

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv struktury elicitinů na změny v antioxidační  
kapacitě u tabákových buněk**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Jakub Foldyna**  
Studijní program: B1406 Biochemie  
Studijní obor: Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Jana Jahnová**  
Konzultant: **Mgr. Martina Janků**  
Rok: 2018

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

V Olomouci dne 14. 5. 2018

.....

Tímto bych rád poděkoval své vedoucí Mgr. Janě Jahnové za odborné vedení, cenné rady a připomínky a trpělivost během vypracování teoretické a experimentální části. Dále bych rád poděkoval Mgr. Martině Janků za rady ohledně kultivace, elicitace a sběru tabákových buněk. Rovněž bych chtěl poděkovat všem zaměstnancům Katedry biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého za milý přístup a výpomoc při práci v laboratoři.

V neposlední řadě bych rád poděkoval Ústavu biochemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně za přípravu a darování elicitinů, bez kterých by tato práce nevznikla.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jakub Foldyna
Název práce	Vliv struktury elicitinů na změny v antioxidační kapacitě u tabákových buněk
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Jahnová
Konzultant	Mgr. Martina Janků
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Rostliny během svého životního cyklu interagují se širokou škálou organismů, mezi které se řadí i fytopatogenní houby rodu *Phytophthora* a *Pythium*. Obranná reakce na tyto patogeny je spuštěna specifickými proteinovými elicitory zvanými elicitiny. Úkolem bakalářské práce bylo stanovit vliv elicitinů infestinu (INF) a kryptogeinu (X24) a jejich mutantních forem na pozici 13 (INF V13K/A14T a X24 K13V) a na pozici 84 (INF V84F a X24 V84F) na aktivitu antioxidačních enzymů, celkovou antioxidační kapacitu a míru peroxidace lipidů suspenzní kultury tabákových buněk *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. Elicitace tabákových buněk vedla ke změnám v aktivitách všech studovaných antioxidačních enzymů. Rozdílný efekt, ve srovnání s kontrolními vzorky, byl pozorován u askorbátperoxidasy, jejíž aktivita byla významně zvýšená, a guajakolperoxidasy, jejíž aktivita byla obvykle menší. Aktivita katalasy a glutathionreduktasy byla nejvýrazněji ovlivněna aplikací mutantních forem elicitinů X24 V84F a zejména INF V84F. Ve srovnání s kontrolními vzorky se aktivita katalasy zvýšila, aktivita glutathionreduktasy se naopak snížila. Po aplikaci všech elicitinů došlo k mírnému zvýšení celkové antioxidační kapacity tabákových buněk, s výjimkou X24 V84F, u kterého byla celková antioxidační kapacita snížena. Působení elicitinů vedlo k větší míře peroxidace lipidů. Největší nárůst byl pozorován u mutantních forem kryptogeinu a infestinu v poloze 13, zatímco největší schopnost aktivovat tvorbu ROS je připisována elicitinům s mutací na reziduu 84.

Klíčová slova	Antioxidační enzymy, elicitiny, kryptogein, infestin, <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jakub Foldyna
Title	Effect of elicitins structure on changes of antioxidation capacity in tobacco cells
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Jahnová
Consultant	Mgr. Martina Janků
The year of presentation	2018

### Abstract

Plants are interacting during their life cycle with wide range of organisms including phytopathogenic fungi of genus *Phytophthora* and *Pythium*. Defense reaction against these pathogens is initiated by the specific proteinaceous elicitors called elicitins. Objective of this bachelor work was to determine effect of elicitins infestin (INF) and cryptogein (X24) and their mutant variants at position 13 (INF V13K/A14T and X24 K13V) and at position 84 (INF V84F and X24 V84F) on activity of antioxidant enzymes, total antioxidant capacity and rate of lipid peroxidation of tobacco cell suspension culture *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. Elicitation of tobacco cells led to changes in activity of all studied antioxidant enzymes. Different effect in comparison with control samples was observed at ascorbate peroxidase, which activity was significantly increased and guaiacol peroxidase, which activity was usually decreased. Activity of catalase and glutathione reductase was significantly affected by application of mutant forms X24 V84F and notably INF V84F. Compared to control samples, activity of catalase was increased and activity of glutathione reductase was decreased. After application of all elicitins total antioxidant capacity was slightly increased with exception of X24 V84F, which decreased total antioxidant capacity. Elicitins increased rate of lipid peroxidation. Biggest increase was observed at mutant variants of cryptogein and infestin at position 13, meanwhile greatest ability to activate production of ROS is ascribed to elicitins with mutation at position 84.

Keywords	Antioxidant enzymes, elicitins, cryptogein, infestin, <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1. Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2. Současný stav řešené problematiky</b>	<b>2</b>
2.1 Obranné reakce rostlin	2
2.1.1 Interakce rostlina - patogen (biotický stresový faktor)	3
2.1.2 Hypersenzitivní reakce	3
2.1.3 Systémově získaná rezistence	4
2.1.4 Lokálně získaná rezistence	5
2.1.5 Indukovaná systémová rezistence	5
2.1.6 Obranné mechanismy aktivované po napadení patogenem	5
2.1.7 Elicitory	6
2.2 Elicitiny	7
2.2.1 Rozdělení elicitinů	8
2.2.1 Elicitiny jako přenašeče sterolů a mastných kyselin	9
2.2.2 Účinky elicitinů	10
2.3 Antioxidační ochrana rostlin	11
2.3.1 Nízkomolekulární antioxidanty	14
2.3.1.1 Glutathion	14
2.3.1.2 Kyselina askorbová	15
2.3.1.3 $\alpha$ -Tokoferol	17
2.3.2 Antioxidační enzymy	18
2.3.2.1 Askorbátperoxidasa	18
2.3.2.2 Glutathionreduktasa	19
2.3.2.3 Glutathionperoxidasa	19
2.3.2.4 Katalasa	19
2.3.2.5 Superoxiddismutasa	20
2.4 Peroxidace lipidů	20
2.4.1 Neenzymová peroxidace lipidů	20
2.4.2 Enzymově katalyzovaná peroxidace lipidů	23
2.4.3 Metody stanovení peroxidace lipidů	24
2.4.3.1 Primární produkty	24
2.4.3.2 Sekundární produkty	25
<b>3. Experimentální část</b>	<b>27</b>
3.1 Chemikálie	27
3.2 Přístroje a vybavení	28
3.3 Rostlinný materiál	28
3.4 Elicitiny	29
3.5 Experimentální metody	30
3.5.1 Stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou	30
3.5.2 Stanovení aktivity antioxidačních enzymů	30
3.5.2.1 Příprava rostlinného extraktu	30
3.5.2.2 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy	30
3.5.2.3 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy	31
3.5.2.4 Stanovení aktivity katalasy	31
3.5.2.5 Stanovení aktivity glutathionreduktasy	31
3.5.3 Stanovení celkové antioxidační kapacity	32
3.5.3.1 Příprava rostlinného extraktu	32
3.5.3.2 Spektrofotometrická metoda využívající DPPH	32
3.5.3.3 Spektrofotometrická metoda využívající ABTS	33

3.5.4 Stanovení peroxidace lipidů	34
3.5.4.1 Příprava rostlinného extraktu	34
3.5.4.2 Metoda FOX2 - primární produkty peroxidace lipidů	34
3.5.4.3 Metoda s NMPI - sekundární produkty peroxidace lipidů	34
3.5.5 Nativní elektroforéza - detekce aktivity peroxidasy	35
3.5.5.1 Příprava vzorků	35
3.5.5.2 Elektroforetická separace	35
3.5.5.3 Detekce enzymů s peroxidasovou aktivitou	36
3.5.5.4 Detekce enzymů s askorbátperoxidasovou aktivitou	37
3.5.6 Imunodetekce askorbátperoxidasy	37
3.5.6.1 Příprava vzorků	37
3.5.6.2 Elektroforetická separace	38
3.5.6.3 Western blot a imunodetekce askorbátperoxidasy	39
<b>4. Výsledky a diskuse</b>	<b>40</b>
4.1 Stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou	41
4.2 Vliv elicitinů na aktivitu antioxidantních enzymů tabákových buněk	42
4.3 Vliv elicitinů na antioxidantní kapacitu tabákových buněk	44
4.4 Vliv elicitinů na míru peroxidace lipidů v tabákových buňkách	46
4.5 Detekce antioxidantních enzymů	49
4.5.1 Detekce aktivity peroxidasy v gelu po nativní elektroforéze	49
4.5.2 Imunodetekce askorbátperoxidasy	51
<b>5. Závěr</b>	<b>52</b>
<b>6. Literatura</b>	<b>54</b>
<b>7. Seznam použitých zkratk</b>	<b>61</b>

## CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části je vypracování literární rešerše, která shrnuje poznatky na témata:

1. Obranné reakce rostlin - hypersenzitivní reakce, systémově získaná rezistence
2. Elicitiny - rozdělení, klasifikace a účinky
3. Antioxidační ochrana rostlin - nízkomolekulární antioxidanty a antioxidační enzymy
4. Peroxidace lipidů

Cíle experimentální části jsou:

1. Příprava biologického materiálu - práce se suspenzí kulturou tabákových buněk (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi)
2. Optimalizace metod stanovení aktivity antioxidačních enzymů askorbátperoxidasy (APX), guajakolperoxidasy (GPX), katalasy (CAT) a glutathionreduktasy (GR) u tabákových buněk
3. Optimalizace metod stanovení peroxidace lipidů a antioxidační kapacity u tabákových buněk
4. Studium vlivu aplikace vybraných 6 elicitinů (kryptogein a infestin a jejich mutantní formy) na aktivitu antioxidačních enzymů (APX, GPX, CAT a GR), hladinu peroxidace lipidů a antioxidační kapacity u tabákových buněk



# 1 ÚVOD

Rostliny jsou v průběhu svého životního cyklu vystaveny proměnlivým vlivům životního prostředí a interakcím s jinými organismy. Pro své přežití jsou nuceny aktivovat obranné mechanismy. Po interakci rostliny s patogenem je obranná reakce spuštěna elicitorem.

Součástí odpovědi rostlin na stresové podmínky je zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, z anglického reactive oxygen species). ROS byly zpočátku identifikovány jako vedlejší produkty aerobního metabolismu a později byly popsány jako důležité signální molekuly nezbytné jak pro normální růst a vývoj rostlin, tak i pro odpověď rostlin na biotický a abiotický stres. Mezi hlavní zástupce ROS se řadí singletový kyslík, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a další (Tab. 1).

Vysoká hladina ROS v buňce vede k poškození makromolekul, např. proteinů, lipidů a nukleových kyselin, a může vyústit až v buněčnou smrt. Aby buňky předešly poškození, vyvinuly se účinné antioxidační mechanismy, ve kterých jsou zapojeny antioxidační enzymy i neenzymové antioxidy.

U fytopatogenních hub rodu *Phytophthora* a *Pythium* se setkáváme se zástupci specifických proteinových elicitorů, tzv. elicitinů. Elicitiny jsou pro tyto organismy nezbytné, neboť vychytávají z rostliny steroly, které jsou esenciální pro jejich životní cyklus. Základní rozdělení elicitinů je podle izoelektrického bodu na kyselé ( $\alpha$ , pI 3-5) a bazické ( $\beta$ , pI 7-9). Rozdílný izoelektrický bod má vliv na schopnost vyvolat nekrózu rostlinného pletiva - bazické elicity působí již při nanomolárních koncentracích, kdežto kyselé elicity jsou nekrotické až při mikromolárních koncentracích. Rozdíl ve schopnosti vyvolat nekrózu byl přiřčen aminokyselině na pozici 13 - u kyselých se na této pozici obvykle nachází valin, kdežto u bazických je zpravidla obsažen lysin.

Tab. 1: Přehled ROS a jejich biologického poločasů (přepřacováno podle Sies, 1993).

<b>Reaktivní forma kyslíku</b>	<b>Biologický poločas</b>
OH $\cdot$ , hydroxylový radikál	10 <sup>-9</sup> s
RO $\cdot$ , alkoxylový radikál	10 <sup>-6</sup> s
ROO $\cdot$ , peroxylový radikál	7 s
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , peroxid vodíku	Enzymaticky odbourán
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , superoxid anion radikál	Enzymaticky odbourán
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> , singletový kyslík	10 <sup>-5</sup> s
Q $\cdot$ , radikál semichinonu	dny

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Obranné reakce rostlin

S handicapem přisedlého způsobu života se rostliny musí vypořádat s působením stresových faktorů abiotického či biotického charakteru (Tab. 2). Mezi biotické stresové faktory ovlivňující růst a vývoj rostlin patří působení řady patogenních mikroorganismů, jako jsou viry, bakterie a houby. V důsledku každodenní expozice těmto organismům došlo u rostlin v průběhu evoluce k vyvinutí velmi účinného aparátu zahrnujícího mechanismy specifické a nespecifické obrany (Procházka, 1998). Mezi projevy nespecifické obrany se řadí mimo jiné tvorba toxických látek pro patogen (peptidy s antimikrobiální aktivitou, sekundární produkty metabolismu) nebo vytvoření či zpevnění mechanických bariér, které limitují průnik patogenu do rostliny a zamezují šíření infekce (Hammond-Kosack a Jones, 1996). Aktivací mechanismů specifické obrany se rostlina snaží limitovat patogen v růstu a vývoji tím, že v místě infekce dojde např. k hypersenzitivní reakci (Morel a Dangl, 1997).

Tab. 2: Přehled stresových faktorů, se kterými se rostliny setkávají (převzato a upraveno z Procházka, 1998).

<b>Stresový faktor</b>		
Abiotický	Fyzikální	Mechanické působení větru Vysoká intenzita záření (ultrafialové, viditelné) Teplotní extrém (horko, mráz)
	Chemický	Nedostatek vody - sucho Deficience kyslíku - hypoxie, anoxie Deficience živin v půdě Nadbytek iontů solí a vodíku v půdě Toxické kovy a organické látky v půdě Toxické plyny ve vzduchu
Biotický		Býložraví živočichové (pastva) Patogenní organismy (viry, bakterie, mikroby) Vzájemné ovlivňování - alelopatie, parazitismus

### **2.1.1 Interakce rostlina - patogen (biotický stresový faktor)**

Úspěch rostlin v boji s patogenem je založen na brzkém rozpoznání daného patogenu a velmi rychlé aktivaci obranných mechanismů. Z tohoto důvodu si patogeny vyvinuly strategie jak obelstít rostlinu tak, aby je nerozpoznala nebo jak potlačit následky po rozpoznání (Dokládal *et al.*, 2012). Například u patogenních hub se setkáváme s velkou škálou účinných lytických exoenzymů (Procházka, 1998). Podle toho, jestli rostlina rozpozná patogen, dělíme interakci rostlina-patogen na kompatibilní a nekompatibilní.

Při kompatibilní interakci je rostlina hostitelem patogenu. Rostlina patogen nedokáže rozpoznat, nemůže zahájit své obranné reakce a patogen se v rostlině může volně rozmnožovat a šířit infekci.

Nekompatibilní interakce může být dána a) stavem, kdy rostlina není hostitelem patogenu a nemůže patogenu zaručit vhodné prostředí, b) existencí předem vytvořených bariér nebo látek patogenu toxických, které brání šíření infekce, c) aktivací obranných mechanismů v důsledku rozpoznání patogenu (Hammond-Kosack a Jones, 1996).

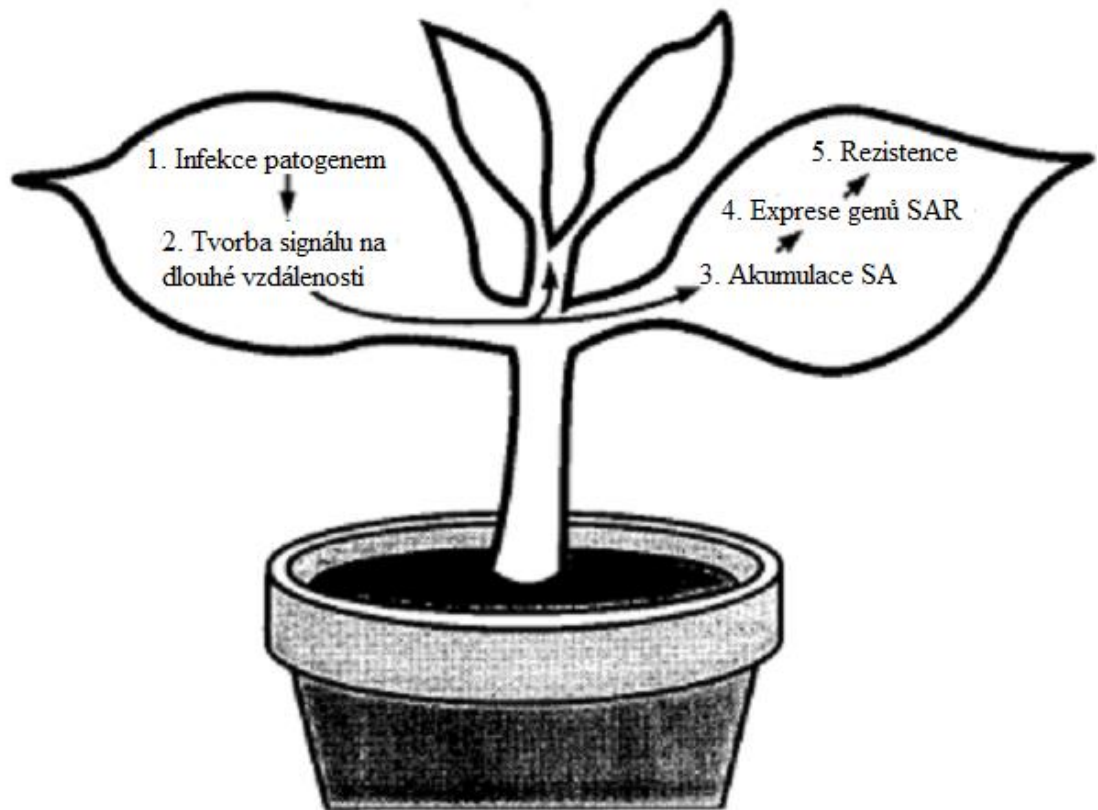
### **2.1.2 Hypersenzitivní reakce**

Častou odpovědí rostliny na nekompatibilní interakci s patogenem je hypersenzitivní reakce (HR) vedoucí k nekróze rostlinného pletiva v místě napadení patogenem a k navození rezistentních reakcí v ostatních částech rostliny (Blein *et al.*, 1991, Rustérucci *et al.*, 1996). U rostlin je považována za jistý typ programované buněčné smrti (Hirasawa *et al.*, 2005).

Během hypersenzitivní reakce dochází k aktivaci řady obranných genů, které brání patogenu v růstu. Po infikování rostliny patogenem dochází k rapidnímu zvýšení koncentrace ROS, k tzv. oxidativnímu vzplanutí (Foissner *et al.*, 2000). Oxidativní vzplanutí vede k zpevnění buněčných membrán a k stimulaci tvorby fytoalexinů a proteinů spojených s patogenezí, tzv. PR-proteinů (z anglického „pathogenesis related proteins”) (Lamb a Dixon, 1997). Zvýšená hladina ROS vede k peroxidaci lipidů a následně k rozpadu buněčných membrán s konečným efektem buněčné smrti (Procházka, 1998).

### 2.1.3 Systémově získaná rezistence

Systémově získaná rezistence (SAR, z anglického „systemic acquired resistance”) je mechanismus rostliny, kterým se rostlina brání vůči širokému spektru patogenů. SAR předchází lokální interakce s patogenem a spustí se událostí vedoucí k ustavení rezistence (Obr. 1) (Galiana *et al.*, 1997). Pro vytvoření SAR je nutná přítomnost signální molekuly kyseliny salicylové (SA), která pochází převážně z isochorismátové dráhy a indukuje akumulaci PR-proteinů (tzv. SAR proteinů), které k SAR přispívají (Durrant a Dong, 2004). K vytvoření SAR může dojít vystavením rostliny virulentním, avirulentním nebo nepatogenním mikrobům. Zároveň mohou vytvoření SAR indukovat chemikálie, např. 2,6-dichloroisoinikotinová kyselina, benzothiazol nebo S-methylester kyseliny 1,2,3-benzothiazolové (Sticher *et al.*, 1997).



Obr. 1: Zjednodušený model popisující události vedoucí k ustavení SAR (přepřacováno podle Ryals *et al.*, 1994). SA - kyselina salicylová, SAR - systémově získaná rezistence

#### **2.1.4 Lokálně získaná rezistence**

Při lokálně získané rezistenci (LAR, z anglického „local acquired resistance”) dochází k akumulaci antimikrobiálních sloučenin ve vzdáleném místě od místa penetrace patogenu. Může se jednat o SAR na kratší vzdálenosti (Sticher *et al.*, 1997). LAR se projevuje tvorbou 1-2 mm zón v okolí inokulace virem tabákové mozaiky (Costet *et al.*, 1999). LAR vede k absenci lézí lokalizovaných blízko již existující léze nebo k tvorbě menšího počtu menších lézí, které se rozvinuly dále od existující léze (Agrios, 2005).

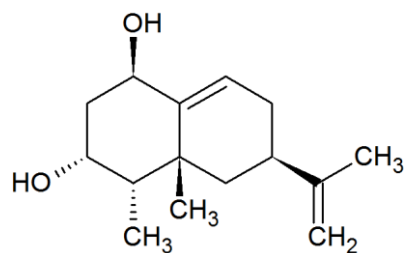
#### **2.1.5 Indukovaná systémová rezistence**

U rhizobakterií podporujících růst rostlin, mezi které se řadí zástupci rodu *Pseudomonas*, je známo, že umějí potlačit infekci rostliny potlačením vývoje patogenu skrz antimikrobiální účinky nebo kompeticí o železo přes siderofory (Mauch-Mani a Métraux, 1998). Oproti SAR je indukovaná systémová rezistence (ISR, z anglického „induced systemic resistance”) závislá na signálních drahách kyseliny jasmonové a ethylenu (Pieterse *et al.*, 1998).

#### **2.1.6 Obranné mechanismy aktivované po napadení patogenem**

Mezi další způsoby obrany rostliny patří zesílení buněčné stěny. Během infekce patogenu dochází k rychlé tvorbě polysacharidu kalosy ( $\beta$ -1,3-D-glukan), který je velmi resistantní vůči patogenním hydrolasám, a akumulaci sekundárních metabolitů s antimikrobiálním účinkem. Po infekci patogenem se v rostlině začnou syntetizovat lipofilní látky s toxickým účinkem pro patogen, které nazýváme fytoalexiny (nejznámější je kapsidiol, Obr. 2). Přehledně jsou mechanismy obrany shrnuty v knize Fyziologie rostlin (Procházka, 1998).

Jedním z dalších možných obranných mechanismů je akumulace PR-proteinů, které jsou toxické pro houbové patogeny. PR-proteiny jsou v rostlině za fyziologických podmínek zastoupeny ve stopovém množství a jejich koncentrace se zvyšuje v reakci na průnik patogenu nebo stresový podnět. Dosud bylo identifikováno přes 14 rodin PR-proteinů, mezi něž řadíme např. chitinasy, defensiny, thioniny, proteiny bohaté na cystein nebo glycin a další. U různých rostlin se můžeme setkat s mnoha isoformami PR-proteinů (Agrios, 2005).



