkce a lokalizace vzniku ROS v rostlinách je velmi rozmanitá. Může se jednat o reakce přirozeného metabolismu, jako je elektronový transportní řetězec fotosyntetického aparátu či respirace. Přehled enzymů podílejících se na produkci ROS je uveden v tabulce 5. Systémy produkující ROS jsou lokalizované v řadě organel, jako jsou chloroplasty, mitochondrie, endoplasmatické retikulum, peroxisomy, glyoxysomy, vakuoly, dále v cytosolu, v plasmatické membráně, v apoplastu a v buněčné stěně. (Neill et al., 2002).

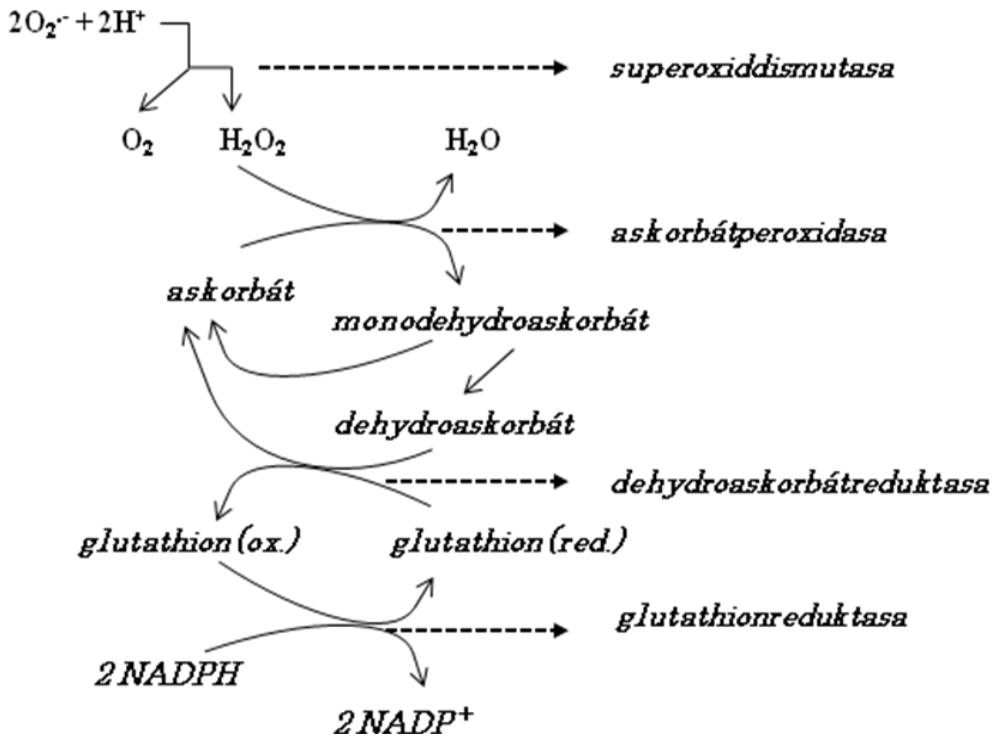
Tab. 3: Enzymy podílející se na produkci ROS, jejich lokalizace a vznikající ROS (přepracováno z Mittler, 2002).

Enzym	Lokalizace	ROS
Glykolátoxidasa	Per	O_2
NADPH-oxidasa	PM	O_2
Oxalátoxidasa	Apo	H_2O_2
Peroxidasy	BS	H_2O_2, O_2
Xanthinoxidasa	Per	O_2^-
Aminooxidasa	Apo	H_2O_2

Vysvětlivky: Per (peroxisom), PM (plasmatická membrána), Apo (apoplast), BS (buněčná stěna).

4.2.1. Odbourávání ROS

Nejuniverzálnějším aparátem podílejícím se na degradaci ROS je systém tří enzymů: superoxiddismutasy (SOD, EC 1.15.1.1), která katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, askorbátperoxidasy (APX, EC 1.11.1.11), která rozkládá peroxid vodíku za přítomnosti L-askorbátu a enzymu katalasy (CAT, EC 1.11.1.6) katalyzující přeměnu H_2O_2 na kyslík a vodu (Mittler, 2002). V rostlinách se SOD vyskytuje dokonce ve třech typech dle kofaktoru, kterým je buď zinek s mědí (Cu/Zn SOD), železo (Fe-SOD) nebo mangan (Mn-SOD). U reakce s APX je potřebná přítomnost L-askorbátu a následně při regeneraci dehydroaskorbátu také glutation společně s enzymy dehydroaskorbátreduktasou (EC 1.6.5.4) a glutathionreduktasou (EC 1.8.1.7) (Obr. 9) (Procházka et al., 1998).



Obr. 9: Odbourávání superoxidu v rostlinných buňkách enzymatickou cestou. Děje se tak za účasti SOD redukující superoxid na peroxid vodíku, enzymu APX následně rozkládající peroxid za přítomnosti askorbátu, dehydroaskorbátreduktasy a glutathionreduktasy podílející se na regeneraci dehydroaskorbátu (převzato z Procházka et al., 1998).

Tab. 4: Enzymy podílející se na degradaci ROS a jejich lokalizace (přepracováno z Mittler, 2002)

Enzym	Lokalizace	ROS
Superoxiddismutasa	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	O_2
Askorbátperoxidasa	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
Katalasa	Per	H_2O_2
Glutathionperoxidasa	Cyt	H_2O_2
Peroxidasy	BS, Cyt, Vak	H_2O_2
Thioredoxinperoxidasa	Chl, Cyt, Mit	H_2O_2

Vysvětlivky: Per (peroxisom), Apo (apoplast), BS (buněčná stěna), Chl (chloroplast), Cyt (cytosol), Mit (mitochondrie), Vak (vakuola)

Rostliny se před oxidačním poškozením (tzn. nerovnováhou mezi tvorbou a degradací ROS) chrání také neenzymově, a to např. díky systémům přímé deaktivace,

jako jsou nízkomolekulární antioxidanty karotenoidy či α-tokoferol (vitamin E). Ty se podílejí na přeměně volných radikálů za vzniku neutrálních sloučenin. Dalšími významnými antioxidanty jsou glutathion a jedna z nejdůležitějších molekul L-askorbát (vitamin C), jehož přítomnost byla prokázána u většiny typů rostlinných buněk, převážně ve stromatech chloroplastů, ale objevuje se také v cytosolu, mitochondriích, vakuolách či buněčné stěně. Koncentrace L-askorbátu v buňce se pohybuje v milimolárních množstvích, např. ve špenátu okolo 50 $mmol.l^{-1}$ (Smirnoff, 1996).

4.3. Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) i přes svůj krátký poločas života, který byl stanoven na méně než 6 s, hraje v organismu důležitou roli jako signální molekula, která aktivuje obrannou odpověď po napadení rostliny patogenem (Klessig et al., 2000). Svým působením také zasahuje do růstu a vývoje rostliny, ovlivňuje např. produkci fytoalexinu či pohyb průduchů. Jakožto plynný radikál volně difunduje přes membrány a jeho biologické účinky se vztahují k účinkům ROS. Je znám jako obecný intra a intercelulární mediátor funkcí buňky (Foissner et al., 2000).

Mezi RNS se řadí dále oxid dusičitý ($\cdot NO_2$) vznikající reakcí peroxydusitanu s hemovou peroxidasou, dusitan (NO_2^-), který může být zpátky redukován na NO např. hemoglobinem, či peroxydusitan (ONOO-) vznikající reakcí radikálu oxidu dusnatého ($NO\cdot$) se superoxidovým anionradikálem ($O_2\cdot^-$) (Hill et al., 2010) (Tab. 3).

Tab. 5: Reaktivní formy dusíku (převzato z Hill et al., 2010).

Druh molekuly	**Funkční vzorec**
Oxid dusnatý	NO, $\cdot NO$
Nitroxyl	HNO, NO^-
Nitrosoniový kation	NO^+
Dusitan	NO_2^-
Dusičnan	NO_3^-
Oxid dusitý	N_2O_3
Oxid dusný	N_2O
Oxid dusičitý	NO_2, $\cdot NO_2$
Peroxydusitan	ONOOH, $ONOO^-$
Peroxydusičnan	O_2NOO^-

Nitrosoperoxokarbonát	$ONOOCO_2^-$
Amoniak	NH_3
Hydroxylamin	NH_2OH

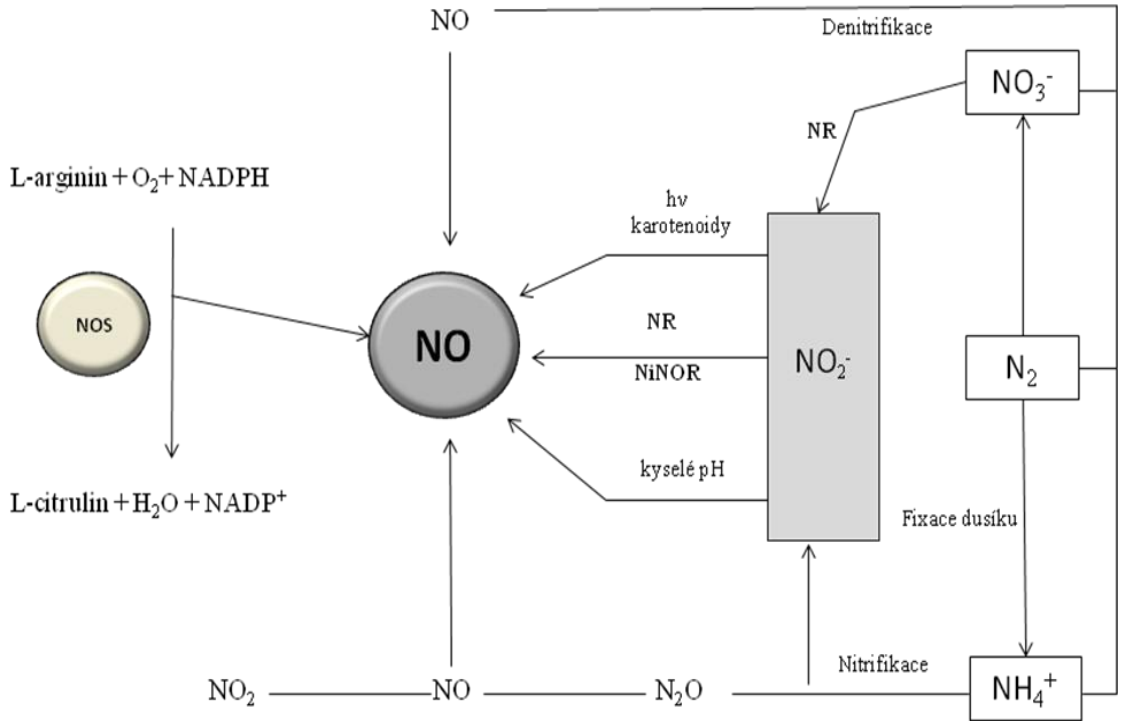
Tab. 6: Biologické aktivity NO v rostlinách (přepracováno z Beerling et al., 2001).

Tkáň nebo orgán	**Fyziologický účinek**	**Druh rostliny**	**Optimální koncentrace NO**
Semena	Indukce klíčení	Hlávkový salát	10^{-6}
	Inhibice buněčné smrti u lepku	Ječmen	10^{-6}
Kořeny	Prodlužování kořenů	Kukuřice	10^{-10}
	Indukce tvorby adventivních kořenů	Okurka, levandule	10^{-9}-10^{-5}
Hlízy	Tvorba hlíz	Brambory	10^{-6}
Hypokotyl	Inhibice růstu při nízkém osvětlení	Hlávkový salát, Huseníček	10^{-6}
Stonek	Inhibice prodlužování internodií při špatném osvětlení	Brambory	10^{-6}
Listy	Oddálení senescence	Hrášek	5×10^{-6}
	Uzavření průduchů	Pšenice	10^{-6}
	Rozšiřování listů	Hrášek	5×10^{-6}
	Indukce obranné reakce	Huseníček, tabák	2×10^{-6}
	Inhibice buněčné smrti	Brambory	10^{-6}

Mechanismem zprostředkovávajícím působení NO je postranslační modifikace thiolových residuí v proteinech zvaná *S*-nitrosace a nitrace specifických tyrosinových residuí v proteinech, vedoucí ke změnám konformace modifikovaného proteinu a následně k ovlivnění jeho biologické aktivity (Martínez et al, 2004, Ischiropoulos, 2003). NO vyskytující se jako volný radikál lze stabilizovat dvěma mechanismy: reakcí s molekulami obsahující nepárový elektron a interakcí s d-orbitaly přechodných kovů, zejména se železem. Při druhé zmíněné reakci NO tvoří vazbu se železem obsaženým v molekule hemu v živých organismech. Jedná se o důležitou reakci, kdy NO posttranslačně aktivuje např. guanylátcyklasu, což vede k přechodnému zvýšení hladiny cyklického GMP (cGMP) (převzato z Beerling et al., 2001).

