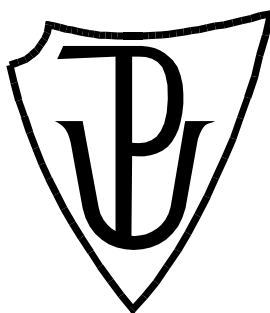


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



**Vplyv elicitinov na produkciu reaktívnych foriem  
kyslíka a nekrotické účinky u tabakovej bunkovej  
kultúry po modulácii  $\text{Ca}^{2+}$  signalizácie**

**BAKALÁRSKA PRÁCA**

Autor:	<b>Štefan Šatka</b>
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný odbor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúca práce:	<b>Mgr. Martina Janků</b>
Rok:	2018

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol som zoznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 14. 5. 2018

Štefan Šatka

Týmto by som rád poďakoval svojej školiteľke, Mgr. Martine Jankú, za odborné vedenie, poskytnutie literatúry, za čas, ktorý mi pri vypracovaní bakalárskej práce venovala a v neposlednom rade za pevné nervy a trpezlivosť, ktoré pri mne potrebovala. Rovnako chcem poďakovať svojim rodičom za podporu počas štúdia.

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Štefan Šatka
Názov práce	Vplyv elicitinov na produkciu reaktívnych foriem kyslíka a nekrotické účinky u tabakovej bunkovej kultúry po modulácii Ca <sup>2+</sup> signalizácie
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúca práce	Mgr. Martina Janků
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Reaktívne formy kyslíka (ROS) sú nielen toxickými medziproduktami aeróbného metabolizmu ale taktiež zastávajú signálnu funkciu. Pri napadnutí rastliny patogénom dochádza po jeho rozpoznaní rastlinnou bunkou k rade procesov vrátane zvýšenej produkcie ROS. Hlavným zdrojom ROS je v tomto prípade NADPHoxidáza, ktorá je aktivovaná predovšetkým fosforyláciou a interakciou s vápenatými iónmi.

Elicitiny sú proteíny o nízkej molekulovej hmotnosti produkované patogénnymi oomycétami rodu *Phytophthora* a *Pythium*, schopné indukovať obranné reakcie rastlín. V predloženej práci bol študovaný vplyv elicitinov kryptogeínu (CRY), a jeho mutantnej formy CRY K13V, infestínu (INF) a jeho mutantnej formy INF V13K/A14T na produkciu ROS a porovnanie nekrotických účinkov na bunkovú suspenziu *Nicotiana tabacum* L cv. Xanthi. Mutácie v primárnej štruktúre študovaných elicitinov sú cieleňé na kladne nabitý lyzín, ktorého prítomnosť je rozhodujúca pre biologické vlastnosti týchto proteínov. Kryptogeín, bázický elicitin s lyzínom v polohe 13, vykazuje vyšší nekrotický účinok v porovnaní s infestínom. Mutácia u CRY viedla k priblíženiu sa vlastností bázického elicitinu k vlastnostiam typickým pre kyslé formy a naopak u mutácie INF bolo pozorované priblíženie sa vlastnostiam bázických elicitinov.

V práci bol ďalej posúdený vplyv elicitinov v kombinácii s blokátorom vápnikových kanálikov, chloridom lantanitým, vzhľadom na životnosť tabakových buniek, produkciu ROS a zmeny v ich hladinách. Vplyv LaCl<sub>3</sub> u elicítovaných tabakových buniek, bol sledovaný nielen na produkciu ROS (vrátane zmien v expresii NADPH oxidázy), ale tiež na ich metabolizmus, konkrétne na zmeny v aktivitách antioxidantných enzýmov. Z výsledkov vyplýva, že chlorid lantanitý spôsobil zníženie nekrotických účinkov elicitinov, a potlačil produkciu ROS.

Kľúčové slová	Elicitiny, kryptogeín, infestín, vápenaté ióny, reaktívne formy kyslíka, chlorid lantanitý <i>Nicotiana tabacum</i>
Počet strán	74
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Štefan Šatka
Title	Influence of elicitors on production of reactive oxygen species and their necrotic effect on tobacco cell culture after modulation of Ca <sup>2+</sup> signalization
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Martina Janků
The year of presentation	2018

### Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are toxic intermediates of an aerobic metabolism and moreover they are important signal transducers. During pathogen attack, plant cells recognize a pathogen and the recognition leads to trigger of several processes, including production of ROS. In these conditions, the main source of ROS is NADPH oxidase, which is primarily activated by phosphorylation and interaction with calcium ions.

Elicitors are proteins with a low molecular weight, which are produced by pathogenic oomycetes of *Phytophthora* and *Pythium* species, with a capacity to induce plant defence responses. In the bachelor thesis, the influence of elicitor cryptogein (CRY) and its mutant form CRY K13V, infestin (INF) and its mutant form INF V13K/A14T were examined on ROS production and elicitors necrotic effects on tobacco cells *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi were compared. Mutation in elicitors primary structure is directed on lysine, a positively charged residue, that is crucial for elicitors biological activity. Cryptogein, basic elicitor having lysine at position 13, shows a higher necrotic effect in contrast to the infestin. The mutation in CRY structure led to features typical for acidic forms. On the contrary, the mutation in INF structure partly confers characteristics of basic elicitors.

The second goal of the experimental part of the thesis was the study of effect of the calcium channels blocker – lanthanum chloride on elicitors triggered pathways in plants. Concretely the viability of tobacco cells and on ROS production and their levels were evaluated. The effect of elicitors was focused not only on ROS production (including changes in NADPH oxidase expression), but also on their metabolism, especially on changes in antioxidant enzymes activities. The study suggests that LaCl<sub>3</sub> causes lower necrotic effect of elicitors and partly suppresses ROS production after elicitor treatment.

Keywords	Elicitors, cryptogein, infestin, calcium ions, reactive oxygen species, lanthanum chloride, <i>Nicotiana tabacum</i>
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Slovak

## OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Súčasný stav riešenej problematiky .....	2
2.1	Obranné reakcie rastlín.....	2
2.2	Zig-Zag model.....	2
2.3	Nehostiteľská rezistencia.....	4
2.3.1	Mechanizmy nehostiteľskej rezistencie .....	5
2.3.2	Typy nehostiteľskej rezistencie.....	6
2.4	Hostiteľská rezistencia .....	6
2.4.1	Hypotéza Gén proti génu .....	7
2.4.2	Guard hypotéza .....	8
2.4.3	Decoy model .....	8
2.5	Elicitory .....	9
2.6	Elicitiny .....	9
2.6.1	Triedy elicitinov .....	10
2.6.2	Fylogenetické delenie.....	11
2.6.3	Funkcie elicitinov .....	14
2.6.4	Signálne dráhy skorej fáze obrannej odpovede rastliny.....	15
2.6.5	Signálne dráhy neskorej fáze obrannej odpovede rastlín.....	18
2.6.6	Úloha ROS v obrane rastlín .....	19
2.6.7	Význam NO v obrane rastlín.....	20
2.6.8	NADPHoxidáza a oxidatívne vzplanutie .....	21
2.7	Ovplyvnenie Ca <sup>2+</sup> signalizácie fosfolipidovým metabolizmom.....	22
2.7.1	Fosfolipáza C .....	23
2.7.2	Delenie fosfolipáz C.....	23
2.7.3	Funkcia fosfolipázy C v prenose signálu .....	23
3	Experimentálna časť.....	26
3.1	Chemikálie.....	26
3.2	Prístrojové vybavenie .....	26
3.3	Rastlinný materiál a elicitiny.....	27
3.3.1	Pestovanie rastlín .....	27
3.3.2	Kultivácia tabakových buniek.....	27
3.3.3	Elicitiny .....	28
3.4	Metódy.....	28
3.4.1	Infiltrácia tabakových listov.....	28
3.4.2	Stanovenie životnosti tabakových buniek.....	28
3.4.3	Spracovanie materiálu pre stanovenie produkcie ROS.....	29

3.4.4	Spracovanie materiálu pre stanovenie enzýmových aktivít.....	31
3.4.5	Spektrofotometricé stanovenie aktivít katalázy a askorbátperoxidázy .....	32
3.4.6	Stanovenie proteínov Bradfordovou metódou .....	33
3.4.7	Izolácia RNA.....	34
3.4.8	Meranie koncentrácie a čistoty RNA .....	34
3.4.9	Reverzná transkripcia.....	35
3.4.10	Real-time qPCR .....	36
4	Výsledky a diskusia .....	37
4.1	Nekrotické účinky elicítinov na listy <i>Nicotiana tabacum</i> .....	37
4.2	Vplyv elicítinov na životnosť bunkovej suspenzie <i>Nicotiana tabacum</i> po zablokovaní Ca <sup>2+</sup> kanálikov .....	39
4.3	Stanovenie produkcie ROS .....	42
4.3.1	Chemiluminiscenčné stanovenie produkcie ROS .....	42
4.3.2	Stanovenie expresie NADPHoxidázy .....	45
4.3.3	Stanovenie hladiny ROS fluorescenčnou sondou H <sub>2</sub> DCF DA .....	47
4.3.4	Stanovenie hladín hROS fluorescenčnou sondou HPF .....	50
4.4	Metabolizmus ROS .....	52
4.4.1	Stanovenie aktivity katalázy .....	52
4.4.2	Stanovenie aktivity askorbátperoxidázy .....	55
5	Záver .....	57
7	Zoznam použitej literatúry .....	58
8	Zoznam použitých skratiek .....	65

## Ciele práce:

Cieľom teoretickej časti práce je literárna rešerš, zhrňujúca:

1. najnovšie poznatky o obranných reakciách rastlín v systéme rastlina - patogén
2. charakteristiku elicitorov so zameraním na elicítiny
3. signálne dráhy spustené v rastlinnej bunke po rozpoznaní elicítinu so zameraním na signalizáciu  $\text{Ca}^{2+}$ , vrátane ovplyvnenia
4. metabolizmu reaktívnych foriem kyslíka (ROS)
5. regulácia  $\text{Ca}^{2+}$  signalizácie fosfolipidovým metabolizmom so zameraním na fosfolipázu C.

Cieľom experimentálnej časti práce je štúdium:

1. vplyvu blokátorov  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov po aplikácii elicítinov u tabakovej bunkovej kultúry vzhľadom na životnosť buniek
2. zmien priebehu produkcie ROS po aplikácii blokátoru  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov u elicítovaných tabakových bunkách
3. zmien v hladinách ROS a hROS u elicítovaných tabakových bunkách a v kombinácii s aplikáciou blokátorov  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov
4. štúdium zmien v metabolizme ROS po aplikácii elicítinov a blokátoru  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov, zameranie na antioxidačné enzýmy



# 1 ÚVOD

Rastliny sú počas svojho života nútené odolávať nepriaznivým vplyvom prostredia, ktoré môžeme označiť ako stresové faktory. Buchanan *et al.* (2000) definujú stres ako vonkajšie podmienky, ktoré nepriaznivo ovplyvňujú rast, vývin alebo produktivitu rastlín. Smith *et al.* (2010) označujú ako stresujúce prostredie také, ktoré je nepriaznivejšie v porovnaní s optimálnym prostredím pre rast, zatiaľ čo Taiz a Zeiger (2010) popisujú stres ako znevýhodňujúci vplyv vyvíjaný na rastliny vonkajšími abiotickými a biotickými faktormi.

Jeden z biotických stresových faktorov predstavuje napadnutie patogénmi, ktoré využívajú rôzne stratégie prekonávajúce obranu rastliny. Rastliny na rozdiel od živočíchov nemajú typický imunitný systém s bunkami zodpovednými za rozpoznanie cudzorodých látok a spúšťajúce imunitnú odpoveď. Namiesto toho sú závislé na vrodenej imunite každej bunky pletiva a na systémových signáloch vychádzajúcich z infikovaných miest. Po napadnutí patogénom sú schopné spustiť vlastné obranné mechanizmy, ktoré v niektorých prípadoch môžu viesť aj k zapamätaniu predchádzajúcej infekcie (Jones a Dangl, 2006).

Obranné reakcie rastlín môžu byť aktivované pôsobením tzv. elicitorov, ktoré patria medzi signálne zlúčeniny. Do rozmanitej rodiny elicitorov radíme i zlúčeniny označované ako elicítiny, proteíny o nízkej molekulovej hmotnosti patogénnych oomycét *Phytophthora* a niektorých druhov rodu *Pythium* (Panabières *et al.*, 1997). Elicitiny po naviazaní na receptory alebo vysokoafinitné miesta plazmatickej membrány rastlinnej bunky spúšťajú signálne dráhy vedúce k produkcii látok vrátane reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a oxidu dusnatého (NO), ktoré sa podieľajú na vyvolaní hypersenzitívnej reakcie charakterizovanej bunkovou smrťou v mieste napadnutia. Hlavným producentom ROS u tabaku, *Nicotiana tabacum*, je integrálny enzým cytoplazmatickej membrány, NADPHoxidáza (EC 1.6.3.1.), ktorá je okrem iného aktivovaná  $\text{Ca}^{2+}$  iónmi (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).  $\text{Ca}^{2+}$  ako druhý posol má veľký význam v množstve fyziologických a indukovaných procesov ako sú napríklad obranné reakcie. Koncentrácia cytosolického vápnika je aktívne udržiavaná na nízkej úrovni a zvyšuje sa na určité podnety. Uvoľnenie vápnika z intracelulárnych zásob závisí, okrem iného, od fosfolipázy C, ktorej enzýmovou aktivitou vznikajú produkty interagujúce s  $\text{Ca}^{2+}$  kanálkami (Singh *et al.*, 2015).

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Obranné reakcie rastlín

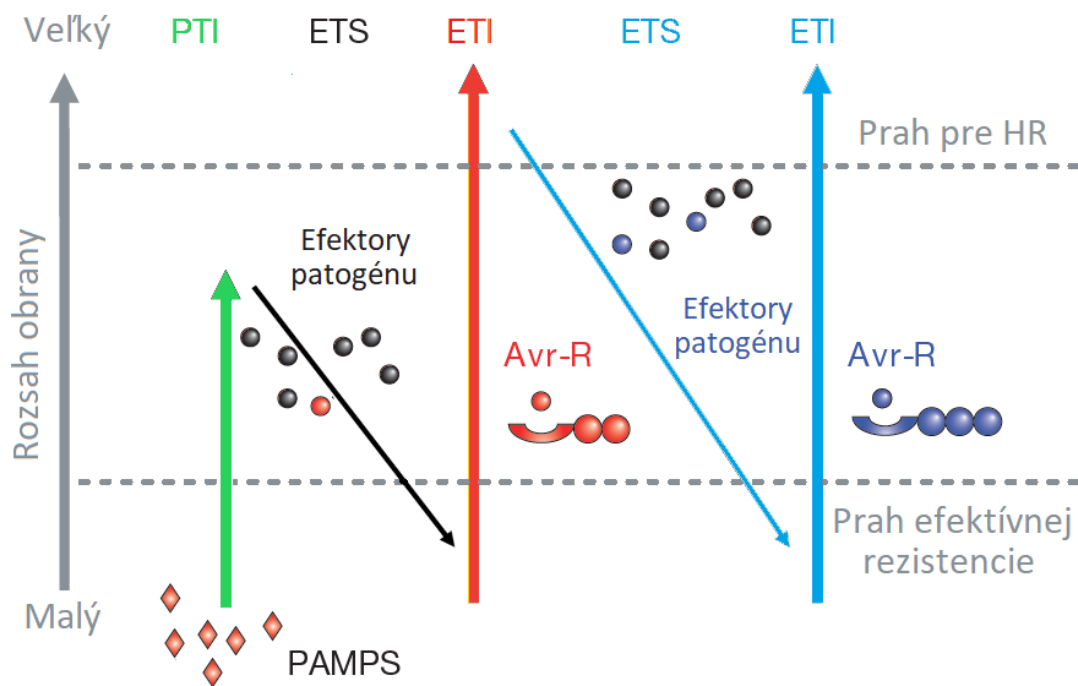
Podľa podstaty interakcie rastlina-patogén sa dajú rozlíšiť dva hlavné typy odolnosti rastlín, a to hostiteľská a nehostiteľská rezistencia, ako dôsledok odpovede rastlinnej imunity. V klasifikácii rezistencie je rozhodujúca adaptácia patogénu na daný druh rastliny. Uplatnené mechanizmy rezistencie sa líšia podľa typu patogénu a rastlinného druhu. Hostiteľská rezistencia sa uplatňuje proti patogénu adaptovanému na rastlinného hostiteľa, zatiaľ čo nehostiteľská na všetky ostatné, neadaptované, patogény (Gill *et al.*, 2015).

Medzi rastlinou a patogénom môže byť vzťah dvojakého typu. Nekompatibilný vzťah existuje medzi nehostiteľskou rastlinou a neadaptovaným patogénom. Nedochoádza k ochoreniu, pretože rastlina patogén rozpozná a uplatnené obranné mechanizmy úspešne potlačia infekciu. Kompatibilný vzťah existuje medzi hostiteľskou rastlinou a patogénom. Rastlina nie je schopná rozpoznať patogén alebo reaguje príliš pomaly a dochádza k ochoreniu (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

V dynamických interakciách rastlín a patogénov má určujúci význam selekčný tlak. Rastlina sa stáva hostiteľom alebo nehostiteľom patogéna na základe rozdielnych geneticky podmienených vlastností oboch zúčastnených strán (Barrett *et al.*, 2008).

### 2.2 Zig-Zag model

Zig-Zag model popisuje v štyroch fázach priebeh imunitnej odpovede spustenej interakciou rastliny a patogénu, vrátane protiútoky patogénu (obr. 1). Zobrazuje kompatibilný i nekompatibilný vzťah medzi hostiteľom a patogénom, a taktiež znázorňuje princíp koevolúcie, t.j. proces vzájomného prispôsobovania sa, v tomto prípade, patogénov a rastlín (Jones a Dangl, 2006).



Obr. 1 Zig-Zag model zobrazujúci dynamiku interakcií medzi rastlinou a patogénom V 1. fáze (vyznačené zelenou) molekulové vzory asociované s patogénom (PAMP) sú rozpoznané vzor rozpoznávajúcimi receptormi (PRR), výsledkom je aktivácia PAMP spustenej imunity (PTI). V 2. fáze (vyznačené čiernou) adaptovaný patogén svojimi efektormi zmaří obranu hostiteľa, čo vedie k aktivácii efektormi spustenej náchylnosti (ETS). V 3. fáze (zvýraznené červenou) hostiteľ s génmi rezistencie (*R*) interaguje s efektormi patogéna a aktivuje sa efektormi spustená imunita (ETI). V 4. fáze (zvýraznené modrou) v rámci koevolúcie dochádza k vývoju nových efektormi patogéna a následne u rastlín k vývoju nových *R* proteínov (upravené podľa Jones a Dangl, 2006).

V prvej fáze útoku patogéna dochádza k jeho rozpoznaniu vďaka molekulovým vzorom asociovaným s patogénom (PAMP), tiež označovaným ako molekulové vzory asociované s mikróboom (MAMP), ktoré predstavujú charakteristické evolučne konzervované znaky mikroorganizmov. Zhľadiska funkcie ide o elicitory, pretože spúšťajú imunitnú odpoveď rastliny. PAMP sú rozpoznané vzor rozpoznávajúcimi receptormi (PRR) rastliny, následkom čoho dochádza k aktivácii PAMP spustenej imunity (PTI). Existujú dva druhy PRR, a to receptor-like proteíny (RLP) a receptor-like kinázy (RLK). PTI zabráni ďalšiemu postupu patogénu, čo sa prejaví hypersenzitívnou reakciou (HR) alebo častejšie imunitná odpoveď prebehne asymptomaticky (Jones a Dangl, 2006).

V druhej fáze adaptovaný patogén uvoľní svoje špecifické molekuly nazývané efektory, ktoré zvyšujú jeho virulenciu tým, že rastline zabraňujú rozpoznať jeho prítomnosť prostredníctvom PRR. Efektory sú produktami génov avirulencie (*Avr*) patogéna. Úlohou efektormi je zdolať PTI, čo v úspešnom prípade vedie k náchylnosti

vyvolanej efektorom (ETS), následkom čoho dochádza k šíreniu patogéna a rozvoju infekcie. Rastliny si ale vyvinuli mechanizmy rozpoznávajúce efekторы patogénov alebo produkty génov avirulencie prostredníctvom R proteínov. R proteíny sú v rastlinách kódované génmi rezistencie (*R*). R proteíny sa uplatňujú v prípade, že PTI ako bazálna obrana nepostačuje na zastavenie infekcie a spúšťajú silnejšiu imunitnú odpoveď (Jones a Dangl, 2006).

V tretej fáze teda dochádza k rozpoznaní efektora – produkt *Avr* génov, ktoré môže byť nepriame alebo priame, najčastejšie prostredníctvom jedného z NB-LRR proteínov (produkty *R* génov) pozostávajúcich z nukleotid viažucej domény (NB) a domény bohatej na leucínové repetície (LRR) s kinázovou aktivitou. Toto vedie k efektorom spustenej imunity (ETI). ETI je zosilnená obranná PTI odpoveď, pre ktorú je typické prekročenie prahu pre indukciu hypersenzitívnej reakcie spojenej s programovanou bunkovou smrťou a nekrotickým vzhľadom v mieste infekcie (Dodds *et al.*, 2006).

Prirodzený výber vedie patogény k tomu, aby sa vyhli ETI tým, že nadobudnú nové efekторы alebo modifikujú tie, ktoré rastlina dokáže rozpoznať. Na druhej strane selekčný tlak u rastlín vedie k novým R proteínom rozpoznávajúcim efekторы a ETI môže byť znova zapojená do obrany (Karasov *et al.*, 2014). Tento proces prispôsobovania sa nazýva koevolúcia (obr. 1). Znakom koevolúcie je, že zúčastnené strany čím ďalej, tým viac špecializujú svoje mechanizmy vzájomnej interakcie (Dodds *et al.*, 2006).

### **2.3 Nehostiteľská rezistencia**

Prevládajúcim typom obrany je nehostiteľská rezistencia, tiež označovaná ako horizontálna, rasovo nešpecifická alebo bazálna rezistencia (Kushalappa *et al.*, 2016). V porovnaní s hostiteľskou rezistenciou pôsobí proti všetkým patotypom konkrétneho druhu patogéna a je prítomná u všetkých kultivarov druhu rastliny. Táto rezistencia je viac trvanlivá a je zodpovedná za obranu proti širokému spektru potenciálnych patogénov (Heath, 2000).

Neadaptované mikroorganizmy, kam patria nepatogénne mikroorganizmy aj potenciálne patogény, sú nositeľmi MAMP (Uma *et al.*, 2011). Tieto vzory sú rozpoznávané transmembránovými receptormi rôznych tried rastlín nazývanými PRR. Po rozpoznaní takéhoto vzoru dochádza k spusteniu PTI. PTI spúšťa veľa signálnych dráh, vedúcich k preprogramovaniu transkripcie génov spojených s obrannými reakciami hostiteľa (Lewis *et al.*, 2015). Táto forma odpovede sa označuje aj ako

bazálna a prvým kontaktom rastliny s patogénom teda dochádza k spusteniu PTI (Zipfel a Rathjen, 2008). Jedným z významných zástupcov PAMP je proteín bakteriálneho bičíka, flagelín, na ktorého N-konci sa nachádza 22 aminokyselín (flg22), ktoré rozpoznáva PRR proteín označovaný ako flagellin-sensing 2 (FS2). Po rozpoznaní sa následne spúšťa PTI. V prípade receptora FS2 ide o kinázu bohatú na leucínové repetície (Goméz-Goméz a Boller, 2002). Ďalšími príkladmi PAMP sú bakteriálny elongačný faktor Tu a chitín húb (Zipfel *et al.*, 2006).

Elicitory okrem vyvolania obranných reakcií majú tiež schopnosť zvyšovať účinok už spustenej imunitnej odpovede. Predovšetkým krytosemenné rastliny sú vybavené mechanizmom, ktorý potencuje účinok PTI prostredníctvom rastlinných elicitorových peptidov (Peps) (Lori *et al.*, 2015). Peps sa nachádzajú v cytoplazme a tiež sú asociované s tonoplastom, odtiaľto sa uvoľňujú do apoplastu rozpadom bunky alebo aktívne vrámci signalizácie podriadenej PRR (Bartels *et al.*, 2015). Peps pôsobia lokálne aj sa systematicky viažu na extracelulárne receptory bunky, ktorá ich produkuje, aj na receptory okolitých buniek, čím v nich spúšťa obranné reakcie. Receptory Peps (PEPR) interagujú s Peps iba vrámci svojej rodiny, PEPR neinteraguje s Peps iných rodín, čo znamená, že systém Peps-PEPR sa rýchlo vyvíja (Lori *et al.*, 2015).

### 2.3.1 Mechanizmy nehostiteľskej rezistencie

V závislosti od hostiteľa môže nehostiteľská rezistencia pozostávať z viacerých mechanizmov, ktoré spolu chránia rastlinu pred potenciálnym patogénom (Thordal-Christensen, 2003). Dajú sa rozdeliť do 2 skupín: na pasívne a indukované formy obranných reakcií rastlín. Medzi pasívne obranné mechanizmy spadajú bariéry ako krycie pletivá, kutikula, vosky a bunková stena, a sekundárne metabolity s antimikrobiálnym účinkom, niekedy označované ako fytoanticipíny, ktoré sú exprimované konštitutívne bez predchádzajúceho pôsobenia stresového faktora (Singh a Chandrawat, 2017). Druhú skupinu predstavujú indukované obranné mechanizmy ako sú akumulácia lignínu, tvorba s patogenézou súvisiacich proteínov (PR) a hypersenzitívna reakcia (Senthil-Kumar a Mysore, 2013).

Príkladom rezistencie voči neadaptovanému patogénu môže byť interakcia *Pseudomonas syringae* pv.tomato a nehostiteľskej rastliny sóje. Rastlina rozpozná efekторы AvrA a AvrD patogénu svojimi génmi rezistencie *Rpg2* a *Rpg4* (Ashfield *et al.*, 1995). Génmi Avr a R sa zaoberá kapitola 2.4.

### 2.3.2 Typy nehostiteľskej rezistencie

Nehostiteľskú rezistenciu môžeme rozdeliť na 2 typy podľa toho, či je sprevádzaná pozorovateľnými symptómami (Mysore a Ryu, 2004).

Typ I nehostiteľskej rezistencie nesprevádzajú žiadne pozorovateľné príznaky. V boji proti patogénu sa uplatňujú pasívne alebo aktívne obranné mechanizmy indukované elicitorami patogénov ako sú napr. PAMP (Thordal-Christensen, 2003).