Obr. 2: Kapsidiol, nejznámější zástupce fytoalexinů.

Mezi první pozorovatelné reakce při interakci rostlina-patogen patří zvýšená tvorba ROS. Zvýšená tvorba ROS začíná aktivací membránové NADPHoxidasy (EC 1.6.3.1) vhodným elicitorem (Procházka, 1998). V obranné reakci na průnik patogenu zvýšená hladina ROS inhibuje patogen v jeho růstu (Neill *et al.*, 2002).

### 2.1.7 Elicitory

Spouštěcím faktorem všech obranných reakcí bývá podnět zvaný elicitor, který má obvykle charakter specifického metabolitu (Procházka, 1998). Z pohledu chemické struktury se jedná např. o oligosacharidy, peptidy, proteiny a další (Montesano *et al.*, 2003). Elicitory můžeme dělit dle původu na primární (exogenní), které jsou vylučované patogenem (např. polysacharidy, specifické enzymy, peptidy). Sekundární (endogenní) elicitory se uvolňují z buněčné stěny rostlin po jejím narušení patogenem (řadí se zde např. oligogalaktourany) (Hahn, 1996). Patogenní organismy produkují elicitory specifické a nespecifické. Specifické elicitory jsou produktem *Avr* genů konkrétního patogenu, zatímco nespecifickými elicitory, mezi které se řadí polysacharidy buněčných stěn, mastné kyseliny nebo steroly, disponuje většina patogenů (Montesano *et al.*, 2003). Stručný přehled možných elicitorů je uveden v Tab. 3.

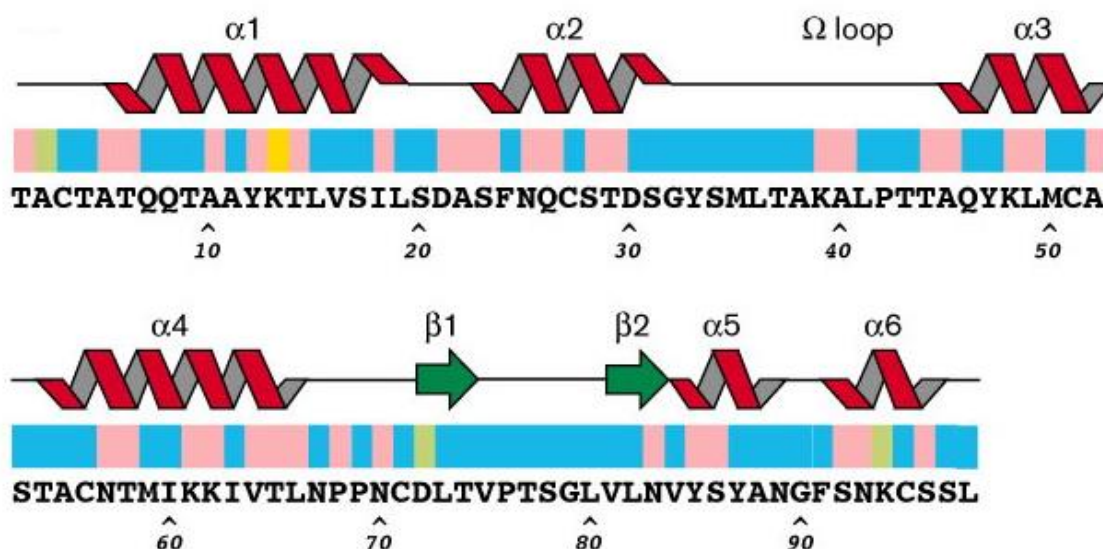
Tab. 3: Stručný přehled elicitorů (přepřacováno podle Angelova *et al.*, 2006).

Elicitor				
Fyzikální	Poškození			
Chemický	Abiotický	Ionty kovů (stříbro, lanthan, kadmium)		
	Biotický	Komplexní složení	Spory hub, buněčná stěna mycelií	
		Definované složení		
		Sacharidy	Polysacharidy Oligosacharidy	Alginát, pektin Chitosan, mannan, guluronát, mannuoráty, galaktouronidy
		Bílkoviny	Peptidy Proteiny	Glutathion Elicitiny, celulasa
Lipidy Glykoproteiny	Lipopolysacharidy Nespecifikované			

## 2.2 Elicitiny

Elicitiny se řadí do rodiny malých extracelulárních proteinů, které jsou produkty oomycet fytopatogenních hub *Phytophthora* a *Pythium* a řadí se mezi specifické elicitory (Yu, 1995). První zmínky o elicitech pochází z 80. let minulého století. Struktura elicitinů je striktně konzervovaná (Derevnina *et al.*, 2016). Primární strukturu elicitinů tvoří 98 aminokyselin a jejich molekulová hmotnost činí přibližně 10 kDa (Yu, 1995). Sekundární struktura elicitinů vykazuje typické rysy 5  $\alpha$ -helixů a 1  $\beta$ -skládáního listu (Obr. 3) a  $\Omega$ -otočky, která při složení proteinu umožňuje vytvořit hydrofobní dutinu (Fefeu *et al.*, 1997).

Ve struktuře elicitinů jsou čteně zastoupeny aminokyseliny cystein, threonin a serin, avšak chybí arginin, histidin a tryptofan (Mikes *et al.*, 1998; Ponchet *et al.*, 1999). Struktura je stabilizována třemi disulfidovými můstky, které jsou lokalizovány na reziduích Cys<sub>3</sub>-Cys<sub>71</sub>, Cys<sub>27</sub>-Cys<sub>56</sub>, Cys<sub>51</sub>-Cys<sub>95</sub> (Fefeu *et al.*, 1997). U elicitinů nebyla prokázána enzymová aktivita (Boissy *et al.*, 1996). Řadí se do skupiny proteinů se schopností přenášet steroly (SCP, z anglického „sterol carrier proteins”) (Mikes *et al.*, 1998).



Obr. 3: Primární struktura kryptogeinu s naznačením sekundárních struktur - modré úseky značí shodné úseky s ostatními elicitinými, růžové úseky značí variabilní residua, žluté residuum (13) je aminokyselina související s toxicitou, zelená residua (2, 72 a 96) mohou mít souvislost s úrovní toxicity (převzato z Boissy *et al.*, 1996).

## 2.2.1 Rozdělení elicitinů

Dle fylogenetické analýzy a celkové struktury proteinů lze elicitiny rozdělit do pěti tříd (Kamoun *et al.*, 1997). Do třídy I řadíme elicitiny, jejichž struktura je tvořena 98 aminokyselinami. Elicitiny této třídy obsahují šest cysteinů, dva fenylalaniny, tři glyciny a tři methioniny. Podle hodnoty isoelektrického bodu je lze dále klasifikovat na kyselé ( $I\alpha$ ) a bazické ( $I\beta$ ) elicitiny (Nespoulous *et al.*, 1992).

Ve třídě II se nachází silně kyselé elicitiny s počtem aminokyselin 103-104, které obsahují krátký hydrofilní C-terminální konec (Panabières *et al.*, 1996).

Do třídy III řadíme elicitiny, které vedle charakteristické proteinové struktury (98 aminokyselin) mají na C-terminálním konci dalších 70 aminokyselin, kde jsou hojně zastoupeny aminokyseliny alanin, threonin a serin. Tento konec představuje O-glykosylovanou doménu. (Kamoun *et al.*, 1997).

Elicitiny produkované rodem *Pythium* se řadí do třídy Py (taktéž I'). Patří sem elicitiny mírně odlišné od třídy I, které mají isoelektrický bod v kyselé oblasti a jsou u nich přítomna glykosylační místa na asparaginových residuích (Panabières *et al.*, 1996).

Dalším kritériem pro klasifikaci elicitinů je hodnota isoelektrického bodu. Elicitiny se dělí na kyselé ( $\alpha$ , pI v rozmezí 3 - 5) a bazické ( $\beta$ , pI v rozmezí 7 - 9) (Bourque *et al.*,



1998). Počet negativně nabitých aminokyselin (kyselina asparagová a kyselina glutamová) je téměř vždy neměnný a hodnoty se pohybují mezi třemi až pěti. U  $\beta$ -elicitinů je pozitivní náboj dán šesti lysinovými residui, kdežto  $\alpha$ -elicitiny zpravidla obsahují dva až čtyři lysiny (Ponchet *et al.*, 1999).

Strukturní rozdíly mezi  $\alpha$ -elicitiny a  $\beta$ -elicitiny se odráží ve schopnosti způsobit nekrózu rostlinného pletiva (O'Donohue *et al.*, 1995). Srovnání sekvencí aminokyselin elicitinů s rozdílným potenciálem vyvolat nekrotickou odezvu v rostlinném pletivu poukázalo na možnou roli aminokyseliny v poloze 13 (Boissy *et al.*, 1996). Zvýšený nekrotický účinek byl pozorován u bazických elicitinů, které mají na pozici 13 hydrofilní residuum, obvykle lysin. U kyselých elicitinů se na téže pozici nachází nepolární valin (O'Donohue *et al.*, 1995). Práce Dokládala *et al.* (2012), která se zabývala funkcí vazby sterolu v kryptoginem indukované rezistenci, prokázala, že mutace v poloze 84 (valin  $\rightarrow$  fenylalanin) vedla k podobné intenzitě tvorby ROS jako u nemutované varianty.

### **2.2.1 Elicitiny jako přenašeče sterolů a mastných kyselin**

Elicitiny byly identifikovány jako nová třída proteinových přenašečů sterolů (Dobeš *et al.*, 2004). Jsou schopny vázat také mastné kyseliny, avšak afinita k nim je 27x menší než ke sterolům (Osman *et al.*, 2001). U hub je jejich životní cyklus, tj. vývoj, sporulace a rozmnožování, závislý na sterolech (Stong *et al.*, 2013). Druhy *Phytophthora* a *Pythium* postrádají schopnost vytvářet látky sterolového charakteru a jsou tedy závislé na vnějších zdrojích sterolů, což může být spojeno s jejich parazitickým způsobem života (Hendrix a Guttman, 1970, Nes a Stafford, 1983). Elicitiny pro tyto patogenní organismy vychytávají steroly z plazmatických membrán rostlin a liposomů (Mikes *et al.*, 1998).

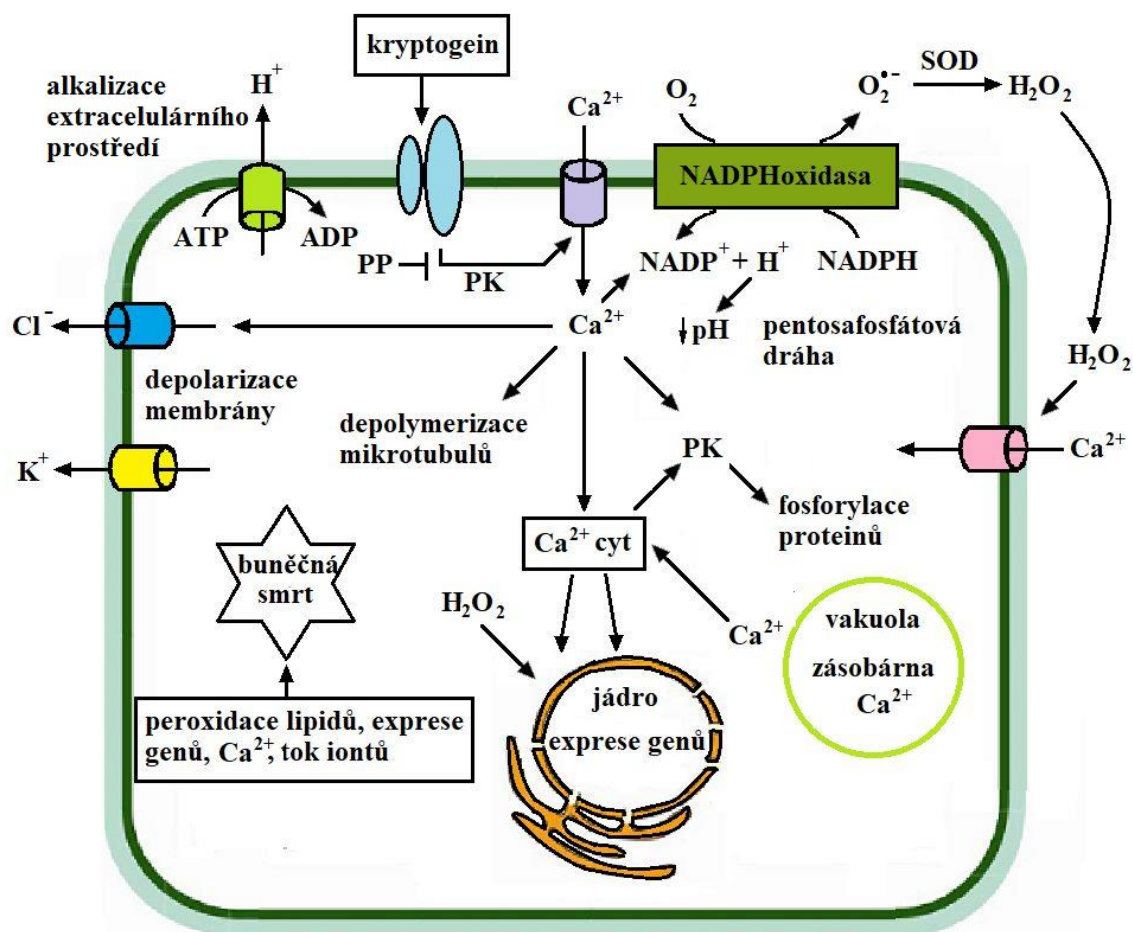
Vazba sterolu/mastné kyseliny se uskutečňuje v hydrofobní dutině nacházející se v jádře elicitinu, kde se váží na  $\Omega$ -smyčku. Vazby se účastí tyrosinová residua v poloze 47 a 87, stechiometrie této vazby je 1:1 (Osman *et al.*, 2001; Hirasawa *et al.*, 2004). Vazbou sterolu na elicitin je podmíněna biologická aktivita elicitinů. Vznikající komplex elicitin-sterol je zásadním krokem pro rozpoznání elicitinu vysokoafinitním receptorem, který se nachází se na plazmatické membráně rostlinné buňky (Lochman *et al.*, 2005). Podle Mikese *et al.* (1998) se jako nejúčinnější přenašeče sterolů z řad elicitinů jeví kaktorein a kryptogein a nejméně účinné přenašeče jsou parasitecin

a kapsicein. Komplex elicitin-sterol hraje důležitou roli v rozmnožování patogenu a spuštění obranných mechanismů rostliny (Blein *et al.*, 2002).

### 2.2.2 Účinky elicitinů

Rostlinná buňka rozpoznává elicitiny prostřednictvím receptorů nebo vysokoafinitních vazebných míst nacházejících se v plasmatické membráně (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999). Vazba na receptor je pravděpodobně zprostředkována přes aminokyselinu na pozici 13 nebo 87 (Boissy *et al.*, 1996). Častým modelem pro studium účinků elicitinů (Obr. 4) je model charakterizující vliv elicitinu kryptogeinu na tabákové buňky. Po aplikaci kryptogeinu k suspenzní kultuře tabákových buněk dochází v rané fázi k fosforylaci proteinů, zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů, akumulaci ethylenu a kapsidiolu, zvýšené produkci oxidu dusnatého a ROS vlivem aktivace membránové NADPHoxidasy (Blein *et al.*, 1991; Viard *et al.*, 1994; Rustérucchi *et al.*, 1996; Osman *et al.*, 2001; Asai *et al.*, 2008; Ptáčková *et al.*, 2015). Působením elicitinů dochází k alkalizaci extracelulárního prostředí, což vede ke zvýšení aktivity NADPHoxidasy a k zabudování vápenatých iontů do buněčné stěny (Blein *et al.*, 1991; Hahn, 1996). Aktivaci membránové NADPHoxidasy doprovází acidifikace cytosolu (Pugin *et al.*, 1997). Rovněž dochází i k vyplavení draselných a chloridových iontů, které vede k depolarizaci plasmatické membrány (Viard *et al.*, 1994; Pugin *et al.*, 1997).

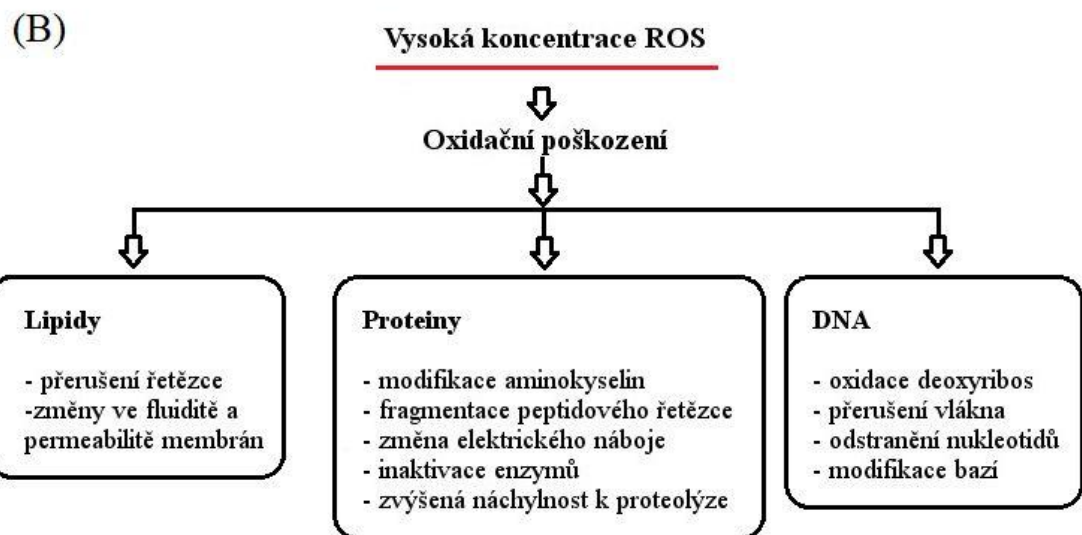
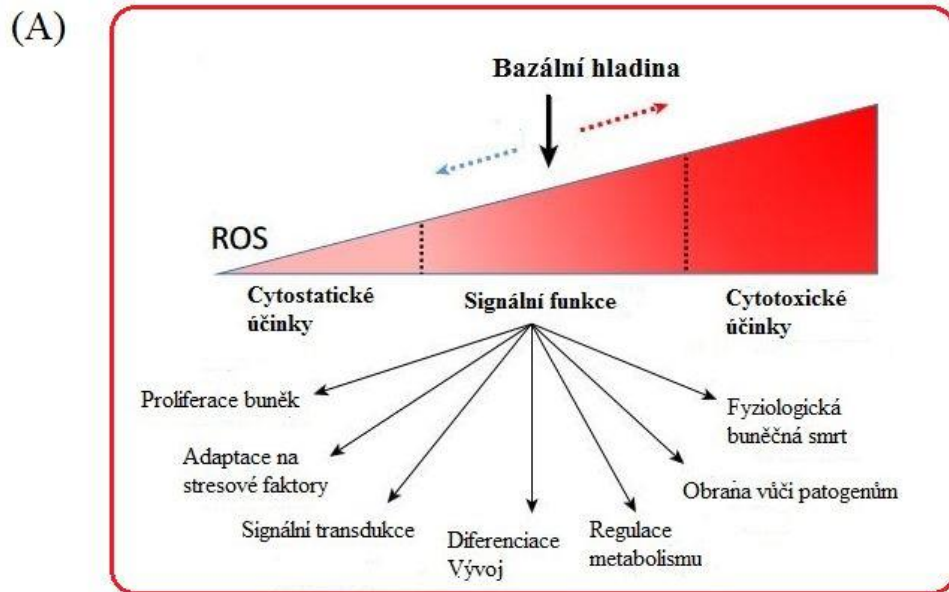
V rámci pozdní fáze obranných reakcí dochází k expresi obranných genů vedoucí k zvýšené produkci řady proteinů, např. se jedná o fenylalaninamoniaklyasu (EC 4.3.1.24), PR-proteiny nebo o proteiny biosyntézy tříslovin (Cormack *et al.*, 2002; Lecourieux *et al.*, 2002). Během interakce rostlinných buněk s elicitiny dochází k aktivaci signálních drah rostlinných hormonů, jako jsou ethylen, kyselina jasmonová a kyselina salicylová (Kawamura *et al.*, 2009).



Obr. 4: Schéma indukovaných signálních drah po vazbě kryptogeinu na receptor (přepřacováno podle Garcia-Brugger *et al.*, 2006). PK - proteinkinasa, PP - proteinfosfatasa, SOD - superoxididismutasa

### 2.3 Antioxidační ochrana rostlin

ROS mají u rostlin dvojí roli: zastávají funkci signálních molekul pro normální růst a vývoj rostlin a jsou zapojeny v odpovědích rostlin na stresové podmínky, a zároveň jejich nadprodukce vede k oxidačnímu poškození buňky (Obr. 5). ROS jsou u rostlin produkovány převážně v chloroplastech, v mitochondriích a v peroxisomech. Mohou rovněž vznikat i v buněčných membránách, v endoplasmatickém retikulu a v apoplastu. Přehled produkce ROS byl podobrobně popsán v přehledném článku Das a Roychoudhury (2014). Vzhledem k dvojí roli ROS je nutné jejich produkci a zhášení přísně regulovat antioxidačními mechanismy tak, aby nedošlo k poškození buňky. Při odpovědi rostlin na stresové podmínky produkce ROS významně narůstá a zároveň dochází k aktivaci enzymových a neenzymových antioxidačních systémů.



Obr. 5: (A) Funkce ROS v závislosti na jejich koncentraci v buňce. ROS jsou nezbytné signální molekuly pro různé fyziologické procesy v rostlině. (B) Cíle ROS při jejich nadprodukci a jejich možné způsoby poškození při jejich nadprodukci (přepřacováno podle Sharma *et al.*, 2014 a Mittler 2017).

Antioxidační systém rostlin zahrnuje enzymové i neenzymové komponenty (Tab. 4). Mezi antioxidační enzymy patří např. peroxidasy, katalasa, superoxiddismutasa a další. Mezi účinné nízkomolekulární antioxidanty patří např. kyselina askorbová, redukovaný glutathion,  $\alpha$ -tokoferol a další.