4.3.1. Vznik NO

Oxid dusnatý může být produkován několika enzymovými nebo neenzymovými způsoby (Obr. 10), např. působením enzymu NO-synthasy (NOS, EC 1.14.13.39), enzymu nitrátreduktasy (NR, EC 1.7.1.1), neenzymově disputací dusitanu v kyselém pH apoplastu nebo redukcí dusitanu kyselinou askorbovou na NO.



Obr. 10: Výskyt a vznik oxidu dusnatého v rostlinách: NOS - NO syntasa, NR - nitrátreduktasa, NiNOR - nitritreduktasa lokalizovaná v plazmatické membráně. (převzato z Piterková et al., 2008)

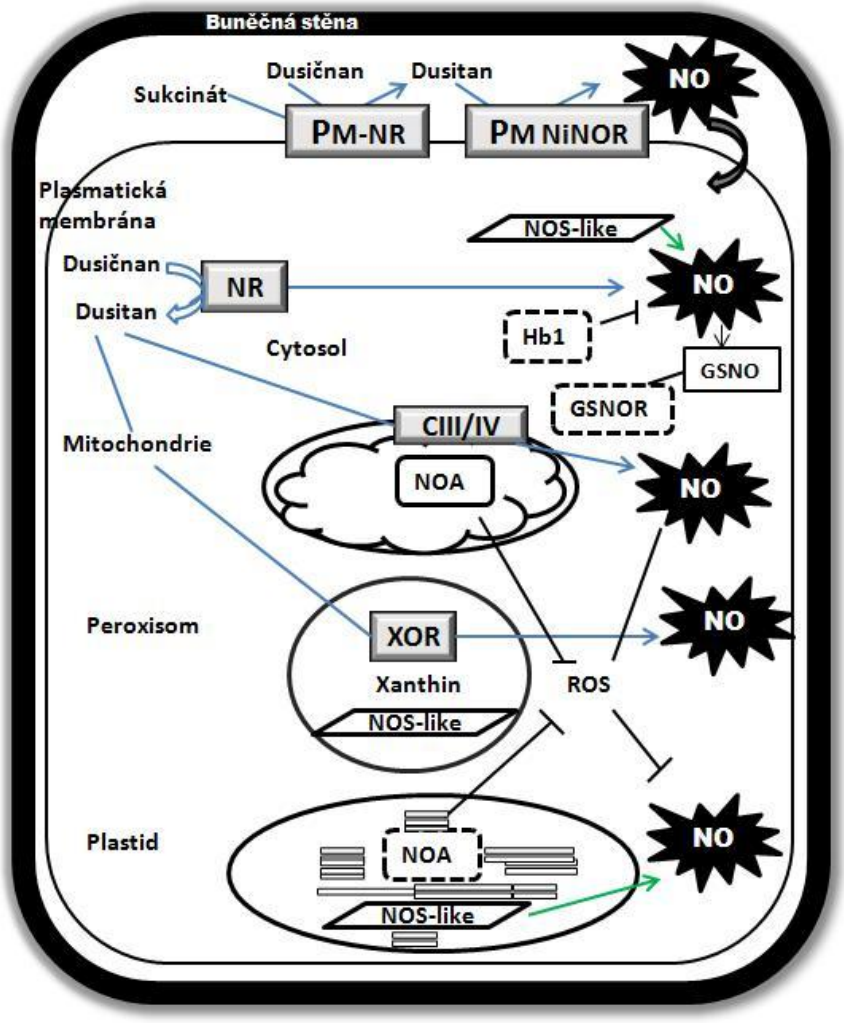
4.3.1.1. Enzymy podílející se na produkci NO

Jedním z enzymů podílejících se na produkci NO u rostlin je NO syntasa, která je dosud dobře charakterizovaná pouze u živočichů (Hill et al., 2010). V přítomnosti NADPH a kyslíku je guanidinový dusík aminokyseliny L-argininu oxidován na NO za vzniku L-citrulinu.

Produkce NO byla popsána při redukci dusitanu (NO_2^-) za přítomnosti enzymu nitrátreduktasy (NR). NR je lokalizována v cytosolu a její aktivita závisí na snižujícím se

pH. Hem je prostetickou skupinou daného enzymu. Hlavní funkcí NR je přeměna dusičnanů na dusitany za katalýzy NAD(P)H. Mezi další úlohy NR patří ovlivňování činnosti průduchů (Neill et al., 2008), aktivace antioxidačních enzymů (Sang et al., 2008) nebo signalizace po napadení patogenem.

Dalším příkladem redukčního mechanismu podílejícím se na vzniku NO je enzym xanthinoxidasa (XOD, EC 1.17.3.2) lokalizovaná v peroxisomech (Obr. 11). Dominantními produkty XOD za aerobních podmínek jsou superoxid a kyselina močová. Za anaerobních podmínek pak vzniká NO. XOD pro tuto reakci využívá substrát NADH nebo xanthin (Gupta et al., 2011). Enzym obsahuje v aktivním místě kovy (Mo, Fe) a koenzymem je FAD.



Obr. 11: Přehled biosyntetických reakcí oxidu dusnatého: Rostlinná buňka s enzymy lokalizovanými v buněčných komponentech. Modré šipky ukazují redukční mechanismy, zelené šipky pak oxidační mechanismy vzniku NO (přepracováno z Gupta et al., 2011).

Vysvětlivky: NOA (NO-asociovaný protein), NOS (NO synthasa), NOS-like (reakce, které připomínají tvorbu NO katalyzovanou zvířecí NOS), PM-NR (nitrátreduktasa vázaná na plasmatickou membránu), PM-NiNOR (nitritreduktasa vázaná na plasmatickou membránu), XOR (Xanthinoxidoreduktasa), Hb1 (nesymbiotický hemoglobin-1), GSNOR (*S*-nitrosoglutathionreduktasa), GSNO (*S*-nitrosoglutathion), CIII/IV (cytochromové komplexy dýchacího řetězce), ROS (reaktivní formy kyslíku).

4.3.1.2. Neenzymová produkce NO

Oxid dusnatý může vznikat v buňkách také neenzymovou cestou. Při jedné z takovýchto reakcí se v chloroplastech redukuje dusitan na NO za katalýzy karotenoidů, kdy tato reakce vyžaduje světlo. Další neenzymový vznik NO byl popsán v rostlinných buňkách a pletivech za fyziologických podmínek, kdy byl za přítomnosti kyseliny askorbové redukován dusitan (Yamasaki et al., 2000). V kyselém pH apoplastu dochází k dismutaci dusitanu na NO a dusičnan (Stohr et al., 2002).

5. *S*-nitrosoglutathionreduktasa

5.1. Obecná charakteristika

S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) je klíčový enzym působící v mechanismu regulace hladiny oxidu dusnatého (NO) a *S*-nitrosothiolů (obecná struktura RS-NO), což jsou stabilnější sloučeniny s delším poločasem života než NO a slouží především k jeho transportu a jako zásoba oxidu dusnatého. Nejvýše početně zastoupený *S*-nitrosothiol je *S*-nitrosoglutathion (GSNO). Aktuální označení enzymu *S*-nitrosoglutathionreduktasa ještě nebylo doposud schváleno Mezinárodní komisí pro biochemii a molekulární biologii NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology), je to však nejpoužívanější a nejrozšířenější termín ve vědeckých publikacích.

Enzym GSNOR je znám také pod názvy *S*-(hydroxymethyl) glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284) nebo glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa. Systematický název je *S*-(hydroxymethyl) glutathion:NAD^+oxidoreduktasa.

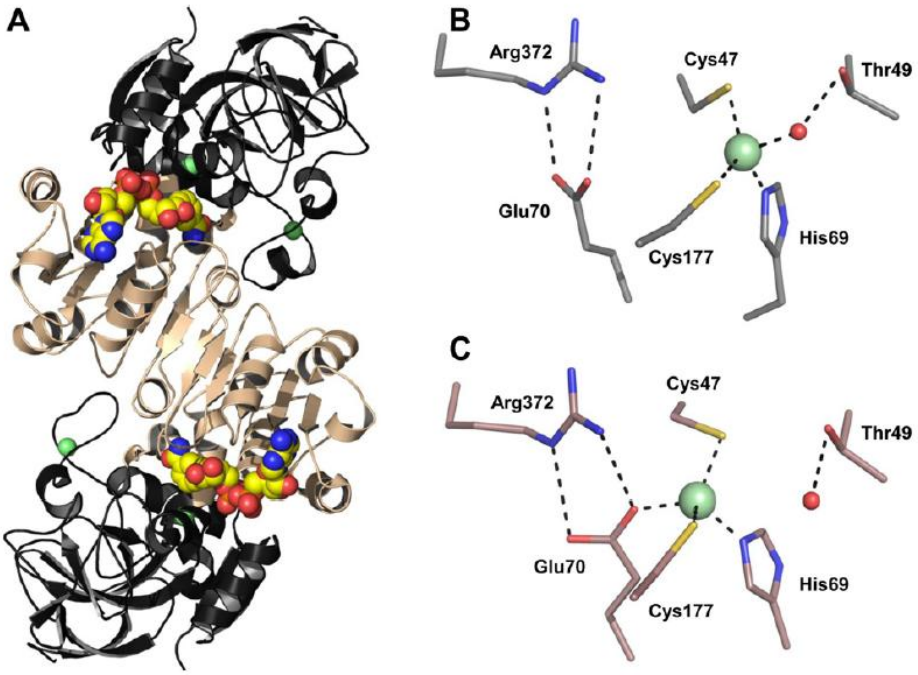
GSNOR se řadí mezi zinek-dependentní alkoholdehydrogenasy třídy III (ADH3). Preferovaným substrátem je *S*-nitrosoglutathion (GSNO), jehož katalytická aktivita byla stanovena na 94 300 mM^{-1} min^{-1} (Gaston et al., 2003).

Dalším významným substrátem je *S*-(hydroxymethyl)glutathion (HMGSH), který spontánně vzniká z glutathionu a formaldehydu. Tato reakce představuje klíčový krok při detoxifikaci organismu exogenního i endogenního formaldehydu. Syntéza substrátu HMGSH je u některých bakterií urychlována enzymem *S*-(hydroxymethyl) glutathionsynthasou (EC 4.4.1.22) (Kubienová et al., 2013). Substráty mohou být také alkoholy se středně dlouhým řetězcem nebo ω-hydroxy mastné kyseliny, např. oktanol či cinnamylalkohol. Tyto substráty však mají mnohem menší katalytickou účinnost.

Všeobecná přítomnost v buňce a jedinečné zachovávání struktury poukazuje, že se jedná o enzym s významnou funkcí v živých organismech (Staab et al., 2008).

