

Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta

Ústav biochemie

**SIGNÁLNE MOLEKULY INDUKOVANÉ
ELICITORMI RODU *PHYTOPHTHORA***

Diplomová práce

Brno 2007

Darina Horňáková

Pod'akovanie

Ďakujem svojmu vedúcemu prof. RNDr. Vladimírovi Mikešovi, CSc., Mgr. Tomášovi Kašparovskému, Ph.D., Mgr. Janovi Lochmanovi, Ph.D. za trpezlivosť a odborné vedenie diplomovej práce a našim laborantkám Věre Kratochvílovej a Jitke Neužilovej.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

V Brne 21.5.2007

Darina Hornáková

OBSAH

Úvod	5
Teoretická časť	6
1. <i>Phytophthora</i>	6
2. Interakcia <i>Phytophthora</i> – rastlina.....	7
2.1. Infekcia.....	7
2.2. Boj hostiteľskej rastliny a <i>Phytophthory</i> pri napadnutí.....	8
2.2.1. Signálna transdukčná kaskáda	9
3. Elicitíny.....	11
3.1. Štruktúrne znaky a vlastnosti.....	11
3.1.1. 3-D štruktúra kryptogéinu.....	13
3.1.2. Vzťah štruktúry a reaktivity.....	14
3.1.3. Elicitíny ako sterol carrier proteíny	14
3.1.4. Mutantné proteíny odvodené od kryptogéinu (MPOK).....	16
3.2. Vybrané fyziologické a biochemické efekty elicítinov vyvolané v rastlinách ..	17
3.2.1. Ranná fáza obrannej reakcie vyvolanej kryptogéinom.....	18
3.2.2. Tok draselných iónov a jeho zmeny po elicitácii	21
HKT transportéry.....	22
HAK/KUP/KT transportéry.....	23
Shaker-typ K ⁺ kanálov.....	25
KCO kanály	27
3.2.3. Tvorba oxidu dusnatého, jeho vlastnosti a účinky.....	27
Tvorba NO v rastlinných bunkách	28
Účinky NO.....	33
3.3. Úloha elicítinov a lipofilných zlúčenín v metabolizme <i>Phytophthory</i>	41
3.4. Význam elicítinov z poľnohospodárskeho a biotechnologického hľadiska.....	42
Cieľ práce.....	43
Experimentálna časť	44
4. Použité chemikálie a biologický materiál.....	44
4.1. Chemikálie.....	44
4.2. Prístroje.....	44
4.3. Biologický materiál.....	45
5. Metódy.....	45

5.1. Kultivácia kalusovej kultúry tabaku.....	45
5.1.1. Príprava média.....	45
5.1.2. Kultivácia suspenznej kalusovej kultúry tabaku.....	46
5.2. Meranie zmien koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí po elicitácii.....	47
5.2.1. Príprava merania.....	47
5.2.2. Vlastné meranie s ISE.....	48
5.3. Sledovanie zmien koncentrácie oxidu dusnatého v bunkách po elicitácii s fluorescenčnou sondou	48
5.3.1. Príprava merania.....	48
5.3.2. Vlastné meranie s fluorescenčnou sondou.....	48
5.4. Meranie zmien koncentrácie oxidu dusnatého po elicitácii Griessovou reakciou... ..	50
5.4.1. Príprava merania.....	50
5.4.2. Vlastné meranie s Griessovým činidlom	50
5.5. Vyhodnocovanie nameraných dat	54
5.5.1. Meranie zmien koncentrácie NO_2^- a NO po elicitácii	54
Výsledky.....	55
6. Meranie zmien koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí po elicitácii	55
6.1. Kalibrácia draselnej elektródy.....	55
6.2. Meranie s ISE pre K^+ po elicitácii	55
6.3. Sledovanie zmien koncentrácie oxidu dusnatého v bunkách po elicitácii s fluorescenčnou sondou.....	61
6.4. Meranie zmien koncentrácie oxidu dusnatého po elicitácii Griessovou reakciou... ..	63
6.4.1. Meranie zmien koncentrácie NO_2^- po elicitácii	63
6.4.2. Meranie zmien koncentrácie NO po elicitácii	68
Diskusia	71
Záver.....	76
Zoznam skratiek.....	77
Literatúra.....	78

ÚVOD

Phytophthora je známy rod pre fytopatológov, zástupcovia tohto rodu zapríčiňujú rôzne patogénne ochorenia a následne veľké škody na úrode poľnohospodársky významných plodín. Na poliach s tabakom bola pozorovaná v prítomnosti patogénov z rodu *Phytophthora* nekróza rastlín bez toho, aby na poli dochádzalo k šíreniu patogénneho ochorenia. Začalo sa skúmať, čo to spôsobuje a následne boli vyizolované z filtrátov kultúr mikroorganizmov *Phytophthora cryptogea* a *Phytophthora capsici* proteínové elicitory – elicítiny. (Elicitor je látka vyvolávajúca v rastlinách obrannú reakciu.)

Aj v našom laboratóriu sa začali skúmať jednotlivé efekty kryptogéínu, elicítinu z patogéna *Phytophthora cryptogea*, na celé rastliny i suspenzné kultúry tabaku. Zaoberáme sa štúdiom mechanizmu obranných reakcií rastlín proti patogénom, konkrétne študujeme interakcie medzi organizmami *Nicotiana tabacum* a *Phytophthora cryptogea*. Bolo publikovaných veľa článkov o biologickej aktivite, fyziologických a biochemických efektoch elicítinov na celé rastliny i suspenzné kultúry tabaku (prehľadný súpis-moja bakalárska práca) a ranná fáza obrannej reakcie tabaku vyvolaná kryptogéínom je popísaná v kapitole 3.2.1. tejto práce.

Táto diplomová práca obsahuje popis štruktúry a vlastností kryptogéínu a mutantných proteínov od neho odvodených. Ďalej jej súčasťou sú kapitola o význame draselných iónov a ich transporte v rastlinách, popis účinkov oxidu dusnatého na tabakové bunky i celé rastliny a výsledky mojej experimentálnej práce, ktorej náplňou bolo meranie zmien koncentrácie draselných iónov v extracelulárnom prostredí a oxidu dusnatého po vyvolaní obrannej reakcie rôznymi elicítinmi.

TEORETICKÁ ČASŤ

1. PHYTOPHTHORA

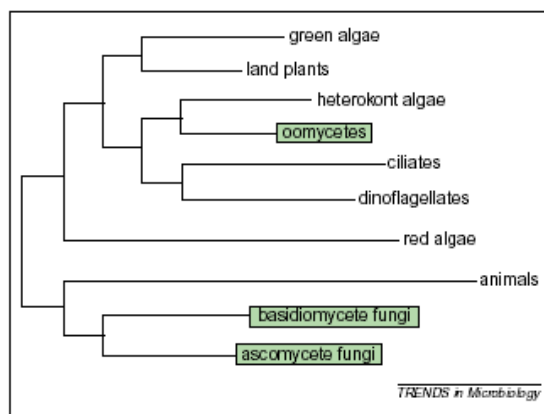
Phytophthora je rod mikroskopických organizmov, ktoré patria do triedy Oomycety. Z veľa zástupcov patriacich do tohto rodu viac ako 30 odrôd sekretuje elicitíny. Tieto parazitujúce mikroorganizmy patria medzi hemibiotrofy. Hemibiotrofy spočiatku vegetujú biotrofným spôsobom, rastú a rozmnožujú sa na živom rastlinnom pletive. Následne keď hostiteľské bunky zomierajú, prechádzajú na nekrotrofný spôsob vegetácie, tj. čerpajú živiny z mŕtvych rastlinných buniek.

Mikroorganizmy rodu *Phytophthora* parazitujú prevažne na vyšších suchozemských rastlinách. Napríklad *Phytophthora fragariae* parazituje na jahodách, spôsobuje ochorenie s názvom červená hniloba koreňa jahody [1] (obr. 1). *Phytophthora infestans* (pleseň zemiaková) napadá listy i hľuzy zemiakov (obr. 1) a i dnes spôsobuje vážne straty na úrode. Koncom polovice 19. storočia bola zodpovedná za vysťahovateľskú vlnu z Írska do USA. Okrem choroby zemiakov spôsobuje *Phytophthora* ochorenia ďalších ekonomicky významných plodín ako je kakao a sója, ale tiež lesov v Kalifornii a Austrálii.



Obr. 1.: Zemiakové hľuzy napadnuté *Phytophthorou infestans* (vľavo) [2] a koreň jahody infikovaný *Phytophthora fragariae* (vpravo) [1].

Ešte pred nedávnom bola trieda Oomycety taxonomicky zaradená do ríše húb - *Fungi*, teraz patria Oomycety do ríše *Protoctista* [3]. Na prvý pohľad je rastová schéma húb a Oomycet rovnaká, kvôli tomu boli Oomycety dlho považované za triedu v ríši húb.



Obr. 2.: Fylogenetický strom ukazujúci evolučné príbuzenstvá medzi hlavnými eukaryotickými skupinami, zdôrazňujúci evolučnú vzdialenosť-blízkosť medzi Oomycetami a hubami [3].

2. INTERAKCIA *PHYTOPHTHORA* – RASTLINA

2.1. INFEKCIA

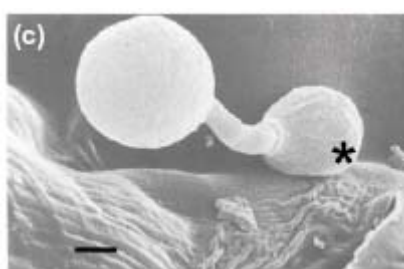
Phytophthora produkuje mycélia a spóry pre nepohlavné a pohlavné rozmnožovanie. Účinná spórová produkcia a rozšírenie sú dôležité pre jej stretnutie s rastlinou. Spóry sú roznášané vetrom alebo dažďom, sú rozptýlené v kvapkách vody, vo vodných filmoch alebo v pôdach bohatých na vodu. Jedná sa o jednojadrové bunky bez bunkovej steny, majúce dve flagely nerovnakej dĺžky. Mechanizmus, ktorým tieto spóry útočia na hostiteľskú rastlinu nie je známy, ale predpokladá sa, že procesy ako chemotaxa, elektrotaxa a autoagregácia by mohli pri útoku hrať dôležitú úlohu [3].

Keď sa spóra dostane k hostiteľskej rastline, zbaví sa flagel a stane sa z nej nepohyblivá cysta. Pohlavné spóry Oomycet sú schopné obvyčajne pretrvať extrémne prírodné podmienky, vyskytujú sa počas prezimovania na zbytkoch listov alebo v pôde. K upevneniu na rastline Oomycety *Phytophthora* a *Pythium* hromadia materiál v malých vezikloch vo vnútri spór, ktorý je uvoľnený na obalenie cysty. Klíčiace cysty Oomycety *Phytophthora infestans* produkujú okrem toho ešte proteíny podobné ľudským mucínom (adhezívne molekuly) a pravdepodobne slúžia k ochrane cýst pred vysušením alebo pred fyzickým poškodením.

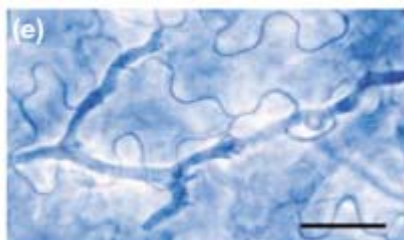
K preniknutiu do pletiva hostiteľskej rastliny vytvárajú rôzne druhy rodov *Phytophthora*, *Pythium* a húb appresoria (prísavky) a haustória (obr. 3 a 4). Appresoria rodov *Phytophthora* a *Pythium* sú všeobecne málo porovnateľné s hubovými, nie sú melanínové, pigmentové a od klíčiacych vlákien sú oddelené pomocou tzv. falošného septa, na rozdiel od húb, u ktorých sa nachádza septum, ktoré zároveň oddeľuje

jednotlivé bunky [3]. Rovnako ako u húb tvorbu appresoria u Oomycet *Phytophthora infestans*, *Phytophthora palmivora* a *Phytophthora sojae* môže vyvolať topologická charakteristika povrchu hostiteľského pletiva, ako sú výbežky a nepravidelnosti.

Haustória sú guľovité alebo laločnaté intracelulárne štruktúry, ktoré sú špecializované na získavanie živín z hostiteľskej rastliny v biotrofnej fáze života mikroorganizmov z rodu *Phytophthora*. Vznikajúce haustórium, nepreniká do cytoplazmy, ale tlačí pred sebou cytoplazmatickú membránu, ktorá sa preliačí, v medzere medzi ňou a bunkovou stenou sa hromadia živiny, ktoré *Phytophthora* vstrebáva. V mieste vniknutia haustória do bunky sa vytvára tzv. krčok.



Obr. 3.: *Phytophthora infestans*: cysta (vľavo) s kľúčiacim vláknom tvoriacim appresorium (*) [3].



Obr. 4.: *Phytophthora infestans*: rozvetvené hýfy s haustóriami v mezofilných bunkách zemiakového druhu Bintje [3].

2.2. BOJ HOSTITEĽSKEJ RASTLINY A PATOGÉNA Z RODU *PHYTOPHTHORA* PRI NAPADNUTÍ

Phytophthora vylučuje množstvo látok, ktoré sú potrebné jednak pre úspešnú kolonizáciu hostiteľskej rastliny ale taktiež i pre ochranu pred rastlinnými látkami určenými na obranu rastliny pred patogénom z rodu *Phytophthora*. Patria sem napríklad enzýmy degradujúce rastlinnú bunkovú stenu. Tieto enzýmy sú často vytvárané v kľúčiacich infekčných hýfách k uľahčeniu úspešnej penetrácie. U Oomycety *Phytophthora infestans* bol identifikovaný gén *Pipg1*, ktorý kóduje extracelulárnu endopolygalakturonázu [3]. Polygalakturonázy sú pektinázy, ktoré hydrolyzujú

homogalakturónový reťazec pektínu. Tento gén je exprimovaný v klíčiach cystách, čo naznačuje, že táto polygalakturonáza má svoju úlohu v počiatočnom štádiu infekcie. V génome mikroorganizmu *Phytophthora infestans* boli nájdené gény aj pre rozličné glukánazy [3].

Ako obranu proti patogénom z rodu *Phytophthora* rastliny produkujú enzýmy degradujúce bunkovú stenu patogéna na oligosacharidy, ktoré vyvolávajú u rastlín ďalšie posilnenie obrannej reakcie. *Phytophthora* vyvinula protiútočnú stratégiu, napríklad *Phytophthora sojae* sekretuje do otvoru vzniknutého pri poškodení rastlinnými glukánázami proteíny, ktoré inhibujú rastlinné obranné enzýmy [3]. Sekréciou takéhoto proteínu v apoplaste zabraňuje rozpadávaniu oligo- β -glukánov a tak znemožňuje alebo spomaľuje naštartovanie obrannej reakcie rastlinou. *Phytophthora infestans* vyvinula mechanizmy inhibície aktivity rastlinných extracelulárnych proteáz, zaradených do rastlinnej obrany, vylučuje proteín s proteázinhibičnou funkciou [3].

Rastlinná obrana nie je založená len na produkcii enzýmov degradujúcich bunkovú stenu patogéna, ale rastliny syntetizujú aj antimikrobiálne sekundárne metabolity ako sú fytoanticipíny (vytvárajú sa stále) a fytoalexíny (ich tvorba je stimulovaná napadnutím patogénom). Okrem toho sa v rastlinnom pletive tvoria aktívne formy kyslíka, spúšťa sa hypersenzitívna reakcia a bunková smrť v okolí miesta infekcie. Aktivuje sa signálna transdukčná kaskáda, ktorá môže viesť až k lokálnej a/alebo systémovej získanej rezistencii rastliny proti patogénom.

Rezistencia závisí na schopnosti rastliny rozpoznať patogén čo najskôr počas infekčného procesu, na rýchlosti spustenia obrannej reakcie a intenzite jednotlivých krokov obrany. Molekuly, ktoré prezrádzajú prítomnosť patogéna, elicitory, aktivujú receptory hostiteľa. Transdukčnou signálnou kaskádou sa signál rýchlo prenáša a spúšťajú sa hostiteľské obranné mechanizmy, ktorých úlohou je zabrániť ďalšiemu rastu, rozmnožovaniu a šíreniu patogéna. Ochorenie zapríčinené patogénom sa šíri len v citlivých rastlinách, ktoré nie sú schopné rozpoznať patogén alebo odpovedajú príliš pomaly a/alebo slabo.

2.2.1. SIGNÁLNA TRANSDUKČNÁ KASKÁDA

Po napadnutí rastliny patogénom môžu nastať rôzne situácie, medzi rastlinou a patogénom sa vytvorí buď nekompatibilná alebo kompatibilná interakcia. Kompatibilná interakcia nastane, keď sa jedná o hostiteľskú rastlinu daného patogéna, rastlina patogén nerozpozná, nenašartuje proti nemu obranné reakcie a dôjde tak

k rozvinutiu choroby. Vo všetkých ostatných situáciach, keď sa jedná o nehostiteľskú rastlinu a/alebo keď patogén sekretuje elicitory a je rastlinou rozpoznávaný, je snaha o jeho zničenie alebo je úspešne zničený, je interakcia označovaná ako nekompatibilná.