Tab. 4: Přehled antioxidačních enzymů a neenzymových antioxidantů podílejících se na antioxidační ochraně buňky, jejich funkce a buněčná lokalizace (přepřacováno podle Das a Roychoudhury, 2014). DHA - dehydroaskorbová kyselina, GSSG - glutathion disulfid, MDHA - monodehydroaskorbová kyselina

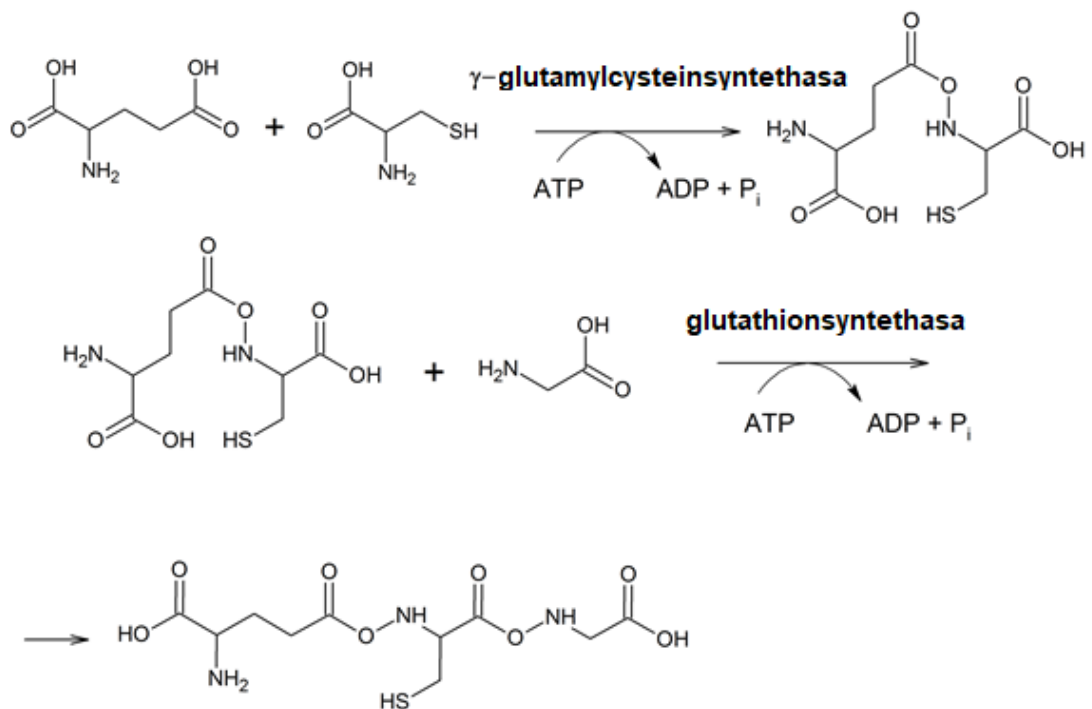
<b>Antioxidační enzymy</b>	<b>EC</b>	<b>Katalyzovaná reakce</b>	<b>Lokalizace</b>
Superoxiddismutasa (SOD)	1.15.1.1	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$	Peroxisomy, mitochondrie, cytosol, chloroplasty
Katalasa (CAT)	1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Peroxisomy, mitochondrie
Askorbátperoxidasa (APX)	1.11.1.11	$H_2O_2 + AsA \rightarrow 2H_2O + DHA$	Peroxisomy, mitochondrie, cytosol, chloroplasty
Monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR)	1.6.5.4	$MDHA + NADPH \rightarrow AsA + NAD^+$	Mitochondrie, cytoplasma, chloroplasty
Dehydroaskorbátreduktasa (DHAR)	1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AsA + GSSG$	Mitochondrie, cytoplasma, chloroplasty
Glutathionreduktasa (GR)	1.6.4.2	$GSSG + NADPH \rightarrow 2GSH + NADP^+$	Mitochondrie, cytoplasma, chloroplasty
Guajakolperoxidasa (GPX)	1.11.1.7	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$	Mitochondrie, cytoplasma, chloroplasty, endoplasmatické retikulum
<b>Neenzymové antioxidanty</b>		<b>Funkce</b>	<b>Lokalizace</b>
Kyselina askorbová (AsA)		Odstraňuje $H_2O_2$ v reakci katalyzované APX	Cytosol, chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy, vakuoly, apoplast
Redukovaný glutathion (GSH)		Působí jako druhý substrát antioxidačních enzymů: peroxidasa, glutathion-S-transferasa, glutathionreduktasa	Cytosol, chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy, vakuoly, apoplast
$\alpha$ -Tokoferol		Zabraňuje peroxidaci lipidů	Převážně v membránách
Karotenoidy		Zháší nadbytečnou energii z fotosystémů, světlosběrných komplexů	Chloroplasty a další nezelené plastidy
Flavonoidy		Přímo reagují s $H_2O_2$ , $^1O_2$ , $OH^{\cdot}$	Vakuoly
Prolin		Účinně zháší $^1O_2$ , $OH^{\cdot}$	Mitochondrie, cytosol, chloroplasty

## 2.3.1 Nízkomolekulární antioxidanty

### 2.3.1.1 Glutathion

Glutathion je tripeptid (GSH,  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-L-glycin), který je u rostlin za fyziologických podmínek přítomen v milimolárních koncentracích (Noctor *et al.*, 2011). GSH je jednou z hlavních forem organické síry přenášenou floémem (Bourgis *et al.*, 1999). Mezibuněčný přenos je zprostředkován apoplastickou i symplastickou cestou nebo oběma způsoby (Noctor *et al.*, 2012). V buněčných kompartmentech má GSH největší zastoupení v mitochondriích, v jádře, v cytosolu a v peroxisomech (Jiménez *et al.* 1997; Fricker *et al.*, 2000; Zechmann *et al.*, 2008). Akumulace GSH je limitována dostupností síry (Nikiforova *et al.*, 2003).

Syntéza GSH (Obr. 6) probíhá ve dvou krocích, které jsou závislé na ATP. V prvním kroku se vytvoří peptidová vazba mezi  $\gamma$ -karboxylovou skupinou glutamátu a aminoskupinou cysteinu za katalýzy  $\gamma$ -glutamylcysteinsyntethasy (EC 6.3.2.2) za vzniku  $\gamma$ -glutamylcysteinu. V druhé reakci dochází za katalýzy glutathionsyntethasy (EC 6.3.2.3) k ligaci glycinu (Zechmann *et al.*, 2008). První reakce je lokalizována v chloroplastech, druhá reakce probíhá převážně v cytosolu, ale může probíhat i v chloroplastech (Wachter *et al.*, 2005).



Obr. 6: Biosyntéza glutathionu (přepřacováno podle Pocernich a Butterfield, 2012).

Funkce GSH v obranných mechanismech rostlin spočívá v zapojení do redoxních reakcí (Noctor *et al.*, 2011). Glutathion je snadno a rychle oxidován ROS a vzhledem k své vysoké koncentraci působí jako redukční chemická bariéra, která zabraňuje nadměrné oxidaci buněčných komponent. GSH hraje důležitou roli v rozmanitých biologických procesech. Podílí se na buněčném dělení, regulaci transportu sulfátu, konjugaci s metabolity, regulaci enzymů a detoxikaci xenobiotik (Foyer *et al.*, 1997; Dixon a Edwards, 2010).

GSH je jednou z klíčových složek pro vývoj meristémů a embrya. Syntéza GSH je esenciální pro dozrávání pylu (Zechmann *et al.*, 2011). Při infekci patogenem dochází k vyčerpání zásob GSH v mitochondriích, což vede k hromadění ROS odpovědných za indukci programované buněčné smrti (Kuźniak a Sklodowska, 2005). GSH rovněž hraje důležitou roli v detoxikaci těžkých kovů jakožto prekurzor fytochelatinů (Cobbett a Goldsborough, 2002). Zároveň se podílí na odstraňování reaktivních ketoaldehydů, se kterými konjuguje za katalýzy glyoxalasu I (EC 4.4.1.5) (Skipsey *et al.*, 2000). Glyoxalasa II (EC 3.1.2.6) hydrolyzuje konjugát za uvolnění GSH a příslušné hydroxykyseliny (Noctor, 2006).

### **2.3.1.2 Kyselina askorbová**

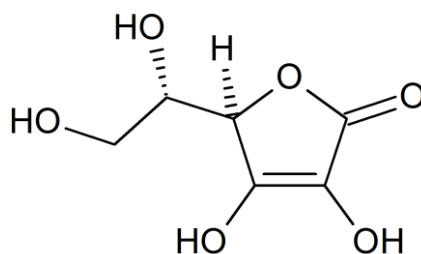
Kyselina askorbová (Obr. 7) hraje důležitou roli v antioxidační ochraně rostlin. Fyziologicky aktivní formou kyseliny askorbové je resonančně stabilizovaná forma aniontu.

Nejdůkladněji prostudovanou dráhou biosyntézy kyseliny askorbové je dráha Smirnoffa a Wheelera (Wheeler *et al.*, 1998). Syntéza kyseliny askorbové v tomto případě vychází D-glukosy, která je kaskádou reakcí přeměněna na L-galaktono-1,4-lakton. Tento prekurzor je na kyselinu askorbovou přeměněn enzymem L-galaktono-1,4-laktondehydrogenasou (EC 1.3.2.3) (Smirnoff *et al.*, 2001). Současné poznatky o biosyntetických drahách kyseliny askorbové shrnuty v přehledném článku Akram *et al.*, (2017). U vyšších rostlin jsou tyto dráhy lokalizovány v mitochondriích (Wheeler *et al.*, 1998).

Kyselina askorbová je přítomná ve všech buněčných kompartmentech včetně buněčné stěny, ale největší zastoupení má v chloroplastech, kde dosahuje koncentrace přes 20 mmol·l<sup>-1</sup>. Kyselina askorbová je substrátem pro askorbátperoxidasu (APX, EC 1.11.1.11), esenciální enzym tokoferol-askorbát-glutathionového cyklu (Obr. 9), který

probíhá téměř ve všech částech buňky (Smirnov a Wheeler, 2000). Askorbát se oxiduje nejprve na monodehydroaskorbát a poté na nestabilní dehydroaskorbát (Smirnov, 2000). Regenerace askorbátu probíhá v askorbát-glutathionovém cyklu, který byl poprvé popsán v chloroplastech a často je nazýván jako cyklus Foyer-Halliwell-Asada (Zsigmond *et al.*, 2011). U rostlin jsou enzymy askorbát-glutathionového cyklu, jako je askorbátperoxidasa, monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR, EC 1.6.5.4) a glutathionreduktasa (GR, EC 1.6.4.2) lokalizovány v cytosolu, mitochondriích a peroxisomech (Jiménez *et al.*, 1997).

Kyselina askorbová se podílí na regulaci hladiny fytohormonů. V práci Sadak *et al.* (2013) bylo po aplikaci kyseliny askorbové a citronové v poměru 2:1 zaznamenáno zvýšení hladiny brassinosteroidů, kyseliny giberrelové, zeatinu a indolactové kyseliny a naopak snížení obsahu kyseliny abscisové. Snížená hladina kyseliny askorbové vede k poškození fotosyntetického aparátu v důsledku neregulované zvýšené produkci ROS, což vede k urychlení senescence (Barth *et al.*, 2006). V chloroplastech se kyselina askorbová společně se zeaxanthinem podílí na ochraně světlosběrných komplexů před destrukcí působením vysoké intenzity záření (Horton a Ruban, 2005). Ve vakuolách hraje klíčovou roli při detoxikaci ROS redukcí fenoxylových radikálů během stresu ze sucha nebo vysoké intenzity světla (Takahama, 2004).



Obr. 7: Strukturní vzorec kyseliny L-askorbové.

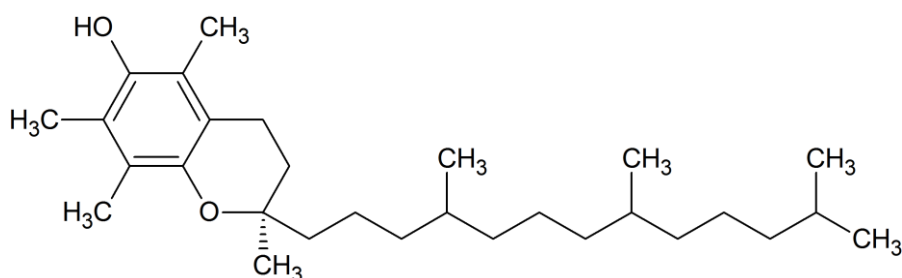


### 2.3.1.3 $\alpha$ -Tokoferol

Tokoferol (Obr. 8) je sloučenina lipofilní povahy, která je považována za jeden z neúčinnějších antioxidantů. Tokoferoly se řadí mezi amfipatické molekuly, které se skládají z polární chromanolové hlavičky a lipofilního isoprenoidního ocásku odvozeného od homogentisátu a fityldifosfátu (Collakova a Dellapena, 2003). Tokoferol se podobně jako cholesterol podílí na stabilizaci membránových struktur, moduluje fluiditu membrány a její permeabilitu pro malé ionty a molekuly (Fryer, 1992).

Biosyntéza tokoferolu probíhá výhradně u fotosyntetických organismů, začíná v plastidech a další část biosyntézy je lokalizována v cytosolu (Soll *et al.*, 1980). Hydrochinonový kruh pochází z degradace tyrosinu, fityldifosfát poskytuje prenylové jednotky (Riewe *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011). Podrobně je biosyntéza rozepsána v přehledném článku Fritzsche *et al.*, (2017). Tokoferol je skladován ve stromatu chloroplastů a v membránách thylakoidů (Lichtenthaler *et al.*, 1981; Fryer, 1992).

Tokoferol je považován za hlavní antioxidant, který se podílí na odstraňování singletového kyslíku (Foyer a Noctor, 2005). Jediná jeho molekula může deaktivovat až 120 molekul singletového kyslíku (Fahrenheitz *et al.*, 1974).  $\alpha$ -Tokoferol zabraňuje peroxidaci lipidů předáním atomu vodíku z chromanolového kruhu na peroxyradikál mastné kyseliny. Pokud nedojde k zpětné recyklaci vznikajícího  $\alpha$ -tokoferoxylového radikálu na  $\alpha$ -tokoferol, dochází k nenávratné degradaci tohoto antioxidantu. K zpětné recyklaci na tokoferol může dojít pomocí askorbátu nebo GSH (Fryer, 1992; Munné-Bosch a Alegre, 2002).

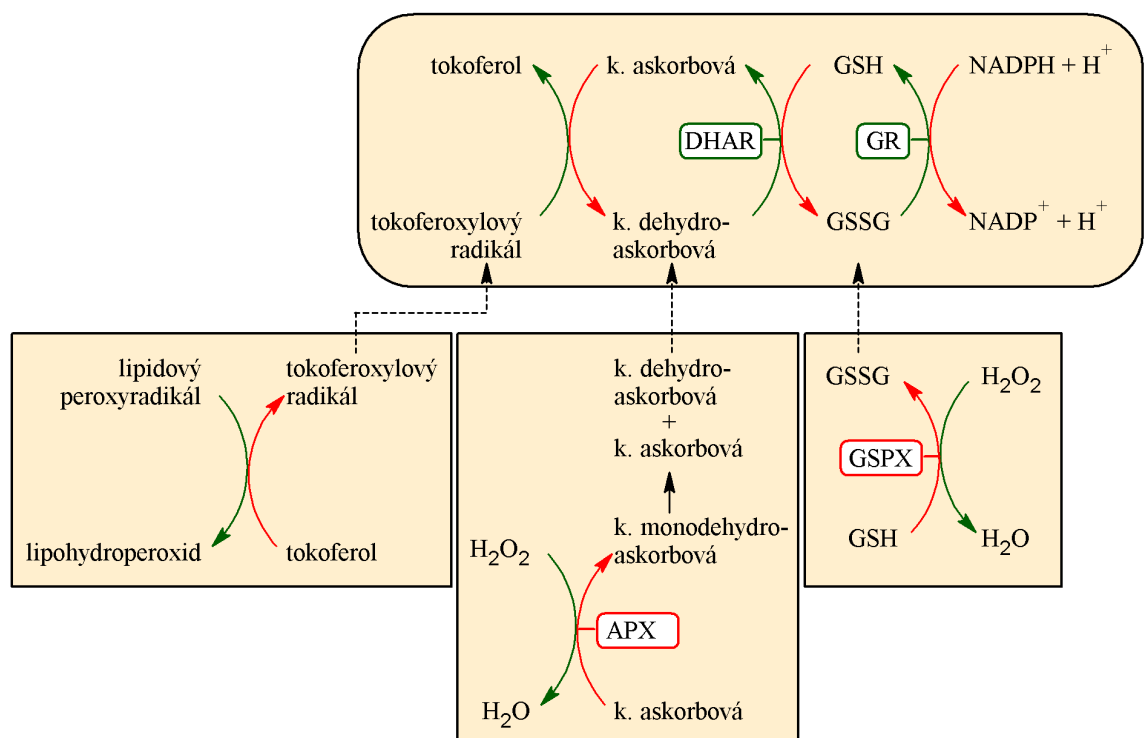


Obr. 8: Strukturální vzorec  $\alpha$ -tokoferolu.

## 2.3.2 Antioxidační enzymy

### 2.3.2.1 Askorbátperoxidasa

Enzym askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11) se řadí mezi hemové peroxidasy I. třídy (Takeda *et al.*, 1998). Podílí na detoxikaci peroxidu vodíku reakcí s kyselinou askorbovou (Obr. 9). U rostlin nacházíme mnoho isoform v závislosti na jejich subcelulární lokalizaci. Cytosolická APX (cAPX), mitochondriální APX (mitAPX) a APX ve stromatu chloroplastu (sAPX) jsou rozpustné isoformy APX, zatímco APX v mikrotěličích (peroxisom, glyoxysom) a thylakoidní APX v chloroplastech (tAPX) jsou membránově vázané isoformy APX (mAPX) (Shigeoka *et al.*, 2002). Lokalizace APX je dána N- a C-terminální doménou proteinu (Teixeira *et al.*, 2006).



Obr. 9: Askorbát-glutathion-tokoferolový cyklus (přepřacováno podle Szarka *et al.*, 2012). APX - askorbátperoxidasa, DHAR - dehydroaskorbátreduktasa, GR - glutathionreduktasa, GSH - redukováná forma glutathionu, GSPX - glutathionperoxidasa, GSSG - oxidovaná forma glutathionu

### 2.3.2.2 Glutathionreduktasa

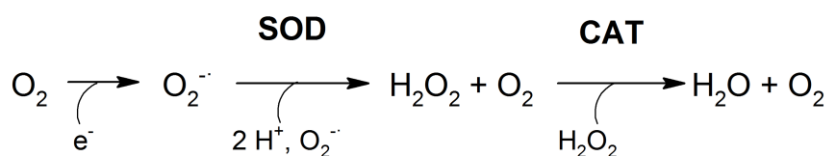
Glutathionreduktasa (GR, EC 1.6.4.2) katalyzuje redukci oxidovaného glutathion disulfidu (GSSG) na glutathion a řadí se mezi flavoproteiny s vysokou afinitou pro NADPH a GSSG (Edwards *et al.*, 1990; Noctor *et al.*, 2012). GR existuje ve dvou isoformách: selen-dependentní a selen-independentní (Matoušková *et al.* 2014). Vysoká aktivita GR byla zaznamenána v chloroplastech, v cytosolu, mitochondriích a peroxisomech (Foyer a Halliwell, 1976; Jiménez *et al.*, 1997; Stevens *et al.*, 2000). Tento enzym udžuje fyziologickou rovnováhu mezi GSH a GSSG v poměru 10 : 1 ve prospěch GSH (Matoušková *et al.*, 2014).

### 2.3.2.3 Glutathionperoxidasa

Enzym glutathionperoxidasa (GSPX, EC 1.11.1.9) je součástí ochranného systému organismu, jehož pomocí se odstraní toxické peroxidy. Jedná se o selen-depedentní enzym lokalizovaný v cytosolu. GSPX katalyzuje přeměnu daného peroxidu na vodu a příslušný alkohol za současné oxidace kofaktoru GSH na GSSG (van der Oost *et al.*, 2003). V ochranném systému je reakce GSPX spřažená s reakcí GR.

### 2.3.2.4 Katalasa

Enzym katalasa (CAT, EC 1.11.1.6) se podílí na heterolytickém štěpení dvou molekul peroxidu vodíku na molekulu kyslíku a vody. U rostlin se nachází převážně v peroxisomech (Mittler, 2002). Aktivita katalasy byla nalezena také v cytosolu, v chloroplastech a v mitochondriích (Mhamdi *et al.*, 2010). Katalasa vykazuje nižší afinitu ( $K_M = 40 - 600 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) k peroxidu vodíku než APX ( $K_M < 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (Mittler, 2002).



Obr. 10: Detoxikace ROS pomocí SOD a CAT (přepřacováno podle Devine *et al.*, 2012).

### 2.3.2.5 Superoxiddismutasa

Superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) je metaloenzym, který v antioxidační ochraně rostlin figuruje jako jedna z jeho nejdůležitějších složek. Podle kovového iontu v aktivním místě byly identifikovány 3 isoformy SOD: Fe-SOD, Mn-SOD a Cu/Zn-SOD. Fe-SOD a Mn-SOD jsou si blízké svou N-terminální sekvencí, 3D strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi (Kitagawa *et al.*, 1986). Všechny tři isoformy se liší svou lokalizací - Cu/Zn-SOD se nachází v chloroplastech, cytosolu a peroxisomech, zatímco Fe-SOD a Mn-SOD jsou lokalizovány v mitochondriích a chloroplastech (Alscher *et al.*, 2002). SOD katalyzuje reakci, při které dochází k dismutaci superoxidového aniontu na peroxid vodíku a kyslík (Obr. 10).

## 2.4 Peroxidace lipidů

Peroxidace lipidů je chemický proces, během kterého dochází k oxidačnímu poškození polynenasycených mastných kyselin (PUFA, z anglického polyunsaturated fatty acids) lipidů biologických membrán vlivem kyslíku a volných radikálů za přítomnosti stopového množství iontů kovů (Esterbauer *et al.*, 1991; Jones, 2008). PUFA mají v organismu řadu funkcí - podílí se na udržování buněčné homeostázy, buněčné signalizaci nebo regulaci genové exprese a interakcích s makromolekulami vedoucích k buněčné smrti (Poulos *et al.*, 1995; Fritz a Petersen, 2013). Peroxidace lipidů je tedy škodlivý proces, který vede k narušení buněčných membrán a následně k dysfunkci buňky (Kühn a Borchert, 2002). Jednotlivé typy buněčných membrán se významně liší zastoupením PUFA (Fritz a Petersen, 2013). Citlivost k oxidačnímu poškození je přímo úměrná počtu dvojných vazeb v molekule mastné kyseliny (Wagner *et al.*, 1994). Během peroxidace vznikají hydroperoxydy jako primární produkty, které se dále mohou přeměňovat na velmi reaktivní sekundární produkty, jež poškozují strukturu dalších biomakromolekul (Siems a Grune, 2003).