5.2. Struktura a funkce GSNOR

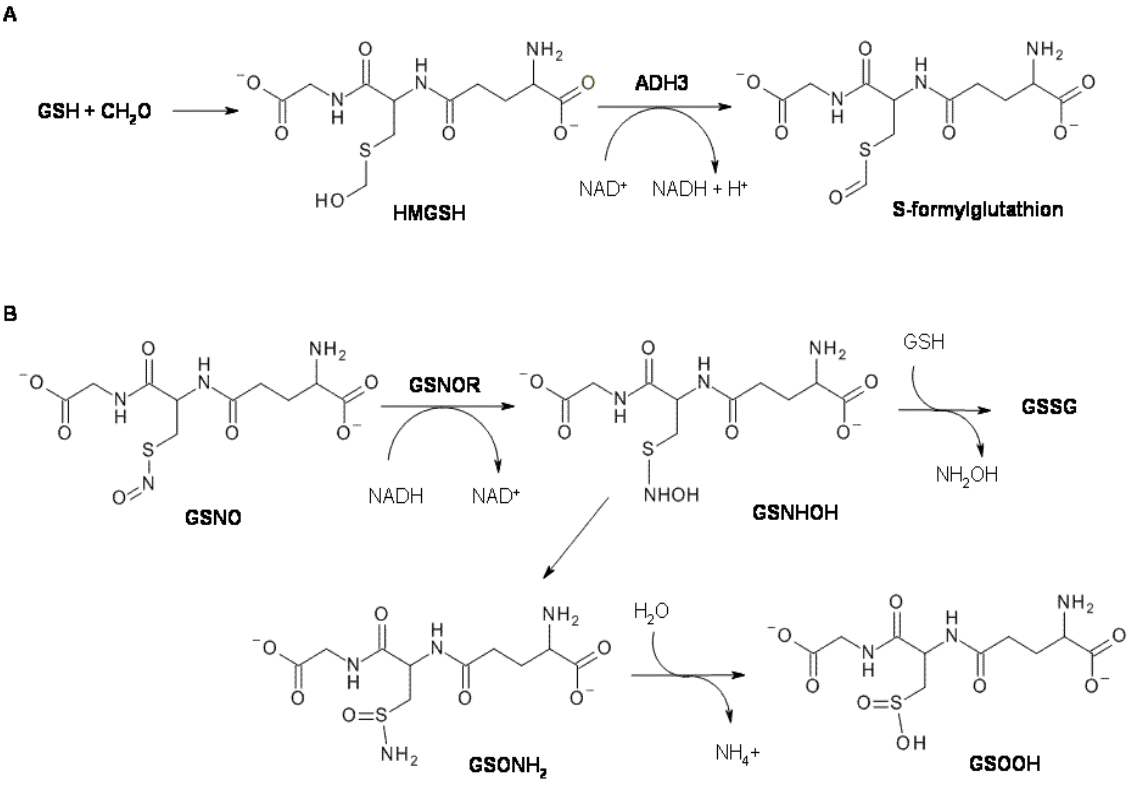
GSNOR má tak jako všechny alkoholdehydrogenasy dimerní strukturu. Enzym tvoří dvě podjednotky o molekulové hmotnosti 40 kDa. Každá z nich obsahuje dvě domény: jednu katalytickou a jednu vážící koenzym. Každá z podjednotek také váže dva zinkové ionty. Zatímco první zinečnatý kation plní pouze strukturní funkci, druhý se chová jako Lewisova kyselina a aktivuje substrát v aktivním místě, které je lokalizováno mezi koenzymem a katalytickou doménou enzymu. V lidské ADH3 je tento katalytický zinek vázán na His69, Cys177 a Cys47. Strukturální zinek je vázán pomocí čtyř cysteinů. V binárním komplexu FDH:NADH vykazuje zinek pentakoordinační stav v jednom z aktivních míst, kdy Glu67 sloužil jako pátý ligand kromě standardních ligandů Cys44, Cys174 a His66 a molekuly vody (Sanghani et al., 2002).



Obr. 12: Dimerní struktura rostlinné GSNOR ze *Solanum lycopersicum*: (A) Katalytická doména je značena černě, doména vázající koenzym světle hnědě. Atomy zinku (zeleně) a koenzym NAD^+ (žlutá - atomy uhlíku, červená - atomy kyslíku, modrá - atomy dusíku) jsou znázorněny kuličkami. (B) Koordinace atomu zinku ve struktuře apoenzymu. (C) Binární komplex zinku s koenzymem NAD^+. Molekula vody v aktivním místě je znázorněna červenými kuličkami (převzato z Kubienová et al., 2013).

Substrátová specifita GSNOR, podobně jako ostatních enzymů třídy ADH3 se výrazně liší od ethanol-oxidujících alkoholdehydrogenas, což je v souladu se strukturálními změnami uvnitř a v bezprostřední blízkosti aktivního místa (Obr. 12). Vzhledem k substrátové specifitě jsou rezidua 53-59 a 113-120 lokalizována mimo katalytickou štěrbinu, čímž je podstatně rozšířeno aktivní místo. Další z přítomných residuí, Arg114 vytváří pozitivní náboj v substrát vázajícím místě a usnadňuje tak vazbu záporně nabitých substrátů, aktivátorů a inhibitorů. V důsledku je tedy nepostradatelný při aktivaci ethanol-dehydrogenasové aktivity a pro vazbu ω-mastné kyseliny (Staab et al., 2008).

Přítomnost enzymu GSNOR byla zjištěna téměř ve všech pletivech (u živočichů v tkáních) a buňkách, tudíž je předpokládaná také její úloha v nitrosačním stresu.



Obr. 13: Reakce *S*-nitrosoglutathionreduktasy: A) Dehydrogenasová reakce za přítomnosti NAD^+, produktem reakce je *S*-formylglutathion; B) NADH-dependentní reduktasová reakce, produktem této reakce je *N*-hydroxysulfinamid (GSNHOH) (Kubienová et al., 2012).

V dehydrogenasové reakci katalyzuje enzym přeměnu *S*-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGSH) na *S*-formylglutathion, kde jako kofaktor působí NAD^+. V reduktasové reakci dochází k přeměně *S*-nitrosoglutathionu na *N*-hydroxysulfinamid za přítomnosti vody, kde jako vedlejší produkt vzniká amoniak (Obr. 13). O tom, zda reakce proběhne dehydrogenasovým nebo reduktasovým mechanismem a jaký bude výsledný produkt, rozhoduje hladina redukovaného glutathionu (GSH). Lidská GSNOR preferuje jako substráty spíše alkoholy s dlouhým řetězcem, jako jsou ω-mastné kyseliny nebo větší substráty typu HMGSH a GSNO, vykazuje malou účinnost k alifatickým alkoholům s krátkým řetězcem, jako je etanol. Špatná katalytická účinnost může být vylepšena přídavkem mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (Sanghani et al., 2002). Za účinnou vazbu HMGSH stejně tak jako GSNO jsou zodpovědné převážně rezidua Arg114, Thr46, Asp55, Glu57 a také katalytický zinek.

5.3. Úloha GSNOR v reakci rostlin na biotický stres

Řada studií prokázala, že GSNOR má významnou roli v obraně rostliny po napadení bakteriálními nebo houbovými patogeny. Byla zjištěna vysoká aktivita GSNOR v huseníčku (Sakamoto et al., 2002) a v hrachu (Barroso et al., 2006). Ve studii Wünsche et al., 2011 se díky VIGS systému (virus induced gene silencing) provedl knock-down GSNOR a byla studována funkce GSNOR v obranné reakci po napadení herbivorním živočichem *Manduca sexta*. Tento živočich napadá převážně jeden druh tabáku *Nicotiana attenuata*.

Umlčení exprese GSNOR snížilo herbivorem-vyvolanou akumulaci kyseliny jasmonové (JA) a ethylenu, dvou důležitých fytohormonů regulujících úrovně rostlinné obrany, aniž by se však snížila aktivita dvou mitogen-aktivovaných proteinkinas (MAPKs), proteinkinasy indukované poraněním (WIPK) a proteinkinasy indukované kyselinou salicylovou (SIPK). V rostlině, kde byla umlčena exprese GSNOR, byla prokázaná snížená aktivita trypsin proteinásových inhibitorů (TPIs) a byla zjištěna zvýšená citlivost k napadení patogenem *M. sexta*. Dále byla zjištěna nutnost přítomnosti GSNOR k akumulaci sekundárních obranných metabolitů vyvolaných methyljasmonátem (TPI, kaffeoylputrescin a diterpenové glykosidy). GSNOR se naopak nepodílí na regulaci transkripce JAZ3 (jasmonate ZIM-domain 3) a TD (threonin deaminasa) což naznačuje, že GSNOR reguluje pouze některé jasmonátem indukované odpovědi.

Data uvedená v práci Wünsche et al., 2011 naznačují, že GSNOR může mít důležitou úlohu v genetické modifikaci rostlin pro zlepšení odolnosti vůči herbivorním živočichům.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. Materiál a přístroje

6.1. Chemikálie

Akrylamid (Bio-Rad, USA)
4-Amino-5-methylamino-2´,7´-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA, Alexis, USA)
APS (Fluka, Švýcarsko)
Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad, USA)
Bisakrylamid (MP Biomedicals, USA)
Bromfenolová modř (Acros Organics, Belgie)
BSA (Sigma, USA)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, USA)
2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetát (H_2DCF DA, Sigma Aldrich, USA)
Etanol (Lach-Ner, ČR)
Fluorescein diacetát (FDA, Serva, USA)
Glutathion (Acros Organics, USA)
Chlorid sodný (Lachema, Česká republika)
Kryptogein - X24 rekombinantní protein (Ústav biochemie MU, Brno)
Laemmliho vzorkovací pufr (Bio-Rad, USA)
Murashige a Skoog medium (MS medium, Duchefa, Nizozemsko)
n-Butanol (Sigma, USA)
NADH (AppliChem, Německo)
Oligandrin (Ústav biochemie MU, Brno)
PMSF (Fluka, Švýcarsko)
Ponceau S (Merck, Německo)
Rekombinantní protein L41F a V84F (Ústav biochemie MU, Brno)
SDS (Sigma, USA)
Sekundární anti-rabbit protilátka IgG značená alkalickou fosfatásou (Sigma, USA)
Standard BSA (Sigma, USA)
Sušené mléko (AppliChem, Německo)
TBS (Fluka, Švýcarsko)
TEMED (Fluka,Švýcarsko)
Tris HCl (MP Biomedicals, Francie)
TRITON X-100 (Sigma, USA)
Tween-20 (Sigma, USA)

6.2. Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo)
Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
Digitální pH metr WTW 526 (InoLab, Německo)
Digitální předvážky (KERN, Německo)
Dokumentační zařízení BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP, USA)
Elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
Elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo)
Flowbox Holten Lamin Air HH 1.2 Plus (Heto-Holten, Dánsko)
Chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo)
Inkubátor INCUBAT (Melag, Německo)
Kolonky NAP-5 (GE Healthcare, USA)
Mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko)
Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA)
Minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika)
SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection Systém (Millipore, USA)
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systém (Bio-Rad, USA)
Trans-BlotR Transfer Medium – nitrocelulosová membrána 0,45 μm (Bio-Rad, USA)
Třepačka Mixing Block MB-102 (BIOER technology, Čína)
VisionWorks®LS (UVP, USA)
Vortex mixer SA8 (Stuart, UK)

6.3. Rostlinný materiál

Pro experiment byly použity suspenzní kultury buněk tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. Buněčná suspenze byla poskytnuta Ústavem biochemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

6.3.1. Kultivace buněčných suspenzí tabáku

Buňky byly kultivovány ve fytotronu s fotoperiodou 16/8 (den/noc), při 23 °C, na laboratorní orbitální třepačce s intenzitou otáček 180 rpm. Suspenzní kultura byla

pěstována v modifikovaném tekutém médiu Murashige-Skoog zvaném Chandlerovo médium, které obsahuje dvě složky. První složkou je hlavní médium s makroprvky a mikroprvky (Tab. 1), druhou složkou je roztok hormonů a vitaminů potřebných pro růst buněk (Tab. 2). Takto připravené tekuté médium bylo rozlito po 100 ml do 250 ml Erlenmeyerových baněk a vyautoklávováno. Buňky tabáku byly jednou týdně sterilně přeočkovávány v laminárním boxu do nového média, tzn. 8 ml buněčné kultury bylo aplikováno do 100 ml média. Vlastní experiment byl zahájen vždy čtvrtý den po pasážování buněk.

Tab. 7: Hlavní médium pro buněčné suspenze tabáku.

		Zásobní roztok (1 l)	Na přípravu 1 l média	Výsledná koncentrace (mg/l)
Makroprvky	NH_4NO_3	33,0 g	50 ml	1650
	KNO_3	38,0 g		1900
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	7,4 g		370
	KH_2PO_4	3,4 g		170
	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	8,8 g		440
Mikroprvky	H_3BO_3	6,2 g	1ml	6,2
	$MnSO_4 \times H_2O$	22,3 g		22,3
	$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	8,6 g		8,6
	KI	0,83 g		0,83
	$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	0,25 g		0,25
	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,025 g		0,025
	$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	0,025 g		0,025
EDTA - Fe	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	3,72 g	10 ml	37,2
	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	2,78 g		27,8

Tab. 8: Roztok hormonů a vitaminů pro buněčné suspenze tabáku.