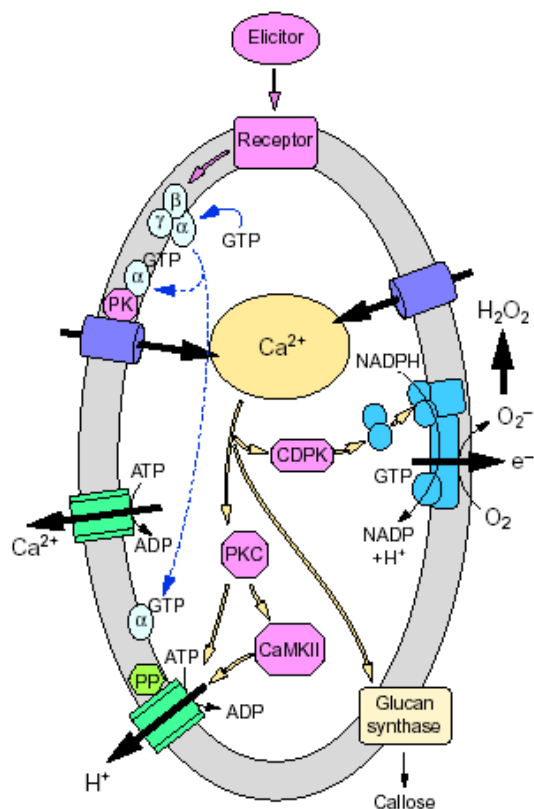
Elicitory môžu pochádzať z patogéna alebo z hostiteľskej rastliny, ako dôsledok pôsobenia patogéna. Najčastejšie sú to proteíny, peptidy, oligosacharidy chitínového typu a štepy glukánov. Existujú druhovo špecifické alebo nešpecifické, príkladmi druhovo nešpecifických elicitorov sú hubové fragmenty (ergosterol, chitín) a fragmenty bunkových stien hostiteľa (lineárne β -1,3-glukány)[4], vzniknuté počas procesu infekcie.

Či je rastlina odolná voči patogénom alebo nie, vysvetľuje jeden z modelov model gén verzus gén [4]. Druhovo špecifické elicitory sú kódované avirulentnými génmi patogéna. Rastlina vlastní vo svojom genóme gény rezistencie, ktorých expresiou vznikajú receptory rozpoznávajúce druhovo špecifické elicitory. Na špecifickom rozpoznávaní je založený vznik rezistencie hostiteľských rastlín voči patogénom. Keď rastlina rozpozná patogén, elicitor sa naviaže na príslušný receptor, spustí sa transdukčná signálna kaskáda. V tejto kaskáde majú dôležitú úlohu receptory spojené s G-proteínmi, ktoré aktivujú vápenaté kanály v plazmatickej membráne. Dochádza k vtoku vápenatých iónov do intracelulárneho prostredia. Vápenaté ióny aktivujú proteínkinázy, ktoré prenášajú signál ďalej.

Prvé odpovede detekované v rastlinách sú aktivácia iónových tokov a tvorba aktívnych foriem kyslíka (AOS) [4]. AOS, ako sú peroxid vodíka, superoxidový radikál a hydroxylový radikál, vznikajú činnosťou enzýmu NADPH oxidáza v procese nazývanom oxidačné vzplanutie. Ovpływujú hostiteľské bunky v mieste infekcie, navodzujú ich programovanú bunkovú smrť (PCD) a tak môžu brzdiť útok patogénu.

Kontakt elicitor-receptor spustí proces hypersenzitívnej reakcie:

- otváranie kanálov pre vápenaté, draselné a chloridové ióny
- syntézu oxidu dusnatého
- fosforylácie proteínov
- PCD pletiva v mieste napadnutia
- zmeny v expresii obranných génov
- tvorbu sekundárnych metabolitov fytoalexínov
- syntézu prekursorov ligninu, aktiváciu fenylalanínamoníaklyázy
- syntézu „pathogenesis-related“ proteínov
- tvorbu a akumuláciu etylénu, kyseliny jasmónovej, salicylovej a benzoovej
- posilnenie bunkovej steny



Obr. 5.: Model transdukčnej signálnej kaskády, prvých krokov reakcie rastliny na interakciu s patogénom. Model popisuje prenos signálu (elicitor) pomocou receptora spojeného s G-proteínom (prerušované čiary naznačujú aktiváciu heterotrimérneho G-proteínu), ktorý vedie k zvýšeniu cytozolovej koncentrácie Ca^{2+} , Ca^{2+} aktivuje doménu proteínkinázy kalmodulínového typu (CDPK). To naštartuje aktivitu NADPH oxidázy, vznikajú aktívne formy kyslíka (O_2^- , H_2O_2). Zvýšenie cytozolovej koncentrácie Ca^{2+} aktivuje aj produkciu kalózy enzýmom β -1,4-glukánsyntáza. Nasleduje aktivácia proteínkináz C (PKC) a Ca^{2+} /CaM-dependentnej iónmi Ca^{2+} , ktoré refosforylujú H^+ -ATPázu [4].

Niektoré tieto procesy môžu viesť k lokálnej a systémovej získanej rezistencii hostiteľskej rastliny voči patogénom, posilnením obranných mechanizmov. Rezistencia je nešpecifická, účinná proti širokej škále patogénov bez obmedzenia lokalizácie miesta napadnutia, trvá však maximálne niekoľko týždňov, na rozdiel od rezistencie u živočíchov, u ktorých existuje imunitná pamäť.

3.ELICITÍNY

3.1. ŠTRUKTÚRNE ZNAKY A VLASTNOSTI

Elicitíny sú malé hydrofilné proteíny bohaté na cysteín vylučované mnohými druhmi mikroorganizmov z rodu *Phytophthora* ako produkty avirulentných génov. Prečo nie

jednoducho len proteíny? Elicitíny sa nepodobajú ostatným proteínom a preto tvoria zvlášť skupinu.

Elicitíny sú obmedzené na druhy z rodu *Phytophthora* a niekoľko málo druhov z rodu *Pythium*, bolo zistené že iné rody z triedy Oomycety nevlastnia gény pre elicitíny ekvivalentných sekvencií. Ďalšie znaky, ktoré robia z proteínu elicitín zo štrukturálneho hľadiska sú:

- veľkosť- 98 aminokyselín vo väčšine prípadoch
- aminokyselinová stavba – vyznačujúca sa nedostatkom tryptofánu, histidínu a arginínu a početnosťou aminokyselín serínu, treonínu, ktoré tvoria asi 30% proteínu, alanínu a leucínu, ktoré tvoria každý asi 10%, výskyt šiestich cystínových zvyškov, lokalizovaných na stálych pozíciách a tri disulfidické mostíky [5].

Podľa izoelektrického bodu (pI) sa elicitíny dajú rozdeliť na kyslé (α , pI<5) alebo bazické (β , pI>7,5). β -elicitíny sú produkované len obmedzeným počtom druhov. Podstatný rozdiel medzi α - a β -elicitínmi je celkový náboj, dôsledok ich rozdielnej stavby, rozdielneho množstva nabitých aminokyselín. Pozitívny náboj v β -elicitínoch spôsobuje 6 lyzínových zvyškov, zatiaľ čo α -elicitíny obsahujú len 2-4 lyzínové zvyšky. Ďalší rozdiel, v β -elicitínoch sú reziduá 13 a 14 polárne aminokyseliny (Lys, Thr), ktoré prerušujú hydrofóbny reťazec, ktorý v α -elicitínoch prerušený nie je [5].

Elicitín kódujúce sekvencie boli podrobne preskúmané a rozdelené do 3 tried.

Trieda 1 obsahuje všetky elicitíny, ktoré majú úplne konzervatívne reziduá 6 Cys, 3 Met, 2 Phe a 3 Gly, reziduá Leu, Ile, Pro a Thr lokalizované na vysoko konzervatívnych pozíciách. Do triedy 1 je zaradená ešte skupina 1' trochu odlišných proteínov od tých v triede 1, prejavujúcich sa novými znakmi ako sú histidínové zvyšky, flexibilnou oblasťou reťazca v pozíciách 98-101 a ďalšími počítačom dedukovanými znakmi, ako sú asparagínové glykozylované miesta [5].

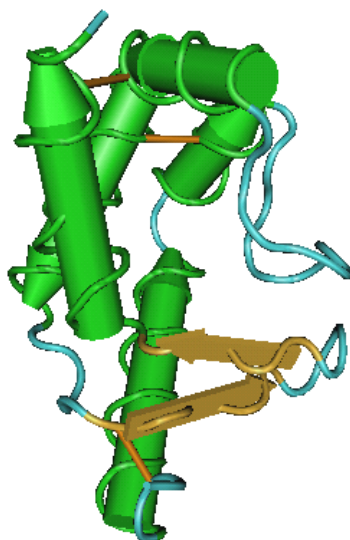
Trieda 2 obsahuje hyperkyslé elicitínové sekvencie, 103-104 aminokyselín dlhé otvorené čítacie rámce z mikroorganizmov *Phytophthora cryptogea* alebo *Phytophthora cinnamomi*, ktoré po prepise odpovedajú vysoko kyslým proteínom s celkovým nábojom od -6 do -10 [5].

Do triedy 3 sa zaraďujú 2 elicitín-kódujúce sekvencie z Oomycety *Phytophthora infestans*, ktoré kódujú 165-170 aminokyselín dlhé peptidy, ktoré sú zložené z konzervatívnej 98 aminokyselín elicitínovej časti, spojenej so ~ 70 aminokyselinovou C-koncovou doménou [5].

3.1.1. 3D- ŠTRUKTÚRA KRYPTOGEÍNU

Kryptogeín je malý hydrofilný holoproteín s molekulovou hmotnosťou 10 kDa, druh β -elicitínu, sekretovaný Oomycetou *Phytophthora cryptogea*.

3D-štruktúra kryptogeínu bola odhalená röntgenovou difrakciou proteínového kryštálu a ^1H NMR proteínového roztoku. Medzi štruktúrami zistenými týmito metódami sú len drobné rozdiely, „kryštálová” štruktúra je ucelenejšia, kdežto „štruktúra z roztoku” zdôrazňuje flexibilitu proteínu.



Obr. 6.: 3-D štruktúra kryptogeínu

Kryptogeín je globulárny proteín, zložený z 98 aminokyselín, obsahuje 5 hélišov, α_1 - α_5 z N-konca k C-koncu v tomto poradí, malý antiparalerný β -skladaný list a Ω -slučku. Tieto štruktúry sú navzájom pospájané disulfidickými mostíkmi a vodíkovými väzbami. Disulfidické mostíky sú 3, boli popísané medzi Cys 3 – Cys 71, Cys 27 – Cys 56, Cys 51 – Cys 95.

Na molekule kryptogeínu možno tvarovo rozlíšiť dve strany, jedna je hladká, tvorí ju α -hélix s polárnymi aminokyselinami obkolesenými roztokom, druhá strana má tvar zobáka, ktorý je zložený z β -štruktúry a z Ω -slučky (obr. 6 a 7). Vo vnútri medzi týmito štruktúrami α , β a Ω -slučkou sa nachádza hydrofóbna dutina, obsahujúca striktne konzervatívne hydrofóbne reziduá (Met, Leu, Ile, Phe, Val, Tyr). Zo štruktúry zisťovanej NMR sa objavilo, že Ω -slučka je flexibilná. Uľahovanie Ω -slučky a β -reťazca zabezpečujú vodíkové väzby a van der Waalsove interakcie.

3.1.2. VZŤAH MEDZI ŠTRUKTÚROU A REAKTIVITOU

Štruktúra elicítínov vykazuje znaky, ktoré pravdepodobne súvisia s ich biologickou aktivitou. Štúdiom konformačných zmien následkom pH a koncentrácie elicítínu sa zistilo, že kryptogeín je schopný dimerizovať. V C-koncových regiónoch (zbytky 92-94) väčšiny silnonekrózových elicítínov boli nájdené proteínkináza C-dependentné fosforylačné miesta, u β -kryptogeínu a β -drechslerínu (z Oomycety *Phytophthora drechsleri*) boli ďalšie takéto miesta lokalizované aj v slučke (reziduá 37-39) [5].

3D-štruktúra kapsiceínu získaná ^1H NMR naznačovala štruktúrnú charakteristiku na C-konci elicítínov podobnú fosfolipáze A_2 . Výzkum kryptogeínu ale ukázal, že kryptogeín nemá žiadnu významnú fosfolipázovú aktivitu, pri inkubácii lipozómov s kryptogeínom nebola pozorovaná žiadna hydrolyza fosfolipidov, ani po 5 hodinách [6]. Pridanie 2 mM Ca^{2+} , ktorý je vyžadovaný pre aktivitu fosfolipázy A_2 , nevedlo k žiadnej zmene výsledkov. Štruktúrna analógia elicítínov s fosfolipázou A_2 neukázala žiadne spojenie s toxicitou kryptogeínu.

3.1.3. ELICITÍNY AKO STEROL CARRIER PROTEÍNY

Steroly stimulujú rast mnohých organizmov podobne ako hormóny. Rast a reprodukcia húb závisí na metabolizme sterolov, zatiaľ čo druhy z rodu *Phytophthora* a *Pythium* nemajú výbavu na syntézu sterolov, preto sú odkázané na ich získavanie z hostiteľských rastlín doteraz nie presne známymi mechanizmami.

Kryptogeín síce nevykazuje žiadnu proteázovú, β -glukanázovú, fosfolipázovú a ani žiadnu inú enzymatickú aktivitu, javí sa však byť rovnaký ako iné sterol carrier proteíny, napriek rozličnej primárnej štruktúre [7]. Testovanie jeho možnej sterol transférovej aktivity sa robilo fluorescenčnými meraniami s použitím fluorescenčného sterolu $\Delta^{5,7,9(11)22}$ -ergostatetraen-3 β -ol dehydroergosterolu (DHE), ktorý sa pred tým používal k štúdiu interakcií medzi sterolmi a membránovými makromolekulami. Merala sa intenzita fluorescencie po pridaní kryptogeínu k DHE v meracom pufri [7,8].

Pridanie kryptogeínu, ale aj iných elicítínov, k DHE spôsobilo značný nárast emisného maxima pri $\lambda = 370$ nm [7,8]. Tvar emisných fluorescenčných spektier pre všetky komplexy elicítín-DHE bol podobný. Interakcie boli časovo závislé. DHE interaguje s hydrofóbnou časťou týchto proteínov. Nárast intenzity fluorescencie a zmena tvaru emisného spektra po naviazaní DHE k hydrofóbnej časti elicítínov, môže byť dôsledok separácie DHE molekúl, ktoré boli koncentrované do micel, v ktorých dochádza k rozptylu energie a zhasínaniu fluorescencie.

Všetky študované elicítiny vykazujú rovnakú stechiometriu viazania, jedna molekula sterolu na jednu molekulu elicítinu, a disociačné konštanty komplexov sú v rozmedzí 0,11-0,58 μM . Stechiometria komplexu sterol-elicítín bola potvrdená izolovaním komplexu chromatograficky [8].

Výsledky pokusov ukazujú, že elicítiny majú podobnú afinitu a množstvo väzbových miest pre DHE ako sterol carrier proteíny z cicavcov ako sú SCP, SCP2 a proteín viažúci masťné kyseliny, všetky z pečene potkana [8].

Kinetika vzniku komplexu DHE-elicítín pri fyziologických podmienkach (pH 5,5-7,0) preukázala, že interakcie elicítinov so sterolmi nie sú závislé na pH, zato pri pH medzi 4,5 a 5,5 sa kinetiky bazického kryptogeínu i kyslého parasiticeínu menili [8]. Dôvodom boli konformačné modifikácie proteínov.

Elicítiny sú schopné viazať fytosteroly [8]. K štúdiu tejto schopnosti bol použitý 2-p-toluidínnaftalén-6-sulfonát (TNS), fluorescencia väzby TNS-kryptogeín. TNS interaguje nešpecificky s veľkým množstvom proteínov a biologických membrán a používa sa k sledovaniu konformačných zmien proteínov. Po pridaní sterolov ku komplexu TNS-kryptogeín došlo k poklesu TNS fluorescencie, čo bolo zapríčinené pravdepodobne vytlačením TNS fytosterolmi, ktoré majú nižšie disociačné konštanty. Všetky steroly sa viažu na kryptogeín s rovnakou afinitou, vykazujú však jedinečné kinetiky tohto procesu.

Elicítiny katalyzujú prenos sterolov medzi lipozómami, malými unilamelárnymi veziklami (SUV) [7,8]. Donorové lipozómy (SUV) obsahujú fosfatidylcholín, fosfatidylserín a DHE, akceptorové lipozómy (SUV) fosfatidylcholín, fosfatidylserín a cholesterol. Fluorescenčno-polarizačné experimenty ukazujú, že pridanie elicítinov stimuluje nárast fluorescenčnej polarizácie DHE v zmesi donor-akceptor SUV. Táto zmena bola spôsobená prenosom sterolov medzi donorovým a akceptorovým SUV. Z elicítinov kryptogeín a cactoreín viac ako ostatné stimulujú sterolový prenos, hoci parametre väzby sú rovnaké pre všetky elicítiny.

Elicítiny sú sterol viažuce i prenášajúce proteíny. Účinnejšiu transférovú aktivitu má bazický proteín z rodiny elicítinov [8]. Najúčinnější sterol prenášajúci elicítín je kryptogeín, menšiu účinnosť vykazujú parasiticeín (z Oomycety *Phytophthora parasitica*) a kapsiceín, naviac kryptogeín indukuje intenzívnejšie odpovede rastlinných buniek, čo naznačuje prepojenie funkcií elicítinov ako elicitory a ich vlastností ako sterol carrier proteíny.

3.1.4. MUTANTNÉ PROTEÍNY ODVODENÉ OD KRYPTOGEÍNU (MPOC)

Biologická aktivita elicítinov pravdepodobne závisí od ich schopnosti naviazať steroly. Elicitíny sa viažu na vysokoafinitné proteíny v cytoplazmatickej membráne, ktoré sú ich biologickými receptormi. Pri spúšťaní obranných reakcií je predpokladaným prvým bodom v rámci interakcií elicítín-rastlinná bunka formovanie komplexu elicítín-sterol.

K sledovaniu zmien vlastností a biologickej aktivity elicítinov je možné použiť mutantné proteíny odvodené od jednotlivých elicítinov pripravené riadenou mutagénou a heterológnu expresiou génov pre ne.

