

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium úlohy reaktivních forem kyslíku a dusíku
v obranné reakci rostlin po aplikaci elicitinu infestinu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Antonín Sedlář**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.**
Rok: 2016

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

V Olomouci dne 6. 5. 2016

Antonín Sedlář

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

Dále chci poděkovat také Mgr. Tereze Jendrišákové a Mgr. Lucii Činčalové Ph.D. za všestrannou pomoc při vypracování experimentální části.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Antonín Sedlář
Název práce	Studium úlohy reaktivních forem kyslíku a dusíku v obranné reakci rostlin po aplikaci elicitinu infestinu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou toxickými produkty aerobního metabolismu živých organismů. V rostlinách dochází po rozpoznání patogenu k oxidativnímu vzplanutí, které je charakteristické výrazným nárůstem produkce ROS. Oxid dusnatý (NO) je významným mediátorem fyziologických i patofyziologických procesů v rostlinách. NO moduluje aktivitu řady proteinů zapojených v signálních kaskádách fytohormonů a enzymů metabolismu ROS.

Elicitiny jsou proteinové elicitory produkované organismy rodu *Phytophthora* a *Pythium*. V předložené práci byl studován a porovnán vliv elicitinu infestinu (INF1) z fytopatogenu *Phytophthora infestans*, kryptogeinu původem z *Phytophthora cryptogea* a oligandrinu původem z *Pythium oligandrum* na produkci ROS a NO v rané fázi po jeho aplikaci k suspenzním kulturám tabáku. Byl posouzen také vliv elicitinů na expresi genů zapojených v metabolismu ROS a NO a na aktivaci signálních drah kyseliny salicylové, jasmonové a ethylenu. Z výsledků je patrné, že působením infestinu dochází k nadprodukcí ROS a NO, naopak produkce vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS) je potlačena. Předběžné výsledky ze stanovení exprese vybraných genů naznačují, že infestin aktivuje signální dráhy kyseliny jasmonové a ethylenu.

Klíčová slova	Elicitiny, infestin, kyselina jasmonová, ethylen, reaktivní formy kyslíku, oxidativní vzplanutí, oxid dusnatý, <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Antonín Sedlář
Title	Study of the role of reactive oxygen and nitrogen species in the plant defense response after elicitor infestatin application
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2016

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are toxic products of aerobic metabolism of living organisms. The oxidative burst, which is characterized by a significant increase of ROS, occurs in plants after pathogen recognition. Nitric oxide (NO) is an important mediator of physiological and pathophysiological processes in plants. NO modulates the activity of a number of proteins involved in phytohormones signaling cascades and enzymes of ROS metabolism.

Elicitins are protein elicitors produced by organisms of genus *Phytophthora* and *Pythium*. The influence of elicitor infestatin (INF1) from the phytopathogen *Phytophthora infestans*, cryptogin that originated from *Phytophthora cryptogea* and oligandrin that originated from *Pythium oligandrum* on the production of ROS and NO in the early phase after its application into suspension cultures of tobacco was studied and compared in this thesis. The influence of elicitors on the expression of genes that are involved in the metabolism of ROS and NO and on the activation of signaling pathways of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene was evaluated as well. The results show that the effect of infestatin leads to an overproduction of ROS and NO. On the contrary, the production of hyper reactive oxygen species (hROS) is suppressed. Preliminary results of determination of selected genes expression are suggesting that infestatin activates signaling pathways of jasmonic acid and ethylene.

Keywords	Elicitins, infestatin, jasmonic acid, ethylene, reactive oxygen species, oxidative burst, nitric oxide, <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	<i>Phytophthora infestans</i>	2
2.1.1	Rozmnožování <i>P. infestans</i>	2
2.1.2	Průběh infekce po napadení rostliny patogenem <i>P. infestans</i>	3
2.1.3	Obranná reakce rostliny proti patogenu <i>P. infestans</i>	4
2.2	Elicitiny.....	6
2.2.1	Infestin.....	8
2.2.2	Další elicitiny produkované patogenem <i>P. infestans</i>	9
2.3	Reaktivní formy kyslíku	11
2.3.1	Úloha ROS při obranné reakci rostlin proti patogenům.....	12
2.3.1.1	NADPH oxidasy	13
2.3.1.2	Peroxidasy buněčné stěny.....	15
2.3.1.3	Oxalát oxidasy	15
2.3.1.4	Aminoxidasy, polyaminoxidasy	16
2.4	Reaktivní formy dusíku	16
2.4.1	Oxid dusnatý.....	17
2.4.1.1	Produkce NO	17
2.4.1.2	Odbourávání NO.....	18
2.4.2	S-nitrosylace	20
2.4.2.1	Úloha S-nitrosylace při obranné reakci rostlin	20
3	Experimentální část	23
3.1	Chemikálie.....	23
3.2	Vybavení.....	23
3.3	Rostlinný materiál.....	24
3.4	Elicitiny.....	25
3.5	Metody	25
3.5.1	Stanovení produkce ROS a RNS pomocí fluorescenčních sond	25
3.5.2	Stanovení viability tabákových buněk.....	26
3.5.3	Extrakce proteinů.....	26
3.5.4	Stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou.....	26
3.5.5	SDS-PAGE	27
3.5.6	Western Blot	28
3.5.7	Izolace a purifikace RNA	28
3.5.8	Měření koncentrace RNA.....	29
3.5.9	Reverzní transkripce.....	29

3.5.10	PCR.....	30
3.5.11	Agarosová elektroforéza.....	31
3.5.12	qPCR.....	31
4	Výsledky a diskuze	32
4.1	Vliv elicitinů na viabilitu tabákových buněk.....	32
4.2	Vliv elicitinů na produkci ROS a RNS v tabákových buňkách.....	34
4.3	Vliv elicitinů na produkci Hsp70.....	38
4.4	Vliv elicitinů na expresi genů zapojených v metabolismu ROS a RNS.....	40
4.5	Vliv elicitinů na expresi genů signálních drah SA, JA a ethylenu	43
4.5.1	Vliv elicitinů na expresi genů signální dráhy kyseliny salicylové	43
4.5.2	Vliv elicitinů na expresi genů signální dráhy kyseliny jasmonové	45
4.5.3	Vliv elicitinů na expresi genů signální dráhy ethylenu	46
5	Závěr.....	49
6	Seznam použité literatury.....	50
7	Seznam použitých zkratk.....	56

Cíle práce:

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

1. charakterizace patogenního organismu *Phytophthora infestans* a mechanismu obranné reakce rostlin na daný patogen
2. charakterizace elicitinů se zaměřením na elicitin infestin sekretovaný patogenním organismem *Phytophthora infestans*
3. úloha reaktivních forem kyslíku a dusíku v obranných reakcích rostlin vystavených působení elicitinů.

V experimentální části je cílem práce otestovat elicitin infestin a porovnat jeho působení s elicitinou kryptogeinem a oligandrinem na modelovém systému suspenzní kultury buněk tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. Studium vlivu infestinu, kryptogeinu a oligandrinu

1. na životnost buněk *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi
2. na produkci ROS a RNS
3. na produkci Hsp70
4. na expresi vybraných genů enzymů metabolismu ROS a RNS (GSNOR a NADPH oxidasa)
5. změny úrovně transkripce genů zapojených do signálních obranných drah kyseliny salicylové, jasmonové a ethylenu

1 Úvod

Rostliny si proti patogenům vytvořily dvě linie aktivní obrany. První z nich je vyvolána interakcí struktur spojených s patogenem (PAMPs) a receptorů v cytoplazmatické membráně rostlinných buněk (PRRs). Druhá je spuštěna patogenními efekty, které se vážou na receptory lokalizované většinou v cytosolu (Jones a Dangl, 2006).

Fytopatogenní organismy rodu *Phytophthora* a *Pythium* produkují elicitory proteinového charakteru, tzv. elicitory, které u řady rostlin spouští obrannou reakci (Kamoun *et al.*, 1997a). *Phytophthora infestans* je hemibiotrofní fytopatogenní oomyceta, která napadá rostliny z čeledi lilkovitých. U brambor způsobuje chorobu známou jako plíseň bramborová (West a Vleeshouwers, 2004). U *P. infestans* bylo nalezeno celkem 7 genů kódujících elicitory (Kamoun *et al.*, 1999). Nejvýznamnějším z nich je infestin (INF1) produkovaný v myceliu patogena, rostlina jej rozpoznává jako PAMP (Jiang *et al.*, 2005).

Při aktivaci obranné reakce dochází mimo jiné k oxidativnímu vzplanutí, které je charakteristické prudkým nárůstem produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) v apoplastu. ROS mohou mít jednak přímý antimikrobiální účinek a dále mohou indukovat expresi genů spojených s patogenesí (Lamb a Dixon, 1997). Zdrojem ROS při oxidativním vzplanutí jsou NADPH oxidasy, peroxidasy buněčné stěny, oxalát oxidasy, aminoxidasy a polyaminoxidasy (Bolwell, 1999).

S obrannou reakcí je také často spojena zvýšená produkce oxidu dusnatého (NO) a tvorba dalších reaktivních forem dusíku - RNS (Yamamoto *et al.*, 2004). Bioaktivita RNS je umožněna jejich schopností kovalentně modifikovat proteiny a modulovat tak jejich aktivitu. Jednou z nejvýznamnějších modifikací je S-nitrosylace, kdy dochází k navázání NO na cysteinové residuum v proteinu (Gaston *et al.*, 2003). NO takto ovlivňuje aktivitu rostlinné NADPH oxidasy, hlavního zdroje superoxidu při oxidativním vzplanutí, ale také akorbátperoxidasy, enzymu s antioxidační aktivitou (Yu *et al.*, 2014, Begara-Morales *et al.*, 2015). Dále také modifikuje řadu proteinů zapojených v signálních drahách např. kyseliny salicylové, jasmonové a ethylenu (Freschi *et al.*, 2013, Yu *et al.*, 2014).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 *Phytophthora infestans*

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary je hemibiotrofní fytopatogen (říše Chromista, třída Oomycetes, oddělení Peronosporomycota, čeleď Pythiaceae), který napadá rostliny z čeledi lilkovitých. U brambor a rajčat způsobuje chorobu známou jako plíseň bramborová. V letech 1845-1849 tato choroba způsobila „Velký hladomor“ v Irsku. Dle nového fylogenetického řazení patří do prvního kladu (vývojové větve) rodu *Phytophthora* spolu s dalšími 12 druhy jako například *P. nicotianae* a *P. mirabilis* (Kroon *et al.*, 2012).

P. infestans je heterotrofní a mycelium-tvořící organismus, proto byl dlouhou dobu řazen spolu s ostatními oomycetami do říše Fungi. Od mikroskopických hub se *P. infestans* liší stavbou buněčné stěny, která je tvořena především β -1,3-glukany, β -1,6-glukany a celulosou (β -1,4-glukan), v malých množstvích pak může obsahovat chitin. Většinu svého života je diploidní, hyfy nejsou odděleny septy. *P. infestans* není schopna syntetizovat steroly (Latijnhouwers *et al.*, 2003).

2.1.1 Rozmnožování *P. infestans*

P. infestans je diploidní, heterothallický organismus, může se rozmnožovat pohlavně i nepohlavně (Obr. 1).

P. infestans se na polích rozmnožuje především nepohlavně. Sporangia (výtrusnice) jsou produkovány ve sporangioforech, které se tvoří na infikovaných pletivech. Sporangia jsou roznesena pasivně vzduchem nebo deštěm na další rostlinná pletiva. Sporangia při teplotě nad 15°C (optimum 20-25°C) klíčí přímo za vzniku mycelia a tvorby dalších sporangií. Při nižších teplotách (10-15°C) a ve vlhkých podmínkách dochází k rýhování a vzniku mnohojaderného sporangia, ze sporangií se pak uvolňuje 6 až 8 pohyblivých zoospor (Fry, 2008).

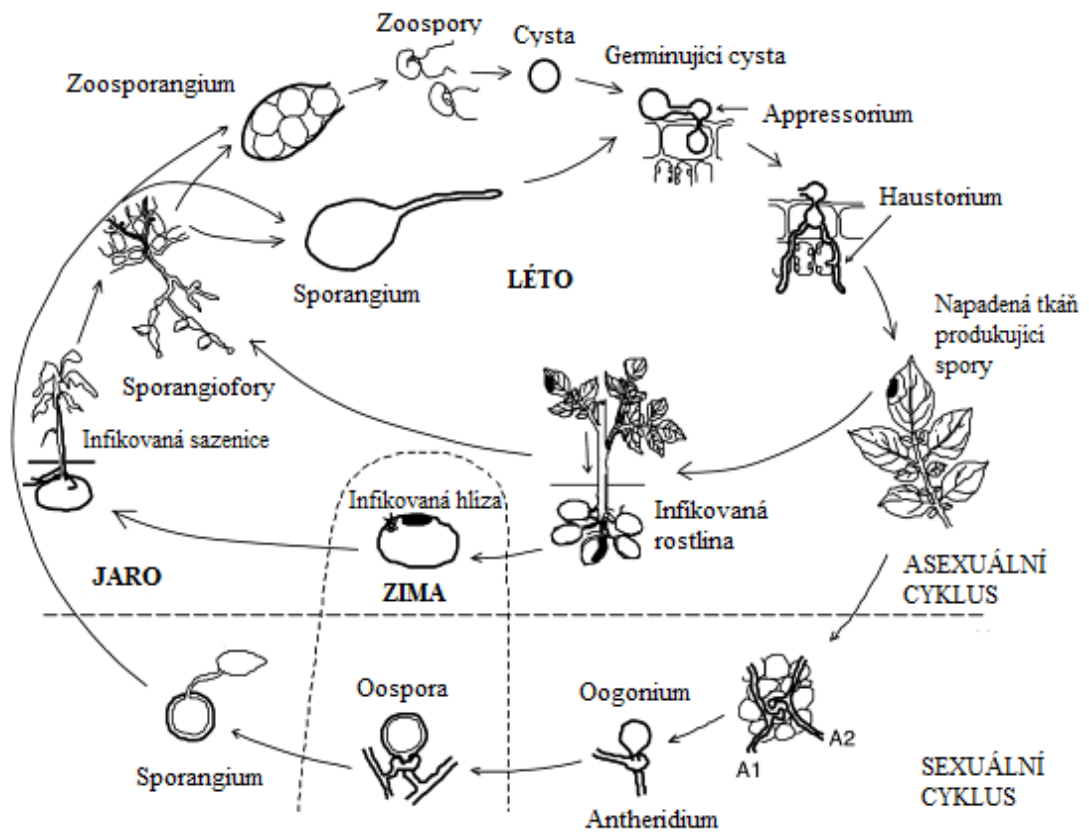
Pro pohlavní rozmnožování *P. infestans* je potřeba dvou pohlavních typů A1 a A2 (Brasier, 1992). Pohlavní typ A1 je heterozygot (Aa), A2 je homozygot (aa). Ve stélkách dvou jedinců dochází vlivem hormonů ke vzniku gametangia (oogonie nebo antheridia), přičemž každý z pohlavních typů může vytvářet buď samičí nebo samčí pohlavní orgány. Antheridium zcela obklopí oogonii, dochází ke splynutí dvou haploidních zárodků, což vede ke vzniku diploidní oospory. Tyto spory jsou silnostěnné a mohou přežít mnoho let v půdě. Jsou velmi odolné vůči nízkým teplotám

(van West a Vleeshouwers, 2004). Pohlavní rozmnožování bylo považováno za vzácné, protože ve světě byl rozšířen především pohlavní typ A1. Koncem 70. let 20. století došlo k rozšíření pohlavního typu A2 z Mexika do jiných částí světa, proto je dnes přikládán význam i pohlavnímu rozmnožování (Yuen a Andresson, 2013).

2.1.2 Průběh infekce po napadení rostliny patogenem *P. infestans*

Zoospory jsou jednojaderné buňky bez buněčné stěny, mají dva bičíky a jsou po krátkou dobu pohyblivé. Poté, co se uvolní ze sporangií, putují ve vodném prostředí pomocí chemotaxe k hostiteli. Zoospory mohou napadat hlízy, kořeny, ale i nadzemní části rostliny. Zoospory se po přiblížení k hostiteli zbaví bičíků a vytváří buněčnou stěnu, čímž vznikají nepohyblivé cysty, ty vylučují glykoproteiny podobné lidskému mucinu, které slouží jako ochrana před poškozením a k přichycení na hostitele. Cysty dále vytváří klíčící vlákno, na jehož vrcholu vzniká speciální útvar apresorium, který penetruje buněčnou stěnu epidermální rostlinné buňky (Krämer *et al.*, 1997). *P. infestans* preferuje pro penetraci zejména listů epidermální buňky, které sousedí se stomatálními buňkami. Apresorium vytváří v hostitelské buňce infekční vezikuly. Z vezikul vyrůstají hyfy, které při biotrofní fázi infekce dále prorůstají do mezibuněčných prostor rostlinných pletiv. Hyfy se větví na haustoria, která se vchlípí dovnitř buněčné membrány (invaginace) a slouží k nasávání živin z hostitele. Po určité době je spuštěna nekrotrófní fáze infekce, která vede k usmrcení rostlinných buněk a vzniku nekrotických skvrn. V této fázi prorůstají hyfy přes stomata až na povrch a vytváří sporangia (Fry 2008; Nowicki *et al.*, 2012a; Kamoun *et al.*, 2015).

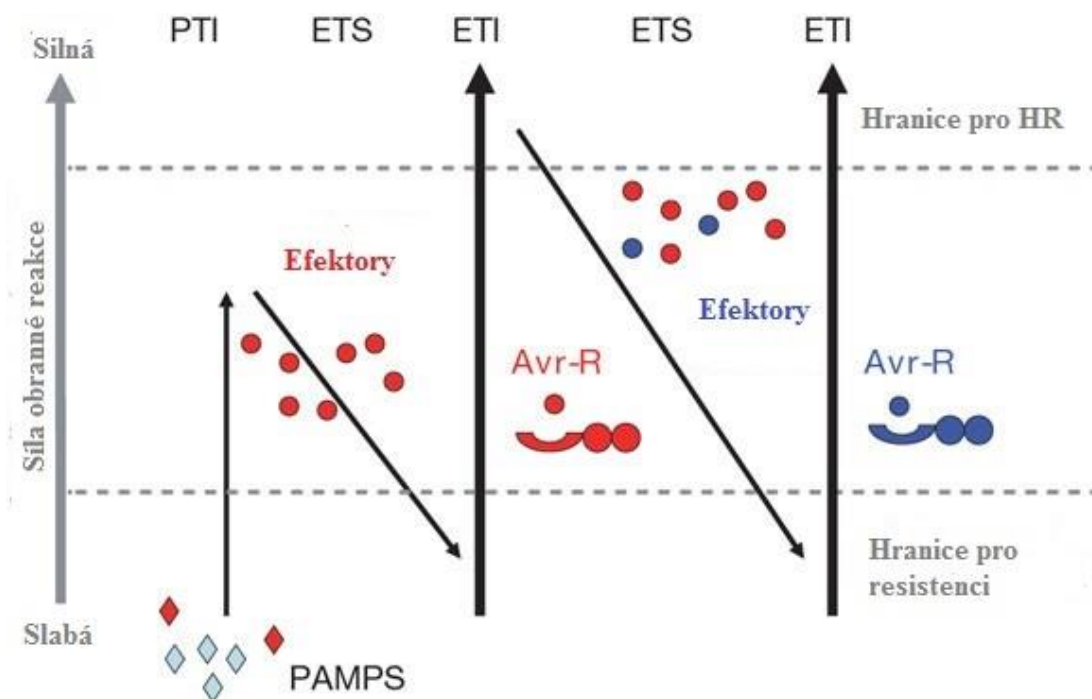
Dva dny po napadení se na rostlině začnou objevovat nekrotické skvrny, po pěti až deseti dnech může dojít ke kolapsu rostliny. Doba od napadení po sporulaci trvá obvykle 4 dny.



Obr. 1: Životní cyklus hemibiotrofního patogenu *Phytophthora infestans* (přepřacováno z van West a Vleeshouwers, 2004).

2.1.3 Obranná reakce rostliny proti patogenu *P. infestans*

Přirozená obrana rostlin při interakci patogen-rostlina je nejčastěji popisována modelem (Obr. 2), který poprvé představili Jones a Dangl (2006). Dle modelu je první linie aktivní rostlinné obrany tvořena membránovými receptory, které rozpoznávají struktury spojené s patogenem (PRRs). Struktury spojené s patogenem (PAMPs) jsou molekuly s konzervovanou strukturou v celé řadě patogenů, patří mezi ně například flagelin nebo chitin. Obranná reakce aktivovaná pomocí PAMP se označuje jako PTI (PAMP-triggered immunity). Některé patogeny ovšem vylučují do apoplastu nebo do cytoplasmy rostlinné buňky efektorové molekuly, které přispívají k virulenci patogenu a potlačují PTI. Rostlina na tyto látky může reagovat pomocí R-proteinů a spouštět druhý stupeň obrany, tzv. ETI (effector-triggered immunity). R-proteiny jsou intracelulární receptory, většinou obsahující doménu NB-LRR. ETI je více specifická a účinnější než PTI, většinou indukuje hypersenzitivní reakci (HR), která se projevuje odumřením buněk v místě napadení patogenem. ETI je tedy velmi efektivní proti biotrofním patogenům, které z odumřelé tkáně nemohou odebrat živiny, proti nekrotrofům je však neúčinná.