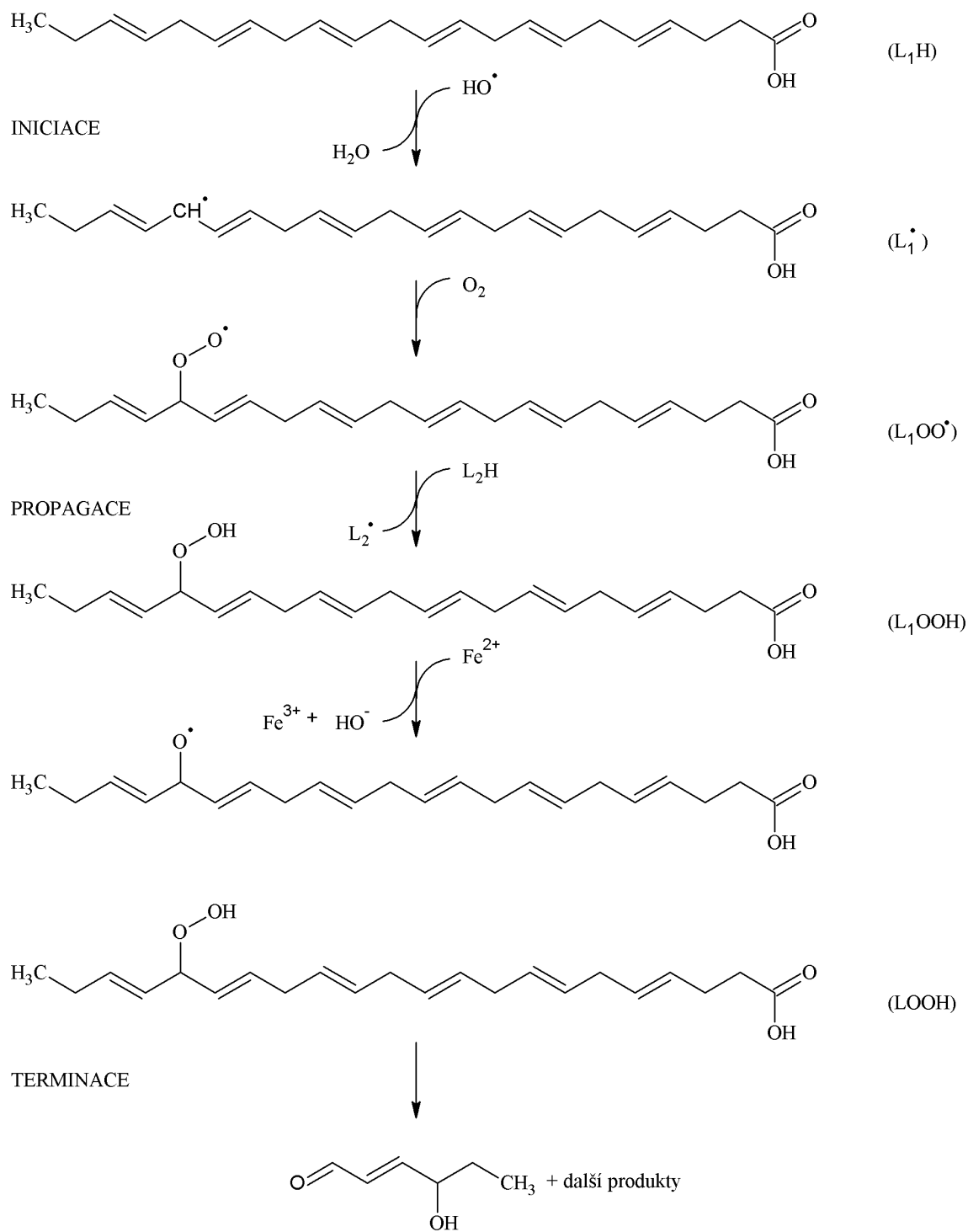
### 2.4.1 Neenzymová peroxidace lipidů

Neenzymová peroxidace lipidů je reakce s řetězovým charakterem skládající se ze tří fází – iniciace, propagace a terminace (Obr. 11) (Girotti, 1985). Reakce může být iniciována hydroxylovými nebo superoxidovými radikály (Fritz a Petersen, 2013). Během iniciační reakce dochází k ataku volného radikálu na cis-methylenové residuum v mastné kyselině a k odštěpení atomárního vodíku za vzniku radikálu  $L_1\cdot$ .

Nejreaktivnější je methylenová skupina, kterou z obou stran destabilizuje dvojná vazba (Vodrážka, 2002).

V propagační fázi dochází k adici molekulárního kyslíku na radikál  $L_1^{\bullet}$  za vzniku peroxylového radikálu  $L_1OO^{\bullet}$ , který vstupuje do reakce s další molekulou PUFA ( $L_2H$ ) za vzniku radikálu  $L_2^{\bullet}$  a nestabilního lipohydroperoxidu ( $L_1OOH$ ) (Vodrážka, 2002; Fritz a Petersen, 2013). Nově vzniklý radikál opět reaguje s  $O_2$  a nastává řetězová reakce, ve které se spotřebovává kyslík a PUFA a hromadí se lipidové peroxidy (Vodrážka, 2002). Během propagační fáze dochází k rozštěpení lipohydroperoxidů, které jsou nestabilní zejména v přítomnosti přechodných kovů (Cu, Fe), na alkoxylové a peroxylové radikály (Cheeseman, 1993).

Nahromaděné primární produkty, peroxidy lipidů, následně mohou vytvořit epoxidy, hydrokyseliny nebo mohou být přeměněny na reaktivní karbonylové sloučeniny (Vodrážka, 2002). V případě, že na sebe narazí dvě molekuly radikálů nebo se molekula radikálu setká s molekulou antioxidantu, dochází k vytvoření stabilního neradikálového produktu a řetězová reakce se ukončí, dochází k tzv. terminaci (Fritz a Petersen, 2013).

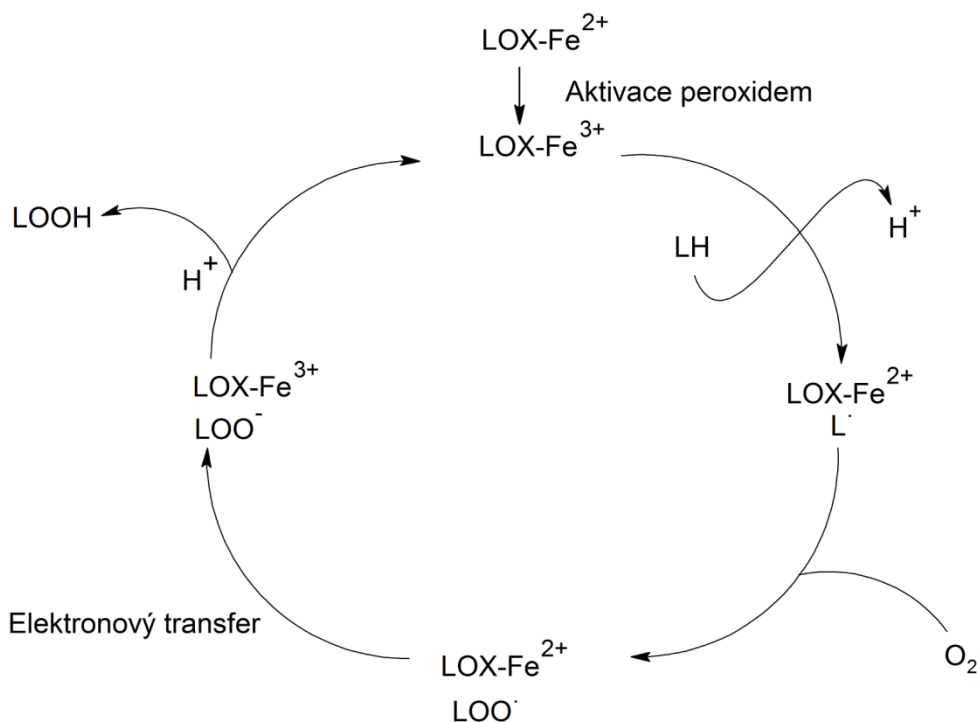


Obr. 11: Schéma neenzymové peroxidace kyseliny dokosahexanové (přepřacováno podle Catalá, 2006).

## 2.4.2 Enzymově katalyzovaná peroxidace lipidů

Peroxidace lipidů může být enzymově katalyzovaná lipoxygenasami (LOX, EC 1.13.11.12), které katalyzují dioxygenaci polynenasycených mastných kyselin (Vörös *et al.*, 1998). Lipoxygenasy oxidují substrát molekulárním kyslíkem a vytváří příslušné hydroperoxy (Kühn a Borchert, 2002). U většiny LOX je kofaktorem nehemové železo, které tvoří vazbu se čtyřmi histidiny a C-terminálním isoleucinem (Kuban *et al.*, 1998). Rostlinné lipoxygenasy se dělí podle jejich regio-specifické dioxygenační reakce na dvě skupiny označované jako 9-LOX a 13-LOX (Ptáčková *et al.*, 2015).

Mechanismus LOX probíhá v cyklických radikálových reakcích (Obr. 12). V prvním kroku dochází odejmutí atomu vodíku mastné kyselině za tvorby radikálu mastné kyseliny (Vodrážka, 2002). Dalším krokem je radikálové uspořádání, po kterém následuje dioxygenace na C-1 nebo C-4 uhlík pentadienylového systému za vzniku hydroperoxidového radikálu mastné kyseliny. Cyklus je uzavřen redukcí meziprojektu a oxidací enzymu na železitou formu (Kühn a Borchert, 2002).



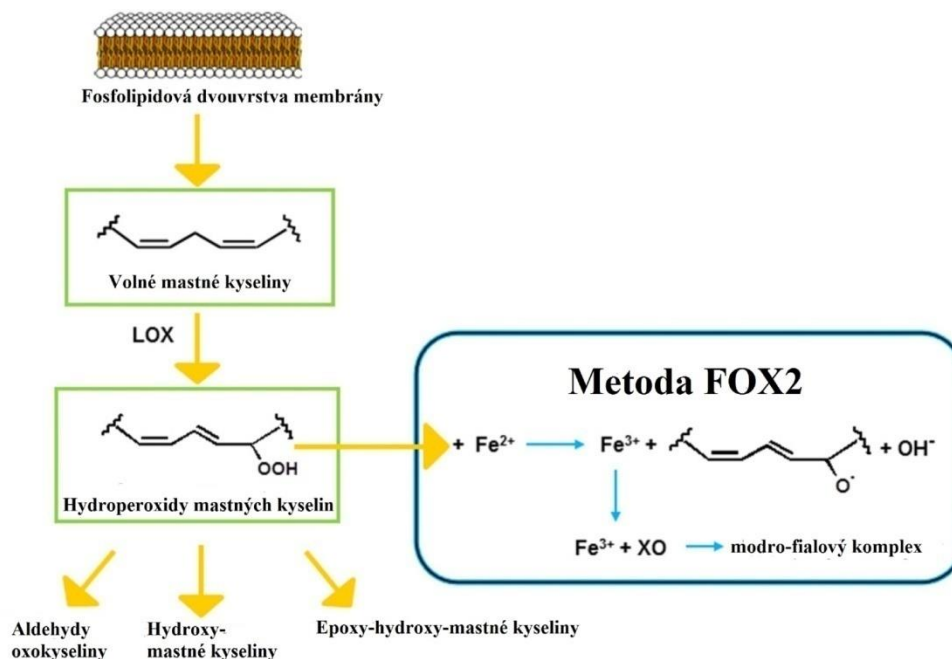
Obr. 12: Předpokládaný mechanismus reakce katalyzované LOX (přepřacováno podle Kühn a Borchert, 2002).

## 2.4.3 Metody stanovení peroxidace lipidů

### 2.4.3.1 Primární produkty

Jednou z metod pro stanovení peroxidace lipidů je metoda využívající oxidace železnatých iontů s xylenolovou oranží (FOX, z anglického Ferrous oxidation - xylenol orange). Hydroperoxydy lipidů, jakožto primární produkty reakce buněčných složek s volnými radikály, reagují při nízkém pH s nadbytkem železnatých iontů v přítomnosti xylenolové oranže (Obr. 13). Měří se vzniklý obsah železitých iontů v komplexu železité ionty-xylenolová oranž ve viditelné části spektra (Griffiths *et al.*, 2000). U této metody byly vyvinuty dvě testovací procedury s různou citlivostí - FOX1 a FOX2. Metodou FOX1 mohou být stanoveny hydroperoxydy ve vodné fázi. Díky sorbitolu, který má funkci radikálového řetězového nosiče, je tato metoda vysoce citlivá. Metoda FOX2 je využívána pro stanovení hydroperoxidů přítomných v lipidových frakcích (lipoproteiny, membrány). Je méně citlivá, ale může být použita za podmínek, které by byly pro předchozí metodu nevhodné (Wolff, 1994).

Pro stanovení hydroperoxidů lipidů v přečištěných rybích olejích byla vyvinuta metoda, která využívá 3-perylendifenylfosfin, který reaguje s hydroperoxydy lipidů za vzniku fluoreskujícího produktu 3-perylendifenylfosfin oxidu. Výsledky této metody korelují s výsledky metody FOX (Chotimarkorn *et al.*, 2005).



Obr. 13: Peroxidace lipidů a stanovení primárních produktů metodou FOX2 (přepřacováno podle Orefice *et al.*, 2015). XO - xylenolová oranž



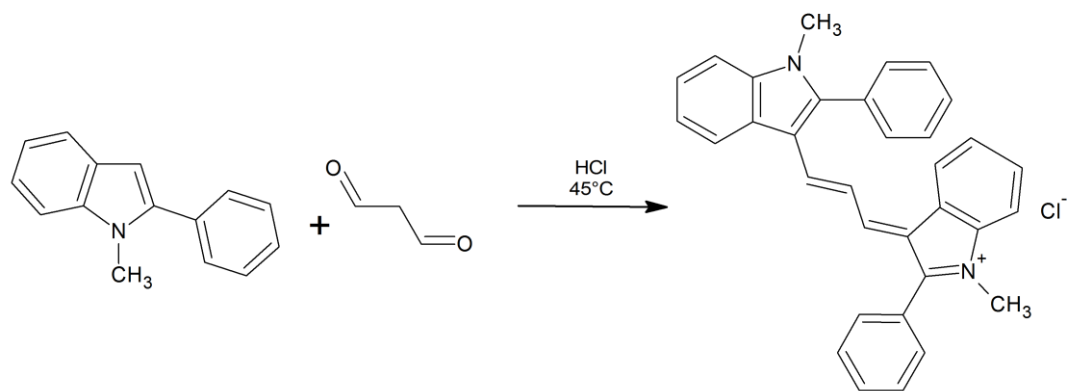
### 2.4.3.2 Sekundární produkty

Metoda využívající kyselinu thiobarbiturovou (TBA) slouží ke kvantifikaci obsahu malondialdehydu (MDA), který je generován během enzymové degradace nebo autooxidace PUFA a je označován jako užitečný index pro stanovení míry peroxidace lipidů prostřednictvím sekundárních produktů (Heath a Packer, 1968). Princip stanovení MDA touto metodou spočívá v nukleofilní adici dvou molekul TBA na jednu molekulu MDA v kyselém prostředí za vzniku růžovo-červeného zbarvení s maximem absorpance při 532 nm (Du a Bramlage, 1992).

U rostlinných extraktů může být obsah malondialdehydu nadhodnocen přítomností interferujících látek, např. sacharidů nebo antokyanů (Taulavuori *et al.*, 2001). U korigované metody je využito odečtení absorpance při 532 nm roztoku rostlinného extraktu inkubovaného bez přídavku TBA od identického vzorku, k němuž byla TBA přidána (Hodges *et al.*, 1999). HPLC analýza slouží k ověření koncentrace aduktů MDA-TBA z důvodu možné interference sloučenin obsažených v rostlinných pletivech. Použití HPLC je mnohem přesnější než spektrofotometrické stanovení vlivem účinné separace na chromatografické koloně, avšak je časově náročnější (Shibamoto, 2006).

V modifikované metodě se místo TBA používá 1,3-diethyl-2-thiobarbiturová kyselina (DETBA). Barevný komplex MDA-DETBA má menší polaritu než komplex MDA-TBA a je snadněji oddělitelný extrakcí na pevné fázi s následnou kvantifikací podobně jako u metody TBA (Guichardant *et al.*, 1994).

Další metoda je založena na reakci chromogenního činidla N-methyl-2-fenylindolu (NMPI) s MDA nebo 4-hydroxyalkenaly při teplotě 45°C (Obr. 14). Principem reakce je interakce jedné molekuly MDA nebo 4-hydroxyalkenalu s dvěma molekulami NMPI za vzniku stabilního zbarveného komplexu s maximem absorpance při 586 nm. Pro kvantifikaci MDA i 4-hydroxyalkenalů se do reakční směsi přidává methanosulfonová kyselina. Pro stanovení pouze MDA se využívá přídavku kyseliny chlorovodíkové, jelikož za těchto podmínek dochází k irreverzibilní cyklizaci 4-hydroxyalkenalů (Gérard-Monnier *et al.*, 1998).



Obr. 14: Reakce metody využívající NMPI.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

Acetonitril (Sigma Aldrich, Německo), albumin z hovězího séra (Sigma Aldrich, Německo), akrylamid/bisakrylamid (AA/BIS, Sigma Aldrich Německo), dimethylformamid (Sigma Aldrich, Německo), N,N,N',N'-tetramethylendiamin (TEMED; Sigma Aldrich, Německo), kyselina L-askorbová (Sigma Aldrich, Německo), bromfenolová modř (Sigma Aldrich, Německo), n-butanol (Sigma Aldrich, Německo), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB, Serva, Německo), Brilliant Blue G250 (Sigma Aldrich, Německo), dusík kapalný (Messer, Česká republika), elicitory (kryptogein, mutanti kryptogeinu K13V a V84F, infestin, mutanti infestinu V13K/A14T a V84F, Ústav biochemie, MU, Brno), dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Česká republika), hydrogenfosforečnan draselný (Sigma Aldrich, Německo), L-glutamin (Merck, Česká republika), glutathiondisulfid (GSSG, Sigma Aldrich, Německo), glycerol (Sigma Aldrich, Německo), glycin (Penta, Česká republika), guajakol (Sigma Aldrich, Německo), 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát p-toluidinová sůl (BCIP, Sigma Aldrich, Německo), kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika), chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika), chlorid vápenatý (Penta, Česká republika), N-methyl-2-fenylindol (NMPI, Acros Organics, USA), kinetin (Sigma Aldrich, Německo), kumylhydroperoxid (Acros Organics, USA), kyselina listová (Sigma Aldrich, Německo), methanol (Lach-Ner, Česká republika), D-mannitol (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), Murashige-Skoog médium s vitaminy dle Gamborga (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, Sigma Aldrich, Německo), hydrát kyseliny 2-(4-morfolino)ethansulfonové (Sigma Aldrich, Německo), 4-chloro-1-naftol (Sigma Aldrich, Německo), kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (2,4-D, Sigma Aldrich, Německo), monosodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Sigma Aldrich, Německo), pantothenát vápenatý (Sigma Aldrich, Německo), Pefabloc (Sigma Aldrich, Německo), peroxid vodíku (Penta, Česká republika), persíran amonný (APS, Sigma Aldrich, Německo), 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich, Německo), polyvinolpolypyrrolidon (PVPP, Sigma Aldrich, Německo), primární anti-APX králičí polyklonální protilátka (Agrisera, Švédsko), 1,1,3,3-tetraethoxypropan (TEP, Sigma Aldrich, Německo), sacharosa (Sigma Aldrich, Německo), sekundární antikráličí IgG protilátka značená alkalickou fosfatasou (Sigma, USA), kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika), síran draselný

(Lachema, Česká republika), síran železnato-amonný (Lachema, Česká republika), p-nitrotetrazoliová modř (Roth, Německo), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS, Sigma Aldrich, Německo), dithiothreitol (DTT, Duchefa Biochemie, Nizozemsko), butylhydroxytoluen (BHT, Sigma Aldrich, Německo), Triton X-100 (Acros Organics, USA), Tween-20 (Sigma Aldrich, Německo), xylenolová oranž (Acros Organics, USA)

### 3.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy Denver Summit (Denver Instrument, USA); automatické pipety (Eppendorf, Německo); dokumentační zařízení Gel-Doc (Bio-Rad, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo); laminární box Bioban-48 (Vetrotecnica, Itálie); mikrodestičky Testplate 96F (TPP, Švýcarsko); minitřepačka Vortex-V1 Plus (Biosan, Litva); parní sterilizátor (Tuttnauer, Německo); plastové mikrozkušavky (Eppendorf, Německo); PVDF membrána (Merck Millipore, USA); Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer Systém (Bio-Rad, USA); třepačka chlazená Innova 42 (Eppendorf, Německo); třepačka orbitální OS-20 (BioSan, Litva) váhy (Kern and Sohn GmbH, Německo); vakuová vývěva D-Lab (Edwards, USA); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA)

### 3.3 Rostlinný materiál

Pro experimentální část byla použita suspenzní kultura tabákových buněk *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. Kultivace tabákových buněk probíhala na třepačce při teplotě 25°C, s celodenním světelným režimem a s intenzitou třepání 180 rpm. Buňky byly kultivovány v tekutém Murashige-Skoog médiu připraveném dle Tab. 5 (Murashige a Skoog, 1962). Připravené médium bylo rozlito po 100 ml do Erlenmayerových baněk a autoklávováno. Buňky byly pasážovány každý týden - v laminárním boxu bylo 25 ml sedm dní staré suspenzní kultury převedeno do čerstvého média. Pro experimenty byly použity buňky čtvrtý den po pasážování, kdy se buněčná suspenze nacházela v exponenciální části růstové křivky.

Tab. 5: Návod pro přípravu 1 l tekutého Murashige-Skoog média s přidavkem hormonů (pH 5,5 - 5,7).

Složka	Množství
Směs Murashige-Skoog médium s vitaminy dle Gamborga	4,4 g
Glutamin	200 mg
Sacharosa	30 g
Zásobní roztok kinetinu ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1 ml
Zásobní roztok 2,4-D ( $220 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0,8 ml
Zásobní roztok vitaminů neobsažených ve směsi (panthotenát vápenatý $300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , glycin $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , kyselina listová $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , biotin $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	10 ml

Čtvrtý den po pasážování bylo pomocí Büchnerovy nálevky odsáto kultivační médium. Buňky byly zváženy na předvážkách a smíseny s ekvilibračním médiem (Tab. 6) v poměru 1 g buněk : 10 ml ekvilibračního média. Po hodinové ekvilibraci byly k buněčné suspenzi aplikovány elicitiny ve výsledné koncentraci  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a buněčná suspenze byla inkubována po dobu 4 h. Po uplynutí doby inkubace bylo ekvilibrační médium odsáto Büchnerovou nálevkou a buňky byly zamraženy při  $-80^\circ\text{C}$ . Pro realizaci experimentů byly buňky homogenizovány v třecí misce s tloučkem v kapalném dusíku. Následně byly buňky rozděleny do plastových mikrozkušavek a uchovány při  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.4 Elicitiny

V experimentální části práce byly použity elicitiny kryptogein (X24) a jeho mutanti K13V a V84F a infestin (INF) a jeho mutanti V13K/A14T (dále uveden jen INF V13K) a V84F, které byly připraveny jako rekombinantní proteiny a darovány Ústavem biochemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně. Elicitiny byly naředěny na koncentraci  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a před aplikací k buněčné suspenzi byly zásobní roztoky zamraženy při  $28^\circ\text{C}$ .

Tab. 6: Složení ekvilibračního média. Uvedená množství jednotlivých složek slouží pro přípravu 1 l ekvilibračního média (pH 5,8).