V našom laboratóriu sa používajú MPOC (tab.1), ktoré majú zamenené aminokyselinové zbytky v mieste určenom pre väzbu sterolu (obr. 7) a elicítín X24 získaný heterológnu expresiou génu pre kryptogéin v kvasinke *Pichia pastoris*, v ktorom nebola prevedená žiadna mutácia. X24 sa líši od kryptogéinu izolovaného priamo z patogéna *Phytophthora cryptogea* o sekvenciu EAEA na N-konci molekuly. Táto sekvencia má signálnu funkciu a pri sekcii proteínu sa neodštiepila.

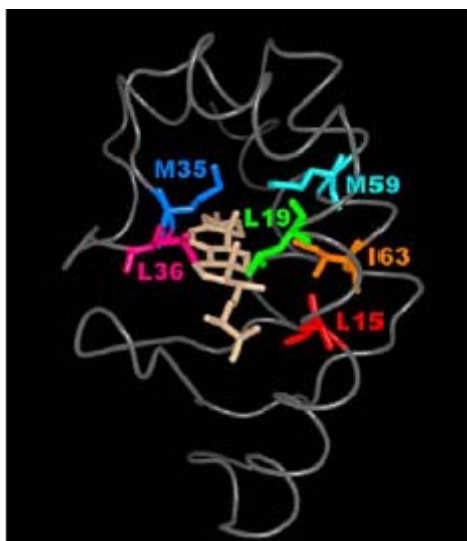
V rekombinantných proteínoch dochádza vďaka mutáciám k modifikáciám, ktoré ovplyvňujú ich správanie. Substitúcia L15 za tryptofán zabraňuje rotácii po naviazaní DHE, mutácia zbytku L19 zmení elektrostatiku a môže ovplyvniť kinetiku viazania pre ligandy s veľkým dipólovým momentom, substitúcia L19 za arginín spôsobí nárast pI proteínu [9].

Tab. 1.: Biologická účinnosť kryptogéinu a MPOC vyvolania tvorby AOS a zmien pH v priebehu obrannej reakcie a schopnosť tvorby väzby s DHE, ako zástupcom sterolov, a s kyselinou cis-parinarovou (CPA), ako zástupcom mastných kyselín. + sila pozitívneho efektu [9].

označenie MPOC	mutácia	DHE	CPA	syntéza AOS	zmien pH
kryptogéin	bez mutácie	viaže sa	viaže sa	+++	+++
8/11	M35W/M59W	neviaže sa	viaže sa	+	++
5/6	L15W/L36F	neviaže sa	neviaže sa	+	++
L19R	L19R	neviaže sa	viaže sa	bez efektu	bez efektu
7/11	M35F/M59W	viaže sa	viaže sa	+++	+++
8/11/3	M35W/M59W/I63F	viaže sa	viaže sa	++	+++

U MPOC sa testovali ich schopnosti naviazania sterolov, mastných kyselín, naviazania sa na väzbové miesta na cytoplazmatickej membráne a spustenia biologických odpovedí. Zistilo sa, že MPOC vykazujú rôznu účinnosť spustenia tvorby AOS a zmien pH (tab.1), tieto odlišnosti sú spojené s rozdielnou schopnosťou viazania

sterolov, a nie mastných kyselín. V prípade mutácií L15W/L36F a M35W/M59W však toto tvrdenie neplatí, keďže tieto mutanty nie sú schopné vytvoriť komplex so sterolom, ale spúšťajú obranné reakcie v rastlinách. Objemné reziduá W35 a F36 spôsobujú konformačné zmeny Ω -slučky oproti štruktúre nezmutovaného kryptogéinu, ktoré sa veľmi podobajú tým, ku ktorým dôjde dôsledkom naviazania sterolov. Preto tvrdenie treba pozmeniť: Konformácia Ω -slučky vyvolaná naviazaním sterolu alebo prítomnosťou objemných zbytkov je pravdepodobne nutná pre schopnosť naštartovania odpovedí rannej fázy obrannej reakcie spôsobených kryptogéinom [9].



Obr. 7.: 3D-model kryptogéinu s ergosterolom (hnedý), naviazaným v hydrofóbnej dutine. Model znázorňuje pozíciu aminokyselinových zbytkov, ktoré ovplyvňujú naviazanie lipidov a biologické efekty kryptogéinu [9].

Mutantné proteíny M35F/M59W, M35W/M59W/I63F, M35W/M59W, L19R, L15W/L36F stimulujú nekrózu a majú schopnosť vyvolať expresiu obranných proteínov ako odpoveď na ich pôsobenie [9].

Mutácie neovplyvňujú schopnosť elicítinov nasýtiť vysokoafinitné väzbové miesta, ale interakcia rozličných MPOC je odlišná.

3.2. VYBRANÉ FYZIOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ EFEKTY ELICÍTINOV VYVOLANÉ V RASTLINÁCH

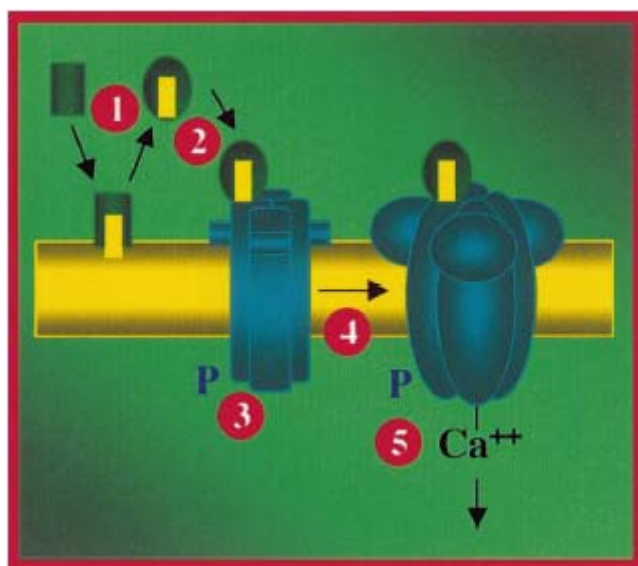
Elicitíny sú zaujímavé hlavne z hľadiska ich biochemických a biologických funkcií. V našom laboratóriu sa zaoberáme štúdiom priebehu obranných reakcií rastlín

proti patogénom, konkrétne študujeme patosystém *Nicotiana tabacum* a *Phytophthora cryptogea*. Interakcia medzi patogénom *Phytophthora cryptogea* a tabakom štartuje obrannú reakciu, charakterizovanú PCD rastlinného pletiva v mieste napadnutia a obmedzením rastu patogéna.

Kryptogeín sa javí ako špecifický elicítin pre vyvolanie PCD, ktorého aktivita je obmedzená na rod *Nicotiana* a niektoré druhy z čeľade *Brassicaceae*. Výsledky naznačujú striktnú špecifitu elicítinov, ktorá môže súvisieť s rozpoznávaním elicítinov a rastlinných buniek navzájom.

3.2.1. RANNÁ FÁZA OBRANNEJ REAKCIE VYVOLANEJ KRYPTOGEÍNOM

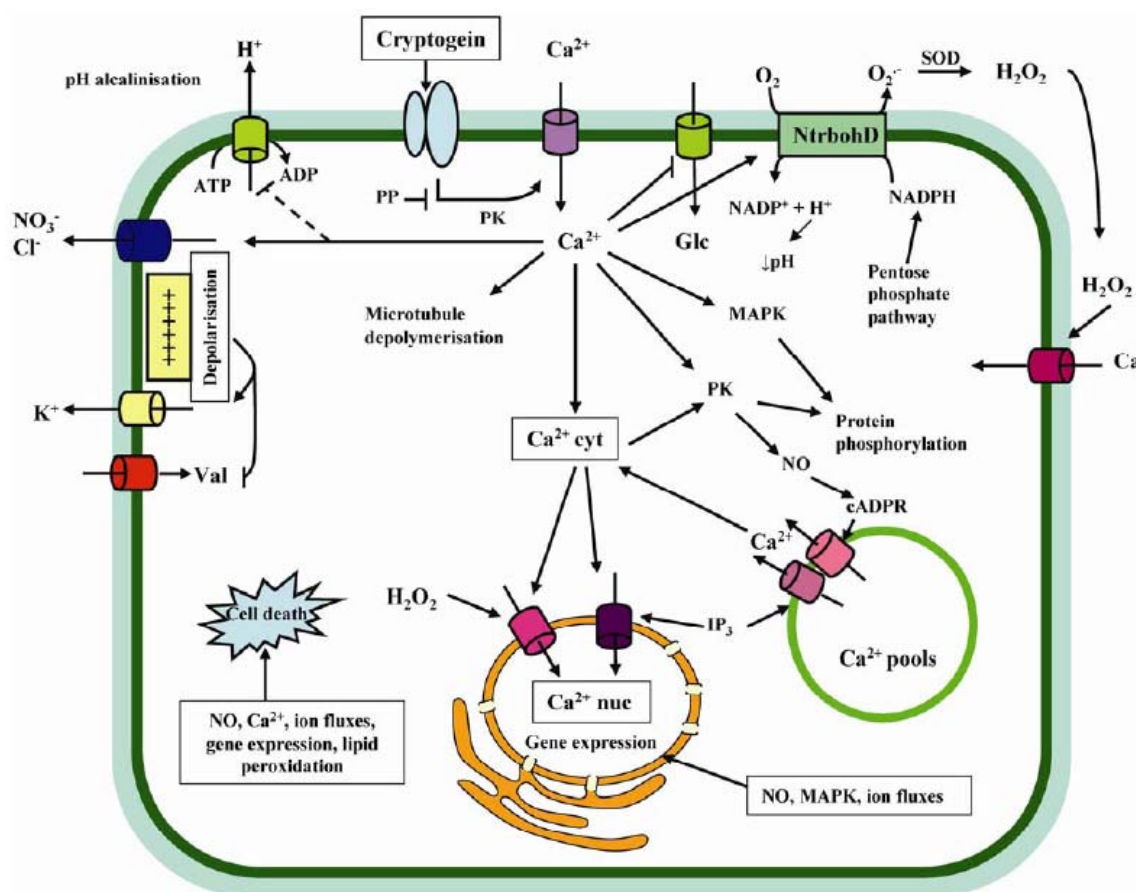
Po pridaní kryptogeínu do suspenzie buniek dôjde k naviazaniu tohto elicítinu na bunkové receptory (obr. 8), za ktoré sú považované vysokoafinitné glykoproteíny [10]. Jedná sa pravdepodobne o 50-kDa *N*-glykoproteín spojený so 162-kDa plazmalemovým *N*-glykoproteínom, ktorý je pravdepodobne zodpovedný za rozpoznávanie kryptogeínu.



Obr. 8.: Prvé kroky v prenášaní elicítinového signálu. Receptor elicítinov je lokalizovaný na rastlinných cytoplazmatických membránach, odhaduje sa, že to je vápenatý kanál, skladajúci sa zo 4 podjednotiek (162-kDa a 50-kDa proteín). Prvá interakcia elicítín-kanál potrebuje elicítín naviazaný so sterolmi z plazmatickej membrány k spusteniu konformačnej zmeny kanála, pravdepodobne spojennej s fosforyláciou podjednotky viažúcej sa k elicítinu. Táto konformačná modifikácia dovoľuje naviazanie ďalších molekúl elicítinu (naviazaných i naviazaných so sterolmi) k receptoru. Biologické odpovede spúšťajú len elicítiny naviazané so sterolmi [5].

Krok rozpoznania kryptogeínu receptorom je nasledovaný aktiváciou proteínkináz alebo inhibíciou proteínfosfatáz [11] (obr 9). Počas rannej fázy obrannej reakcie dochádza k prieniku Ca^{2+} iónov do rastlinnej bunky pomocou Ca^{2+} kanálov a následne k zvýšeniu koncentrácie Ca^{2+} v cytozole. V čase kľudu je v rastlinných i živočíšnych bunkách cytozolová koncentrácia Ca^{2+} nízka, menej než 200 nM, a je kontrolovaná pomocou koordinácie pasívnych tokov a aktívneho transportu cez plazmalemu a organelové membrány, napríklad tonoplast.

Ca^{2+} ióny majú počas pôsobenia na tabakové bunky elicitínni dve úlohy, sú dôležitým druhým poslom so slabým a prechodným vzrastom koncentrácie vo vnútri bunky, okrem toho sa zabudovávajú do gelu, pektátu vápenatého, čo spôsobuje posilnenie bunkových stien.



Obr. 9.: Schéma kryptogeínom vyvolanej signálnej transdukcie [12].

Vstup Ca^{2+} iónov je esenciálny pre spustenie ďalších kryptogeínom vyvolaných odpovedí. Vtok Ca^{2+} iónov ovplyvňuje ďalšie iónové toky. Je pozorovaný výtok K^+ iónov (kapitola 3.2.2.), ktorý je pravdepodobne spojený s vtokom protónov, a výtok

Cl⁻ iónov. To štartuje rozsiahlu depolarizáciu plazmatickej membrány, ktorá sa udeje za menej ako jednu minútu po lag perióde asi 5 minút [13]. Inou z príčin depolarizácie môže byť kryptogeínom indukovaná inhibícia plazmalemovej H⁺-ATPázy. Po pár minútach pôsobenia kryptogeínu je vyvolaná silná alkalizácia extracelulárneho média resp. intracelulárna acidifikácia.

Zvýšená koncentrácia Ca²⁺ aktivuje ďalšie zložky signálnej kaskády vedúcej k vzniku obrannej reakcie. Medzi tieto zložky patria napríklad MAP kinázy (mitogen-activated protein kinase) [14] a Ca²⁺-dependentné proteínkinázy, predovšetkým proteínkináza C [15].

Vtok extracelulárnych Ca²⁺ iónov spôsobuje aj aktiváciu NADPH oxidázy viazanej na cytoplazmatickú membránu, ktorá je regulovaná malým G proteínom ako napríklad Rac2, ale odlišným spôsobom ako je regulované oxidačné vzplanutie u neutrofilov. NADPH oxidáza katalyzuje tvorbu O₂⁻, ktoré dizmutujú na H₂O₂ hlavne pri nízkom pH alebo reakciou katalyzovanou superoxiddizmutázou. H₂O₂ indukuje následný ďalší vtok extracelulárnych Ca²⁺ iónov a nárast koncentrácie Ca²⁺ v cytozole [16,17]. Zvýšenie cytozolovej koncentrácie Ca²⁺ je aj následkom uvoľňovania Ca²⁺ iónov z vnútorných zásob Ca²⁺ cez IP₃- a c-ADPR- regulované Ca²⁺-kanály (kapitola 3.2.3.-účinky NO).

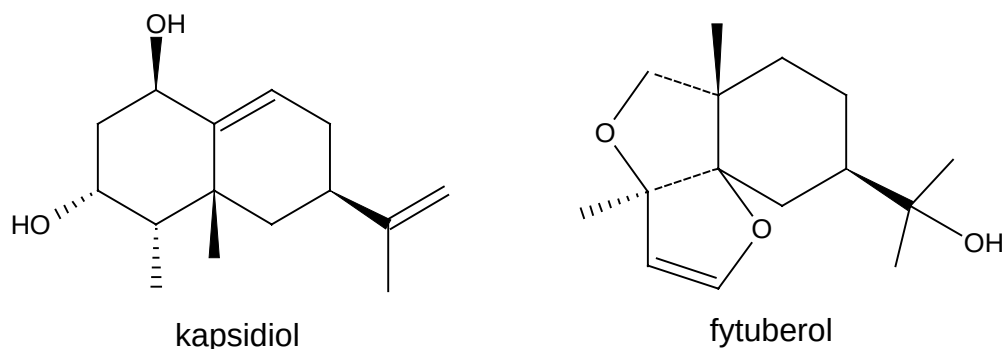
Boli identifikované ďalšie zdroje AOS počas obrannej reakcie: peroxidázy viazané na bunkovú stenu a aminooxidázy v apoplaste [18]. Produkcia AOS vyvolaná kryptogeínom bola detekovaná po 20 minútach, maximum dosiahla po 30 minútach a vrátila sa na kontrolnú úroveň po 90 minútach po pridaní tohto elicitínu [19]. Intenzita tvorby AOS je závislá na dávkach elicitínu a odpovede boli pozorované po lag fáze, ktorej dĺžka bola nepriamo úmerná koncentrácii kryptogeínu [20]. Zistilo sa, že kapsiceín (druh α -elicitínu pochádzajúci z Oomycety *Phytophthora capsici*) treba pridať v 10-krát vyššej koncentrácii ako kryptogeín, k vyvolaniu tvorby rovnakých množstiev AOS [21].

AOS sú čiastočne redukované formy atmosferického O₂, sú schopné neobmedzene oxidovať rôzne bunkové komponenty, čo môže viesť k oxidačnej deštrukcii bunky. AOS sa tvoria nevyhnutne počas bunkového metabolizmu a sú za normálnych okolností ďalej spracovávané superoxiddizmutázou, katalázou a askorbátperoxidázou na neškodné zlúčeniny. AOS zohrávajú dôležitú úlohu v obrane rastlín proti útokom patogénom.

Počas rannej fázy obrannej reakcie dochádza ku generovaniu okrem AOS ďalšej signálnej molekuly a to NO (kapitola 3.2.3. – tvorba NO).

Tieto všetky odpovede je možné sledovať v prvej hodine po pridaní kryptogeínu.

Neskorými bunkovými odpoveďami sú napríklad tvorba etylénu - 120 minút po pridaní elicitínu, zmeny v zastúpení lipidov a zmeny v génovej expresii. 24 až 48 hodín od začiatku pôsobenia kryptogeínu dôjde k indukcii lipoxxygenázy, aktivity proteinázových inhibítorov a k akumulácii fytoalexínov (kapsidiol, fytuberin, fytuberol, obr. 10).



Obr. 10.: Fytoalexíny

Pospájaním výsledkov všetkých experimentov sa predpokladá, že elicitíny môžu stimulovať dve signálne dráhy. Prvou sa indukujú nekrózy a expresia PR proteínov, zahŕňa tyrozínproteínkinázy a MAP kinázy a závisí na celkovej štruktúre proteínov a distribúcii náboja. Druhý typ interakcie je sprostredkovaný fosfolipázou C a fosfokinázou C, zahŕňa Ca²⁺ kanály a Ser/Thr proteínkinázy, spúšťa syntézu AOS a zmeny v pH a závisí na schopnosti elicitínov viazať steroly. Tieto dve signálne dráhy môžu, ale nemusia byť prepojené.