Obr. 2: Model obranné reakce rostlin proti patogenům. V první fázi dochází ke vzniku PTI (Pathogen triggered immunity). Efektory potlačují PTI, rostlina je náchylná k infekci, tento stav se nazývá ETS (Effector-triggered susceptibility). Pokud rostlina obsahuje R-proteiny, dojde k silné obranné reakci doprovázené hypersenzitivní reakcí, tzv. ETI (Effector-triggered immunity). Další druhy efektorů mohou opět spouštět ETS nebo ETI (převzato z Dangl a Jones, 2006).

Několik vteřin po interakci PAMP s příslušným receptorem dojde k prudkému nárůstu intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů, což vede k oxidativnímu vzplanutí (Chandra a Low, 1997). Zároveň je také pozorováno vyplavení K^+ a Cl^- iontů z buňky a alkalizace vnějšího prostředí (Fellbrich *et al.*, 2000). Později dochází k remodelaci buněčné stěny, syntéze kalózy, akumulaci proteinů, fenolických látek, ROS a RNS a v některých případech k hypersenzitivní reakci (Bolwell a Daudi, 2009).

Je známo, že *Phytophthora infestans* produkuje celou řadu látek, které vystupují jako efektory či PAMP (Tab. 1).

Tabulka 1: Přehled efektorů a PAMP produkovaných patogenem *Phytophthora infestans* (přepracováno z Nowicki *et al.*, 2012a)

Efektor	Biologická funkce
Apoplastické efekторы	
Enzymy degradující buněčnou stěnu	
Endo-polygalakturonasy	Degradace pektinu v buněčné stěně rostliny
Endo-glukanasy	Hydrolyza β -1,3-glukanů
Exo-glukanasy	Hydrolyza β -1,3-glukanů
Inhibitory enzymů	
Cystatin-like inhibitor proteas	Inhibice rostlinných cystein proteas a potlačení obranné reakce rostlin
Kazal-like extracelulární inhibitor proteas	Inhibice rostlinných proteas a potlačení obranné reakce rostlin
PAMPs a malé na cystein bohaté proteiny	
Elicitiny (INF1 a další)	Přenašeče sterolů, spuštění obranné reakce
PcF-like (scr74)	Fytotoxin-like, spouští HR
Transglutaminasy (Pep13)	Spouští oxidativní vzplanutí a HR
Efektory lokalizované v cytoplazmě	
Typ RXLR	
AVR1	Indukce HR po interakci s proteinem R1
AVR2	Indukce HR po interakci s proteinem R2, R2-like, Rpi-abpt, Rpi-blb3
AVR3a	Indukce HR po interakci s proteinem R3a, potlačení HR vyvolané INF1
AVR3b	Indukce HR po interakci s proteinem R3b
AVR4	Indukce HR po interakci s proteinem R4
AVRblb1	Třída I a II indukuje HR po interakci s proteinem Rpi-blb1, třída III může potlačit takto spuštěnou HR
AVRblb2	Indukce HR po interakci s proteinem Rpi-blb2
AVRvnt1	Indukce HR po interakci s proteinem Rpi-vnt1
Jiné	
Crinkling/necrosis inducing proteins	Potlačení/indukce HR
SNE1	Potlačení HR vyvolané Avr proteiny

2.2 Elicitiny

Jako elicitory je označována skupina strukturně podobných proteinových elicitorů produkovaných patogenními organismy rodu *Phytophthora* a *Pythium* (Kamoun *et al.*, 1997a). Tyto proteiny indukují hypersenzitivní reakci u rostlin tabáku (Kamoun *et al.*, 1993b). Společným strukturním znakem elicitinů je vysoce konzervovaná doména aminokyselin 1 až 98, obsahující 6 cysteinových reziduí, které vytvářejí 3 disulfidické můstky (Fefeu *et al.*, 1997). Rozložení cysteinových reziduí má téměř ve všech elicitinech schéma C₁-variabilní-C₂-23-C₃-4-C₄-14-C₅-variabilní-C₆. Disulfidické můstky jsou vytvořeny mezi rezidui C₁-C₅, C₂-C₄ a C₃-C₆ (Jiang *et al.*, 2006a). Charakteristická je nepřítomnost aminokyselin histidinu, tryptofanu a argininu v polypeptidovém řetězci, naopak serin, threonin, alanin a leucin

jsou zastoupeny hojně (Ponchet *et al.*, 1999). Elicitiny jsou globulární proteiny, tvořené 6 α -helixy, 2 antiparalelními β -skládanými listy a ω -smyčkou (Boissy *et al.*, 1996). Do své hydrofobní dutiny mohou elicitory vázat steroly a mastné kyseliny, patogenu tedy slouží jako extracelulární přenašeče sterolů (Mikeš *et al.*, 1998, Ponchet *et al.*, 1999). Schopnost elicitinů vázat se na membránové receptory a vyvolat hypersenzitivní reakci u rostlin je spojena s jejich schopností vázat steroly (Osman *et al.*, 2001b).

Elicitiny jsou děleny do 3 tříd (Tab. 2). Třída I zahrnuje 10 kDa elicitory tvořené přesně 98 aminokyselinami. Dělí se na dvě podtřídy, které se liší hodnotou isoelektrického bodu a nekrotickou aktivitou. Schopnost vyvolat nekrosu rostlinných buněk je spojena s reziduem na pozici 13. Elicitiny Ia (pI = 4-5) mají na této pozici hydrofobní valin; elicitory Ib (pI = 7,5-8,5) jsou až stokrát více nekroticky aktivní a na pozici 13 mají hydrofilní lysin (Fefeu *et al.*, 1997). Hodnota isoelektrického bodu je ovlivněna počtem lysinových residuí, Ib elicitory jich obsahují 6, Ia elicitory 2-4 (Ponchet *et al.*, 1999). Elicitiny třídy II jsou silně kyselé, obsahují krátký C-hydrofilní konec, který je tvořený 5-6 residuí. Třída III zahrnuje elicitory s C-koncovou glykosylovanou doménou, která obsahuje 65-101 aminokyselin (Kamoun *et al.*, 1997a).

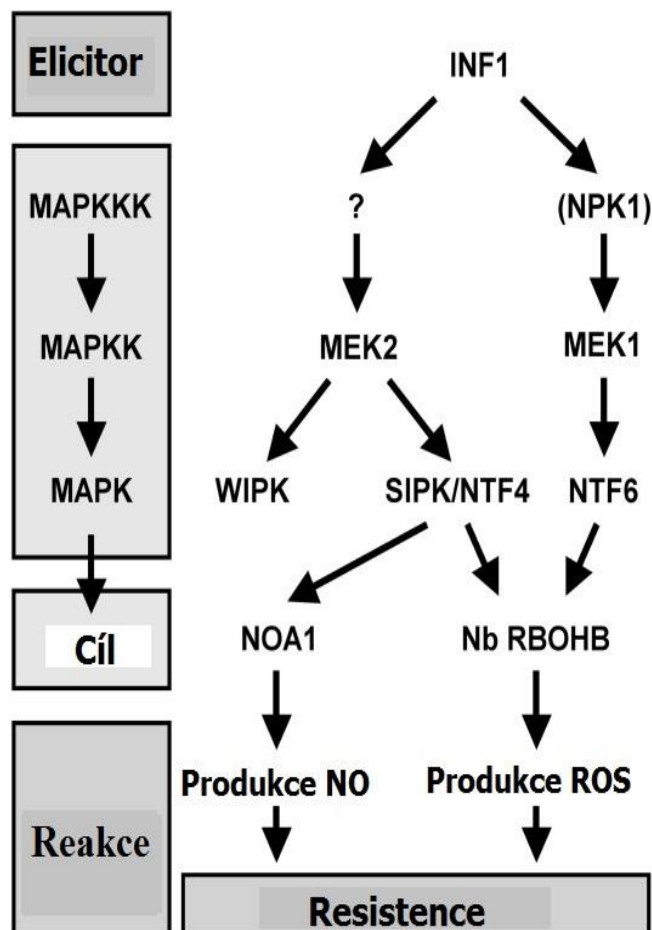
Tabulka 2: Klasifikace a charakteristika elicitinů (přepřacováno z Oswald *et al.*, 2014)

Třída	Počet aminokyselin	Isoelektrický bod	Charakteristika
I α	98	kyselé	Valin na pozici 13 (hydrofobní)
I β	98	bazický	Lysin na pozici 13 (hydrofilní)
II	103-104	velmi kyselé	
III	98+	kyselé	

2.2.1 Infestin

INF1, nazývaný též jako infestin, je elicitin třídy Ia produkovaný patogenem *Phytophthora infestans*, jeho molekulová relativní hmotnost je dle výsledků z hmotnostní spektrometrie 10 325 a vypočtený pI je 4,7 (Huet *et al.*, 1993). 15 aminokyselinových residuí, které vytváří u kryptogeu hydrofobní dutinu schopnou vázat ergosterol, je totožných i u INF1 (Boissy *et al.*, 1999). Gen kódující INF1 je exprimován v myceliu (Jiang *et al.*, 2005).

Při interakci rostlina-patogen vystupuje jako PAMP (Kamoun *et al.*, 1998). Patogenem je sekretován pomocí 20 aminokyselin dlouhého hydrofobního N-koncového signálního peptidu do extracelulárního prostoru rostlinných pletiv (Kamoun *et al.*, 1997a). N-koncový signální peptid je stejný u všech elicitinů třídy Ia (Baillieul *et al.*, 2003). INF1 je pravděpodobně přenesen endocytosou do cytoplasmy rostlinné buňky, zde se váže na subdoménu VIb kinasové domény membránového proteinu NbLRK1, tím způsobuje autofosforylaci kinasové domény, která dále přenáší obranný signál. Protein NbLRK1 patří do třídy B lektinu podobných receptorových kinas, jedná se o PRR nalezený v cytoplazmatické membráně buněk *N. benthamiana* (Kanzaki *et al.*, 2008). Membránový protein BAK1/SERK3 hraje významnou roli v obranné reakci rostliny jako regulátor funkce PRR při aplikaci INF1 a jiných PAMPs (Heese *et al.*, 2007). INF1 u *N. benthamiana* spouští mitogen-aktivovanou proteinkinasovou dráhu, která vede k produkci reaktivních forem kyslíku a NO, viz Obr. 3 (Asai *et al.*, 2008). Chaperony Hsp70 a Hsp90 hrají u *N. benthamiana* klíčovou roli při vyvolání hypersenzitivní reakce po aplikaci INF1. Byla prokázána interakce Hsp90 se SIPK, tyto proteiny jsou tedy patrně součástí MAPK signální dráhy (Kanzaki *et al.*, 2003). U rajčat (*S. esculentum* cv. MicroTom) aktivuje infestin signální dráhy kyseliny jasmonové a ethylenu bez nekrotických projevů na rostlině (Kawamura *et al.*, 2009). U rostlin rodu *Solanum* nebyla po aplikaci infestinu pozorována hypersenzitivní reakce (Kamoun *et al.*, 1997a), naopak u rodu *Nicotiana* byla HR zaznamenána (Huitema *et al.*, 2005).



Obr. 3: **Infestinem indukovaná MAPK signální dráha vedoucí k produkci NO a ROS u *N. benthamiana*.** INF1 spouští produkci NO přes signální dráhu MEK2-SIPK/NTF4 a produkci ROS přes signální dráhy MEK2-SIPK/NTF4 a (NPK1)-MEK1-NTF6. MAPK – mitogen-asociovaná proteinkinasa. MAPKK – MAPK kinasa. MAPKKK – MAPKK kinasa. Otazník značí neidentifikovanou MAPKKK. RBOHB – respiratory burst oxidase homologue B. NOA1 – NO associated 1. SIPK – salicyl acid-induced proteinkinase. WIPK – wound-induced proteinkinase (převzato z Asai *et al.*, 2008).

2.2.2 Další elicitory produkované patogenem *P. infestans*

U *P. infestans* bylo nalezeno celkem 7 genů kódujících elicitory, byly označeny jako *inf1*, *inf2a*, *inf2b*, *inf4*, *inf5*, *inf6* a *inf7* (Kamoun *et al.*, 1997a; Kamoun *et al.*, 1999). Elicitory INF2A, INF2B, INF5 a INF6 jsou řazeny do III třídy, elicitin INF4 je řazen do třídy I β (Baillieul *et al.*, 2003). INF1 je elicitin třídy 1 α (Huet *et al.*, 1993). Geny kódující INF4, INF5 a INF6 jsou exprimovány v myceliu, geny pro INF2A a INF2B jsou exprimovány navíc také v zoosporách, cystách a sporangiích (Jiang *et al.*, 2006a). Elicitory INF2A a INF2B obsahují C-koncovou doménu dlouhou 67 resp. 71 AMK (Kamoun *et al.*, 1997a). Zvýšený obsah threoninu a serinu v této doméně naznačuje, že zde dochází k O-glykosylaci (Wilson *et al.*, 1991), jedná se tedy o glykoproteiny, které jsou ukotveny v buněčné stěně patogenu (Jiang *et al.*, 2006a).

Sekvence konzervované domény INF2A a INF2B se liší pouze ve třech aminokyselinách (Obr. 4), přesto byly pozorovány značné rozdíly v jejich účinku na rostliny. INF2B spouští u *N. tabacum* hypersenzitivní reakci. *N. benthamiana* na tento elicitin nereaguje; INF2A spouští hypersenzitivní reakci u obou druhů. Rozdíly v citlivosti na INF2B u těchto dvou druhů by mohly vysvětlovat vyšší resistenci *N. tabacum* proti *P. infestans* (Huitema *et al.*, 2005). Elicitin INF4 je sekretován s N-koncovým signálním peptidem typickým pro elicitiny třídy III, jeho isoelektrický bod je zásaditý. INF5 je elicitin tvořený 164 aminokyselinami, vyznačuje se značnou podobností s γ -megasperminem. INF6 obsahuje 163 aminokyselin (Baillieul *et al.*, 2003).

	$\alpha 1$										$\alpha 2$										ω										$\alpha 3$																													
CryB	T	A	C	T	A	T	Q	Q	T	A	A	Y	K	T	L	V	S	I	L	S	D	A	S	F	N	Q	C	S	T	D	S	G	Y	S	M	L	T	A	K	A	L	P	T	T	A	Q	Y	K	L	M										
INF1	T	T	C	T	T	S	Q	Q	T	V	A	Y	V	A	L	V	S	I	L	S	D	T	S	F	N	Q	C	S	T	D	S	G	Y	S	M	L	T	A	T	S	L	P	T	T	E	Q	Y	K	L	M										
INF2A	E	T	C	S	P	T	D	Q	T	T	A	Y	S	T	L	A	S	V	L	T	L	S	S	F	Q	G	C	A	D	D	S	G	F	S	L	L	Y	S	T	A	L	P	D	D	D	Q	Y	V	K	M										
INF2B	E	T	C	S	P	T	D	Q	T	T	A	Y	S	T	L	A	S	V	L	T	L	S	S	F	Q	G	C	A	D	D	S	G	F	S	L	L	Y	S	T	A	L	P	D	D	A	Q	Y	V	K	M										
INF4	A	A	C	T	A	K	Q	Q	T	A	A	Y	N	T	L	V	S	L	L	S	E	A	S	F	S	T	C	S	K	D	S	G	Y	S	M	I	T	S	K	T	L	P	R	P	K	E	K	K	A	M										
INF5	E	A	C	S	T	T	Q	Q	A	S	A	Y	T	S	M	V	G	L	L	Q	G	T	S	L	S	T	C	A	S	D	S	G	Y	N	M	L	Y	A	T	A	L	P	T	A	E	Q	T	A	A	M										
INF6	A	A	C	T	T	A	Q	Q	Q	S	A	Y	L	G	M	V	G	L	L	T	G	T	A	L	N	E	C	A	S	E	S	G	Y	N	M	L	Y	A	T	A	L	P	T	D	D	E	R	K	A	M										
	1																														50																													
	$\alpha 3$										$\alpha 4$										$\beta 1$										$\beta 2$										$\alpha 5$										$\alpha 6$									
CryB	C	A	S	T	A	C	N	T	M	I	K	K	I	V	T	L	N	P	P	N	C	D	L	T	V	P	T	S	G	L	V	L	N	V	Y	S	Y	A	N	G	F	S	N	K	C	S	S	L												
INF1	C	A	S	T	A	C	K	T	M	I	N	K	I	V	S	L	N	A	P	D	C	E	L	T	V	P	T	S	G	L	V	L	N	V	Y	S	Y	A	N	G	F	S	S	T	C	A	S	L												
INF2A	C	A	S	D	N	C	K	S	L	I	E	S	V	A	G	L	N	P	P	N	C	D	L	T	V	P	T	S	G	L	V	L	N	V	V	D	L	T	S	G	F	S	E	K	C	S	S	S												
INF2B	C	A	S	D	N	C	K	S	L	I	E	S	V	A	S	L	N	P	P	N	C	D	L	T	V	P	T	S	G	L	V	L	N	V	V	D	L	T	S	G	F	S	K	K	C	S	S	S												
INF4	C	K	S	S	S	C	K	S	M	I	K	K	I	I	A	L	N	P	P	N	C	T	L	T	V	P	T	S	G	L	K	T	N	V	Y	K	M	A	H	D	F	S	S	D	C	K	R	L												
INF5	C	K	V	D	A	C	H	E	L	I	K	N	V	Q	A	T	N	P	P	D	C	D	L	N	I	P	T	S	G	A	I	M	N	V	K	S	L	A	D	N	F	E	P	G	C	S	P	S												
INF6	C	V	V	Q	A	C	H	D	L	I	V	S	V	L	A	T	N	P	P	D	C	D	L	T	I	P	T	S	N	A	V	M	N	V	Y	Q	L	A	S	T	F	E	T	Q	C	D	A	L												
	51																														98																													

Obr. 4: Sekvence vysoce konzervovaných domén elicitinů *P. infestans* v porovnání s kryptogeinem. Aminokyseliny značené červeně jsou u všech elicitinů shodné. AMK v modrém pozadí vytváří u kryptogeinu (1 β elicitin z *P. cryptogea*) hydrofobní dutinu, která váže steroly. Vyznačeny jsou také sekundární struktury nalezené u kryptogeinu (přepřacováno z Baillieul *et al.*, 2003, Huitema *et al.*, 2005).

2.3 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou toxickými produkty aerobního metabolismu všech organismů, vznikají přenosem elektronů na molekulární kyslík (Bolwell, 1999). Postupnou jednoelektronovou redukcí vzniká z molekulárního kyslíku superoxidový anion ($\cdot\text{O}_2^-$) nebo hydroperoxylový radikál ($\cdot\text{HO}_2$), dále peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$). Hydroperoxylový radikál je pouze protonovaná forma superoxidu ($\text{pK}_a = 4,8$), vzniká především v kyselém prostředí buněčné stěny. Peroxid vodíku a hydroxylový radikál v buňce proton neodštěpují, jejich pK_a je vyšší než 11 (Mori a Schoreder, 2004). Mezi ROS je řazen také singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), který vzniká excitací elektronu v molekulárním kyslíku.

V rostlinných buňkách jsou ROS produkovány v mitochondriích při respiraci (hlavně $\cdot\text{O}_2^-$), v chloroplastech při fotosyntéze ($\cdot\text{O}_2^-$ a $^1\text{O}_2$) a v peroxisomech, kde probíhá fotorespirace (vzniká hlavně $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2), dále také v buněčné stěně nebo cytoplazmatické membráně při abiotickém a biotickém stresu, kdy vzniká $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 (Mittler, 2002).

ROS reagují nespecificky s makromolekulami v buňce a způsobují mutace DNA, peroxidaci lipidů a oxidaci proteinů, což může vést až k buněčné smrti (Beckman *et al.*, 1998). Jako ochranu před oxidativním poškozením si rostliny vyvinuly celou řadu enzymatických a neenzymatických antioxidačních systémů, díky kterým je koncentrace ROS za fyziologických podmínek velmi nízká (Tab. 3). Pokud je rostlina vystavena stresovým faktorům (biotickým či abiotickým), dochází k nadprodukci ROS, antioxidační systémy nestíhají akumulované ROS odbourávat (Mittler, 2002).

Tabulka 3: Nejvýznamnější rostlinné antioxidanty (přepřacováno z Mittler, 2002)

Antioxidant	Lokalizace	ROS
Superoxiddismutasa	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	$\cdot\text{O}_2^-$
Askorbátperoxidasa	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
Katalasa	Per	H_2O_2
Glutathionperoxidasa	Cyt	H_2O_2 , ROOH
Peroxidasy	BS, Cyt, Vak	H_2O_2
Thioredoxinperoxidasy	Chl, Cyt, Mit	H_2O_2
Askorbát	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2 , $\cdot\text{O}_2^-$
Glutathion	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H_2O_2
α - tokoferol	Membrány	ROOH, $^1\text{O}_2$
Karotenoidy	Chl	$^1\text{O}_2$

Pozn.: Apo – apoplast, BS – buněčná stěna, Chl – chloroplast, Cyt – cytosol, Mit – mitochondrie, Per – peroxisom, Vak – vakuola.