Složka	Množství
D-Mannitol	32 g
MES-hydrát [hydrát kyseliny 2-(4-morfolino)ethansulfonové]	390 mg
$\text{K}_2\text{SO}_4$	87 mg
$\text{CaCl}_2$	74 mg

## **3.5 Experimentální metody**

### **3.5.1 Stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou**

Koncentrace celkových proteinů byla stanovena metodou podle Bradforda, která využívá vazby barviva Coomassie Brilliant Blue G250 na molekuly proteinů v kyselém prostředí (Bradford, 1976). Vznikající modré zbarvení je úměrné koncentraci proteinů ve vzorku.

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 45  $\mu\text{l}$  destilované vody, 5  $\mu\text{l}$  blanku, extraktu nebo standardu hovězího sérového albuminu (BSA) a 200  $\mu\text{l}$  Bradfordova činidla připraveného zředěním zásobního roztoku Coomasie Blue v poměru 1:4. Zásobní roztok Coomasie Blue byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomasie Blue G250 v 25 ml methanolu, 50 ml 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a doplněním  $\text{H}_2\text{O}$  do objemu 100 ml. Po pěti minutové inkubaci byla změřena absorbance při 595 nm. Kalibrační křivka byla sestavena ze standardů BSA o koncentracích 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 a 1,6  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Standardy a vzorky byly měřeny ve třech opakováních.

### **3.5.2 Stanovení aktivity antioxidačních enzymů**

#### **3.5.2.1 Příprava rostlinného extraktu**

Extrakce vzorků byla provedena přidáním extrakčního pufru k zamraženým zhomogenizovaným buňkám v poměru 1:2 (w/v). Pro extrakci byl použit 0,1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  K-fosfátový pufr (pH 7,0) obsahující 2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA- $\text{Na}^+$ , 1% PVPP, 2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  DTT a 0,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Pefabloc. Vzorky byly ponechány 20 min na ledové lázni a v pravidelných intervalech promíchány na vortexu. Po uplynutí uvedené doby byly vzorky centrifugovány 15 min při 16 900 g. Supernatant byl následně přepipetován do čistých plastových mikrozkušavek a uchován na ledové lázni.

#### **3.5.2.2 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy**

Askorbátperoxidasa katalyzuje reakci, ve které dochází k oxidaci kyseliny askorbové na kyselinu monodehydroaskorbovou a současně je  $\text{H}_2\text{O}_2$  redukován na vodu. Úbytek kyseliny askorbové je monitorován jako pokles absorbance při 290 nm. Molární absorpční koeficient má hodnotu 2800  $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Nakano a Asada, 1981).

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 150  $\mu\text{l}$  0,1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  K-fosfátového pufru (pH 6,0), 40  $\mu\text{l}$  1,75  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny askorbové a 50  $\mu\text{l}$  10x zředěného extraktu. Extrakční pufr sloužil jako blank. Reakce byla zahájena přidávkem 50  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

peroxidu vodíku. Reakce probíhala při teplotě 30°C a absorbance při 290 nm byla monitorována po dobu 30 s.

### **3.5.2.3 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy**

Guajakolperoxidasa katalyzuje reakci, ve které dochází k oxidaci guajakolu na 3,3'-dimethoxyfenyl-4,4'-bifenoquinon za vzniku žlutohnědého zbarvení, které může být monitorováno spektrofotometricky při 436 nm. Molární absorpční koeficient má hodnotu 4500 l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> (Frébort a Adachi, 1995; Doerge *et al.*, 1997).

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 150 μl 0,1 mol·l<sup>-1</sup> K-fosfátového pufru (pH 6,0), 40 μl 50 mmol·l<sup>-1</sup> guajakolu a 50 μl 50x zředěného extraktu. Extrakční pufr sloužil jako blank. Reakce byla zahájena přidávkem 50 μl 10 mmol·l<sup>-1</sup> peroxidu vodíku. Reakce probíhala při teplotě 30°C a absorbance při 436 nm byla monitorována po dobu 2 min.

### **3.5.2.4 Stanovení aktivity katalasy**

Katalasa katalyzuje reakci, ve které dochází k disproportionaci peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Úbytek peroxidu vodíku může být monitorován spektrofotometricky při 240 nm. Molární absorpční koeficient má hodnotu 39,4 l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> (Aebi, 1984).

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 220 μl 0,1 mol·l<sup>-1</sup> K-fosfátového pufru (pH 7,0), 20 μl neředěného extraktu a 60 μl 60 mmol·l<sup>-1</sup> peroxidu vodíku. Jako blank sloužila destilovaná voda. Reakce probíhala při 30°C a absorbance při 240 nm byla monitorována po dobu 4 min a 45 s.

### **3.5.2.5 Stanovení aktivity glutathionreduktasy**

Glutathionreduktasa katalyzuje reakci, ve které dochází k redukci oxidovaného glutathionu (GSSG) za vzniku redukovaného glutathionu (GSH). Ve spřažené reakci GSH redukuje 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinu (DTNB) na dianion 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB) za vzniku žlutého zbarvení, které může být monitorováno spektrofotometricky při 412 nm. Molární absorpční koeficient má hodnotu 14 150 l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> (Smith *et al.*, 1988).

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 200 μl 0,1 mol·l<sup>-1</sup> K-fosfátového pufru (pH 7,4) obsahujícího 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA-Na<sup>+</sup>, 0,95 mmol·l<sup>-1</sup> DTNB a 123 mmol·l<sup>-1</sup> NADPH a 25 μl neředěného extraktu. Po promíchání byla směs

inkubována v termobloku po dobu 2 min při teplotě 35°C. Po uplynutí doby inkubace byla reakce zahájena přidáním 25 µl 50 mmol·l<sup>-1</sup> K-fosfátového pufru (pH 7,4) obsahujícího 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA-Na<sup>+</sup> a 10 mmol·l<sup>-1</sup> GSSG. Jako blank sloužil 50 mmol·l<sup>-1</sup> K-fosfátový pufr (pH 7,4) obsahující 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA-Na<sup>+</sup>. Reakce probíhala při teplotě 30°C a absorbance při 412 nm byla monitorována po dobu 5 min.

### **3.5.3 Stanovení celkové antioxidační kapacity**

#### **3.5.3.1 Příprava rostlinného extraktu**

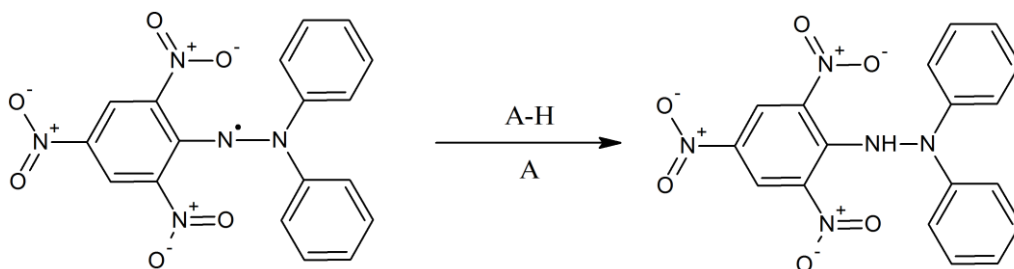
Extrakce vzorků byla provedena přidáním vychlazeného methanolu k zamraženým zhomogenizovaným buňkám v poměru 1:2 (w/v). Vzorky byly ponechány 15 min na ledové lázni, v pravidelných intervalech byly vortexovány a poté byly centrifugovány 15 min při 15 000 g. Supernatanty byly následně přepipetovány do čistých plastových mikrokumavek a byly uchovány na ledové lázni.

#### **3.5.3.2 Spektrofotometrická metoda využívající DPPH**

Principem této metody je reakce stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) s antioxidantem, který poskytuje atom vodíku, za vzniku redukovaného DPPH-H (Obr. 15). Pokles absorbance, který je dán změnou fialového zbarvení ve žluté, a je sledován spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm (Paulová *et al.*, 2004; Prakash *et al.*, 2001).

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 50 µl blanku (methanol), standardu nebo 10x zředěného vzorku a 150 µl 67 µmol·l<sup>-1</sup> radikálu DPPH. Reakční směs byla inkubována 10 min při laboratorní teplotě ve tmě a poté byla změřena absorbance při 515 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena ze standardů troloxu v methanolu o koncentracích 10; 20; 40; 60; 80 a 100 µmol·l<sup>-1</sup>. Antioxidační kapacita byla vyjádřena v ekvivalentech Troloxu vztažených na gram čerstvé váhy rostlinného materiálu.



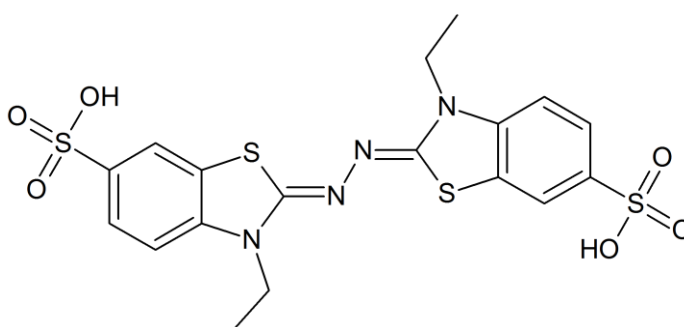


Obr. 15: Reakce metody využívající DPPH.

### 3.5.3.3 Spektrofotometrická metoda využívající ABTS

V této metodě je testovaná schopnost vzorku zhaset kation-radikál  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (Obr. 16), který má modrozelenou barvu, ve vodném prostředí nebo častěji v prostředí pufru (Arnao *et al.*, 1999). Ztráta charakteristického modrozeleného zbarvení v průběhu reakce je monitorována jako pokles absorbance při vlnových délkách 645, 734 a 815 nm (Pellegrini *et al.*, 2003).

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 50  $\mu\text{l}$  blanku (methanol), standardu nebo 10x zředěného extraktu a 50  $\mu\text{l}$  372  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  persíranu amonného. Reakce byla zahájena přidávkem 100  $\mu\text{l}$  1,6  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  radikálu ABTS. Reakční směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 50 min a následně byla změřena absorbance při vlnové délce 734 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena ze standardů troloxu v methanolu o koncentracích 10; 20; 40; 60 a 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Antioxidační kapacita byla vyjádřena v ekvivalentech Troloxu vztažených na gram čerstvé váhy rostlinného materiálu.



Obr. 16: Strukturální vzorec sloučeniny ABTS.

### **3.5.4 Stanovení peroxidace lipidů**

#### **3.5.4.1 Příprava rostlinného extraktu**

Extrakce byla provedena přidáním extrakčního pufru k zamraženým zhomogenizovaným buňkám v poměru 1:2 (w/v). Pro extrakci byl použit  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  K-fosfátový pufr (pH 7,0) obsahující 1% (v/v) Triton X-100 a 0,01% (w/v) butylhydroxytoluen. Vzorky byly ponechány 20 min na ledové lázni a v pravidelných intervalech promíchány na vortexu. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky centrifugovány 20 min při 16 000 g.

#### **3.5.4.2 Metoda FOX2 - primární produkty peroxidace lipidů**

Hydroperoxydy lipidů (primární produkty peroxidace lipidů) oxidují železnaté ionty v kyselém prostředí na železité, které tvoří komplex s xylenolovou oranží za vzniku modrofialového zbarvení, které je možno monitorovat spektrofotometricky při 560 nm (Griffiths *et al.*, 2000).

V mikrozkuvkách bylo inkubováno 40  $\mu\text{l}$  blanku (extrakční pufr), standardu nebo vzorku a 10  $\mu\text{l}$  methanolu. Inkubace probíhala 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace bylo do každé mikrozkuvky přidáno 400  $\mu\text{l}$  pracovního činidla FOX 2, který byl připraven smícháním činidla FOX A a FOX B (Tab. 6) v poměru 1:9. Obsah mikrozkuvek byl promíchán na vortexu a mikrozkuvky byly inkubovány 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace byly mikrozkuvky centrifugovány 5 min při 16 200 g při laboratorní teplotě. Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 180  $\mu\text{l}$  supernatantu a byla změřena absorbance při 560 nm. Kalibrační křivka byla sestavena ze standardů kumenhydroperoxidu o koncentracích 1; 5; 10; 25; 50; 75 a 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### **3.5.4.3 Metoda s NMPI - sekundární produkty peroxidace lipidů**

Chromogenní činidlo N-methyl-2-fenylindol (NMPI) interaguje s malondialdehydem (MDA), který je označován jako užitečný index pro stanovení míry peroxidace lipidů prostřednictvím sekundárních produktů. Vznikající barevný komplex je možné detekovat spektrofotometricky s maximem absorpce při 586 nm (Gérard-Monnier *et al.*, 1998)

Do mikrozkuvek bylo pipetováno 80  $\mu\text{l}$  blanku (extrakční pufr), standardu nebo vzorku a 260  $\mu\text{l}$   $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  činidla NMPI (Tab. 7).

Tab. 7: Složení roztoků pro metody stanovení peroxidace lipidů.

Roztok	Složení
FOX A	250 mmol·l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1 mmol·l <sup>-1</sup> xylenolová oranž a 2,5 mmol·l <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
FOX B	4,4 mmol·l <sup>-1</sup> butylhydroxytoluen v methanolu
čínidlo NMPI	41 mg NMPI (výsledná koncentrace je 10 mmol·l <sup>-1</sup> ), 15 ml acetonitrilu, 5 ml methanolu

Reakce byla zahájena přidáním 60 µl koncentrované HCl a směs v mikrozkušných buňkách byla inkubována v termobloku 45 min při 45°C. Po uplynutí doby inkubace byly mikrozkušné buňky ochlazeny. Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 150 µl roztoku ve dvojnásobném opakování a byla změřena absorbance při 586 nm. Kalibrační křivka byla sestavena ze standardů malondialdehydu, který ve vodném prostředí poskytuje TEP, o koncentracích 0,1; 0,5; 1; 5; 10 a 20 µmol·l<sup>-1</sup>.

### 3.5.5 Nativní elektroforéza - detekce aktivity peroxidasy

#### 3.5.5.1 Příprava vzorků

Extrakce byla provedena přidáním extrakčního pufru k zamraženým zhomogenizovaným buňkám. Vzorky připravované pro detekci peroxidasy (POX) byly extrahovány v poměru 1:2 (w/v), vzorky připravované pro detekci APX byly extrahovány v poměru 1:1 (w/v). Pro extrakci byl použit 0,1 mol·l<sup>-1</sup> K-fosfátový pufr (pH 7,0) obsahující 2 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA-Na<sup>+</sup>, 1% PVPP, 2 mmol·l<sup>-1</sup> DTT a 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> Pefabloc. Vzorky byly ponechány 20 min na ledové lázni a v pravidelných intervalech promíchány na vortexu. Po uplynutí uvedené doby byly vzorky centrifugovány 15 min při 16 900 g. Supernatanty byly následně smíseny s 60% (v/v) glycerolem v poměru 3:1 a takto připravené vzorky byly uchovány na ledové lázni.

#### 3.5.5.2 Elektroforetická separace

Elektroforéza byla provedena v polyakrylamidových gelech v tenké vrstvě mezi dvěma skleněnými deskami ve vertikální poloze a v diskontinuálním uspořádání. Gely byly připraveny dle Tab. 8. Zaostřovací gel obsahoval 0,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris-chloridový (Tris/HCl) pufr (pH 6,8), zatímco dělicí gel obsahoval 1,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 8,8). Vodivé prostředí mezi elektrodami bylo zajištěno elektrodovým pufrem. Do krajních jamek gelu bylo aplikováno 15 µl roztoku bromfenolové modři, která indikovala pohyb čela dělicích se látek. Roztok bromfenolové modři byl připraven rozpuštěním 1 mg

bromfenolové modři v 5 ml dH<sub>2</sub>O a přidáním 2,5 ml 60% glycerolu. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí, které bylo nižší v zóně zaostřovacího gelu a zvýšilo se po doputování čela dělicích se látek na rozhraní zaostřovacího a dělicího. Elektroforetické dělení bylo ukončeno po doputování čela k dolnímu okraji skla.

Parametry nastavení elektroforetického dělení se lišily podle enzymu, který měl být v gelu následně detekován. Byly připraveny gely o rozdílné tloušťce, procentuálním obsahu AA/BIS a lišilo se i nastavení konstantního napětí (Tab. 9). Do jamek gelu o tloušťce 0,75/1 mm bylo aplikováno 15/25  $\mu$ l vzorku. Složení elektrodových pufrů je uvedeno v Tab. 10. Vzorky pro detekci enzymů s peroxidasovou aktivitou byly do jamek gelů nanášeny bezprostředně po sestavení elektroforetické aparatury a následně byla zahájena separace látek připojením ke zdroji konstantního napětí. Sestavená elektroforetická aparatura s gely pro detekci enzymů s askorbátperoxidasovou aktivitou byla připojena ke zdroji napětí (100 V) 30 min před aplikací vzorků, aby do gelů vstoupila kyselina askorbová z elektrodového pufru. Vlastní elektroforetická separace probíhala vždy při 4°C.

### 3.5.5.3 Detekce enzymů s peroxidasovou aktivitou

Po elektroforetické separaci byly gely na 5 min přeneseny do 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 7,0). Po uplynutí doby inkubace byly gely na 30 min přeneseny do barvicího roztoku, který byl připraven rozpuštěním 4 mg 4-chlor-1-naftolu v 2,5 ml ledově vychlazeném methanolu, přidáním 12,5 ml 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 7,0) a 20  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Angelini a Federico, 1989). Po vybarvení byly gely 3x promyty destilovanou vodou a zdokumentovány pomocí přístroje Gel Doc (BioRad, USA) v programu ImageLab. Densitometrické vyhodnocení bylo provedeno v programu UVP VisionWorksLS.

Tab. 8: Složení polyakrylamidového gelu.

gel (% T)	AA/BIS (T 30 %, C 2,67%)	0,5 mol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 6,8)	1,5 mol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 8,8)	H <sub>2</sub> O	TEMED	10% APS
4 %	1,3 ml	2,5 ml	-	5,9 ml	20 $\mu$ l	200 $\mu$ l
5 %	1,6 ml	2,5 ml	-	5,6 ml	20 $\mu$ l	200 $\mu$ l
8 %	2,6 ml	-	2,5 ml	4,6 ml	10 $\mu$ l	150 $\mu$ l
10 %	3,2 ml	-	2,5 ml	4,0 ml	10 $\mu$ l	150 $\mu$ l
14 %	4,5 ml	-	2,5 ml	2,7 ml	10 $\mu$ l	150 $\mu$ l

Tab. 9: Parametry elektroforetického dělení před detekcí aktivity POX a APX v gelech po nativní elektroforéze.

detekovaný enzym	tloušťka gelu	zaostřovací gel: složení / napětí na zdroji	dělicí gel: složení / napětí na zdroji
POX	0,75 mm	4% AA/BIS / 100 V	8% AA/BIS / 180 V
POX	1 mm	4 % AA/BIS / 100 V	10% AA/BIS / 180 V
APX	1 mm	5 % AA/BIS / 100 V	14% AA/BIS / 120 V

Tab. 10: Složení elektrodového pufru pro nativní elektroforézu.

detekovaný enzym	složení elektrodového pufru
POX	25 mmol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl, 192 mmol·l <sup>-1</sup> glycin
APX	25 mmol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl, 192 mmol·l <sup>-1</sup> glycin, 2 mmol·l <sup>-1</sup> kyselina askorbová

### 3.5.5.4 Detekce enzymů s askorbátperoxidasovou aktivitou

Po elektroforetické separaci byly gely inkubovány dle následujícího rozpisu (Tab. 11). Všechny inkubace probíhaly při laboratorní teplotě. Po vybarvení byly gely 3x promyty destilovanou vodou a zdokumentovány pomocí přístroje Gel Doc (BioRad, USA) v programu ImageLab. Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno v programu UVP VisionWorksLS.

## 3.5.6 Imunodetekce askorbátperoxidasy

### 3.5.6.1 Příprava vzorků

Extrakce vzorků byla provedena přidáním extrakčního pufru k zamraženým zhomogenizovaným buňkám v poměru 1:2 (w/v). Pro extrakci byl použit 0,1 mol·l<sup>-1</sup> K-fosfátový pufr (pH 7,0) obsahující 2 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA-Na<sup>+</sup>, 1% PVPP, 2 mmol·l<sup>-1</sup> DTT a 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> Pefabloc. Vzorky byly ponechány 20 min na ledové lázni a v pravidelných intervalech promíchány na vortexu. Po uplynutí uvedené doby byly vzorky centrifugovány 15 min při 16 900 g.

Do čistých plastových mikrozkušavek bylo napipetováno 20 µl supernatantu, 20 µl 10% SDS a 20 µl vzorkovacího pufru (125 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 6,8), 4% (w/v) dodecylsírán sodný (SDS), 20% (v/v) glycerol, 0,2 mol·l<sup>-1</sup> DTT, 0,02% (w/v) bromfenolová modř). Vzorky byly povařeny 5 min, ochlazeny na ledové lázni a centrifugovány 5 min při 6 000 g.

Tab. 11: Postup inkubace gelů po nativní elektroforéze pro detekci enzymů s askorbátperoxidaseovou aktivitou (upraveno podle Mittler a Zilinskas, 1993).

Doba inkubace	Roztok
30 min	50 mmol·l <sup>-1</sup> K-fosfátový pufr (pH 6), 2 mmol·l <sup>-1</sup> kyselina askorbová každých 10 min vyměněn za čerstvý
20 min	50 mmol·l <sup>-1</sup> K-fosfátový pufr (pH 6), 4 mmol·l <sup>-1</sup> kyselina askorbová, 2 mmol·l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
1 min	50 mmol·l <sup>-1</sup> K-fosfátový pufr (pH 6)
20 – 30 min	50 mmol·l <sup>-1</sup> K-fosfátový pufr (pH 7,8), 28 mmol·l <sup>-1</sup> TEMED, 2,45 mmol·l <sup>-1</sup> nitrotetrazoliová modř (NBT)

### 3.5.6.2 Elektroforetická separace

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přidavkem detergentu SDS je denaturační metodou diskontinuální elektroforézy sloužící k separaci proteinů dle jejich molekulové hmotnosti. SDS má záporný náboj, při vazbě na protein (1,4 g SDS : 1 g proteinu) mění jeho konformaci a vyrovnává rozdíly v nábojích proteinů, které se v gelu pohybují směrem od katody k anodě na základě jejich rozdílné velikosti.

Elektroforéza byla provedena v polyakrylamidových gelech s SDS v tenké vrstvě (1 mm) mezi dvěma skleněnými deskami ve vertikální poloze a v diskontinuálním uspořádání. Separace proteinů vzorků tabákových buněk v 4% zaostřovacím a 10% dělicím gelu s přidavkem 10% SDS. Zaostřovací gel obsahoval 0,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl pufr (pH 6,8), dělicí gel obsahoval 1,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 8,8) (Tab. 12).

Vodivé prostředí mezi elektrodami bylo zajištěno elektrodovým 125 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl pufrem (pH 8,3) obsahujícím 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycin a 0,1% (w/v) SDS. Do jamek gelu bylo aplikováno 20 μl vzorku. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 100 V v zóně zaostřovacího gelu a 200 V v zóně dělicího gelu. Elektroforetické dělení bylo ukončeno po doputování čela dělicích se látek k dolnímu okraji skla.