Typ II nehostiteľskej rezistencie je spojený s HR, ktorú charakterizuje nekrotická aktivita v mieste infekcie. Šírením patogéna rastlinným pletivom po prekonaní pasívnej obrany, napr. mechanických bariér, je zastavený aktiváciou obranných mechanizmov vedúcich k HR (Kumar a Mysore, 2013). Hypersenzitívna reakcia je obranný mechanizmus rastliny charakterizovaný odumretím buniek hostiteľa v mieste infekcie. HR je detekovateľná už pár hodín po kontakte s patogénnym organizmom. Programovaná bunková smrť obmedzuje rast biotrofného patogénu, jednak nedostupnosťou výživových látok ale aj produkciou ROS, ktoré sú škodlivé i pre patogén (Morel a Dangl, 1999). Okrem bunkovej smrti vo forme HR dochádza z miesta infekcie k uvoľňovaniu signálnych molekúl do zdravého pletiva rastliny, ktoré spúšťajú širokospektrálnu imunitu označovanú ako systémovo získaná rezistencia (SAR) v celej rastline. SAR potom pomáha chrániť rastlinu proti opakovanej infekcii (Ross, 1961).

### 2.4 Hostiteľská rezistencia

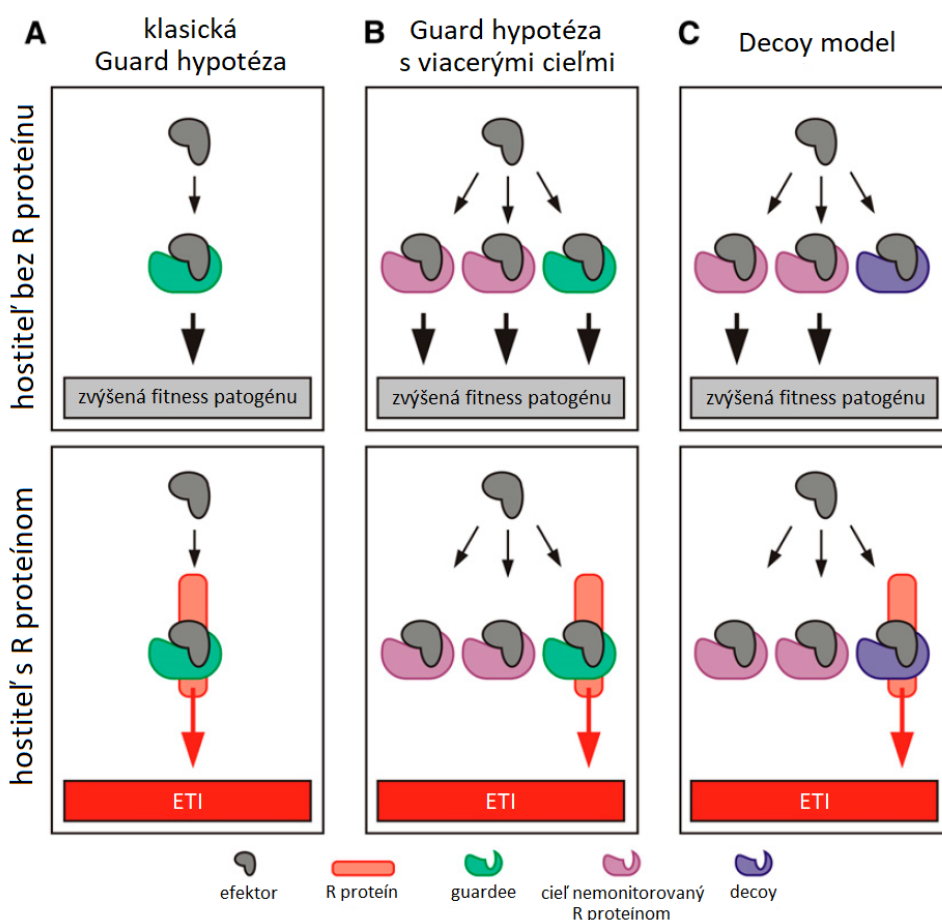
Hostiteľská rezistencia je ďalším mechanizmom obrany hostiteľa proti patogénom, označuje sa tiež ako vertikálna, rasovo špecifická, monogénna, prípadne oligogénna rezistencia, kedy rezistenciu zabezpečuje viacero génov, ktoré rastlinu chránia, a uplatňuje sa v interakcii s adaptovaným patogénom (Kushalappa *et al.*, 2016).

Hostiteľská rezistencia je typom odolnosti špecifickej pre konkrétny genotyp alebo kultivar rastliny a konkrétny kmeň patogénu. Za špecifitu interakcie rastlina-patogén zodpovedá jeden alebo niekoľko génov *R*. Takáto rezistencia je málo trvanlivá, pretože je podmienená len jedným alebo niekoľkými génmi *R*, ktoré rýchlo sa vyvíjajúci patogén môže za relatívne krátky čas prekonať - adaptovať sa. Dôvodom zníženej trvácnosti takejto rezistencie je veľký selekčný tlak, ktorý je vyvíjaný na patogény a narastá s rozširovaním takejto formy rastlinnej obrany (Dangl *et al.*, 2013). Vyvíjajúci sa patogén stratou alebo mutáciou efektora môže na jednej strane prekaziť rozpoznanie hostiteľom, na druhej strane existuje možnosť, že takáto zmena môže znížiť virulenciu patogénu a predĺžiť trvácnosť rezistencie hostiteľa (Cruz *et al.*, 2000).

Účinný efektor dokáže zdolať PTI, čo vedie k ETS (Jones a Dangl, 2006). Následne si rastliny proti efektorom vyvinuli taktiku, ako vyvolať silnejšiu, pre hostiteľskú rezistenciu charakteristickú, obrannú odpoveď – ETI, vďaka R proteínom, ktorými sú schopné rozpoznať efektory, proteíny AVR (Nimchuk *et al.*, 2003). Hostiteľskú rezistenciu vystihuje hypotéza gén proti génu (Flor, 1971).

### 2.4.1 Hypotéza Gén proti génu

Základom hostiteľskej rezistencie je, že patogény nesú gény avirulencie (*Avr*) a hostiteľské rastliny gény rezistencie (*R*). Rezistencia je sprostredkovaná produktom génu *R* (R proteínmi), ktorý priamo interaguje s príslušným produktom génu *Avr*, napr. efektorom, podľa vzoru ligand – receptor (obr. 2) (Flor, 1971). Samotné rozpoznanie môže byť priame alebo nepriame (Dodds *at al.*, 2006).



Obr. 2 Schéma priameho a nepriameho rozpoznanie efektorov R proteínmi. (A) Hypotéza Gén proti génu popisuje priame rozpoznanie efektoru R proteínom. (B) Guard hypotéza popisuje ako dochádza k rozpoznanie efektoru, ktorý má viacero cieľov v hostiteľovi, R proteín monitoruje integritu iba jedného z cieľov. (C) Podľa Decoy modelu je cieľom efektoru molekula, ktorej integritu monitoruje R proteín. Ak dôjde k jej pozmeneniu R proteín spustí obranu rastliny - efektorom spustenú imunitu (ETI) (upravené podľa van der Hoorn a Kamoun, 2008).

Produkty *R* génov sa dajú rozdeliť do piatich tried: intracelulárne proteínkinázy, receptorové proteínkinázy s extracelulárnou LRR doménou, intracelulárne LRR proteíny s NB a motívom leucínového zipsu, intracelulárne NB-LRR proteíny s oblasťou podobnou s Toll a interleukínovým receptorom u *Drosophily melanogaster* a cicavcov a na membránu viazané extracelulárne LRR proteíny (Odjakova a Hadjiivanova, 2001). Väčšinou ale ide o *R* proteíny označované ako NB-LRR, pre ktoré je charakteristické, že obsahujú nukleotid viažucu doménu a doménu bohatú na leucínové repetície s kinázovou aktivitou (Dangl a Jones, 2001). NB-LRR proteíny sprostredkujú účinnú rezistenciu iba proti biotrofným alebo hemibiotrofným patogénom (Glazebrook, 2005). Na základe hypotézy Gén proti génu vznikli neskôr Guard hypotéza a Decoy model.

### **2.4.2 Guard hypotéza**

Ďalšou z hypotéz popisujúcich imunitnú odpoveď rastliny vyvolanú interakciou s patogénom je tzv. Guard hypotéza (obr. 2). Tá je postavená na predpokladoch, že cieľ efektora je nejaká molekula hostiteľa, ktorej funkcia je efektorom manipulovaná v prospech patogéna. Pozmenený cieľ interakciou s efektorom aktivuje korešpondujúci *R* receptorový proteín, čo vedie k vyvolaniu imunitnej odpovede. Označenie guard popisuje úlohu *R* proteínu, ktorý v podstate zastáva funkciu strážcu, monitoruje integritu cieľa efektora (tzv. guardee) a v momente jeho modifikácie spustí obrannú odpoveď v podobe ETI (Van der Biezen *et al.*, 1998). Hypotéza vysvetľuje ako dochádza k aktivácii obrany, hoci priamy kontakt medzi efektorom a *R* proteínom nebol pozorovaný (van der Hoorn a Kamoun, 2008).

### **2.4.3 Decoy model**

Vzhľadom na to, že cieľ efektora môže jedna rastlina rozpoznávať svojim *R* proteínom, u druhej rastliny takýto špecifický *R* proteín môže chýbať, tak by v rámci evolúcie dochádzalo k protichodným dejom. V skupine rastlín bez *R* génu by sa znižovala afinita cieľa (tzv. guardee) k efektoru. A naopak v prítomnosti funkčného *R* génu, by dochádzalo k zlepšeniu interakcie s guardee, aby sa zdokonalilo rozpoznanie patogénu a spustili sa obranné reakcie (van der Hoorn a Kamoun, 2008).

Kompromisom by bol vznik proteínu, označeného tzv. decoy, ktorý by v hostiteľovi napodobňoval cieľ efektora (obr. 2). Decoy model teda popisuje decoy ako alternatívny cieľ efektora, ktorého integritu monitoruje *R* proteín a v prípade pozmenenia decoy proteínu interakciou s efektorom spustí obrannú reakciu. Decoy proteín sám o sebe



nemá vplyv na virulenciu patogénu alebo funkciu bunky hostiteľa (van der Hoorn a Kamoun, 2008). Model popisuje prípad ako AvrPto, efektor *Pseudomonas syringae*, u rezistentných rastlín interaguje s proteinkinázou Pto (decoy), ktorá v komplexe s proteínom Prf umožňuje rozpoznanie baktérie a spusteniu ETI (Zipfel a Rathjen, 2008).

## 2.5 Elicitory

Elicitory sú heterogénnou skupinou lipidových látok, proteínov, glykoproteínov, peptidov a oligosacharidov (Montesano *et al.*, 2003), ktoré spúšťajú obranné reakcie v rastlinách. Produkujú ich biotrofné, hemibiotrofné, nekrotrofné patogény (Govrin *et al.*, 2006), dokonca aj niektoré saprofyty (Mao *et al.*, 2010) a kvasinky (Khokon *et al.*, 2010). Elicitory pôvodom z patogénov označujeme ako primárne. Ak ide o produkty génov avirulencie, efekторы, označujú sa ako špecifické elicitory. Medzi nešpecifické patria konzervované štruktúry mikroorganizmov, MAMP, pretože dokážu vyvolať obrannú odpoveď u hostiteľov aj nehostiteľov (Kruger *et al.*, 2003). Elicitory pôvodom z rastliny sa nazývajú sekundárne (Bent a Mackey, 2007).

Patogény v interakcii s rastlinou často využívajú xylanázy, pektát lyázy a polygalakturonázy. Tieto enzýmy degradujú bunkovú stenu rastlín, pričom ich štepne produkty, oligogalakturonidy, vykazujú schopnosť indukovať obranné odpovede rastliny (Bent a Mackey, 2007). Látky pôvodom z rastliny vznikajúce pôsobením mikroorganizmov sú pomenované ako MIMP (microbe-induced molecular patterns) (Mackey a McFall, 2006). Tie, ktorých vznik je podmienený zranením alebo herbivormi, sa analogicky nazývajú WIMP/HIMP (wound/herbivory-induced molecular patterns). Podstatný rozdiel medzi primárnymi a sekundárnymi elicitorami spočíva v spôsobe detekcie rastlinnou bunkou. Primárne elicitory sa viažu priamo s rastlinnými receptormi, napr. PRR, ale patogény sú schopné takúto detekciu obísť a vyhnúť sa imunitnej odpovedi rastliny. Pôsobením patogénov následne rastlinná bunka produkuje sekundárne elicitory, ktoré sú rastlinou rozpoznané a vedú k spusteniu obranných reakcií (Bent a Mackey, 2007).

## 2.6 Elicitiny

Elicitiny sú rodinou štruktúrne príbuzných proteínov o nízkej molekulovej hmotnosti patriacich do skupiny špecifických elicitorov. Tieto efektorové molekuly sú produkované oomycétami, predovšetkým rodom *Phytophthora* a príbuzným rodom *Pythium* a sú schopné vyvolať hypersenzitívnu reakciu u určitých druhov rastlín

(Panabières *et al.*, 1997). Ricci *et al.*, (1989) prvýkrát popísali elicítiny vo filtráte kultúr patogénnych oomycét, ako sekretované proteíny o veľkosti približne 10 kDa, ktoré spôsobujú hypersenzitívnu reakciu u tabaku. Ďalšou významnou vlastnosťou týchto proteínov je, že medzi membránami hostiteľa a patogénu dokážu prenášať mastné kyseliny a steroly, čo je podmienené existenciou hydrofóbnej dutiny, kam sa tieto lipofilné látky revezibilne viažu. Steroly získané od hostiteľa sú nevyhnutné pre životný cyklus oomycét, nakoľko si ich sami nedokážu syntetizovať (Plešková *et al.*, 2011).

### 2.6.1 Triedy elicítinov

Na základe rozdielov v primárnej štruktúre možno elicítiny rozdeliť do piatich tried, a to triedu I, ktorá sa delí na I-A a I-B, ďalej triedy Py, II a III (Kamoun *et al.*, 1997). Do triedy I patria proteíny zložené z konzervovanej elicitinovej domény 98 aminokyselín, pričom vždy obsahujú 6 cysteínových, 3 metionínové, 2 fenylalanínové a 3 glycínové reziduá (Panabières *et al.*, 1997; Moricová *et al.*, 2014). Identitu triedy dotvárajú vysoko konzervované pozície cysteínových reziduí, ktoré sa podieľajú na tvorbe troch disulfidových mostíkov. Primárna štruktúra konzervovanej elicitinovej domény všeobecne dáva vzniku jednému antiparalélnemu  $\beta$ -listu, piatim  $\alpha$ -helixom a jednej  $\Omega$ -slučke. Celú štruktúru stabilizujú disulfidové mostíky. Zatiaľ čo  $\alpha$ -helixy sú sústredené na konvexnej strane proteínu, na druhej strane sa nachádza vstup do hydrofóbnej dutiny, ktorá sa skladá z  $\Omega$ -slučky a  $\beta$ -listu (Fefeu *et al.*, 1997).

Na základe hodnoty izoelektrického bodu (pI) elicítiny možno deliť na kyslé ( $\alpha$ -elicítiny, pI 4 – 5) a bázické ( $\beta$ -elicítiny, pI 7,5 – 8,5) (Yu, 1995). Medzi kyslé zaraďujeme okrem elicítinov tried II a Py aj elicítiny triedy I-A napr. parasiticein (*Phytophthora parasitica*) a INF1 (*Phytophthora infestans*). Zástupci rodu *Pythium* produkujú elicítiny, z ktorých väčšina sa radí do triedy Py. Ide o skupinu kyslých elicítinov, ktoré obsahujú navyše zopár aminokyselín, napr. VEX2 (*P. vexans*) sa skladá zo 100 reziduí (Kamoun *et al.*, 1997). Bázické elicítiny sú tvorené triedu I-B, kam patrí napr. kryptogein (Panabières *et al.*, 1997).

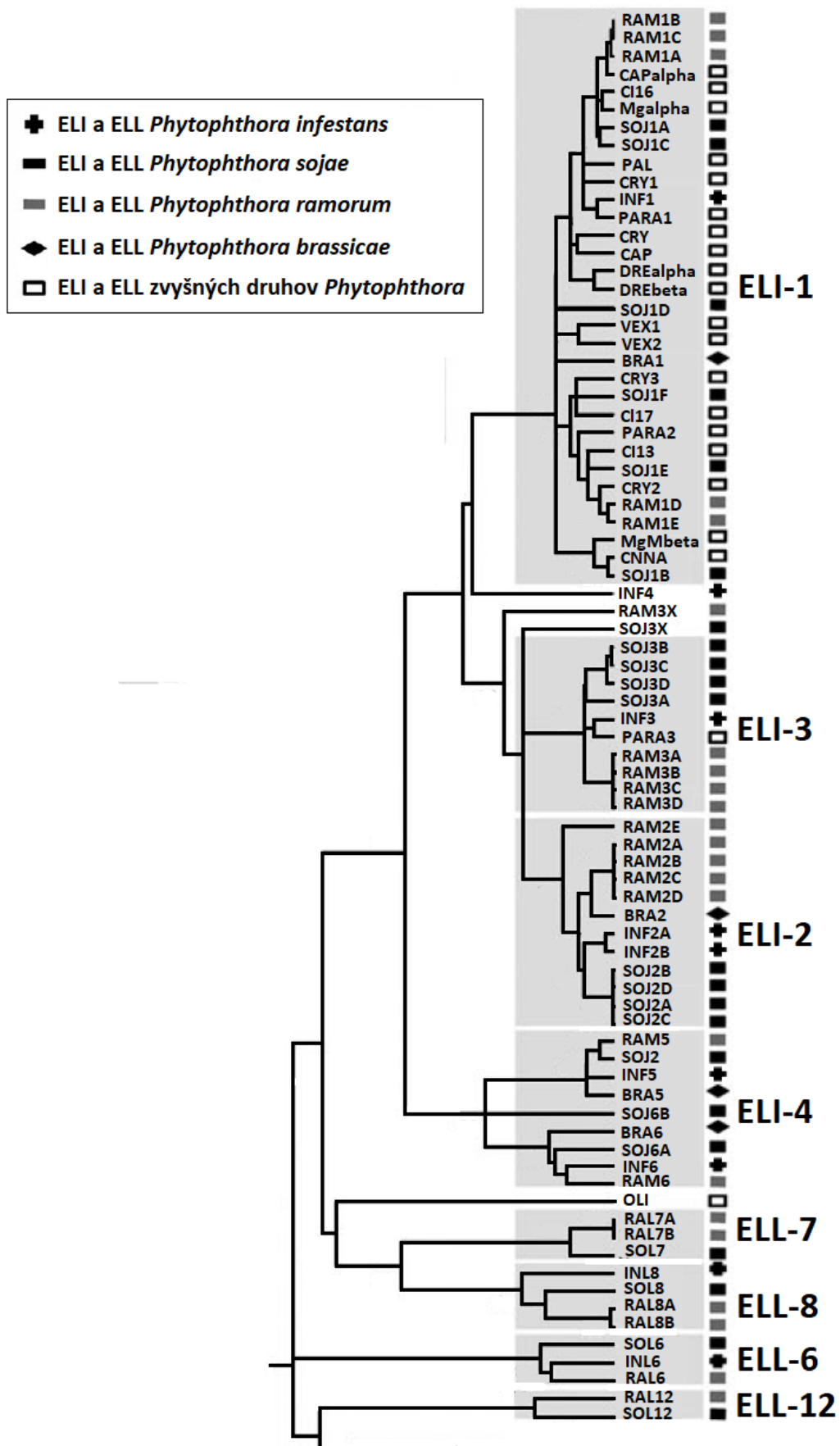
V porovnaní s ostatnými triedami elicítinov sú elicítiny I. triedy sekretované v najväčšom množstve. Typickým príkladom zástupcu proteínov z triedy I je kryptogein sekretovaný oomycétami *Phytophthora cryptogea* (Mikes *et al.*, 1997).

Trieda II obsahuje veľmi kyslé elicítiny, ktoré majú krátky hydrofilný C-terminálny koniec, napr. Cry-HAE26 a Cry-HAE20 *Phytophthora cryptogea*, oba sa skladajú zo 103 aminokyselín (Panabières *et al.*, 1997).

Elicitiny triedy III môžu mať reťazec tvorený až 170 aminokyselinami, z ktorých 98 vytvára charakteristickú elicitinovú doménu, jej primárna štruktúra je však v porovnaní s konzervovanou elicitinovou doménou predchádzajúcich tried rozmanitejšia. Aminokyselinové zloženie zvyšku C-konca týchto polypeptidov naznačuje, že táto doména môže podliehať O-glykozylácii (Wilson *et al.*, 1991). Zástupcami sú INF2A, INF2B produkované *Phytophthora infestans* (Kamoun *et al.*, 1997).

### 2.6.2 Fylogenetické delenie

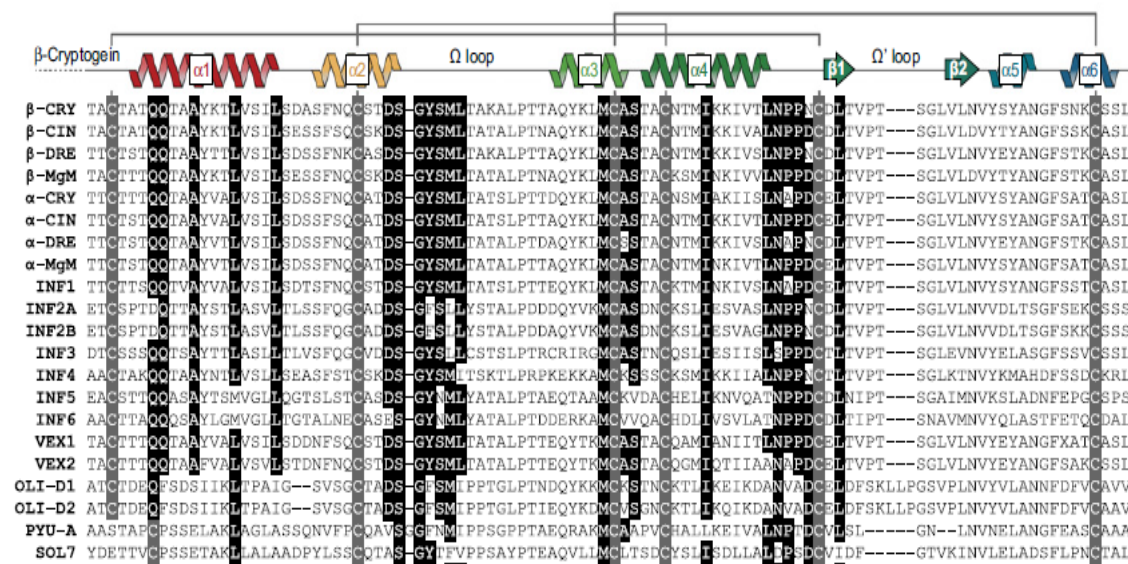
Jiang a kolektív (2006) zostrojili fylogenetický strom analýzou celkovo 156 elicitinových domén získaných z aminokyselinových sekvení 128 elicitinov viacerých druhov *Phytophthora* a *Pythium* (obr. 3). Výsledkom klasifikácie bolo 17 kladov, z ktorých štyri predstavujú elicitiny a zvyšných trinásť elicitinom podobné proteíny, ktoré sa od seba vo svojej primárnej štruktúre navzájom odlišujú. Pre každý klad je charakteristická konzervovaná schéma rozmiestnenia cysteínových reziduí. Výskyt elicitinov určitých kladov u jednotlivých druhov oomycét naznačuje, že diverzita elicitinov existovala ešte pred divergenciou druhov *Phytophthora* a *Pythium* zo spoločného predka (Jiang *et al.*, 2006).



Obr. 3 Kladogram elicitinov (ELI) a elicitinom podobných proteínov (ELL) produkovaných oomycétami rodu *Phytophthora* (upravené podľa Jiang *et al.*, 2006).

Skratkou ELI označujeme elicitory, ktorých primárna štruktúra zdieľa vysoko konzervovanú elicitinovú doménu zloženú z 98 aminokyselín s typickou schémou rozmiestnenia cysteínov. Do kladu ELI-1 patria všetky elicitory triedy I, vrátane I-A a I-B, triedy II a triedy Py. Skratkou ELL sa označujú elicitinom podobné proteíny, pre ktoré je typické, že elicitinová doména sa líši dĺžkou a tiež rozmanitosťou na úrovni sekvencie aminokyselín v porovnaní s konzervovanou doménou ELI (Jiang *et al.*, 2006).

Všetky štyri klady ELI-1 až ELI-4 možno spoznať podľa primárnej štruktúry konzervovanej elicitinovej domény, ktorú charakterizuje schéma rozloženia cysteínov C<sub>1</sub>-23-C<sub>2</sub>-23-C<sub>3</sub>-4-C<sub>4</sub>-14-C<sub>5</sub>-23-C<sub>6</sub> (obr. 4). Medzi jednotlivými cysteínmi sa nachádza premenlivý počet aminokyselín. Celkovo tri disulfidové mostíky sa vždy vytvárajú v poradí medzi prvým a piatym cysteínom, ďalej medzi druhým a štvrtým a nakoniec medzi tretím a šiestym reziduom cysteínu (obr. 4). Klady ELL majú rozdielne rozloženie cysteínov s tým, že počet aminokyselín medzi tretím a štvrtým cysteínom je u všetkých ELL proteínov rovnaký. Vo zvyšných dvojiciach, t. j. medzi prvým a druhým, ďalej medzi piatim a šiestim cysteínom sa nachádza premenlivý počet aminokyselín. Z tohto sa dá pre celú rodinu elicitinov (ELI aj ELL) odvodiť všeobecná schéma rozmiestnenia cysteínov, konkrétne: C<sub>1</sub>-rôzny počet reziduí-C<sub>2</sub>-23-C<sub>3</sub>-4-C<sub>4</sub>-rôzny počet reziduí-C<sub>5</sub>-23-C<sub>6</sub> (Jiang *et al.*, 2006).



Obr. 4 Primárna a sekundárna štruktúra elicitinovej domény (98 aminokyselín) ELI a ELL so zvýraznením zhodných aminokyselín (zvýraznené čiernou) a vyznačenou schémou pozícií cysteínových reziduí (zvýraznené šedou) vrátane zobrazenia disulfidových mostíkov (čiary spájajúce cysteínové reziduá) (upravené podľa Derevnina *et al.*, 2016).

Všetky ELI a ELL sú syntetizované so signálnym peptidom na N-konci pred konzervovanou elicitinovou doménou proteínu, za ktorou môže nasledovať na C-konci premenlivý počet aminokyselín (Jiang *et al.*, 2006). Napr. kryptogein je syntetizovaný ako preproteín, ktorého signálny peptid obsahuje 20 prevažne hydrofóbných aminokyselín. Avšak sekretovaný proteín obsahuje už iba konzervovanú elicitinovú doménu z 98 aminokyselín (Tercé-Laforgue *et al.*, 1992). Ďalšími príkladmi s rovnako dlhým signálnym peptidom sú elicitinom podobné proteíny INF2A a INF2B (trieda III) druhu *P. infestans*, s tým rozdielom, že majú na C-terminálnom konci, za elicitinovou doménou, ďalších 67 a 71 aminokyselín (Kamoun *et al.*, 1997).