2.3.1 Úloha ROS při obranné reakci rostlin proti patogenům

Jednou z prvních obranných reakcí, která nastává po napadení rostliny patogenem, je oxidativní vzplanutí, které je charakteristické prudkým nárůstem produkce ROS v apoplastu rostlinné buňky (Lamb a Dixon, 1997).

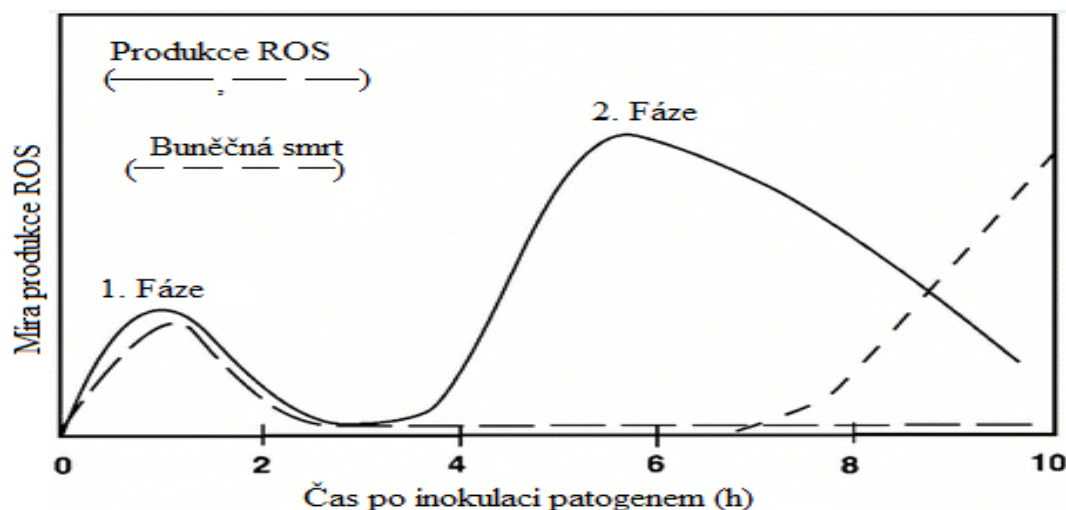
Hlavním zdrojem ROS při oxidativním vzplanutí jsou NADPH oxidasy v cytoplazmatické membráně, které generují O_2^- , nebo peroxidasy v buněčné stěně, které produkují H_2O_2 (Bolwell, 1999), dalšími zdroji mohou být také oxalát oxidasy, aminoxidasy a polyaminoxidasy.

Oxidativní vzplanutí má dvě fáze (Obr. 5). První nastává několik minut po rozpoznání PAMPs rostlinnou buňkou a přetrvává 60-180 minut. V této fázi je produkce ROS zajišťována enzymy, které se nacházely v apoplastu v dosud neaktivní formě, dochází také k indukci transkripce genů pro další enzymy produkující ROS. Druhá fáze je spuštěna 3-4 hodiny po napadení avirulentními patogeny a souvisí s rozpoznáním efektorů R-proteiny v rostlinné buňce. Produkce ROS v této fázi trvá déle a je větší než u první fáze, může vést k hypersenzitivní reakci (Doehlemann a Hemetsberger, 2013).

Oxidativní vzplanutí způsobuje zpevnění buněčné stěny, stimuluje tvorbu fytoalexinů a proteinů spojených s patogenezí, má přímý antimikrobiální účinek, vysoké koncentrace ROS mohou způsobit hypersenzitivní reakci (Lamb a Dixon, 1997).

Superoxid vznikající při oxidativním vzplanutí je přeměňován superoxid dismutasou (EC 1.15.1.1) či peroxidasou na peroxid vodíku (Léon *et al.*, 1995). Může také reagovat s oxidem dusnatým za vzniku peroxodisitanu ($ONOO^-$).

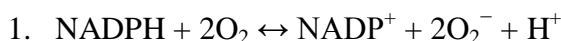
Peroxid vodíku difunduje přes cytoplazmatickou membránu do buňky, v apoplastu stimuluje syntézu prekurzorů ligninu a jejich následné zesíťování (Piterková *et al.*, 2005). Zesíťování probíhá za účasti peroxidas, které oxidují ligninové prekurzory za tvorby fenolických radikálů, které spolu reagují a tvoří lignin. Peroxid vodíku také aktivuje 2-hydroxylyasu kyseliny benzoové, což vede k akumulaci kyseliny salicylové. Peroxid vodíku spolu s kyselinou salicylovou poté aktivují expresi obranných genů a indukují hypersenzitivní reakci (Léon *et al.*, 1995).



Obr. 5: Produkce ROS po napadení rostliny bakteriálním patogenem. 1. fáze je nespecifická pro řadu stresových podnětů. 2. fáze nastává pouze při napadení avirulentním patogenem a souvisí s ustavením resistance proti patogenu, virulentní patogeny tuto fázi nespouští (převzato z Lamb a Dixon, 1997).

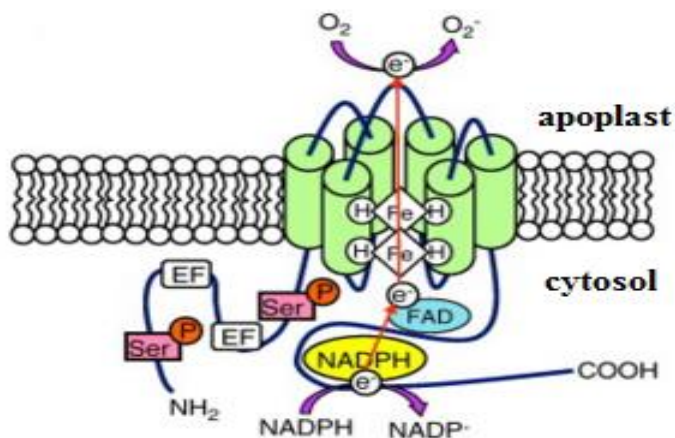
2.3.1.1 NADPH oxidasy

NADPH oxidasa (EC 1.6.3.1.) je multienzymový komplex lokalizovaný v cytoplazmatické membráně. Dosud byl nejlépe popsán savčí isoenzym NADPH oxidasy Nox2, který byl nalezen ve fagocytech. Je tvořen podjednotkami $p40^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ a GTPasou Rac, které mají regulační funkci a jsou lokalizovány v cytoplasmě, dále integrálním membránovým flavocytochromem b_{558} , který je složen z katalytické podjednotky $gp91^{\text{phox}}$ a adaptorového proteinu $p22^{\text{phox}}$. Fosforylace podjednotky $p47^{\text{phox}}$ způsobí aktivaci celého enzymového komplexu, $gp91^{\text{phox}}$ katalyzuje reakci dle rovnice 1 (Babior, 2004).



Rostlinné NADPH oxidasy (Obr. 6) jsou homologní s podjednotkou $gp91^{\text{phox}}$ savčí NADPH oxidasy, bývají označovány jako RBOHs - respiratory burst oxidase homologues (Lamb a Dickson, 1997) a jsou zdrojem O_2^- v obou fázích oxidativního vzplanutí po napadení patogenem (Yoshioka *et al.*, 2001). Na rozdíl od $gp91^{\text{phox}}$ obsahují RBOHs N-koncovou hydrofilní doménu, která je tvořena dvěma motivy EF-ruky, které vážou Ca^{2+} ionty (Keller *et al.*, 1998). V rostlinách nebyla jednoznačně prokázána přítomnost homologů k podjednotkám $p40^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ a $p22^{\text{phox}}$ (Tenhaken a Rübel, 1998). Rostlinné NADPH oxidasy mohou být aktivní bez cytoplazmatických podjednotek (Sagi a Fuhr, 2001) a jejich aktivita je stimulována zvýšenou koncentrací Ca^{2+} iontů (Ogasawara *et al.*, 2008), fosforylací přes vápník-

dependentní proteinkinasu (Kobayashi *et al.*, 2007) a přes MAPK signální dráhu (Asai *et al.*, 2008). U rýže (*oryza sativa*) byl prokázán význam homologů Rac proteinu při obranné reakci, nelze proto vyloučit jejich úloha při regulaci RBOHs (Ono *et al.*, 2001). U rostlin *N. benthamiana* s umlčenými geny pro NbrBOHA a NbrBOHB bylo pozorováno mírnější oxidativní vzplanutí po aplikaci INF1 než u kontrolních rostlin, navíc tyto rostliny vykazovaly sníženou resistenci proti *P. infestans* (Yoshioka *et al.*, 2003).

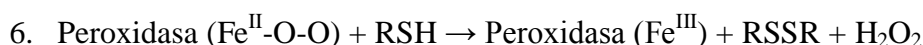
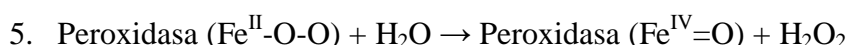
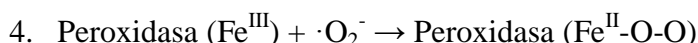
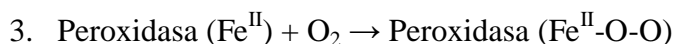
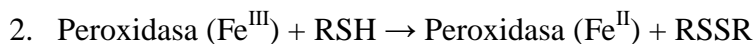


Obr. 6: Rostlinná RBOH. Z NADPH se uvolňují elektrony, které jsou transportovány přes FAD a hemy až na kyslík za vzniku superoxidového aniontu radikálu. Transmembránová doména je tvořena 6 helixy. Na 2 helixech jsou přes histidinová rezidua navázány 2 hemy. C-terminální doména v cytosolu obsahuje vazebné dutiny pro FAD a NADPH. N-terminální doména obsahuje 2 motivy EF-ruky a serinová rezidua, na kterých dochází k fosforylaci. Na N-terminální doménu se mohou také vázat homology Rac proteinů (převzato ze Suzuki *et al.*, 2011).

2.3.1.2 Peroxidasy buněčné stěny

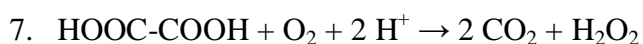
Zdrojem ROS při oxidativním vzplanutí mohou být také 46 kDa peroxidasy 3. třídy (EC 1.11.1.7) lokalizované v buněčné stěně (Bolwell, 1999). Peroxidasy běžně redukují peroxid vodíku za současné oxidace organických sloučenin. Přítomnost reduktantů a alkalizace apoplastu, která nastává po rozpoznání patogenu rostlinou, ovšem stimuluje peroxidasy buněčné stěny k produkci peroxidu vodíku. Jako *in vitro* reduktanty mohou vystupovat fenoly, thioly, mastné kyseliny, NAD(P)H a askorbát (O'Brien *et al.*, 2012), *in vivo* reduktanty zatím nebyly určeny.

V mechanismu vzniku peroxidu vodíku je zapojený konjugát hemového železa s kyslíkem ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O-O}$), který vzniká reakcí redukované peroxidasy (rovnice 2) s molekulárním kyslíkem (rovnice 3). Konjugát se vytváří také reakcí peroxidasy se superoxidem (rovnice 4). Peroxid vodíku pak vzniká reakcí konjugátu s vodou (rovnice 5) nebo redukcí za přítomnosti organického substrátu dle rovnice 6 (Murphy *et al.*, 1998). Peroxidasy buněčné stěny mohou produkovat také OH^- , $\cdot\text{OH}$ a $\cdot\text{O}_2^-$ (Liszakay *et al.*, 2003).



2.3.1.3 Oxalát oxidasy

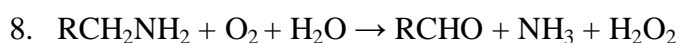
U některých jednoděložných a dvouděložných rostlin byly nalezeny exocelulární oxalát oxidasy (EC 1.2.3.4), které katalyzují oxidaci šťavelanu dle rovnice 7 a jsou strukturně podobné germinu, což je proteinový marker klíčení semen pšenice.



Některé houbové patogeny (např. *Sclerotinia sclerotiorum*) při napadení rostliny sekretují kyselinu šťavelovou, která vytváří vhodné prostředí pro činnost houbových enzymů degradujících buněčnou stěnu. Oxalát oxidasy kyselinu rozloží za tvorby peroxidu vodíku (Bolwell a Wojtaszek, 1997). Rostliny obsahující oxalát oxidasu jsou více resistantní proti patogenu *S. sclerotiorum* (Davidson *et al.*, 2009). Oxalát může pocházet také z vakuol poškozených patogenem.

2.3.1.4 Aminoxidasy, polyaminoxidasy

Aminoxidasy (EC 1.4.3.6) a polyaminoxidasy (1.5.3.11), které se hojně vyskytují u rostlin z čeledi lipnicovitých a bobovitých, katalyzují reakci dle rovnice 8, vyskytují se také v apoplastu.



Aminoxidasy jsou homodimery s atomem mědi a chinonovým kofaktorem v každé podjednotce. Polyaminoxidasy obsahují jako kofaktor FAD. Jako substráty většinou slouží biogenní aminy spermin, spermidin, kadaverin a putrescin. Byla prokázána úloha těchto oxidas při abiotickém stresu, mechanickém poškození rostliny a také při napadení patogenem (Angelini *et al.*, 2010). U tabákových buněk ošetřených elicitem kryptogeinem bylo pozorováno zvýšení aktivity polyaminoxidasy a nárůst produkce H_2O_2 doprovázené programovanou buněčnou smrtí (PCD). Po přidání inhibitoru syntézy polyaminů došlo k potlačení produkce H_2O_2 a PCD (Yoda *et al.*, 2006).

2.4 Reaktivní formy dusíku

Mezi reaktivní formy dusíku (RNS) je řazen oxid dusnatý (NO) a produkty, které vznikají jeho reakcí s reaktivními formami kyslíku. Takovým produktem může být například nitrosoniový kationt (NO^+), nitroxylový aniont (NO^-), peroxodusitan (ONOO^-), oxid dusitý (N_2O_3) a oxid dusičitý (NO_2), viz tabulka 4 (Hill *et al.*, 2010).

Tabulka 4: Reaktivní formy dusíku (převzato z Hill *et al.*, 2010).

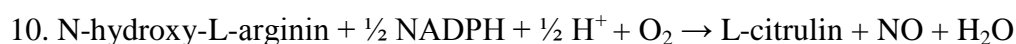
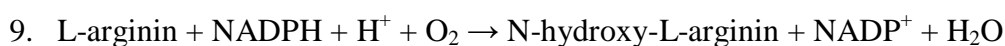
Reaktivní forma dusíku	Funkční vzorec	Poznámka
Oxid dusnatý	NO	Nenabitý volný radikál
Nitroxylový aniont	NO^-	Nabitá redukována forma NO, vystupuje jako nukleofil
Nitrosoniový kationt	NO^+	Oxidovaná forma NO, při neutrálním pH neexistuje (reaguje s vodou)
Dusitan	NO_2^-	Produkt reakce NO s O_2 , v přítomnosti železa může být opět redukován na NO
Dusičnan	NO_3^-	Nereaktivní oxidační produkt NO
Oxid dusitý	N_2O_3	Nitrosylační činidlo, zniká reakcí NO a O_2
Oxid dusný	N_2O	Rajský plyn
Oxid dusičitý	NO_2	Silné oxidační a nitrační činidlo, volný radikál
Peroxodusitan	ONOO^-	Nitrační činidlo, vzniká reakcí NO a O_2
Peroxodusičnan	O_2NOO^-	Vzniká reakcí NO_2 a superoxidu
Nitrosoperoxouhličitan	ONOOCO_2^-	Vzniká reakcí CO_2 a peroxodusitanu, velmi krátká životnost
Hydroxylamin	NH_2OH	Produkt nitroxylové reakce
Amoniak	NH_3	Odpadní produkt metabolismu

2.4.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je bezbarvý plyn s jedním nepárovým elektronem v π orbitalu. Je to lipofilní radikál schopný volně difundovat přes membrány, funguje jako endogenní signální molekula za fyziologických i stresových podmínek. Oxid dusnatý reaguje v extracelulárním i intracelulárním prostoru s celou řadou makromolekul, je významně zapojen v posttranslačních modifikacích proteinů, kdy se váže na kovová centra, způsobuje S-nitrosylaci thiolových skupin a nitraci tyrosinů (Corpas *et al.*, 2011). U živočichů slouží jako mediátor v procesech apoptosy, zánětlivé reakce a neurotransmise. V rostlinách byla prokázána jeho významná úloha při klíčení, růstu, senescenci, buněčné smrti, reakci na sucho, produkci ethylenu, zavírání průduchů a resistenci proti patogenům (del Río, 2011).

2.4.1.1 Produkce NO

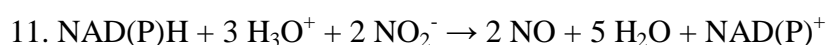
Živočichové produkují oxid dusnatý především enzymem NOsynthasou (EC 1.14.13.39). Tento homodimerní enzym obsahující hemovou skupinu je oxidoreduktasa, která katalyzuje dvoukrokovou oxidaci L-argininu na L-citrulin a NO za přítomnosti kyslíku (rovnice 9 a 10). Pro reakci jsou potřebné kofaktory NADPH, FAD, FMN, tetrahydrobiopterin, Ca^{2+} ionty a kalmodulin (Alderton *et al.*, 2001).



Ve vyšších rostlinách se nepodařilo nalézt gen či protein homologní s živočišnou NOsynthasou (NOS). V řadě rostlinných druhů však byla zjištěna L-arginin dependentní NOS aktivita v peroxisomech a mitochondriích za účasti stejných kofaktorů (Corpas *et al.*, 2009). V *Arabidopsis thaliana* byl nalezen enzym se sekvencí podobnou proteinu, který je zapojen v produkci NO u hlemýždě zahradního. Tento enzym však nevykazoval NOS aktivitu, proto byl pojmenován jako NOA1 - NO associated1 (Crawford *et al.*, 2006). NOA1 je ve skutečnosti chloroplastová GTPasa zodpovědná za správné složení ribosomu a jeho stabilitu. Vyřazení genu pro NOA1 vede k chybnému vázání ribosomů, což se projevuje zvýšenou produkcí ROS a oxidovaných lipidů, které reagují s NO a tím redukují akumulaci NO v rostlině (Moreau *et al.*, 2008). Knockoutování genu pro NOA1 je tedy vhodné pro studium úlohy oxidu dusnatého například při obranné reakci proti patogenům (Asai *et al.*, 2008). Po napadení rostliny *A. thaliana* a tabáku patogenem vykazoval NOS aktivitu P protein, který byl tedy

označen jako patogenem indukovaná NOS (iNOS). P protein je součástí mitochondriálního glycindekarboxylasového enzymového komplexu, který katalyzuje rozklad glycinu vznikajícího při fotorespiraci (Chandok *et al.*, 2003). Výsledky této studie byly nereprodukovatelné, P protein byl poté jako enzym s potenciální NOS aktivitou zavržen (Moreau *et al.*, 2008). Rostlinný enzym s NOS aktivitou tedy dosud nebyl identifikován.

Zdrojem NO v rostlinách je také nitrátreduktasa (NR, EC 1. 7. 99. 4) lokalizovaná v cytosolu, která primárně katalyzuje redukci dusičnanového aniontu na dusitanový za přítomnosti NAD(P)H. Enzym může také katalyzovat redukci dusitanů na NO (rovnice 11), ve větší míře však tato reakce probíhá při vysokých koncentracích dusitanů a při nedostatku kyslíku a světla. NR produkuje NO v řadě procesů, mimo jiné i při obranné reakci rostlin (Yu *et al.*, 2014)



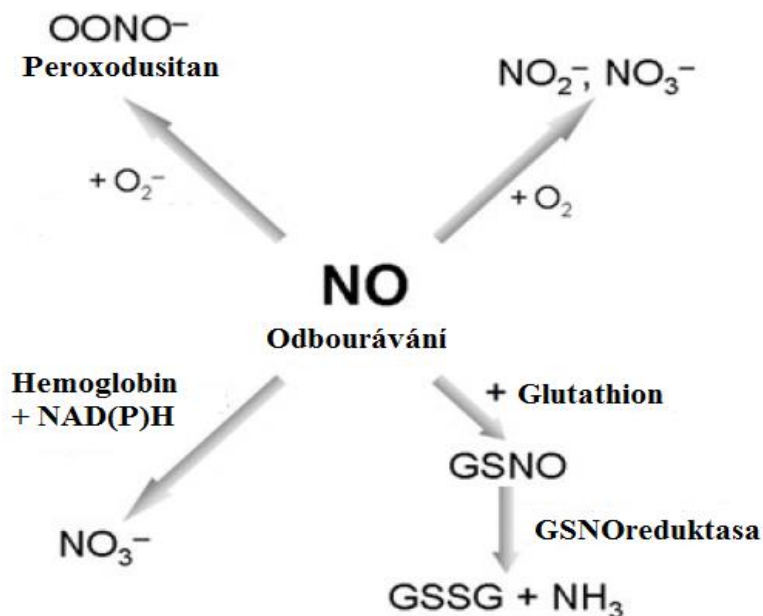
Nitrit-NOreduktasa (Ni-NOR) je enzym vázaný na cytoplazmatickou membránu, vyskytuje se zejména v kořeni, produkuje NO redukcí dusitanů. Xanthinoxidasa/dehydrogenasa (XDH) katalyzuje tvorbu NO za přítomnosti substrátu xanthinu a dusitanu. Hemové proteiny cytochrom P450, hemoglobin a katalasa vytvářejí NO oxidací N-hydroxy-L-argininu kyslíkem, resp. kumylhydroperoxidem (Misra *et al.*, 2011).