		Zásobní roztok (1 l)	Na přípravu 1 l média	Výsledná koncentrace (mg/l)
Vitaminy	Kyselina nikotinová	50 mg	10 ml	5
	Pantothenát Ca	30 mg		3
	Glycin	20 mg		2
	Thiamin	5 mg		0,5
	Kyselina folová	5 mg		0,5
	Pyridoxin	5 mg		0,5
	Biotin	0,5 mg		0,05

	Kinetin	---	1 ml	0,1
	2,4 D	22 mg	0,8 ml	0,175
	myo-Inositol	---	100 mg	100
	Glutamin	---	200 mg	200
	Sacharosa	---	30 g	30 000

7. Metody

7.1. Elicitace buněčných kultur tabáku

Čtvrtý den po pasážování buněk byla buněčná suspenze rozdělena po 20 ml do pěti 100 ml Erlenmeyerových baněk. Do každé z nich bylo přidáno 100 μl testovaného elicitinu - X24, L41F, V84F a oligandrinu. Výsledná koncentrace elicitinů v suspenzi byla 5 $nmol.l^{-1}$. Do páté baňky, která sloužila jako kontrola, bylo přidáno 100 μl deionizované vody. Zásobní roztoky elicitinů o koncentraci 96 μM byly poskytnuty Ústavem biochemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Odběry vzorků byly realizovány v čase 0 (okamžitě po aplikaci elicitinů), 6, 24, 48 a 72 hodin od elicitace.

7.2. Stanovení životnosti buněčné suspenze

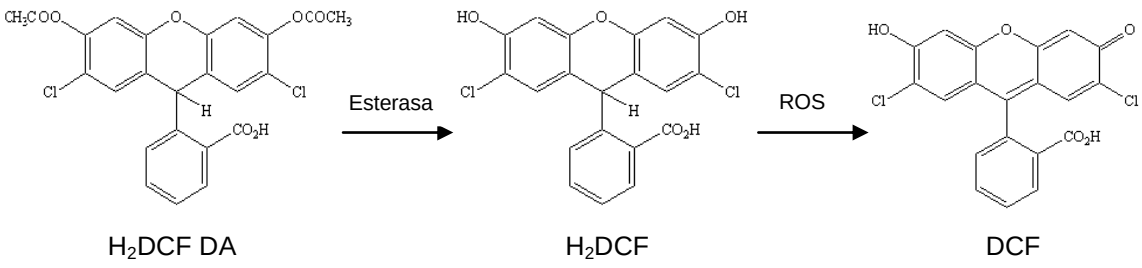
Životnost byla stanovena metodou využívající fluorescein diacetát (FDA) pomocí mikrodestičkového readeru Synergy-HT. Ke 100 μl buněčné suspenze v jamce na destičce bylo přidáno 5 μl fluorescenční sondy FDA o koncentraci 0,1 mg/ml. Jako blank bylo použito Chandlerovo kultivační médium buněk. Fluorescenční signál (excitace 490 nm, emise 514 nm) byl měřen ihned po přídavku detekční sondy k buněčné suspenzi a následně po 10 minutách inkubace mikrodestičky při 27 °C ve tmě. Stanovení bylo prováděno v triplikátu.

7.3. Stanovení produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku

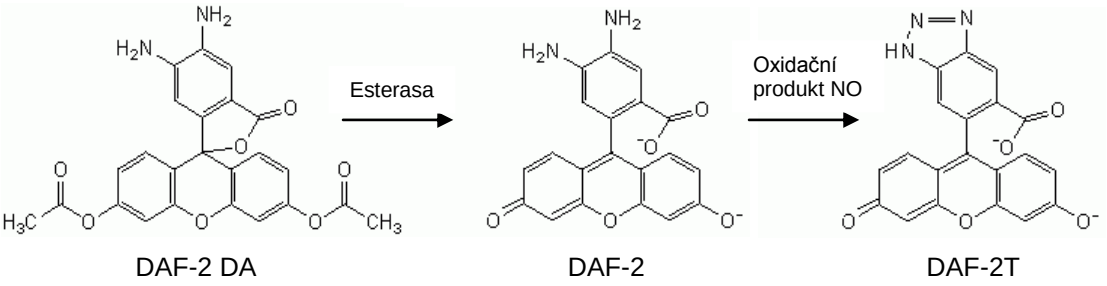
Pro stanovení aktivity enzymu produkce ROS a RNS byly použity vzorky elicitované buněčné suspenze odebírané v časech 0, 6, 24, 48 a 72 hodin po zahájení experimentu.

Reaktivní formy kyslíku (ROS) či dusíku (RNS) byly stanovovány spektrofluorimetricky pomocí tří fluorescenčních sond. V případě ROS se jednalo o sondu H_2DCF DA (Obr. 14), u RNS pak pomocí citlivých sond DAF-2 DA (Obr. 15) a DAF-FM (Obr. 16). DAF-FM je ve srovnání s DAF-2 fotostabilnější a citlivější, se stabilní a silnou fluorescencí v širokém rozmezí pH (Planchet & Kaiser, 2006). Všechny sondy prochází membránami a po vstupu do buňky jsou vnitrobuněčnými esterasami deacetylovány a následně reagují s přítomnými ROS nebo RNS.

Do jamek mikrodestičky bylo napipetováno 100 µl buněčné suspenze a poté přidáno 5 µl detekční sondy o koncentraci 0,2 mmol/l. Jako blank bylo použito Chandlerovo tekuté médium, ve kterém byly pěstovány buňky. Fluorescenční signál (excitace 495 nm, emise 515 nm) byl změřen ihned po přídavku sondy a poté po hodinové inkubaci ve tmě při 27 °C. Stanovení bylo prováděno v triplikátu.

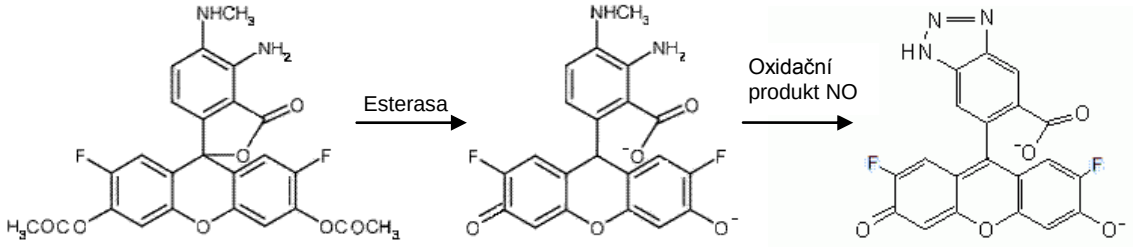


Obr. 14: Reakce detekční sondy H_2DCF DA. Sloučenina je esterasou deacetylována po vstupu do buňky. Poté reaguje s ROS za vzniku fluorescenčního produktu (převzato z Gomes et al., 2005)



Obr. 15: Reakce detekční sondy DAF-2 DA. Sloučenina je esterasou deacetylována

po vstupu do buňky. Poté reaguje s oxidačním produktem NO za vzniku fluorescenčního produktu (přepracováno z Gomes et al, 2006).



DAF-FM DA DAF-FM DAF-FM 2T

Obr. 16: Reakce detekční sondy DAF-FM DA. Sloučenina je esterasou deacetylována po vstupu do buňky. Poté reaguje s oxidačním produktem NO za vzniku fluorescenčního produktu (přepracováno z Kojima et al., 1998).

7.4. Měření optické hustoty buněk

Do mikrodestičky bylo napipetováno 200 µl buněčné suspenze. Poté byla na spektrofotometru změřena optická hustota (OD) při vlnové délce 600 nm. Jako blank bylo použito Chandlerovo tekuté médium. Měření bylo prováděno v duplikátu.

7.5. Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR

Pro stanovení aktivity enzymu GSNOR byly použity kontrolní a elicitované buněčné suspenze tabáku odebírané v časech 0, 6, 24, 48 a 72 hodin po zahájení experimentů elicitací buněk.

7.5.1. Příprava buněčného extraktu

Do 2 ml plastových zkumavek byly přeneseny z kultivačního media v Erlenmeyerových baňkách 2 ml buněčné suspenze. Po centrifugaci (5 minut, 1000 rcf) bylo odpipetováno 1 ml supernatantu. Eppendorfka s 1 ml zakoncentrované buněčné suspenze byla vložena na 1 min do tekutého dusíku. Po rozmražení byl přidán 1 ml čerstvě připraveného extrakčního pufru (50 mM Tris, pH 7,5; 0,2 % (v/v)

Triton-X; 2 mM DTT, 1 mM PMSF) a extrakt byl promíchán na vortexu. Homogenát byl centrifugován v předem vychlazené centrifuze 20 min při 16 000 g, 4°C.

7.5.2. Přečištění buněčného extraktu

Buněčný extrakt (supernatant viz. bod 7.5.1) byl přečištěn na kolonách NAP-5. Na kolony ekvilibrované 3 x 2,5 ml 10 mM Na-fosfátovým pufrem, pH 6,8 bylo naneseno 500 µl supernatantu. Po následném vsáknutí extraktu byl na kolonu nanesen 1 ml 50 mM K-fosfátového pufru o pH 7,8. Eluát byl okamžitě jímán do plastové zkumavky. Následně byla kolonka promyta 25 ml destilované vody.

7.5.3. Měření aktivity GSNOR

Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR bylo provedeno na readeru Synergy-HT v 96-ti jamkových mikrodestičkách. Do jednotlivých jamek bylo postupně napipetováno 225 µl reakčního pufru (20 mM Tris, pH 8), 15 µl extraktu a 30 µl NADH. Poté byla reakce startována přídavkem 30 µl GSNO. Roztoky 2 mM NADH a 4 mM GSNO byly připraveny vždy čerstvé a uchovávány ve tmě. V případě blanku bylo místo substrátu enzymu GSNO přidáno do jamky 30 µl destilované vody. Všechny vzorky byly měřeny ve třech opakováních, každý vzorek s vlastním blankem. Zaznamenáván byl pokles absorbance v průběhu deseti minut při 340 nm a 25 °C.

7.6. Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové

Měření bylo prováděno v 96-ti jamkových mikrodestičkách. Pro kalibraci byly použity standardy hovězího sérového albuminu (BSA) v koncentrační řadě: 0,02 - 0,04 - 0,06 - 0,08 - 0,1 - 0,12 - 0,16 - 0,2 - 0,4 mg/ml. Do jamek bylo postupně pipetováno 45 µl destilované vody, 5 µl standardu nebo vzorku proteinu a 200 µl činidla Bradfordové (pracovního roztoku). Do blanku bylo místo standardu nebo vzorku napipetováno 5 µl destilované vody. Destička byla protřepána a ponechána 10 minut pro vyvinutí zbarvení. Poté byla na readeru Synergy-HT proměřena absorbance při 595 nm.

7.6.1. Příprava roztoků pro stanovení proteinů

Činidlo Bradfordové:

Zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue: 50 mg CBB G-250, 25 ml 95 % metanolu a 50 ml 85 % kyseliny fosforečné.

Pracovní roztok: Zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue naředěný vodou v poměru 1:4.

7.7. Nativní PAGE elektroforéza (detekce GSNOR)

Elektroforéza neboli migrace iontů v elektrickém poli je separační metoda, která se používá pro dělení biologických látek na základě rozdílné elektroforetické pohyblivosti a také velikosti molekul. Nativní elektroforéza je prováděná za nedenaturujících podmínek. Vzorek je nanášen v nativní formě a po celou dobu separace musí být zachovávána jeho nativní struktura a s tím spojená enzymová aktivita. Jako nosič byl použit polyakrylamidový gel (PAGE), který vzniká polymerací akrylamidu (AA) a N,N‘-methylenbisakrylamidu (BIS). Polymerace byla zahájena volnými radikály vzniklými při rozkladu persíranu amonného (APS; $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2\ SO_4^{-\bullet}$). Do směsi byl vždy přidáván stabilizátor volných radikálů TEMED (N,N,N‘,N‘-tetramethylendiamin).

Separace proteinů byla provedena metodou diskontinuální elektroforézy za použití dvou gelů: 10 % dělícího gelu o pH 8,8 a 4 % zaostřovacího gelu o pH 6,8. Dělení v zaostřovacím gelu probíhalo při konstantním napětí 110 V a po doputování zóny bromfenolové modři na rozhraní zaostřovacího a dělícího gelu probíhalo dělení při konstantním napětí 150 V.

7.7.1. Příprava vzorků pro nativní PAGE elektroforézu

Vzorek byl smíchán s 60 % vychlazeným glycerolem v poměru 3:1 a promíchán na vortexu. Následně bylo 20 µl vzorku nanášeno do jamek elektroforetické komůrky. Pro viditelnost průběhu separace bylo do krajních jamek aplikováno 20 µl zásobního roztoku bromfenolové modři (0,4 mg bromfenolové modři, 2 ml vody, 1 ml 60 % glycerolu).