Väčšina ELL je pravdepodobne asociovaná s bunkovou stenou alebo ukotvená do membrány C-koncom proteínu. Väčšie zastúpenie treonínu, serínu v C-terminálnej doméne niektorých ELI a ELL naznačuje rozsiahlu O-glykozyláciu a pripojenie na bunkovú stenu (Jiang *et al.*, 2006). C-konce niektorých ELL (klady ELL-4 a ELL-8) sú bohaté na prolín, čo naznačuje možné ukotvenie do bunkovej steny. Všeobecne glykoproteíny rastlín bohaté na prolín a hydroxyprolín veľmi často patria medzi komponenty bunkovej steny (Cassab, 1998). Bolo dokázané, že zoospóry oomycét špecificky exprimujú gény ELL (klad ELL-3). Zoospóram oomycét chýba bunková stena, a tak sa predpokladá, že maturované ELL sú upevnené do plazmatickej membrány pomocou glykozylfosfatidylinozitolovej kotvy (Jiang *et al.*, 2006).

### 2.6.3 Funkcie elicitinov

Úroveň expresie génov *eli* a *ell* sa veľmi odlišuje. Vcelku platí, že viac sú exprimované *eli* ako *ell*. Proteíny ELI aj ELL sa líšia svojimi funkciami. Primárnou funkciou ELI je prenos sterolov, nakoľko druhy *Phytophthora* ich nedokážu syntetizovať a napr. elicitiny kladu ELI-1 sú sekretované významne počas rastu mycélia (Jiang *et al.*, 2006). Schopnosť transportovať steroly z cytoplazmatickej membrány rastliny do oomycét napomáha destabilizovať membrány hostiteľa a rozširovať nekrózu, čo prispieva k šíreniu patogénu rastlinnými pletivami (Ptáčková *et al.*, 2015). Ďalej je známe, že proteíny ELI-4 majú fosfolipázovú aktivitu, zatiaľ čo ELL sa nachádzajú predovšetkým v zoospórach (Jiang *et al.*, 2006)

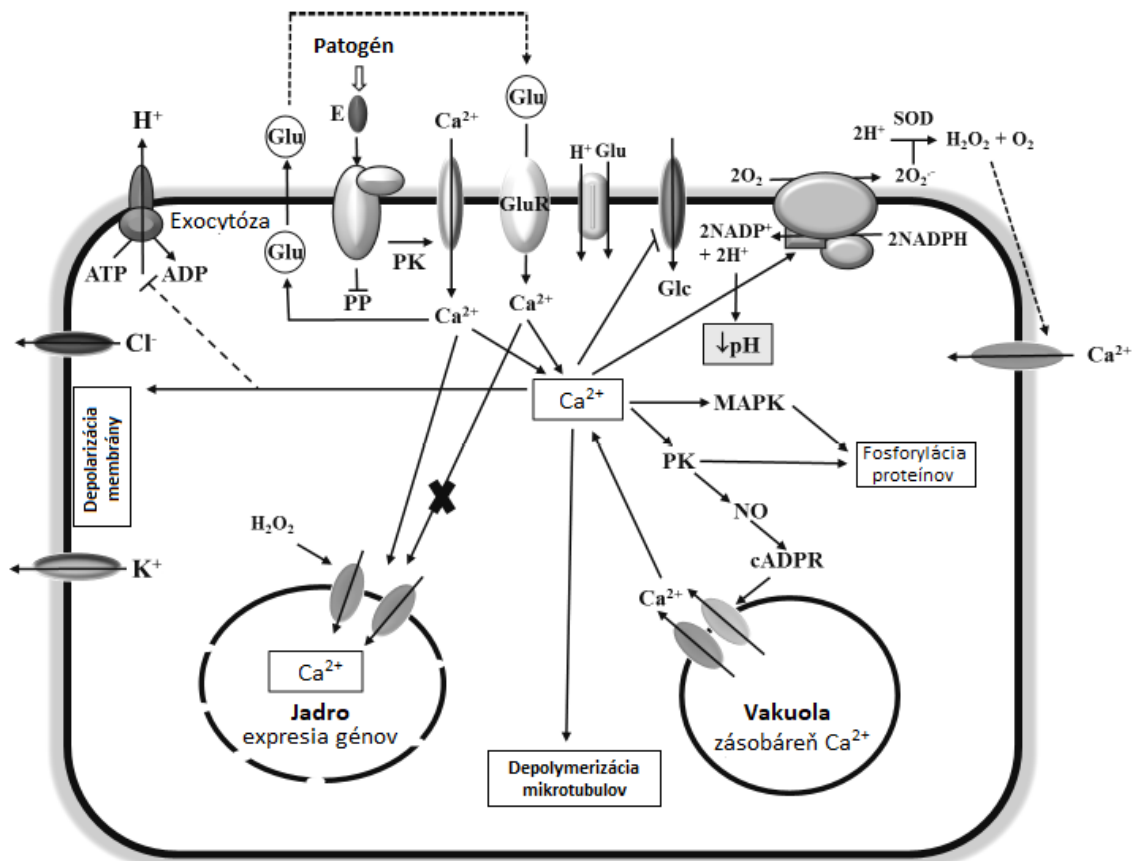
Dôležitou biologickou funkciou elicitinov je schopnosť indukcie obranných reakcií u rastlín a vyvolanie HR. Všeobecne bázické,  $\beta$ -elicitiny, vykazujú vyššiu nekrotickú aktivitu než kyslé,  $\alpha$ -elicitiny, pričom rozhodujúci je pravdepodobne počet lyzínových

reziduí a ich umiestnenie v primárnej štruktúre proteínu. Kryptogein obsahuje 6 lyzínov, v porovnaní s  $\alpha$ -elicitinmi je to dvojnásobné množstvo, a preto patrí medzi bázické elicitiny. Rozloženie náboja na povrchu proteínu je dôležité pri jeho väzbe na vysokoafinitné miesta membrány. Zdá sa, že tri lyzínové reziduá na povrchu proteínu majú kľúčovú úlohu v tejto väzbe (Ptáčková *et al.*, 2015). Jedným z nich je lyzín v pozícii 13, kde sa u kyslých elicitinov nachádza neutrálny valín (Yu, 1995). Ukázalo sa, že zmena náboja mutáciou aminokyselín na povrchu kryptogeinu ovplyvní jeho biologickú aktivitu výraznejšie ako zmena v zastúpení aminokyselín vo vnútri dutiny (Ptáčková *et al.*, 2015).

Lyzín v pozícii 13 je dôležitý pre vyvolanie HR, ale aj pre transport sterolov medzi membránami. Rekombinantný proteín kryptogeinu s mutáciu Lys13Val vykazoval päťkrát nižšiu schopnosť prenášať steroly v porovnaní s divokým typom kryptogeinu. Dôvodom je zmena náboja na povrchu proteínu, ktorá ovplyvňuje správnu orientáciu proteínu vzhľadom k membráne (Plešková *et al.*, 2011).

#### **2.6.4 Signálne dráhy skorej fáze obrannej odpovede rastliny**

Medzi najčastejšie študované elicitiny patrí kryptogein, ktorý u tabaku vyvoláva sled signálnych reakcií (obr. 5) vedúcich k bunkovej smrti vo forme HR. Kryptogein sa reverzibilne viaže na glykozylovaný heterodimérny proteín umiestnený v plazmatickej membráne rastlinnej bunky. Tento proteín plní funkciu receptora, pravdepodobne interaguje aj s elicitinmi parasiticeinom, cinnamominom a capsiceinom, hoci spôsobujú odlišné odpovede rastliny (Bourque *et al.*, 1998).



Obr. 5 Schéma signálnych dráh indukovaných kryptogéinom. Po rozpoznaní elicítinu (E) dochádza k spusteniu mnohých signálnych dráh vedúcich k bunkovej odpovedi. Dochádza k aktivácii proteínkináz, zvyšovaniu hladiny vápenatých iónov v cytosole, produkcii ROS, oxidu dusnatého, ďalej je indukovaná expresia génov spojených s obrannými reakciami rastlín a hypersenzitívnou reakciou (upravené podľa Moricová *et al.*, 2014).

Receptor pre infestín INF1 bol objavený len nedávno v zemiaku *Solanum microdontum* a získal označenie „elicitin response“ (ELR) (Du *et al.*, 2015). ELR je integrálny proteín umiestnený v plazmatickej membráne rastlinnej bunky, kde spolu s proteínom SOBIR1 (supresor proteínu BIR1-1) a koreceptorom BAK1 (kináza asociovaná s BRI1), tiež známy ako SERK3 (somatic embryogenesis receptor kinase 3) vytvára komplex schopný aktivovať signálne dráhy vedúce k obrannej odpovedi. Samotný ELR nemá kinázovú aktivitu, preto sa v membráne asociuje so SOBIR1, ktorý má cytoplazmatickú doménu s kinázovou aktivitou. SOBIR1 je nevyhnutný pre indukciu programovanej bunkovej smrti. Výsledný komplex ELR-SOBIR1-BAK1 sa stabilizuje naviazaním infestínu - INF1 a fosforyluje podriadené proteíny v rámci signálnej dráhy spustenej elicítinom INF1 (Domazakis *et al.*, 2018). ELR týmto spôsobom detekuje hneď niekoľko elicítinov viacerých druhov rodu *Phytophthora*, pretože ELR rozpoznáva konzervovanú elicitínovú doménu. Prenos ELR



do náchylného kultivaru zemiaka mu udelil rezistenciu hneď voči viacerým elicítinom, ktoré produkujú zástupci rodu *Phytophthora* (Du *et al.*, 2015).

Percepciu elicítinu nasleduje aktivácia proteínkináz (PK) a inhibícia proteínfosfatáz (PP), čo spôsobuje otvorenie vápnikových kanálikov a tok  $\text{Ca}^{2+}$  do cytosolu bunky (Bourque *et al.*, 1998). Aktivita proteínkináz je nevyhnutná pre vtok  $\text{Ca}^{2+}$  iónov, ktoré ďalej aktivujú mitogénmi aktivovanú proteínkinázu (MAPK) a PK zapojené v produkcii NO. Vápenaté katióny ďalej spôsobujú tok  $\text{Cl}^-$  a  $\text{K}^+$  z cytosolu do apoplastu, tieto toky iónov vedú k depolarizácii plazmatickej membrány. V odpovedi na elicítiny ďalej dochádza k iniciácii produkcie ROS, inhibícii importu glukózy, inhibícii  $\text{H}^+$ -ATPázy a v neposlednom rade k depolymerizácii mikrotubulov (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

Kanálik SLAC1, ktorý je umiestnený v plazmatickej membráne rastlinnej bunky, je zodpovedný za tok  $\text{Cl}^-$  z bunky do apoplastu a je aktivovaný fosforyláciou na N-konci. Táto fosforylácia je sprostredkovaná integrálnym proteínom - kalcium dependentnou proteín kinázou 6 (CPK6) alebo komplexom CIPK11 (kalcineurin B-like interagujúca proteínkináza) a CBL5 (kalcineurin B-like proteín). CBL5 je senzorom  $\text{Ca}^{2+}$  iónov. Predpokladá sa, že ďalšie proteíny a kanáliky plazmatickej membrány sú riadené zástupcami patriacimi do uvedených dvoch tried proteínov a ich kombinácie majú rôzny dopad na ten istý cieľ, ktorý regulujú (Saito *et al.*, 2018).

Aktivácia MAPK je nezávislá od produkcie ROS, NO a toku aniónov z bunky. Avšak tok aniónov sa podieľa na aktivácii NADPHoxidázy a v konečnom dôsledku na bunkovej smrti (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Nárast hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosole nie je chvíľkový, objavuje sa už 5 minút po ošetrení elicítinom a zvyšuje sa nasledujúcich 90 minút. Zmeny hodnôt pH a hladín ROS v apoplaste sa dajú detegovať takmer okamžite po elicitácii. Na depolarizácii plazmatickej membrány elicítovaných buniek sa zúčastňujú jednak NADPHoxidáza prenosom elektrónov cez membránu, jednak kanáliky umožňujúce tok  $\text{Cl}^-$  do apoplastu a predovšetkým inhibícia  $\text{H}^+$ -ATPázy (Ponchet *et al.*, 1999).

NADPHoxidáza lokalizovaná v plazmatickej membráne je aktivovaná predovšetkým fosforyláciou a naviazaním  $\text{Ca}^{2+}$  iónov. V reakcii katalyzovanej NADPHoxidázou dochádza k tvorbe superoxidových aniónov za spotreby NADPH z pentózového cyklu. Oxidácia NADPH v malej miere tiež prispieva k acidifikácii cytosolu (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Hlavnou príčinou je inhibícia  $\text{H}^+$ -ATPázy, s ktorou sa spája alkalizácia extracelulárneho prostredia zvyšujúca aktivitu NADPHoxidázy produkujúcej ROS, čím dochádza k oxidatívnemu vzplanutiu, tzv. „oxidative burst“ (Ponchet *et al.*, 1999).

Cacas *et al.* (2017) dokázali, že kyselina fosfatidová je pozitívnym regulátorom aktivity NADPHoxidázy a jej množstvo sa rýchlo zvyšuje v bunkách vystavených účinku kryptogéinu. Za produkciu PA sú zodpovedné fosfatidyl-inositolfosfolipáza C (PI-PLC) (EC 3.1.4.11) a diacylglycerolkináza (DGK) (EC 2.7.1.107) (Cacas *et al.*, 2017). Superoxidový anión je ďalej premenený superoxididismutázou (SOD; EC 1.15.1.1) na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ktorý indukuje ďalší tok Ca<sup>2+</sup> z apoplastu do cytosolu a tiež z cytosolu do jadra bunky (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

Zvyšovanie hladiny cytosolického vápnika je spôsobené takisto jeho uvoľňovaním z vnútorných rezerv prostredníctvom inositoltrisfosfát (IP<sub>3</sub>)-dependentných Ca<sup>2+</sup> kanálikov a cADPR-dependentných Ca<sup>2+</sup> kanálikov. Cyklická ADP-ribosa (cADPR) môže byť vytváraná v odpovedi na NO. Nárast Ca<sup>2+</sup> v jadre je závislý iba na IP<sub>3</sub>-dependentnom kanáliku a nie dôsledkom difúzie z cytosolu (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Na zvyšovaní cytosolického vápnika sa podieľa aj ionotropný glutamátový receptor (Kwaaitaal *et al.*, 2012). Bolo dokázané, že kryptogéin navyše indukuje demetyláciu pektínu v bunkovej stene, čo je pravdepodobne spôsobené aktiváciou apoplastickej pektínesterázy vďaka alkalizácii extracelulárneho prostredia. Extracelulárny Ca<sup>2+</sup> sa môže asociovať s týmito demetylovanými pektínmi a dochádza tak k zosilneniu bunkovej steny (Ponchet *et al.*, 1999).

Navzdory tomu, že v signálnej kaskáde spustenej kryptogéinom dochádza viackrát k fosforylácii regulačných proteínov, zatiaľ bolo identifikovaných len niekoľko proteínkináz spomedzi nich dve MAPK, a to SIPK (proteínkináza indukovaná kyselinou salicylovou, *salicylic acid-induced protein kinase*) a WIPK (proteínkináza indukovaná poranením, *wound-induced protein kinase*) (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Kryptogéin tiež spôsobuje aktiváciu niekoľkých PK v bunkovom jadre, ktoré sa líšia v rýchlosti aktivácie a závislosti od vápnika (Dahan, 2009).

### **2.6.5 Signálne dráhy neskorej fáze obrannej odpovede rastlín**

Medzi neskoré reakcie elicitovanej bunky zaraďujeme produkciu ethylénu, ktorá začína po dvoch hodinách, kyseliny salicylovej a jasmonovej (Milat *et al.*, 1991), expresiu WIPK (Xu *et al.*, 2014), ďalej obranných génov vrátane kyslých a bázických PR proteínov, fenylalanínamoniak lyázy (PAL; EC 4.3.1.24), NADPHoxidázy a lipoxygenázy (LOX, EC 1.13.11.x). Ďalšou charakteristickou reakciou neskorej fázy obrannej reakcie rastliny je rozvoj SAR (Bonnet *et al.*, 1996). Po 24 až 48 hodinách od napadnutia patogénom dochádza u rastlín k akumulácii phytoalexínov (napr.

capsidiolu, phytuberinu a phytuberolu) (Milat *et al.*, 1991), ktorých produkcia však nezávisí od oxidatívneho vzplanutia (Rustérucchi *et al.*, 1996). Takisto dochádza k peroxidácii lipidov, ktorá sa často spája s bunkovou smrťou prejavujúcou sa tvorbou nekróz (Ptáčková *et al.*, 2015).

Lipoxygenázy sú nehémové enzýmy obsahujúce železo, ktorých aktivitou vznikajú hydroperoxydy mastných kyselín. U rastlín rozlišujeme dve skupiny lipoxygenáz podľa regiošpecifity dioxygenácie polynenasýtených mastných kyselín, a to 9-LOX a 13-LOX. Kryptogéinom indukovaná peroxidácia lipidov je daná príspevkami peroxidácie lipidov sprostredkovanvej enzýmovou aktivitou 9-LOX a peroxidácie lipidov spôsobenej radikálmi (Ptáčková *et al.*, 2015). Zatiaľ čo radikály reagujú aj s esterifikovanými polynenasýtenými mastnými kyselinami, aktivite LOX predchádza indukcia fosfolipáz a galaktolipáz (Cacas *et al.*, 2005).

Metabolická dráha, v ktorej je zapojená 13-LOX, produkuje okrem iného aj kyselinu jasmonovú (JA), významný fytohormón zapojený v obranných reakciách rastlín v odpovedi na patogény (Stintzi a Browse, 2000). Enzým 13-LOX je neustále aktívny aj u nestresovaného tabaku a jeho aktivita postačuje na akumuláciu množstva JA potrebného na indukciu expresie 9-LOX u tabaku ošetrovaného kryptogéinom (Ptáčková *et al.*, 2015).

## 2.6.6 Úloha ROS v obrane rastlín

Reaktívne formy kyslíka, medzi ktoré patria  $H_2O_2$ , superoxidový anión ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxylový radikál ( $OH^{\cdot}$ ), ako najvýznamnejší zástupcovia, sú vedľajšie produkty kontinuálne vytvárané aeróbnym metabolizmom organizmov. Pre ich silné oxidačné vlastnosti musí byť ich nadbytok detoxifikovaný, aby nedochádzalo k poškodeniu bunkových štruktúr (Halliwell, 2006). ROS sú ďalej produkované na podnet stresových faktorov prostredia, vrátane útoku patogénov. Hlavným zdrojom ROS v interakcii rastlina-patogén sú NADPHoxidázy, u rastlín tiež známe ako RBOH (respiratory burst oxidase homologues), ďalej peroxidázy triedy III, oxalát oxidázy, aminoxidázy, alebo lipoxygenázy (Camejo *et al.*, 2016).

Dôležitú rolu v produkcii aj detoxifikácii ROS, počas fyziologických, aj počas stresových podmienok, zaujíma bunková kompartmentalizácia (Camejo *et al.*, 2016). Množstvo ROS určuje ich úlohu. V nízkych koncentráciách vystupujú ako dôležité signálne molekuly a vo vysokých koncentráciách pôsobia toxicky pre ich silné oxidačné

vlastnosti. Ich významnou vlastnosťou sú taktiež antimikrobiálne účinky (Chen a Schopfer, 1999).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je nenabitá molekula, ktorá dokáže prechádzať membránou. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a OH<sup>•</sup> môžu reagovať s polynenasýtanými mastnými kyselinami v membránach za vzniku lipidových peroxidov. Tento proces vedie k destabilizácii a deštrukcii membrány (Grant a Loake, 2000). Prebytok vysokoreaktívneho OH<sup>•</sup>, ktorý bunky nedokážu detoxifikovať, vedie k bunkovej smrti. K akumulácii ROS dochádza, pretože prevažuje tvorba ROS nad ich detoxifikovaním pomocou antioxidantných systémov, kam sa zaraďuje napr. kataláza (CAT; EC 1.11.1.6) (Camejo *et al.*, 2016).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> má nezastupiteľné postavenie v programovej bunkovej smrti indukovanej kryptogéinom predovšetkým v podmienkach s dostatkom svetla, kedy dochádza k ROS sprostredkovej peroxidácii lipidov (Hoeberichts *et al.*, 2013).

Všeobecne ROS ako signálne molekuly sprostredkujú odpovede počas fyziologických procesov a rovnako v reakcii na biotické a abiotické podnety. ROS sa napr. zúčastňujú aktivácie MAPK, toku Ca<sup>2+</sup> a modifikácii redoxného systému bunky (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

### **2.6.7 Význam NO v obrane rastlín**

Oxid dusnatý je reaktívnou formou dusíka (RNS) a plní mnoho funkcií ako za fyziologických podmienok, tak i v rámci obranných mechanizmov vyvolaných pôsobením stresových faktorov, vrátane interakcií rastlina-patogén (Delledonne *et al.*, 1998).

Ošetrovanie tabakových buniek a listov kryptogéinom vyvoláva rýchlu a krátkodobú produkciu NO. Oxid dusnatý, súčasť signálnej dráhy obranných reakcií rastlín, moduluje expresiu viacerých obranných génov vrátane génov kódujúcich PR proteíny a proteíny sekundárneho metabolizmu, ako bolo preukázané napr. u *Arabidopsis* (Kulik *et al.*, 2015). Cyklický guanozíntrifosfát (cGMP) a cADPR, ktorých produkcia je indukovaná NO, sú potrebné pre indukciu génov kódujúcich PAL a proteíny zapojené v obranných reakciách. Oxid dusnatý sa tiež podieľa na posttranslačnej modifikácii proteínov tým, že reaguje so špecifickými reziduami cysteínu (S-nitrosylácia) a tyrozínu (nitratácia) (Parani *et al.*, 2004). V rastlinách sa NO účastní vyvolania HR spolu s ROS, pričom dôležitý je ich pomer. Štúdia tiež odhalila, že NO môže regulovať elicitorom sprostredkovanú bunkovú smrť aj nezávisle od H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a peroxydusitanu (ONOO<sup>-</sup>) (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

Peroxydusitan vzniká reakciou oxidu dusnatého so superoxidovým radikálom. V prípade, že množstvo ONOO<sup>-</sup> prekročí kapacitu antioxidantných systémov dochádza k nadmernému poškodeniu bunkových štruktúr (proteínov, lipidov, DNA), čo následne môže viesť k bunkovej smrti. V opačnom prípade, pri zachovaní nízkych hladín ONOO<sup>-</sup> v bunke, sa peroxydusitan zúčastňuje bunkovej signalizácie modifikáciou proteínov napr. fosforylačnej kaskády. ONOO<sup>-</sup> môže reagovať s tyrozínom za vzniku nitrotyrozínu, takto modifikované proteíny sa zúčastňujú signálnej transdukcie vrámci odpovede na útok patogénu. ONOO<sup>-</sup> je molekula podieľajúca sa taktiež na regulácii expresie génov zapojených v programovanej bunkovej smrti (Vandelle a Delledonne, 2011).

## 2.6.8 NADPHoxidáza a oxidatívne vzplanutie

U *N. tabacum* sú za oxidačné vzplanutie zodpovedé dve izoformy NADPHoxidázy označované ako RBOHD1 a RBOHD2 (Noirot *et al.*, 2014). Zastúpenie NADPHoxidáz sa u jednotlivých rastlinných druhov líši, napr. u *Arabidopsis* bolo objavených 10 génov kódujúcich NADPHoxidázy (Torres a Dangl 2005). NADPH oxidáza je integrálny enzým, ktorý oxidáciou NADPH na NADP<sup>+</sup> redukuje O<sub>2</sub> na superoxidový anión radikál. Čo sa týka štruktúry NADPHoxidázy, tak v cytosole na C-konci obsahuje doménu s väzbovými miestami pre koenzýmy FAD a NADPH. V membráne sa nachádza šesť transmembránových domén a oxidázová doména, ktorá je lokalizovaná do apoplastu bunky. V cytosole na N-konci proteínu sú dva motívy tzv. EF-hand, ktoré interagujú s Ca<sup>2+</sup>iónmi, ďalej sa tu nachádzajú fosforylačné miesta a miesta interagujúce s kyselinou fosfatidovou (Kadota *et al.*, 2015).

Rozdiely v množstve a lokalizácii NADPHoxidáz v bunke ovplyvňujú priebeh produkcie ROS. Navyše oxidatívne vzplanutie udeľujú charakteristický dvojfázový priebeh. NADPHoxidázy sa nenachádzajú iba v cytoplazmatickej membráne ale tiež sú lokalizované v Golgiho komplexe (GA). U *N. tabacum* Noirot a kolektív (2014) dokázali, že neaktívne NADPHoxidázy uskladnené v GA sú účinkom kryptogénu transportované do cytoplazmatickej membrány, kde sa následne aktivujú a podieľajú na produkcii ROS. Počiatočná tvorba ROS je tak zabezpečená NADPHoxidázami už umiestnenými v plazmatickej membráne, kde sa pravdepodobne vyskytujú v oligomérskej forme. Prvú fázu oxidatívneho vzplanutia charakterizuje pík približne po 15 min od elicitácie, načasovanie sa však môže mierne líšiť, následne hladina ROS klesá.

Asi po hodine nastupuje druhá fáza oxidatívneho vzplanutia, pre ktorú je typický nárast hladiny ROS trvajúci niekoľko hodín, pričom obvykle platí, že hladina ROS je mnohonásobne vyššia ako v prvej fáze. K druhej fáze dochádza iba v interakcii s avirulentným patogénom a často prechádza v hypersenzitívnu reakciu. V tejto fáze je produkcia ROS zabezpečená NADPHoxidázami pochádzajúcimi z GA.

Ako príklad je možné uviesť interakciu *N. benthamiana* a *P. infestans*. Elicitin INF1 interaguje s receptorovým proteínom, čo spúšťa prvú krátkodobú vlnu oxidatívneho vzplanutia. Percepcia efektoru AVR3a a elicitinu INF1 receptormi vedie k aktivácii MAPK kaskády. Fosforylujú sa transkripčné faktory WRKY 7, 8, 9 a 11, ktoré sa viažu na W-box v oblasti promotora génu pre jednu z izoform NADPHoxidázy, konkrétne RBOHB, a spúšťajú jej transkripciu. Nakoniec novosyntetizované RBOHB sú transportované do cytoplazmatickej membrány, kde sa podieľajú na druhej fáze oxidatívneho vzplanutia (Adachi *et al.*, 2015).