3.2.2. TOK DRASELNÝCH IÓNOV A JEHO ZMENY PO ELICITÁCII

Draselné ióny sú najviac zastúpené katióny v rastlinných bunkách, ich cytoplazmatická koncentrácia je regulovaná a nadobúda hodnoty 80-200 mM. Zastávajú rozhodujúcu funkciu v prežití a vývoji rastlinných buniek, regulácii enzýmovej aktivity a membránového potenciálu, podľa ktorého sú riadené ďalšie dôležité fyziologické procesy ako sú úpravy turgoru, predlžovací rast buniek, pohyby prieduchov a listov i bunková homeostáza. K⁺ sa podieľajú na aktivácii viac ako 50 rastlinných enzýmov a spolupracujú v mnohých metabolických procesoch: fotosyntéze, oxidačnom metabolizme a syntéze proteínov.

Väčšina K^+ iónov je lokalizovaná v centrálnej vakuole rastlinných buniek, kde zohrávajú funkciu osmotika. Použitie K^+ iónov ako osmotikum nie je nevyhnutné, pri malej zásobe K^+ iónov, ich vie rastlina nahradiť inými osmoticky aktívnymi látkami. K^+ ióny sa javia byť esenciálne vo funkcii aktivátorov biochemických procesov v cytozole, obzvlášť proteosyntézy [22].

Koncentrácia K^+ iónov je kontrolovaná, aj keď ich maximálne koncentrácie predstavujú rozdielne hodnoty v rôznych rastlinách, dokonca i pre korene a stonky v tej istej rastline. Platí, že vakuolárna koncentrácia K^+ iónov je oveľa viac citlivá na zmeny v zásobe K^+ ako cytozolická, čo odráža rozdielne transportné aktivity na cytoplazmatickej membráne a tonoplaste.

Príjem aj výdaj K^+ do/z buniek je výsledkom činnosti aktívnych a pasívnych spôsobov transportu. Aktívny transport K^+ sa uskutočňuje tzv. HKT transportérmi (high affinity K^+ transporter) a HAK/KUP/KT transportérmi. Okrem prenášačov zohrávajú v transporte úlohu draselné kanály ako príklady pasívneho druhu transportu K^+ iónov. V rastlinách sú známe K^+ kanály *Shaker*-typu a KCO kanály.

Počas obrannej reakcie dochádza k výtoku K^+ iónov von z buniek, jedná sa pravdepodobne o antiport K^+/H^+ . Zmena koncentrácie K^+ v extracelulárnom prostredí dosiahne maximum po 30-40 minútach a trvá niekoľko hodín.

HKT transportéry

Rastlinné HKT transportéry sú príbuzné s hubovými Trk transportérmi a KtrB a TrkH podjednotkami prenášačov K^+ iónov u prokaryot [23]. Jedna predstava je, že sa jedná o kotransportéry K^+ iónov s H^+ alebo Na^+ iónmi alebo o $K^+:K^+$ kotransportné systémy, v závislosti na transportných a pravdepodobne aj iónových podmienkach. Druhá predstava je, že HKT pravdepodobne fungujú ako $Na^+:K^+$ alebo $Na^+:Na^+$ symport závislý na externej koncentrácii Na^+ iónov. Prevažne sa pomocou nich uskutočňuje aktívny transport K^+ do intracelulárneho priestoru buniek.

HKT transportéry sú asi prítomné vo všetkých rastlinných druhoch, ale skôr nie ako rozsiahle rodiny, v *Arabidopsis thaliana* je len jeden. Vie sa, že HKT1 je exprimovaný v koreňovom kortexe a v mezofylných bunkách hraničiacich s vaskulárnym pletivom v listoch. Bunky susediace so xylómom, nazývané xylémové kontaktné bunky, majú špecializované funkcie, v týchto bunkách môžu byť HKT1 zahrnuté v kontrolovaní doručovania látok rozpustených v roztoku do mezofylu

a epidermálnych buniek [24]. Expresia HKT1 je regulovaná na základe dostatku/nedostatku K^+ .

Sekvenčné analýzy viedli k hypotéze, že sa tieto prenášače vyvinuli z bakteriálnych kanálov pre K^+ s dvoma transmembránovými doménami. HKT sú zložené z 8 transmembránových domén a 4 pórformujúcich domén (P) (obr. 11), vzájomne sú poskladané tak, že tvoria 4 za sebou nasledujúce tzv. MPM motívy (transmembránový helix – pór – transmembránový helix). Existujú dôkazy pre tento model s 8 transmembránovými segmentami a N- a C-terminálnymi regiónmi [23].

Vo všetkých doménach P K^+ -permeabilných HKT/Trk/KtrB transportérov sa vyskytuje vysoko konzervovaný glycinový zvyšok, v AtHKT1 a OsHKT1 je vymenený za serínový v prvej doméne P, a tieto transportéry sú veľmi slabo permeabilné voči K^+ .

V HKT1 sa za oblasť dôležitú pre selektivitu považuje 16 aminokyselinových zvyškov v slučke na C-terminálnom konci proteínu, vo štvrtom tzv. MPM motíve, v helikálnej časti, vytvárajúcej pór [24].

Existuje návrh-model, že HKT1 má 2 nezávislé miesta pre ióny, ale nevie sa lokalizácia tých miest a ako by mohol byť spojený transport medzi týmito „nezávislými“ miestami [24]. Podľa tohto modelu sa jedno miesto vyznačuje vysokou afinitou pre viazanie K^+ a druhé Na^+ ióny. Miesto pre Na^+ je pravdepodobne zahrnuté v aktivácii transportu, ukázalo sa, že je vysokošpecifické pre Na^+ a nedochádza k väzbe s ďalšími iónmi alkalických kovov ako Rb^+ , Li^+ alebo Cs^+ . Druhé miesto je selektívne pre K^+ , ale je možné aby sa tam viazali Na^+ ako i iné ióny alkalických kovov, ale s inými afinitami. HKT1 je schopné fungovať i ako Na^+ transportér, keď sú v roztoku len Na^+ ióny. Interakcie medzi iónmi a väzbovými miestami závisia na pomere a koncentráciách K^+ a Na^+ v roztoku.

HAK/KUP/KT transportéry

Rastlinné transportéry nazývané KUP, HAK alebo KT vytvárajú rozsiahlu rodinu s 13 členmi u *Arabidopsis* a najmenej 17 členmi u ryži. Tak ako i HKT táto rodina bola nájdená v baktériach a hubách, ale v týchto organizmoch nie sú až tak rozšírené ako homológy HKT. KUP/HAK gény sú exprimované najviac v rastlinných pletivách, to naznačuje, že tieto transportéry sú zásadné pre výživu rastlín.

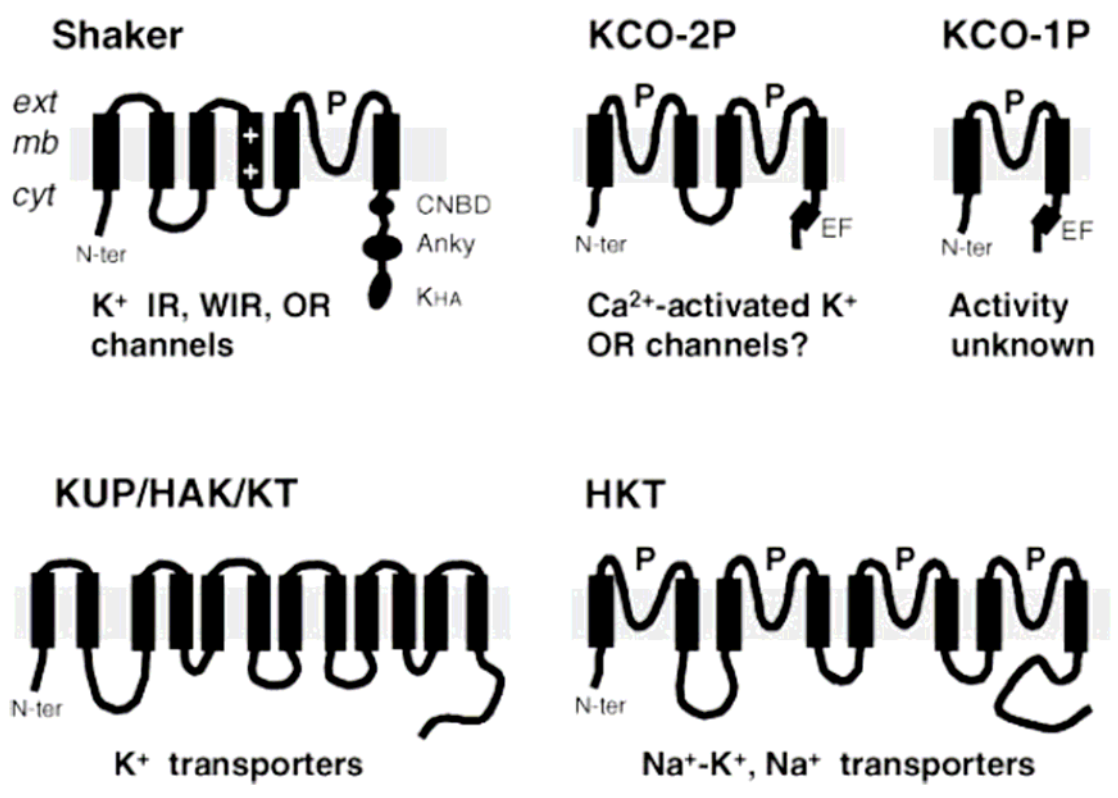
Obsahujú 12 transmembránových domén, dlhú cytozolickú slučku medzi druhým a tretím transmembránovým úsekom a dlhú cytozolickú C-terminálnu doménu (obr. 11).

Zatiaľ nebol ešte žiadny región identifikovaný, ktorý by mal zodpovednosť za iónovú špecifitu.

KT/HAK/KUP transportéry rastlinnej ríše vytvárajú 4 skupiny na fylogenetickom strome [25]. Reprezentanti skupiny 1 sú HvHAK1 z jačmeňa a AtHAK5 z *Arabidopsis*, ktoré boli charakterizované počas expsie v kvasinkách ako vysokoafinitné transportéry pre K^+ . Gén pre HvHAK1 je exprimovaný hlavne v koreňoch, jeho expresia je zvyšovaná K^+ -hladovaním. Tento prenášač má vysokú afinitu pre Rb^+ , Na^+ inhibujú príjem Rb^+ a môžu byť tiež prenášané pomocou HvHAK1.

KT/HAK/KUP sú pravdepodobne K^+H^+ symportéry. Niektoré tieto systémy sa správajú ako vysokoafinitné, iné ako nízkoafinitné. HvHAK2 je nízkoafinitný transportér pre K^+ , veľmi citlivý na fyziologické koncentrácie Na^+ . AtKUP1 je transportér s duálnou afinitou pre K^+ : 22 až 44 μM a 11mM [24]. KT/HAK/KUP rozlišujú chabo medzi K^+ , Rb^+ a Cs^+ , ale sú oveľa menej permeabilné pre Na^+ a NH_4^+ . Súčasné štúdie poukazujú na to, že tieto systémy môžu sprostredkovať vtok i výtok K^+ [23].

Expresia oboch vysoko i nízko afinitných KUP/HAK/KT transportérov bola nájdená v rozličných rastlinných pletivách, ale ich subcelulárna lokalizácia je väčšinou neznáma.



Obr. 11.: Transportéry a kanály pre K^+ [23].

Shaker-typ K^+ kanálov

K^+ kanály *Shaker*-typu sú exprimované *in vivo* v cytoplazmatickej membráne, patria medzi kanály regulované potenciálom. Podľa toho pri akej hodnote potenciálu na cytoplazmatickej membráne dochádza k ich aktivácii a podľa ich funkcie, sa delia do troch skupín: hyperpolarizáciou aktivované inward-rectifying K^+ kanály, ktoré typicky sprostredkujú príjem K^+ , depolarizáciou aktivované outward-rectifying K^+ kanály sprostredkujúce výtok K^+ , a weakly-rectifying K^+ kanály sprostredkujúce oboje príjem i výdaj v závislosti na elektrochemických gradientoch K^+ .

Tieto kanály sa zaraďujú medzi nízkoafinitné transportné systémy. Zúčastňujú sa na transporte K^+ vo veľkom množstve typov buniek pri milimolárnych koncentráciach týchto iónov v bunkách alebo prostredí. Rastlinné K^+ kanály *Shaker*-typu vykazujú vysokú sekvenčnú homológiu so živočíšnymi K^+ kanálmi *Shaker*-typu, obzvlášť s kanálmi patriacimi do *ether* a *gogo* superrodiny [26].

K^+ kanály *Shaker*-typu sú zložené z viacerých podjednotiek, všetky podjednotky majú 6 transmembránových segmentov (S1-S6) (obr. 11). Funkčné kanály zahŕňajú 4 podjednotky, poskladané tak, že v strede medzi nimi je vytvorený centrálny iónovo vodivý pór. Každá z podjednotiek je charakterizovaná vnútorným senzorom napätia zloženým primárne z nabitých aminokyselinových reziduí v S2, S3 a S4 segmentoch proteínu. Okrem transmembránových domén K^+ kanály *Shaker*-typu obsahujú pórový segment (P), ktorý spája segmenty S5 a S6 (obr. 11), tvorí povrchovú časť iónovo vodivého póru a udeľuje kanálu selektívne vlastnosti. Sekvencia P domény zahŕňa TxxTxGYGD motív. Tento motív je charakteristickým znakom rastlinných i živočíšnych K^+ -selektívnych kanálov a je dobre konzervovaný v sekvenciách rastlinných K^+ kanálov *Shaker*-typu. P segment je prítomný i v Ktr/Trk/HKT transportéroch. Štyri pórové segmenty (zo 4 podjednotiek) funkčného kanálu sú usporiadané v štvornásobnej symetrii, vyčnievajú z extracelulárnej strany smerom k membránovému interiéru.

K^+ kanály *Shaker*-typu majú ďalej vo svojej štruktúre na C-terminálnom konci proteínu doménu viažúcu cyklický nukleotid (cNBD), ankyrínovú doménu a K_{HA} oblasť (obr. 11). Ankyrínová doména nemusí byť zahrnutá vo všetkých K^+ kanáloch *Shaker*-typu, typicky zahŕňa 5-6 ankyrínových repetícií a predpokladá sa, že jej funkciou je ulahčenie viazania kanálov na cytoskelet alebo proteín-proteín interakcií alebo modulácie cytozolickými faktormi. K_{HA} región, bohatý na hydrofóbne a kyslé aminokyselinové zbytky, je spolu s cNBD a ankyrínovou doménou pravdepodobne

zahrnutý v procese podjednotkovej tetramerizácie a zhlukovania kanálov v membráne [23].

Masový transport na dlhé vzdialenosti, ktorý je zahrnutý v K^+ -výžive rastlín, regulácii bunkového stavu K^+ a osmotického potenciálu je pravdepodobne sprostredkovaný práve K^+ kanálmi *Shaker*-typu.

Podľa analýzy génov rastlinných K^+ kanálov *Shaker*-typu môžu byť tieto kanály klasifikované do 5 skupín-subrodín AKT1, KAT1, AKT2, AtKC1 a SKOR (zoraďené podľa poradia skupín) podľa sekvenčných podobností a bežných funkčných vlastností. Subrodiny AKT1 a KAT1 sú inward-rectifying kanálmi, AKT2 weakly-rectifying kanálmi, SKOR outward-rectifying kanálmi a AtKC1 nemá jednoznačné určenie. Niektoré z týchto kanálov sú prítomné len v určitých špecifických pletivách, všeobecne kanály skupiny 2 sa nachádzajú v listoch, hlavne v bunkách prieduchov, kanály skupiny 1 a 4 sú vo väčšine prípadov prítomné v koreňoch, kanály 3. skupiny sú širokorozšírené, ale najviac exprimované sú vo floéme a kanály skupiny 5 sa nachádzajú v koreňoch, prieduchoch a floéme.

Kanály AKT1, AtKC1 a ďalší členovia skupiny 1 a 4 sú najviac exprimované v koreňoch rastlín, kde zohrávajú dôležitú úlohu v príjme K^+ z pôdneho roztoku. AKT1 a AtKC1 sú exprimované aj v prieduchoch a nádorovom pletive [26] a ďalší kanál z tejto subrodiny nazývaný SPIK je zahrnutý v príjme K^+ v peľových zrnkách a je požadovaný pre optimálny vývoj peľového vaku a kompetitívnej schopnosti peľu [23]. Tieto kanály sa zaraďujú medzi nízkoafinitné transportné systémy, ale podarilo sa demonštrovať zahrnutie K^+ -kanálov aj vo vysokoafinitnom transporte K^+ v koreňoch pri 1-200 μM koncentrácii K^+ . Vo vysoko hyperpolarizovaných bunkách môže byť príjem K^+ sprostredkovaný pasívnym transportérom-kanálom AKT1, ktorý je schopný sprostredkovať akumuláciu K^+ v rastlinných bunkách pri nízkej externej koncentrácii K^+ 10 μM [26].

Skupina 2, do ktorej patria kanály napr. KAT1 a KAT2, je exprimovaná hlavne v prieduchoch. Kanály tejto skupiny sa zúčastňujú kontroly pohybov prieduchov spolu s kanálom GORK patriacim do subrodiny SKOR (5. skupina).

GORK sa javí byť jediným outward-rectifying kanálom zodpovedným za výtok K^+ z prieduchov v *Arabidopsis thaliana* [26]. Bolo demonštrované, že GORK je prítomný aj v bunkách koreňových vláskov, kde asi slúži ako senzor pre K^+ a kooperuje v regulácii membránového potenciálu koreňových vláskov. SKOR je špecificky

a prevažne exprimovaný v strednom valci v koreni a sprostredkováva transport K^+ do xylému.