Neenzymaticky je NO produkován mnoha procesy. Vzniká reakcí peroxidu vodíku a L-argininu, dále také oxidací oxidu dusného při nitrifikačních a denitrifikačních procesech. Reducí dusitanů kyselinou askorbovou při kyselém pH vzniká kyselina dehydroaskorbová a NO. Kyselé pH v apoplastu způsobuje také samovolnou dismutaci dusitanů na dusičnany a NO. Vlivem světla jsou karotenoidy schopny redukovat oxid dusičitý na NO (del Río *et al.*, 2004).

2.4.1.2 Odbourávání NO

NO je odbouráván řadou mechanismů, ve kterých jsou často zapojeny reaktivní formy kyslíku jako například superoxid (Obr. 7). NO může být také oxidován kyslíkem na dusitany a dusičnany, které jsou substrátem pro nitrátreduktasu (NR) produkující opět NO. S-nitrosylací redukovaného glutathionu vzniká S-nitrosoglutathion (GSNO). Redukovaný glutathion je tripeptid (γ -glutamylcysteinylglycin), který se běžně vyskytuje v organismech v poměrně vysokých koncentracích (2 až 3 mmol/l) jako jeden

z antioxidantů. GSNO slouží jako zásobárna NO v organismu a v transnitrosylačních reakcích vystupuje jako donor NO. Koncentrace GSNO je regulována enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR), který katalyzuje redukci GSNO na GSSG a amoniak a který hraje důležitou roli při obranných reakcích rostlin. Významná je také interakce NO s hemovými proteiny; hemoglobin dokáže katalyzovat jeho NAD(P)H-dependentní přeměnu na dusičnany (Wilson *et al.*, 2008).



Obr. 7: Odbourávání NO. ROS mohou reagovat s NO za vzniku peroxodisitanu. Molekulární kyslík způsobuje jeho oxidaci na dusitany či dusičnany. NO je odbouráván NAD(P)H-dependentní reakcí pomocí hemoglobinu. Významným enzymatickým regulátorem koncentrací NO je S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR), která redukuje GSNO na GSSG a NH₃ (převzato z Wilson *et al.*, 2008).

2.4.2 S-nitrosylace

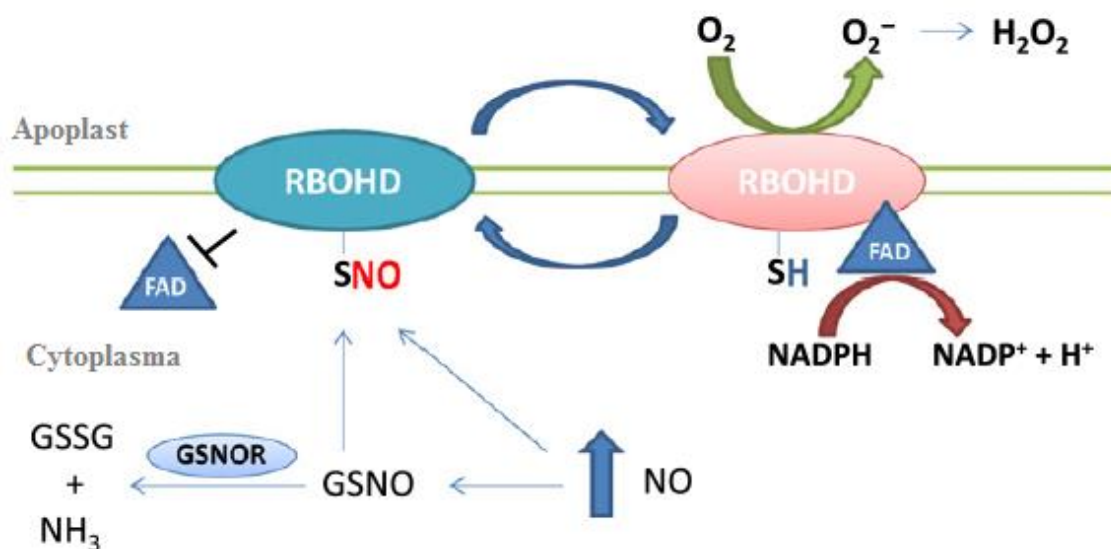
Bioaktivita NO a RNS spočívá především v jejich schopnosti reagovat se specifickými atomy proteinů za vzniku kovalentních modifikací. Jednou z nejvýznamnějších modifikací je S-nitrosylace, kdy dochází k reakci atomu cysteinové či homocysteinové síry s oxidem dusnatým za vzniku S-nitrosothiolů. Průběh reakce je typický elektrofilním atakem nitrosoniového kationtu na thiolovou skupinu (rovnice 14). Pro vznik nitrosoniového kationtu je zapotřebí molekulární kyslík jako akceptor elektronů (rovnice 12), kdy dále vzniká oxid dusitý jako nestabilní intermediát (rovnice 13).



Reakci mohou katalyzovat proteiny jako ceruloplasmin a hemoglobin. K S-nitrosylaci jsou náchylná cysteinová residua s nízkým pK_a . Vznikající S-nitrosothioly mohou být katabolizovány za účasti enzymů xantin/xantinoxidas, γ -glutamyltranspeptidas, glutathionperoxidas, superoxididismutas a S-nitrosoglutathionreduktas (Gaston *et al.*, 2003).

2.4.2.1 Úloha S-nitrosylace při obranné reakci rostlin

S-nitrosylací je významně ovlivněna aktivita RBOH (Obr. 8). NO se prostřednictvím S-nitrosoglutathionu (GSNO) váže na residuum Cys890. Tento cystein se nachází poblíž residua Phe921, které je klíčové pro navázání kofaktoru FAD, který transportuje elektrony z NADPH. S-nitrosylace zabrání vázání kofaktoru, což vede ke snížení aktivity RBOH a snížení produkce ROS. Tím dochází k regulaci buněčné smrti při pozdní fázi hypersenzitivní reakce (Yun *et al.*, 2011).



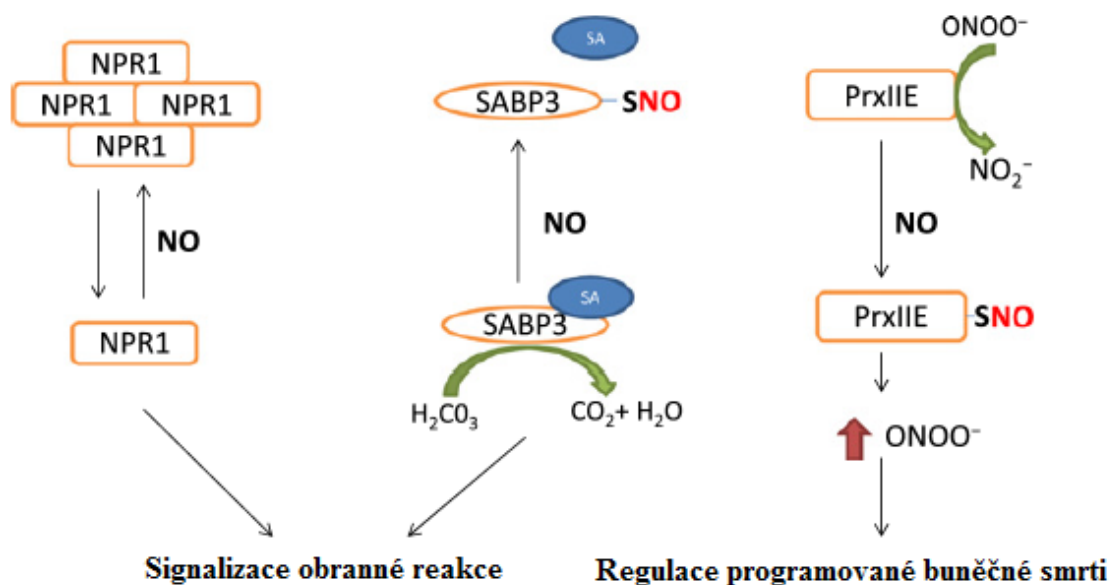
Obr. 8: Regulace aktivity RBOHD (respiratory burst oxidase homologue D) prostřednictvím S-nitrosylace. RBOHD je hlavním zdrojem ROS při oxidativním vzplanutí po napadení patogenem. Mechanismus regulace aktivity NADPH oxidas S-nitrosylací je konzervován u rostlin i živočichů. Míra S-nitrosylace Cys890 je nepřímou kontrolována aktivitou enzymu AtGSNOR1- *A. thaliana* S-nitrosoglutathionreduktasa 1 (převzato z Yu *et al.*, 2014).

Působení NO je úzce spjato se signální funkcí fytohormonu kyseliny salicylové (SA). SA je zodpovědná za lokální i systematickou obranu reakci u rostlin. Může spouštět influx Ca^{2+} iontů, aktivuje mitogen-aktivovanou proteinkinazu SIPK, produkci ROS, indukuje hypersenzitivní reakci a expresi genů spojených s patogenezí. SA se váže na řadu proteinů spojených s imunitou rostliny a moduluje tak jejich aktivitu. Takovým proteinem je například SABP3 (Salicylic acid-binding protein 3), který po navázání SA vykazuje karbonátanhydratasovou aktivitu potřebnou pro syntézu lipidů. SABP3 je klíčový pro vytvoření resistance rostliny (Slaymaker *et al.*, 2002). NO způsobuje S-nitrosylaci residua Cys280, zabraňuje tím navázání SA a zastavuje katalytický účinek proteinu (Obr. 9). S-nitrosylace tedy působí jako negativní zpětná vazba při vzniku resistance (Yu *et al.*, 2014).

Mechanismem S-nitrosylace je ovlivněna aktivita proteinu NPR1, hlavního regulátoru imunitní odpovědi rostlin (Obr. 9). NPR1 (Non-expresser of pathogenesis-related genes 1) je cytosolární protein, který se za fyziologických podmínek vyskytuje především v oligomerní formě, kdy jsou jednotlivé monomerní jednotky spojeny disulfidickými můstky. Při napadení rostliny patogenem dochází k oxidativnímu vzplanutí, které je doprovázené zvýšenou produkcí SA a aktivitou antioxidantních systémů. Antioxidanty způsobují redukci disulfidických můstků, odštěpované monomery NPR1 putují z cytoplasmy do jádra, kde jako koaktivátory způsobují

nadexpresi SA-dependentních genů spojených s patogenesisí (Fu a Dong, 2013). NO způsobuje S-nitrosylaci residua Cys156, čímž podporuje tvorbu oligomerního NPR1, což naopak reguluje expresi genů (Tada *et al.*, 2008).

Při napadení patogenem dochází také k S-nitrosylaci Peroxiredoxinu II E (PrxII E). Ten je schopný přeměňovat toxický peroxodusitan na dusitan, S-nitrosylace tohoto proteinu vede k zastavení detoxifikační aktivity, akumulace peroxodusitanů pak indukuje programovanou buněčnou smrt, viz obr. 9 (Romero-Puertas *et al.*, 2007).



Obr. 9: Role NO a S-nitrosylace při imunitní odpovědi a patogenem spuštěné buněčné smrti. S-nitrosylace NPR1 reguluje homeostázu mezi jeho oligomerní a monomerní formou v cytoplasmě, pouze monomerní forma může vstupovat do jádra a aktivovat expresi genů. S-nitrosylovaný SABP3 není schopen vázat kyselinu salicylovou a nevykazuje karbonátanhydratasovou aktivitu potřebnou pro ustavení resistance. S-nitrosylovaný peroxiredoxin II E není schopen detoxifikace, akumulace peroxodusitanu vede k indukci programované buněčné smrti (převzato z Yu *et al.*, 2014).

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Absolute qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), Agarosa (SERVA, Německo), akrylamid/bis-akrylamid (AA/BIS, Sigma-Aldrich, USA), 3'-(p-aminofenyl)fluorescein (APF, Enzo Life Sciences, USA), 4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM, Sigma-Aldrich, Německo), 4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceindiacetát (DAF-FM DA, Sigma-Aldrich, Německo), barvicí roztok BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, Německo), Color Taq DNA Polymerase (EUR_x, Polsko), D-mannitol (Lach-Ner, Česká republika), 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetát (H₂DCFDA, Thermo Fisher Scientific, USA), dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, Indie), elicitory (infestin, kryptogein, olignadrin, Ústav Biochemie MU, Brno), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF, Sigma-Aldrich, Německo), GelRed[™] (Biotium, USA), GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EUR_x, Polsko), Heat shock protein70 rekombinantní lidský (Sigma-Aldrich, Německo), 3'-(p-hydroxyfenyl)fluorescein (HPF, Enzo Life Sciences, USA), chlorid vápenatý (CaCl₂, Lach-Ner, Česká republika), HyperLadder 50 bp (Bioline, USA), L-glutamin (LOBA CHEMIE, Rakousko), 2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich, Japonsko), MES-hydrát (Sigma-Aldrich, USA), monoklonální protilátka proti Hsp70 produkovaná v myši (Sigma-Aldrich, Německo), Murashige-Skoog médium s vitamíny dle Gamborga (Sigma-Aldrich, USA), peroxidisíran amonný (APS, Sigma-Aldrich, Německo), N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED, BIO RAD, USA), resazurin (Sigma-Aldrich, USA), sacharosa (Sigma-Aldrich, USA), sekundární anti-myší protilátka značená alkalickou fosfátasou (Cell Signaling, USA), síran draselný (LACHEMA, Česká republika), sušené mléko nízkotučné (Sigma-Aldrich, Německo), Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Švýcarsko), Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA).

3.2 Vybavení

Analytické váhy Denver Summit (Denver Instrument, USA), automatické pipety (Eppendorf, Německo), elektroforetický systém Mini PROTEAN Tetra Cell (BIO RAD, USA), elektroforetický systém SafeBlue (Major Science, USA), Gel Doc EZ System (BIO RAD, USA), chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), laminární box Bioban-48 (Vetrotecnica, Itálie), magnetická míchačka (IKA, Německo), minitřepačka

3-D (BIOSAN, Litva), parní sterilizátor (Tuttnauer, Německo), pH metr WTW 526 (inoLab, Německo), předvážky (KERN, Německo), suchá inkubační lázeň (Major Science, USA), termocyklér gradientový T100 (BIO RAD, USA), termocyklér CFX96 a analyzátor CFX Touch Real-Time (BIO RAD, USA), Trans-Blot Turbo Transfer Systém (BIO RAD, USA), třepačka chlazená stolní INNOVA (Eppendorf, Německo), vakuová vývěva D-lab (Edwards, USA), vortex V-1 plus (BIOSAN, Litva).

3.3 Rostlinný materiál

Při experimentech byla použita suspenzní kultura buněk *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. Tabákové buňky byly kultivovány na třepačce při teplotě 24 °C, světelném režimu 24 h den, s intenzitou třepání 170 rpm. Pro kultivaci buněk bylo použito tekuté Murashige-Skoog médium připravené dle tab. 5 (Murashige a Skoog, 1962). Připravené médium bylo vždy rozlito do Erlenmeyerových baněk po 100 ml a autoklávováno. Při pasážování buněk v laminárním boxu došlo k převedení 8 ml 7 dní staré suspenzní kultury do čerstvého média. Experimenty byly prováděny s buňkami až čtvrtý den po pasážování, kdy se buněčná suspenze nacházela v exponenciální fázi růstové křivky.

Tabulka 5: Návod na přípravu 1 l Murashige-Skoog média s přidavkem hormonů (pH = 5,5 – 5,7).

Složka	Množství
Směs Murashige-Skoog medium s vitamíny dle Gamborga	4,4 g
Glutamin	200 mg
Sacharosa	30 g
Zásobní roztok kinetinu (100 mg/l)	1 ml
Zásobní roztok 2,4-D (220 mg/l)	0,8 ml
Zásobní roztok vitamínů (panthotenát vápenatý 300 mg/l, glycin 200 mg/l, kyselina listová 50 mg/l, biotin 5 mg/l)	10 ml

Pokud není uvedeno jinak, z buněčné suspenze bylo před samotným experimentem pomocí Büchnerovy nálevky odsáto kultivační médium. Buňky byly zváženy na předvážkách a smíchány s ekvilibračním médiem (tab. 6) v poměru 1g buněk : 10 ml ekvilibračního média.

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

Složka	Množství
Mannitol	32 g
CaCl ₂	74 mg
K ₂ SO ₄	87 mg
MES-hydrát	390 mg

3.4 Elicitiny

V experimentech byly použity elicitory infestin, kryptogein a oligandrin, které byly připraveny jako rekombinantní proteiny a poskytnuty Ústavem biochemie PřF MU v Brně. Zásobní roztoky elicitinů byly aplikovány tak, aby jejich výsledná koncentrace v buněčné suspenzi byla 5 nmol/l.

3.5 Metody

3.5.1 Stanovení produkce ROS a RNS pomocí fluorescenčních sond

Pracovní roztoky fluorescenčních sond byly připraveny vždy těsně před experimentem smísením zásobního roztoku fluorescenční sondy a ekvilibračního média tak, aby výsledná koncentrace byla 200 μ mol/l. Ke 100 μ l buněčné suspenze v jamkách mikrotitrační destičky byly přidány roztoky elicitinů (výsledná koncentrace 5 nmol/l) a poté roztoky fluorescenčních sond tak, že jejich výsledná koncentrace v suspenzi byla 8 μ mol/l. Byl stanoven fluorescenční signál při vlnových délkách excitace/emise, které jsou specifické vždy pro danou použitou sondu. Bylo provedeno celkem 19 měření v pětiminutových intervalech.

Pro stanovení produkce ROS byla použita sonda H₂DCF DA, což je nepolární sloučenina, která difunduje přes cytoplazmatickou membránu buněk. V cytoplazmě je deacetylována buněčnými esterasami za vzniku polární sloučeniny H₂DCF, která přes membrány neprostupuje. Tento produkt je dále oxidován intracelulárními ROS za vzniku fluoreskující sloučeniny DCF. Tato sonda reaguje nespecificky s celou řadou ROS. Vlnové délky excitace/emise jsou 490/515 nm (Crow, 1997).

Sondy APF a HPF slouží pro specifickou detekci vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS), mezi které patří peroxodisitanový a chlornanový anion a také hydroxylový radikál. Sonda HPF s chlornanovým aniontem nereaguje, proto se tyto sondy často využívají současně. Vlnové délky excitace/emise jsou 490/515 nm. APF i HPF jsou ve srovnání s jinými fluorescenčními sondami více fotostabilní (Setsukinai *et al.*, 2003).

Produkce NO byla stanovena pomocí sond DAF-FM DA a DAF-FM. Jedná se o fluorované deriváty fluoresceinu, které jsou v porovnání s často používanými sloučeninami DAF-2 resp. DAF-2 DA více fotostabilní (Kojima *et al.*, 1998). Vlnové délky excitace/emise jsou 495/515 nm.

3.5.2 Stanovení viability tabákových buněk

Životnost byla stanovena spektrofotometrickou metodou, která využívá netoxického redoxního indikátoru resazurinu (Alamar Blue). Modře zbarvený resazurin je metabolicky aktivními buňkami redukován na růžový resorufin, který fluoreskuje. Poškozené či usmrcené buňky vykazují sníženou metabolickou aktivitu a poskytují tak slabší fluorescenční signál. Resazurin je redukován intracelulárními reduktasami a elektronovým transportním řetězcem v mitochondriích.

K buňkám v Murashige-Skoog médiu byly přidány jednotlivé elicitiny. Do eppendorfek bylo odebráno 180 μ l takto ošetřené buněčné suspenze, dále přidáno 20 μ l zásobního roztoku resazurinu. Jako blank sloužilo čerstvé Murashige-Skoog médium s přídavkem resazurinu. Vzorky byly jemně promíchány a inkubovány 2 hodiny v termostatu ve tmě při teplotě 24 °C. Poté proběhla sonifikace vzorků na vodní lázni (5 minut) a centrifugace (10 minut při 15000 g). 170 μ l supernatantu bylo převedeno do jamek mikrotitrační destičky určené pro měření fluorescence. Mikrodestičkový reader poté zaznamenal fluorescenční signál v jamkách při nastavení vlnové délky pro excitaci/emisi 560/590 nm (Byth *et al.*, 2001).

Zásobní roztok resazurinu: koncentrace 0,15 mg/ml v destilované vodě.

3.5.3 Extrakce proteinů

Ke 300 mg zmražených tabákových buněk (získaných po odsátí kultivačního média) bylo přidáno 300 μ l extrakčního pufru. Buňky byly za stálého chlazení na ledu rozetřeny pomocí plastového tloučku v třecí misce. Vzorky byly centrifugovány 20 minut při teplotě 4 °C a zrychlení 16000 g. Extrakt byl převeden do nových eppendorfek a uchován při teplotě -80 °C nebo dále zpracován.

Extrakční pufr: 50 mmol/l Tris, 0,2% (v/v) Triton X-100, 2 mmol/l DTT a 1mmol/l PMSF.