## 2.7 Oplyvnenie Ca<sup>2+</sup> signalizácie fosfolipidovým metabolizmom

Rastlinné membrány sú miesta, kde dochádza k percepcii veľkého množstva stimulov. Fosfolipidy sú základné stavebné zložky membrán a slúžia tiež ako zdroj pre vytváranie signálnych mediátorov. Tvorbu zabezpečujú fosfolipázy väčšinou spojené s plazmatickou membránou. Rastlinné fosfolipázy sa delia podľa miesta hydrolyzy v molekule glycerolfosfolipidu na fosfolipázy A1, A2, C a D. Ich aktivitou vznikajú rôzne produkty vrátane kyseliny fosfatidovej (PA), diacylglycerolu (DAG), voľných mastných kyselín a lysofosfolipidov, ktoré plnia dôležité úlohy v regulácii bunkového metabolizmu a fyziologických procesov bunky. Aktivity rozličných fosfolipáz tak majú dopad na integritu membrány, bunkový metabolizmus a regulačné procesy ako sú signálna transdukcía, dynamika cytoskeletu, sekrécia a transport vezikúl. Obsah fosfolipidov v membránach nie je rovnaký a mení sa počas vývoja bunky aj v odpovedi na stresové podnety (Hong *et al.*, 2016).

Fosfolipázy C (PLC) predstavujú skupinu enzýmov, v rámci ktorej existujú rodiny a podrodiny, ktoré sa odlišujú na základe štruktúry, substrátovej špecificity, požiadavkách na kofaktory a alebo reakčné podmienky (Hong *et al.*, 2016). Na základe substrátovej špecificity sa rastlinné PLC delia na dve skupiny, a to na fosfatidyinozitolfosfolipázy (PI-PLC) a fosfatidylcholínfosfolipázy (PC-PLC), tiež známe ako nešpecifické (NPC), pretože dokážu hydrolyzovať fosfatidyletanolamín, fosfatidylcholín aj fosfatidylserín (Singh *et al.*, 2015).

### 2.7.1 Fosfolipáza C

Fosfolipáza C (PI-PLC; EC 3.1.4.11) hydrolyticky štiepi esterovú väzbu špecifického substrátu fosfatidylinozitol-4,5-difosfátu medzi glycerolom a fosfátom za tvorby signálnych molekúl, tzv. druhých poslov, DAG a inozitol-1,4,5-trifosfátu (IP<sub>3</sub>), ktorý prenášajú signál. Konkrétne DAG aktivuje proteínkinázu C a IP<sub>3</sub> zvyšuje hladinu cytosolického vápnika (Singh *et al.*, 2015).

V rastlinách existuje niekoľko izoformiem, u *Arabidopsis* je charakterizovaných deväť PI-PLC (AtPLC-1 až At-PLC-9), avšak nie všetky vykazujú enzýmovú aktivitu. Typická rastlinná PI-PLC obsahuje dve katalytické domény X a Y, ktoré zabezpečujú fosfoesterázovú aktivitu. Konkrétne na C-konci proteínu sa nachádza C2 doména, ktorá zodpovedá za väzbu fosfolipidu, zatiaľ čo na N-konci sa nachádza motív EF-hand, ktorý interaguje s Ca<sup>2+</sup>. V aktívnom centre všetkých funkčných PI-PLC rastlín nájdeme dve konzervované histidínové reziduá (Tasma *et al.*, 2009).

Aktivitu PLC regulujú rozdielne faktory, medzi tie hlavné patria: koncentrácia Ca<sup>2+</sup>, posttranslačné modifikácie a interakcie s inými proteínmi (Singh *et al.*, 2015). V *Arabidopsis* PI-PLC majú viacero fosforylačných miest, ktoré sa môžu líšiť u jednotlivých izoformiem (Durek *et al.*, 2010). Fosforylácia pozitívne reguluje aktivitu PLC. Tiež bolo poukázané na možnú reguláciu aktivity PI-PLC pomocou G-proteínu, ako to bolo popísané u *Pisum sativum* pri zapojení receptora spriahnutého s G-proteínom (Misra *et al.*, 2007).

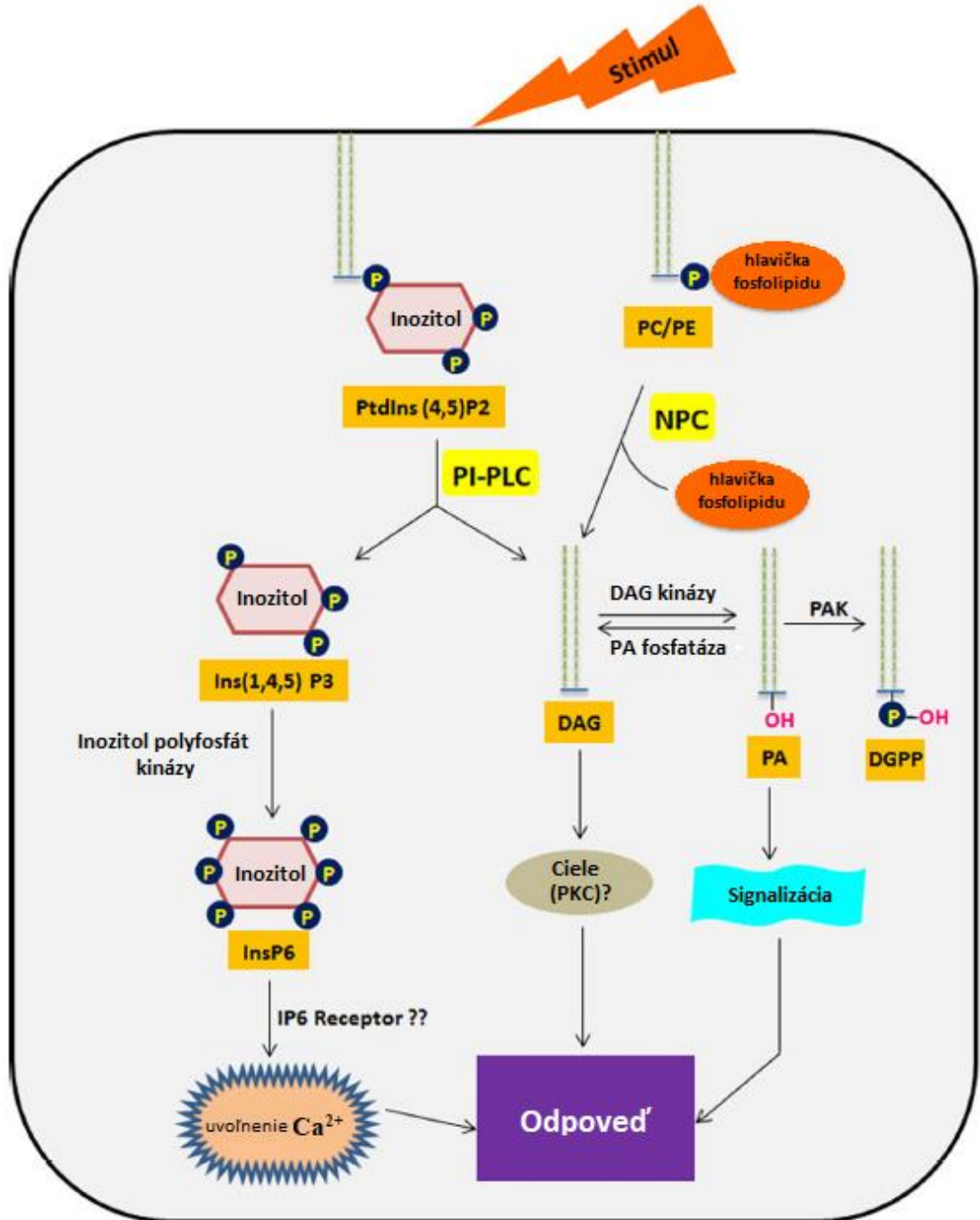
### 2.7.2 Delenie fosfolipáz C

Okrem základného delenia na PI-PLC a NPC môžeme ďalej deliť na rozpustné v cytosole a membránovo viazané. Dostupnosť Ca<sup>2+</sup> ovplyvňuje hlavne ich aktivitu, ďalej lokalizáciu v bunke a okrem toho súvisí s preferenciou substrátov rôznych PI-PLC. Cytosolické katalyzujú optimálne pri milimolárnych koncentráciách Ca<sup>2+</sup>, východiskovou látkou je fosfatidylinozitol. Substrátmi membránových PI-PLC sú fosfatidylinozitol-4-fosfát a fosfatidylinozitol-4,5-difosfát, pre katalýzu sú optimálne mikromolárne koncentrácie Ca<sup>2+</sup>. Na druhej strane aktivita NPC je nezávislá od Ca<sup>2+</sup> (Singh *et al.*, 2015).

### 2.7.3 Funkcia fosfolipázy C v prenose signálu

Fosfolipáza C je u živočíchov hlavný enzým, ktorý hydrolyzuje membránové fosfolipidy na DAG a IP<sub>3</sub> vystupujúce ako signálne molekuly. DAG zostáva pripojený

v membráne a aktivuje protein kinázu C (PKC), zatiaľ čo  $IP_3$  je uvoľnený do cytoplazmy, kde sa viaže na  $Ca^{2+}$  ionotropné kanáliky a spôsobuje uvoľnenie vápnika do cytosolu z vnútorných zásob (Vossen *et al.*, 2010). U rastlín je však situácia iná, hoci  $IP_3$  tiež spôsobuje zvýšenie cytosolického vápnika (obr. 6) (Singh *et al.*, 2015).



Obr. 6 Schéma signálnej dráhy, ktorej sa zúčastňujú fosfolipázy PI-PLC (fosfatidylinositolfosfolipáza C) a NPC (fosfatidyleholínfosfolipáza). PC (fosfatidylcholín), PE (fosfatidyletanolamín), DAG (diacylglycerol), PA (kyselina fosfatidová), DGPP (glyceraldehydbisfosfát), PKC (proteínkináza C) a ďalšie enzýmy katalyzujúce fosforyláciu prípadne defosforyláciu ich produktov (upravené podľa Singh *et al.*, 2015).



Na rozdiel od živočíchov obsahuje cytoplazmatická membrána veľmi málo substrátu fosfatidylinozitol-4,5-difosfátu (van Leeuwen *et al.*, 2007). V rastlinných bunkách sa nenachádzajú receptory IP<sub>3</sub>, výnimkou je jednobunková zelená riasa *Chlamydomonas*, preto je diskutabilné ako je IP<sub>3</sub> zahrnutý v signalizácii. V sekvenovaných genómoch rastlín sa nenašla ani PKC, čo vyvoláva pochybnosti o tom, že DAG je druhým posolom a signálnou molekulou rastlín (Wheeler a Brownlee, 2008).

Predpokladá sa, že u rastlín fungujú druhí posli PA a fosforylované formy DAG a IP<sub>3</sub>, t.j. inozitolhexakisfosfát (IP<sub>6</sub>) a diacylglycerolpyrofosfát (DGPP). Vznikla hypotéza, že IP<sub>3</sub> môže byť najskôr premenený na IP<sub>6</sub> polyinosytolfosfátkinázou a ten spôsobí uvoľnenie Ca<sup>2+</sup> z intracelulárnych zásob. Toto tvrdenie podporuje aj objav IP<sub>6</sub> receptoru v rastlinách. DAG musí byť u rastlín transformovaný na PA, aby sa zachoval prenos signálu. U *Arabidopsis* bolo objavených niekoľko diacylglycerol kináz (DGK) a receptorov pre PA (Arisz *et al.*, 2009).

Fosfolipáza D (PLD) tiež generuje PA ako druhého posla prenášajúceho signál. Rastliny sú však schopné odlišiť PA vytvorenú PLD od PA vzniknutej aktivitou PLC a následne DGK. Štúdie ukázali, že niektoré štruktúrne vlastnosti, ako je dĺžka acylového reťazca a stupeň nenasýtenosti v molekule PA, vytvárané v rámci signalizácie PLD a PLC/DGK, sú konzervované a štruktúrne unikátne pre danú PA (Munnik a Testernik, 2009).

PLC majú dôležitú úlohu v patogéne indukovanej HR, SAR a indukovanej systémovej rezistencii (ISR). Bolo ukázané, že použitie inhibítorov PLC spôsobilo zníženie produkciu fytoalexínov a ROS v tabakových bunkách elicitovaných riboflavínom (Wang *et al.*, 2012) a elicitorom AVR4 pochádzajúcim z *Cladosporium fulvum* (de Jong *et al.*, 2004). V rámci adaptácie na abiotický stres, napr. osmotický, teplotný a chladový, dochádza k zvýšeniu aktivity PLC (Singh *et al.*, 2015).

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Chemikálie

Acetón (Lach-ner, Česká republika), biotin (Sigma-Aldrich, USA), Coomassie Blue G250 (Sigma-Aldrich, Nemecko), D-mannitol (Duchefa, Holandsko), dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Česká republika), 2',7'-dichlorodihydrofluoresceíndiacetát (H<sub>2</sub>DCF DA, Sigma-Aldrich, USA), disodná soľ kyseliny etylendiaminotetraoctovej dihydrát (Sigma-Aldrich, USA), dithiothreitol (Duchefa, Holandsko), fluoresceín diacetát (FDA, Sigma-Aldrich, Nemecko), GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx, Poľsko), glycín (Lachema, Česká republika), hovädzí sérový albumín (Sigma-Aldrich, USA), hydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, Česká republika), hydroxyfenyl fluoresceín (HPF, Sigma-Aldrich, USA), chlorid lantanitý heptahydrát (Koch-Light, Anglicko), chlorid vápenatý bezvodý (Penta, Česká republika), kinetín (Sigma-Aldrich, USA), kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, USA), kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (2,4-D) (Fluka, Nemecko), kyselina fosforečná (Lach-ner, Česká republika), kyselina listová (Sigma-Aldrich, USA), L-glutamín (Merck, Česká republika), luminol (Alexis biochemicals, Švédsko) MES hydrát (Sigma-Aldrich, USA), metanol (Lach-ner, Česká republika), Murashige & Skoog médium vrátane vitamínov (Duchefa, Holandsko), pantotenát vápenatý (Sigma-Aldrich, USA), Pefabloc® SC (Sigma-Aldrich, USA), peroxid vodíka (Penta, Česká republika), poly(vinylpolypyrrolidon) (Sigma-Aldrich, USA), sacharóza (Sigma-Aldrich, USA), síran draselný (Lachema, Česká republika), Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Švédsko), xCEED qPCR SG-1step 2x Mix kit (Institute of Applied Biotechnologies a.s., Česká republika).

### 3.2 Prístrojové vybavenie

Analytické váhy Denver Summit (Denver Instrument, USA), automatické pipety (Eppendorf, Nemecko), digitálne predvážky (Kern, Nemecko), chladená centrifúga stolná 5415R (Eppendorf, Nemecko), laminárny box Bioban-48 (Vetrotecnica, Taliansko), magnetická miešačka (IKA, Nemecko), minitrepačka PST-60 HL plus (Biosan, Lotyšsko), pH metr WTW 526 (inoLab, Nemecko), parný sterilizátor (Tuttnauer, Nemecko), spektrofotometer Reader Synergy HT (BioTek instruments, USA), spektrofotometer Synergy H1 (BioTek, USA); fotoaparát (Sony A330, Čína),

trepačka chladená stolná INNOVA (Eppendorf, Nemecko), trepačka s termostatom ES-20 (Biosan, Lotyšsko), trepačka vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko), vákuová výveva D-lab (Edwards, USA).

### 3.3 Rastlinný materiál a elicitiny

#### 3.3.1 Pestovanie rastlín

Na experimenty boli použité 8 týždňov staré rastliny *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi pestované vo fytotrone pri 25°C, s fotoperiódou 16/8 h.

#### 3.3.2 Kultivácia tabakových buniek

Bunková suspenzia *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi bola kultivovaná v Murashige-Skoog tekutom médiu vrátane vitamínov (Murashige a Skoog, 1962) s dodatočným prídáním niekoľkých látok podľa tab. 1. Médium bolo rozdelené do Erlenmayerových bánk po 100 ml a autoklávované. Podmienky kultivácie: neustále trepanie (160 RPM), 25°C, fotoperiódou 24/0 h. Na experimenty boli použité bunky suspenzie nachádzajúce sa v exponenciálnej fáze rastu vždy po uplynutí 4 dní od pasážovania.

Na pasážovanie bola použitá 7 dní stará bunková suspenzia, z ktorej bolo asepticky v prostredí laminárneho boxu prenesených 25 ml do 100 ml čerstvého média.

Tab. 1 Zloženie 1 l Murashige-Skoog tekutého kultivačného média s prídavkom hormónov, pH 5,5 – 5,7.

Zložka	Množstvo
Murashige-Skoog médium vrátane vitamínov	4405 mg
Glutamín	200 mg
Sacharóza	30 g
Roztok kinetínu (100 mg/l)	1,0 ml
Roztok 2,4-D (220 mg/l)	0,8 ml
Roztok vitamínov (pantotenát vápenatý 300 mg/l, kyselina listová 50 mg/l, biotín 5 mg/l, glycín 200 mg/l)	10,0 ml

### 3.3.3 Elicitiny

Elicitiny kryptogein a jeho mutantná forma CRY K13V spolu s infestinom a jeho mutantnou formou INF V13K/A14T boli pripravené ako rekombinantné proteíny Ústavom biochémie Prírodovedeckej fakulty Masarykovej univerzity v Brne.

## 3.4 Metódy

### 3.4.1 Infiltrácia tabakových listov

Na aplikáciu testovaných látok bol vybraný list štvrtej odnože odspodu rastliny. Na troch odlišných segmentoch toho istého listu bol testovaný vplyv  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elicitinu,  $500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku  $\text{LaCl}_3$ ,  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elicitinu v kombinácii s  $500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$ . Do štvrtého segmentu bola infiltrovaná deionizovaná voda ako kontrola. Vpichom pomocou ihly bola rozrušená epiderma spodnej strany listu, k tomuto miestu sa priložilo ústie injekčnej striekačky a pomalým tlačением piestu striekačky sa vpravil vybraný roztok medzi mezofylové bunky listu.

Po 24-hodinovej inkubácii v svetelnom režime 16/8 h boli infiltrované listy odrezané pomocou skalpelu, a bol na nich zdokumentovaný rozsah nekrózy pomocou fotoaparátu. Následne boli listy vložené do kadičky s vodou a po ďalších 24 hodinách, t.j. 48 h od infiltrácie, bola fotodokumentácia vzniknutých nekroz zopakovaná.

### 3.4.2 Stanovenie životnosti tabakových buniek

Na stanovenie životnosti bola použitá sonda fluoresceín diacetát, ktorá je esterázami metabolizovaná na fluoreskujúci produkt, fluoresceín.

Do mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných po  $100 \mu\text{l}$  bunkovej suspenzie v Murashige-Skoog kultivačnom médiu a  $5 \mu\text{l}$  pracovného roztoku sondy fluoresceín diacetátu (FDA) o koncentrácii  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Fluorescencia bola okamžite zmeraná pri vlnových dĺžkach excitácie a emisie zodpovedajúcich  $490 \text{ nm}$  a  $514 \text{ nm}$ . Mikrotitračná doštička bola následne 15 min inkubovaná (160 RPM,  $25^\circ\text{C}$ ) za tmy. Potom bola fluorescencia opätovne zmeraná. Pre vyhodnotenie sa použil rozdiel v čase 0 a po 15 min.

#### 3.4.2.1 Testovanie vplyvu $\text{LaCl}_3$ na životnosť tabakových buniek a životnosti elicítovaných buniek po aplikácii $\text{LaCl}_3$

Suspenzia buniek v Murashige-Skoog kultivačnom médiu bola rozdelená do požadovaného množstva Erlenmayrových bánk, ktoré boli následne umiestnené

na pol hodinu do inkubátora, aby sa bunky adaptovali na pozmenené podmienky (tzv. ekvilibrácia buniek). Do bánk sa pridalo množstvo zásobného roztoku  $\text{LaCl}_3$ , aby bola dosiahnutá požadovaná výsledná koncentrácia  $\text{LaCl}_3$  v suspenzii tabakovej kultúry. Do jednej z Erlenmayerových bánk bol vždy pridaný iba zodpovedajúci objem deionizovanej vody – kontrolná bunková suspenzia. V prípade testovania vplyvu  $\text{LaCl}_3$  u elicítovaných buniek bol k tabakovej suspenzii pridaný najskôr zásobný roztok  $\text{LaCl}_3$  tak, aby bola výsledná koncentrácia  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následne po 10 minútovej inkubácii, boli pridané zásobné roztoky testovaných elicítinov o výslednej koncentrácii  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ihneď po prídavku  $\text{LaCl}_3$ /elicítinov a premiešaní suspenzie bola premeraná životnosť tabakových buniek, vid'. kapitola 3.4.2. Stanovenie bolo opakované po 4., 8. a 24 hodinách od aplikácie testovaných látok.

### 3.4.3 Spracovanie materiálu pre stanovenie produkcie ROS

Filtráciou na Büchnerovom lieviku za zníženého tlaku bolo odstránené kultivačné médium z bunkovej suspenzie. Bunky boli rozsuspendované v ekvilibračnom médiu pridanom v pomere vždy 10 ml média : 1 g buniek. Ekvilibračné médium bolo pripravené podľa tab. 2. Celkový objem bunkovej suspenzie bol rozdelený do 10 Erlenmayerových bánk, ktoré sa umiestnili do inkubátora (160 RPM,  $25^\circ\text{C}$ ) na jednu hodinu, aby sa bunky adaptovali na pozmenené podmienky (ekvilibrácia buniek). Následne do 5 Erlenmayerových bánk bol pridaný roztok  $\text{LaCl}_3$ , aby jeho výsledná koncentrácia v bunkovej suspenzii bola  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Po 10 minútach od prídavku roztoku  $\text{LaCl}_3$  boli do bunkovej suspenzie pridané elicítiny, aby ich výsledná bola  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V prípade kontroly sa do suspenzie bez  $\text{LaCl}_3$  pridala voda o objeme zodpovedajúcej objemu pridaného zásobného roztoku  $\text{LaCl}_3$ .

Tab. 2 Zloženie 1 l ekvilibračného média pre tabakové bunky, pH 5,8.

Zložka	Množstvo na prípravu 1 l média
D-mannitol	31,88 g
Chlorid vápenatý bezvodý	73,51 mg
Síran draselný heptahydrát	87,14 mg
MES-hydrát	390 mg

### 3.4.3.1 Stanovenie produkcie ROS fluorescenčnými sondami

Na stanovenie bola použitá bunková suspenzia ošetrovaná  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elicítinmi a  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$  po pol hodinovej a troj hodinovej inkubácii (160 RPM,  $25^\circ\text{C}$ ).

Na stanovenie produkcie ROS sa použila fluorescenčná sonda 2',7'-dichlorodihydrofluoresceíndiacetát ( $\text{H}_2\text{DCF DA}$ ) o výslednej koncentrácii  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Na stanovenie vysokoreaktívnych foriem kyslíka (hROS), bola použitá fluorescenčná sonda hydroxyfenyl fluoresceín (HFP) o výslednej koncentrácii  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

$\text{H}_2\text{DCFDA}$  je lipofilná zlúčenina schopná prechádzať bunkovými membránami. Po vstupe do cytosolu je deacetylovaná esterázami buniek na polárny produkt,  $\text{H}_2\text{DCF}$ , ktorý je ľahko oxidovateľný reaktívnymi formami kyslíka na fluoreskujúcu formu dichlorofluoresceín (Crow, 1997). HFP tiež prechádza membránami, ale na rozdiel od  $\text{H}_2\text{DCF DA}$ , reaguje selektívne s hROS, konkrétne s hydroxylovými radikálmi a peroxydusitanovými aniónmi (Setsukinai *et al.*, 2003).

Do jamky mikrotitračnej doštičky sa pipetovalo  $100 \text{ }\mu\text{l}$  elicítovanej bunkovej suspenzie, následne  $15 \text{ }\mu\text{l}$  ekvilibračného média a nakoniec  $10 \text{ }\mu\text{l}$  pracovného  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku fluorescenčnej sondy. Produkcia ROS a hROS bola meraná po pol hodinovej inkubácii s elicítinmi v 5 minútových intervaloch počas 1 hodiny.

Fluorescenčný signál bol v prípade oboch fluorescenčných sond meraný pri vlnových dĺžkach excitácie a emisie zodpovedajúcich  $485 \text{ nm}$  a  $516 \text{ nm}$ . Obsah mikrotitračnej doštičky bol pred každým meraním pretrepávaný po dobu 3 sekúnd.

### 3.4.3.2 Chemiluminiscenčné stanovenie produkcie ROS

Na stanovenie intracelulárnej produkcie ROS bol použitý luminol, ktorý po prídavku k bunkovej suspenzii zareagoval s produkovanými ROS na produkt, ktorý vyžiaril svetelné kvantum ako dôsledok prechodu z excitovaného stavu do základného stavu.

Chemiluminiscenčné stanovenie vnútrobunkovej produkcie ROS bolo monitorované ihneď po prídavku elicítinov k ekvilibrovaným bunkovým suspenziám. Do jamky mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných  $140 \text{ }\mu\text{l}$  reakčného pufru (tab. 3),  $135 \text{ }\mu\text{l}$  bunkovej suspenzie a  $25 \text{ }\mu\text{l}$  pracovného roztoku luminolu o koncentrácii  $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pracovný roztok luminolu bol pripravený riedením zásobného roztoku,  $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  luminolu pripraveného v dimetylsulfoxide, do reakčného pufru. Pracovný roztok bol automaticky dávkovaný spektrofotometrickým readerom Synergy H1 a bola premeraná chemiluminiscencia. Tento postup bol opakovaný pre každý časový interval.

Tab. 3 Zloženie reakčného pufru pre chemiluminiscenčné stanovenie, pH 6,5.

Zložka	Výsledná koncentrácia [mmol·l <sup>-1</sup> ]
D-mannitol	175,0
Chlorid vápenatý bezvodý	0,5
Síran draselný heptahydrát	0,5
MES-hydrát	50,0

### 3.4.4 Spracovanie materiálu pre stanovenie enzýmových aktivít

Z ošetrenej bunkovej suspenzie bolo, podľa potreby po 1 hodinovej alebo 4 hodinovej inkubácii (160 RPM, 25°C), odstránené kultivačné médium filtráciou na Büchnerovom lieviku za zníženého tlaku. Bunky z filtračného papiera boli prenesené na hliníkovú fóliu, zmrazené v tekutom dusíku. Zmrazené bunky boli homogenizované v tekutom dusíku pomocou trecej misky a tĺčiku. Homogenát bol rozdelený na 0,5g alikvoty uskladnené pri -80°C.

#### 3.4.4.1 Príprava extraktov pre stanovenie aktivity vybraných enzýmov

Na prípravu extraktu bol použitý vždy čerstvo pripravený extrakčný tlmivý roztok podľa tab. 4, ktorý sa pridal k homogenizovaným bunkám umiestneným v ľadovom kúpeli v pomere 2 : 1 a zmes bola dôkladne zvortexovaná a ponechaná v ľadovom kúpeli 10 minút za občasného premiešania. Extrakt bol získaný centrifugáciou zmesi (15 000 g, 15 min, 4°C). Supernatant bol prepipetovaný do čistej mikroskúmavky, umiestnený do ľadového kúpeľa a použitý na meranie enzýmových aktivít askorbáteperoxidázy a katalázy.