AKT2 sa predpokladá, že zodpovedá za transport K^+ do floému a za udržovanie membránového potenciálu vo floéme, ktorý ovplyvňuje reguláciu príjmu a výdaja sacharózy z/do floému. Okrem toho AKT2 je pravdepodobne zodpovedný aj za permeabilitu mezofilných buniek pre K^+ v *Arabidopsis* a za citlivosť buniek prieduchov na Ca^{2+} .

H^+ , Cs^+ , Ca^{2+} a Ba^{2+} sa správajú ako modulátory K^+ kanálov *Shaker*-typu.

KCO kanály

KCO kanály patria medzi outward-rectifying K^+ kanály. Vykazujú hydrofóbne jadro zložené buď zo 4 transmembránových domén a 2 pórových (P) domén = KCO-2P rodina alebo z 2 transmembránových domén a 1 P domény = KCO-1P rodina. Nevlastnia v štruktúre žiadne transmembránové segmenty, od ktorých by sa očakávalo, že sa budú správať ako napäťové senzory. Ich pórová doména nesie vysoko konzervovaný charakteristický motív TXGYGD, značiaci permeabilitu pre K^+ .

Väčšina z KCO kanálov má v cytozolicom C-terminálnom regióne 1 alebo 2 „EF hand“ motívy, čo je unikátna štruktúrna vlastnosť tohto typu kanálu v porovnaní s ostatnými kanálmi pre K^+ v rastlinách. EF časť zastáva pravdepodobne dôležitú úlohu v regulácii kanálovej aktivity pri odpovedi na Ca^{2+} .

V *Arabidopsis* je známych 5 členov z KCO-2P rodiny a 1 člen z KCO-1P rodiny [23]. Do dnes bol charakterizovaný len kanál KCO1, patriaci do KCO-2P rodiny. KCO1 bol úspešne exprimovaný v hmyzích bunkách, kde kóduje outward-rectifying kanál selektívny pre K^+ aktivovaný cytozolickými Ca^{2+} iónmi. KCO1 sa dá funkčne odlíšiť od outward-rectifying K^+ kanálov *Shaker*-typu tým, že sú u neho pozorované rýchlejšie a nesigmoidálne kinetiky prúdovej aktivácie a vyššia kanálová vodivosť [23].

Na subcelulárnej úrovni sú KCO kanály lokalizované v tonoplaste. Unikátnou vlastnosťou týchto outward-rectifying kanálov je ich schopnosť reagovať na extracelulárne koncentrácie K^+ iónov [24].

3.2.3. TVORBA OXIDU DUSNATÉHO, JEHO VLASTNOSTI A ÚČINKY

Oxid dusnatý je plynňý voľne difundujúci radikál, ktorý sa vytvára v rastline konštitutívne za normálnych fyziologických podmienok v určitej nízkej koncentrácii. Jeho produkcia sa zvýši počas niektorých stresových situácií. Zvyšovanie koncentrácie

NO bolo pozorovanou odpoveďou na rôzne abiotické stresory ako vysoká teplota, osmotický stres a UV-b žiarenie a ako sa mení koncentrácia NO po navodení biotického stresu je stredobodom záujmu výzkumov v tejto oblasti.

Produkcia NO bola lokalizovaná v cytozole, jadre, matrixe peroxizómov a v chloroplastoch [27]. Táto zlúčenina bola v roku 1992 vyhlásená pracovníkmi časopisu *Science* za Molekulu roka [28] a je považovaná za všestranný bunkovosignalizačný efektor, zohrávajúci dôležitú úlohu v rôznych (pato)fyziológických procesoch.

NO obsahuje nepárový elektrón v jeho π_2 orbitáli, môže existovať v troch medzi sebou vymieňajúcich sa stavoch: radikál ($\text{NO}\cdot$), nitrozóniový kation (NO^+) a nitroxylový anión (NO^-), vznikajúce z radikálu odobraním alebo pridaním elektrónu [28]. Jeho rôznorodé efekty sú prisudzované schopnosti reagovať s molekulou kyslíka a jeho redoxnými formami a so špecifickými proteínmi obsahujúcimi železo a tiolové skupiny [27]. NO je schopný difundovať vo vodných častiach bunky, napr. v cytoplazme, ale taktiež prechádzať voľne cez lipidovú fázu membrán.

NO je zahrnutý v regulácii rôznych rastlinných procesov ako sú fytomorfogenéza, koreňový rast, listová expanzia, starnutie, zatváranie prieduchov, ďalej v regulácii cytokinínovej signálnej dráhy, homeostázy železa [29,30] a je priamo súčasťou signálnej transdukčnej kaskády obrannej reakcie rastliny na abiotický i biotický stres.

Tvorba NO v rastlinných bunkách

Schopnosť rastlín akumulovať a metabolizovať atmosferický NO je známa už dlhší čas. Merania emisie plynu z rastlín ukázali, že NO môže byť syntetizovaný v rastline enzýmovými i neenzýmovými reakciami [27].

Tab. 2.: Enzýmové a neenzýmové zdroje NO v rastlinách. Skratky: H_4B , tetrahydrobiopterín; PM, cytoplazmatická membrána; (?), predpokladá sa, ale nie je demonštrované; N, nie je presne určené [31].

	substrát	kofaktor	bunková lokalizácia	ovplyvňované fyziologické procesy
iNOS	L-Arg	hém, NADPH, FAD, H_4B , kalmodulín	chloroplasty(?)	obrané reakcie proti patogénom
AtNOS1	L-Arg	NADPH, kalmodulín	N	ABA signalizácia, rast a vývoj, úrodnosť
NR	nitrit	NAD(P)H	cytozol	ABA signalizácia, obranné reakcie(?), fotoinhibícia
Ni-NOR	nitrit	cytochróm c	PM väzby	N
neenzýmová NO produkcia	nitrit	fenoly, kyslé pH	apoplast	N

Výzkumy naznačujú, že za syntézu NO v rastlinách sú zodpovedné viaceré enzýmy (tab. 2), NO sa tvorí ako odpoveď na podnety za rôznych podmienok v rôznych druhoch rastlín rozličnými spôsobmi. Dôležitosť jednotlivých zdrojov NO v jeho fyziologickej produkcii závisí od druhu rastlín, buniek, pletív, podmienok, za ktorých rastliny rastú a aj na signálnych dráhach aktívnych za daných podmienok. Predpokladá sa, že nitrátreduktáza (NR) je spojená s neelicitovaným generovaním NO, a inducibilná NOS (iNOS) je zodpovedná za produkciu NO v rastlinách odolných voči patogénom [29]. Bol pozorovaný nárast v aktivite iNOS v rezistentnom tabaku počas infekcie TMV, i po pôsobení na tabakové rastliny kryptogénom.

Enzýmy zúčastňujúce sa tvorby NO v rastlinách vykazujú veľa podobných biochemických a kinetických vlastností ako jednotlivé NOS v živočíšnej ríši, ale len málo významných sekvenčných motívov spojených s produkciou NO v živočíchoch je možné rozpoznať v rastlinnej iNOS, čo naznačuje rozdielny chemizmus syntézy NO v rastlinách [29].

Hlavný enzým syntetizujúci NO po útoku patogéna je patogén-inducibilná NOS (iNOS), vykazujúca vlastnosti a považovaná za variant P proteínu glycíndekarboxylázového komplexu, ale predpokladá sa, že je samostatná, nie je časťou tohto komplexu [29]. Je špecificky indukovaná počas rezistentnej odpovede na patogénnu infekciu. Substrátom pre tento enzým je L-arginín a molekula kyslíka, iNOS katalyzuje okrem vzniku NO tvorbu L-citrulínu. Požaduje k tomu kofaktory také isté ako cicavčí druh enzýmu NADPH, FAD, FMN, kalmodulín, tetrahydrobiopterín (H_4B) a hém, aj keď využíva pravdepodobne iný mechanizmus generovania NO [31].

Signálom pre spustenie syntézy NO pomocou iNOS počas obrannej reakcie rastlín voči patogénom, je pravdepodobne zvýšená koncentrácia voľných Ca^{2+} iónov v cytozole a fosforylácia/defosforylácia špecifických proteínov. Aktivácia iNOS je požadovaná pre obranné odpovede po napadnutí patogénom. iNOS aktivita je blokováná inhibítormi cicavčej NOS L- N^G -monometylarginin monoacetátom (L-NMMA) a difenylenjodónium chloridom [29], čo zase naznačuje podobnosť biochemických vlastností enzýmov tvoriacich NO v rastlinnej a živočíšnej ríši. V rastlinách inhibítory NOS blokujú patogénom a elicitorom vyvolanú obrannú aktiváciu génov, syntézu antimikrobiálnych látok a spustenie hypersenzitívnej reakcie.

iNOS cicavcov je regulovaná primárne na transkripčnej úrovni, zato regulácia rastlinnej iNOS sa predpokladá na posttranslačnej úrovni kvôli rýchlemu zvýšeniu koncentrácie NO po pôsobení na listové epidermálne bunky tabaku s kryptogénom. Je

možné, že rýchla aktivácia rastlinnej iNOS je sprostredkovaná kalmodulínom a zmenami v koncentrácii Ca^{2+} iónov, ako je to v prípade cicavčej eNOS a nNOS [29]. Ca^{2+} ióny a kalmodulín sú požadované pre činnosť rastlinnej iNOS.

K rýchlemu zvýšeniu koncentrácie NO po pôsobení kryptogéinom dôjde v chloroplastoch epidermálnych buniek, a preto sa predpokladá, že iNOS je lokalizovaná v tejto organele [29].

Zistilo sa, že inhibítory variantu P proteínu karboxymetoxylamín a aminoacetonitril znižujú aktivitu tabakovej iNOS [32]. Karboxymetoxylamín inhibuje funkciu variantu P proteínu tým, že reaguje s pyridoxálfosfátom, okrem toho pyridoxálfosfát mierne stimuluje aktivitu tabakového enzýmu z čoho vyplýva, že pyridoxálfosfát asi spolupracuje pri syntéze NO [29]. iNOS pravdepodobne funguje ako dimér, čo koreluje s prítomnosťou leucínového zipsu v jej sekvencii. Tabaková iNOS má odhadovanú molekulovú hmotnosť 120 kDa.

Najviac odlišností medzi P proteínom, ktorý tvorí časť glycín dekarboxylázového komplexu a variantom P proteínu (iNOS) v *Arabidopsis* je v N-terminálnej oblasti týchto P proteínov, zahŕňajúcej približne 80 aminokyselín [29].

Glycín dekarboxylázový komplex (GDC) je multienzymový komplex, s veľkosťou viac ako 1300 kDa, je prítomný v mitochondriálnom matrixe rastlinných a živočíšnych buniek a bol nájdený aj v mikróboch. Okrem 100-120 kDa pyridoxálfosfát obsahujúceho P proteínu, GDC komplex obsahuje L proteín – 50 až 60 kDa lipoamiddehydrogenázu, T proteín – 40 až 45 kDa tetrahydrofolát obsahujúci enzým, a H proteín – 15 kDa lipoamid obsahujúci enzým. Tento komplex spolu so serínhydroxymetyltransferázou katalyzuje premenu dvoch glycínových molekúl na serín, oxid uhličitý a amoniak. V zelenom rastlinnom pletive, podjednotky GDC reprezentujú až do 50% celkového množstva mitochondriálnych proteínov. Toto pozoruhodné množstvo enzýmu slúži na záchranu glycínu produkovaného ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylázou-oxygenázou (RUBISCO) počas fotorespirácie.

Ďalším enzýmom vykazujúcim NOS aktivitu je hormonálne aktivovaná NOS (AtNOS1). Bola identifikovaná počas screeningu génov *Arabidopsis thaliana*, kódujúcich proteíny s rovnakými sekvenciami aké sú známe v NOS slimáka *Helix pomatia*. Nie je príbuzná s rastlinnou iNOS, vykazuje homológiu s NOS cicavcov a patrí do neobvyklej rodiny predpokladaných NOS, ktorá je konzervovaná u eukaryot a baktérií [30].

AtNOS1 katalyzuje produkciu NO ako súčasť odpovede rastliny na široký okruh hormonálnych, ale aj iných signálov. Súčasné výzkumy poskytujú genetický dôkaz o úlohe AtNOS1 ako producenta NO v procesoch: kyselinou abscisovou indukované zatváranie prieduchov, potláčanie kvitnutia a obranné reakcie vyvolané lipopolysacharidmi [30]. Analýzou fenotypových znakov mutantov so zníženou tvorbou NO sa potvrdilo, že AtNOS1 zohráva centrálnu úlohu v rastlinnom vývoji, lebo u týchto mutantných rastlín bola pozorovaná redukcia koreňov, zakoreňovania, rastu, vývoja a úrodnosti [30].

AtNOS1 požaduje k činnosti Ca^{2+} ióny, kalmodulín a NADPH, zato jej aktivita je FMN, FAD, hém a H_4B independentná [30,31]. AtNOS1 vo svojej štruktúre obsahuje doménu viažucu GTP, jej GTPázová aktivita je otázna.

Prvým identifikovaným enzýmom, ktorý je schopný produkovať NO, bola NR. NR je kľúčový enzým nitrátovej asimilácie vyšších rastlín, katalyzuje premenu NO_3^- na NO_2^- a ako elektrónový zdroj k tomu používa NAD(P)H.

NR má kapacitu vytvárať i NO, táto aktivita bola demonštrovaná *in vitro* i *in vivo*, generuje ho z NO_2^- zase za účasti NAD(P)H ako elektrónového donora. Kapacita NR na tvorbu NO pri nasýtených koncentráciách NAD(P)H a NO_2^- je asi len 1% z celkovej enzýmovej aktivity a *in vivo* produkcia NO závisí na celkovej aktivite NR, na množstve enzýmu v aktívnom stave a na intracelulárnej akumulácii NO_2^- a NO_3^- [33]. NR vytvára peroxynitrit (ONOO^-) simultánne s NO.

NR vyšších rastlín je obyčajne homodimér s podjednotkami veľkosti 100-115 kDa. Obsahuje tri prostetické skupiny FAD, hém a molybdénový kofaktor (MoCo), ktoré sa zúčastňujú na transfere elektrónov, ten je požadovaný pre katalytickú aktivitu NR. Z topologického hľadiska možno rozoznať tri štrukturálne domény oddelené spájacími regiónmi, v spájacích regiónoch dochádza k proteolytickému štiepeniu. Na N-konci proteínu je doména s MoCo podobná sulfitoxidáze cicavcov, ďalej región viažuci hém, ležiaci v centrálnej doméne, obsahujúci histidínové reziduá a vykazujúci podobnosť s cytochrómom b_5 , a FAD-viažuce miesto nájdené v poslednej tretej doméne smerom k C-terminálnemu koncu polypeptidu, táto doména je podobná cytochróm b_5 reduktáze. Miestom katalytického generovania NO je pravdepodobne MoCo, ako je to známe pri ďalšom enzýme, produkujúcom NO a obsahujúcom MoCo, xantínoxidoreduktáze [28].

NR je pravdepodobne zodpovedná za tvorbu NO v neinfikovaných a neelicitovaných rastlinách [29]. Zatiaľ nie je preukázaná úloha NR počas obrannej reakcie na patogénnu

infekciu, bola však pozorovaná indukcia expresie génov pre NR na transkripčnej i proteínovej úrovni v zemiakových hl'uzách po pôsobení na ne patogénom *Phytophthora infestans* alebo elicitorom patogéna z triedy Oomycety [31].

Aktivita NR je kontrolovaná pomocou kovalentnej modifikácie fosforylácie/defosforylácie, fosforylácia môže byť Ca^{2+} -dependentná. Fosforylovaná NR má schopnosť byť rozpoznaná NR inhibičným proteínom (NIP), NIP je členom 14-3-3 rodiny regulačných polypeptidov. Keď dôjde k spojeniu NR a NIP, tak sa NR inaktivuje. Rýchlosť degradácie NR taktiež závisí na jej stave, či je fosforylovaná alebo nie, a asociácii s 14-3-3 proteínom. Aktivita NR môže byť inhibovaná aj kyanidom a azidom, tieto zlúčeniny inhibujú veľa ďalších enzýmov napr. cytochrómoxidázu.

Nitrit: NO-reduktáza (Ni-NOR) je 310-kDa enzým viazaný na cytoplazmatickú membránu, katalyzuje redukciu NO_2^- na NO. Aktivita tohoto enzýmu bola sledovaná v koreňoch rastlín tabaku, kde dochádzalo k redukcii NO_2^- , tvoreného NR viazanou na cytoplazmatickú membránu, na NO. Funkciou Ni-NOR môže byť zahrnutie v signalizácii pre reguláciu nitrátovej asimilácie [34].

Substráty pre Ni-NOR sú NO_2^- a redukovaný cytochróm c, priamo v rastlinách môžu byť donormi elektrónov pre Ni-NOR cytochrómy viazané na plazmatickej membráne, NADPH sa v tomto prípade nepoužíva. Maximum aktivity enzýmu bolo nájdené pri pH 6,1. Ni-NOR nie je citlivá ku kyanidu a antiNR IgG [28], iba minoritná inhibícia bola dosiahnutá pri vysokej 10 mM koncentrácii KCN.