3.5.4 Stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou

Do jamek v mikrotitrační destičce bylo postupně přidáno 45 μ l destilované vody, 5 μ l vzorku proteinů nebo standardu hovězího sérového albuminu (BSA) a 200 μ l Bradfordova činidla, které bylo připraveno zředěním zásobního roztoku Coomassie Brilliant Blue G-250 destilovanou vodou v poměru 1:4. Po 10minutové inkubaci byla měřena absorbance na mikrodestičkovém readeru při vlnové délce 595 nm; vzorky

i standardy byly měřeny v duplikátu. Kalibrační křivka byla sestrojena z hodnot absorbancí standardů BSA v koncentrační řadě 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 a 1,6 mg/ml. (Bradford, 1976).

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

3.5.5 SDS-PAGE

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za použití detergentu SDS (dodecylsírán sodný) slouží k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti.

Dělicí 10% a zaostřovací 4% gel byl připraven dle tab. 7. Peroxodisíran amonný (APS) je iniciátorem polymerace a proto byl přidán jako poslední složka media. Po proběhnutí polymerace (20 minut pro každý gel) byly skla s gely vloženy do elektroforetické komory a zality elektrodoým pufrem. Poté byly do jamek gelu aplikovány vzorky a standard pro Hsp70. Zaostření proteinů v gelu probíhalo 20 minut při napětí 110 V, dělení pak přibližně 60 minut při napětí 180 V. Pro stanovení produkce Hsp70 byl jako standard použit lidský rekombinantní Hsp70 (0,2 µg/µl).

Příprava vzorků: Extrakty proteinů byly smíchány se vzorkovacím pufrem v poměru 3:1 a zahřívány v suché inkubační lázni při 100 °C po dobu 10 minut. Rekombinantní Hsp70 byl upraven obdobně. Vzorky byly do jamek aplikovány ve stejných objemech (25 µl) nebo v objemech odpovídajících stejnému množství proteinů. Standard pro Hsp70 byl aplikován v množství 4 µl (tj. 0,2 µg proteinu).

Vzorkovací pufr: 0,125 mol/l Tris/HCl, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 5% merkaptoethanol, 0,02% bromfenolová modř, pH = 6,8

Elektrodoý pufr: 0,025 mol/l Tris, 0,192 mol/l glycin, 0,1% SDS, pH = 8,3

Tabulka 7: Předpis pro přípravu zaostřovacích a dělicích gelů. Uvedené objemy (ml) slouží pro přípravu dvou gelů o tloušťce 1,5 mm.

Gel	AA/BIS	APS	H ₂ O	SDS	TEMED	1,5 M Tris/HCl (pH = 8,8)	0,5 M Tris/HCl (pH = 6,8)
4% zaostřovací	1,95	0,15	9,15	0,15	0,015	---	3,75
10% dělicí	4,95	0,15	6,15	0,15	0,015	3,75	---

3.5.6 Western Blot

Pro přenos proteinů na nitroceluloseovou membránu byla využita semi-dry varianta této metody. Filtrační papíry, nitroceluloseová membrána a polyakrylamidový gel po SDS-PAGE byly namočený v blotovacím pufru a umístěny na kazetu přístroje Trans-Blot Turbo Transfer Systém a to v pořadí 2x filtrační papír, membrána, gel, 2x filtrační papír. Blotování probíhalo 10 minut při napětí 25 V a proudu 1,3 A. Pro ověření přenosu proteinů byla membrána inkubována 4 minuty v barvivu Ponceau S. Membrána byla několikrát promyta destilovanou vodou a vyfotografována. Poté byla membrána inkubována 2 hodiny v blokovacím pufru. Následovala inkubace přes noc při 4 °C s primární myší protilátkou proti Hsp70 ředěnou v poměru 1:500 s blokovacím pufrům. Po odstranění primární protilátky byla membrána promyta třikrát čerstvým promývacím pufrům po 20 minutách. Po posledním promytí byla membrána inkubována 90 minut se sekundární anti-myší protilátkou značenou alkalickou fosfatase, která byla ředěna blokovacím pufrům v poměru 1:5000. Poté byla membrána opět třikrát promyta. Nakonec byla inkubována 5 minut se 4 ml roztoku BCIP/NBT. Po vizualizaci bandů byl roztok odlit, membrána opláchnuta destilovanou vodou a vyfotografována přístrojem Gel Doc™ EZ Imager (BIO RAD). Bandy byly vyhodnoceny denzitometricky v programu VisionWorks.

Blotovací pufr: 0,025 mol/l Tris, 0,192 mol/l glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3

Promývací pufr TTBS: 20 mmol/l Tris, 500 mmol/l NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20

Blokovací pufr: 3% sušené mléko (w/v) v TTBS

3.5.7 Izolace a purifikace RNA

Zmražené tabákové buňky (300 mg) byly rozetřeny ve sterilní třecí misce. Během tření byla třecí miska neustále chlazena. Sterilní eppendorfky se 100 mg takto rozetřených buněk byly znovu zamraženy v tekutém dusíku.

Pro purifikaci a izolaci celkové RNA z tabákových buněk byl použit GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit. Ke 100 mg tabákových buněk bylo přidáno 100 µl RL pufru a 200 µl LG pufru, který byl předtím smíchan s β-merkaptoethanolem v poměru 1 ml : 10 µl. Vzorky byly centrifugovány 4 minuty při 16000 g. Supernatant byl převeden do nové, sterilní eppendorfky a k němu přidáno 200 µl RL pufru. Dále byl supernatant pipetován na speciální kolonku a centrifugován 2 minuty při 16000 g. K eluátu bylo přidáno 300 µl ethanolu (96%), směs byla nanášena na kolonku vázající

RNA, která byla následně centrifugována 1 minutu při 11000 g. Dále bylo na kolonku pipetováno 400 μl Wash DN1 pufru a proběhla centrifugace 1 minutu při 11000 g. Po odlití eluátu bylo na kolonku aplikováno 50 μl DNR pufru, který obsahoval DNAsu I. Kolonka s pufrům byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Enzym obsažený v pufru je schopen štěpit molekuly DNA navázané na membráně, tím dojde ke zvýšení čistoty izolované RNA. Na kolonku bylo nanášeno 400 μl Wash RB1 pufru a proběhla centrifugace 1 minutu při 11000 g. Kolonky byly dále dvakrát promyty a to nejprve 650 μl Wash RBW pufru (následovala centrifugace 1 minutu při 11000 g) a poté 350 μl Wash RBW pufru (následovala centrifugace 2 minuty při 11000 g). Na membránu kolonky bylo nanášeno 50 μl RNase-free vody. Po centrifugaci 1 minutu při 11000 g byla eluována z kolonky RNA. Takto připravené roztoky RNA byly uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.8 Měření koncentrace RNA

Koncentrace izolované RNA byla určena měřením absorbancí 2 μl vzorků při vlnových délkách 260, 280 a 320 nm. Jako blank byla použita sterilní voda. Koncentrace byla vypočtena z absorbance při 260 nm. Při koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA je absorbance rovna 1.

3.5.9 Reverzní transkripce

Pro reversní transkripci mRNA na cDNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche). Nejprve byla připravena směs o celkovém objemu 11,4 μl , která obsahovala 1 μg izolované RNA, 1 μl Anchored-oligo (dT)₁₈ primeru (50 $\mu\text{mol/l}$) a RNase-free vodu. Směs byla inkubovaná v termostatu při teplotě $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut a poté chlazená na ledu. V dalším kroku byla přidána směs připravená dle tab. 8. Následovala inkubace 30 minut při $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byla inaktivována reverzní transkriptasa inkubací směsi při $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Připravená cDNA byla dále uchována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 8: Složení reakční směsi aplikované k roztoku mRNA s anchored-oligo (dT)₁₈ primery.

Složka	Objem (μl)	Výsledná koncentrace ve směsi s mRNA
5x Reaction Buffer	4	1x
Protector RNase inhibitor (40 U/ μl)	0,8	1,6 U/ μl
dNTP mix (10 mmol/l každý)	2	1 mmol/l každý z dNTP
DTT (0,1 mol/l)	1	5 $\mu\text{mol/l}$
Reverzní transkriptasa	1,1	---
Celkový objem	8,9	---

3.5.10 PCR

Pro tuto metodu byla využita Color Taq DNA polymerasa (EURx). Ve sterilních eppendorfkách byly za stálého chlazení na ledu připraveny reakční směsi (tab. 9). Polymerázová řetězová reakce probíhala v termocykleru T100TM (BIO RAD) dle protokolu uvedeného v tab. 10. Teplota navázání primerů pro geny *AOS*, *End/Hel*, *GSNOR* a *PR-1α* je 56 °C, u genů *ACCS2*, *MYC2*, *PAL*, *RBOHD1* a *RBOHD2* pak 60 °C. Gen *EF-1α* má optimální teplotu annealingu 54 °C.

Tab. 9: Složení reakční směsi pro PCR.

Složka	Objem (μl)	Finální koncentrace
5x Pol. Buffer B	10	1x
dNTP mix (5mmol/l každý dNTP)	2	0,2 mmol/l (každý dNTP)
Forward primer (10 μmol/l)	1,5	0,3 μmol/l
Reverse primer (10 μmol/l)	1,5	0,3 μmol/l
Color Taq DNA polymerasa (1 U/μl)	1,25	1,25 U
cDNA	1	---
Sterilní 2x destilovaná voda	32,75	---
Celkový objem	50	---

Tab. 10: Protokol polymerázové řetězové reakce v přístroji T100TM Thermal Cycler.

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95	180	1
Denaturace	95	30	35
Navázání primerů	54-60	30	35
Elongace	72	60	35
Finální elongace	72	420	1
Chlazení	4	∞	1

3.5.11 Agarosová elektroforéza

Agarosový gel byl připraven rozpuštěním 2 g agarosy ve 100 ml TBE pufru. Do gelu bylo před zatuhnutím přidáno 6 μl interkalačního barviva GelRedTM. Toto barvivo slouží ke zviditelnění separovaných nukleových kyselin. Na rozdíl od často používaného ethidiumbromidu je toto barvivo netoxické a více citlivé. Po zatuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické komory naplněné TBE pufrem. Jednotlivé produkty z PCR byly nanесeny do jamek v objemu 18 μl . Jako marker molekulové hmotnosti byl použit HyperLadder 50 bp (Bioline), který byl aplikován v objemu 4 μl . Elektroforetická separace probíhala 40 minut při konstantním napětí 90 V. Bandy byly vyhodnoceny denzitometricky v programu VisionWorks.

TBE pufr: 89 mmol/l Tris, 89 mmol/l kyselina boritá, 2 mmol/l EDTA

3.5.12 qPCR

Templátová cDNA byla zředěna sterilní vodou v poměru 1:1. Pro qPCR byl využit Absolute qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific, USA) obsahující fluorescenční barvivo SYBR Green a ROX. V jamkách destičky pro qPCR byly připraveny reakční směsi (tab. 11). Teploty annealingu primerů pro geny *EF-1 α* , *GSNOR*, *End/Hel* a *RBOHD2* jsou uvedeny v kap. 3.5.10. Kalibrační křivky pro jednotlivé geny byly sestaveny z dat získaných měření templátové cDNA kontrolních vzorků zředěné v poměru 1:1, 1:3, 1:7, 1:15 a 1:31.

Tab. 11: Složení reakční směsi při qPCR.

Složka	Objem (μl)	Výsledná koncentrace
2X Absolute qPCR SYBR Green ROX Mix	10	1X
Forward primer (3 $\mu\text{mol/l}$)	1,75	0,26 $\mu\text{mol/l}$
Reverse primer (3 $\mu\text{mol/l}$)	1,75	0,26 $\mu\text{mol/l}$
Templátová cDNA	1	---
Celkový objem	20	---

4 Výsledky a diskuze

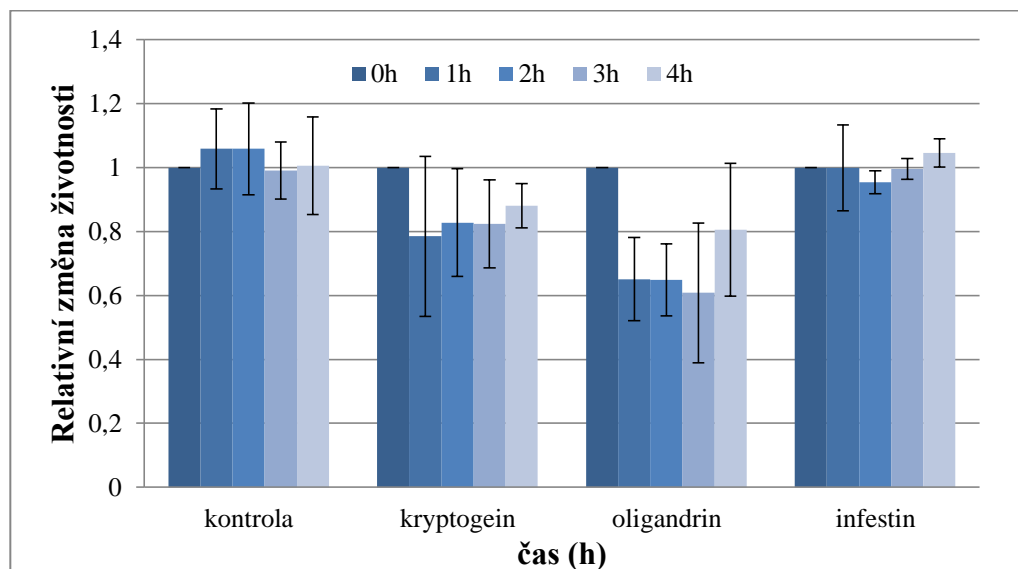
4.1 Vliv elicitinů na viabilitu tabákových buněk

Pro stanovení životnosti byla použita metoda využívající resazurin, který je životaschopnými a metabolicky aktivními buňkami redukován na fluoreskující resorufin (Byth *et al.*, 2001). Buněčná suspenze *Nicotiana tabacum L. cv. Xanthi* ošetřená oligandrinem vykazovala výrazně sníženou životnost (obr. 10). Pokles životnosti byl zaznamenán i v případě aplikace kryptogeinu. Buňky ošetřené infestinem nevykazovaly ve sledovaných časech změny ve viabilitě. Tabákové buňky kultivované v Murashige-Skoog médiu, které byly použity v experimentu, se nacházely v exponenciální fázi růstu. Mírný nárůst signálu ve čtvrté hodině po aplikaci elicitinů může být spojen s tvorbou nových, životaschopných buněk.

Elicitiny jsou proteinové elicitory, které mohou způsobit hypersenzitivní reakci. Již při aplikaci 100 pmolů na rostlinu tabáku jsou schopny elicitivity třídy I β vyvolat výraznou nekrosu, v případě elicitinů třídy I α je potřeba až stonásobné množství pro vyvolání obdobné reakce (Fefeu *et al.*, 1997). INF1 a oligandrin řadíme mezi I α elicitivity (Huet *et al.*, 1993; Picard *et al.*, 2000a), kryptogein naopak patří mezi I β elicitivity (Panabieres *et al.*, 1995). Schopnost vyvolat nekrosu rostlinných buněk je spojena s reziduem na pozici 13. Elicitiny I α (pI = 4-5) mají na této pozici hydrofobní valin; elicitivity I β (pI = 7,5-8,5) jsou až stokrát více nekroticky aktivní a na pozici 13 mají hydrofilní lysin (Fefeu *et al.*, 1997; Ponchet *et al.*, 1999). Naše výsledky potvrzují negativní vliv kryptogeinu, řazeného mezi elicitivity třídy I β , na životnost buněk, projevující se na pletivu rostlin nekrotickým efektem spojeným s HR (Bonnet *et al.*, 1996, Plešková *et al.*, 2011, Dokládal *et al.*, 2012). V diplomové práci Jendrišáková (2015) při stanovení životnosti metodou využívající fluorescein diacetát (FDA) byl v časech 1 až 4 h po aplikaci kryptogeinu zaznamenán mnohem výraznější pokles životnosti tabákových buněk. V případě infestinu (INF1), který je řazený do třídy I α , v souladu s již publikovanými daty jsme nedetekovali v časovém intervalu 1 až 4 h negativní efekt na životnost buněk. V souladu s našimi výsledky v práci Uruma *et al.*, 2009 nebyl pozorován u suspenzní kultury tabákových buněk v rané fázi 1 až 6 h vliv infestinu na buněčnou smrt, zvýšená míra buněčné smrti byla zaznamenána až 24 hodin po aplikaci 150 nmol/l INF1. Je zajímavé, že elicitin oligandrin, který je rovněž řazen mezi elicitivity třídy I α , po aplikaci k suspenzi tabákových buněk v našich experimentech významně negativně ovlivnil životnost buněk. V bakalářské práci

T. Jendrišákové (2013) byl stanovován vliv oligandrinu na životnost buňky pouze v časovém intervalu 6 až 24 h. V tomto časovém intervalu nebyl detekován negativní vliv oligandrinu na životnost buněk.

V následující studii bude nutné ověřit vliv elicitinů na životnost buněk metodou využívající FDA, případně jinou vhodnou metodou s cílem jednoznačně určit vliv elicitinů na životnost buněk a získat výsledky zatížené menší chybou než v případě realizované metody s resazurinem.

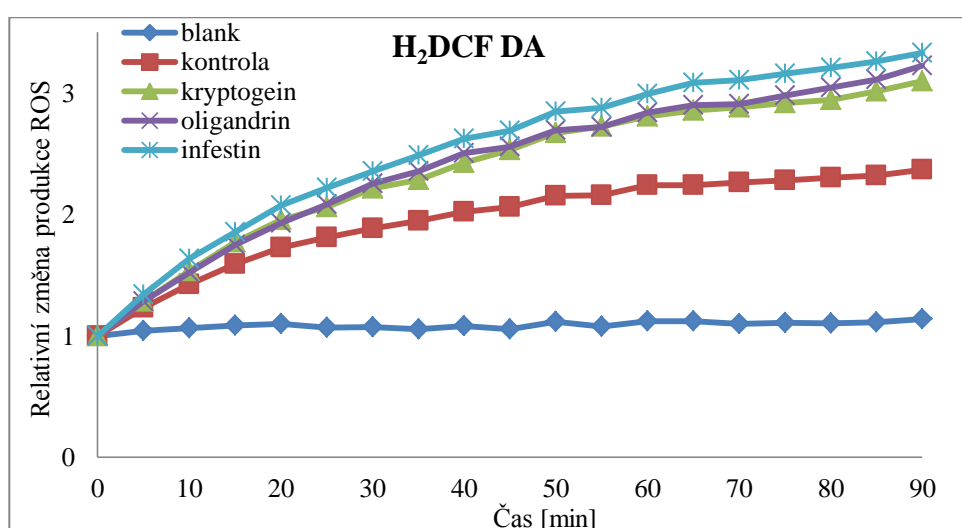


Obr. 10: Vliv elicitinů na životnost tabákových buněk. Životnost byla sledována v časech 0, 1, 2, 3 a 4 h po aplikaci elicitinů. Koncentrace jednotlivých elicitinů v suspenzi byla vždy 5 nmol/l.

4.2 Vliv elicitinů na produkci ROS a RNS v tabákových buňkách

U suspenzní kultury buněk *N. tabacum* L. cv. Xanthi byla sledována produkce ROS použitím sond H₂DCF DA, APF a HPF. Produkce ROS byla měřena v čase 0-90 minut po aplikaci elicitinů. Měření probíhala v pětiminutových intervalech.

Produkce nespecifických ROS v intracelulárním prostoru buněk byla stanovena sondou H₂DCF DA. Jedná se o nejpoužívanější činidlo pro detekci intracelulárních ROS. U buněk ošetřených elicitinem byl pozorován výrazně vyšší růst produkce ROS ve srovnání s kontrolními buňkami (Obr. 11). Aplikace elicitinů stimulovala produkci ROS. Největší změny v produkci ROS byly detekovány po aplikaci infestinu. Efekt kryptogeinu a oligandrinu byl srovnatelný.

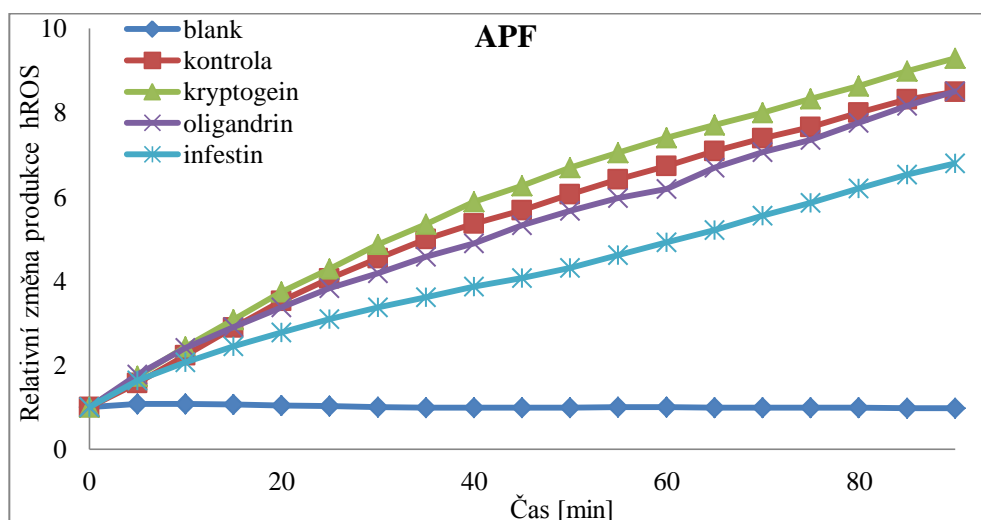


Obr. 11: Relativní změna produkce ROS v závislosti na čase po aplikaci elicitinů k suspenzním kulturám tabáku detekovaná s využitím fluorescenční sondy H₂DCF DA. Jako blank sloužilo ekvilibrační médium s přidavkem pracovního roztoku fluorescenční sondy; ke kontrolní buněčné suspenzi byla namísto elicitinů přidána destilovaná voda. Použitá koncentrace elicitinů byla 5 nmol/l.