Tab. 3 Zloženie extrakčného tlmivého roztoku rozpustením navážok v 10 ml 0,1 mol·l<sup>-1</sup> K-fosfátového tlmivého roztoku (pH 7,0) s obsahom disodnej soli etyléndiamintetraoctovej kyseliny o koncentrácii 2 mmol·l<sup>-1</sup>.

Látka	Navážka [mg]	Výsledná koncentrácia
Poly(vinylpolypyrrolidon)	100,00 mg	1,00 %
Dithiotreitol	3,10 mg	2,00 mmol·l <sup>-1</sup>
Pefabloc® SC	1,10 mg	0,50 mmol·l <sup>-1</sup>

### 3.4.5 Spektrofotometrické stanovenie aktivít katalázy a askorbátperoxidázy

Na stanovenie aktivity katalázy sa do jamky mikrotitračnej doštičky pipetovali zložky podľa tabuľky č. 5. Ako blank sa namiesto peroxidu vodíka pipetoval zodpovedajúci objem deionizovanej vody. Po zahájení reakcie bola meraná zmena absorbancie pri 240 nm každých 15 s po dobu 10 min. Aktivita katalázy bola následne vyjadrená ako úbytok  $\text{H}_2\text{O}_2$  v danom časovom intervale, a potom bola spočítaná špecifická aktivita katalázy. Pre výpočet aktivity katalázy bol použitý extinkčný koeficient pre peroxid vodíka,  $\varepsilon = 34,9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Tab. 4 Zloženie reakčnej zmesi pre stanovenie aktivity katalázy

Zložka	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
0,1 mol $\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátový tlmivý roztok (pH = 7,0)	240
Bunkový extrakt (1:2)	20
60 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$ peroxid vodíka	50

Na stanovenie askorbátperoxidázy sa použil 30x zriedený bunkový extrakt. Do jamky mikrotitračnej doštičky sa pipetovali zložky podľa tabuľky č. 6, pričom ako blank sa použila destilovaná voda namiesto peroxidu vodíka. Po zahájení reakcie bola meraná zmena absorbancie pri 240 nm každých 10 s po dobu 2 min. Aktivita askorbátperoxidázy bola následne vyjadrená ako úbytok askorbátu v danom časovom intervale, a potom bola spočítaná špecifická aktivita askorbátperoxidázy. Pre výpočet aktivity askorbátperoxidázy bol použitý extinkčný koeficient pre askorbát  $\varepsilon = 2,8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .



Tab. 6 Zloženie reakčnej zmesi pre stanovenie aktivity askorbátperoxidázy

Zložka	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
0,1 mol·l <sup>-1</sup> fosfátový tlmivý roztok (pH = 6,0)	150
Kyselina askorbová 1,75 mmol·l <sup>-1</sup>	40
Bunkový extrakt (1:2) 30-krát zriedený	50
10 mmol·l <sup>-1</sup> peroxid vodíka	50

### 3.4.6 Stanovenie proteínov Bradfordovou metódou

Na stanovenie obsahu celkových proteínov sa do jamky mikrotitračnej doštičky napipetovalo 45  $\mu\text{l}$  destilovanej vody, 5  $\mu\text{l}$  štandardu hovädzieho sérového albumínu alebo vhodne nariedenej vzorky rastlinného extraktu a 200  $\mu\text{l}$  pracovného roztoku Bradfordovho činidla, ktorý bol pripravený nariedením zásobného roztoku Coomasie Blue G-250 destilovanou vodou v pomere 1:4. Zásobný roztok Coomasie Blue G-250 bol pripravený podľa tab. 7. Po 5 minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 595 nm.

Vzorky aj štandardy boli zmerané v triplikáte. Kalibračná krivka bola vyhotovená použitím hovädzieho sérového albumínu v rozsahu koncentrácií 0,2 - 1,4 mg/ml.

Tab. 7 Zloženie 100 ml zásobného roztoku Coomasie Blue.

Zložka	Množstvo
Coomasie Blue G250	50 mg
Metanol	25 ml
85% kyselina fosforečná	50 ml

### 3.4.7 Izolácia RNA

Na izoláciu RNA z rastlinného materiálu bol použitý GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit firmy EURx. Ku každej vzorke v mikroskúmavke (0,120 g) boli pridané stabilizačné roztoky 100  $\mu$ l RL roztoku a 200  $\mu$ l LG roztoku, ktoré boli zmiešané s  $\beta$ -merkaptóetanolom v pomere 10  $\mu$ l merkaptóetanolu na 1 ml roztoku. Zmes bola vortexovaná 1 min a následne centrifugovaná pri 16000 g, 4 min, 25°C. Do novej sterilnej mikroskúmavky bolo pridaných 200  $\mu$ l RL roztoku a následne 200  $\mu$ l supernatantu. Premiešaná zmes bola napipetovaná na žltú kolónku, nasledovala centrifugácia pri 16000 g, 2 min, 25°C. Do mikroskúmavky s eluátom bolo pridaných 300  $\mu$ l 96% etanolu, zmes bola premiešaná a napipetovaná na bielu kolónku viažucu RNA. Vzorka na bielej kolónke bola centrifugovaná pri 11000 g, 1 min, 25°C. Nakoniec bolo na bielu kolónku pridaných 400  $\mu$ l Wash DN1 roztoku a zmes bola centrifugovaná pri 11000 g, 1 min, 25°C, eluát bol odstránený. Priamo na kolónku sa pridalo 50  $\mu$ l roztoku DNázyI (1U/ $\mu$ l) a nechalo sa inkubovať 10 min pri laboratórnej teplote, potom sa pridalo 400  $\mu$ l Wash RB1 roztoku a vzorka bola scentrifugovaná pri 11000 g, 1 min, 25°C. Na premytie kolónky sa použilo 650  $\mu$ l Wash RBW roztoku a vzorka sa scentrifugovala opäť pri 11000 g, 2 min, 25°C. Druhé premytie a scentrifugovanie pri 11000, 2 min, 25°C bolo vykonané po prídavku 350  $\mu$ l Wash RBW roztoku. Biela kolónka so vzorkou bola prenesená do novej 1,5ml sterilnej mikroskúmavky, potom sa pridalo 50  $\mu$ l sterilnej RNase-free vody priamo na membránanu kolónky, ktorá potom bola scentrifugovaná pri 11000 g, 1 min., 25°C (elúcia RNA). Po odstránení bielej kolónky bola mikroskúmavka s izolovanou RNA zamrazená pre ďalšiu prácu pri -80°C.

### 3.4.8 Meranie koncentrácie a čistoty RNA

Koncentrácia a čistota izolovanej RNA bola zmeraná na spektrofotometrickom readeri Synergy H1 s použitím doštičky Take3. V duplikáte bola stanovovaná absorbančia pri vlnových dĺžkach 260 nm a 280 nm. Na meranie sa použili 2  $\mu$ l vzorky a RNase-free voda ako blank. Na výpočet koncentrácie RNA boli použité hodnoty absorbiancie pri 260 nm, z ktorých program Gene5 určil koncentrácie RNA. Čistota izolovanej RNA sa hodnotí podľa pomeru absorbiancií A260 : A280. Výsledný pomer väčší než 2 znamená dostatočnú čistotu.

### 3.4.9 Reverzná transkripcia

Pomocou Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) bol uskutočnený prepis mRNA do komplementárnej DNA (cDNA). Na prípravu vzorky o objeme 11,4  $\mu$ l treba 1  $\mu$ g izolovanej RNA, 1  $\mu$ l Anchored-oligo (dT)18 primeru (50  $\mu$ mol/l) a RNase-free voda. Vznikutá zmes bola inkubovaná 10 min v termostate pri teplote 65°C, a potom chladené na ľade.

Bol pripravený potrebný objem premixu podľa počtu vzoriek (tab. 8). K jednotlivým vzorkám bolo napipetovaných 8,6  $\mu$ l premixu. Nasledovala inkubácia 30 min, pri 45°C. Po skončení inkubácie bola reverzná transkriptáza inaktivovaná 5 min inkubáciou pri 85°C. Po ochladení boli vzorky cDNA uskladnené pri -20°C.

Tab. 8 Zloženie premixu aplikovaného k jednej vzorke izolovanej mRNA

Zložka	Množstvo
5x reakčný pufor	4,0 $\mu$ l
Inhibítor RNáz	0,5 $\mu$ l
dTNP	2,0 $\mu$ l
DTT	1,0 $\mu$ l
Reverzná transkriptáza	1,1 $\mu$ l

### 3.4.10 Real-time qPCR

Real-time PCR bola vykonaná použitím kitu pre qPCR: Xceed qPCR SG 1-step 2x Mix (Institute of Applied Biotechnologies). Do doštičky určenej na PCR bol napipetovaný premix podľa tab. 9. Následne bol pridaný DNA templát 1  $\mu$ l cDNA riedený 1:1. Napipetovaná doštička bola umiestnená do cycleru a bol spustený program: pre 1. cyklus 95°C (2 min) (aktivácia polymerázy) a zvyšných 39 cyklov pre denaturáciu 95°C (5 s), naviazanie primerov 60°C (30 s) a elongáciu 60°C (30 s). Po prebehnutí 39 cyklov nasledovalo ochladenie na 4°C. Nasledovala analýza kriviek topenia. V práci boli študované gény *RBOHD1* a *RBOHD2*, ako housekeeping gény boli použité gény pre aktín a EF-1 $\alpha$ . Sekvenciu primerov sú uvedené v tab. 10.

Tab. 9 Zloženie premixu na 1 reakciu PCR

Zložka	Množstvo
Xceed qPCR SG 2x Mix	5,00 $\mu$ l
3 $\mu$ mol/l forward primer	1,33 $\mu$ l
3 $\mu$ mol/l reverse primer	1,33 $\mu$ l
Sterilná voda	1,34 $\mu$ l

Tab. 10 Sekvencie primerov

Gén	Forward primer	Reverse primer
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	TGTGATGTTTTTGTTCGGTC TTTA	TCAAAAGAAAATGCAGACAGA CTCA
<i>aktín</i>	CCATTCTTCGTTTGGACCTT	TTCTGGGCAAGGGAACCT
<i>RBOHD1</i>	CATCAAAACAGCTAAGGA CACAG	GTACACAATAGGGAGAGTTGG TAGAC
<i>RBOHD2</i>	AGATACCAAGGGAATTAA GAATGTG	GGCACCCATCAAAAGAGG

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Nekrotické účinky elicitinov na listy *Nicotiana tabacum*

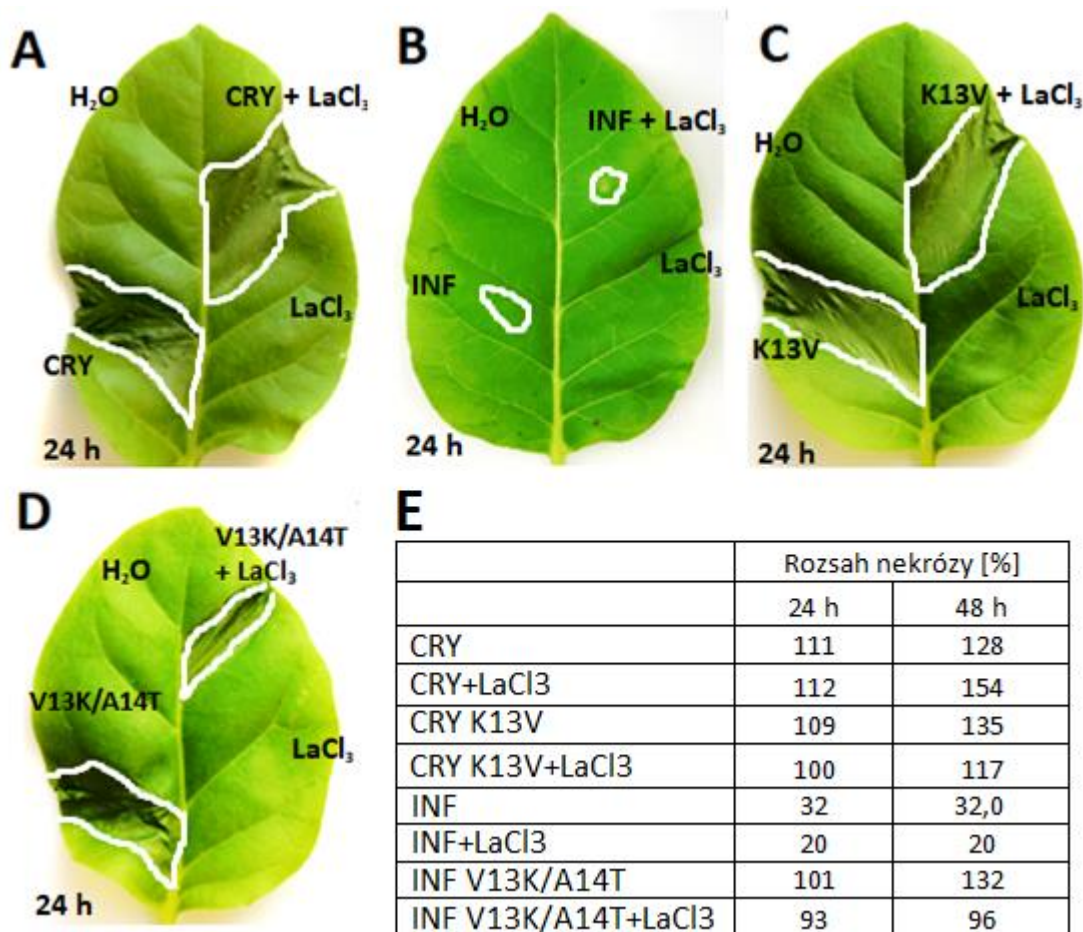
Elicitiny produkované fytopatogénnymi oomycétami vedú k hypersenzitívnej reakcii a systémovej získanej rezistencii u vybraných druhov rastlín (Bonnet *et al.*, 1996). Všeobecne platí, že bázické elicitiny vykazujú vyššiu nekrotickú aktivitu než kyslé, ktoré sú produkované vždy, zatiaľ čo bázické produkujú len niektoré z fytopatogénnych oomycét (Ponchet *et al.*, 1999).

Medzi bázické elicitiny radíme kryptogein, medzi kyslé infestin. Rekombinantný proteín CRY K13V je mutantnou formou kryptogeinu, ktorá má v pozícii 13 nepolárny valín namiesto bázického lyzínu. Táto zámena aminokyselín je sprevádzaná poklesom hodnoty pI proteínu a vedie k zníženiu jeho nekrotických účinkov. Dochádza teda k priblíženiu vlastnostiam typickým pre kyslé elicitiny (O'Donohue *et al.*, 1995). Naopak u rekombinantného proteínu infestinu označeného INF V13K/A14T je v pozícii 13 valín zamenený za lyzín a súčasne v pozícii 14 je alanín nahradený treonínom. V tomto prípade mutácia spôsobuje zvýšenie hodnoty pI tohto proteínu s čím narastá i jeho nekrotický účinok.

Chlorid lantanitý funguje ako blokátor vápnikových kanálikov v cytoplazmatickej membráne (Knight *et al.*, 1997). Vápnikové ióny, ako druhé posly, sú dôležité v procese signálnej transdukcie a použitie blokátora vápnikových kanálikov spôsobuje zablokovanie signálnych dráh podriadených  $\text{Ca}^{2+}$  signalizácii, ktorá zaujíma dôležitú rolu i v signálnych dráhach obranných reakcií rastlín aktivovaných aplikáciou elicitinov (Kadota *et al.*, 2004). V našom prípade sa to prejavilo slabým poklesom v rozsahu nekrózy (obr. 7 E). Výnimkou bol však kryptogein, ktorý v kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  vyvolal rozsiahlejšiu nekrózu po 48 hodinách od infiltrácie listu (obr. 7 E).

Zaujímavé je, že infestin, ktorý u tabaku nekrotické lézie nevyvoláva (Panabières *et al.*, 1998), v našom experimente na tabakových listoch vyvolal tvorbu malých nekrotických zón (obr. 7 B). Tento pilotný experiment bol vykonaný iba jedenkrát pre zhodnotenie možného vplyvu  $\text{LaCl}_3$  na zmeny v rozsahu vytváraných nekroz po infiltrácii tabakových listov testovanými elicitinmi. Tento výsledok tak mohol byť podmienený prípadným oslabením rastliny, na ktorej bol účinok infestinu testovaný. V súlade s O'Donohue a kolektívom (1995) sme detekovali znížený stupeň nekrózy u mutantnej formy kryptogeinu CRY K13V. A naopak, u mutantnej formy infestinu

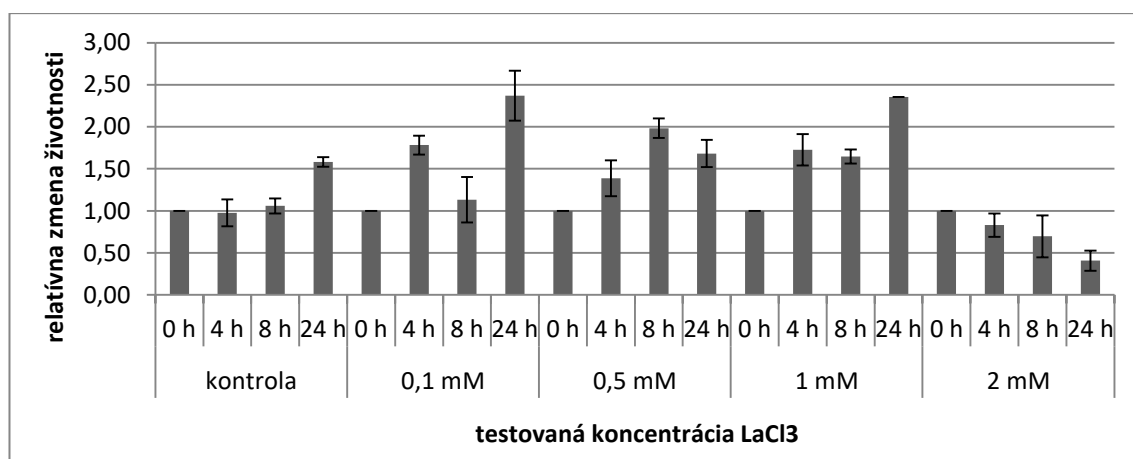
INF V13K/A14T bol pozorovaný opačný účinok, čo dokazuje významnosť lyzínu v pozícii 13 primárnej štruktúry elicítinu pre jeho nekrotický účinok (Plešková *et al.*, 2011).



Obr. 7 Zhodnotenie nekrotických účinkov elicítinov v kombinácii s blokátorom vápnikových kanálikov (LaCl<sub>3</sub>) na listoch *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi. Koncentrácia elicítinov 100 nmol·l<sup>-1</sup>; koncentrácia LaCl<sub>3</sub> 500 mmol·l<sup>-1</sup>. Použité elicítiny: (A) kryptogein (CRY) a (B) jeho mutantná forma CRY K13V, (C) infestin (INF) a (D) jeho mutantná forma INF V13K/A14T. (E) Zhodnotenie rozsahu nekrotickej plochy vzhľadom na infiltrovanú plochu segmentov listov po 24 a 48 hod. od infiltrácie listov testovanými látkami.

## 4.2 Vplyv elicitinov na životnosť bunkovej suspenzie *Nicotiana tabacum* po zablokovaní $\text{Ca}^{2+}$ kanálikov

Na stanovenie zmien v životnosti tabakových buniek po ošetrení  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elicitinmi a  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$  bola použitá sonda fluoresceín diacetát (FDA). Testovaniu životnosti predchádzalo nájdenie vhodnej koncentrácia blokátora vápnikových kanálikov -  $\text{LaCl}_3$ . Z obr. 8 vyplýva, že koncentrácia  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$  negatívne neovplyvňuje životaschopnosť neelicitovaných buniek., preto bola vybratá pre ďalšie experimenty. Zvolená koncentrácia  $\text{LaCl}_3$  bola použitá i v ďalších štúdiách zaoberajúcich sa problematikou signalizácie  $\text{Ca}^{2+}$  iónmi (Lachaud *et al.*, 2011; Liu a Hasenstein, 2005). Vyššia testovaná koncentrácia,  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$ , sa ukázala ako nevhodná. Už po 8. hodine od ošetrenia začal byť pozorovaný výraznejší negatívny vplyv na životaschopnosť tabakových buniek (obr. 8).



Obr. 8 Testovanie vplyvu zvyšujúcej sa koncentrácie blokátora vápnikových kanálikov,  $\text{LaCl}_3$ , na životnosť tabakových buniek. Stanovenie životnosti pomocou fluorescenčnej sondy FDA v časových intervaloch 0, 4, 8 a 24 hodín od aplikácie  $\text{LaCl}_3$ . Testované koncentrácie 0,1; 0,5; 1,0 a 2,0  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Stanovenie bolo vykonané v biologickom triplikáte.

Ďalej sa v predloženej práci testovala životaschopnosť elicitovanej bunkovej suspenzie *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi po blokácii  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov v porovnaní so zmenami v životaschopnosti týchto buniek vyvolanými nekrotickým účinkom samotných elicítinov (obr. 9). V kontrolnej bunkovej suspenzii vidíme, že dochádzalo k poklesu životnosti buniek v 4. a 8. hodine od začiatku experimentu, čo mohlo byť spôsobené stresom vyvolaným manipuláciou s bunkovou kultúrou. Po 24 hodinách sa zaznamenal nárast fluorescenčného signálu v dôsledku rastu a delenia sa buniek za priaznivých kultivačných podmienok.

V bunkovej suspenzii ošetrenej kryptogeinom došlo k výraznému poklesu životaschopnosti po 24 hodinách od aplikácie tohto elicítinu. Teoreticky mala byť pozorovaná takmer nulová životnosť, pretože základný kryptogein už o koncentrácii  $5 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  vykazuje pre tabakové bunky vysoký nekrotický účinok vedúci k bunkovej smrti (Sedlár, 2018). V kombinácii kryptogeinu s  $\text{LaCl}_3$  však sledujeme menší a postupný pokles životnosti po 4 h, ktorý sa v čase 8 h od elicitácie prehĺbuje ale po 24 h životnosť výrazne narastá. V čase 4 h od aplikácie kryptogeinu k tabakovým bunkám, najskôr ošetreným prídavkom  $\text{LaCl}_3$ , nedošlo k tak veľkému poklesu životnosti ako v prípade samotného kryptogeinu, ktorý spôsobil prudší pokles životnosti práve už po 4 h. Toto pozorovanie by mohlo byť vysvetlené zablokovaním bunkovej odpovede na úrovni vápnikovej signalizácie, vedúcim k potlačeniu indukcie HR, pre ktorú je typická programovaná bunková smrť.

Mutantná forma kryptogeinu, CRY K13V, má v porovnaní s kryptogeinom menej negatívny vplyv na životaschopnosť tabakových buniek (O'Donohue *et al.*, 1995), ako vyplýva aj z nášho stanovenia (obr. 9). CRY K13V v kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  spôsobili postupné klesanie životnosti buniek v čase 4 h a 8 h od elicitácie. Po 24 h však životnosť stúpla na úroveň životnosti bunkovej suspenzie ošetrenej iba CRY K13V.

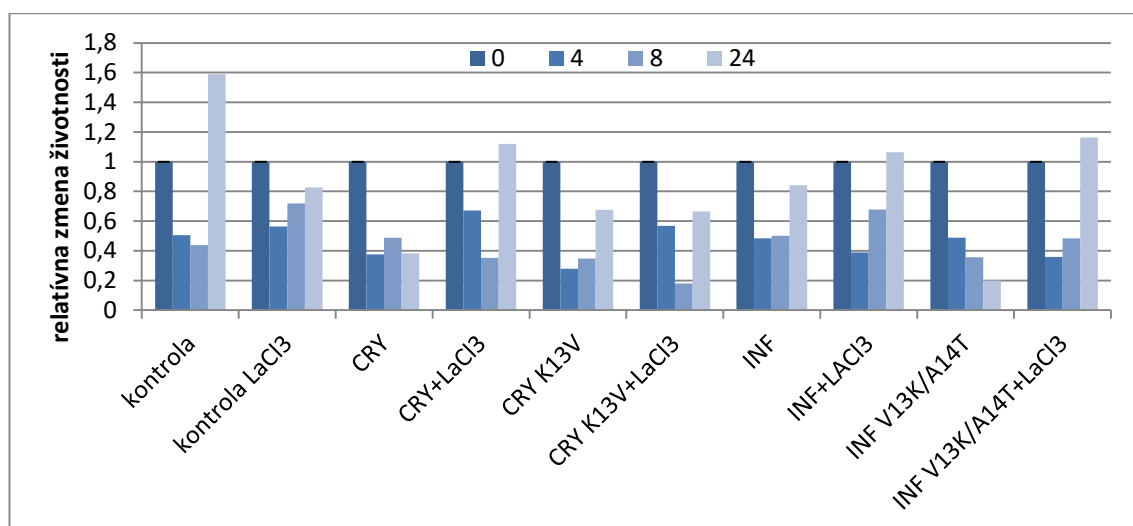
Pokles životnosti u infestínu, ktorý nevykazuje u tabaku nekrotické účinky a nespôsobuje tak smrť buniek, je porovnateľný s kontrolou, až na rozdiel v zmeranej životnosti po 24 h. S prídavkom  $\text{LaCl}_3$  sa životnosť infestínom elicitovaných buniek výrazne nezmenila (obr. 9). Antonín Sedlár (2016) vo svojej bakalárskej práci sledoval zmeny životnosti tabakovej bunkovej kultúry použitím redoxného indikátora resazurínu. Po štvrtej hodine však nezaznamenal pokles životnosti, aký je prezenovaný na obr. 9. V jeho prípade zmena životnosti v čase bola minimálna a porovnateľná s kontrolou. Pokles životnosti mohol byť spôsobený stresom vyvolaným manipuláciou s bunkovou kultúrou, vzhľadom na to, že i v kontrolnej bunkovej suspenzii došlo k porovnateľnému



poklesu signálu fluorescencie. Po 24 hodinách došlo k zvýšeniu životnosti, ktorá však nedosahovala úroveň kontroly, čo mohlo byť spôsobené odlišnou rýchlosťou v delení buniek ovplyvnených elicitiu.

Mutantná forma infestinu INF V13K/A14T vykazuje zvýšené nekrotické účinky na listoch tabaku, čo sa odrazilo v stanovenej životnosti buniek. Životnosť s časom postupne klesala. V kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  INF V13K/A14T po prvotnom poklese životnosti v čase 4 h sa množstvo životaschopných buniek zvyšovalo (obr. 9).

Výsledky získané aplikáciou kryptogeinu, infestinu a INF V13K/A14T, vždy po predchádzajúcej aplikácii  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$  súhlasia so skutočnosťou, že potlačenie bunkovej odpovede na úrovni vápnikovej signalizácie, nevedlo k tak silnej indukcii HR, pre ktorú je charakteristická smrť buniek. My teda nepozorujeme pokles v stanovenej životnosti buniek v takej miere, ako u tabakových buniek ošetrovaných samotnými elicitiu. S výnimkou elicitiu INF, ktorý nekrotické účinky nevykazuje (Panabières *et al.*, 1998).