Tab. 12: Složení polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE elektroforézu.

gel (% T)	AA/BIS (T 30 %, C 2,67 %)	0,5 mol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 6,8)	1,5 mol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 8,8)	H <sub>2</sub> O	10% (w/v) SDS	TEMED	10% APS
4 %	1,3 ml	2,5 ml	-	6,1 ml	100 μl	20 μl	200 μl
10 %	3,3 ml	-	2,5 ml	4,1 ml	100 μl	10 μl	100 μl

### 3.5.6.3 Western blot a imunodetekce askorbátperoxidasy

Metoda Western blot slouží pro kvalitativní detekci proteinů nebo pro jejich semikvantitativní stanovení. Po separaci proteinů SDS-PAGE elektroforézou následuje jejich přenos na membránu z nitrocelulosity nebo polyvinylidendifluoridu (PVDF) působením elektrického proudu.

Proteiny z gelu po SDS-PAGE elektroforéze byly přeneseny na PVDF membránu v tankovém uspořádání Western blot metody. PVDF membrána byla před použitím ponořena na 5 min do methanolu. Gel se separovanými proteiny, filtrační papíry, membrána a porézní houbičky byly ponořeny na 30 min do blotovacího 25 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl pufru (pH 8,3) obsahujícího 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycin a 20% (v/v) methanol. Jednotlivé vrstvy byly do blotovací kazety naskládány v následujícím pořadí: černá deska kazety – porézní houbička – filtrační papír – gel – membrána – filtrační papír – porézní houbička – průsvitná deska kazety. Po vložení kazety do blotovací komůrky a přidání blotovacího pufru byl nastaven konstantní proud 0,8 mA·cm<sup>-1</sup> membrány a blotování probíhalo přes noc při 4°C. Po ukončení blotování byla membrána vyjmuta z kazety a byla detekována přítomnost APX (Tab. 13).

Po vybarvení byla membrána 3x promyta destilovanou vodou a zdokumentována pomocí přístroje Gel Doc (BioRad, USA) v programu ImageLab. Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno v programu UVP VisionWorksLS.

Tab. 13: Postup inkubace PVDF membrány pro detekci přítomnosti APX.

Doba inkubace	Roztok	Složení
2 h	5% BSA v TTBS	TTBS: 20 mmol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 7,5), 500 mmol·l <sup>-1</sup> NaCl, 0,1% Tween
3x 10 min přes noc	TTBS primární protilátka	králičí anti-APX; ředění 1 : 2 000 v 5% BSA v TTBS
3x 10 min 2 h	TTBS sekundární protilátka	protilátka proti králičím IgG značená alkalickou fosfatasou; ředění 1 : 5 000 v 5% BSA v TTBS
3x 10 min 5-20 min	TTBS barvicí roztok	10 ml AP pufru (100 mmol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 9), 150 mmol·l <sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·l <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> ) + 33 μl 10% NBT v 70% dimethylformamidu + 33 μl 5% BCIP v 100% dimethylformamidu
3x 10 min	destilovaná H <sub>2</sub> O	

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

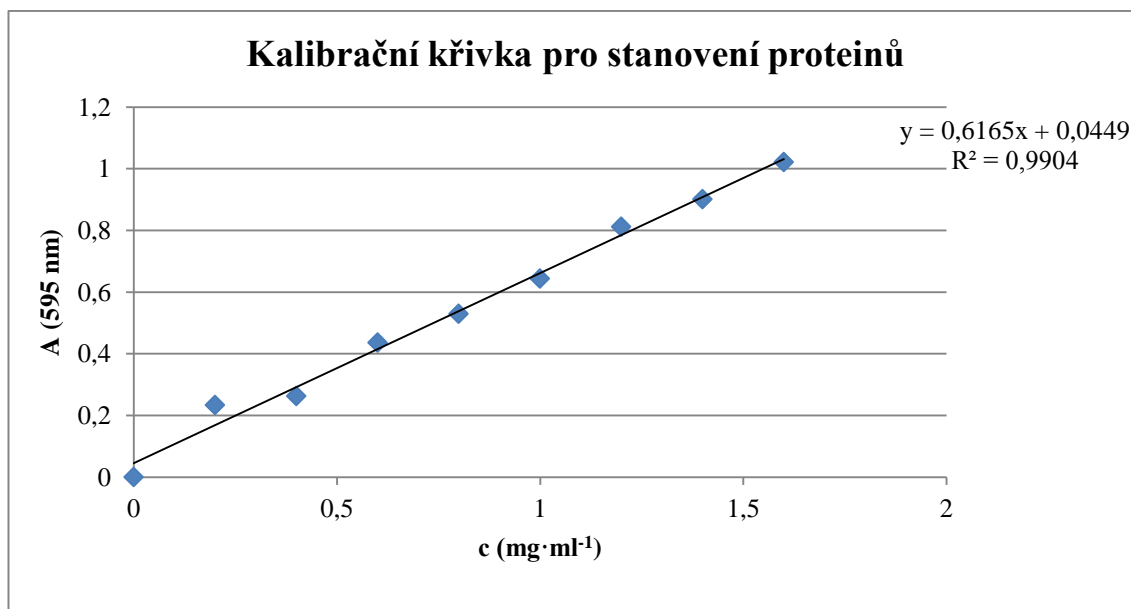
Hlavními cíly předložené bakalářské práce bylo studium a porovnání vlivu elicitinů infestinu a kryptogeinu a jejich mutantních forem na aktivity klíčových antioxidačních enzymů, celkové antioxidační kapacity a míry peroxidace lipidů. Po aplikaci kryptogeinu k suspenzní kultuře tabákových buněk dochází v rané fázi obranných mechanismů k fosforylaci proteinů, zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů, akumulaci ethylenu a kapsidiolu, zvýšené produkci oxidu dusnatého a ROS vlivem aktivace membránové NADPH oxidasy. (Blein *et al.*, 1991; Viard *et al.*, 1994; Rustérucci *et al.*, 1996; Osman *et al.*, 2001; Asai *et al.*, 2008; Dokládál *et al.*, 2012; Ptáčková *et al.*, 2015). Po aplikaci elicitinů byla pozorována alkalizace extracelulárního prostředí, což vede ke zvýšení aktivity NADPH oxidasy a k inkrustaci buněčné stěny  $\text{Ca}^{2+}$  ionty (Hahn, 1996; Ptáčková *et al.* 2015). Vzhledem k dvojí roli ROS, jejichž koncentrace po aplikaci elicitinů k tabákovým buňkám je významně zvýšená, je důležité regulovat jejich produkci a zhášení antioxidačními mechanismy tak, aby nebyly poškozeny komponenty rostlinné buňky. Častou odpovědí rostlin na působení stresových faktorů je produkce ROS a aktivace ochranného systému zahrnující enzymové i neenzymové antioxidanty (Das a Roychoudhury, 2014).

Do studie byly zařazeny vedle elicitinů infestinu a kryptogeinu i jejich mutantní formy. U kryptogeinu záměnou aminokyseliny lysinu na pozici 13 za valin je ovlivněna schopnost produkce ROS a s tím spojená schopnost indukce HR a tvorba nekrot. Mutace kryptogeinu K13V posouvá isoelektrický bod do kyselé oblasti. Naopak u infestinu při záměně valinu za lysin v poloze 13 jsou jeho účinky přiblíženy účinkům kryptogeinu. Po aplikaci INF V13K dochází k aktivaci produkce ROS a objevují se nekrotická místa (nepublikované výsledky Sedlář 2018). V práci byl použit dvojitý mutant INF V13K/A14T. Bylo prokázáno, že mutace v poloze 84 u kryptogeinu (X24 V84F) zvyšuje produkci ROS u rostlin tabáku (Dokládál *et al.*, 2012). Podobný efekt byl pozorován i v případě INF V84F u suspenzní kultury tabákových buněk (nepublikované výsledky Sedlář, 2018).



#### 4.1 Stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou

Kalibrační křivka pro stanovení celkových proteinů byla sestrojena pomocí standardů BSA v rozmezí  $0,2 - 1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Obr. 17). Rovnice regresní přímky byla použita pro výpočet koncentrace celkových proteinů ve vzorcích tabákových buněk.



Obr. 17: Kalibrační křivka pro stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou. Graf znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 595 nm na koncentraci kalibračních standardů BSA.

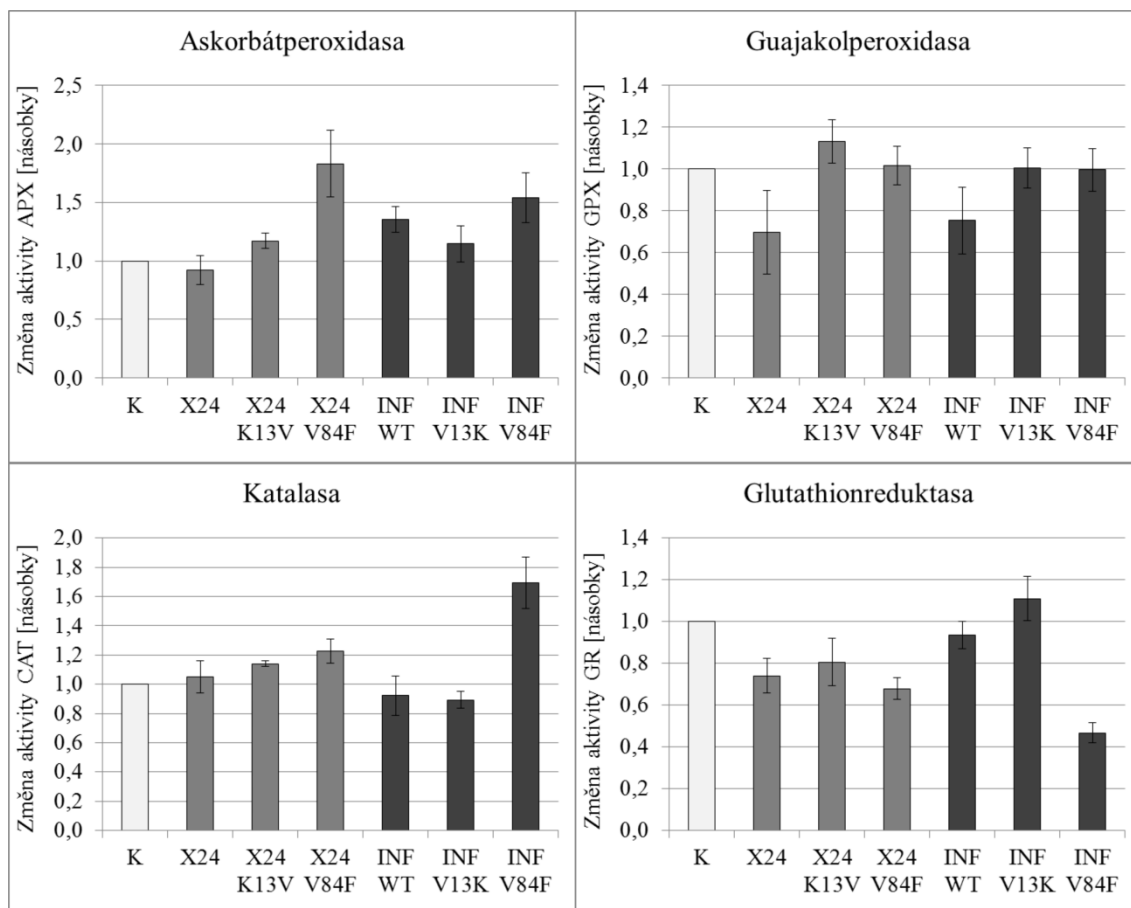
## 4.2 Vliv elicitinů na aktivitu antioxidantních enzymů tabákových buněk

Prvním dílčím úkolem bakalářské práce bylo studium vlivu elicitinů na aktivitu enzymů askorbátperoxidasy, guajakolperoxidasy, katalasy a glutathionreduktasy, které se podílí na antioxidantní ochraně buněk. Aktivita všech studovaných enzymů byla stanovena spektrofotometrickými metodami a vliv elicitinů (Obr. 18) byl vyjádřen jako násobky specifické aktivity kontrolních vzorků (Tab. 14), ke kterým nebyly aplikovány elicitiny.

APX je jedním z klíčových enzymů askorbát-glutathion-tokoferolového cyklu (Szarka *et al.*, 2012), který se podílí na detoxikaci ROS. Po aplikaci kryptogeinu nebyla zaznamenána změna aktivity tohoto enzymu narozdíl od efektu infestinu, kdy došlo k navýšení aktivity APX. Dále byl sledován vliv mutace aminokyseliny na pozici 13, která je zapojena do nekrotických účinků elicitinů. Efekt mutace kryptogeinu v poloze 13 i infestinu byl srovnatelný, byla detekována mírně zvýšená aktivita APX. U mutantu kryptogeinu K13V, u kterého mutace posouvá isoelektrický bod do kyselé oblasti a přibližuje kryptogein účinkům infestinu, došlo k nárůstu APX aktivity v porovnání s efektem kryptogeinu a naopak APX aktivita po aplikaci infestinu s mutací v poloze 13 byla nižší než v případě aplikace infestinu. V případě mutantů infestinu i kryptogeinu V84F, kdy byla prokázána zvýšená schopnost aktivace produkce ROS (Dokládál *et al.*, 2012; Ptáčková *et al.*, 2015; nepublikované výsledky Sedlář 2018), jsme detekovali významně zvýšenou APX aktivitu.

Tab. 14: Specifická aktivita antioxidantních enzymů kontrolních neelicitovaných vzorků.

enzym	aktivita
GPX	2,387 $\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1} \pm 0,114$
APX	139,487 $\text{ngat}\cdot\text{mg}^{-1} \pm 22,069$
CAT	133,343 $\text{ngat}\cdot\text{mg}^{-1} \pm 23,222$
GR	0,187 $\text{ngat}\cdot\text{mg}^{-1} \pm 0,017$



Obr. 18: Porovnání vlivu elicitinů na aktivitu antioxidantních enzymů - askorbátperoxidasy (APX), guajakolperoxidasy (GPX), katalasy (CAT) a glutathionreduktasy (GR). Specifická aktivita enzymů v elicitovaných vzorcích je vyjádřena relativně jako násobky kontrolního vzorku, který nebyl elicítován. V práci byl použit dvojitý mutant INF V13K/A14T - v grafu je z důvodu přehlednosti uvedena pouze mutace v poloze 13.

Dalším měřeným enzymem byla guajakolperoxidasa (GPX). Po aplikaci kryptogeinu i infestinu došlo k výraznému snížení aktivity GPX. U mutantu X24 K13V byl detekován mírný nárůst aktivity GPX vůči kontrolnímu vzorku. Aktivita GPX po elicítaci mutantu X24 V84F, INF V13K a INF V84F nebyla výrazně ovlivněna.

Katalasa (CAT) je antioxidantní enzym, který se podílí na detoxikaci ROS převážně v peroxisomech (Mittler, 2002). Na aktivitu CAT nebyl prokázán statisticky významný efekt kryptogeinu i infestinu. Vlivem aplikace mutantu X24 K13V došlo k mírnému nárůstu aktivity CAT v porovnání s kontrolním experimentem, aplikace mutantní formy INF V13K naopak CAT aktivitu mírně snížila. Působením mutantů X24 V84F a zejména INF V84F došlo k nárůstu aktivity CAT.

Posledním stanovovaným antioxidantním enzymem byla glutathionreduktasa (GR), která je zapojena v askorbát-glutathionovém cyklu (Zsigmond *et al.*, 2011). Je zajímavé,

že po aplikaci studovaných elicitinů a jejich mutantních forem s výjimkou INF V13K byla aktivita oproti kontrolnímu vzorku snížena. Nejvýraznější pokles GR aktivity byl detekován po aplikaci elicitinů s mutací v poloze 84 a to zejména u mutantní formy infestinu. Po aplikaci mutantu INF V13K došlo k nárůstu aktivity vůči kontrolnímu vzorku.

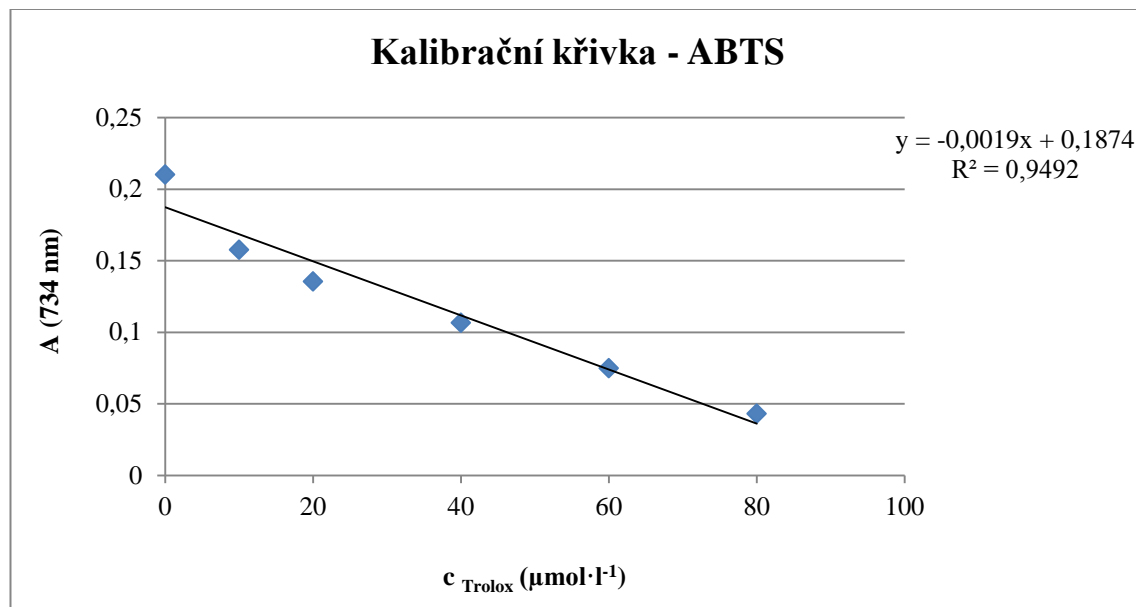
Zajímavý je rozdílný efekt elicitace tabákových buněk na aktivitu askorbátperoxidasy a glutathionreduktasy, kdy v případě APX byla detekována významně zvýšená aktivita a naopak v případě GPX byl většinou pozorován pokles aktivity tohoto enzymu. Nejvýznamnější změny v případě obou enzymů byly zaznamenány po aplikaci elicitinů s mutací v poloze 84. Zde je možné poukázat na souvislost změny aminokyseliny v pozici 84 (V84F) ve struktuře elicitinů se schopností aktivovat tvorbu reaktivních forem kyslíku tabákovými buňkami.

### **4.3 Vliv elicitinů na antioxidační kapacitu tabákových buněk**

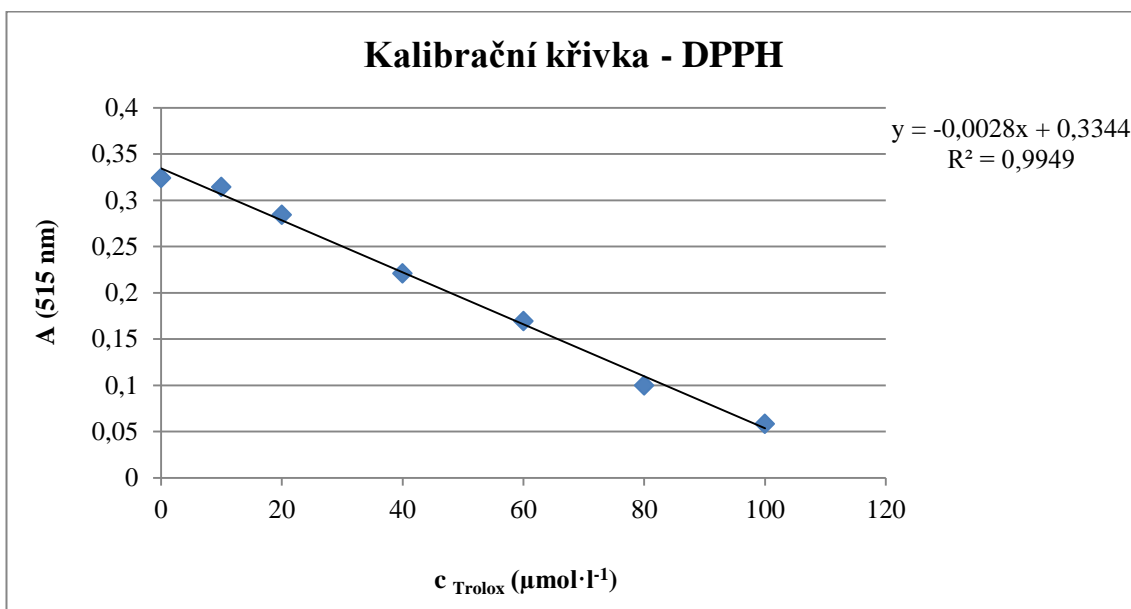
Pro stanovení antioxidační kapacity byly vybrány spektrofotometrické metody využívající kation-radikál ABTS a radikál DPPH. Při stanovení antioxidační kapacity metodou využívající ABTS je sledován úbytek modrozeleného zbarvení při 734 nm. Metodou využívající DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) se spektrofotometricky stanovuje antioxidační kapacita monitorováním změny fialového zbarvení ve žluté (viz kapitola 3.5 Experimentální metody). Pro obě metody byly sestaveny kalibrační křivky (Obr. 19 a Obr. 20) pomocí standardů syntetického antioxidantu Troloxu, pro metodu ABTS v rozmezí 10-80  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a pro metodu DPPH v rozmezí 10-100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Rovnice regresních přímek byly použity pro výpočet koncentrace ekvivalentů antioxidační kapacity syntetické látky Troloxu ve vzorcích tabákových buněk, které byly následně vztaheny na gram čerstvé váhy. Antioxidační kapacita elicitovalých vzorků byla porovnána relativně vůči kontrolnímu vzorku.

Antioxidační kapacita tabákových buněk měřená metodou ABTS (Obr. 21) byla po aplikaci elicitinů infestinu a kryptogeinu a jejich mutantních forem (mutace na pozici 13 a 84) v porovnání s antioxidační kapacitou kontrolních tabákových buněk mírně zvýšená. Výjimkou byl elicitin X24 V84F, u kterého došlo k snížení celkové antioxidační kapacity. Průměrná koncentrace ekvivalentů Troloxu v kontrolních neelicitovaných vzorcích byla 2,454  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé váhy.