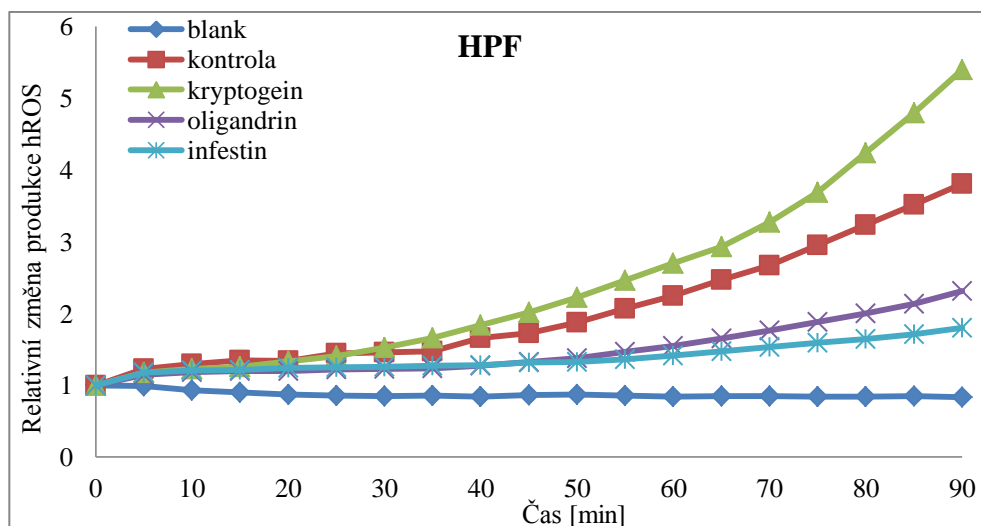
Produkce vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS) byla měřena pomocí sond APF a HPF (Setsukinai *et al.*, 2013). Sonda APF detekuje chlornanový a peroxodusitanový aniont a hydroxylový radikál. HPF s chlornanovým aniontem nereaguje. Při použití sondy APF byla pozorována mírně zvýšená produkce hROS po aplikaci elicitinu kryptogeinu (Obr. 12). Tabákové buňky ošetřené oligandrinem vykazovaly mírně sníženou produkci hROS v porovnání s kontrolními vzorky. Po aplikaci infestinu byla detekována výrazně snížená produkce hROS.

V případě použité sondy HPF byl zaznamenán výraznější růst signálu přibližně 50 minut po začátku experimentu (Obr. 13). Kryptogein stimuloval buňky k produkci

hROS. Suspenze s oligandrinem a infestinem vykazovaly naopak významně sníženou schopnost produkce hROS v porovnání s kontrolním experimentem.

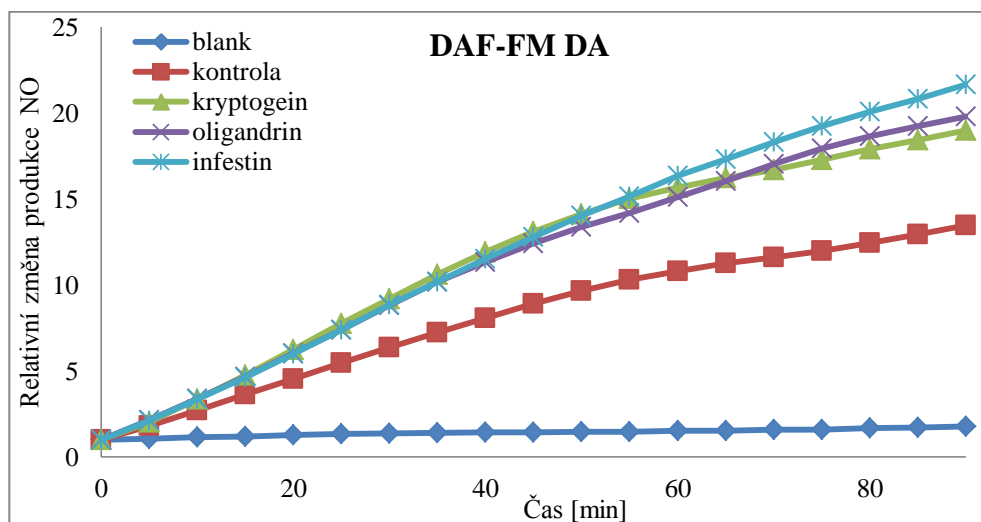


Obr. 12: Relativní změna produkce hROS v závislosti na čase po aplikaci elicitinů k suspenzím kulturám tabáku detekovaná s využitím fluorescenční sondy APF. Jako blank sloužilo ekvilibrační médium s přidavkem pracovního roztoku fluorescenční sondy; ke kontrolní buněčné suspenzi byla namísto elicitinů přidána destilovaná voda. Použitá koncentrace elicitinů byla 5 nmol/l.



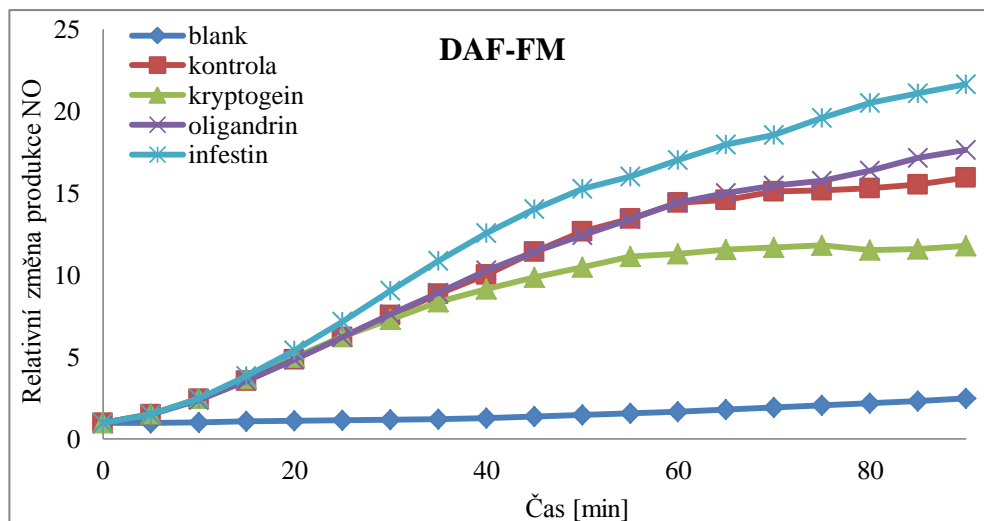
Obr. 13: Relativní změna produkce hROS v závislosti na čase po aplikaci elicitinů k suspenzím kulturám tabáku detekovaná s využitím fluorescenční sondy HPF. Jako blank sloužilo ekvilibrační médium s přidavkem pracovního roztoku fluorescenční sondy; ke kontrolní buněčné suspenzi byla namísto elicitinů přidána destilovaná voda. Použitá koncentrace elicitinů byla 5 nmol/l.

K sledování produkce intracelulárního NO byla použita sonda DAF-FM DA. Sonda DAF-FM DA po vstupu do buňky reaguje s RNS po odštěpení diacetátu buněčnými esterasami (Kojima *et al.*, 1998). Po aplikaci všech testovaných elicitinů byl zaznamenán zvýšený nárůst produkce NO oproti kontrole. Největší změny byly detekovány po aplikaci infestinu (Obr. 14).



Obr. 14: Relativní změna produkce NO v závislosti na čase po aplikaci elicitinů k suspenzím kulturám tabáku detekovaná s využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA. Jako blank sloužilo ekvilibrační médium s přidavkem pracovního roztoku fluorescenční sondy; ke kontrolní buněčné suspenzi byla namísto elicitinů přidána destilovaná voda. Použitá koncentrace elicitinů byla 5 nmol/l.

Produkce extracelulárního NO byla měřena sondou DAF-FM. V tomto případě byla detekována zvýšená produkce NO pouze po aplikaci infestinu. Do 30 min po zahájení experimentu nebyl pozorován vliv oligandrinu a kryptogeinu. Následně byla detekována snížená produkce NO po aplikaci kryptogeinu do buněčné suspenze. Oligandrin produkci oxidu dusnatého významně neovlivnil.



Obr. 15: Relativní změna produkce NO v závislosti na čase po aplikaci elicitinů k suspenzním kulturám tabáku detekovaná s využitím fluorescenční sondy DAF-FM. Jako blank sloužilo ekvilibrační médium s přidavkem pracovního roztoku fluorescenční sondy; ke kontrolní buněčné suspenzi byla namísto elicitinů přidána destilovaná voda. Použitá koncentrace elicitinů byla 5 nmol/l.

V souladu s našimi výsledky byla detekovaná zvýšená produkce ROS v důsledku aplikace kryptogeinu k tabákovým buňkám v práci Simon-Plas *et al.*, 1997, stejný jev byl zaznamenán i v řadě dalších prací (Simon-Plas *et al.*, 2002; Lherminier *et al.*, 2009; Dokládal *et al.*, 2012). V diplomové práci Jendrišáková (2015) byl u tabákových buněk v intervalu 0-120 minut po aplikaci 5 nmol/l kryptogeinu naměřena zvýšená produkce ROS, hROS i NO. K měření byly použity stejné fluorescenční sondy jako v předložené práci. Suspenzní kultura tabákových buněk BY-2 vykazovala zvýšenou produkci peroxodisitanu a dalších hROS již 1 hodinu po aplikaci 50 nmol/l INF1, pozorována byla také nadprodukce superoxidového aniontu (Saito *et al.*, 2006). U *N. benthamiana* je po aplikaci INF1 rovněž pozorována produkce ROS a NO (Asai *et al.*, 2008).

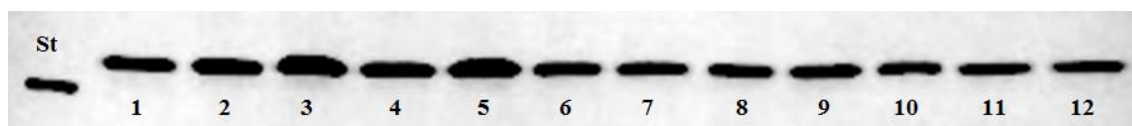
Ve studii Yamamoto *et al.*, 2004 byl prokázán výrazný nárůst produkce NO u suspenzní kultury tabáku BY-2 po aplikaci 50 nmol/l infestinu a zároveň bylo zjištěno, že se oxid dusnatý podílí na indukci buněčné smrti, výsledky potvrzuje i práce Saito *et al.*, 2006. V řadě předchozích studií bylo prokázáno, že po aplikaci kryptogeinu k buněčné suspenzi tabáku dochází k největší produkci NO okamžitě, s maximem v řádu několika jednotek minut (Lamotte *et al.*, 2004, Planchet *et al.*, 2006; Foissner *et al.*, 2000).

4.3 Vliv elicitinů na produkci Hsp70

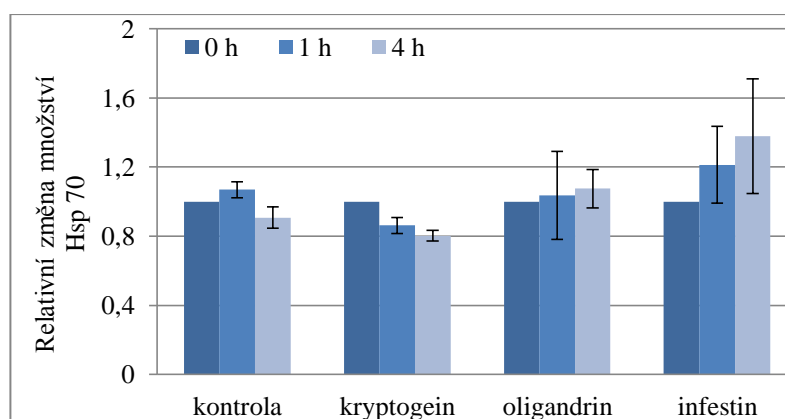
Heat shock proteiny (Hsp) jsou vysoce konzervované proteiny, které jsou zodpovědné za správné skládání proteinů. Konstitutivně exprimované Hsp70 proteiny jsou často zapojeny v procesu skládání de novo syntetizovaných polypeptidických řetězců a importu/translokace proteinových prekurzorů. Některé formy Hsp70 jsou exprimovány pouze, když je organismus vystaven environmentálnímu stresu. Ty se účastní znovusložení proteinů a degradace neaktivních proteinů (Frydman, 2001; Wang *et al.*, 2004). Ve studii Kanzaki *et al.*, 2003 byla prokázána významná úloha cytosolárních Hsp70 a Hsp90 při hypersenzitivní reakci spuštěné infestinem u *N. benthamiana*. Rostliny, u kterých byly umlčeny geny pro Hsp70 a 90, nevykazovaly žádné známky HR ani 36 hodin po aplikaci INF1.

Cílem experimentální části této práce bylo posoudit vliv elicitinů na produkci chaperonů Hsp70. Z obrázku 16 je patrné, že kryptogein způsobil mírný pokles produkce Hsp70. Je zajímavé, že naopak aplikace infestinu produkci Hsp70 stimulovala. Oligandrin signifikantně neovlivnil produkci Hsp70.

a)



b)

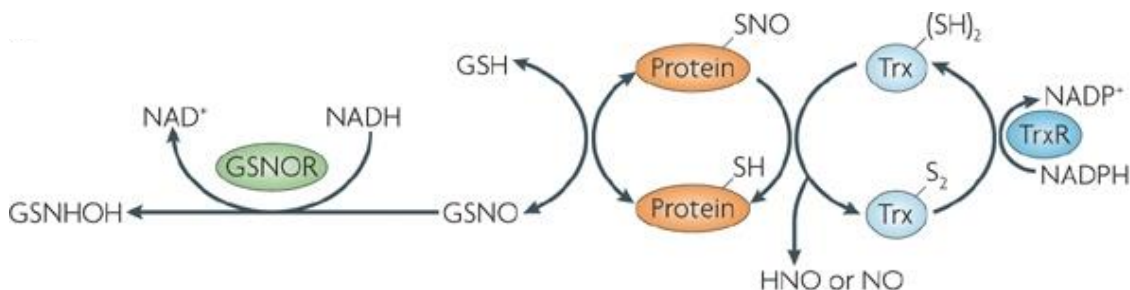


Obr. 16: Stanovení Hsp70 metodou Western blot po aplikaci elicitinů k tabákové buněčné suspenzi. a) Imunodetekce Hsp70, b) vyhodnocení intenzity signálu bandů po imunodetekci Hsp70 (relativní jednotky – vztaženo na vzorek 1). St) Standard Hsp70 (0,2 µg/ml), 1) kontrola - 0 h, 2) kryptogein - 0 h, 3) oligandrin - 0 h, 4) infestin - 0 h, 5) kontrola - 1 h, 6) kryptogein - 1 h, 7) oligandrin - 1 h, 8) infestin - 1 h, 9) kontrola - 4 h, 10) kryptogein - 4 h, 11) oligandrin - 4 h, 12) infestin - 4 h.

Ve studii Piterková *et al.*, 2013 byla prokázána zvýšená produkce Hsp70 v průběhu patogenese na modelovém systému *Solanum* spp. po infekci patogenem *Oidium neolycopersici* a současně úloha NO a ROS v regulaci produkce Hsp70 při působení abiotického i biotického stresu na rostliny. Akumulace Hsp70 je také významně ovlivněna kyselinou salicylovou (SA). U protoplastových kultur tabáku SA stimulovala akumulaci Hsp70 vyvolanou teplotním stresem za současné redukce míry apoptosy (Cronjé *et al.*, 2004). Naše pilotní experimenty prokázaly změny v produkci Hsp70 v závislosti na typu použitého elicitoru po aplikaci v tabákové suspenzi. Zajímavý je opačný efekt infestinu a kryptogeinu.

4.4 Vliv elicitinů na expresi genů zapojených v metabolismu ROS a RNS

V předložené práci byla studována míra exprese genu pro GSNOR čtyři hodiny po aplikaci elicitinů do tabákové suspenze buněk. Enzym GSNOR (obr. 17) je zapojen v katabolismu NO a hraje významnou roli v obranné reakci rostlin (Wilson *et al.*, 2008).



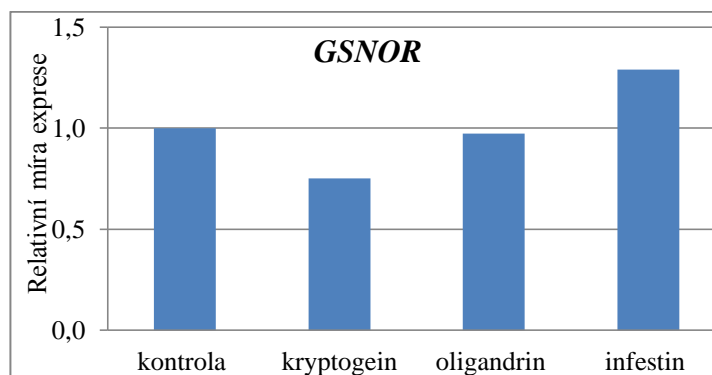
Obr. 17: Mechanismus denitrosylace za účasti enzymu GSNOR S-nitrosylované proteiny a nízkomolekulární S-nitrosothioly jsou metabolizovány na redukované thioly za vzniku S-nitrosoglutathionu. Ten je dále přeměněn na N-hydroxysulfonamid a oxidovaný glutathion. Denitrosylace probíhá i působením Trx - thioredoxinu (převzato z Benhar *et al.*, 2009).

Po aplikaci elicitinu kryptogeinu byla detekována snížená exprese genu pro GSNOR, naopak v případě aplikace infestinu byla zaznamenána zvýšená exprese tohoto genu (obr. 18). Oligandrín neměl vliv na expresi genu pro GSNOR.

a)

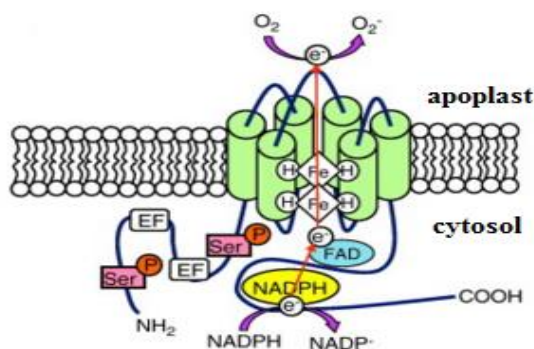


b)



Obr. 18: Stanovení exprese genu pro GSNOR pomocí PCR a agarosové elektroforézy. a) Agarosová elektroforéza po PCR, b) vyhodnocení relativní exprese po vztahení na housekeepingový (provozní) gen - elongační faktor EF-1 α . Expresa byla stanovena 4 h po aplikaci elicitinů do tabákové suspenze buněk 1) kontrola (buněčná suspenze, do které byla přidána destilovaná voda), 2) kryptogein, 3) oligandrín, 4) infestin, St1 – DNA standard o velikosti 300 bp, St2 – DNA standard o velikosti 200 bp.

Enzym NADPH oxidasa je hlavním producentem ROS při oxidativním vzplanutí (Obr.19) (Yoshioka *et al.*, 2001).



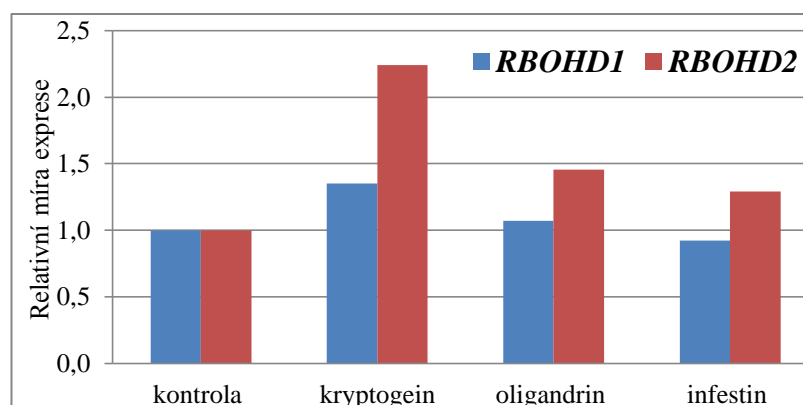
Obr. 19: Rostlinná NADPH oxidasa (RBOHD). Z NADPH se uvolňují elektrony, které jsou transportovány přes FAD a hemy až na kyslík za vzniku superoxidového aniontu radikálu (převzato ze Suzuki *et al.*, 2011).