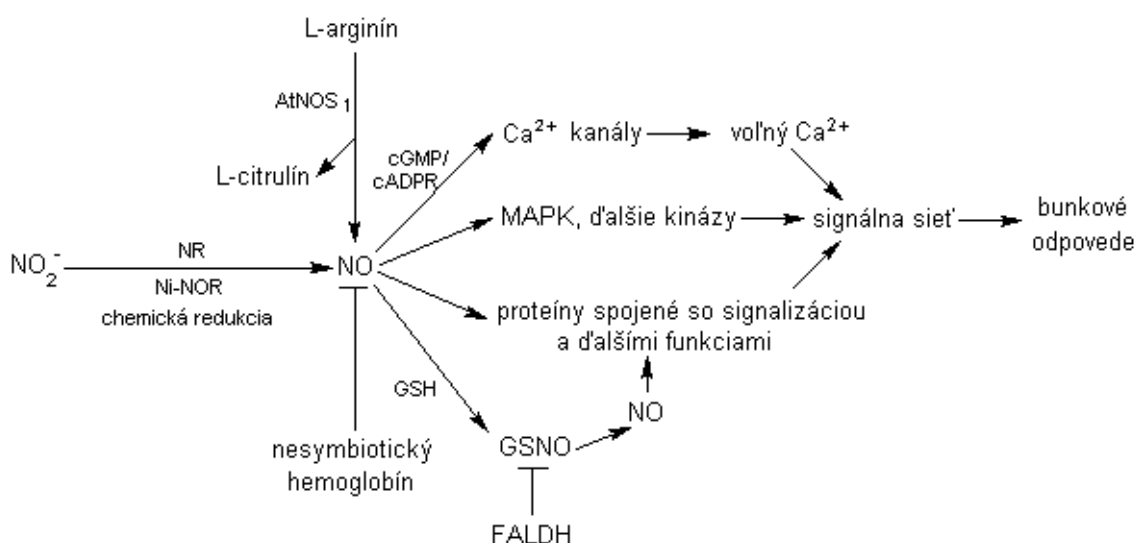
Ni-NOR je rozdielna od rozpustnej nitritreduktázy (NiR) lokalizovanej v plastidoch. Oba enzýmy sú schopné prijímať elektróny z umelého donoru elektrónov redukovanej metyl viologen, avšak pri redukcii NO_2^- , katalyzovanej rozpustnou NiR, je produktom NH_3 na rozdiel od redukcie, katalyzovanej Ni-NOR, vtedy je produktom NO. Je to spôsobené rozdielmi v pH optime enzýmov a použití elektrónových donorov pri redukcii, cytochróm c je využívaný ako zdroj elektrónov výhradne Ni-NOR [34].

Aktivita Ni-NOR nebola detekovaná v plazmatickej membráne listov tabaku. Ni-NOR predstavuje možnosť enzýmovej produkcie NO v koreňoch rastlín, kde je limitovaný prístup kyslíka. NOS potrebuje k svojej činnosti kyslík na rozdiel od Ni-NOR, ktorá je aktívna aj pri nízkych koncentráciách tohto prvku.

Ďalším zdrojom NO v rastlinách ale iba za určitých podmienok môže byť xantínoxidoreduktáza (XOR), enzým obsahujúci MoCo tak isto ako NR. XOR sa vyskytuje v dvoch vzájomne prevediteľných formách: superoxid produkujúca xantínoxidáza a xantíndehydrogenáza. Činnosť XOR bola nájdená v peroxizómoch.

NO-generujúca aktivita tohto enzýmu vzrastá pri klesajúcom parciálnom tlaku O_2 , pri tlaku O_2 blížiacemu sa anaeróbnemu prostrediu enzým vytvára O_2^- i NO, keď je tlak O_2 vysoký, enzým produkuje len O_2^- . NO vzniká premenou anorganického NO_2^- , miestom katalytického generovania NO je MoCo. XOR má kapacitu vytvárať dva signály AOS a NO v závislosti na tlaku O_2 .

Okrem enzýmovej premeny môže NO vznikať neenzymaticky, stačia k tomu správne podmienky prostredia. Neenzýmová redukcia NO_2^- na NO v apoplaste vyžaduje pH v kyslej oblasti a jej rýchlosť je zvyšovaná prítomnosťou zlúčenín s redukčnými vlastnosťami ako sú fenolické látky a askorbát, ktoré sú prítomné v rastline vo veľkom množstve. Ďalej môže byť NO vytvorené z NO_2 svetlom sprostredkovanou premenou za účasti karotenoidov [34,35]. Fyziologický význam neenzýmovej tvorby NO je v súčasnosti neznámy, bola pozorovaná ako odpoveď na pôsobenie giberelínov a kyseliny abscisovej [31]. Tieto dva hormóny spôsobujú rapídne okyselenie apoplastického prostredia.



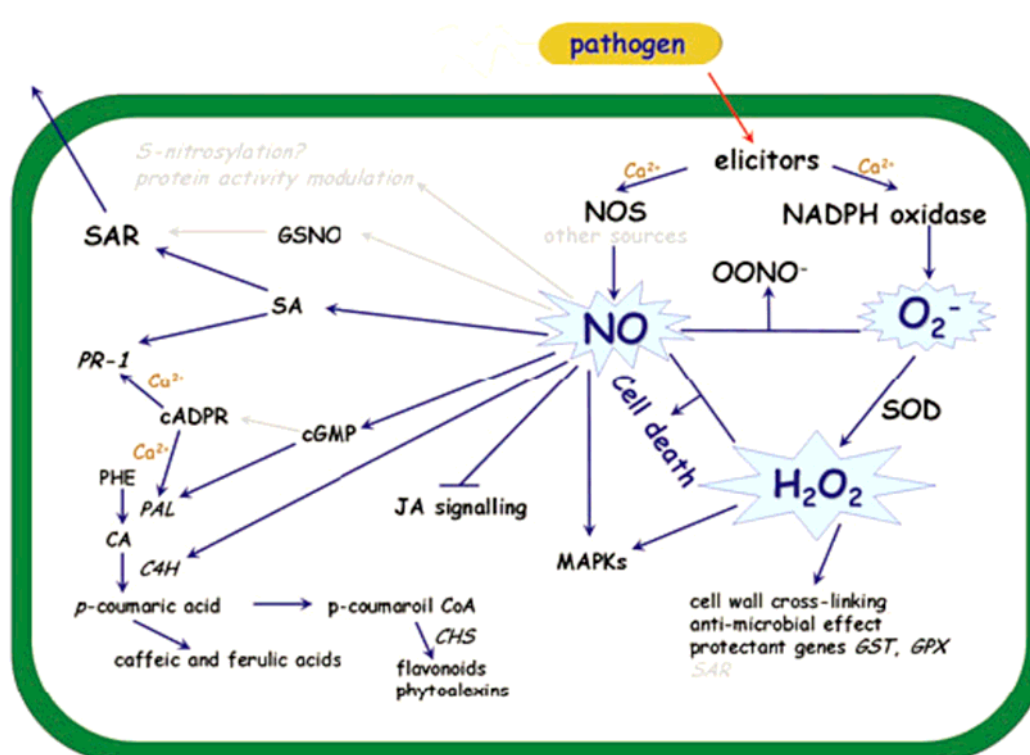
Obr. 12.: Schématické znázornenie signalizácie pomocou NO v rastlinných bunkách [30].

Účinky NO

NO pôsobí v rôznych organelách rastlinných buniek, v chloroplastoch ovplyvňuje biosyntézu chlorofylu a fotofosforyláciu, v mitochondriách aktivitu cytochróm c oxidázy a alternatívnej oxidázy, v peroxizómoch reguláciu katalázy, a v cytozole moduláciu akonitázy [33].

NO je schopný oxidovať, nitrovať alebo nitrozylovať proteíny. Môže modifikovať tiolové skupiny prítomné v reaktívnych aminokyselinách ako cysteín a tyrozín i centrá obsahujúce prechodné kovy širokého funkčného spektra proteínov. Tieto obe modifikácie sú reverzibilné a špecifické, poskytujú možnosť flexibilne a presne zmeniť funkciu proteínov v bunkách počas odpovede na signály z prostredia. Odhalilo sa, že NO zohráva významnú úlohu v ochrane a obrane rastlín proti patogénom. NO interaguje s rôznymi kľúčovými enzýmami, ktoré sa účastnia obrany.

Jedným z hlavných cieľov pre NO je rozpustná guanylátcykláza. Merateľným následkom pôsobenia NO na napríklad *Arabidopsis thaliana* a listy i suspenzné kultúry tabaku je prechodný nárast koncentrácie endogénneho cGMP (obr. 12 a 13). Prítomnosť cGMP v rastlinách bola preukázaná pomocou hmotnostnej spektrofotometrie a metódou RIA. Aktivácia guanylátcyklázy prebieha naviazaním NO na hémové železo alebo S-nitrozyláciou určitých cysteínových reziduí [35,36].



Obr. 13.: Schéma signalizačných funkcií NO počas hypersenzitívnej reakcie [32].

cGMP je signálna molekula, tzv. druhý posol, ktorá aktivuje aj ADPRcyklázu a tak sa signál vyvolaný NO prenáša ďalej. ADPRcykláza vyrába cADPR z $\beta\text{-NAD}^+$, indukcia syntézy cADPR pomocou NO priamo bez tvorby cGMP nebola v rastlinných bunkách dokázaná [30].

cADPR patrí tiež do skupiny sekundárnych poslov, viaže sa na ryanodínové receptory (RYP) intracelulárnych kanálov pre Ca^{2+} ióny a tým stimuluje uvoľnenie týchto iónov z endoplazmatického retikula a vakuoly do cytozolu. NO, cGMP a cADPR sa zúčastňujú na zvýšení cytozolickej koncentrácie Ca^{2+} iónov v tabakových bunkách počas reakcie buniek na hyperosmotický stres a kryptogéin [30,31]. Okrem mobilizácie Ca^{2+} iónov sa cADPR pravdepodobne zúčastňuje modulácie vakuolárnych proteínov podobných RYP zapojených do signálnej dráhy kyseliny abscisovej [27]. Zvýšenie cytozolickej koncentrácie Ca^{2+} iónov ako súčasť signálnej transdukčnej kaskády spustenej NO nemusí byť spôsobené cADPR, ale aj priamo cGMP. K úplnému potlačeniu mobilizácie intracelulárnych Ca^{2+} iónov sú potrebné inhibítory ryanodínových receptorov, antagonista cADPR i inhibítory syntézy cGMP.

Kryptogéin spúšťa špecifické zvýšenie cytozologickej koncentrácie Ca^{2+} iónov, najskôr dôjde k počiatočnému prechodnému nárastu koncentrácie s maximom $1,9 \mu\text{M}$ po 5 minútach od začiatku pôsobenia kryptogéinu a potom k trvalému zvyšovaniu koncentrácie, ktoré dosiahne maximum $1 \mu\text{M}$ po 25 minútach a táto koncentrácia Ca^{2+} iónov neklesne najmenej počas nasledujúcich 3 hodín. Prvý pík zvýšenia koncentrácie Ca^{2+} iónov je spôsobený Ca^{2+} iónmi z extracelulárneho média i intracelulárnych zásob, zatiaľ čo na druhom zvýšení sa podieľajú Ca^{2+} ióny hlavne z extracelulárneho prostredia [37]. Dôkazom že NO vyvoláva mobilizáciu intracelulárnych zásob Ca^{2+} iónov sú výsledky meraní s 2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetrametylimidazolin-3-oxid-1-oxyl (cPTIO), inhibítormi iNOS a ruténiovou červeňou (inhibitor RYP), po ich pridaní sa značne inhibuje prvý nárast koncentrácie Ca^{2+} iónov, na druhé zvýšenie nemajú žiadny vplyv [37].

Najdôležitejšiou úlohou, ktorú v tomto prípade Ca^{2+} ióny zohrávajú, je úloha druhého posla. Slúžia ako mediátor sprostredkujúci indukciu expresie génov pre PAL i ďalšie pokračovanie signálnej transdukčnej kaskády obrannej reakcie, ktorej súčasťou je produkcia NO (obr. 12). Po pridaní inhibítorov guanylátcyklázy sa zablokuje NO-indukovaná enzýmová aktivita PAL a aj aktivácia expresie génov pre PAL v tabaku [31], čo je jeden z dôkazov dráhy: ... $\rightarrow$ NO $\rightarrow$ cGMP $\rightarrow$ Ca^{2+} $\rightarrow$ PAL $\rightarrow$

NO ovplyvňuje expresiu väčšieho množstva rastlinných génov (tab. 3), okrem génov pre PAL napr. gény pre PR-1 proteíny, Hsp a etylénformujúce proteíny. cGMP stimuluje i indukciu génov kódujúcich feredoxín NADP⁺ oxidoreduktázu a chalkónsyntázu, čo je prvý enzým dráhy špecifickej pre flavonoidy a antibiotiká, ktoré

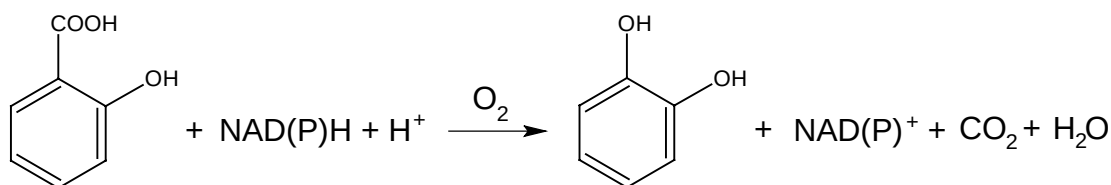
sú derivátmi izoflavonoidov, a bolo zistené, že iniciuje biosyntézu antocyanínu v sóji [27,36].

Tab. 3.: Triedy génov regulovaných NO v rastlinách. ^a+, „upregulation” pomocou NO; –, „downregulation” pomocou NO; ^blen v SA-deficientnej NahG transgéennej *Arabidopsis* [31].

gény regulované NO	^a efekt na expresiu	zdroj NO
enzýmy zahrnuté v syntéze JA	+	plynný NO
JA-odpovedajúce gény	–	donory NO, plynný NO
	^b +	
enzýmy zahrnuté v syntéze etylénu	+	donor NO
	+	kryptogén
proteíny zahrnuté v signalizácii etylénu	+	donor NO
PR gény	+	donory NO
	+	TMV
enzýmy fenypropanoidnej dráhy	+	donory NO
	+	<i>P. syringae</i>
antioxidantné a ďalšie ochranné proteíny	+	donory NO
	+	kryptogén
signalizačné proteíny	+ alebo –	donor NO
proteíny zahrnuté vo fotosyntéze	+	donor NO
proteíny zahrnuté v bunkovom transporte	+	donor NO
proteíny zahrnuté v bunkovej smrti	+	donor NO
proteíny základného metabolizmu	+ alebo –	donory NO
proteíny reagujúce na auxíny	+	donor NO
ferritín	+	donor NO
gény s neznámou funkciou	+	donory NO

PAL je zahrnutá v obrane rastlín proti patogénom, je to prvý a kľúčový enzým fenypropanoidnej biosynthetickej dráhy. Inhibíciou NOS-aktivity sa značne redukuje akumulácia transkriptov kódujúcich PAL.

PAL katalyzuje v rastlinách vznik kyseliny škoricovej, z ktorej následnými reakciami vzniká kyselina salicylová (SA). Pôsobením NO na listy tabaku a *Arabidopsis thaliana* dochádza k značnému nárastu koncentrácie endogénnej SA. Toto zvýšenie je požadované pre indukciu expresie génov pre PR-1 proteíny [27,36]. Dôkazom toho je zablokovanie indukcie expresie v transgénnych NahG rastlinách, ktoré nie sú schopné akumulovať SA, lebo obsahujú navyše gén pre salicylát hydroxylázu. Tento enzým katalyzuje premenu kyseliny salicylovej na katechol (obr. 14).



Obr. 14.: Reakcia katalyzovaná enzýmom salicylát hydroxyláza.

SA tvoriaca sa ako reakcia na NO má schopnosť sprostredkovať i potencovať efekty NO, pretože viaceré enzýmy regulované NO, ako sú akonitáza, kataláza a ďalšie proteíny obsahujúce hém zahrnuté v redoxnej kontrole, sú taktiež regulované pomocou SA [27].

SA sa podieľa na rozvoji lokálnej i systémovej rezistencie počas inkompatibilných interakcií medzi rastlinami a patogénmi, zohráva dôležitú úlohu na vzniku odolnosti rastliny voči chorobám spôsobených patogénnym mikroorganizmom *Phytophthora*, ale zistilo sa, že nesprostredkováva hypersenzitívnu reakciu.

Všeobecné vlastnosti získanej systémovej rezistencie (SAR) sú nešpecifickosť, účinnosť proti širokému spektru patogénov a výdrž maximálne niekoľko týždňov. SAR bola pozorovaná pre rod *Nicotiana*, ale už pre ostatné rody z tej istej čelade *Solanaceae*, ako napríklad paradajka, petúnia a paprika, ktoré nevykazujú nekrózu ako odpoveď na elicitíny, nebola zistená [38]. Intenzita rezistencie u rastlín z rodu *Nicotiana* je závislá na podmienkach kultivácie a na tom, z ktorej konkrétnej odrody pochádzajú.

Pôsobením inhibítorov NOS alebo vychytávačov NO sa zmenšuje SA-indukovaná SAR, to poukazuje na dôležitú úlohu NO v indukcii signálnej dráhy (dráh) vedúcej k vzniku SAR v tabaku, hoci jeho aktivita je plne závislá na funkcii SA [32].

Hoci je SA dôležitou molekulou požadovanou pre indukciu obranných génov v neinfikovaných pletivách vzdialených od miesta napadnutia, nie je kľúčovým signálom pre vznik SAR. Vznik systémovej rezistencie sa javí byť závislý na extracelulárnej RNAázovej aktivite, pretože RNA molekuly môžu prenášať signály v rastline na dlhé vzdialenosti [5]. Predpokladá sa, že i lipidy a lipidové deriváty sú mobilné signály na krátke aj dlhšie vzdialenosti. Nedávno bol navrhnutý ako prenosný signál endogénny peptidový elicitor uvoľnený aspartátovou proteázou. Ďalším kandidátom mobilného signálu je nitrózoglutation (GSNO). Verí sa, že GSNO funguje ako intra- i intercelulárny NO prenášač. Signál pre SAR sa najpravdepodobnejšie prenáša vo floéme, v ktorom je glutacion hlavný metabolit. GSNO je silný induktor rastlinných obranných génov. Nedávno boli charakterizované GSNO-katabolizujúci enzým a gén kódujúci tento enzým (GS-FDH), z čoho sa vyvodzuje predpoklad, že rastliny sú schopné modulovať bioaktivitu a signálnu funkciu tejto stabilnej formy NO [32].