7.7.2. Roztoky pro nativní PAGE

Roztoky na přípravu dvou gelů při použití systému pro elektroforézu fy. Bio-Rad (spacery - 0,75 mm) jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9: Složení dělícího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Voda	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	TEMED	APS 10 %
Dělící 10%	3,3	4,1	2,5	-	0,01	0,1
Zaostřovací 4 %	0,65	3,05	-	1,25	0,01	0,1

Složení elektrodového pufru: 0,025 mol.l^{-1} Tris/HCl; 0,192 mol.l^{-1} glycin; H_2O; pH 8

K barvení byl použit roztok s NBT a HMGSH ve složení: 0,1 mol.l^{-1} NAD^+, 0,1 mol.l^{-1} PMS, 0,1 mol.l^{-1} NBT, 0,1 mol.l^{-1} GSH a 1 mol.l^{-1} roztok formaldehydu. Inkubace s barvícím roztokem probíhala ve tmavé nádobě zakryté alobalem po dobu 45 minut, následně byl gel promyt v destilované vodě a ponechán v ní na třepačce do druhého dne.

7.8. SDS-PAGE

Dodecylsíran sodný (SDS) váže pomocí hydrofóbní interakce bílkoviny v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny a udílí jim uniformní záporný náboj. Při elektroforéze v prostředí SDS dochází k migraci proteinů k anodě, přičemž pohyblivost závisí na velikosti molekuly. Po přidání merkaptoethanolu, dithiothreitolu, či jiných látek redukujících disulfidové můstky mezi řetězci bílkovin, je možné určit molekulovou hmotnost jednotlivých podjednotek neznámého vzorku bílkoviny.

Postup provedení SDS-PAGE je shodný s postupem pro nativní elektroforézu s tím rozdílem, že do dělícího i zaostřovacího gelu je přidán 10 % dodecylsíran sodný. Separace probíhala přibližně 45 minut.

7.8.1. Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Vzorky biologického materiálu byly smíchány se vzorkovacím pufrem v poměru 1:1 a po promíchání inkubovány 5-10 minut při teplotě 100 °C. Po vychladnutí bylo 40 µl vzorku napipetováno do označených jamek připraveného gelu. Jako kontrolní vzorek byl použit rekombinantní protein GSNOR. 40 µl kontrolního vzorku (obsahující 10 µg proteinu) připraveného smícháním se vzorkovacím pufrem v poměru 1:1 bylo aplikováno do krajní jamky gelu.

7.8.2. Roztoky a pufry pro SDS-PAGE

Roztoky na přípravu dvou gelů při použití sytému pro elektroforézu fy. Bio-Rad (spacery – 1,5 mm) jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Složení dělícího a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE elektroforézu.

Objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	H_2O	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	0,5 M Tris/HCl pH 6,8	TEMED	APS 10 %	SDS 10%
Dělící 10%	4,95	6,15	3,75	-	0,03	0,3	0,1
Zaostřovací 4 %	1,95	9,15	-	3,75	0,03	0,3	0,1

Laemmliho vzorkovací pufr: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 25% glycerol; 2% SDS; 0,01% bromfenolová modř. Před použitím se přidá 50 µl β-merkaptoethanolu k 950 µl vzorkovacího pufru.

Složení elektrodového pufru: 0,025 mol.l^{-1} Tris/HCl, 0,192 mol.l^{-1} glycin, 0,1 % SDS, pH 8, H_2O

Komerční roztok Bio-Safe Coomassie Stain byl použit k barvení polyakrylamidových gelů.

7.9. Western blot s následnou imunodetekcí

Western blot je analytická metoda, která je používána pro detekci, kvantifikaci, případně stanovení molekulové hmotnosti specifických proteinů v daném vzorku. Metoda spočívá v principu elektrotransferu proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu (např. nitrocelulosová, PVDF membrána). V prvním kroku jsou proteiny vzorku separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Proteiny jsou poté za pomoci elektrického proudu přeneseny z gelu na membránu. Molekuly přenesené a fixované na membráně se zviditelňují přímo různými barevnými reakcemi nebo metodou interakce se specifickými protilátkami (imunoblotting), kdy se po blokaci volných míst na membráně primární protilátka váže s vysokou specifitou na daný protein. Následuje inkubace se sekundární protilátkou, která bývá značená např. alkalickou fosfatasou nebo kořenovou peroxidasou. Ta se váže na imunokomplex primární protilátka-protein. Na základě enzymové reakce vzniká barevný nerozpustný produkt nebo jsou s využitím chemiluminiscenční reakce detekovány studované proteiny.

Postup provedení práce spočíval v separaci proteinů podle velikosti pomocí metody SDS-PAGE elektroforézy. Následně byl proveden Western blot za pomocí přístroje Trans-Blot® Turbo (Bio-Rad, USA). Při pokládání potřebného materiálu na blotovací kazetu muselo být dodrženo pořadí filtračních papírů, membrány a gelu, předem namočených po několik minut v blotovacím pufru. Pomocí speciálního válečku byly poté odstraněny bubliny. Samotné blotování probíhalo 8 minut za přítomnosti jednosměrného elektrického proudu (2,5 A, 25 V). Pro ověření správnosti přeblotování a zviditelnění rozdělených proteinů byl použit roztok Ponceau S, který lze po obarvení membrány zpátky vymýt destilovanou vodou.

Imunodetekce byla realizována s využitím přístroje SNAP i.d. Membrána v jamce krabičky byla umístěna tak, aby byly proteiny v kontaktu s použitými roztoky. Přístroj byl napojen na vakuum. Jako první byl použit blokovací roztok (0,3 % nízkotučné sušené mléko v TTBS) k zablokování volných míst na povrchu membrány tak, aby v následujících krocích nedocházelo k nespecifickým interakcím mezi protilátkami a matricí (membránou). Membrána byla blokovacím roztokem promyta a odsáta do sucha. Následně byla přidána primární protilátka ředěná do 0,3 % mléka s TTBS (viz Tab. 11). Inkubace probíhala 10 minut při laboratorní teplotě. Po odsátí byla membrána promyta TTBS (3x). Poté byla přidána protilátka sekundární (Anti-králičí – alkalická fosfatasa) ředěná v 0,3 % mléku v TTBS (1000x). Inkubace probíhala opět 10 minut s následným promytím s TTBS (3x).

Tab. 11: Použité primární a sekundární protilátky a jejich ředění.

Detekce	Primární Ab	Ředění	Sekundární Ab	Ředění
GSNOR	Ab polyklonální GSNOR (králičí)	100x	Anti-králičí/ alkalická fosfatasa (kozí)	1000x
Nitrované proteiny	Ab monoklonální NO_2-Tyr (myší)	1000x	Anti-myší/ peroxidasa (kozí)	10000x
β-aktin	Ab polyklonální Aktin (králičí)	2500x	Anti-králičí/ peroxidasa (kozí)	10000x

Takto připravená membrána se následně inkubovala 10-15 minut s komerčním roztokem NBT/BCIP pro obarvení. Poté byla promyta destilovanou vodou (2x) a usušena volně na vzduchu. Po vyschnutí byla provedena fotodokumentace na přístroji BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP,USA).

7.9.1. Roztoky a pufry pro Western blot

Blotovací pufr: 0,025 mol.l^{-1} Tris, 0,192 mol.l^{-1} glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3
TBS: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5
TTBS: 400 ml TBS, 200 μl Tween
Blokovací roztok: 0,3 % nízkotučné sušené mléko v TTBS

8. Výsledky a diskuse

Cílem předložené bakalářské práce bylo otestovat vliv aplikace vybraných elicitinů v průběhu obranné reakce na metabolismus reaktivních forem dusíku v suspenzní kultuře tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) se zaměřením na sledování změn aktivity *S*-nitrosoglutathionreduktasy. Elicitiny jsou velmi účinné elicitory - látky, které vyvolávají obrannou reakci v interakci rostlina-patogen. Jedná se

o malé, vysoce konzervativní rodiny extracelulárních proteinů sekretované zástupci rodů *Phytophthora* (Ricci et al., 1989) a *Pythium* z řádu *Pythiales* oddělení *Oomycet* (Ponchet et al., 1999, Panabières et al., 1997). Vedle stanovení životnosti buněk a hustoty buněčné suspenze charakterizující základní vliv elicitinů na buňky tabáku byly stanoveny změny schopnosti produkce NO a ROS po aplikaci elicitinů a *S*-nitrosoreduktásová aktivita, tj. aktivita enzymu podílejícího se na metabolismu oxidu dusnatého.

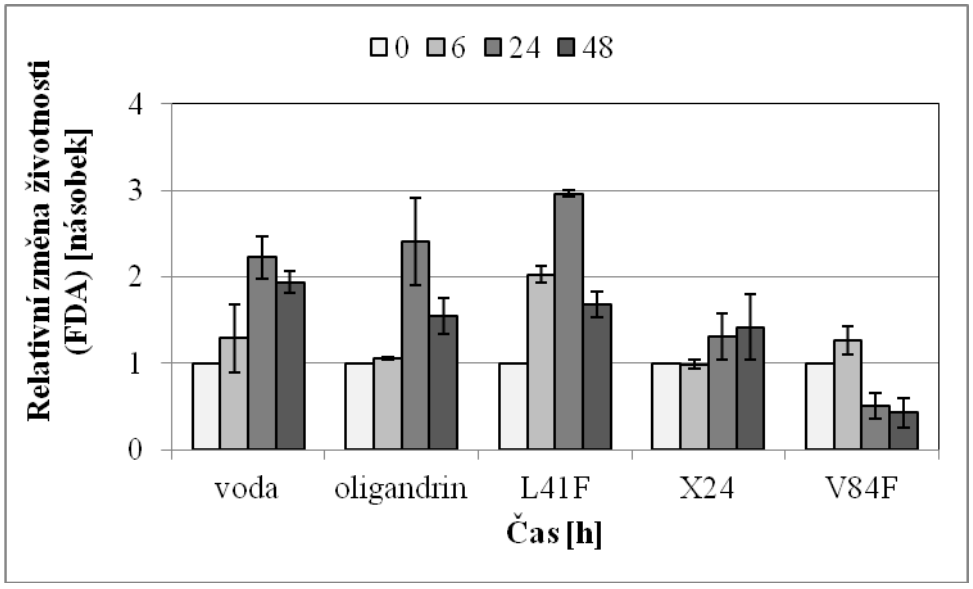
Pro studium vlivu elicitinů na metabolismus NO se zaměřením na enzym s *S*-nitrosoglutathionovou aktivitou na modelovém systému (buňky *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) byly v rámci předložené bakalářské práce zvoleny čtyři elicitiny: kryptogein (rekombinantní protein X24 - elicitin, připravený expresí genu pro kryptogein v kvasince *Pichia pastoris*), mutanty kryptogeinu L41F a V84F (opět rekombinantní proteiny) a elicitin oligandrin izolovaný z *Pythium oligandrum.* Výsledná koncentrace použitých elicitinů byla 5 nM v buněčné suspenzi. Vybrané parametry byly stanoveny v časech 0, 6, 24 a 48 hodin po aplikaci elicitinů k buněčné suspenzi. Všechny experimenty byly realizovány ve 3-5 opakováních.

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

Pro stanovení životnosti buněk jsme zvolili fluorogenní substrát esteras - fluorescein diacetát (FDA). Hlavní výhodou metod založených na detekci fluorescence je jejich citlivost. V tomto případě se jedná o velmi jednoduchou a rychlou metodu (Fišar, 2003; Rode et al., 1998). FDA je nepolární látka, která pasivně proniká do buněk. V živých buňkách je štěpen na octan a fluorescein. Princip metody je založen na stanovení enzymové aktivity buněčných esteras a tím současně membránové integrity, která zajišťuje nitrobuněčnou retenci vznikajících fluoreskujících produktů. Esterasy katalyzují hydrolytické štěpení molekul jednoduchých esterů obsahujících alkoholy s krátkým uhlíkatým řetězcem. Díky své souvislosti s buněčným metabolismem slouží esterasy jako marker životaschopnosti buněk. Některé práce ukázaly, že aktivita intracelulárních esteras buněčné suspenze je přímo úměrná počtu živých buněk (Víteček et al., 2004).