V předložené bakalářské práci byla stanovena exprese dvou genů, které kódují RBOHD v tabákových buňkách (*RBOHD1* a *RBOHD2*). Indukce exprese *RBOHD2* byla zaznamenána po aplikaci všech elicitinů. Nejvýraznější změny byly detekovány po aplikaci kryptogeinu, který patří mezi elicitiny třídy I β . V případě exprese genu *RBOHD1* byla zvýšená exprese pozorována pouze po aplikaci kryptogeinu. Oligandrin a infestin neovlivnili expresi *RBOHD1* (obr. 20). Po aplikaci všech elicitinů byla zaznamenána zvýšená produkce ROS sondou H₂DCF DA a v případě detekce hROS sondami APF a HPF pouze po aplikaci kryptogeinu. Tyto výsledky korespondují se změnami exprese genu pro *RBOHD2*, které jsou jednoznačně nejvyšší v důsledku působení kryptogeinu na tabákové buňky. Výsledky stanovené metodou PCR s následnou agarosovou elektroforézou byly potvrzeny v případě genu *RBOHD2* metodou RT PCR (Obr. 20 c).

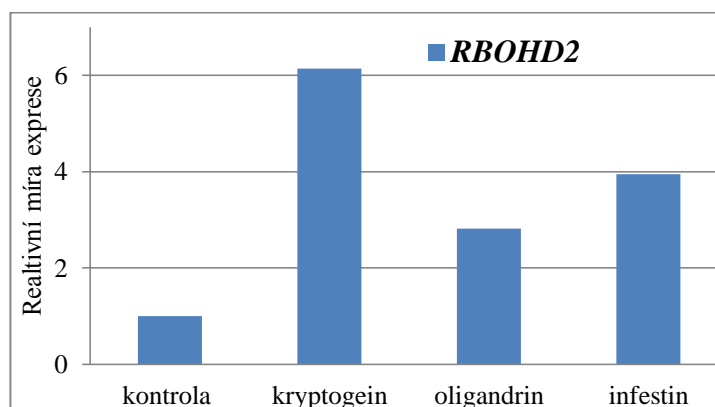
a)



b)



c)



Obr. 20: Stanovení exprese genu *RBOHD1* a *RBOHD2* metodou PCR a agarosové elektroforézy a metodou qPCR. a) Agarosová elektroforesa po PCR, b) vyhodnocení agarosové elektroforézy - relativní exprese po vztahování na housekeepingový (provozní) gen - elongační faktor EF-1 α , c) vyhodnocení relativní exprese genu *RBOHD2* metodou qPCR. Expresse byla stanovena 4 h po aplikaci elicitinů do tabákové suspenze buněk. *RBOHD1*: 1) kontrola, 2) kryptogein, 3) oligandrin, 4) infestin, St1 - DNA standard o velikosti 100 bp, St2 - DNA standard o velikosti 50 bp.; *RBOHD2*: 5) kontrola, 6) kryptogein, 7) oligandrin, 8) infestin, St2 - DNA standard o velikosti 50 bp, St3 - DNA standard o velikosti 100 bp.

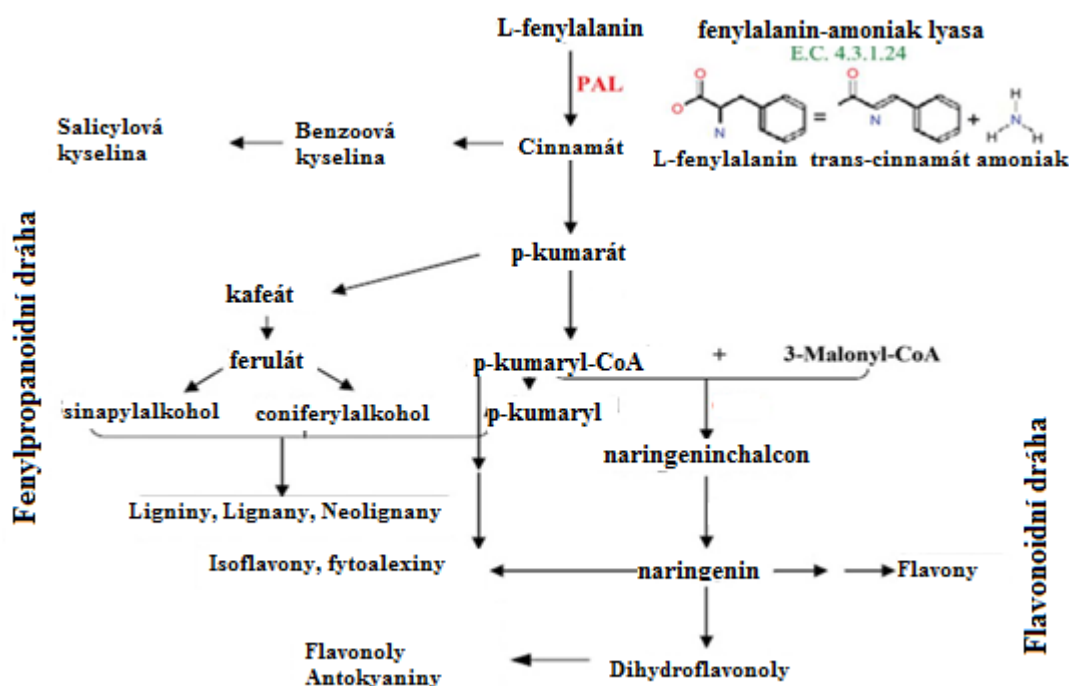
GSNOR hraje důležitou roli v mechanismu obranných reakcí rostlin po napadení patogenem. Rostliny *A. thaliana* se sníženým obsahem GSNOR byly více resistantní proti patogenu *Phytophthora parasitica* (Rusterucci *et al.*, 2007). GSNOR je nadprodukována působením kyseliny salicylové, naopak kyselina jasmonová produkci tohoto enzymu potlačuje (Díaz *et al.*, 2003). V diplomové práci Jendrišáková 2015 byla 4 hodiny po aplikaci 5 nmol/l kryptogeinu zaznamenána snížená exprese genu GSNOR a zároveň upregulace genů pro NADPH oxidasy, což koresponduje s výsledky této práce. Bylo prokázáno, že dvě isoformy NADPH oxidasy u *N. benthamiana* (NbRBOHA a NbRBOHB) způsobují akumulaci H₂O₂ a podílí se v obranném mechanismu dané rostliny vedoucí k rezistenci proti patogenu *P. infestans*. Po aplikaci infestinu došlo k indukci exprese genu NbRBOHB. NbRBOHA byl exprimován konstitutivně (Yoshioka *et al.*, 2003). V tabáku je za produkci ROS při působení elicitinu kryptogeinu zodpovědná pouze jediná isoforma NADPH oxidasy - NtRBOHD (Lherminier *et al.*, 2009). U suspenzní tabákové kultury ošetřené kryptogeinem byla sledována akumulace transkriptu NtRBOHD a současný růst produkce ROS (Simon-Plas *et al.*, 2002). Ve studii Noirot *et al.*, 2014 byla u buněk tabáku sledována nadexpresse genů *RBOHD1* a *RBOHD2* již 30 minut po vystavení kryptogeinu. V předložené práci byla naměřena zvýšená exprese *RBOHD1* a *RBOHD2* způsobená kryptogeinem, což koreluje s naměřenou nadprodukcí peroxidu vodíku po jeho aplikaci.

U tabákových buněk s přidavkem infestinu a oligandrinu byla sledována snížená produkce hROS v porovnání s kontrolou; mírně nadexprimována byla pouze *RBOHD2*. V dalších experimentech by bylo vhodné použít fluorescenční sondy DHE pro srovnání růstu produkce O_2^- s expresí NADPH oxidas.

4.5 Vliv elicitinů na expresi genů signálních drah SA, JA a ethylenů

4.5.1 Vliv elicitinů na expresi genů signální dráhy kyseliny salicylové

V předložené práci byla studována exprese genu pro PAL (fenylalanin-amoniak lyasa), což je klíčový enzym biosyntézy fenypropanoidů, flavonoidů a kyseliny salicylové viz obr. 21 (Mauch-Mani a Slusarenko, 1996). Dále byla sledována exprese genu pro PR-1 α . Jedná se o kyselý protein produkovaný ve spojitosti se systémově získanou resistencí, kterou mohou vytvářet rostliny po napadení patogenem. PR-1 α vykazuje fungicidní aktivitu. Exprese tohoto proteinu je indukována kyselinou salicylovou (Ryals *et al.*, 1996).



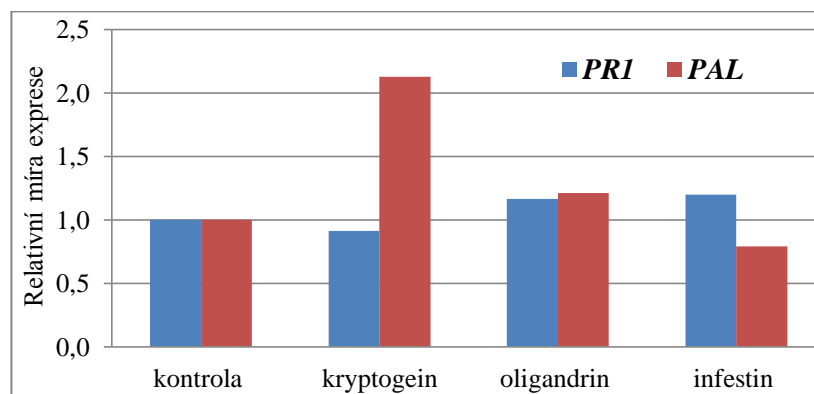
Obr. 21: Úloha fenylalaninamoniaklyasy v biosyntetické dráze flavonoidů a fenypropanoidů. Nadexprese genu *PAL* může vést ke zvýšené produkci kyseliny salicylové, fytoalexinů, anthokyanů a lignifikaci (převzato z Dehghan *et al.*, 2014).

Po aplikaci kryptogeinu byla zaznamenána nadměrná exprese genu pro PAL, v případě infestinu byl pozorován mírný pokles exprese. Exprese genu pro PR-1 α nebyla významně ovlivněna aplikací jednotlivých elicitinů (obr. 22). Předběžné výsledky poukazují, že signální dráha kyseliny salicylové nebude pravděpodobně zapojena v obranném mechanismu po aplikaci elicitinů k tabákovým buňkám. Nadexprese *PAL* působením kryptogeinu může být spojena s lignifikací či aktivací flavonoidní dráhy. Po aplikaci kryptogeinu byl v této práci pozorován růst produkce ROS. Vznikající peroxid vodíku může v apoplastu stimulovat syntézu prekurzorů ligninu a jejich následné zesíťování.

a)



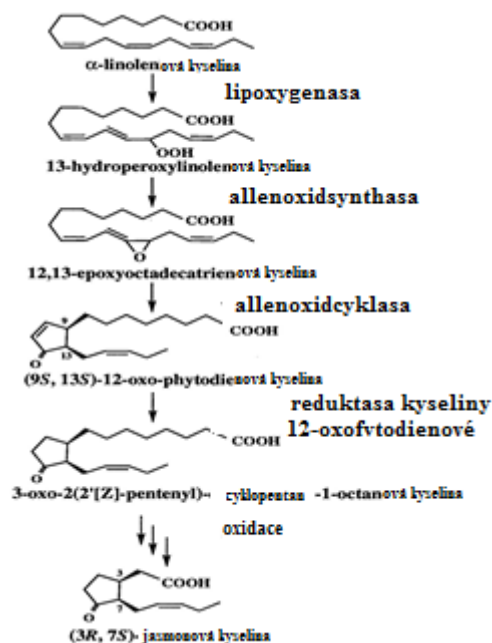
b)



Obr. 22: Stanovení exprese genů zapojených v signální dráze kyseliny salicylové (*PR-1 α* a *PAL*) pomocí PCR a agarosové elektroforézy. a) Agarosová elektroforéza po PCR, b) vyhodnocení agarosové elektroforézy - relativní exprese po vztážení na housekeepingový (provozní) gen - elongační faktor EF-1 α . Exprese byla stanovena 4 h po aplikaci elicitinů do tabákové suspenze buněk. *PR-1 α* : 1) kontrola, 2) kryptogein, 3) oligandrin, 4) infestin, St1 – DNA standard o velikosti 200 bp, St2 – DNA standard o velikosti 100 bp. *PAL*: 5) kontrola, 6) kryptogein, 7) oligandrin, 8) infestin, St3 - DNA standard o velikosti 200 bp, St4 - DNA standard o velikosti 100 bp.

4.5.2 Vliv elicitinů na expresi genů signální dráhy kyseliny jasmonové

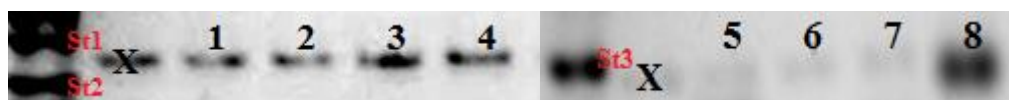
Signální dráha JA byla sledována pomocí exprese genů pro allenoxidsynthasu (AOS) a transkripční faktor *MYC2*. Allenoxidsynthasa je enzym produkující prekurzor potřebný pro syntézu kyseliny jasmonové (obr. 23). *MYC2* je transkripční faktor JA-dependentních genů.



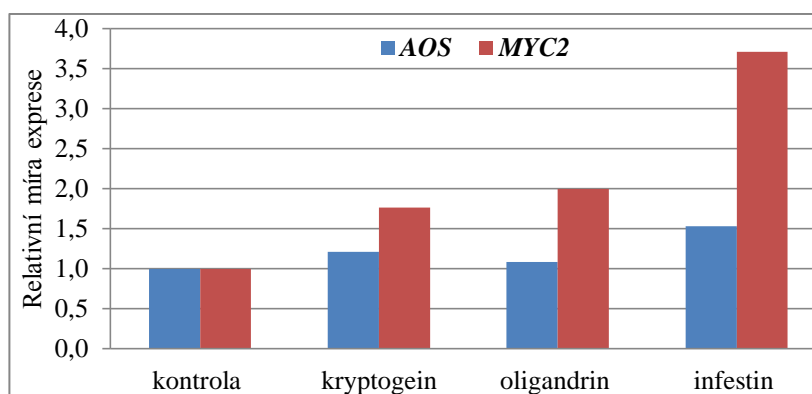
Obr. 23 Biosyntéza kyseliny jasmonové. Tvorby prekurzorů kyseliny jasmonové se účastní enzym AOS (allenoxidsynthasa) (převzato ze Stintzi a Browse, 2000).

Po aplikaci kryptogeinu a oligandrinu k buněčné suspenzi tabáku byl detekován pouze mírný nárůst exprese *MYC2*, v porovnání s efektem který měla na expresi tohoto genu aplikace infestinu. Vliv na expresi AOS byl zaznamenán pouze v případě aplikace elicitinu infestinu (obr. 24).

a)



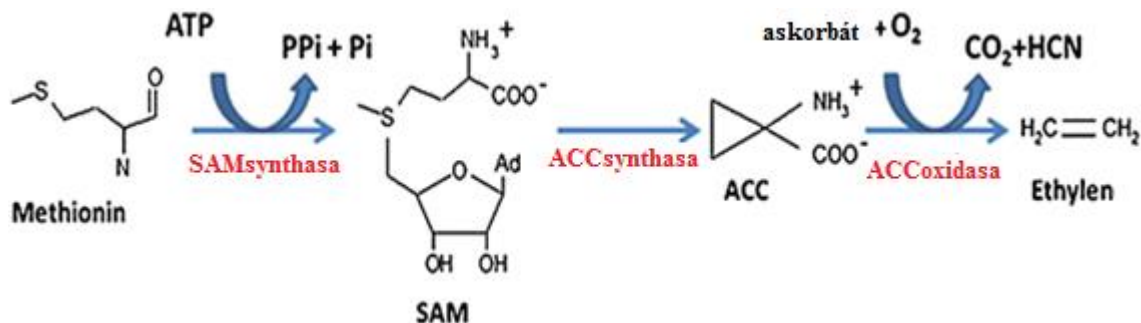
b)



Obr. 24: Stanovení exprese genů zapojených v signální dráze kyseliny jasmonové (*AOS* a *MYC2*) pomocí PCR a agarosové elektroforézy. a) Agarosová elektroforéza po PCR, b) vyhodnocení agarosové elektroforézy - relativní exprese po vztažení na housekeepingový (provozní) gen - elongační faktor *EF-1α*. Exprese byla stanovena 4 h po aplikaci elicitinů do tabákové suspenze buněk. *AOS*: 1) kontrola, 2) kryptogein, 3) oligandrin, 4) infestin, St1 – DNA standard o velikosti 200 bp, St2 – DNA standard o velikosti 100 bp. *MYC2*: 5) kontrola, 6) kryptogein, 7) oligandrin, 8) infestin, St3 – DNA standard o velikosti 100 bp.

4.5.3 Vliv elicitinů na expresi genů signální dráhy ethylenu

Pro posouzení vlivu elicitinů na aktivaci ethylenu byl vybrán gen pro endochitinasu/hevein-like (*End/Hel*). Endochitinasy jsou enzymy katalyzující hydrolyzu chitinu a jsou nadexprimovány při patogenesi působením ethylenu a kyseliny jasmonové (Rakwal *et al.*, 2004). Rostlina využívá endochitinas jako ochranu před patogeny, které obsahují chitin (Roby *et al.*, 1991). V biosyntéze ethylenu je zapojen enzym *ACC*synthasa (obr. 25), jehož gen je vhodný pro sledování této signální dráhy a bude studován v následující studii.



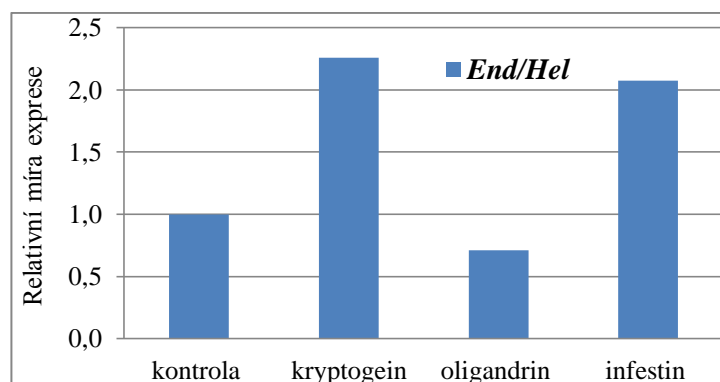
Obr. 25: Biosyntéza ethylenu. Pro sledování aktivace signální dráhy ethylenu se často využívá gen pro *ACC*synthasu, což je jeden z klíčových enzymů při produkci tohoto fytohormonu. SAM – S-adenylmethionin, ACC – 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina (převzato z Rudus *et al.*, 2012).

Kryptogein a infestin aktivovaly expresi genu kódujícího endochitinasu. U oligandrinu byl naopak pozorován mírný pokles exprese vybraného genu (obr. 26).

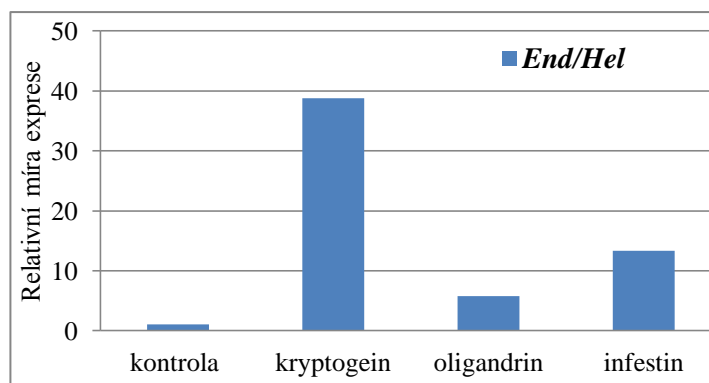
a)



b)

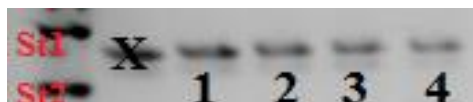


c)



Obr. 26: Stanovení exprese genu zapojeného v signální dráze ethylenu (*End/Hel*) pomocí PCR a agarosové elektroforézy. a) Agarosová elektroforéza po PCR, b) vyhodnocení agarosové elektroforézy - relativní exprese po vztažení na housekeepingový (provozní) gen - elongační faktor EF-1 α . c) vyhodnocení relativní exprese metodou qPCR. Expresse byla stanovena 4 h po aplikaci elicitinů do tabákové suspenze buněk. 1) kontrola, 2) kryptogein, 3) oligandrin, 4) infestin, St1 – DNA standard o velikosti 200 bp, St2 – DNA standard o velikosti 100 bp.

V rámci předložené bakalářské práce byly realizovány pilotní experimenty zaměřené na detekci exprese vybraných genů. Jako housekeepingový (provozní) gen byl použit elongační faktor *EF-1 α* (obr. 27). Jedná se o experimenty, jejichž hlavním cílem bylo prakticky se seznámit s metodami PCR a qPCR a otestovat vliv aplikace studovaných elicitorů na expresi genu pro NADPH oxidasu, genu pro GSNOR a expresi genů spojených se signálními drahami kyseliny salicylové, jasmonové, případně ethylenu. Experimenty byly zatím realizovány v 1-2 opakováních.



Obr. 27: Stanovení exprese genu *EF1-1 α* pomocí PCR a agarosové elektroforózy. *EF1* je exprimován konstitutivně. 1) kontrola 4h, 2) kryptogein 4h, 3) oligandrin 4h, 4) infestatin 4h, St1 – DNA standard o velikosti 200 bp, St2 – DNA standard o velikosti 100 bp.