Pôsobenie NO na suspenzie tabaku a sóji spúšťa expresiu rozličných génov spojených s obranou. Aktivácia expresie môže prebiehať pravdepodobne viacerými

cestami, nepriamo cez produkciu cGMP, cADPR a SA alebo napríklad NO má možnosť priamo regulovať proteíny podobné RYR cez S-nitrozáciu [27].

Elicitácia kryptogéinom zapríčiňuje pomalé hromadenie mRNA, kódujúcej PAL a „pathogenesis-related“ proteín PR-1b. PR-1 je dominantná skupina „pathogenesis-related“ proteínov, ktorých produkcia je spustená patogénom a je všeobecne používaná ako marker pre SAR. Nárast akumulácie PAL mRNA bol pozorovaný medzi 30 a 60 minútami a pre PR-1b mRNA po 3 hodinách od pridania kryptogéinu k bunkám. Úroveň mRNA pre PR-1b stúpila viac ako 100-krát dva dni po očkovaní s vírusom tabakovej mozaiky [39].

Produkcia NO štartuje biosyntézu antimikrobiálnych flavonoidov, patriacich medzi sekundárne metabolity fytoalexíny. Po infiltrácii NO donora v podmienkach vyvolávajúcich bunkovú smrť bol v *Arabidopsis* pozorovaný transkripčný nárast cinnamát-4-hydroxylázy (C4H). C4H je považovaná za kľúčový enzým syntézy fenolických zlúčenín spojených s rezistenciou k chorobám. Okrem toho inhibícia aktivity NOS spôsobuje redukciiu akumulácie transkriptov kódujúcich chalkónsyntázu, čo je enzým zúčastňujúci sa syntézy flavonoidov [32].

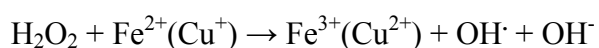
Okrem guanylátcyklázy môžu byť cieľmi pre NO v rastlinách MAP kinázy. Umelo generovaný NO stimuluje MAP kinázy v tabaku i *Arabidopsis thaliana* [30], nie je ale známe, či aktivácia MAP kináz pomocou NO prebieha priamo alebo nie.

MAP kinázy sú zahrnuté v aktivácii obranných reakcií rastlín proti patogénom. Rozpoznanie elicitínov a karbohydrátového elicitoru, pochádzajúceho z bunkovej steny, z Oomycety *Phytophthora* hostiteľom spúšťa fosforylačnú kaskádu, ktorá zahŕňa SIP kinázu (SA-indukovaná proteín kináza), patriacu do rodiny MAP kináz. Táto 48-kDa kináza identifikovaná v suspenzii tabakových buniek je rýchlo a prechodne aktivovaná SA a tým aj SA-dependentnou signálnou dráhou NO. Bola objavená ešte jedna MAP kináza, aktivovaná aj elicitínmi a karbohydrátovým elicitorom z bunkovej steny, nazývaná WIP kináza (wounding-induced protein kinase) [40].

Akonitáza, enzým citrátového cyklu, je ďalším dôležitým cieľom NO v živočíchoch. NO inhibuje činnosť mitochondriálnej a cytozolickej akonitázy a okrem toho je signálom pre premenu cytozolickej akonitázy na mRNA-viažúci proteín IRP-1 (iron regulatory proteín). IRP-1 sa viaže na špecifické miesta, tzv. železo-reagujúce elementy, na transkriptoch génov zahrnutých v metabolizme železa, napríklad gény pre transferínový receptor a feritín, čím sa zmení stabilita a schopnosť translácie daných

transkriptov. Týmto mechanizmom sa IRP-1 zúčastňuje na regulácii koncentrácie voľného železa v živočíšnych bunkách a NO stimuluje nárast úrovne voľného železa.

V rastlinách bola demonštrovaná tiež inhibícia aktivity cytozolickej a mitochondriálnej akonitázy pomocou NO. Sekvenčnou analýzou rastlinnej cytozolickej akonitázy sa odhalila 76% podobnosť s ľudským IRP-1 a je známe, že rozhodujúce reziduá pre väzbu IRP-1 na mRNA sú v tomto enzýme konzervované [27, 40]. Predpokladá sa, že rastlinná cytozolická akonitáza môže vykonávať analogickú funkciu ako IRP-1. Potenciál IRP-1 homológa zvýšiť úroveň voľného železa ako odpoveď na NO môže zohrávať ochrannú funkciu po útoku patogéna. V prítomnosti AOS voľné železo podporuje Fentonovou reakciou, generujúcou hydroxylové radikály (obr. 15), oxidačnú deštrukciu a PCD. Tak NO-sprostredkovaný nárast železa môže pomôcť vytvoriť letálne prostredie, ktoré prispieva k hypersenzitívnej reakcii ako i k zabitíu patogéna.



Obr. 15.: Fentonova reakcia.

NO môže reagovať s voľným $\text{O}_2^\cdot$ a vytvárať tak reaktívnu molekulu peroxynitrit (ONOO^- , obr. 13). Ten vykazuje bakteriostatické vlastnosti, v živočíšnej ríši sa predpokladá, že viacero biologických efektov NO, vrátane indukcie apoptózy, je sprostredkovaných práve touto molekulou, a hľadá sa obdoba u rastlín. Vzájomné ovplyvňovanie sa NO a AOS, medzi ktoré sa $\text{O}_2^\cdot$ zaraďuje, boli popísané hlavne počas interakcií rastlín s patogénmi.

NO kooperuje s AOS v aktivácii hypersenzitívnej reakcie. Výsledkom hypersenzitívnej reakcie je rýchla lokalizovaná bunková smrť, dochádza k rýchlemu nekrotickému odumieraniu buniek v okolí miesta infekcie, jej úlohou je obmedziť infekciu a zabrániť šíreniu patogéna. Okrem toho tieto dva signály, AOS a NO, pravdepodobne spolupracujú i počas rastu a vývoja rastliny, napríklad NO je zahrnutý v regulácii lignifikácie, ovplyvňuje činnosť peroxidáz a produkciu H_2O_2 v xyléme *Zinnia elegans* [27].

NO môže pôsobiť synergicky s AOS alebo potláčať toxické efekty sprostredkované AOS, je to závislé na ich príslušných koncentráciách. Za vhodných podmienok je NO schopné chrániť rastliny, napríklad zemiaky, pred poškodením AOS zapríčinené

metylviologennými herbicídmi. Reakcia NO so O_2^- alebo H_2O_2 môže potenciálne zničiť superoxidový, resp. peroxidový signál-efekt.

H_2O_2 spolu s NO a SA aktivuje PCD. V rastlinných mitochondriách NO inhibuje aktivitu cytochrómoxidázy a sprievodnú syntézu ATP a zmenená mitochondriálna aktivita stimuluje PCD. Predpokladá sa, že PCD indukovaná NO nastane pri inhibícii respirácie a uvoľnení mitochondriálneho cytochrómu c [33]. Po útoku patogéna je aktivita askorbátperoxidázy a katalázy potlačená pomocou NO a SA. Produkcia askorbátperoxidázy je potlačená posttranskripčne a produkcia katalázy je nastavená na nízku úroveň udržiavaním stálej hladiny jej mRNA. Tak rastlina produkuje viac AOS a v tom istom čase znižuje svoju vlastnú kapacitu vylučovania H_2O_2 , výsledkom je hromadná akumulácia AOS a aktivácia PCD. Experimentálne to bolo dokázané, súčasný nárast NO a H_2O_2 v tabakových bunkách indukuje bunkovú smrť, ktorá má typické cytologické a biochemické znaky PCD [36]. Potlačenie AOS-vylučovacieho mechanizmu dokopy so syntézou NO sa javia byť rozhodujúce pre aktiváciu PCD, pretože len samotný nárast tvorby AOS v apoplaste nespustí PCD [18].

PCD v rastlinách vykazuje podobnosti s PCD v živočíchoch (apoptóze), v oboch ríšach v priebehu PCD dochádza ku kondenzácii chromatinu a strate elektrického potenciálu na mitochondriálnej membráne.

NO sa javí byť bifunkčným modulátorom PCD, je schopný ju stimulovať alebo inhibovať. Antiapoptické vlastnosti vykazuje, keď pôsobí antagonisticky voči AOS, znižuje ich cytotoxicitu reakciou so O_2^- za vzniku $ONOO^-$ a zvyšovaním úrovne protektívnych proteínov katalázy, superoxiddizmutázy, alternatívnej oxidázy a glutation-S-transferázy [31].

Ako sú chránené rastlinné bunky pred nadbytkom NO? Kľúčová úloha nesymbiotického hemoglobínu v detoxifikácii NO v živočíchoch, kvasinkách a baktériach je známa, podľa všetkého je vylučovateľom NO, vzniká z neho S-nitrozohemoglobín. V tabakových rastlinách s vysokou produkciou hemoglobínu, u ktorého sa aj v rastlinnej ríši predpokladá funkcia vylučovateľa NO, bolo pozorované zníženie PCD po inokulácii s avirulentnými patogénmi alebo za hypoxických podmienok [30,31].

Okrem hemoglobínu sa možno na vypnutie NO-signálu v rastlinách podieľa glutation-dependentná formaldehyddehydrogenáza (FALDH, iný názov S-nitrozoglutationreduktáza) (obr. 12). U ľudí GSNO, vznikajúci primárne nitrozyláciou glutationu, slúži ako rezervoár NO a sprostredkováva niektoré efekty NO. FALDH

katalyzuje premenu GSNO na oxidovanú formu glutationu a amoniak a tým kontroluje intracelulárnu hladinu GSNO a obmedzuje toxicitu NO. Neexistuje jasný dôkaz prítomnosti GSNO v rastlinách, ale *in vitro* FALDH z *Arabidopsis thaliana* vykazuje GSNO-reduktázovú aktivitu [30].

3.3. ÚLOHA ELICITÍNOV A LIPOFILNÝCH ZLÚČENÍN V METABOLIZME *PHYTOPHTHORY*

Viaceré desaťročia sa domnievalo, že mikroorganizmy z rodov *Phytophthora* a *Pythium* potrebujú steroly pre svoj účinný rast a nepohlavnú i pohlavnú reprodukciu, tak ako parazit *Lagenidium giganteum* [5]. V skutočnosti je to len čiastočne pravdivé.

Za laboratórnych rastových podmienok steroly spúšťajú formovanie reprodukčných orgánov u homo- i heterotalických mycet, ale nedostatok zdroja sterolov neovplyvňuje rast mikroorganizmu *Phytophthora cactorum*. Stimuláciu formovania reprodukčných orgánov u mikroorganizmov *Phytophthora cactorum* a *Pythium aphanidermatum* môže zabezpečovať preprava fosfolipidov do ich organizmov. Nenasýtené masťné kyseliny, aj ich triglyceridy, boli tiež označené za stimulantov reprodukcie v Oomycetách *Phytophthora cinnamoni*, *Phytophthora cactorum* a *Phytophthora parasitica*, pre Oomycetu *Phytophthora cactorum* je takým stimulantom aj fytol, degradačný produkt chlorofylov [5].

Steroly v membránach druhov z rodu *Phytophthora* môžu byť nahradené za triterpenoidy pri splnení dostatočnej podobnosti štruktúrnych a biochemických vlastností, napríklad za fytoftorol, ktorý je syntetizovaný týmito mikroorganizmami.

Lipofilné zlúčeniny nie sú esenciálne pre rast a rozšírenie mikroorganizmov rodu *Phytophthora* ani *Pythium*, prečo potom tieto Oomycety sekretujú vysoko energeticky náročné proteíny s vysokou genetickou diverzitou - elicitíny, schopné transportovať lipofilné zlúčeniny? Jedna z hypotéz hovorí, že elicitíny sú distribuované do okolitého životného prostredia mikroorganizmov z rodu *Phytophthora* za účelom zhromažďovania a prenosu cudzích lipidických zlúčenín do mycélia, ktoré sa stávajú informačným prostriedkom [5]. Informujú mikroorganizmus o prítomnosti a množstve potenciálnych hostiteľov.

Elicitíny, analyzované zo sterolového hľadiska, sa javia ako zložky virulencie patogéna *Phytophthora* [5]. Podľa toho interakcia medzi elicitínmi a tabakom je výnimka - všeobecný faktor virulencie je rozpoznávaný hostiteľskou bunkou, zobrazujúca hostiteľsko-patogénnu koevolúcie (vzájomne podmienený vývoj).

3.4. VÝZNAM ELICITÍNOV Z POĽNOHOSPODÁRSKEHO A BIOTECHNOLOGICKÉHO HĽADISKA

Základné znaky získanej systémovej rezistencie a to, že sa dá navodiť pôsobením elicítinov, predurčujú možnosť využitia týchto poznatkov v ochrane poľnohospodársky významných rastlín. Snahou je nájsť taký elicitor, ktorý by navodil čo najdlhšiu systémovú rezistenciu rastliny bez ohrozenia jej ďalšieho života a úrody.

Umelou vyvolaná systémová rezistencia indukovaná elicítinmi je účinná proti niektorým agresívnym chorobám tabaku, spôsobených mikroorganizmom *Phytophthora parasitica*. Bolo preukázané, že je účinná aj proti tabakovým fytopatogénnym hubám: *Sclerotinia sclerotium*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Erysiphe cichoracearum* a *Peronospora tabacina* [5,41]. Niektoré úvodné experimenty preukázali, že elicitíny je možné použiť na indukciu rezistencie tabaku proti fytopatogénnym baktériam *Pseudomonas cichorii* a *Erwinia chrysanthemi* [5]. Elicitíny sú silné elicitory, relatívne dlhodobo a nešpecificky chránia tabakové rastliny proti širokému spektru patogénov.

Transgénnne rastliny, v ktorých je navodená umelá rezistencia sa dajú vyrobiť dvoma spôsobmi spustenia elicítinových génov v tabaku. Výsledkom použitia nekontrolovanej expresie syntetických génov, kódujúcich kryptogeín, boli životaschopné transgénnne rastliny. Proteín, následkom intracelulárnej lokalizácie, ale nebol schopný interagovať so svojim špecifickým väzbovým miestom na plazmaleme a očkovanie s patogénom *Phytophthora parasitica* poukázalo na nízku úroveň rezistencie takýchto rastlín [5].

Druhý spôsob bol založený na kontrolovanej génovej expresii. Vyrobila sa transgénnna rastlina, spojením génového promotora tabaku (hsr203J), ktorého funkčnosť sa naštartuje pôsobením patogénu na rastlinu, a génu, kódujúceho kryptogeín [41]. Infekcia Oomycetou *Phytophthora parasitica* v rastline stimulovala produkciu kryptogeínu. Proteín bol adresovaný do apoplazmatického priestoru, pomocou signálneho peptidu PR-1a, pridaného medzi promotor a gén pre kryptogeín, čo mu umožňovalo viazať sa na vonkajšiu stranu plazmatickej membrány. Výsledkom tvorby kryptogeínu bola lokálna nekróza, ktorá sa podobala hypersenzitívnej odpovedi vyvolanej patogénnym mikroorganizmom *Phytophthora cryptogea* a došlo k zastaveniu ďalšieho rastu patogéna. Rezistencia je generovaná bez konšitutívnej syntézy transgénnneho produktu a je účinná proti rozličným druhom húb, vírusov a hád'atkám.

CIEĽ PRÁCE

Cieľ môjkej práce je stanovenie a porovnanie množstva vytvoreného NO a zmien koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí vyvolaných elicitáciou kryptogeínom a mutantnými proteínmi odvodenými od kryptogeínu. Práca má pômoť vysvetliť ako mutácia zasahuje do rozpoznania elicitoru rastlinou a teda aj do spustenia a intenzity jednotlivých krokov obrannej reakcie.

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL

4.1. CHEMIKÁLIE

Elicitory:

kryptogén, X24, 811, 56, L19R, LTP laboratórium INRA Antibes Francúzsko,
naše laboratórium

Príprava pufrov:

D-manitol Sigma
kyselina 2-N-morfolinoethylsulfónová (MES) Sigma
N-(2-hydroxyetyl)piperazín-N'-(2-etánsulfónová kyselina) (HEPES)
Sigma

Príprava živných médií:

vitamíny uvedené v tab. Sigma
myoinozitol Sigma
glutamín Sigma
kinetín Sigma
kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová (2,4 D) Sigma

Inhibitor iNOS:

L- N^G -monometylarginín monoacetát (L-NMMA)
Sigma

Fluorescenčná sonda:

4,5-diaminofluoresceín diacetát (DAF-5 DA) Fluka

Ďalej boli použité bežné chemikálie čistoty p.a.

4.2. PRÍSTROJE

predvážky Scaltec SP 051
analytické váhy Kern ABJ
pH meter WTW inoLab Level 2
autokláv Chirana AUT 26/II
trepačka s vodným kúpeľom Elpan typ-357
trepačka Heidolph Unimax 2010
trepačka Minitron
laminárny box Ekom EM 90

laminárny box Holten Safe 2010
doštičkový spektrofleurimeter Perkin Elmer LS 50
fluorescenčný mikroskop Olympus U-RFLT 50
spektrofotometer Thermo Spectronic
ISE pre K⁺ ióny 2THETA

4.3. BIOLOGICKÝ MATERIÁL

kalusová kultúra *Nicotiana tabacum* odroda *Xanti*

5. METÓDY

5.1. KULTIVÁCIA KALUSOVEJ KULTÚRY TABAKU

5.1.1. PRÍPRAVA MÉDIA

Suspenné tabakové kultúry sa pestujú v tzv. modifikovanom MS médiu (Murashige-Skoog medium) nazývanom Chandlerovo médium [42]. Médium obsahuje dve zložky: hlavné médium (tab. 4) a roztok vitamínov a rastových látok (tab. 5).