Čtvrtý den po pasážování buněk (buňky byly v exponenciální fázi růstu) byly k buněčné suspenzi aplikovány testované elicitiny. U kontrolních buněk byl zaznamenán ve stanovovaných časových intervalech 0-24 h postupný nárust životnosti

spojený s růstem a dělením buněk. Čtyřicet osm hodin po zahájení experimentu byl detekován mírný pokles životnosti buněk. Výsledky stanovení životnosti jsou v korelaci s výsledky stanovení optické hustoty, charakterizující vývoj buněčné suspenze (viz kapitola 8.2.). Podobný trend byl zaznamenán i po aplikaci oligandrinu a mutantu L41F. Rozdíly v intenzitě změn v porovnání i s kontrolním experimentem byly pozorovány zejména 6 h po aplikaci elicitinů, kdy se životnost po aplikaci oligandrinu významně nezměnila, naopak v případě L41F mutantu došlo ke zdvojnásobení detekované hodnoty. Zvýšení životnosti v případě aplikace mutantu L41F bylo vyšší i v porovnání s kontrolním experimentem. Podobně i 24 h po aplikaci elicitinů byl v případě L41F mutantu zaznamenán významnější nárust životnosti. Naopak 48 hodinu experimentu byl ve všech případech (kontrola, oligandrin, L41F) detekován pokles životnosti. V tomto případě u buněčných suspenzí s aplikovaným oligandrinem nebo mutantem L41F byl pokles významnější v porovnání s kontrolou. Šest hodin po aplikaci kryptogeinu X24 nedošlo k navýšení životnosti, její vzestup byl zaznamenán až 24, ale i 48 h experimentu, na rozdíl od kontrolního pokusu. Změny v životnosti v případě X24 proteinu jsou významně nižší v porovnání s kontrolním experimentem a jsou v korelaci s výsledky stanovení optické hustoty buněčné suspenze (viz. kap. 8.2) a poukazují na výrazný negativní vliv kryptogeinu na dělení, růst a životaschopnost buněk. Toxický účinek mutantu V84F na buněčnou suspenzi tabáku je ještě výraznější. Šest hodin po aplikaci V84F mutantu se životnost buněčné suspenze mírně zvýšila, dle výsledků stanovení optické hustoty, buňky byly schopny se ještě dělit, ale již 24 h po aplikaci V84F mutantu byl zaznamenán destrukční vliv tohoto elicitinu na buňky, bylo detekováno snížení životnosti na polovinu hodnoty stanovované na počátku experimentu (Obr. 17).



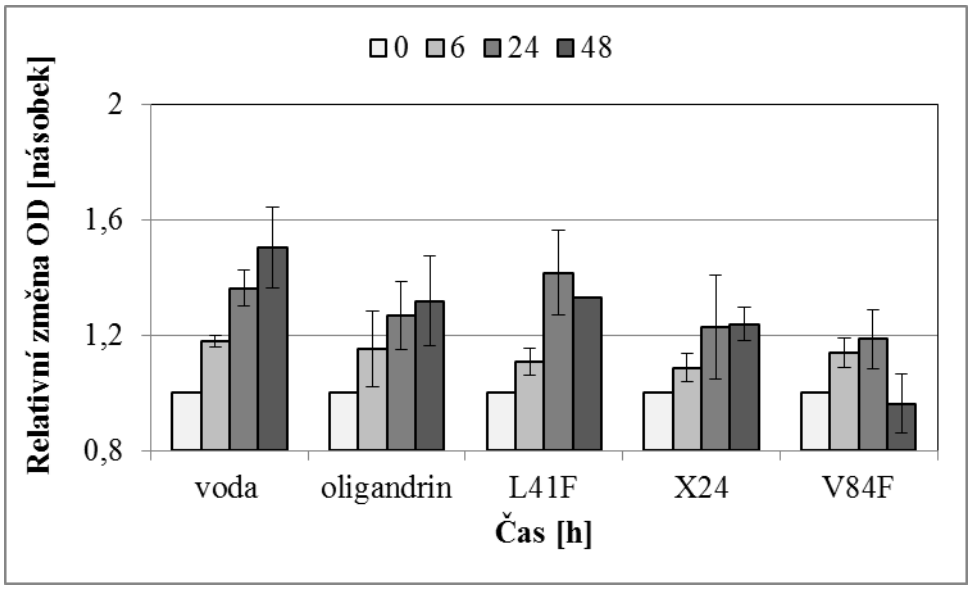
Obr. 17: Vývoj životnosti buněk po aplikaci elicitinů k suspenzním kulturám tabáku: Srovnání čtyř elicitinů v časech 0, 6, 24 a 48 hodin. Jako kontrola byla použita destilovaná voda.

V případě aplikace kryptogeinu na listy tabáku byla výrazná nekróza pozorována již po 48 hodinách (Plešková et al., 2011), po třech dnech po aplikaci elicitinu byla pozorována rozsáhlá nekróza po celé ploše listu (Dokládal et al., 2012). Mutantní elicitin V84F také vyvolává nekrózu na listech tabáku, avšak v menším rozsahu, než tomu bylo při aplikaci kryptogeinu. Mutant L41F (Dokládal et al., 2012) podobně jako oligandrin (nepublikované výsledky) nevyvolává téměř žádnou nekrózu, tedy hypersenzitivní reakci na listech tabáku, což koresponduje s naměřenými výsledky na modelu buněčné suspenze tabáku.

8.2. Vliv elicitinů na optickou hustotu buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi

Měření optické hustoty (optical density - OD) buněk bylo provedeno spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm. Zaznamenané výsledky jsou v korelaci s naměřenými hodnotami životnosti buněk. U kontrolních buněk s destilovanou vodou byl zaznamenán nárust OD ve všech měřených časech, což je spojeno růstem životaschopnosti buněk a jejich dělením (Obr. 18). Podobný trend byl zaznamenán také v případě elicitinu oligandrinu a mutantu L41F, což v souladu s výsledky stanovení životnosti buněk naznačuje jejich nízkou toxicitu vůči buňkám *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi (viz. kap.8,1). Čtyřicet osm hodin po aplikaci mutantu L41F byl zaznamenán

mírný pokles v hodnotách OD, naopak u elicitinu oligandrinu hodnoty vzrostly. Toxické účinky elicitinů kryptogeinu a mutantu V84F potvrzuje malý nárust hodnot OD. V případě mutantu V84F byl 48 h po aplikaci elicitinů dokonce zaznamenán výrazný pokles OD pod hodnotu charakterizující hustotu buněčné suspenze na počátku experimentu.



Obr. 18: Relativní změna OD v čase po aplikaci elicitinů k suspenzním kulturám tabáku: Srovnání čtyř elicitinů v časech 0, 6, 24 a 48 hodin.

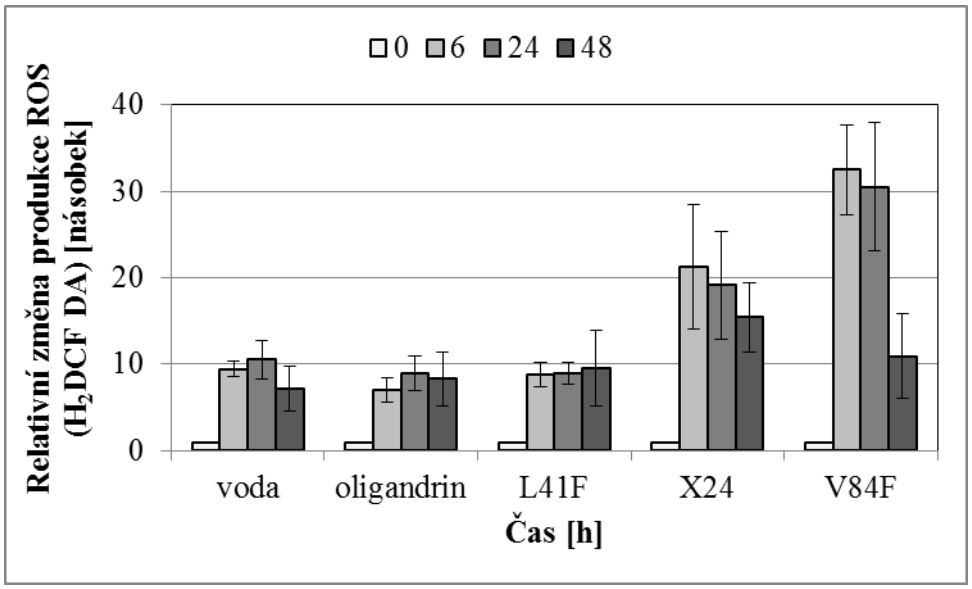
8.3. Vliv elicitinů na produkci reaktivních forem kyslíku buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi

V průběhu inkubace tabákových buněk s elicitiny byla sledována produkce ROS za použití fluorescenční sondy H_2DCF DA (Crow, 1997). Chemicky představuje tato sonda redukovanou formu fluoresceinu. Po odštěpení acetátových skupin intracelulárními esterasami a následné oxidaci je H_2DCF převeden na vysoce fluoreskující DCF.

Elicitiny byly k buněčné suspenzi přidány čtvrtý den po pasážování. Do kontrolního vzorku byla aplikována destilovaná voda místo elicitinů. Produkce ROS byla měřena v časech 0, 6, 24 a 48 hodin. Pokus byl proveden ve třech opakováních.

Šest hodin po aplikaci elicitinů v porovnání k počátečnímu stavu byl detekován nárust produkce ROS i v kontrolním vzorku bez elicitinu (Obr. 19). V tomto případě lze předpokládat vliv mechanické manipulace s buněčnou suspenzí při aplikaci elicitinů, případně vody do kontrolního vzorku. Produkce ROS po aplikaci oligandrinu a mutantu

L41F byla srovnatelná s kontrolním experimentem v průběhu 0-48 h. Naopak v případě elicitinů X24 a V84F byl nárust ROS 6 h po aplikaci elicitinů až trojnásobně vyšší než v případě kontroly. Intenzivní produkci ROS buňkami tabáku po aplikaci kryptogeinu potvrzuje několik studií včetně Cvetkovska and Vanlerberghe, 2012, kde byl prokázán nárust ROS ve dvou fázích kulminujících po 2 a po 8 hodinách po aplikaci patogenu. Od 24. hodiny po aplikaci X24 a V84F k buněčné suspenzi se intenzita produkce ROS snižovala, ale byla stále významně vyšší než v případě kontroly a po aplikaci elicitinů oligandrinu a mutantu L41, což koresponduje s předchozími publikovanými výsledky (Dokládal et al., 2012). V případě mutantního elicitinu V84F byla zaznamenána 48 h po aplikaci elicitinů více než trojnásobně snížená produkce ROS a to na úroveň intenzity produkce ROS v kontrolním vzorku. Významně rychlý pokles produkce ROS po aplikaci mutantu V84F je v korelaci se výrazně sníženou životností buněk a schopností se dělit, což koresponduje s prokázaným zvýšeným toxickým účinkem tohoto elicitinu (Dokládal et al., 2012).



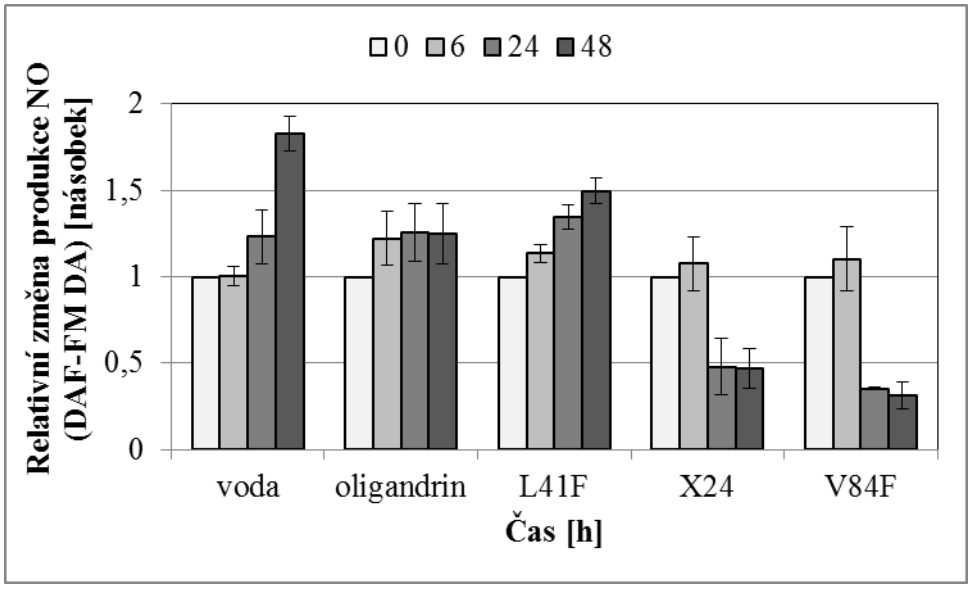
Obr. 19: Relativní změna produkce ROS v závislosti na čase po aplikaci elicitinů k suspenzním kulturám tabáku: Srovnání čtyř elicitinů v časech 0, 6, 24 a 48 hodin. Měření bylo provedeno pomocí fluorescenční sondy H_2DCF DA.