Signální dráhy fytohormonů SA, JA a ethylenu hrají klíčovou roli v mechanismu obranných reakcí rostlin vedoucích k rezistenci rostliny proti patogenům. Dráhy JA a ethylenu jsou aktivovány zejména při působení nekrotrofních patogenů, SA indukuje resistenci proti biotrofním patogenům (Glazebrook, 2005). Po aplikaci kryptogeinu byla prokázána aktivace produkce ethylenu v tabákových buňkách (Milat *et al.*, 1991). U rajčat (*S. lycopersicum* cv. MicroTom) byla po aplikaci infestinu pozorována aktivace signálních drah kyseliny jasmonové a ethylenu. Signální dráhy byly sledovány pomocí genů *PR-6*, *LOX* a *LeATL6*, jež jsou nadexprimovány působením JA a genů *PR-2b* a *ERF2*, které jsou nadexprimovány při zvýšené produkci ethylenu. Zároveň byla také sledována akumulace ethylenu 4 h po aplikaci INF1 (Kawamura *et al.*, 2009). V práci Schenke *et al.*, 2004 byla měřena produkce ethylenu tabákovými buňkami po aplikaci infestinu a zároveň bylo zjištěno, že tvorba ethylenu je indukována reaktivními formami kyslíku. Jendrišáková (2015) ve své diplomové práci sledováním exprese genů *PR1 α* , *PAL*, *AOS*, *MYC2* a *End/Hel* zjistila, že kryptogein aktivuje v tabákových buňkách dráhu JA a ethylenu. V této práci byla rovněž prokázána zvýšená exprese genu pro *PAL*. Ve studii Amelot *et al.*, 2011 způsobil kryptogein u tabákových buněk nadexpresi *PAL* a aktivaci fenylypropanoidní dráhy. *PR-1* a *PAL* mohou být nadexprimovány také působením NO (Durner *et al.*, 1998).

5 Závěr

Cílem předložené bakalářské práce bylo studium aktivace obranných mechanismů po aplikaci infestinu na modelovém systému suspenzní kultury buněk tabáku *N. tabacum* L. cv. Xanthi a porovnání jeho působení s elicitiny kryptogeinem a oligandrinem. Z výsledků experimentální části práce lze usoudit, že infestin:

- nemá významný vliv na životnost tabákových buněk (*negativní efekt má oligandrin a kryptogein*)
- způsobuje zvýšenou produkci peroxidu vodíku a oxidu dusnatého, produkce hROS je naopak potlačena
- zvyšuje expresi genu pro NADPH oxidasu (*RBODH2*) (*zvýšení je ale výrazně nižší v porovnání s efektem kryptogeinu*)
- zvyšuje expresi genu pro GSNOR (*kryptogein potlačuje expresi GSNOR*)
- mírně stimuluje produkci Hsp70 (*kryptogein potlačil produkci Hsp70*)
- aktivuje signální dráhy ethylenu a kyseliny jasmonové (*podobně jako kryptogein*)

6 Seznam použité literatury

- Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. (2001): Nitric oxide synthases: structure function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593-615.
- Angelini R., Cona A., Federico R., Fincato P., Tavladoraki P, Tisi A. (2010): Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 560-564.
- Asai S., Ohta K., Yoshika H. (2008): MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell* **20**, 1390–1406.
- Babior B. M. (2004): NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology* **16**, 42-47.
- Baillieul F., de Ruffray P., Kauffmann S. (2003): Molecular cloning and biological activity of α -, β -, and γ -megaspermin, three elicitors secreted by *Phytophthora megasperma* H20. *Plant Physiology* **131**, 155-166.
- Beckman K. B., Ames B. N. (1998): The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* **78**, 547-581.
- Benhar M., Forrester M. T., Stamler J. S. (2009): Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Molecular Cell Biology* **10**, 721-732.
- Boissy G., Delafortelle E., Kahn R., Huet J. C., Bricogne G., Pernollet J. C., Brunie S., (1996): Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* **4**, 1429–1439.
- Boissy G., O'Donohue M., Gaudemer O., Perez V., Pernollet J. C., Brunie S. (1999): The 2.1 Å structure of an elicitor-ergosterol complex: A recent addition to the sterol carrier protein family. *Protein Sci.* **8**, 1191-1199.
- Bolwell G. P. (1999): Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current opinion in plant biology* **2**, 287-294.
- Bolwell G. P., Daudi A. (2009): Reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. In: Reactive Oxygen Species in Plant Signaling (del Río A. P., Puppo A.), Springer, 113-134.
- 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.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254.
- Brasier C. M. (1992): Evolutionary biology of *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 153-170.
- Byth H-A., Mchunu B. I., Dubery I. A., Bornman L. (2001): Assessment of a simple, non-toxic Alamar Blue cell survival assay to monitor tomato cell viability. *Phytochemical Analysis* **12**, 340-346.
- Chandok M. R., Ytterberg A. J., van Wijk K. J., Klessig D. F. (2003): The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* **113**, 469-482.
- Corpas F. J., Palma J. M., del Río L. A., Barroso J. B. (2009): Evidence supporting the existence of L-arginine dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist* **184**, 9-14.
- Corpas F. J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J. M., Barroso J. B. (2011): Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* **181**, 604-611.
- Crawford M. C., Galli M., Tischner R., Heimer Y. M., Okamoto M., Mack A. (2006): Response to Zemojtel *et al*: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends in Plant Science* **11**, 526-527.
- Cronjé M. J., Weir I. E., Bornman L. (2004): Salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 induction correlates with reduced apoptosis tobacco protoplasts. *Cytometry* **61**, 76-87.
- 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.

- Davidson R. M., Reeves P. A., Manosalva P. M., Leach J. E. (2009): Germins: A diverse protein family important for crop improvement. *Plant Science* **199**, 499-510.
- Dehghan S., Sadeghi M., Pöppel A., Fischer R., Lakes-Harlan R., Kavousi R., Vilcinskas A., Rahnamaeian M. (2014): Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*. *Bioscience reports* **34**.
- Del Río L. A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2004): Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**, 783-792.
- Del Río L. A. (2011): Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **506**, 1-11.
- Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martínez M. C. (2003): The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letters* **543**, 136-139.
- Doehlemann G., Hemetsberger C. (2013): Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist* **198**, 1001-1016.
- Dokládal L., Obořil M., Stejskal K., Zdráhal Z., Ptáčková N., Chaloupková R., Damborský J., Kašparovský T., Jeandroz S., Žďárská M., Lochman J. (2012): Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2203-2215.
- Fefe S., Bouaziz S., Huet J. C., Pernollet J. C., Guittet E. (1997): Three-dimensional solution structure of beta cryptogein, a beta elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Sci.* **6**, 2279-2284.
- Fellbrich G., Blume B., Brunner F., Hirt H., Kroj T., Ligterink W., Romanski A., Nürnberger T. (2000): *Phytophthora parasitica* elicitor-induced reactions in cells of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell Physiology* **41**, 692-701.
- Foissner I., Wendehenne D., Langebartes Ch., Durner J. (2000): *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *The Plant Journal* **23**, 817-824.
- Fry W. (2008): *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular plant pathology* **9**, 385-402.
- Fu Z. Q., Dong X. (2013): Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 839-863.
- Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003): S-nitrosylation signaling in cell biology. *Molecular Interventions* **3**, 253-263.
- Glazebrook J. (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 205-227.
- Grant J. J., Loake G. J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant physiology* **124**, 21-29.
- Heese A., Hann D. R., Gimenez-Ibanez S., Jones A. M. E., He K, Li J., Schroeder J. I., Peck S. C., Rathjen J. P. (2007): The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12217-12222.
- Hill B. G., Dranka B. P., Bailey S. M., Lancaster J. R. Jr., Darley-Usmar V. M. (2010) What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J. Biol. Chem.* **285**, 19699-19704.
- Huet J. C., Sallé-Tourne M., Pernollet J. C., (1993): Amino acid sequence and toxicity of the α elicitor secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 302-304.
- Huitema E., Vleeshouwers V. G. A. A., Cakir C., Kamoun S., Govers F. (2005): Differences in intensity and specificity of hypersensitive response induction in *Nicotiana* spp. by INF1, INF2A, and INF2B of *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 183-193.
- Chandra S., Low P. S. (1997): Measurement of Ca^{2+} fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 28274-28280.
- Jiang R. H. Y., Tyler B. M., Whisson S. C., Hardham A. R., Govers F. (2006a): Ancient origin of elicitor gene clusters in *Phytophthora* genomes. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 338-351.
- Jones J. D. G., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.

- Jendrišáková T. (2013): *Úloha oxidu dusnatého v obranné reakci po aplikaci elicitinů k suspenzním kulturám tabáku*. Bakalářská práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Jendrišáková T. (2015): *Reaktivní formy dusíku v obranném mechanismu rostlin*. Diplomová práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Kamoun S., Klucher K. M., Coffey M. D., Tyler B. (1993): A gene encoding a host specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 573–581.
- Kamoun S., Lindqvist H., Govers F. (1997a): A novel class of elicitin-like genes from *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 1028–1030.
- Kamoun S., Van West P., Vleeshouwers V. G., De Groot K. E., Govers F. (1998): Resistance of *Nicotiana Benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* **10**, 1413–1426.
- Kamoun S., Hrabec P., Sobral B., Nuss D., Govers F. (1999): Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen *phytophthora infestans* based on expressed sequences. *Fungal Genetics and Biology* **28**, 94–106.
- Kanzaki H., Saitoh H., Ito A., Fujiwara S., Kamoun S., Katoh S., Yoshioka H., Terauchi R. (2003): Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant. Pathol.* **4**, 383–391.
- Kanzaki H., Saitoh H., Takahashi Y., Berberich T., Ito A., Kamoun S., Terauchi R. (2008): NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with *Phytophthora infestans* INF1 elicitor and mediates INF1-induced cell death. *Planta* **228**, 977–987.
- Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshioka H., Kamoun S., Takahashi H. (2009): Jasmonic acid- and ethylene-mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato. *J. Phytopathol.* **157**, 287–297.
- Keller T., Damude H. G., Werner D., Doerner P., Dixon R. A., Lamb C. (1998): A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**, 255–266.
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshika H. (2007): Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *The Plant Cell* **19**, 1065–1080.
- Kojima H., Nakatsubo, Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T. (1998): Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry* **70**, 2446–2453.
- Krämer R., Freytag S., Schmelzer E. (1997): *In vitro* formation of infection structures of *Phytophthora infestans* is associated with synthesis of stage specific polypeptides. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 43–53.
- Kroon L. P. N. M, Brouwer H., de Cock A. W. A. M., Govers F. (2012): The genus *phytophthora* anno 2012. *Phytopatology* **102**, 348–364.
- Lamb C., Dixon R. A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **48**, 251–275.
- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Seyueira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A., Wendehenne D. (2004): Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* **135**, 516–529.
- Latijnhouwers M., de Wit P. J. G. M., Govers F. (2003): Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology* **11**, 462–469.
- 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.
- León J., Lawton M. A. and Raskin I. (1995): Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* **108**: 1673–1678.

- Liszakay A., Kenk B., Schopfer P. (2003): Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* **217**, 658-667.
- Mauch-Mani B., Slusarenko A. J. (1996): Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell* **8**, 203-212.
- Mikeš V., Milat M. L., Ponchet M., Panabieres F., Ricci P., Blein J. P. (1998): Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 133-139.
- 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 A. N., Misra M., Singh R. (2011): Nitric oxide: A ubiquitous signaling molecule with diverse role in plants. *African Journal of Plant Science* **5**, 57-74.
- Moreau M., Lee G. I., Wang Y., Crane B. R., Klessig D. F. (2008): AtNOS/AtNOA1 is a functional Arabidopsis thaliana cGTPase and not a nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **283**, 32957-32967.
- Mori I. C., Schroeder J. I. (2004): Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signalling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology* **135**, 702-708.
- Murphy T. M., Asard H., Cross A. R. (1998): Possible sources of reactive oxygen species during the oxidative burst in plants. In: *Plasma Membrane Redox Systems and their role in Biological Stress and Disease* (Asard H., Bérczi A., Caubergs R. J.), Springer-Science+Business Media, B. V., 215-246.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* **15**, 473-497.
- Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. (2012a): Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease* **96**, 4-17.
- O'Brien J. A., Daudi A., Butt V. S., Bolwell G. P. (2012): Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**, 765-779.
- Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M., Suzuki K., Tanokura M., Kuchitsu K. (2008): Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **283**, 8885-8892.
- Ono E., Wong H. L., Kawasaki T., Hasegawa M., Kodama O., Shimamoto K. (2001): Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 759-764.
- Osman H., Vauthrin S., Mikeš V., Milat M. L., Panabieres F., Marais A., Brunie S., Maume B., Ponchet M., Blein J. P. (2001b): Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 2825-2834.
- Oswald W., Fleischmann F., Rigling D., Coelho A. C., Cravador A., Diez J., Dalio R. J., Jung H. M., Pfanz H., Robin C., Sipos G., Solla A., Cech T., Chanbery A., Diamandis S., Hansen E., Jung T., Orlikowski L. B., Parke J., Prospero S., Werres S. (2014): Strategies of attack and defence in woody plant-*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology* **44**, 169-190.
- Panabieres F., Marais A., Leberre J. Y., Penot I., Fournier D., Ricci P. (1995): Characterization of a gene cluster of *Phytophthora cryptogea* which codes for elicitors, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**, 996-1003.
- Picard K., Ponchet M., Blein J. P., Rey P., Tirilly Y., Benhamou N. (2000a): Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiology* **124**, 379-396.
- Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005): Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy* **99**, 455-466.

- Planchet E., Sonoda M., Zeier J., Kaiser W. M. (2006): Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogein induced hypersensitive response – a critical re-evaluation. *Plant, Cell and Environment* **29**, 59-69.
- Plešková V. (2011): *Sledování pozdní fáze obranné reakce tabáku v závislosti na použitém elicitoru*. Diplomová práce, MU Brno, Česká republika.
- Ponchet M., Panabières F, Milat M. L., Mikes V., Montillet J. L., Suty L., Triantaphylides C., Tirillye Y., Blein J. P. (1999): Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 1020–1047.
- Rakwal R., Yang G, Komatsu S. (2004): Chitinase induced by jasmonic acid, methyl jasmonate, ethylene and protein phosphatase inhibitors in rice. *Molecular Biology Reports* **31**, 113-119.
- Roby D., Broglie K., Gaynor J., Broglie R. (1991): Regulation of a chitinase gene promoter by ethylene and elicitors in bean protoplasts. *Plant Physiology* **97**, 433-439.
- Romero-Puertas M. C., Laxa M., Matte A., Zaninotto F., Finkemeier I., Jones A. M. E., Perazzolli M., Vandelle E., Dietz K. J., Delledonne M. (2007): S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**, 4120-4130.
- Rodus I., Sasiak M., Kepczynski J. (2012): Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 295-307.
- Rusterucci C., Espunya M. C., Díaz M., Chabannes M., Martínez M. C. (2007): S-nitrosogluthione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant physiology* **143**, 1282-1292.
- Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H. Y., Hunt M. D. (1996): Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **8**, 1809-1819.
- Sagi M., Fluhr R. (2001): Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **126**, 1281-1290.
- Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (2006): Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco cells. *Plant and Cell Physiology* **47**, 689-697.
- 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.
- Schenke D., Naito K., Toyoda K., Inagaki Y., Shiraiishi T., Ichinose Y. (2004): Regulation of elicitor-induced ethylene production in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *J Gen Plant Pathol* **71**, 273-279.
- Simon-Plas F., Rustérucci C., Milat M. L., Humbert C., Montillet J. L., Blein J. P. (1997): Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environ.* **20**, 1573–1579.
- Simon-Plas F., Elmayan T., Blein J. P. (2002): The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *The Plant Journal* **31**, 137–147.
- Slaymaker D. H., Navarre D. A., Clark D., Del Pozo O., Martin G. B., Klessig D. F. (2002): The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**, 11640-11645.
- Stinzi 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.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M. A., Mittler R. (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 691-699.
- Tada Y., Spoel S. H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008): Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952-956.

- Tenhaken R., Rübél C. (1999): Cloning of putative subunits of the soybean plasma membrane NADPH oxidase involved in the oxidative burst by antibody expression screening. *Protoplasma* **205**, 21–28.
- Uruma S., Shibata Y., Takemoto D., Kawakita K. (2009): N,N-dimethylsphingosine, an inhibitor of sphingosine kinase induces phytoalexin production and hypersensitive cell death of Solanaceae plants without generation of reactive oxygen species. *Journal of General Plant Pathology* **75**, 257-266.
- Van West P., Vleeshouwers G. A. A. (2004): The *Phytophthora infestans*-potato interaction. In: *Annual Plant Reviews*, Vol. **11**: *Plant-pathogen interactions* (Talbot N. J.), Blackwell Scientific Publishers, 219-242.
- Wilson I. B., Gavel Y., von Heine G. (1991): Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites. *Biochem. J.* **275**, 529-534.
- Wilson I. D., Neill S. J., Hancock J. T. (2008): Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* **31**, 622-631.
- Wrzacek M., Brosché M., Kangasjärvi J. (2013). ROS signaling loops – production, perception, regulation. *Current opinion in plant biology* **16**, 575–582.
- Yamamoto A., Katou S., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (2004): Involvement of nitric oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension culture. *J. Gen. Plant. Pathol.* **70**, 85-92.
- Yoda H., Hiroi Y., Sano H. (2006): Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol.* **142**, 193-206.
- Yoshioka H., Sugie K., Park H. J., Maeda H., Tsuda N., Kawakita K., Doke N. (2001): Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 725–736.
- Yoshioka H., Numata N., Nakajima K., Katou S., Kawakita K., Rowland O., Jones J. D. G., Doke N. (2003): *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **15**: 706–718.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S. H., Loake G. J. (2014): Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist* **202**, 1142-1156.
- Yuen J. E., Andersson B. (2013): What is the evidence for sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Europe? *Plant pathology* **62**, 485-491.
- Yun B. W., Feechan A., Yin M., Saidi N. B. B., Le Bihan T., Yu M., Moore J. W., Kang J. G., Kwon E., Spoel S. H., Pallas J. A., Loake G. J. (2011): S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264-268.

7 Seznam použitých zkratek

2,4 – D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
AA/BIS	akrylamid/bis-akrylamid
Apo	apoplast
APF	3'-(p-aminofenyl)fluorescein
APS	peroxodisíran amonný
AOS	allenoxyd-synthasa
BAK1/SERK3	brassinosteroid-associated kinase 1/somatic embryogenesis receptor kinase 3
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BS	buněčná stěna
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
Cyt	cytoplasma
Chl	chloroplast
DAF-FM	4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein
DAF-FM DA	4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceindiacetát
DCF	2',7'-dichlorodihydrofluorescein (oxidovaný)
DHE	dihydroethidium
DTT	dithiotreitol
End/Hel	endochitinasa/hevein-like
ETI	effector-triggered immunity
ETS	effector-triggered susceptibility
FDA	fluorescein diacetát
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
HPF	3'-(p-hydroxyfenyl)fluorescein
HR	hypersenzitivní reakce
Hsp70	Heat shock protein 70
Hsp90	Heat shock protein 90
H ₂ DCF	2',7'-dichlorodihydrofluorescein (redukovaný)
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetát
iNOS	patogenem indukovaná NOSynthasa
INF1	infestin
JA	kyselina jasmínová (jasmonic acid)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa (mitogen-activated protein kinase)
MAPKK	kinasa mitogenem aktivované proteinkinasy (mitogen-activated protein kinase kinase)
MAPKKK	kinasa kinasy mitogenem aktivované proteinkinasy (mitogen-activated protein kinase kinase kinase)
MEK1	MAPKK 1
MEK2	MAPKK 2
MES	kyselina 2-(N-morpholino)etansulfonová
Mit	mitochondrie
MYC2	transkripční faktor
NbLRK	B-lektinu podobná receptorová kinasa - <i>Nicotiana benthamiana</i> (lectin-like receptor kinase)

NB-LRR	doména vázající nukleotidy-doména bohatá na leucin (nucleotide binding domain-leucin rich repeat domain)
NBT	nitro blue tetrazolium chloride
Ni-NOR	Nitrit-NOreduktasa
NOA1	NO associated 1
Nox2	savčí isoenzym NADPH oxidasy
NPK1	homolog MAPKKK
NPR1	Non-expresser of pathogenesis-related genes 1
NR	nitrátreduktasa
NTF6	homolog MAPK
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCD	programovaná buněčná smrt
Per	peroxisom
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PRR	pathogen-related receptor
PR-1 α	protein spojený s patogenezí (pathogenesis-related protein 1 α)
PrxIIIE	Peroxyredoxin II E
PTI	PAMP-triggered immunity
RBOH	respiratory burst oxidase homologue
RBOHB	rostlinná NADPH oxidasa (respiratory burst oxidase homologue B)
RBOHD	rostlinná NADPH oxidasa (respiratory burst oxidase homologue D)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SA	kyselina salicylová (salicylic acid)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)
SABP3	protein vázající kyselinu salicylovou
SIPK/NTF4	proteinkinasa indukovaná kyselinou salicylovou (salicyl acid-induced protein kinase)/ homolog SIPK
TBE	Tris/borát/EDTA
TBS	fyziologický roztok pufrovaný Tris (Tris-buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
Vak	vakuola
WIPK	wound-induced proteinkinase
X24	rekombinantně připravený kryptogein
XDH	xantindehydrogenasa