Obr. 9 Testovanie životnosti buniek *N. tabacum* po elicitácii a elicitovaných buniek *N. tabacum* po predchádzajúcej aplikácii blokátora  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov v časových intervaloch 0, 4, 8 a 24 hodín od aplikácie elicitiu. Koncentrácia elicitiu  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; koncentrácia  $\text{LaCl}_3$   $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použité elicitiu: kryptogein (CRY) a jeho mutantná forma CRY K13V, infestin (INF) a jeho mutantná forma INF V13K/A14T.

### 4.3 Stanovenie produkcie ROS

Po rozpoznaní elicítinu dochádza k aktivácii signálnych dráh, vedúcich, okrem iného, k tvorbe ROS (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Elicitiny všeobecne spôsobujú prudký nárast produkcie ROS, ktorý môže prebiehať v dvoch fázach (Noirot *et al.*, 2014). U rastlín sú hlavným producentom reaktívnych foriem kyslíka NADPHoxidázy, označované tiež ako RBOH, ktoré sú všeobecne regulované okrem posttranslačných modifikácii, ako je napr. fosforylácia, aj asociáciou s RacGTPázou (Oda *et al.*, 2010), ich aktivita ďalej môže byť regulované hladinou ATP (Song *et al.*, 2006) a významnú rolu v regulácii aktivity NADPHoxidáz tiež zaujímajú vápenaté ióny (Cacas *et al.*, 2017).

#### 4.3.1 Chemiluminiscenčné stanovenie produkcie ROS

Priebeh produkcie ROS, v kultúre tabakových buniek, bol sledovaný s využitím chemiluminiscenčnej sondy luminolu, ktorý po prídavku k bunkovej suspenzii zreagoval na produkt vyžarujúci svetelné kvantum ako dôsledok prechodu z excitovaného stavu do základného stavu.

Výhodou tohto stanovenia je, okrem vysokej citlivosti metódy, že umožňuje priame monitorovanie časového priebehu produkcie ROS vo zvolených časových intervaloch. Zmeny v tvorbe ROS u elicítovaných tabakových buniek v kombinácii s aplikáciou  $\text{LaCl}_3$  boli sledované po dobu 7 hodín, počas ktorých bolo možné detekovať maximá oboch fáz produkcie ROS. V čase objavenia sa maxima v prvej fáze oxidatívneho vzplanutia (0-90 min) a druhej fáze oxidatívneho vzplanutia (240-300 min) bola produkcia ROS monitorovaná v 15 min intervaloch, v ostatných časových úsekoch bola hladina vzniknutých ROS detekovaná v dlhšom časovom intervale, a to každých 30 min.

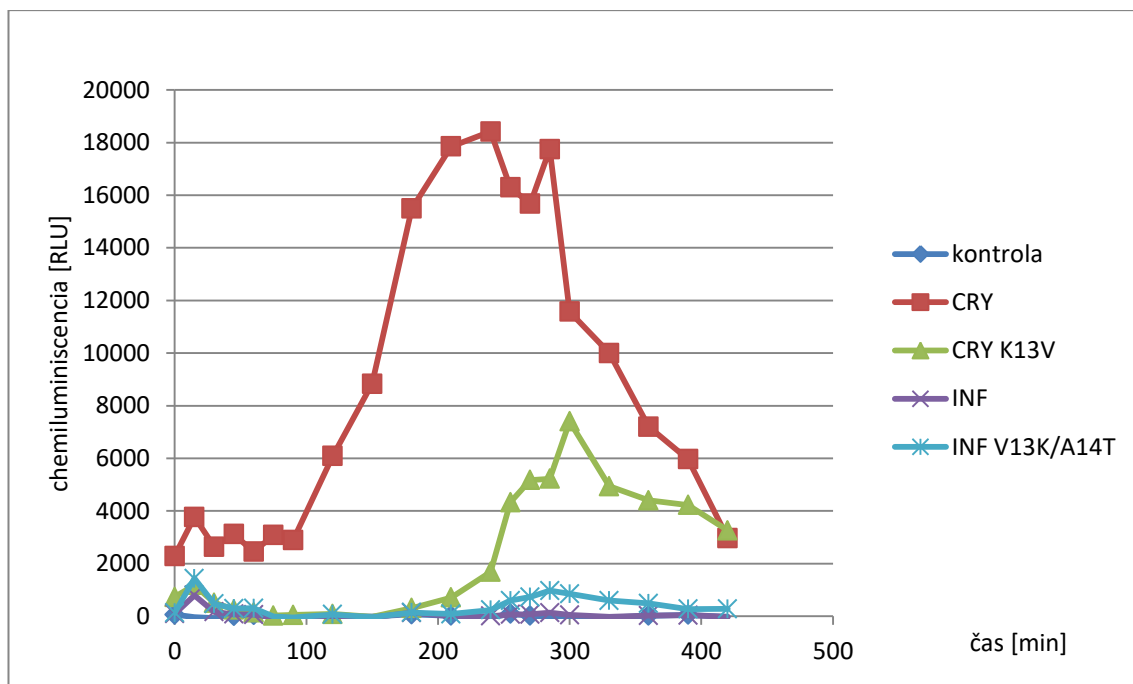
Ako už bolo uvedené, oxidatívne vzplanutie u kryptogéinom elicítovaných buniek má dve fázy (Noirot *et al.*, 2014), čo taktiež bolo pozorované (obr. 10). Rekombinantný proteín CRY K13V spôsobil slabý nárast hladiny ROS v druhej fáze oxidatívneho vzplanutia, pričom infestin ako kyslý elicítin nevyvolal tvorbu ROS v druhej fáze oxidatívneho vzplanutia vôbec. Z výsledkov (obr. 10) vyplýva, že lyzín v pozícii 13 je dôležitý pre vyvolanie produkcie ROS. Zo závislosti produkcie ROS na čase tiež vyplýva, že po prvej krátkotrvajúcej fáze dochádza k poklesu produkcie ich tvorby, čo môže byť spôsobené posttranslačnou modifikáciou, konkrétne S-nitrosyláciou NADPHoxidázy odohrávajúcej sa na Cys890 (Yun *et al.*, 2011). Následné zvyšovanie

hladín ROS v druhej fáze oxidatívneho vzplanutia je pravdepodobne spôsobené presunom neaktívnej NADPHoxidázy z vnútorných zásob, hlavne Golgiho komplexu, do cytoplazmatickej membrány, kde sa následne aktivuje (Noirot *et al.*, 2014).

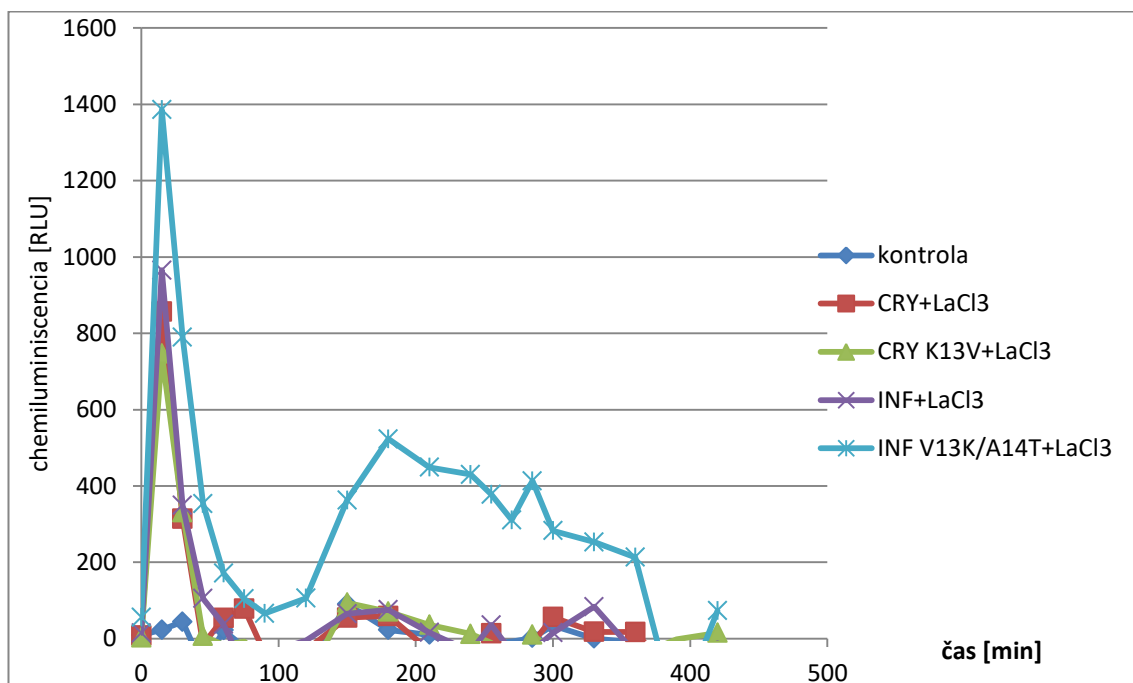
U vzoriek s použitím  $\text{LaCl}_3$  a CRY môžeme vidieť nárast hladiny ROS v prvej fáze, ktorý je ale cca 5x nižší v porovnaní s produkciou ROS po aplikácii iba CRY. Druhá fáza produkcie ROS je takmer úplne potlačená. Výnimkou je efekt INF, kedy v prítomnosti  $\text{LaCl}_3$  boli detekované dve fázy produkcie ROS, ale v porovnaní s aplikáciou elicitínu bez  $\text{LaCl}_3$  je produkcia cca 15x nižšia. Pre nedostatok  $\text{Ca}^{2+}$  nedochádza k tvorbe ROS, čo môže byť spôsobené zablokovaním tvorby PA alebo transportu NADPHoxidáz zo zásob do plazmatickej membrány (Noirot *et al.*, 2014), prípadne zablokovaním mechanizmu aktivácie NADPHoxidáz. Výsledok stanovenia tak môže zodpovedať nasledujúcemu predpokladu.

Po elicitácii kryptogéinom dochádza k prudkému nárastu kyseliny fosfatidovej (PA), dosahujúcej maximum, po 10 minútach od elicitácie, ktorého hladina je udržiavaná nasledujúcu hodinu. Fosfolipázy C z rodiny PI-PLC sú kalcium dependentné enzýmy a použitie blokátora vápnikových kanálikov vedie k inhibícii tvorby PA, ako bolo dokázané pomocou rádioaktívneho značenia (Cacas *et al.*, 2017). Je tak zamedzené toku  $\text{Ca}^{2+}$  do cytosolu, a to vedie k zablokovaniu signálnej transdukcie a k potlačeniu tvorby PA, čo zabráni v aktivácii NADPHoxidázy a následnej tvorbe ROS.

Zhang a kolektív (2009) dokázali, že fosfatidová kyselina priamo interaguje s NADPHoxidázou u *Arabidopsis* prostredníctvom domény viažucej PA nachádzajúcej sa na N-konci NADPHoxidázy. Z porovnania sekvencií NADPHoxidázy *Arabidopsis* a NADPHoxidázy tabaku vyplýva, že primárna štruktúra domény viažucej PA, vrátane dvoch aminokyselín podieľajúcich sa na priamej interakcii s PA, sú konzervované u oboch týchto rastlín, preto sa dá predpokladať, že u *N. tabacum* je NADPHoxidáza regulovaná taktiež prostredníctvom PA (Cacas *et al.*, 2017). Na základe toho sa dá očakávať, že použitie  $\text{LaCl}_3$  zablokuje vápnikové kanáliky, čo spôsobí potlačenie produkcie ROS, prostredníctvom zablokovania tvorby PA.



Obr. 10 Intracelulárna produkcia ROS u bunkovej suspenzie *N. tabacum* po aplikácii elicitinov (o koncentrácii  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) bez blokátora vápnikových kanálikov. Detekcia luminolom. Závislosť produkcie ROS na čase zobrazuje obe fázy oxidatívneho vzplanutia s výnimkou ošetrenia tabakovej kultúry INF, u ktorej je zvýšená produkcia ROS pozorovaná iba v prvej fáze obrannej reakcie. CRY - kryptogein, CRY K13V – mutantná forma kryptogeinu, INF – infestin, INF V13K/A14T – mutantná forma infestinu.

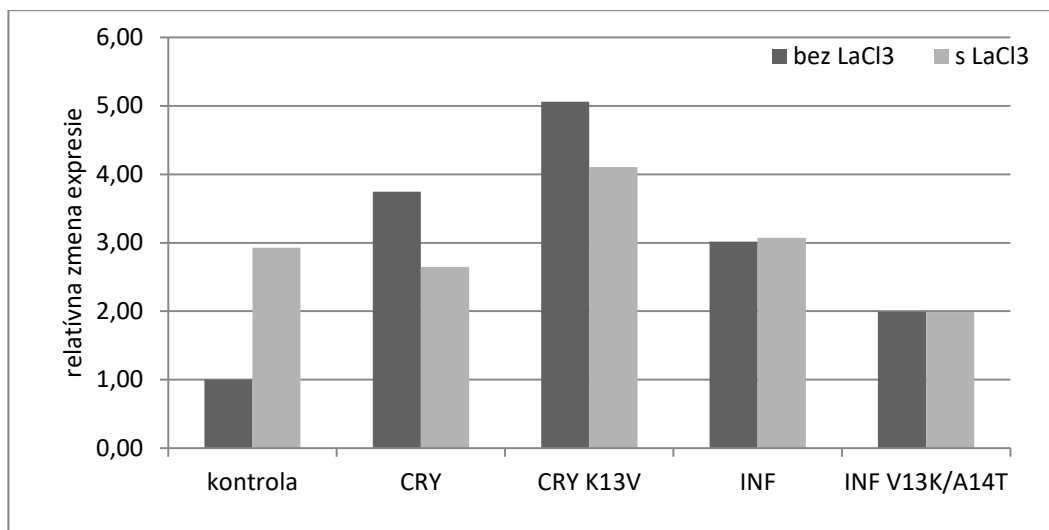


Obr. 11 Intracelulárna produkcia ROS u bunkovej suspenzie *N. tabacum* po aplikácii elicitinov (o koncentrácii  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) s blokátorom vápnikových kanálikov,  $\text{LaCl}_3$  ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Detekcia luminolom. Závislosť produkcie ROS na čase zobrazuje prvú fázu oxidatívneho vzplanutia, druhá fáza je výrazne potlačená v dôsledku zablokovania vápnikových kanálikov. CRY - kryptogein, CRY K13V – mutantná forma kryptogeinu, INF – infestin, INF V13K/A14T – mutantná forma infestinu.

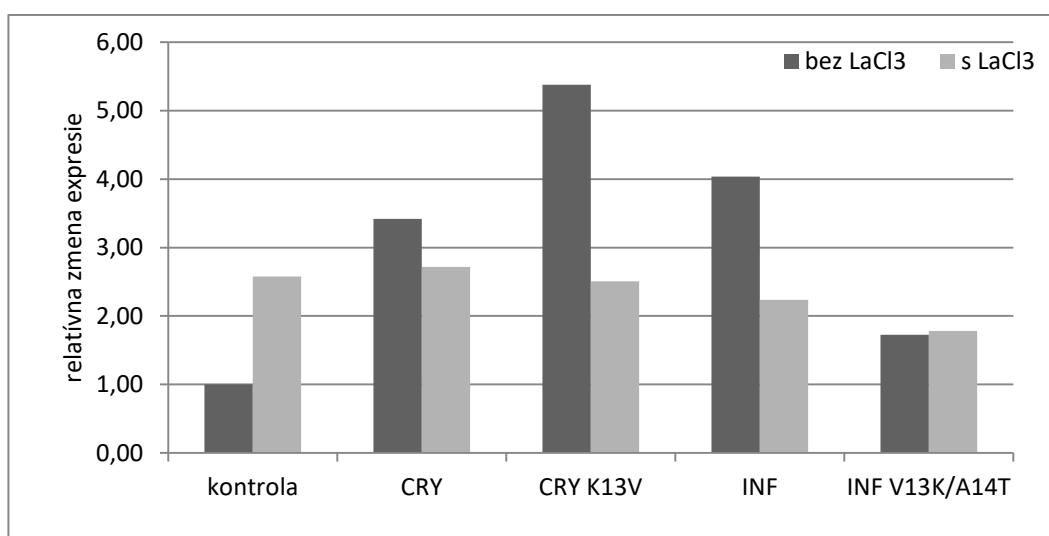
### 4.3.2 Stanovenie expresie NADPHoxidázy

Elicitácia kryptogeinom indukuje v tabakových bunkách zvýšenú expresiu NADPHoxidáz. Množstvo mRNA kódujúcich NADPHoxidázu sa po 30 min elicitácie zvyšuje približne 1,5-násobne a v čase 60 minút až 2,3-násobne. Novo syntetizované NADPHoxidázy sú lokalizované do Golgiho komplexu, a následne sú v prípade potreby translokované do cytoplazmatickej membrány (Noirot *et al.*, 2014).

Indukcia expresie oboch sledovaných izoforiem NADPHoxidáz (*RBOHD1* a *RBOHD2*) bola zaznamenaná u buniek ošetrovaných všetkými elicitinmi a rovnako aj u kontrolných buniek ošetrovaných  $\text{LaCl}_3$  (obr. 12 a obr. 13). V bunkách ošetrovaných iba  $\text{LaCl}_3$  došlo k zvýšeniu expresie NADPHoxidázy pravdepodobne z toho dôvodu, že  $\text{LaCl}_3$  ako blokátor vápnikových kanálikov vyvolal u buniek stres, v odpovedi na ktorý bunky zareagovali vrátane zvýšenia expresie génov kódujúcich NADPHoxidázy. Navyše bola zablokovaná aktivácia NADPHoxidázy, ktorej funkcia je potrebná aj za fyziologických podmienok, takže bunka pravdepodobne zareagovala zvýšením expresie NADPHoxidáz. V bunkách s aplikovaným kryptogeinom v kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  došlo k poklesu expresie *RBOHD1* (obr. 12) aj *RBOHD2* (obr. 13) v porovnaní s ich expresiou v bunkách ošetrovaných samotným kryptogeinom, v ktorého prípade bol detekovaný štvornásobný nárast odpovedajúcich transkriptov izoforiem NADPHoxidázy. Rovnaký trend môžeme pozorovať po ošetrovaní buniek samotnou mutantnou formou kryptogeinu CRY K13V aj v elicitácii po predchádzajúcej aplikácii blokátora  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov, kedy ošetrovanie CRY K13V v kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  vyvolalo nižšiu expresiu *RBOHD1* (obr. 12) a *RBOHD2* (obr. 13). V prípade elicitácie infestinom po predchádzajúcej aplikácii  $\text{LaCl}_3$  bolo pozorované, že miera expresie *RBOHD1* zostala v oboch prípadoch rovnaká (obr. 12). U expresii *RBOHD2* je vidieť rovnaký trend ako u kryptogeinu, teda došlo k poklesu expresie u buniek ošetrovaných elicitinmi v kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  (obr. 13). Najmenšiu indukciu expresie *RBOHD1* a *RBOHD2* vyvolala mutantná forma infestinu INF V13K/A14T s použitím aj bez použitia  $\text{LaCl}_3$ .



Obr. 12 Relatívne vyjadrenie zmeny v expresii NADPHoxidázy – izoformy *RBOHD1* 4 hodiny po aplikácii elicitinov (o koncentrácii  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a aplikácii elicitinov v kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  (o koncentrácii  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Kryptogein (CRY), mutantná forma kryptogeinu CRY K13V, infestin (INF) a jeho mutantná forma INF V13K/A14T.



Obr. 13 Relatívne vyjadrenie zmeny v expresii NADPHoxidázy – izoformy *RBOHD2* 4 hodiny po aplikácii elicitinov (o koncentrácii  $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a aplikácii elicitinov v kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  (o koncentrácii  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Kryptogein (CRY), mutantná forma kryptogeinu CRY K13V, infestin (INF) a jeho mutantná forma INF V13K/A14T.

Zo stanovenia expresie NADPHoxidázy, izoforiem *RBOHD1* a *RBOHD2* v rámci tejto práce môžeme potvrdiť, že elicitácia tabakových buniek všeobecne vedie k zvýšeniu expresie týchto proteínov (Lherminer *et al.*, 2009). Antonín Sedlář (2016) vo svojej bakalárskej práci sledoval zmeny v expresii *RBOHD1* a *RBOHD2* v tabakovej suspenzii ošetrenej vybranými elicítinmi, vrátane kryptogeinu a infestinu. V práci bolo poukázané, že spomenuté elicítiny, kryptogein a infestin, indukujú expresiu NADPHoxidázy, pričom izoforma *RBOHD2* bola u kryptoteinom a infestinom elicítovaných buniek exprimovaná vo vyššej miere ako izoforma *RBOHD1*. V prípade infestinu toto zistenie súhlasí s predloženými výsledkami (obr. 12 a obr. 13). Ale v prípade buniek elicítovaných kryptogeinom bola zaznamenaná opačná zmena, hoci rozdiel v expresii *RBOHD1* a *RBOHD2* bol minimálny.

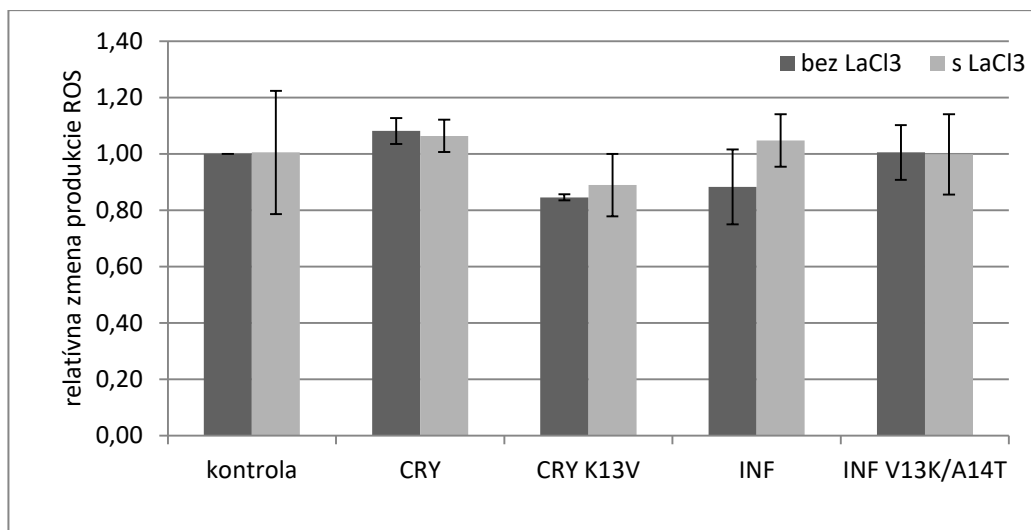
Čo sa týka zmien v expresii tabakových NADPHoxidáz po elicitácii buniek vopred ošetrovaných blokátorom  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov, tak blokácia týchto kanálikov viedla k poklesu v expresii oboch sledovaných izoforiem NADPHoxidázy. To súhlasí s predpokladom, že  $\text{LaCl}_3$  zablokovaním  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov negatívne ovplyvnil signálnu transdukciu v rámci obrannej reakcie rastlinnej bunky, čo v dôsledku viedlo k zmene expresie NADPHoxidázy.

### **4.3.3 Stanovenie hladiny ROS fluorescenčnou sondou $\text{H}_2\text{DCF DA}$**

Produkcia ROS bola sledovaná u tabakovej bunkovej kultúry nielen chemiluminiscenčne, ale aj s použitím membránovo permeabilnej fluorescenčnej sondy 2',7'-dichlorodihydrofluoresceín diacetátu ( $\text{H}_2\text{DCF DA}$ ). Nevýhodou tejto sondy je, že v tomto usporiadaní experimentu neumožňujú monitorovanie priebehu produkcie ROS v konkrétnom čase, ale je iba stanovovaná celková hladina vzniknutých ROS za daný časový úsek.

Množstvo produkovaných ROS v prvej fáze oxidatívneho vzplanutia (obr. 14) je u kontrolných buniek s  $\text{LaCl}_3$  aj bez jeho aplikácie porovnateľné. U rekombinantného proteínu CRY K13V aj infestinu sa zaznamenal mierny pokles v produkcii ROS v porovnaní s kontrolou.

U mutantnej formy CRY K13V sa očakával pokles v produkcii ROS, pretože mutáciou mierne klesajú jeho nekrotické účinky, čo sa potvrdilo (obr. 14). V prípade aplikácie blokátora  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov by sa dalo predpokladať, že  $\text{LaCl}_3$  spôsobí pokles v produkcii ROS a budú teda detekované ich nižšie hladiny.



Obr. 14 Relatívne vyjadrenie zmeny produkcie ROS po elicícii (5 nmol·l<sup>-1</sup> elicitinmi) a elicícii po predchádzajúcom ošetrení blokátorom Ca<sup>2+</sup> kanálikov (1 mmol·l<sup>-1</sup> LaCl<sub>3</sub>) u bunkovej suspenzie *N. tabacum*. Znáznomená produkcia ROS v prvej fáze oxidatívneho vzplanutia, detekcia sondou H<sub>2</sub>DCF DA. Kryptogeín (CRY), mutaná forma kryptogeínu CRY K13V, infestin (INF) a jeho mutaná forma INF V13K/A14T.

V druhej fáze oxidatívneho vzplanutia (obr. 15) kryptogeínom elicítované bunky vykazovali pokles v produkcii ROS, čo nesúhlasí s výsledkom získaným chemiluminiscenčným stanovením ROS (obr. 10), kedy dochádzalo u kryptogeínu k veľkému nárastu ROS. Vzhľadom na citlivosť metódy a usporiadanie experimentu a dosiahnutom výsledku vyplýva, že táto sonda nie je vyhovujúca pre daný typ experimentu. Kryptogeín v kombinácii s LaCl<sub>3</sub> vyvolal malý nárast produkcie ROS v porovnaní s aplikáciou samotného kryptogeínu, čo nezodpovedá chemiluminiscenčnému stanoveniu, kde bola produkcia výrazne znížená.