8.4. Vliv elicitinů na produkci reaktivních forem dusíku buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi

Pro měření produkce RNS byly použity sondy DAF-FM DA (Kojima et al., 1998) a DAF-2 DA (Gomes et al, 2006). Jedná se rovněž o fluorescenční sondy reagující na

principu odštěpení diacetátu buněčnými esterasami a následné reakci s NO za vzniku fluorescenčního produktu. Sonda DAF-FM DA je citlivější. Výsledky při použití obou sond vykazovaly podobnou závislost změn produkce RNS v čase po aplikaci elicitinů k buněčným suspenzím. V případě použití sondy DAF-FM DA bylo dosaženo výsledků s významně nižšími odchylkami.

Čtvrtý den po pasážování byly k buněčné suspenzi aplikovány elicitiny. V řadě předchozích studií bylo prokázáno, že po aplikaci kryptogeinu k buněčné suspenzi tabáku dochází k největší produkci NO okamžitě, s maximem v řádu několika jednotek minut (Lamotte et al., 2004, Planchet et al., 2006). V případě kontrolního vzorku byl zaznamenán postupný nárust produkce NO, který dosahoval téměř dvojnásobné hodnoty 48 h po aplikaci elicitinu. V případě mutantu L41F byl pozorován podobný trend v nárustu schopnosti produkce NO jako v případě kontrolního experimentu, pouze 48 h bylo zvýšení intenzity produkce NO pouze 1,5 násobně větší než u kontrolního vzorku. Oligandrin po 6 h mírně zvýšil produkci NO, která se dále již neměnila. Již 24 h po aplikaci kryptogeinu a mutantu V84F shodně došlo k výraznému snížení produkce NO, které bylo až trojnásobné oproti původní měřené hodnotě. V případě mutantu V84F lze pozorovat korelaci mezi poklesem životnosti buněk a poklesem schopnosti produkovat NO. Toxický účinek v případě mutantu V84F projevující se sníženou schopností produkce NO v porovnání s kontrolním experimentem byl opět intenzivnější v porovnání s účinkem kryptogeinu



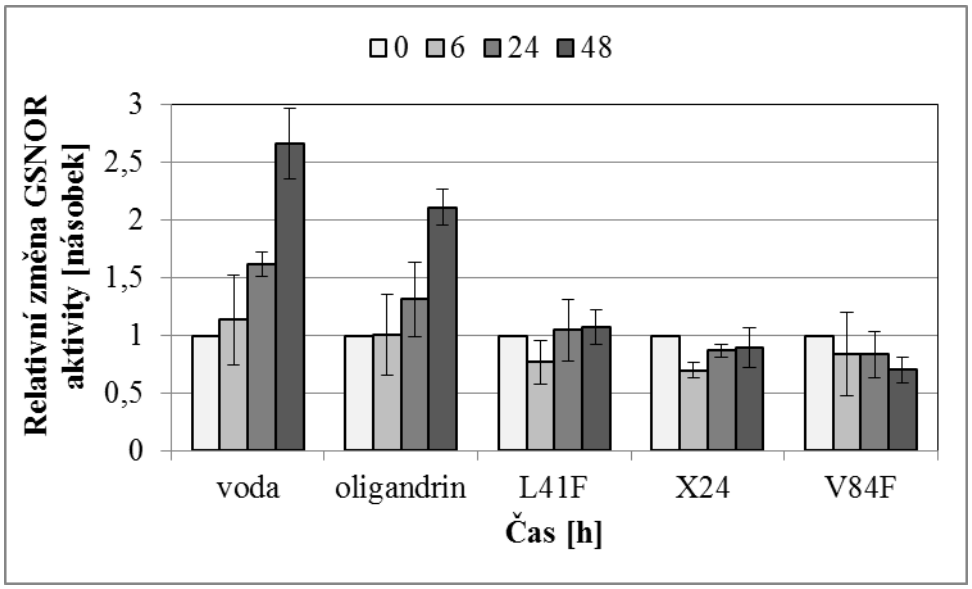
Obr. 20: Relativní změna produkce NO v závislosti na čase po aplikaci elicitinů k suspenzním kulturám tabáku: Srovnání čtyř elicitinů v časech 0, 6, 24 a 48 hodin. Měření bylo provedeno pomocí fluorescenční sondy DAF-FM DA.

8.5. Vliv elicitinů na aktivitu *S*-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) buněčné suspenze *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi

Stanovení aktivity GSNOR bylo provedeno spektrofotometricky měřením změny absorbance při 340 nm po dobu 10 min. Princip měření aktivity GSNOR spočíval v použití Warburgova optického testu, kdy je NAD^+ redukován na $NADH + H^+$. Tato reakce je provázena výraznou změnou absorpčního spektra.

Z výsledků je patrné, že největší aktivita byla naměřena u kontrolních buněk, což koresponduje s výsledky naměřenými pro produkci NO. Podobný trend byl zaznamenán i v případě elicitinu oligandrinu, kdy se stanovovaná aktivita GSNOR zvyšuje ve všech časech. U buněčných suspenzí s aplikovanými elicitiny kryptogeinem, L41F a V84F byl pozorován opačný trend. Šest hodin po zahájení experimentu byl detekován mírný pokles GSNOR aktivity. V případě kryptogeinu a mutantu L41F došlo v průběhu 24 i 48 h k následnému mírnému zvýšení aktivity GSNOR Detekované změny GSNOR aktivity v případě elicitinu L41F a kryptogeinu v průběhu experimentu nejsou významné. Pouze v případě V84F mutantu byl zaznamenán pokles GSNOR aktivity, což opět souvisí s výrazným toxickým účinkem mutantu V84F.

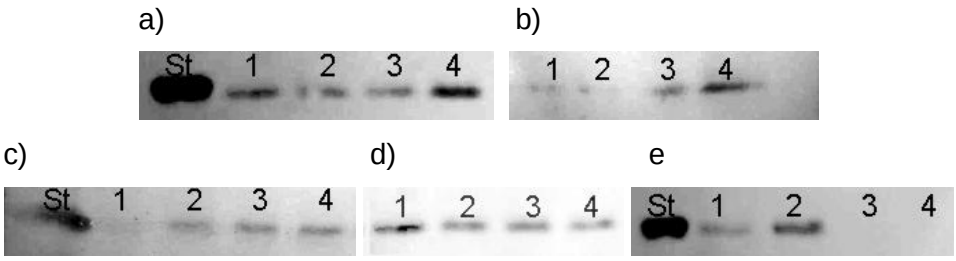
.



Obr. 21: Relativní změna GSNOR aktivity v závislosti na čase po aplikaci elicitinů k suspenzním kulturám tabáku: Srovnání čtyř elicitinů v časech 0, 6, 24 a 48 hodin.

8.6. Western blot analýza změn zastoupení GSNOR a intenzity nitrace proteinů po aplikaci elicitinů

Změny v zastoupení GSNOR byly detekovány metodou Western blot s použitím připravené polyklonální protilátky proti rekombinantní GSNOR (*Lactuca sativa*). Z časových důvodů bylo stanovení realizováno pouze ve dvojím opakování, kdy byly upřesněny vhodné podmínky pro detekci GSNOR metodou Western blot v extraktech připravených z tabákových buněk (podmínky extrakce, ředění primární protilátky,…). Jedná se o předběžné výsledky z pilotních experimentů, které musí být dále ověřeny. Výsledky jsou v souladu se stanovenými změnami GSNOR aktivity po aplikaci vybraných elicitinů. Zvýšení zastoupení proteinu GSNOR v extraktech bylo pozorováno v kontrolním experimentu a po aplikaci oligandrinu. V případě aplikace L41F bylo detekováno mírné zvýšení zastoupení proteinu GSNOR. Pokles zastoupení proteinu GSNOR byl zaznamenán po aplikaci kryptogeinu. 24 a 48 h po aplikaci V84F elicitinu nebyl signál detekovaný.

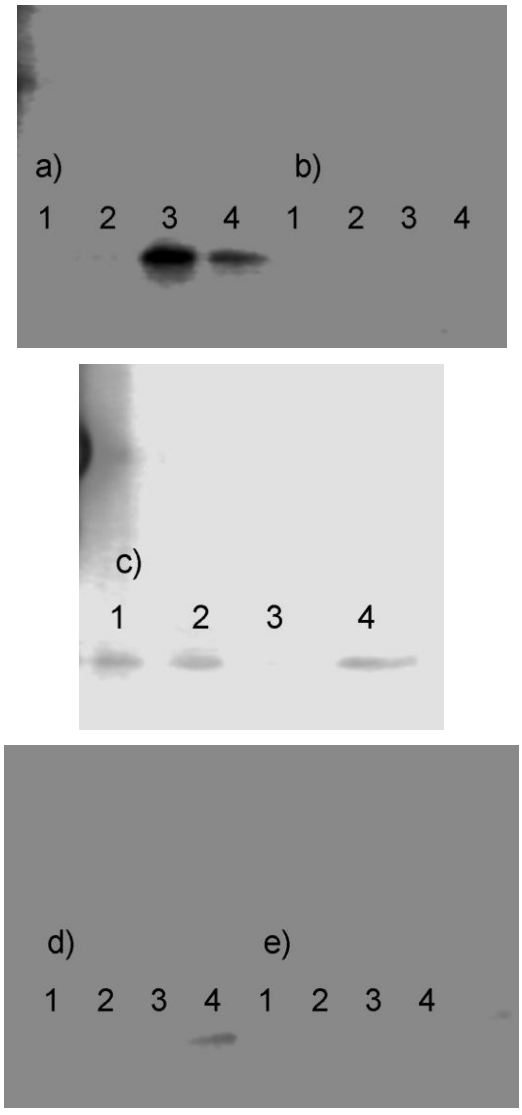


Obr. 22 Western blot analýza změn zastoupení GSNOR. Aplikace a) voda (kontrola), b) oligandrin, c) L41F, d) kryptogein, e) V84F. St – standard GSNOR (*Lactuca sativa*) 5 µg; 1 – 0 h, 2 – 6 h, 3 – 24 h, 4 – 48 h.

Detekce β-aktinu v rámci pilotních experimentů nebyla úspěšná. Byla použita komerční protilátka připravená proti β-aktinu, která byla specifická na β-aktin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), ječmene setého *(Hordeum vulgare*) a kukuřice seté (*Zea mays*). V následujících experimentech je nutné použít primární protilátku specifickou na β-aktin tabáku, případně zvolit jiný kontrolní protein.

Pozitivní reakci, tzn. přítomnost nitrovaných proteinů (bandy detekující proteiny v oblasti s molekulovou hmotností cca 30-40 kDa), jsme detekovali s využitím protilátky proti nitrovanému tyrozinu zejména 24 h a 48 h po aplikaci oligandrinu a 48 h po aplikaci elicitinu L41F. Nitrované proteiny byly detekované i v kontrolním vzorku. Proč nebyl detekován v kontrolním experimentu (aplikace

vody) žádný band v čase 24 h bude nutné ověřit v následujících experimentech (zda se pouze nejedná o chybu při měření). Je zajímavé, že přítomnost nitrovaných proteinů byla prokázána u buněk kontrolních neovlivněných aplikací elicitinu, což může souviset s růstem buněčné suspenze. Po aplikaci elicitinů byly významné změny zastoupení nitrovaných proteinů detekované pouze v případě oligandrinu. Lze předpokládat možnou roli procesu nitrace v mechanismu obranné reakce vyvolané působením elicitinů. V případě elicitinů aktivujících intenzivní produkci ROS, jako je kryptogein a V84F, nebyla nitrace detekována. Opět je nutné zdůraznit, že se jedná pouze o pilotní experimenty a výsledky musí být v následujících pokusech potvrzeny.



Obr. 23 Western blot analýza změn zastoupení nitrovaných proteinů. Aplikace a) oligandrin, b) kryptogein, c) voda, d) L41F, e) V84F. 1 – 0 h, 2 – 6 h, 3 – 24 h, 4 – 48 h.