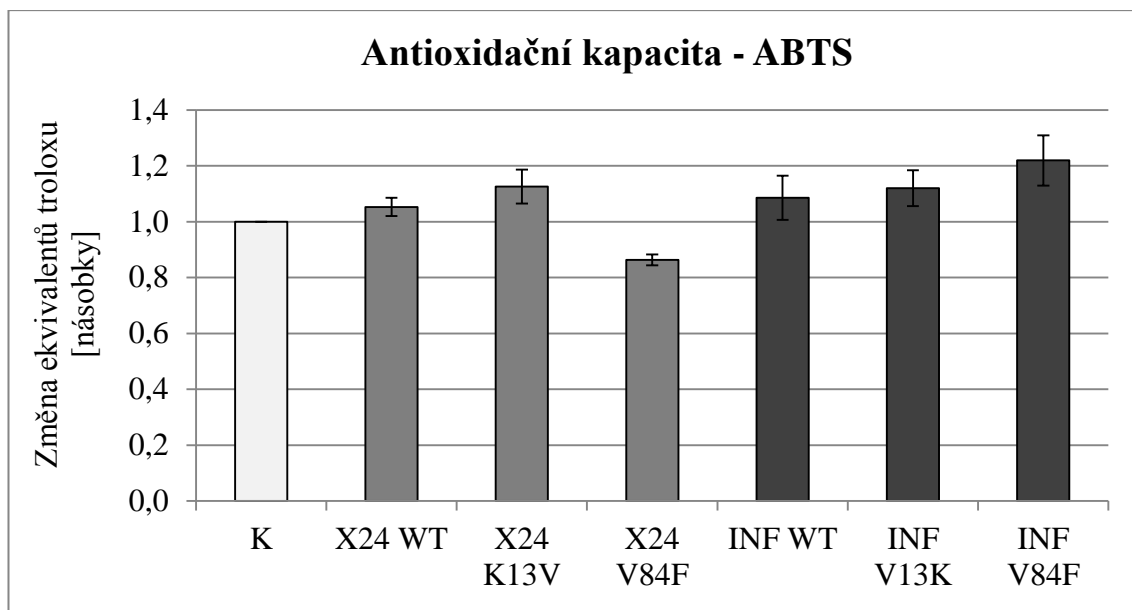
Metodou využívající DPPH se antioxidační kapacitu tabákových buněk nepodařilo stanovit. Během inkubace se v jamkách mikrotitrační destičky tvořil zákal a metoda nebyla reprodukovatelná. Pro měření reálných vzorků bude nutná další optimalizace.



Obr. 19: Kalibrační křivka pro stanovení celkové antioxidační kapacity tabákových buněk metodou využívající ABTS. Graf znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 734 nm na koncentraci kalibračních standardů Troloxu.



Obr. 20: Kalibrační křivka pro stanovení celkové antioxidační kapacity tabákových buněk metodou využívající DPPH. Graf znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 515 nm na koncentraci kalibračních standardů Troloxu.



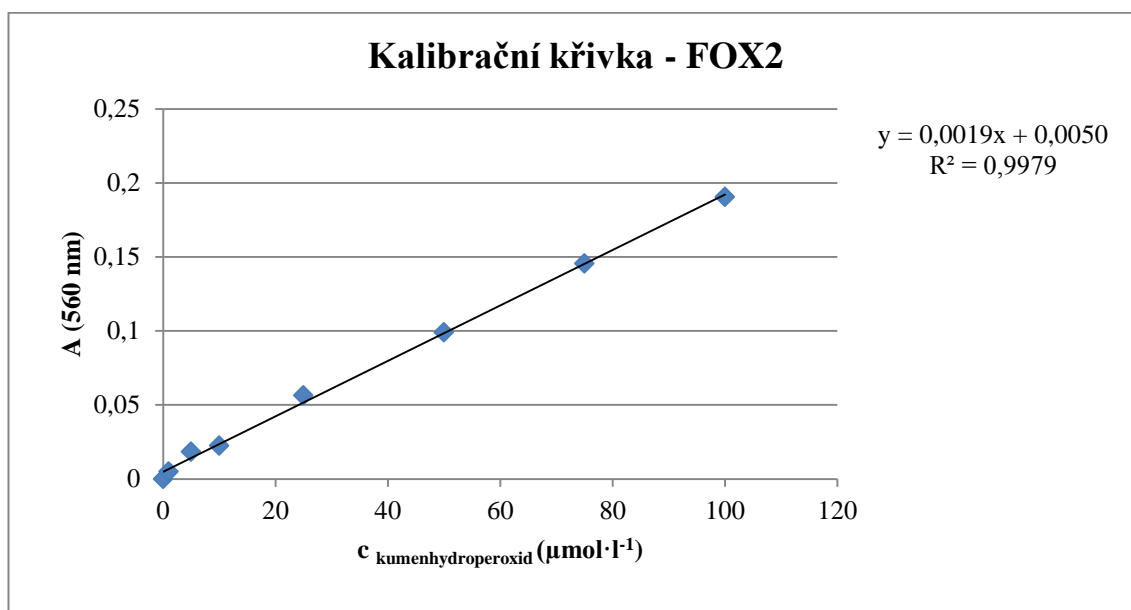
Obr. 21: Porovnání vlivu elicitinů na antioxidační kapacitu metodou ABTS. V práci byl použit dvojitý mutant INF V13K/A14T - v grafu je z důvodů přehlednosti uvedena pouze mutace v poloze 13.

#### 4.4 Vliv elicitinů na míru peroxidace lipidů v tabákových buňkách

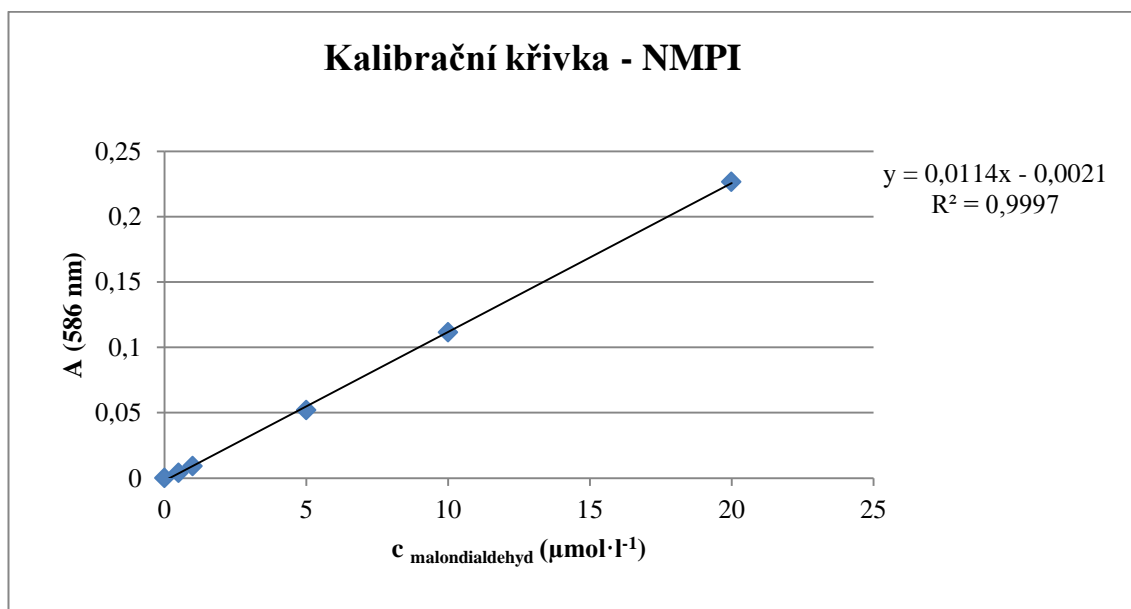
Se zvýšenou produkcí ROS po aplikaci elicitinů k suspenzní kultuře tabákových buněk se zvyšuje pravděpodobnost peroxidace lipidů, která může vést k narušení buněčných membrán a následně k dysfunkci buňky (Kühn a Borchert, 2002). Peroxidace lipidů je chemický proces, při kterém jsou oxidačně poškozeny polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) lipidů biologických membrán vlivem ROS za přítomnosti stopového množství iontů kovů (Esterbauer et al., 1991; Jones, 2008). Citlivost k oxidačnímu poškození je přímo úměrná počtu dvojných vazeb v molekule mastné kyseliny (Wagner et al., 1994). Vznikající primární produkty jsou hydroperoxyd mastných kyselin, které se dále mohou přeměňovat na vysoce reaktivní sekundární produkty (aldehydy), jež poškozují strukturu dalších biomakromolekul (Siems a Grune, 2003). Pro detekci intenzity peroxidace lipidů po elicitaci tabákových buněk byly testované dvě metody (FOX2 a metoda využívající NMPI).

Kalibrační křivka pro stanovení primárních produktů peroxidace lipidů metodou FOX2 (Obr. 22) byla sestavena pomocí standardů kumenhydroperoxidu v rozmezí 1 - 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Kalibrační křivka pro stanovení sekundárních produktů metodou využívající NMPI (Obr. 23) byla sestavena pomocí standardů malondialdehydu, který poskytuje 1,1,3,3-tetraethoxypropan (TEP) ve vodném prostředí, v rozmezí

0,1 - 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Rovnice regresních přímek byly použity pro výpočet koncentrace produktů peroxidace lipidů, ve vzorcích tabákových buněk.



Obr. 22: Kalibrační křivka pro stanovení primárních produktů peroxidace lipidů metodou FOX2. Graf znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 560 nm na koncentraci kalibračních standardů kumenhydroperoxidu.

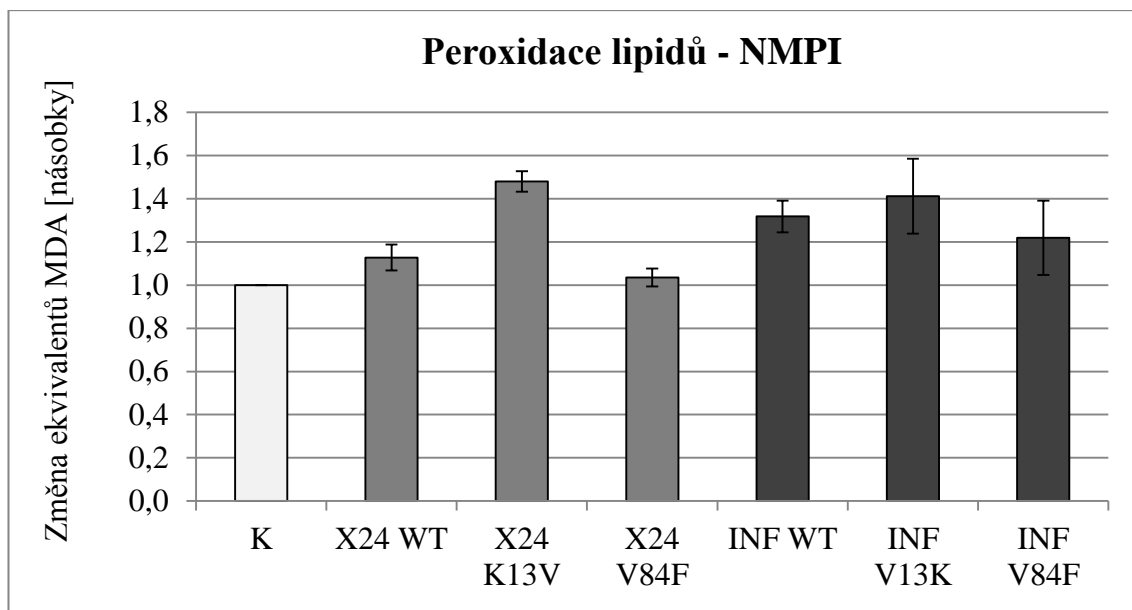


Obr. 23: Kalibrační křivka pro stanovení sekundárních produktů peroxidace lipidů metodou NMPI. Graf znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 586 nm na koncentraci kalibračních standardů malondialdehydu.

Primární produkty peroxidace lipidů metodou FOX2 nebylo možné ve vzorcích tabákových buněk stanovit. Je možné, že jejich obsah byl nižší, než je limit detekce této metody.

Pro sledování vlivu elicitinů na peroxidaci lipidů prostřednictvím sekundárních produktů byla vybrána metoda využívající chromogenní činidlo N-methyl-2-fenylindol. Výsledky měření (Obr. 24) byly vztaženy na standard malondialdehydu a byly vyjádřeny relativně vůči kontrolnímu vzorku. Průměrná koncentrace MDA v kontrolních vzorcích, které nebyly elicítovány, byla  $7,663 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z výsledků je možné usoudit, že působením elicitinů dochází ve větší míře k peroxidaci lipidů. Zvýšená míra peroxidace lipidů po elicítaci tabákových buněk byla zjištěna i v práci Ptáčková *et al.* (2015). Zajímavým zjištěním je, že největší změny v peroxidaci lipidů oproti kontrolnímu vzorku byly pozorovány u elicitinů X24 K13V a INF V13K, zatímco největší schopnost produkce ROS byla detekována po aplikaci mutantní formy elicitinu v poloze 84 (Dokládál *et al.*, 2012; nepublikované výsledky Sedlář, 2018). Otázkou je vzájemné propojení procesů odehrávajících se po elicítaci ve spojení schopnosti aktivovat produkci ROS, následně aktivovat signální dráhy vedoucí k expresi obranných genů, mezi které patří i antioxidantní enzymy, což se může projevit v intenzitě peroxidace lipidů. Jako příklad může být uvedeno působení kryptogeinu s mutací v poloze 84, který významně ovlivňuje produkci ROS a následně dochází k aktivaci APX, klíčového enzymu v antioxidantním systému rostlin. To může být důvodem potlačení peroxidace lipidů v prostředí, kde dochází po elicítaci k intenzivní produkci ROS. Je samozřejmé, že obranný mechanismus rostlin aktivovaný elicítiny je tvořen komplexním systémem reakcí, které se mohou vzájemně doplňovat či ovlivňovat. Předložené výsledky dokumentují jen dílčí reakce tabákových buněk na stres vyvolaný působením elicitinů.





Obr. 24: Porovnání vlivu elicitinu na peroxidaci lipidů prostřednictvím sekundárních produktů. V práci byl použit dvojitý mutant INF V13K/A14T - v grafu je z důvodu přehlednosti uvedena pouze mutace v poloze 13.

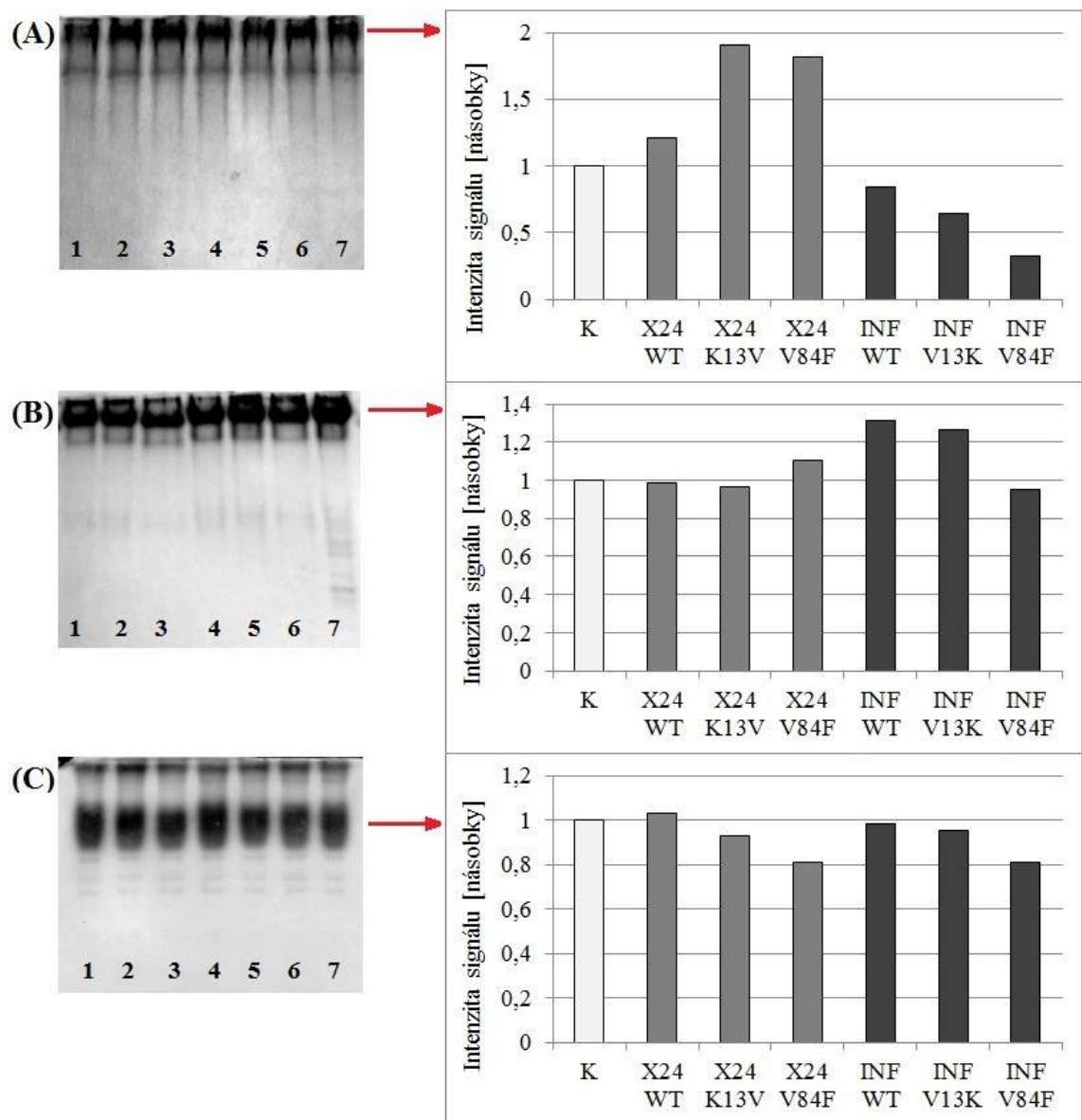
## 4.5 Detekce antioxidačních enzymů

### 4.5.1 Detekce aktivity peroxidas v gelu po nativní elektroforéze

Vliv elicitinů na enzymy s peroxidasovou a askorbátperoxidasovou aktivitou byl kromě spektrofotometrických metod sledován i v gelech po elektroforetické separaci za nativních podmínek. Peroxidasová aktivita byla detekována barvicí směsí obsahující 4-chloro-1-naftol, askorbátperoxidasová aktivita byla detekována barvicí směsí s nitrotetrazoliovou modří. Gely byly následně denzitometricky vyhodnoceny, jako ukazatel intenzity signálu byla vybrána plocha bandu v denzitometrickém záznamu. Výsledky těchto experimentů jsou pouze orientační, protože doposud nebyly potvrzeny opakováním experimentů.

Peroxidasová aktivita byla detekována v 8%/10% dělicím gelu o tloušťce 0,75/1 mm. V gelu o tloušťce 1 mm byly detekovány 3 isoenzymy peroxidas, zatímco v gelu o tloušťce 0,75 mm byly detekovány pouze 2 isoenzymy (Obr 25 (A), (B)). Pro denzitometrické vyhodnocení byla z obou gelů vybrána nejintenzivněji zastoupená isoforma POX.

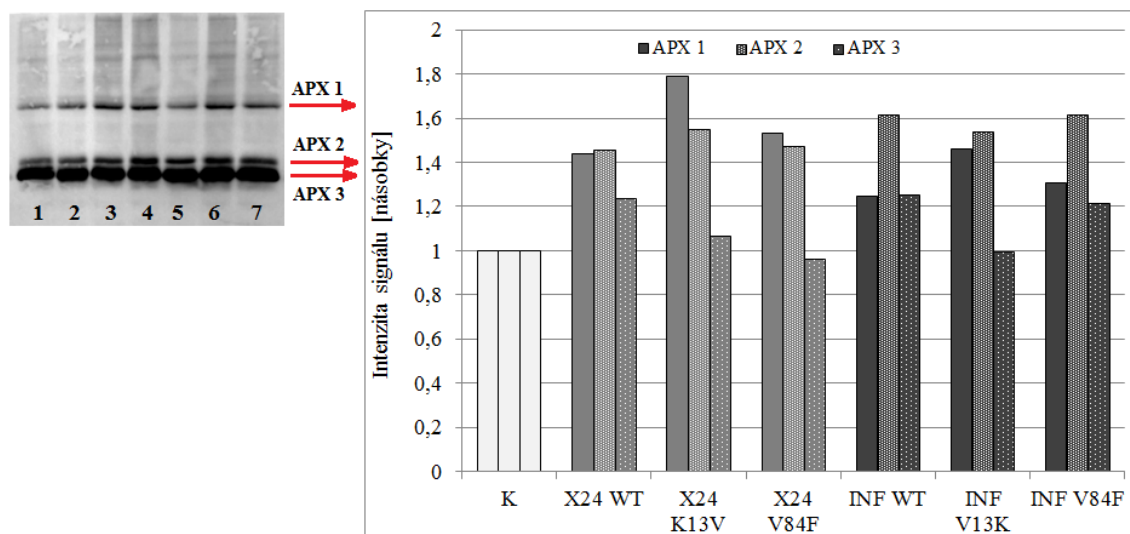
Askorbátperoxidasová aktivita byla detekována v 14% dělicím gelu (Obr. 25 (C)). Ve všech vzorcích bylo detekováno 5 isoenzymů. Další optimalizace metody bude zaměřena na nastavení takových parametrů elektroforézy, aby byly jednotlivé isoenzymy dobře rozdělené a zaostřené.



Obr. 25: Detekce aktivity POX a APX v gelu po nativní elektroforéze. (A) aktivita POX, 8% dělicí gel, tloušťka 0,75 mm; (B) aktivita POX, 10% dělicí gel, tloušťka 1 mm; (C) aktivita APX, 14% dělicí gel, tloušťka 1 mm. 1- Kontrola, 2 - X24 WT, 3 - X24 K13V, 4 - X24 V84F, 5 - INF WT, 6 - INF V13K/A14T, 7 - INF V84F. V práci byl použit dvojitý mutant INF V13K/A14T v grafu je z důvodů přehlednosti uvedena pouze mutace v poloze 13. Denzitometrické vyhodnocení intenzity signálu vybraných izoenzymů.

#### 4.5.2 Imunodetekce askorbátperoxidasy

Enzym askorbátperoxidasa byl dále detekován imunochemicky na PVDF membráně po proběhnuté SDS-PAGE elektroforéze a Western blotu (Obr. 26). PVDF membrána byla denzitometricky vyhodnocena, jako ukazatel intenzity singálu byla použita plocha bandu jednotlivých isoenzymů v denzitometrickém záznamu. U jednotlivých vzorků bylo detekováno 5-7 dobře rozlišitelných isoform. U infestinu a jeho mutantních forem intenzita signálu pro isoformu 3 koreluje s výsledky získanými spektrofotometrickým měřením.



Obr. 26: Imunodetekce isoenzymů APX. 1 - Kontrola, 2 - X24 WT, 3 - X24 K13V, 4 - X24 V84F, 5 - INF WT, 6 - INF V13K/A14T, 7 - INF V84F. Denzitometrické vyhodnocení intenzity signálu vybraných isoenzymů.

## 5 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše zaměřená na problematiku týkající se obranných reakcí rostlin při jejich interakci s patogenem, elicitinů, antioxidační ochrany rostlin a peroxidace lipidů.