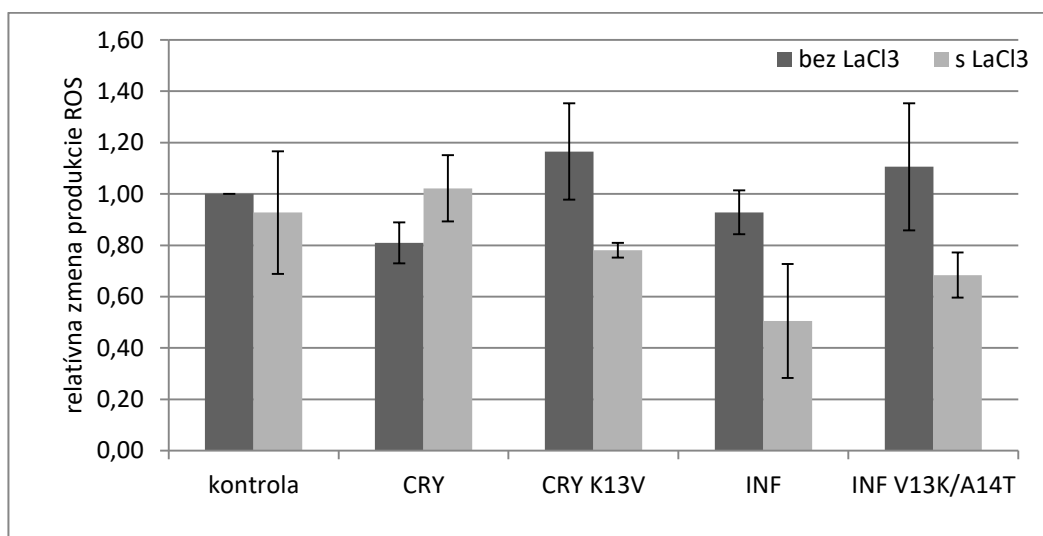
U buniek ošetrených elicitinmi CRY K13V, infestinom a INF V13K/A14T s výnimkou kryptogeínu došlo k zníženiu produkcie ROS, keď menované elicitiny boli aplikované spolu s LaCl<sub>3</sub>. Pozorovaná zmena je vyvolaná vplyvom LaCl<sub>3</sub>, ktorý blokuje tok vápenatých iónov, z apoplastu do cytosolu, potrebných pre aktiváciu NADPHoxidázy (Cacas *et al.*, 2017).

Predpoklad, že v druhej fáze bude produkcia ROS viac ovplyvnená sa potvrdil, môžeme pozorovať výraznejšie zmeny v produkcii ROS než vo fáze prvej, dôvodom je pravdepodobne dlhá inkubácia s LaCl<sub>3</sub>.

Chemiluminiscenčná metóda detekcie zmien produkcie ROS je vhodnejšia v porovnaní s detekciou pomocou fluorescenčnej sondy H<sub>2</sub>DCF DA. Výhodou je, že sú detekované zmeny v danom čase, metóda je viac citlivá a dochádza k detekcii peroxiduodíka v reakcii s luminolom. Navyše z časového priebehu produkcie ROS sme



schopní odčítať konkrétne maximá hladín ROS v oboch fázach oxidatívneho vzplanutia. H<sub>2</sub>DCF DA reaguje nešpecificky, pričom túto sondu dokážu oxidovať v rôznej miere peroxydusitany, chlornany a peroxid vodíka v prítomnosti peroxidázy (Crow, 1997).



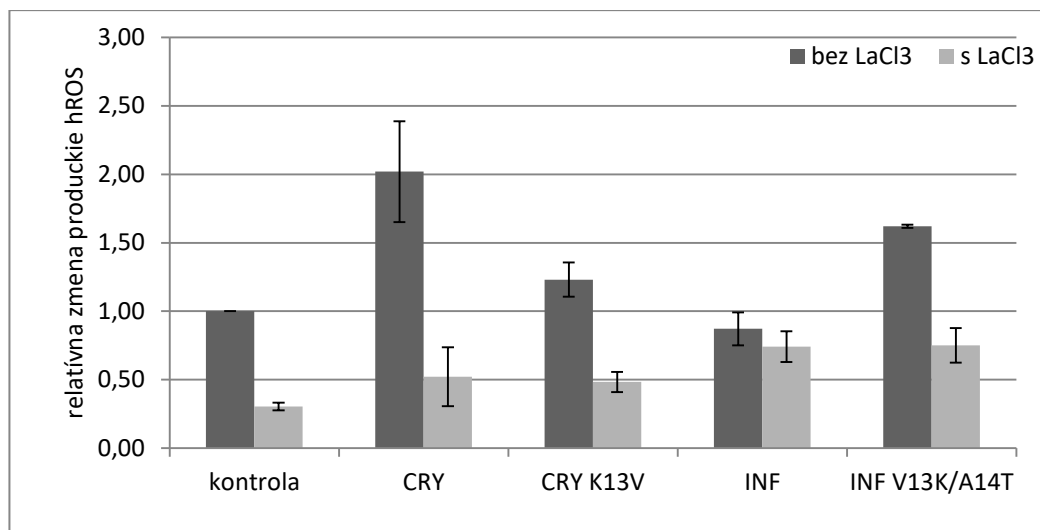
Obr. 15 Relatívne vyjadrenie zmeny produkcie ROS po elicitácii (5 nmol·l<sup>-1</sup> elicitinmi) a elicitácii po predchádzajúcom ošetrení blokátorom Ca<sup>2+</sup> kanálikov (1 mmol·l<sup>-1</sup> LaCl<sub>3</sub>) u bunkovej suspenzie *N. tabacum*. Znáznornená produkcia ROS v druhej fáze oxidatívneho vzplanutia, detekcia fluorescenčnou sondou H<sub>2</sub>DCF DA. Kryptogein (CRY), mutančná forma kryptogeinu CRY K13V, infestín (INF) a jeho mutančná forma INF V13K/A14T.

#### 4.3.4 Stanovenie hladín hROS fluorescenčnou sondou HPF

Vysokoreaktívne formy kyslíka (hROS) boli stanovované použitím fluorescenčnej sondy hydroxyfenyl fluoresceínu (HPF), ktorá špecificky deteguje hydroxylový radikál a peroxydusitan (Setsukinai *et al.*, 2003).

V prvej fáze oxidatívneho vzplanutia (obr. 16) u kontrolných buniek aplikácia  $\text{LaCl}_3$  spôsobila pokles produkcie hROS o 75 %. Elicitiny kryptogein, CRY K13V, infestin a INF V13K/A14T vyvolali zvýšený nárast produkcie hROS. Tento nárast bol výrazne potlačený aplikáciou  $\text{LaCl}_3$  k daným elicitiom. Bázický kryptogein spôsobil dvojnásobný nárast v produkcii hROS v porovnaní s kontrolou. V kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  produkcia klesla o 75 % v porovnaní so samotným kryptogeinom. V prípade kyslého infestinu a infestinu s aplikovaným  $\text{LaCl}_3$  bola zaznamenaná v produkcii hROS len malá zmena. Rekombinantný proteín INF V13K/A14T vykazoval zvýšenú produkciu hROS.

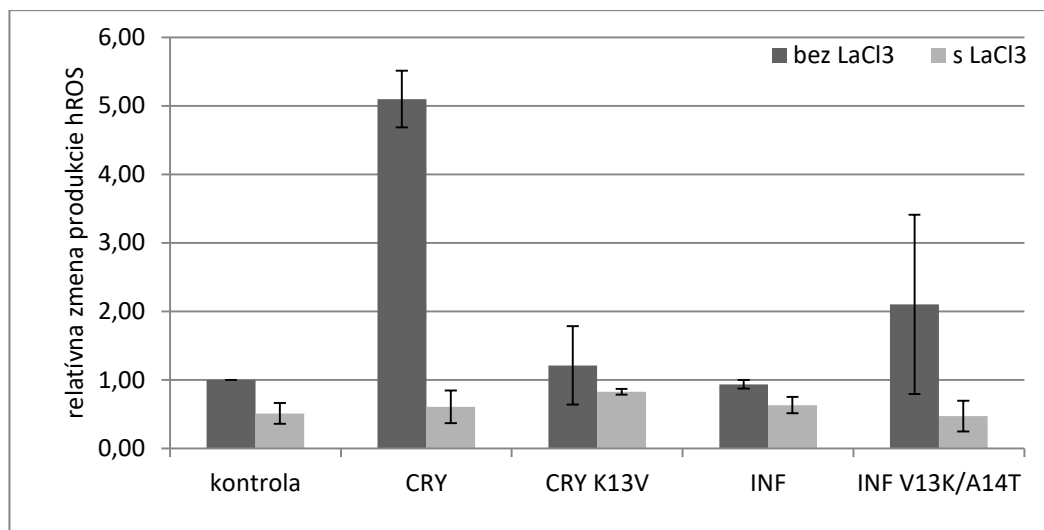
Vo výsledkoch bakalárskej práce Antonína Sedláře (2016) kryptogein spôsobil najväčší nárast hROS v porovnaní s kontrolou. Infestin taktiež vyvolal pokles v produkcii hROS v porovnaní s kontrolou. Toto zistenie je v zhode s predloženými výsledkami (obr. 16) a s vlastnosťami typickými pre bázické a kyslé elicitory. Môžeme skonštatovať, že mutácie u elicitiinov spôsobili čiastočné obrátenie vlastností elicitiinov, t.j. CRY K13V sa po mutácii svojimi vlastnosťami približuje ku kyslému infestinu, pričom dochádza k slabšej produkcii ROS, a naopak INF V13K/A14T sa vlastnosťami čiastočne približuje bázickému kryptogeinu, a preto dochádza k zvýšeniu produkcie hROS (obr. 16).



Obr. 16 Relatívna zmena produkcie ROS po elicícii ( $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elicitinmi) a elicícii po predchádzajúcom ošetrení blokátorom  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) u bunkovej suspenzie *N. tabacum*. Znáznorená produkcia hROS v prvej fáze oxidatívneho vzplanutia, detekcia fluorescenčnou sondou HPF. Kryptogeín (CRY), mutantná forma kryptogeínu CRY K13V, infestín (INF) a jeho mutantná forma INF V13K/A14T.

V druhej fáze oxidatívneho vzplanutia (obr. 17) produkcia hROS v bunkách elicítovaných kryptogeínom a INF V13K/A14T stále dosahovala vysoké hodnoty. Produkcia hROS v bunkách elicítovaných infestínom a CRY K13V klesla na porovnateľnú úroveň, detekované hladiny ROS sa blížili kontrole. Použitie  $\text{LaCl}_3$  spôsobilo pokles v produkcii hROS vo všetkých elicítovaných bunkách.

V prípade kryptogeínu a INF V13K/A14T môžeme pozorovať, že v druhej fáze sa prehĺbili rozdiely v produkcii hROS medzi elicítovanými bunkami s použitím  $\text{LaCl}_3$  a bez jeho použitia (obr. 17). Pozorovanie je v zhode s hypotézou uvedenou vyššie.



Obr. 17 Relatívna zmena produkcie ROS po elicitácii ( $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elicitinmi) a elicitácii po predchádzajúcom ošetrení blokátorom  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) u bunkovej suspenzie *N. tabacum*. Znáznorená produkcia hROS v druhej fáze oxidatívneho vzplanutia, detekcia fluorescenčnou sondou HPF. Kryptogein (CRY), mutantná forma kryptogeínu CRY K13V, infestin (INF) a jeho mutantná forma INF V13K/A14T.

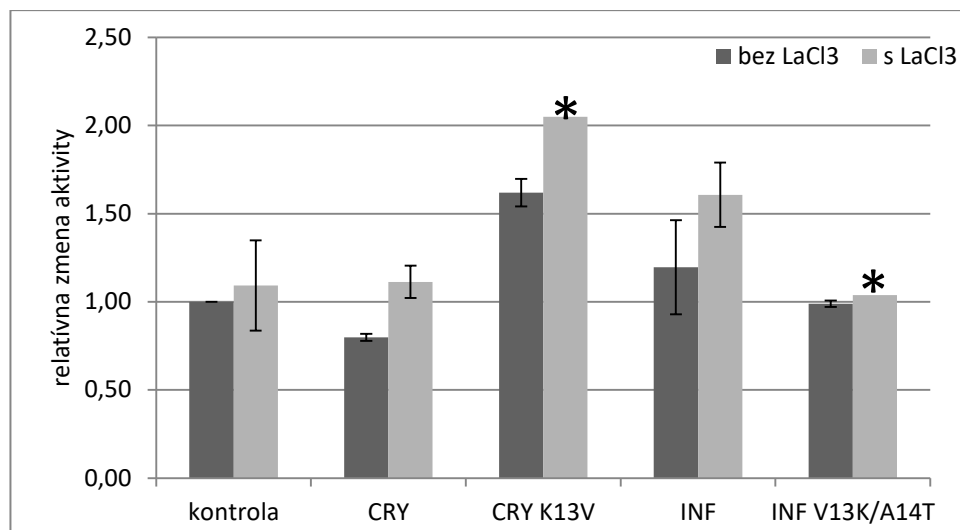
#### 4.4 Metabolizmus ROS

Reaktívne formy kyslíka sú vo vysokých koncentráciách pre bunku toxické, reagujú s bunkovými štruktúrami a ich nadmerná produkcia môže viesť k bunkovej smrti. Akumulácia ROS je spôsobená nerovnováhou v produkcii a detoxifikácii ROS. Na detoxifikácii sa podieľajú antioxidantné systémy bunky, kam spadajú jednak antioxidanty napr. glutation, jednak tzv. antioxidantné enzýmy, medzi ktoré patrí napr. kataláza a askorbátperoxidáza (APX; EC 1.11.1.11), ktoré boli v rámci predloženej bakalárskej práci študované (Camejo *et al.*, 2016).

##### 4.4.1 Stanovenie aktivity katalázy

Kataláza ako antioxidantný enzým katalyzuje rozklad peroxidu vodíka na vodu a kyslík, čím sa podieľa na ochrane bunky pred oxidačným stresom (Camejo *et al.*, 2016).

V prvej fáze oxidatívneho vzplanutia kryptogein spôsobil mierny pokles v aktivite katalázy (obr. 18), CRY K13V vyvolal takmer dvojnásobné zvýšenie aktivity katalázy v porovnaní s kryptogeinom. Infestin spôsobil len mierne zvýšenie v porovnaní s kontrolou a aktivita v prípade INF V13K/A14T zostala na úrovni kontroly. V kombinácii kryptogeínu a  $\text{LaCl}_3$  sme zaznamenali nárast v aktivite katalázy, CRY K13V v kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  spôsobil približne dvojnásobný nárast v porovnaní s kontrolou a v prípade infestinu došlo k nárastu aktivity porovnateľnej s CRY K13V bez aplikácie  $\text{LaCl}_3$ . Aktivita katalázy v prípade INF V13K/A14T v kombinácii s  $\text{LaCl}_3$  zostala bez zmeny, na úrovni kontroly.

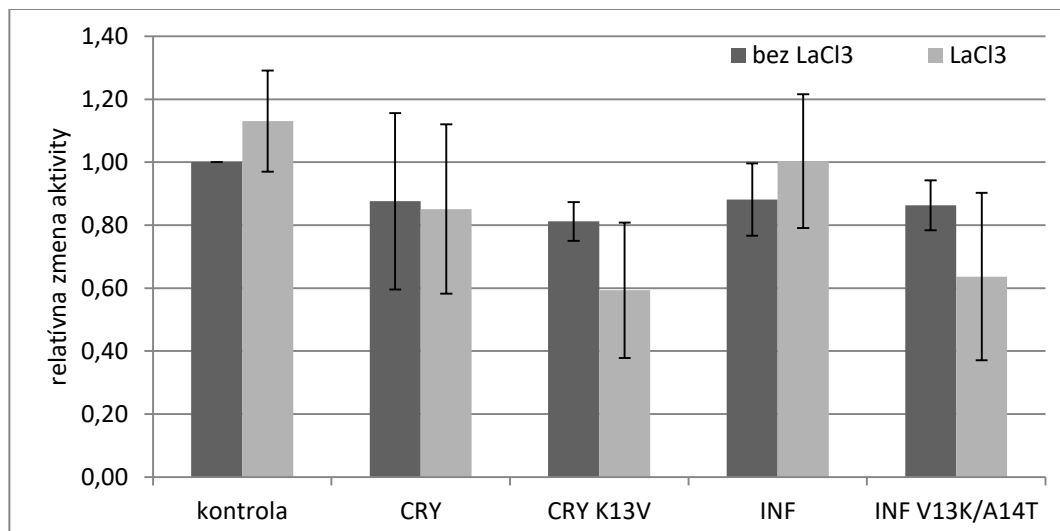


Obr. 18 Enzymová aktivita katalázy, po elicitácii ( $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elicitinmi) a elicitácii po predchádzajúcom ošetrení blokátorom  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$ ) u tabakovej bunkovej kultúry *N. tabacum*. V grafe je porovnávaná aktivita antioxidantného enzýmu katalázy, v prvej fáze oxidatívneho vzplanutia. Kryptogeín (CRY), mutantná forma kryptogeínu CRY K13V, infestin (INF) a jeho mutantná forma INF V13K/A14T. \* Zmerné iba jedenkrát (výsledok nutné overiť).

V druhej fáze oxidatívneho vzplanutia (obr. 19) sa u kontrolných buniek ošetrených  $\text{LaCl}_3$  zvýšila aktivita katalázy asi o 10 % v porovnaní s kontrolou. Bunky elicitované kryptogeínom bez aj s  $\text{LaCl}_3$  nevykazovali rozdiel v aktivite katalázy. Keď sa elicitiny CRY K13V a INF V13K/A14T aplikovali spolu s  $\text{LaCl}_3$  aktivita katalázy poklesla, ako keď sa elicitiny aplikovali samostatne. Opačný trend sa zaznamenal u buniek elicitovaných infestinom, kedy aktivita katalázy vzrástla, v prípade, že bunky boli elicitované s prídavkom  $\text{LaCl}_3$ .

V miere produkcie ROS po štvrtej hodine (obr. 15) od elicitácie, je vidieť pokles v produkcii ROS po aplikácii  $\text{LaCl}_3$  v bunkách elicitovaných CRY K13V a INF V13K/A14T. V aktivite katalázy po 4 hodine od elicitácie môžeme pozorovať podobný trend v jej zmenách ako pri rozdieloch produkcie ROS u ošetrených tabakových buniek. U buniek, u ktorých bol pozorovaný nárast v produkcii ROS, sa zvýšila aktivita katalázy. Z čoho sa dá usúdiť, že zvýšená produkcia ROS vyvolala silnejšiu iniciáciu antioxidantných systémov v bunke, ako obranného mechnizmu pred nadmerným poškodením. Rovnaký trend, tam kde bol nárast v produkcii ROS, zvýšila sa aj aktivita katalázy. Chlorid lantanitý v porovnaní s kontrolou mal väčší účinok na zníženie aktivity v druhej fáze oxidatívneho vzplanutia v porovnaní s prvou fázou, čo mohlo byť spôsobené pomalším reagovaním buniek na použitý blokátor  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov. Pravdepodobne preto výrazné zmeny v aktivite katalázy v prvej fáze oxidatívneho

vzplanutia neboli pozorované. Avšak pri stanovení zmien aktivity katalázy v druhej fáze oxidatívneho vzplanutia sú výsledky zaťažené pomerne veľkou štatistickou chybou a pre správnu interpretáciu výsledkov je nutné stanovenie aktivity katalázy ešte zopakovať.



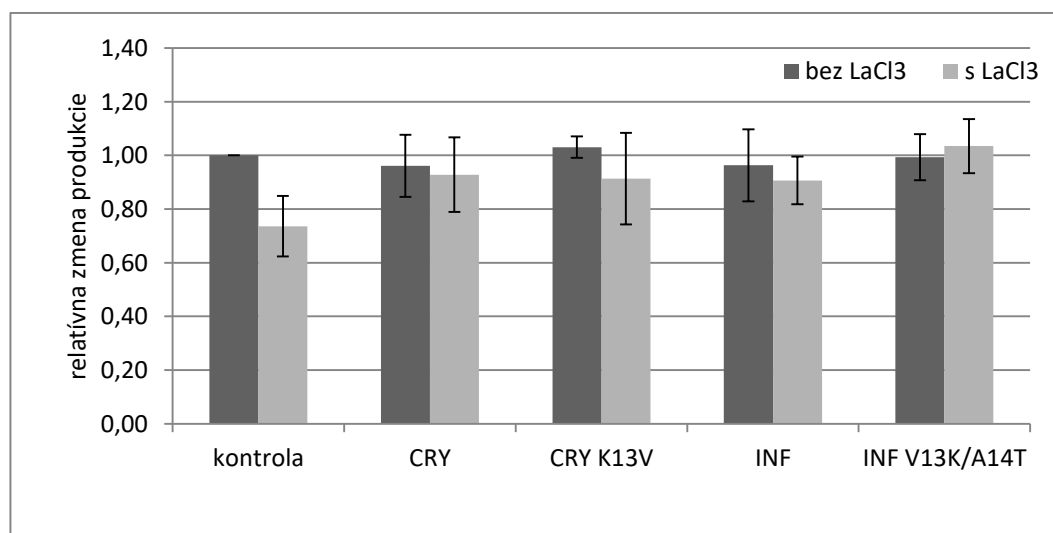
Obr. 19 Enzymová aktivita katalázy, po elicitácii ( $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elicitinmi) a elicitácii po predchádzajúcom ošetrení blokátorom  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$ ) u tabakovej bunkovej kultúry *N. tabacum*. V grafe je porovnávaná aktivita antioxidantného enzýmu katalázy, v druhej fáze oxidatívneho vzplanutia. Kryptogein (CRY), mutantná forma kryptogeinu CRY K13V, infestin (INF) a jeho mutantná forma INF V13K/A14T.

#### 4.4.2 Stanovenie aktivity askorbátperoxidázy

Askorbátperoxidáza ako antioxidantný enzým katalyzuje oxidáciu askorbátu za spotreby peroxidu vodíka, čím sa podieľa na ochrane bunky pred oxidačným stresom (Camejo *et al.*, 2016). Dá sa predpokladať, že v prípade elicítinov s vysokými nekrotickými účinkami (kryptogein) môže dôjsť k silnejšej iniciácii zapojenia askorbátperoxidázy v detoxifikácii ROS vzniknutých v nadmernej miere.

V prvej fáze oxidatívneho vzplanutia (obr. 20) sa u buniek s aplikovaným  $\text{LaCl}_3$  hodnota aktivity askorbátperoxidázy znížila približne o 26 % v porovnaní s kontrolou.

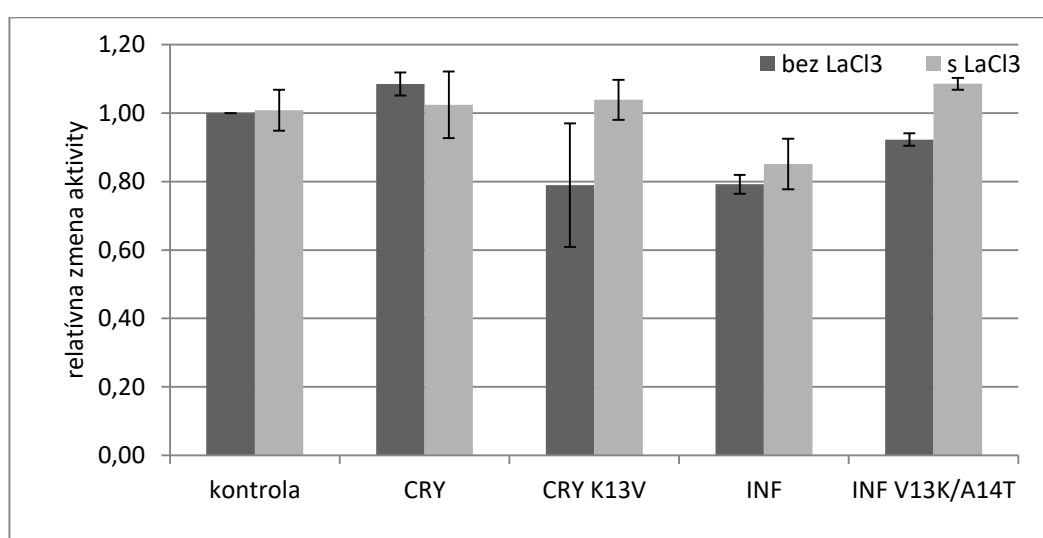
Vplyv všetkých ostatných elicítinov na aktivitu askorbátperoxidázy bol porovnateľný bez výraznejších rozdielov. Produkcia ROS v prvej fáze oxidatívneho vzplanutia (obr. 14) bola taktiež podobná u všetkých elicítinov, preto nedošlo k zvýšeniu aktivity askorbátperoxidázy v elicítovaných bunkách.



Obr. 20 Enzýmová aktivita askorbátperoxidázy, po elicítácii ( $5 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  elicítinmi) a elicítácii po predchádzajúcom ošetrení blokátorom  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$ ) u tabakovej bunkovej kultúry *N. tabacum*. V grafe je porovnávaná aktivita antioxidantného enzýmu askorbátperoxidázy, v prvej fáze oxidatívneho vzplanutia. Kryptogein (CRY), mutantná forma kryptogeínu CRY K13V, infestín (INF) a jeho mutantná forma INF V13K/A14T.

V druhej fáze oxidatívneho vzplanutia (obr. 21) sa u kontrolných buniek a buniek s aplikovaným  $\text{LaCl}_3$  hodnota aktivity askorbátperoxidázy nelíšila.  $\text{LaCl}_3$  je látka, ktorá neinicuje zvýšenú aktivitu antioxidantných enzýmov, čo je v súlade s tým, že nedochádza k nadmernej aktivácii NADPHoxidázy, a tým pádom nevzniká nadbytok ROS a nie je dôvod k aktivácii systémov pre ich detoxifikáciu.

U kryptogeinu došlo k miernemu zvýšeniu aktivity askorbátperoxidázy, zatiaľ čo u CRY K13V, infestinu a INF V13K/A14T došlo k poklesu aktivity. U týchto mutantných foriem elicítinov sa prejavil účinok  $\text{LaCl}_3$ , kedy aktivita askorbátperoxidázy bola vyššia v prítomnosti  $\text{LaCl}_3$  v porovnaní s aktivitou tabakových buniek ovplyvnenými elicítinmi.



Obr. 21 Enzymová aktivita askorbátperoxidázy, po elicitácii ( $5 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  elicítinmi) a elicitácii po predchádzajúcom ošetrení blokátorom  $\text{Ca}^{2+}$  kanálikov ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$ ) u tabakovej bunkovej kultúry *N. tabacum*. V grafe je porovnávaná aktivita antioxidantného enzýmu askorbátperoxidázy, v druhej fáze oxidatívneho vzplanutia. Kryptogein (CRY), mutantná forma kryptogeinu CRY K13V, infestín (INF) a jeho mutantná forma INF V13K/A14T.



## 5 ZÁVER

Cieľom predloženej bakalárskej práce bolo štúdium vplyvu elicítinov na nekrotické účinky a produkciu reaktívnych foriem kyslíka po modulácii vápnikovej signalizácie u bunkovej kultúry *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi.