9. Závěr

- Zvýšená produkce NO a současně i GSNOR aktivita, jsou charakteristické pro dělení a růst buněk (kontrolní experiment). Naopak změna produkce ROS a je u kontrolních buněk minimální.

- Byl potvrzen toxický účinek aplikace elicitinu kryptogeinu (protein X24) a mutantu V84F na buněčnou suspenzi tabáku. Negativní vliv V84F je intenzivnější.

- Toxický účinek kryptogeinu a jeho mutantu V84F je spojen s významně zvýšenou produkcí ROS a s tím spojeným oxidativním stresem vedoucím k destrukci buněk. Naopak produkce NO nebyla aktivována a v korelaci s poklesem životnosti buněk byla naopak snížena.

- Byl pozorován malý vliv oligandrinu a elicitinu L41F na růst, dělení a životaschopnost buněk. Nebyla zaznamenána změna v produkci ROS.

- Na rozdílný mechanismus účinku oligandrinu a mutantu L41F poukazují rozdílné změny v produkci NO a aktivitě GSNOR po aplikaci daných elicitinů.

- Nitrace proteinů byla zaznamenána zejména po aplikaci elicitinu oligandrinu.

- V této práci se jednalo pouze o pilotní experimenty, kdy byl zjišťován vliv elicitinů na buněčnou suspenzi *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi v časovém období 0-48 h po aplikaci elicitinů. Následující experimenty budou zaměřeny na studium zapojení NO, GSNOR a intenzitu nitrace proteinů v čase 0 - max. 12 h po aplikaci elicitinů.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab-GSNOR	Králičí polyklonální protilátka proti GSNOR
APS	Persíran amonný
APX	Askorbátperoxidasa
BIS	N,N‘-methylenbisakrylamid
BSA	Hovězí sérový albumin
CAT	Katalasa
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
DAF-2	4,5-Diaminofluorescein
DAF-2 DA	4,5-Diaminofluorescein diacetát
DAF-2 T	Triazofluorescein
DAF-FM	4-Amino-5-methylamino-2‘,7‘-difluorescein
DAF-FM DA	4-Amino-5-methylamino-2‘,7‘-difluorescein diacetát
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DHE	Dihydroergosterol
DTT	Dithiotreitol
GSH	Redukovaný glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
H_2DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
H_2DCF DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetát
HMGSH	Hydroxymethylglutathion
HR	Hypersenzitivní reakce
NBD-PC	Nitrobenzoxadiazol-fosfatidylcholin
NBT	Nitrotetrazoliová modř
NBT-BCIP	Nitrotetrazoliová modř - 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
NOS	Synthasa oxidu dusnatého
NR	Nitrátreduktasa
$O_2^{\bullet-}$	Superoxidový anion-radikál
OH^-	Hydroxylový ion
$ONOO^-$	Peroxydusitanový anion
PMS	Fenylmethylsulfonyl
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid
PR-protein	Protein související s napadením patogenem
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxiddismutasa
TEMED	N,N,N‘,N‘-tetramethylendiamin
TTBS	Tween s TBS

Seznam použité literatury

Akimoto C., Aoyagi H., Tanaka H. (1999). Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant cells. *Appl Microbiol Biotech*. **52**, 429–436.

Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Rodriguez-Serrano M., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M.C., Valderrama R., Sandialo L.M., del Río L.A. (2006) Localization of *S*-nitrosoglutathione and expression of *S*-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J. Exp. Bot.* **57**, 1785–1793.

Beerling D.J., Osborne C.P., Chaloner G.W. (2001) Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Plant. Sci.* **6**, 508-509.

Boller, T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**,189–214.

Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants, pp. 1102-1156, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA

Crow J.P. (1997) Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: Implicationsfor intracellular measurement of reactive nitrogenand oxygen species. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* **1**, 145-157

Cetkovska M., Vanlerberghe G.C. (2012) Coordination of a mitochondrial superoxide burst during the hypersensitive response to bacterial pathogen in *Nicotiana tabacum. Plant Cell Environ*. **35**, 1121–1136

Dokládal 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 elicitin-induced resistence. *J. Exp. Bot.* **63**, 2203–2215.

Fefeu S., Bouaziz S., Huet J.-C., Pernollet J.-C., Guittet E. (1997) Three-dimensional structure of β-cryptogein, a β-elicitin secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea. Protein Sci.* **6**, 2279-2284.

Fišar Z. (2003), Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. Učebnice, http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm, 6. 5. 2013

Flor H.H. (1942) Inheritance of pathogenicity in Melampsora lini. *Phytopath*, **32**, 653–669.

Flor HH. (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annu. rev. phytopathol.* **9**, 275-283.

Foissner I, Wendehenne D., Langebartels Ch., Durner J. (2000) *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J.* **23**, 817-824.

Garcia-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. *Mol Plant-Microbe Interact.* **19**, 711-724.

Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003) *S*-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol. Interv*. **3**, 253 – 263.

Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. biochem. biophys. methods* **65**, 45-80

Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C. (2006) Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: A review. *J. Fluoresc.* **16**, 5-30

Gooley P.R., Keniry M.A., Dimitrov R.A., Marsh D.E., Keizer D.W., Gayler K.R., Grant B.R. (1998) The NMR solution structure and characterization of pH dependent chemical shifts of the β-elicitin, cryptogein. *J. Biomol. NMR* **12**, 523-534.

Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci.* **16**, 160-168.

Heath M. C. (1998) Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol*. **104**, 117-124.

Hill B.G., Dranka B.P., Bailey S.M., Lancaster J.R. Jr., darley-Usmar V. (2010) What part od NO don´t you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J. Biol. Chem.* **285**, 19699-19704.

Hirasawa K., Amano T., Shioi Y. (2005) Effects of scavengers for active oxygen species on cell death by cryptogein. *Phytochemistry* **66,** 463-468.

Ischiropoulos H. (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Bioph Res Co* **305**, 776-783.

Jones J.D., Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.

Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshioka H., Kamoun S., Takahashi H. (2009) INF1 elicitin activates jasmonic acid- and etylene-mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt dinase in tomato. *J. Phytopathol.* **157**, 287-297.

Keen N.T. (1975) Specific elicitors of plant phytoalexin production - determinant of race specificity in pathogenes. *Science* **187**, 74-75.

Klessig D.F., Durner J., Noad R., Navarre D.A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J., Shsh J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8849-8856.

Kojima H., Nakatsubo, Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T. (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* **70**, 2446-2453.

Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2012) *S*-nitrosoglutathionreduktasa: klíčový enzym regulace *S*-nitrosylace. *Chem. listy* **107**, 202-208.

Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tâch R., Luhová L., Barroso J.B., Petřivalský M. (2013) Structural and functional

characterization of a plant *S*-nitrosohlutathione reduktase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie*, **95**, 889-902.

Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Seyueira-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 Physiol.* **135**, 516-529.

Lascombe M.B., Retaulleau P., Ponchet M., Industri B., Blein J.P., Prangé T. (2007) Structure of sylvaticin, a new alpha-elicitin-like protein from *Pythium sylvaticum*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **63**, 1102-1108.

Lebrun-Garcia A., Bourque S., Binet M.-N., Ouaked F., Wendehenne D., Chiltz A., Schäffner A., Pugin A. (1999) Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction on tobacco. *Biochimie* **81**, 663-668.

Lherminier J., Benhamou N., Larrue J., Milat M. L., Boudon-Padieu E., Nicole M., Blein J.-P. (2003) Cytological characterization of elicitin-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. *Phytopathology* **93**, 1308-1319.

Lichtenthaler H. K. (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant. Physiol*. **148**, 4-14.

Lochman J., Kašparovský T., Damborský J., Osman H., Marais A., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J.-P., Mikes V. (2005) Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora,* with altered abilities to indude a defense reaction in tabacco cells. *Biochemistry* **44**, 6565-6572.

Lyon G.D., Reglinski T., Newton AC. (1995) Novel disease control compounds: The potential to immunise plants against infection. *Plant Pathol*. **44**, 407-427.

Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2004) *S*-nitrosylation : a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res.* **62**, 43-52.

Masunaka A., Sekiguchi H., Takahashi H., Takenaka S. (2010) Distribution and expression of elicitin-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum. Phytopathology* **158**, 417-426.

Mejía-Teniente L., Torres-Pacheco I., González-Chavira M. M., Ocampo-Velazquez R. V., Herrera-Ruiz G., Chapa-Oliver A. M., Guevara-González R. G. (2010) Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *Afr. J. Biotechnol*. **9**, 9155-9162.

Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**, 405-410.

Neill S., Desikan R., Hancock J. (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 388-395.

Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **59**, 165-176.

Panabières F., Ponchet M., Allasia V., Cardin L., Ricci P. (1997) Characterization of border species among Pythiaceae: several *Pythium* isolates produce elicitins, typical proteins from *Phytophthora* spp. *Mycol. Res.* **101**, 1459-1468.

Pei, Q. H., Li T., Kao S. Ch., Lin H. H., Guang Y. L. (2006) Induction of volatile organic compounds of *Lycopersicon esculentum* Mill. and its resistance to *Botrytis cinerea* Pers. by burdock oligosaccharide. *J. Integr. Plant Biol.* **48**, 550 - 557.

Petřivalský M. a kol. (2011) Experimentální metody studia obranné reakce rostlin. Pp. 1-106, skripta, Univerzita Palackého
Petřivalský M. (2012) Reaktivní formy kyslíku a dusíku ve vývoji a stresových odpovědích rostlin. Habilitační práce

Picard K., Ponchet M., Blein J.-P., Rey P., Tirilly Y, Benhamou N. (2000) Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant physiol*. **124**, 379-395.

Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008) Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chem. Listy* **102**, 410-416.

Planchet E., Sonoda M., Zeier J., Kaiser W.M. (2006) Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogein induced hypersensitive response – a critical re-evaluation. *Plant Cell Environ.*, **29**, 59-69.

Planchet E., Kaiser W.M. (2006) Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J. Exp. Botany* **57**, 3043–3055.

Plešková V., Kašparovský T., Obořil M., Ptáčková N., Chaloupková R., Dokládal L., Damborský J., Lochman J. (2011) Elicitine membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: Role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant Physiol. Bioch.* **49**, 321-328.

Ponchet M., Panabières F, Milat M.-L., Mikes V., Montillet J.-L., Suty L., Triantaphylides C., Tirillye Y., Blein J.-P. (1999) Are elicitins cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci*. **56**, 1020–1047.

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., a kol. (1998) Fyziologie rostlin. Pp. 412-430, Academia Praha, Česká republika.

Radman R., Saez T., Bucke Ch., Keshavarz T. (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem*. **37**, 91-102.

Ricci P., Bonnet P., Huet J.-C., Sallantin M., Beauvais - Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G., Pernollet J.-C. (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi Phytophthora eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem*. **183**, 55-583.

Rode H. J., Eisel D., Frost I. (editors) (1998) Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation, 3rd edition, Roche Applied Science.

Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an *S*-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett.* **515**, 20-24.

Sang J., Jiang M., Lin F., Zhang A., Tan M. (2008) Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. *J. Integr. Plant Biol.* **50**, 231-243.

Sanghani P. C., Bosron W. F., Hurley T. D. (2002) Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structural changes associated with ternary complex formation. *Biochemistry* **41**, 15189–15194.

Smirnoff N. (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* **78**, 661-669.

Staab C. A., Hellgren M., Hoog J. O. (2008) Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and *S*-nitrosoglutathione reduktase activities. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3950 – 3960.

Stohr C., Ullrich W. R. (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J. Exp. Bot.* **53**, 2293-2303

Thakur M., Sohal B.S. (2013) Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *Biochemistry*. Volume 2013, Article ID 762412, 10 str.

Vera-Estrella R., Higgins V.I., Blumwald E. (1994) Plant defense response to fungal pathogens. *Plant Physiol.* **106**, 97-102.

Víteček J., Adam V., Petřek J., Vacek J., a kol. (2004): Esterases as a marker for growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the Norway spruce. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **79**, 195-201.

Wünsche H., Baldwin I.T., Wu J. (2011) *S*-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuata. J. Exp. Bot.* **62**, 4605–4616.

Yamasaki, H. and Sakihama, Y. (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett*. **468**, 89–92

Yu L.M. (1995) Elicitins from *Phytophthora* and basic resistence to tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 4088-4094.

Zhao J., Davis L.C., Verpoorte R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **23**, 283 - 333.