V experimentální části bakalářské práce byl připraven biologický materiál, suspenzní kultura tabákových buněk *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. Byla optimalizována řada metod pro realizaci na daném biologickém materiálu:

- spektrofotometrické metody pro stanovení aktivity antioxidačních enzymů askorbátperoxidasy, guajakolperoxidasy, katalasy a glutathionreduktasy;
- spektrofotometrická metoda využívající radikál ABTS<sup>•+</sup> ke stanovení celkové antioxidační kapacity buněk;
- spektrofotometrická metoda využívající NMPI pro detekci sekundárních produktů peroxidace lipidů.

V rámci bakalářské práce byly realizovány i další metody, z časových důvodů se jednalo zatím o první orientační experimenty. Jedná se o metody:

- diskontinuální nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s následnou detekcí enzymové aktivity;
- diskontinuální elektroforéza v denaturujícím prostředí v polyakrylamidovém gelu, Western blot v tankovém uspořádání a imunochemická detekce.

Hlavním výstupem experimentální práce bylo stanovení a porovnání vlivu elicitinů kryptogeinu a infestinu a jejich mutantních forem v polohách 13 a 84 na aktivitu antioxidačních enzymů, celkovou antioxidační kapacitu buněk a míru peroxidace lipidů. Z předložených výsledků je zřejmé, že:

- Aplikace elicitinů X24 a INF nemá významný efekt na aktivaci antioxidačních enzymů APX, GPX a CAT. Pouze aplikace INF významněji zvýšila aktivitu APX. Tyto informace korelují s malými změnami v celkové antioxidační kapacitě a se zvýšenou peroxidací lipidů. Otázkou je detekovaná zvýšená míra peroxidace lipidů po aplikaci INF v porovnání s X24, pro který je charakteristická aktivace intenzivní produkce ROS.
- Mutace v poloze 84 u obou elicitinů (X24 i INF) významně zvýšila schopnost elicitinů aktivovat APX a CAT. S tím může být spojena nižší detekovaná peroxidace lipidů v porovnání s efektem X24 a INF. V případě mutace v poloze

84 u INF s výsledky stanovení změn aktivity antioxidantních enzymů koreluje zvýšená antioxidantní kapacita. Otázkou zůstává detekované téměř 20% snížení antioxidantní kapacity po aplikaci X24 V84F v porovnání s kontrolními buňkami. Tento rozporuplný výsledek bude nutné ověřit.

- Mutace v poloze 13 zejména u INF minimálně ovlivnila aktivitu APX, GPX a CAT. V případě X24 K13V bylo detekováno mírné zvýšení aktivity antioxidantních enzymů. Tyto výsledky korelují s největší intenzitou peroxidace lipidů pozorované po aplikaci elicitinů s mutací v poloze 13.
- Obranný mechanismus rostlin je obecně tvořen komplexním systémem vzájemně se ovlivňujících reakcí a předložené výsledky tak popisují pouze dílčí události, které jsou v tabákových buňkách vyvolány po aplikaci elicitinů.

## 6 LITERATURA

- Aebi H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.
- Agrios G. N. (2005): *Plant pathology*. 5th ed., Elsevier Academic Press, Boston, USA, 922 stran.
- Akram N. A., Shafiq F., Ashraf M. (2017): Ascorbic acid - a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1-17.
- Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1331-1341
- Angelini R., Federico R. (1989): Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *Journal of Plant Physiology* **135**, 212-217.
- Angelova Z., Georgiev Z., Roos W. (2006): Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **20**, 72-82.
- Arnao M. B., Cano A., Acosta M. (1999): Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Research* **31**, 89-96.
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H. (2008): MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell* **20**, 1390-1406.
- Barth C., De Tullio M., Conklin P. L. (2006): The role of ascorbic acid in the control of flowering time and onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1657-1665.
- Blein J.-P., Coutos-Thévenot P., Marion D., Ponchet M. (2002): From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in plant science* **7**, 293-296.
- Blein J.-P., Milat M. L., Ricci P. (1991): Responses of cultured tobacco cells to cryptogin, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*, *Plant physiology* **95**, 486-491.
- Boissy G., de La Fortelle E., Kahn R., Huet J. C., Bricogne, Pernollet J. C., Brunie S. (1996): Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* **4**, 1429-1439.
- Bourgis F., Roje S., Nuccio M. L., Fisher D. B., Tarczynski M. C., Li Ch., Herschbach C., Rennenberg H., Pimenta M. J., Shen T.-L., Gage D. A., Hanson A. D. (1999): S-methylmethionine plays a major role in phloem sulphur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *The Plant Cell* **11**, 1485-1497.
- Bourque S., Ponchet M., Binet M.-N., Ricci P., Pugin A., Lebrun-Garcia A. (1998): Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. *Plant Physiology* **4**, 1317-1326.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Catalá A. (2006): An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, 1482-1495.
- Cobbett C., Goldsborough P. (2002): Phytochelatins and metallothioneins: role in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 159-182.
- Collakova E., DellaPenna D. (2003): Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**, 632-642.
- Cormack R. S., Eulgem T., Rushton P. J., Köchner P., Hahlbrock K., Somssich I. E. (2002): Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochimie et biophysica acta* **1576**, 92-100.
- Costet L., Cordelier S., Dorey S., Baillieul F., Fritig B., Kauffmann S. (1999): Relationship between localized acquired resistance (LAR) and hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **12**, 655-662.
- Das K., Roychoudhury A. (2014): Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* **2**, 1-13.

- Deorge D. R., Divi R. L., Churchwell M. I. (1997): Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidase. *Analytical Biochemistry* **250**, 10-17.
- Derevnina L., Dagdas Y. F., de la Concepcion J. C., Bialas A., Kellner R., Petre B., Domazakis E., Du J., Wu C. H., Lin X., Aguilera-Galvez C., Cruz-Mireles N., Vleeshouwers V. G., Kamoun S. (2016): Nine things to know about elicitors. *New Phytologist* **212**, 888-895.
- Devine P. J., Perreault S. D., Luderer U. (2012): Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biology of Reproduction* **86**, 1-10.
- Dixon D. P., Edwards R. (2010): Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 36322-36329.
- Dobeš P., Kmuníček J., Mikes V., Damborský J. (2004): Binding of fatty acids to  $\beta$ -cryptogein: Quantitative structure–activity relationships and design of selective protein mutants. *Journal of Chemical Information and Modeling* **44**, 2126-2132.
- Dokládál L., Obořil M., Stejskal K., Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J. (2012): Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2203-2215.
- Du Z., Bramlage W. J. (1992): Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1566-1570.
- Durrant W. E., Dong X. (2004): Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 185-209.
- Edwards E. A., Rawsthorne S., Mullineaux P. M. (1990): Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisium sativum* L.). *Planta* **180**, 278-284.
- Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine* **11**, 81-128.
- Fahrenholtz S. R., Doleiden F. H., Trozzolo A. M., Lamolo A. A. (1974): On the quenching of singlet oxygen by alpha-tocopherol. *Photochemistry and Photobiology* **20**, 505-509.
- Fefe S., Bouaziz S., Huet J. C., Pernollet J. C., Guittet E. (1997): Three-dimensional solution structure of  $\beta$  cryptogein, a  $\beta$  elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein science* **6**, 2279-2284.
- Foissner I., Wendehenne D., Langebartels Ch., Durner J (2000): *In vivo* imaging of elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *The Plant Journal* **23**, 817-824.
- Foyer C. H., Noctor G. (2005): Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological response. *The Plant Cell* **17**, 1866-1875.
- Foyer C. H., Halliwell B. (1976): The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25.
- Foyer C. H., Lopez-Delgado H., Dat J. F., Scott I. M. (1997): Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, **100**, 241-254.
- Frébert I., Adachi O. (1995): Copper/quinone-containing amine oxidases, an exciting class of ubiquitous enzymes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 625-632.
- Fricker M. D., May M., Meyer A. J., Sheard N., White N. S. (2000): Measurement of glutathione levels in intact roots of *Arabidopsis*. *Journal of Microscopy* **198**, 162-173.
- Fritsche S., Wang X., Jung Ch. (2017): Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: an overview of key genes, functions, and breeding of vitamin E improved crops. *Antioxidants* **6**, 1-18.
- Fritz K. S., Petersen D. R. (2013): An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine* **59**, 85-91.
- Fryer, M.J. (1992): The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant, Cell & Environment* **15**, 381-392.
- Galiana E., Bonnet P., Conrod S., Keller H., Panabières F., Ponchet M., Poupet A., Ricci P. (1997): RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and

- increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant Physiology* **115**, 1557-1567.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourgue S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006): Early signaling events induced by elicitor of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **19**, 711-724
- Gérard-Monnier D., Erdelmeier I., Régnard K., Moze-Henry N., Yadan J. C., Chaudière J. (1998): Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology* **11**, 1176-1183.
- Girotti A. W. (1985): Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radical in Biology & Medicine* **1**, 87-95.
- Griffiths G., Leverenz M., Silkowski H, Gill N., Sánchez-Serrano J. J. (2000): Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1363-1370.
- Guichardant M., Valette-Talbi L., Cavadini C., Crozier G., Berger M. (1994): Malondialdehyde measurement in urine. *Journal of Chromatography, B. Biomedical Applications* **665**, 112-116.
- Hahn M. G. (1996): Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 387-412.
- Hammond-Kosack K. E., Jones J. D. G. (1996): Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* **8**, 1773-1791.
- Heath R. L., Packer L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 189-198.
- Hendrix J. W., Guttman S. M. (1970): Sterol or calcium requirement by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for growth on nitrate nitrogen. *Mycologia* **62**, 195-198.
- Hirasawa K- I., Amano T., Shioi Y. (2004): Lipid-binding form is a key conformation to induce a programmed cell death initiated in tobacco BY-2 cells by a proteinaceous elicitor of cryptogein. *Physiologia Plantarum* **121**, 196-203.
- Hirasawa K- I., Amano T., Shioi Y. (2005): Effects of scavengers for active oxygen species on cell death by cryptogein. *Phytochemistry* **66**, 463-468.
- Hodges D. M., DeLong J. M., Forney Ch. F., Prange R. K. (1999): Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**, 604-611.
- Horton P., Ruban A. (2005): Molecular design of photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* **56**, 365-373.
- Cheeseman K. H. (1993): Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molecular Aspects of Medicine* **14**, 191-197.
- Chotimarkorn C., Nagasaka R., Ushio H., Ohshima T., Matsunaga S. (2005): Development of novel fluorescent probe 3-perylene diphenylphosphine for determination of lipid hydroperoxide with fluorescent image analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 1222-1228.
- Jiménez A., Hernández J. A., del Río L. A., Sevilla F. (1997): Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* **114**, 275-284.
- Jones D. P. (2008): Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **295**, C849-C868.
- Kamoun S., Lindqvist H., Govers F. (1997): A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **10**, 1028-1030.
- Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshioka H., Kamoun S., Takahashi H. (2009): INF1 elicitor activates jasmonic acid- and ethylene-mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato. *Journal of Phytopathology* **157**, 287-297.
- Kitagawa Y., Tsunasawa S., Tanaka N., Katsube Y. Sakiyama F., Asada K. (1986): Amino acid sequence of copper, zinc-superoxide dismutase from spinach leaves. *Journal of Biochemistry* **99**, 1289-1298.



- Kuban R. J., Wiesner R., Rathman J., Veldink G., Nolting H., Solé V. A., Kühn H. (1998): The iron ligand sphere geometry of mammalian 15-lipoxygenases. *The Biochemical Journal* **332**, 237-242.
- Kühn H., Borchert A. (2002): Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Biology & Medicine* **33**, 154-172.
- Kuźniak E., Sklodowska A. (2005): Fungal pathogen-induced changes in antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* **222**, 192-200.
- Lamb C., Dixon R. A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 251-275.
- 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 in tobacco. *Biochimie* **81**, 663-668.
- Lecourieux D., Mazars Ch., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A. (2002): Analysis and effects of cytosolic increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *The Plant Cell* **14**, 2627-2641.
- Lichtenhaler H. K., Prenzel U., Douce R., Joyard J. (1981): Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. *Biochimie et Biophysica Acta* **641**, 99-105.
- 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 to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry* **44**, 6565-6572.
- Matoušková M., Ruttkay-Nedecký B., Kizek R. (2014): Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* **3**, 53-56.
- Mauch-Mani B., Métraux J. P. (1998): Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* **82**, 535-540.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. (2010): Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4197-4220.
- Mikes V., Milat M.-L., Ponchet M., Panabières F., Ricci P., Blein J.-P. (1998): Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 133-139.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Mittler R. (2017): ROS are good. *Trends in Plant Science* **22**, 11-19.
- Mittler R., Zilinskas B. A. (1993): Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry* **212**, 540-546.
- Montesano M., Brader G., Palva E. T. (2003): Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular plant pathology* **4**, 73-79.
- Morel J.-B., Dangl J. L. (1997): The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation* **4**, 671-683.
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2002): Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants. *FEBS Letters* **524**, 145-148.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* **15**, 473-497.
- Nakano Y., Asada K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **22**, 867-880.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1237-1247.
- Nes W. D., Stafford A. E. (1983): Evidence for metabolic and functional discrimination of sterols by *Phytophthora cactorum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 3227-3231.

- Nespoulous C., Huet J.-C., Pernollet J.-C. (1992): Structure-function relationships of  $\alpha$  and  $\beta$  elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta* **186**, 551-557.
- Nikiforova V., Freitag J., Kempa S., Adamik M., Hesse H., Hoefgen R. (2003): Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **33**, 633-650.
- Noctor G. (2006): Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell & Environment* **29**, 409-425.
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C. H. (2012): Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment* **35**, 454-484.
- Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch S., Foyer C. H. (2011): Glutathione. *The Arabidopsis Book* **9**, 1-32.
- O'Donohue M. J., Gousseau H., Huet J.-C., Tepfer D., Pernollet J.-C. (1995): Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding beta-cryptogein, an elicitor produced by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Molecular Biology* **27**, 577-586.
- Orefice I., Gerecht A., d'Ippolito G., Fontana A., Ianora A., Romano G. (2015): Determination of lipid hydroperoxides in marine diatoms by the FOX2 assay. *Marine Drugs* **13**, 5767-5783.
- Osman H., Mikes V., Milat M.-L., Ponchet M., Marion D., Prangé T., Maume B. F., Vauthrin S., Blein J.-P. (2001): Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Letters* **498**, 55-58.
- Panabières F., Marais A., Le Berre J.-Y., Penot I., Fournier D., Ricci P. (1996): Characterization of gene cluster *Phytophthora cryptogea* which codes for elicitors, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **8**, 996-1003.
- Paulová H., Bochořáková H., Táborská E. (2004): Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy* **98**, 174-179.
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F. (2003): Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *The Journal of Nutrition* **133**, 2812-2819.
- Pieterse C. M. J., van Wees S. C. M., van Pelt J. A., Knoester M., Laan R., Gerrits H., Weisbeek P. J., van Loon L. C. (1998): A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**, 1571-1580.
- Pocernich Ch. B., Butterfield D. A. (2012): Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochimie et biophysica acta* **1822**, 625-630.
- Ponchet M., Panabières F., Milat M.-L., Mikes V., Montillet J. L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y., Blein J.-P. (1999): Are elicitors cryptogins in plant-oomycete communications? *Cellular and Molecular life sciences* **56**, 1020-1047.
- Poulos A. (1995): Very long chain fatty acids in higher animals - a review. *Lipids* **30**, 1-14.
- Prakash A., Rigelhof F., Miller E. (2001): Antioxidant activity. *Medaillon Laboratories Analytical Progress* **19**, 1-6.
- Procházka S. (1998): *Fyziologie rostlin* . 1. vydání, Academia, Praha, Česká republika, 484 stran.
- Ptáčková N., Klemrová J., Obořil M., Nedělová S., Lochman J. (2015): The effect of cryptogin with changed abilities to transfer sterols and altered charge distribution on extracellular alkalization, ROS and NO generation, lipid peroxidation and LOX gene transcription in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **97**, 82-95.
- Pugin A., Frachisse J.-M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J. (1997): Early events induced by the elicitor cryptogin in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *The Plant Cell* **9**, 2077-2091.
- Riewe D., Koowhi M., Lisec J., Pfeiffer M., Lippmann R., Schmeichel J., Willmitzer L., Altmann T. (2012): A tyrosine aminotransferase involved in tocopherol synthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **71**, 850-859.

- Rustérucci Ch., Stallaert V., Milat M.-L., Pugin A., Ricci P., Blein J.-P. (1996): Relationship between active oxygen species, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*, *Plant Physiology* **111**, 885-891.
- Ryals J., Uknes S. Ward E. (1994): Systemic acquired resistance. *Plant physiology* **104**, 1109-1112.
- Sadak M. S., Elhamid E. M. A., Mostafa H. M. (2013): Alleviation of adverse effects of salt stress in wheat cultivars by foliar treatment with antioxidant 1. Changes in growth, some biochemical aspects and yield quantity and quality. *America-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* **13**, 1476-1487.
- Sedlář A. (2018): *Studium vlivu modifikace struktury elicitinů infestinu a kryptogeinu na modelovém systému tabákové buněčné suspenze*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M. (2014): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanisms in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* **2012**, 1-26.
- Shibamoto T. (2006): Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 12-25.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. (2002): Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1305-1319.
- Siems W., Grune T. (2003): Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 167-175.
- Sies H. (1993): Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* **215**, 213-219.
- Skipsey M., Andrews C. J., Townson J. K., Jepson I., Edwards R. (2000): Cloning and characterization of glyoxylase I from soybean. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **374**, 261-268.
- Smirnoff N. (2000): Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 229-235.
- Smirnoff N., Conklin P. L., Loewus P. A. (2001): Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **52**, 437-467.
- Smirnoff N., Wheeler G. L. (2000): Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 291-314.
- Smith I. K., Vierheller T. L., Thorne C. A. (1988): Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry* **175**, 408-413.
- Soll J., Douce R., Schultz G. (1980): Site of biosynthesis of alfa-tocopherol in spinach chloroplasts. *FEBS Letters* **112**, 243-246.
- Stevens R. G., Creissen G. P., Mullineaux P. M. (2000): Characterisation of pea cytosolic glutathione reductase expressed in transgenic tobacco. *Planta* **211**, 537-545.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Metraux J. P. (1997): Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **35**, 235-270.
- Stong R. A., Kolodny E., Kelsey R. G., Gonzáles-Hernández M. P., Vivanco J. M., Manter D. K. (2013): Effect of plant sterols and tannins on *Phytophthora ramorum* growth and sporulation. *Journal of chemical ecology* **39**, 733-743.
- Szarka A., Tomasskovic B., Bánhegyi G. (2012): The ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol triad in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 4458-4483.
- Takahama U. (2004): Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reaction. *Phytochemistry Reviews* **3**, 207-219.
- Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T., Shigeoka S. (1998): Purification and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris*. *Biochimie* **80**, 295-301.
- Taulavuori E., Hellström E. K., Taulavuori K., Laine K. (2001): Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2375-2380.

- Teixeira F. K., Menezes-Benavente L., Galvão V. C., Margis R., Margis-Pinheiro M. (2006): Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* **224**, 300-314.
- van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N. P. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**, 57-149.
- Viard M.-P., Martin F., Pugin A., Ricci P., Blein J.-P. (1994): Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* **104**, 1245-1249.
- Vodrážka Z. (2002): *Biochemie*. 2. vydání, Academia, Praha, Česká republika, 505 stran.
- Vörös K., Feussner I., Kühn H., Lee J., Graner A., Löbner M., Parthier B., Wasternack C. (1998): Characterization of methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *European Journal of Biochemistry* **251**, 36-44.
- Wagner B. A., Buettner G. R., Burns C. P. (1994): Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* **33**, 4449-4453.
- Wachter A., Wolf S., Steininger H., Bogs J., Rausch T. (2005): Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione synthesis in *Brassicaceae*. *The Plant Journal* **41**, 15-30.
- Wheeler G. L., Jones M. A., Smirnov N. (1998): The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**, 365-369.
- Wolff S. P. (1994): Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology* **233**, 182-189.
- Yang W., Cahoon R. E., Hunter S. C., Zhang Ch., Han J., Borgschulte T., Cahoon E. B. (2011): Vitamin E biosynthesis: functional characterization of monocot homogentisate geranylgeranyl transferase. *The Plant Journal* **65**, 206-217.
- Yu L. M. (1995): Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4088-4094.
- Zechmann B., Koffler B. E., Russell S. D. (2011): Glutathione synthesis is essential for pollen germination *in vitro*. *BMC Plant Biology* **11**, 1-11.
- Zechmann B., Mauch F., Sticher L., Müller M. (2008): Subcellular immunocytochemical analysis detects highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *Journal of Experimental Botany* **59**, 4017-4027.
- Zsigmond L., Tomasskovic B., Deak V., Rigo G., Szabados L., Banhegyi G., Szarka A. (2011): Enhanced activity of galactono-1,4-lactone dehydrogenase and ascorbate-glutathione cycle in mitochondria from complex III deficient *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**, 809-815.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
AA/BIS	akrylamid- <i>N,N</i> -bisakrylamid
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
APS	persíran amonný
APX	askorbátperoxidasa
AsA	kyselina askorbová
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát p-toluidinová sůl
BHT	butylhydroxytoluen
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
cAPX	cytosolická askorbátperoxidasa
CAT	katalasa
Cu/Zn-SOD	superoxiddismutasa s atomy mědi a zinku v aktivním místě
DETBA	diethylthiobarbiturová kyselina
DHA	dehydroaskorbová kyselina
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	dithionitrobenzoová kyselina
DTT	dithiothreitol
Fe-SOD	superoxiddismutasa s atomem železa v aktivním místě
FOX	oxidace železnatých iontů v přítomnosti xylenolové oranž
GPX	guajakolperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion (redukováná forma)
GSPX	glutathionperoxidasa
GSSG	glutathion (oxidovaná forma)
HR	hypersenzitivní reakce
INF	infestin
ISR	indukovaná systémová rezistence (induced systemic resistance)
LAR	lokálně získaná rezistence (local acquired resistance)
LOX	lipoxygenasy
mAPX	askorbátperoxidasa v mikrotěličkách
MDA	malondialdehyd

MDHA	monodehydroaskorbová kyselina
MDHAR	monodehydroaskorbátreduktasa
MES	kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová
mitAPX	mitochondriální askorbátperoxidasa
Mn-SOD	superoxiddismutasa s atomem manganu v aktivním místě
NBT	nitrotetrazoliová modř
NMPI	N-methyl-2-fenylindol
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PK	proteinkinasa
POX	peroxidasy
PP	proteinfosfatasa
PR-proteiny	proteiny související s patogenezí (pathogenesis related)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
PVDF	polyvinylidendifluorid
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
rpm	otáčky za minutu (rotations per minute)
SA	kyselina salicylová
sAPX	stromatální askorbátperoxidasa
SAR	systémově získaná rezistence (systemic acquired resistance)
SCP	proteiny přenášející steroly (sterol carrier proteins)
SDS	dodecylsírán sodný
SOD	superoxiddismutasa
tAPX	thylakoidní askorbátperoxidasa
TBA	thiobarbiturová kyselina
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethan-1,2-diamin
TEP	1,1,3,3-tetraethoxypropan
TNB	dianion kyseliny 5-thio-2-bis-nitrobenzoové
v/v	objem na objem
w/v	hmotnost na objem
X24	kryptogein
XO	xylenolová oranž