Z výsledkov experimentálnej časti práce sa dá usúdiť, že:

- kryptogein vyvoláva hypersenzitívnu reakciu u tabakových buniek, pričom jeho mutantná forma CRY K13V vykazuje zníženú nekrotickú aktivitu, mutácia spôsobuje priblíženie sa vlastnostiam kyslých elicítinov
- mutantná forma infestinu, INF V13K/A14T, vykazuje zvýšenie nekrotických účinkov, mutácia spôsobila priblíženie sa vlastnostiam bázických elicítinov
- aplikácia blokátora vápnikových kanálikov, LaCl<sub>3</sub>, pozitívne ovplyvnila životaschopnosť elicítovaných tabakových buniek
- blokácia vápnikových kanálikov niekoľkonásobne znížila produkciu ROS po elicítácii a v podstate u väčšiny testovaných elicítinov eliminovala druhú fázu oxidatívneho vzplanutia u elicítovaných tabakových bunkách
- testované elicítiny zvýšili expresiu dvoch izoform NADPHoxidázy *N. tabacum*
- blokácia vápnikových kanálikov nevedla k zvýšeniu expresie NADPHoxidázy u elicítovaných tabakových buniek
- chlorid lantanitý znížil produkciu ROS pravdepodobne prostredníctvom negatívnej regulácie NADPHoxidázy, ktorá nebola aktivovaná vápenatými iónmi
- zvýšenie produkcie ROS spôsobilo silnejšiu indukciu antioxidantných systémov v bunke, ako súčasť obranného mechanizmu rastliny.

## 7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Adachi, H., Nakano, T., Miyagawa, N., Ishihama, N., Yoshioka, M., Katou, Y., Yaeno T., Shirase K., Yoshioka, H. (2015): WRKY Transcription Factors Phosphorylated by MAPK Regulate a Plant Immune NADPH Oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **27**, 2645–2663.
- Ashfield T., Keen N.T., Buzzell R.I., Innes R.W. (1995): Soybean resistance genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic, or closely linked, at the RPG1 locus. *Genetics* **141**, 1597-1604.
- Arisz S.A. Testerink C., Munnik T. (2009): Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochimica et biophysica acta* **1791**, 869-875.
- Barrett L. G., Thrall P. H., Burdon J. J., Nicotra A. B., Linde C. C. (2008): Population structure and diversity in sexual and asexual populations of the pathogenic fungus *Melampsora lini*. *Molecular Ecology* **3**, 3401-3415.
- Bartels S., Boller T. (2015): Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *Journal of Experimental Botany* **66**, 5183-5193.
- Bent A.F., Mackey D. (2007): Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology* **45**, 399-436.
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J.P., Ricci P. (1996): Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 181-192.
- 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* **118**, 1317–1326.
- Bourque S., Binet M.-N., Ponchet M., Pugin A., and Lebrun-Garcia A. (1999): Characterization of the cryptogin binding sites on plant plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 34699-34705.
- Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (2000): *Biochemistry and molecular biology of plants*. The American Society of Plant Physiologist, Maryland, USA, 1367 strán.
- Cacas J.L., Vailleau F., Davoine C., Ennar N., Agnel J.P., Tronchet M., Ponchet M., Blein J.P., Roby D., Triantaphylides C., Montillet J.C. (2005): The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant Cell Environment* **28**, 1367-1378.
- Cacas J.L., Gerbeau-Pissot P., Fromentin J., Cantrel C., Thomas D., Jeannette E., Kalachova T., Mongrand S., Simon-Plas F., Ruelland E. (2017): Diacylglycerol kinases activate tobacco NADPH oxidase-dependent oxidative burst in response to cryptogin. *Plant, Cell & Environment* **40**, 585–598.
- Camejo D., Guzmán-Cedeno Á., Moreno A. (2016): Reactive oxygen species, essential molecules, during plant–pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* **103**, 10-23.
- Cassab G.I. (1998): Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 281-309.
- Crow J. P. (1997): Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **1**, 145-157.
- Cruz C.M.V., Bai J., Ona I., Leung H., Nelson R. J., Mew T.W., and Leach, J. E. (2000): Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 13500-13505.
- Cunnac S., Ochaialini A., Barberis P., Boucher C., Genin S. (2004): Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Molecular Microbiology* **53**, 115-128.
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833.
- Dangl J.L., Horvath D.M., Staskawicz B.J. (2013): Pivoting the Plant Immune System from

- Dissection to Deployment. *Science* **341**, 746-751.
- Dahan J., Pichereaux C., Rossignol M., Blanc S., Wendehenne D., Pugin A., Bourque S. (2009): Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogin, an elicitor of plant defence reactions. *Biochemical Journal* **418**, 191-200.
- de Jong C.F., Laxalt A.M., Bargmann B.O., de Wit P.J., Joosten M.H., Munnik T. (2004): Phosphatidic acid accumulation is an early response in the Cf-4/Avr4 interaction, *Plant Journal* **39**, 1–12.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585–588.
- 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.A.A., Kamoun S. (2016): Nine things to know about elicitors. *New Phytologist* **212**, 888–895.
- Desikan R., A.-H.-Mackerness S., Hancock J. T., Neill S. J. (2001): Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiology* **127**, 159–172
- Dodds P.N., Lawrence G.J., Catanzariti A., Teh T., Wang C.A., Kobe B., Ellis J.G. (2006): Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 8888-889.
- Domazakis E., Wouters D., Visser R.G.F., Kamoun S., Joosten M.H.A.J., Vleeshouwers V.G.A.A. (2018): The ELR-SOBIR1 complex functions as a two-component RLK to mount defense against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Du, J., Verzaux E., Chaparro-Garcia A., Bijsterbosch G., Keizer L.C.P., Zhou J., Liebrand T. W. H., Xie C., Govers F., Robatzek S., van der Vossen E. A. G., Jacobsen E., Visser R. G. F., Kamoun S., Vleeshouwers V. G. A. A. (2015): Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature Plants* **1**, 15035.
- Durek P., Schmidt R., Heazlewood J.L., Jones A., MacLean D., Nagel A., Kersten B., Schulze W.X. (2010): PhosPhAt: the Arabidopsis thaliana phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Research* **38**, 828-834.
- Ellis J., Dodds, P., Pryor, T. (2000): Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 278-284.
- Fefe, S., Bouaziz S., Huet J.C., Pernollet J.C., Guittet E. (1997): Three-dimensional solution structure of beta cryptogin, a beta elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Science* **6**, 2279–2284.
- Ferrari S., Savatin D.V., Sicilia F., Gramegna F., Cervone F., De Lorenzo G. (2013): Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science* **4**:49. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2013.00049/abstract>
- Flor H.H., (1971): Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275-296.
- Fu Y., Duan X., Tang C., Li X., Voegelé R. T., Wang X., Wei G., Kang Z. (2014): TaADF7, an actin-depolymerizing factor, contributes to wheat resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *International Journal of Botany* **78**, 16-30.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006): Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 711-724.
- Gill U.S., Lee S., Mysore K.S. (2015): Host Versus Nonhost Resistance: Distinct Wars with Similar Arsenals. *Phytopathology* **105**, 580-587.
- Glazebrook J. (2005): Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 205-227.
- Goméz-Goméz L., Boller T. (2002): Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science* **7**, 251-256.
- Govrin E.M., Rachmilevitch S., Tiwari B.S., Solomon M., Levine A. (2006): An Elicitor from *Botrytis cinerea* Induces the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana* and Other Plants and Promotes the Gray Mold Disease. *Phytopathology* **96**, 299-307.
- Grant J. J., Loake G. J. (2000): Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox

- signaling in disease resistance. *Plant Physiology*, **124**, 21-30.
- Halliwell B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**, 312–322.
- Heath M.C. (2000): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 315-319.
- Hong Y., Zhao J., Guo L., Kim S.-Ch., Deng X., Wang G., Zhang G., Li M., Wang X. (2016): Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Progress in Lipid Research* **62**, 55-74.
- Hoerberichts F.A., Davoine C., Vandorpe M., Morsa S., Ksas B., Stassen C., Triantapylides C. Breusegem F.V (2013): Cryptogein-Induced Transcriptional Reprogramming in Tobacco Is Light Dependent. *Plant Physiology* **163**, 263-275.
- Hoefle C., Loehrer M., Schaffrath U., Frank M., Schultheiss H., Huckelhoven R. (2009): Transgenic suppression of cell death limits penetration success of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* into epidermal cells of barley. *Phytopathology* **99**, 220-226.
- Hoch H. C., Staples R. C., Whitehead B., Comeau J., and Wolf E. D. (1987): Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in uromyces. *Science* **235**, 1659-1662.
- Huet J.C., Nespoulous C., Pernollet J.C. (1992): Structures of elicitin isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*. *Phytochemistry* **31**, 1471-1476.
- Huffaker A., Ryan C.A. (2007): Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 10732-10736.
- Chen S.X., Schopfer P. (1999): Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry* **260**, 726–735.
- Christopher-Kozjan R., Heath M. C. (2003): cytological and pharmacological evidence that biotrophic fungi trigger different cell death execution processes in host and nonhost cells during the hypersensitive response. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**, 265-275.
- Jakobek J.L., Smith J.A., Lindgren P.B. (1993): Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **5**, 57-63.
- Jones J.D.G., Dangl J. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kadota Y., Furuichi T., Ogasawara Y., Goh T., Higashi K., Muto S., Kuchitsu Ks (2004): Identification of putative voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-permeable channels involved in cryptogein-induced Ca<sup>2+</sup> transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **317**, 823-830.
- Kadota Y., Shirasu K., Zipfel C. (2015): Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant Cell Physiology* **56**, 1472-1480.
- Kamoun, S., Lindqvist H., Govers F. (1997): A novel class of elicitin-like genes from *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 1028–1030.
- Karasov T.L., Horton M.W., Bergelson J. (2014): Genomic variability as a driver of plant–pathogen coevolution? *Current Opinion in Plant Biology* **18**, 24-30.
- Kwaaitaal M., Maintz J., Cavdar M., Panstruga R. (2012): On the ligand binding profile and desensitization of plant ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels functioning in MAMP-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 1373-1377.
- Khokon A.R., Hossain M.A., Munemasa S., Uraji M., Nakamura Y., Mori I.C., Murata Y. (2010): Yeast elicitor-induced stomatal closure and peroxidase-mediated ROS production in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology* **51**, 1915-1921.
- Knight H., Trewavas A.J. Knight M.R. (1997): Calcium signalling in Arabidopsis thaliana responding to drought and salinity. *Plant journal* **12**, 1068-1078.
- Kobayashi Y., Yamada M., Kobayashi I., and Kunoh H. (1997): Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants. *Plant Cell Physiology* **38**, 725-733.
- Kruger WM, Szabo LJ, Zeyen RJ. 2003. Transcription of the defense response genes

- chitinase IIb PAL and peroxidase is induced by the barley powdery mildew fungus and is only indirectly modulated by R genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**, 167-178.
- Kushalappa C.A., Kalenahalli Y., Guptha K.S.S. (2016): Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* **35**, 38-55.
- Kwon C., Bednarek P., Schulze-Lefert P. (2008): Secretory Pathways in Plant Immune Responses. *Plant Physiology* **147**, 1575-1583.
- Lachaud C., Da Silva D., Amelot N., Chloé B., Briere C., Cotelle V., Graziana A., Grat S., Mazars C., Thuleau P. (2011): Dihydrospingosine-Induced Programmed Cell Death in Tobacco BY-2 Cells Is Independent of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production. *Molecular plant* **4**, 310-318.
- Lewis A. L., Polanski K., de Torres-Zabala M., Jayaraman S., Bowden L., Moore J., Penfold C.A., Jenkins D.j., Hill C., Baxter L., Kulasekaran S., Truman W., Littlejohn G., Prusinska J., Mead A., Steinbrenner J., Hickman R., Rand D., Wild D.L., Ott S., Buchanan-Wollaston V., Smitnoff N., Beynon J., Denby K., Grant M. (2015): *The Plant Cell* **27**, 1040-4651.
- Lherminier J., Elmayan T., Fromentin J., Elaraqui K.T., Vesa S., Morel J., Verrier J.L., Cailleteau B., Blein J.P., Simon-Plas F. (2009): NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Molecular plant-microbe interactions* **22**, 868-881
- Lipka V., Dittgen J., Bednarek P., Bhat R., Wiermer M., Stein M., Landtag J., Brandt W., Rosahl S., Scheel D., Llorente F., Molina A., Parker J., Somerville S., Schulze-Lefert P. (2005): Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. *Science* **310**, 1180-1183.
- Liu M., Hasenstein K.H. (2005): La<sup>3+</sup> uptake and its effect on the cytoskeleton in root protoplasts of *Zea mays* L. *Planta* **220**, 658-66.
- Lori M., van Verk M.C., Hander T., Schatwitz H., Klausner D., Flury P., Gehrin C.A., Boller T., Bartelz S. (2015): Evolutionary divergence of the plant elicitor peptides (Peps) and their receptors: interfamily incompatibility of perception but compatibility of downstream signalling. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 5315-5325.
- Mackey D., Holt B.F., Wiig A., Dangl J.L. (2002): RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**, 743-54.
- Mackey D., McFall A.J. (2006): MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology* **61**, 1365-1371.
- Mao J., Liu Q., Yang X., Long C., Zhao M., Zeng H., Liu H., Yuan J., Qiu D. (2010): Purification and expression of a protein elicitor from *Alternaria tenuissima* and elicitor-mediated defence responses in tobacco. *Annals of Applied Biology* **156**, 411-420.
- Mikes V., Milat M.L., Ponchet M., Ricci P., Blein J.P. (1997): The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Letters* **416**, 190-192.
- Milat M.-L., Ricci P., Bonnet P., Blein J.-P. (1991): Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytochemistry* **30**, 2171-2173.
- Misra S.S., Wu Y., Venkatarama G., Sopory S., Tuteja N. (2007): Heterotrimeric G-protein complex and G-protein-coupled receptor from a legume (*Pisum sativum*) role in salinity and heat stress and cross-talk with phospholipase C. *Plant Journal* **51**, 656-669.
- Munnik T., Testerink C. (2009): Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". *Journal of lipid research* **50**, 260-265.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiology Plant* **15**, 473-497.
- Montesano M, Brader G, Palva ET. (2003): Pathogenderived elicitors: searching for receptor in plants. *Molecular Plant Pathology* **4**, 73-78.
- Montillet J. L., Chamnongpol S., Rustérucci C., Dat J., Van De Cotte B., Agnel J. P., Battesti C., Inzé D., Van Breusegem F., Triphanlydès C. (2005): Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* **138**, 1516- 1526.
- Morel J.B., Dnagl J.L. (1999): The hypersensitive response and the induction of cell death in

- plants. *Cell Death and Differentiation* **4**, 671-683.
- Moricová P., Luhová L., Lochman J., Kašparovský T., Petřivalský M. (2014): Elicitiny: Klíčové molekuly interakcí rostlin a patogenů. *Chemické listy* **108**, 1133-1139.
- Mysore K.S., Ryu C.M. (2004): Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* **9**, 97-104.
- Nakao M., Nakamura R., Kita K., Inukai R., Ishikawa A. (2011): Nonhost resistance to penetration and hyphal growth of *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis*. *Scientific Reports* **1**, 171.
- Nimchuk Z., Eulgem T., Holt III B.F., Dangl J.L. (2003): Recognition and Response in the Plant Immune System. *Annual Review of Genetics* **37**, 579-609.
- Noiro E., Der C., Lherminier J., Robert F., Moricova P., Kiêu K., Leborgne-Castle N., Simon-Plas F., Bouhidel K. (2014): Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5011–5022.
- Nomura K., Melotto M., He S.Y. (2005): uppression of host defense in compatible plant–*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 361-368.
- Nyadanu D., Akromah R., Adomako B., Kwoseh C., Dzahini-Obiatey H., Lowor S.T., Akrofi A.Y., Assuah M.K. (2012): Host Plant Resistance to Phytophthora Pod Rot in Cacao (*Theobroma cacao* L.): The Role of Epicuticular Wax on Pod and Leaf Surfaces. *International Journal of Botany* **8**, 13-21.
- 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 elicitin produced by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Molecular Biology* **27**, 577-586.
- Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N., Hayashi K., Wong H.L., Shimamoto K., Shimizu T., Hashimoto H., Akashi S., Kojima C., Kawasaki T., Sato M. (2010): Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 1435–1445.
- Odjakova M., Hadjiivanova C. (2001): The Complexity of Pathogen Defense in Plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* **27**, 101–109.
- Panabières F., Ponchet M., Allasia V., Cardin V., Ricci P. (1997): Characterization of border species among Pythiaceae: several *Pythium* isolates produce elicitins, typical proteins from *Phytophthora* spp. *Mycological Research* **101**, 1459-1468.
- Panabières F., Birch P.R., Unkles S.E., Ponchet M., Lacourt I., Venard P., Keller H., Allasia V., Ricci P., Duncan J.M. (1998): Heterologous expression of a basic elicitin from *Phytophthora cryptogea* in *Phytophthora infestans* increases its ability to cause leaf necrosis in tobacco. *Microbiology* **144**, 3343-3349.
- Birch PR, Unkles SE, Ponchet M, Lacourt I, Venard P, Keller H, Allasia V, Ricci P, Duncan JM. (1998): Heterologous expression of a basic elicitin from *Phytophthora cryptogea* in *Phytophthora infestans* increases its ability to cause leaf necrosis in tobacco. *Microbiology* **144**, 3343-3349.
- Parani M., Rudrabhatla S., Myers R., Weirich H., Smith B., Leaman D.W., Goldman S.L. (2004): Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 359-366.
- Plešková V., Kašparovský T., Obořil M., Ptáčková N., Chaloupková R., Ladislav D., Damborský J., Lochman J. (2011): Elicitin–membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: Role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**, 321-328.
- Ponchet M., Panabières F., Milat M.L., Mikes V., Montillet J.L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y., Blein J.P. (1999): Are elicitins cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 1020-1047.
- Ptáčková N., Klempová J., Obořil M., Nedělová S., Lochman J., Kašparovský T. (2015): The effect of cryptogein 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.
- Ricci P., Bonnet P., Huet J.C., Sallantin M., Beauvais C. F., Bruneteau M., Billard V.,

- Michel G., Pernollet J.C. (1989): Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry* **183**, 555–564.
- Ross A.F. (1961): Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**, 340-358.
- Rustérucci C., Stallaert V., Milat M.-L., Pugin A., Ricci P., Blein J.-P. (1996): Relationship between AOS, lipid peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiology*, **111**, 885–891.
- Rustérucci C., Montillet J. L., Agnel J. P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J. J., Etienne P., Suty L., Blein J. P., Triantaphylides C. (1999): Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *Journal of Biochemical Chemistry* **274**, 36446-36455.
- Saito S., Hamamoto S., Moriya K., Matsuura K., Sato A., Muto J., Noguchi H., Yamauchi S., Tozawa Y., Ueda M., Hashimoto K., Köster P., Dong Q., Held L., Kudla J., Utsumi T., Uozumi N. (2018): N-myristoylation and S-acylation are common modifications of Ca<sup>2+</sup>-regulated Arabidopsis kinases and are required for activation of the SLAC1 anion channel. *New Phytologist*
- Sedlár A. (2016): Study of the role of reactive oxygen and nitrogen species in the plant defense response after elicitor application. Bakalárska práca, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Sedlár A. (2018): Studium vlivu modifikace struktury elicitorů infestinu a kryptogeinu na modelovém systému tabákové buněčné suspenze. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika
- Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H. J., Nagano T. (2003): Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 3170-3175
- Senthil-Kumar M., Mysore K.S. (2013): Nonhost Resistance Against Bacterial Pathogens: Retrospectives and Prospects. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 407-427.
- Singh A., Bhatnagar N., Pandey A., Pandey G.K. (2015): Plant phospholipase C family: Regulation and functional role in lipid signaling. *Cell Calcium* **58**, 139-146.
- Singh R., Chandrawat K.S. (2017): Role of Phytoalexins in Plant Disease Resistance. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6**, 125-129.
- Smith A.M., Coupland G., Dolan L., Harberd N., Jones J., Martin C., Sablowski R., Amey A., (2010): *Plant Biology*. Garland Science, New York, USA, 679 strán.
- Stam R., Mantelin S., McLellan H., Thilliez G. (2014): The role of effectors in nonhost resistance to filamentous plant pathogens. *Frontiers in Plant Science* **5**, 582.
- Stintzi A., Browse J. (2000): The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10625-10630.
- Taiz L., Zeiger E. (2010): *Plant Physiology*. 5th ed., Sinauer Associates Inc., Sunderland, 782 strán.
- Tasma I.M., Brendel V., Whitham S.A., Bhattacharyya M.K. (2008): Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **7**, 627-637.
- Tercé-Laforgue T., Huet J.C., Pernollet J.C. (1992): Biosynthesis and secretion of cryptogein, a protein elicitor secreted by *Phytophthora crytoega*. *Plant Physiology* **98**, 936-941.
- Thomma B.P.H.J., Eggermont K., Penninckx I.A.M.A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P.A., Broekaert W.F. (1998): Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 15107-15111.
- Thordal-Christensen H. (2003): Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 351-357.

- Torres M.A., Dangl J.L. (2005): Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 397-403.
- Uma B., Rani T.S., Podile A.R. (2011): Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology* **168**, 2141-2152.
- Uppalapati S. R., Ishiga Y., Doraiswamy V., Bedair M., Mittal S., Chen J. H., Nakashima J., Tang Y. H., Tadege M., Ratet P., Chen R. J., Schultheiss H., and Mysore K. S. (2012): Loss of abaxial leaf epicuticular wax in *Medicago truncatula* *irg1/palm1* mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens. *Plant Cell* **24**, 353-370.
- Van der Biezen E.A., Jones J.D.G. (1998): Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 454-456.
- van der Hoorn, R.A.L., Kamoun S. (2008): From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell* **20**, 2009-2017.
- van Leeuwen W., Vermeer J.E., Gadella T.W. Jr., Munik T. (2007): Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole *Arabidopsis* seedlings. *Plant journal* **56**, 1014-1026.
- Vandelle E., Delledonne M. (2011): Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science* **181**, 534-539.
- Vossen J. H., Abd-El-Haliem A., Fradin E. F., Van Den Berg G. C.M., Ekengren S. K., Meijer H. J.G., Seifi A., Bai Y., Ten Have A., Munnik T., Thomma B. P.H.J., Joosten M. H.A.J. (2010): Identification of tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase-C (PI-PLC) family members and the role of PLC4 and PLC6 in HR and disease resistance. *Plant Journal* **62**, 224-239.
- Wang L., Zhu X., Liu J., Chu X., Jiao J., Liang Y. (2012): Involvement of phospholipases Cand D in the defence responses of riboflavin-treated tobacco cells, *Protoplasma* **250**, 441-449.
- Wheeler G.L., Brownlee C. (2008): Ca<sup>2+</sup> signalling in plants and green algae – changing channels. *Trends in Plant Science* **9**, 506-514.
- Wilson I.B.H., Gavel Y., von Heijne G. (1991): Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites. *Biochemical Journal* **275**, 529- 534.
- Wulff B. B. H., Horvath D. M., Ward E. R. (2011): Improving immunity in crops: New tactics in an old game. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 468-476.
- Xu J., Kwang-Yeol Y., Jin Yoo S., Liu Y., Ren D., Zhang S. (2014): Reactive oxygen species in signaling the transcriptional activation of WIPK expression in tobacco.. *Plant, cell & environment*. **37**, 1614-1625.
- Yamaguchi Y., Huffaker A. (2011): Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 351-357.
- 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.
- Yun B-W, Feechan A, Yin M (2011): S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264-268.
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T., Felix G. (2006): Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell* **125**, 749-760.
- Zipfel C., Rathjen J. P. (2008): Plant Immunity: AvrPto Targets the Frontline. *Current Biology* **18**, R218-R220.
- Zhang Y., Zhu H., Zhang Q., Li M., Yan M., Wang R., Wang L., Welti R., Zhang W., Wang X. (2009). *The Plant Cell* **21**, 2357-2377.



## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová
APX	askorbátperoxidáza
Avr	gény avirulencie
AVR3a	efektorová molekula u <i>Phytophthora infestans</i>
AvrA	efektorová molekula u <i>Pseudomonas syringae</i>
AvrD	efektorová molekula u <i>Pseudomonas syringae</i>
BAK1	kináza asociovaná s BRI1
BRI1	<i>brassinosteroid-insensitive1</i>
cADPR	cyklická ADP-ribosa
CAT	kataláza
CBL5	kalcineurin B-like proteín
cGMP	cyklický guanozíntrifosfát
CIPK11	kalcineurin B-like interagujúca proteínkináza
CPK6	kalcium dependentná proteínkináza 6
CRY	kryptogén
DAG	diacylglycerol
DGK	diacylglycerolkináza
DGPP	diacylglycerolpyrofosfát
ELI	elicitin
ELL	elicitinu podobný proteín
ELR	receptor <i>elicitin response</i>
ETI	efektorom spustená imunita
ETS	efektorom spustená náchylnosť
FDA	fluoresceín diacetát
FS2	<i>flagellin-sensing 2</i>
GA	Golgiho komplex
H <sub>2</sub> DCF DA	2',7'-dichlorodihydrofluoresceíndiacetát
HPF	hydroxyfenyl fluoresceín
HR	hypersenzitívna reakcia
hROS	vysokoreaktívne formy kyslíka
INF	infestin
IP <sub>3</sub>	inositoltrisfosfát
ISR	indukovaná systémová rezistencia
JA	kyselina jasmonová
LaCl <sub>3</sub>	chlorid lantanitý
LOX	lipoxygenázy
LRR	doména bohatá na leucínové repetície
MAMP	molekulové vzory asociované s mikróbom
MAPK	mitogénom aktivovaná proteínkináza
MIMP	<i>microbe-induced molecular patterns</i>
NB	nukleotid viažuca doména
NO	oxid dusnatý
NPC	nešpecifická fosfolipáza
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoxidový anión radikál
OH <sup>•</sup>	hydroxylový radikál
PA	kyselina fosfatidová
PAL	fenylalanínamoniak lyáza
PAMP	molekulové vzory asociované s patogénom

PC	fosfatidylcholín
PC-PLC	fosfatidylcholínfosfolipáza
PEPR	receptory rastlinných elicitorových peptidov
Peps	rastlinné elicitorové peptidy
pI	izoelektrický bod
PI-PLC	fosfatidylinositolfosfolipáza C
PK	proteín kináza
PKC	proteínkináza C
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
PP	proeínfosfatáza
PR	proteíny súvisiace s patogenézou,
PRR	patogén rozpoznávajúci receptor
PTI	PAMP spustená imunita
R	gény rezistencie
RBOH	<i>respiratory burst oxidase homologue</i>
RLK	receptor like-kináza
RLP	receptor like-proteín
RLU	jednotka luminiscencie
RNS	reaktívne formy dusíka
ROS	reaktívne formy kyslíka
<i>Rpg2</i>	gény rezistencie rastliny sóje
<i>Rpg4</i>	gény rezistencie rastliny sóje
RPM	otáčky za minútu
SAR	systemovo získaná rezistencia
SEKR3	somatic embryogenesis receptor kináza 3
SIPK	proteínkináza indukovaná kyselinou salicylovou
SOBIR1	supresor proteínu BIR1-1
SOD	superoxiddizmutáza
WIPK	proteínkináza indukovaná poranením
WIMP/HIMP	<i>wound/herbivory-induced molecular patterns.</i>
WRKY	transkripčné faktory