V tabuľke uvedené množstvá makro- a mikroprvkov sa rozpustia v príslušnom objeme destilovanej vody za stáleho miešania, pH roztoku sa upraví na 5,5-5,7 pomocou KOH a roztok sa dá sterilizovať do autoklávu na 30 minút pri tlaku 200 kPa. Po sterilizácii sa roztok nechá vychladnúť vo flowboxe (na cca 50°C) a pridá sa do neho sacharóza a cez mikrofilter roztok vitamínov a rastových látok, táto časť média sa nemôže sterilizovať v autokláve kvôli svojej tepelnej labilita a preto sa sterilizuje ultrafiltráciou. Médium sa rozleje po 80 ml do 250 ml Erlenmeyerových baniek, ktoré sa predtým vysterilizujú horúcim vzduchom 3 hodiny pri 150°C, a banky sa dajú zase do autoklávu na 30 minút pri 100 kPa. Po vytiahnutí z autoklávu sa nechá médium v bankách vychladnúť vo flowboxe, hrdlo baniek sa obalí fóliou a na banky sa napíše dátum prípravy média.

Tab. 4.: Hlavné médium pre suspenznú kultúru.

	na prípravu 1l média	zásobný roztok 1l	výsledná koncentrácia
Makroprvky			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,37 g		0,37 g/l
KH ₂ PO ₄	0,17 g		0,17 g/l
NH ₄ NO ₃	1,65 g		1,65 g/l
KNO ₃	1,90 g		1,90 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,44 g		0,44 g/l
EDTA-Fe			
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10 ml	3,72 g	37 mg/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O		2,78 g	28 mg/l
Mikroprvky			
H ₃ BO ₃	1 ml	6,2 g	6,2 mg/l
MnSO ₄ ·H ₂ O		22,3 g	22 mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		8,6 g	8,6 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		0,25 g	0,25 mg/l
KI		0,83 g	0,83 mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0,025 g	0,025 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0,025 g	0,025 mg/l
sacharóza	30 g		30 g/l

Tab. 5.: Roztok vitamínov a rastových látok pre suspenznú kultúru.

	na prípravu 1l média	zásobný roztok na 0,1l	výsledná koncentrácia
Vitamíny			
kys. nikotínová	10 ml	50 mg	5 mg/l
pantotenát vápenatý		30 mg	3 mg/l
glycín		20 mg	2 mg/l
tiamín		5 mg	0,5 mg/l
kys. folová		5 mg	0,5 mg/l
pyridoxín		5 mg	0,5 mg/l
biotín		0,5 mg	0,05 mg/l
myoinozitol	100 mg		100 mg/l
glutamín	200 mg		200 mg/l
kinetín	1 ml	22,1 mg	0,11 mg/l
2,4 D	0,8 ml	22,5 mg	0,18 mg/l

5.1.2. KULTIVÁCIA SUSPENZNEJ KALUSOVEJ KULTÚRY TABAKU

Suspenzná kultúra tabaku (obr. 16) sa pestuje v Minitrone za stáleho svetla a trepania s frekvenciou 120 otáčok/min pri 23°C a vlhkosti 60%. Z tejto suspenzie sa sterilne odoberie 8 ml a prenesie do 80 ml tekutého média (príprava a zloženie kapitola 5.1.1) v 250 ml Erlenmeyerovej banke, následne sa banka uzavrie alobalom a fóliou

a umiestni do Minitronu. Na uchovávanie sa za uvedených podmienok suspenzná kultúra pestuje po dobu 7 dní, na meranie používam 3 dni starú kultúru.



Obr. 16.: Suspenzná kultúra tabakových buniek.

5.2. MERANIE ZMIEN KONCENTRÁCIE K^+ IÓNOV V EXTRACELULÁRNOM PROSTREDÍ PO ELICITÁCII

5.2.1. PRÍPRAVA MERANIA

Z 3 dni starej bunkovej suspenzie sa jemne odsaje rastové médium na sklenenej frite (hustota S1, nízky podtlak), ktorá sa najskôr zväži prázdna a následne spolu s bunkami. Bunky sa dvakrát premyjú pufrum I2, ktorý má laboratórnu teplotu (zloženie tab. 6, príprava pod tabuľkou), roztok sa zase jemne odsaje. Potom sa bunky rozsuspendujú v pufrum I2 pH 5,8, tak aby bola výsledná koncentrácia 1g buniek/10 ml pufru I2 pH 5,8, a premiestnia sa do čistej (vypálenej) 250 ml Erlenmeyerovej banky. Takto pripravená suspenzia tabakových buniek sa rozleje po 20 ml do 50 ml Erlenmeyerových baniek, ktoré sa nechajú inkubovať v trepačke s vodným kúpeľom Elpan typ- 357 pri 25°C a frekvencii 150 otáčok/min po dobu 120 minút.

Tab. 6.: Zloženie pufru I2.

látka	koncentrácia	navážka na 1l
D-manitol	175 mM	32 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5 mM	0,1 g
K ₂ SO ₄	0,5 mM	0,09 g
MES	2 mM	0,39 g

Príprava pufru: Všetky zložky pufru uvedené v tabuľke 6 sa rozpustia v destilovanej vode, objem roztoku sa doplní na 1l a pH roztoku sa upraví pomocou KOH na hodnotu 5,8.

5.2.2. VLASTNÉ MERANIE S ISE

Zmena koncentrácie K^+ iónov sa meria ako zmena potenciálu v extracelulárnom médiu pred a po pridaní rôznych koncentrácií elicitorov pomocou ISE pre K^+ ióny.

Do tabakovej suspenzie pripravenej na meranie v I2 pH 5,8 sa ponorí ISE pripojená na pH meter WTW inoLab Level 2, ktorý je online pripojený k počítaču. Každých 30 s sa ukladajú údaje namerané ISE do textového súboru do počítača. V čase 0 sa pridá do suspenzie určité množstvo elicitora. Zmena potenciálu ISE sa sleduje do času 45 minút od prídania elicitora. Ako kontrolná vzorka sa použije suspenzia bez prídavku elicitora. Počas celého merania sú banky so suspenziou umiestnené v trepačke s vodným kúpeľom Elpan typ- 357 pri 25°C a frekvencii 150 otáčok/min.

Namerané hodnoty potenciálu ISE sa pomocou kalibračnej krivky prepočítajú na koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí.

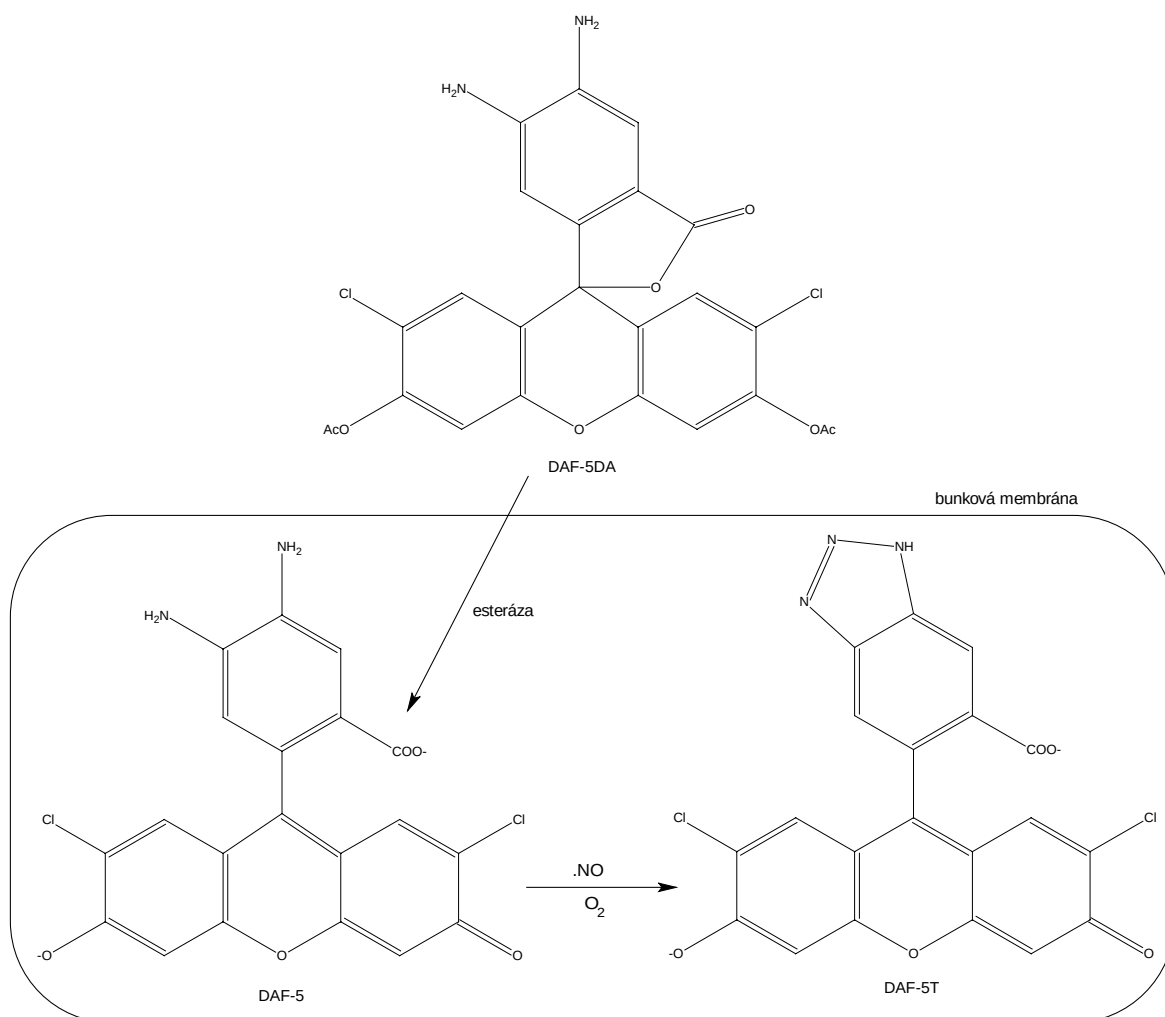
5.3. SLEDOVANIE ZMIEN KONCENTRÁCIE OXIDU DUSNATÉHO V BUNKÁCH PO ELICITÁCII S FLUORESCENČNOU SONDOU

5.3.1. PRÍPRAVA MERANIA

Príprava na meranie prebieha obdobne ako pri meraní zmien koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí (kapitola 5.2.1). Rozdiel je v tom, že sa v celom postupe nahradí roztok I2 pH 5,8 roztokom I20 rovnakého pH 5,8 (tieto roztoky sa líšia len v koncentrácii MES, ktorá sa zmení z 2 mM na 20 mM) a tabaková suspenzia v I20 pH 5,8 sa rozleje po 5 ml do 25 ml Erlenmeyerových baniek a nechá sa to inkubovať po dobu 90 minút.

5.3.2. VLASTNÉ MERANIE S FLUORESCENČNOU SONDOU

Pre sledovanie zmien koncentrácie NO bola vybratá fluorescenčná metóda s permeabilnou sondou 4,5-diaminofluoresceín diacetát (DAF-5DA). Prítomnosť NO vo vnútri buniek tabaku sa detekuje pomocou zelenej superfluorescencie zlúčeniny DAF-5T (4,5-diaminofluoresceín triazol, excitačná $\lambda = 491$ nm, emisné maximum $\lambda = 513$ nm), vznikajúcej reakciou NO s DAF-5, ktorý sa tvorí z DAF-5DA pomocou esteráz po vstupe do buniek (obr. 17). Chemická transformácia fluorescencie sondy je založená na reaktivite dvoch aromatických vicinálnych amínov, pripojených na fluoresceín, s NO v prítomnosti O_2 za formovania triazolového kruhu.



Obr. 17.: Schématické znázornenie vstupu DAF-5DA do buniek a vzniku DAF-5T [43].

Do banky s 5 ml tabakovej suspenzie v I20 pH 5,8 pripravenej na meranie sa pridá 20 μ l DAF-5DA, zásobná koncentrácia sondy je 5 mM a výsledná koncentrácia je 20 μ M. Počas celého merania sú banky umiestnené v trepačke s vodným kúpeľom Elpan typ- 357 pri 25°C a frekvencii 150 otáčok/min. Po pridaní fluorescenčnej sondy až do konca pokusu sa banky uchováajú v tme. Po 30 minútach od pridaní sondy sa suspenzia preniesie do nového roztoku I20 pH 5,8.

Potom sa do jednotlivých baniek pridáva elicitor, ja som konkrétne pridávala kryptogéin, tak aby jeho koncentrácia v banke bola 50 nM.

Každých 30 minút po dobu dvoch hodín sa odoberajú vzorky suspenzií na podložné sklíčka, pozorujú sa fluorescenčným mikroskopom, na vzorky sa svieti modrým svetlom, excitačná λ pre DAF-5T = 491 nm.

Kvôli dôkazu toho, že zelená superfluorescencia je spôsobená naozaj zlučeninou DAF-5T, ktorá vzniká spôsobom uvedeným na obr. 17, sa do niektorých baniek

so suspenziou 10 minút pred pridaním kryptogeínu pridáva inhibítor NOS – L-NMMA (výsledná koncentrácia 150 μM). Po elicitácii suspenzie buniek tabaku s prídavkom inhibítora sa očakáva pokles fluorescence oproti suspenzii, do ktorej sa žiadny inhibítor nepridal.

Získané fotky suspenzií sa vyhodnocujú v programe Origin, fotky sa pseudokolorujú podľa intenzity fluorescence.

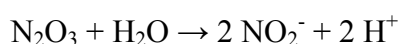
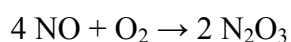
5.4. MERANIE ZMIEN KONCENTRÁCIE OXIDU DUSNATÉHO PO ELICITÁCII GRIESSOVOU REAKCIOU

5.4.1. PRÍPRAVA MERANIA

Príprava na meranie prebieha rovnako ako v prípade merania zmien koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí (kapitola 5.2.1).

5.4.2. VLASTNÉ MERANIE S GRIESSOVÝM ČINIDLOM

Pre zistenie množstva NO_2^- v biologickom materiáli sa používa okrem iného aj kolorimetrické stanovenie s Griessovým činidlom. Táto metóda sa dá použiť i pre kvantifikáciu NO. NO reaguje s kyslíkom a so zložkami Griessovho reagentu (obr. 20) za vzniku toho istého azofarbiva, ako pri reakcii s NO_2^- (obr. 21), oranžovej alebo ružovej farby podľa toho, či pH reakčnej zmesi je neutrálne resp. kyslé. Koncentrácia NO sa selektívne stanoví pri neutrálnom pH zmeraním intenzity vzniknutého azofarbiva pri $\lambda = 496 \text{ nm}$. V prípade stanovenia množstva NO_2^- , ktoré z NO následne vznikajú reakciami na obr. 18, musí byť Griessova reakcia prevedená v prostredí s kyslým pH a vzniká ružové azofarbivo, ktorého intenzita sa zmeria pri $\lambda = 540 \text{ nm}$.



Obr. 18.: Vznik NO_2^- z NO [44].

Existujú rôzne modifikácie zloženia Griessovho činidla, ja som používala 2 rôzne zmesi. Prvý variant obsahuje kyselinu sulfanilovú a α -naftylamín (obr. 19). Pripraví sa 1%-roztok kyseliny sulfanilovej v 0,1 M HCl a 0,02%-roztok α -naftylamínu taktiež v 0,1 M HCl (zloženie tab. 7, príprava pod tabuľkou). Potom sa tieto jednotlivé zložky

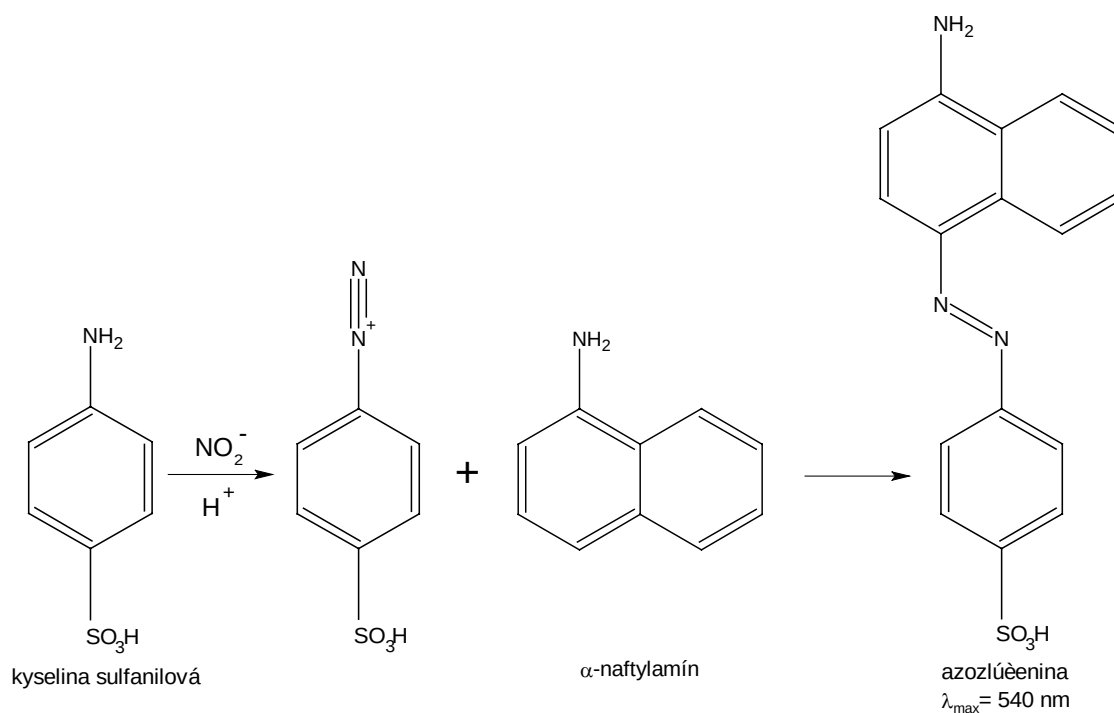
pridávajú v pomere 1:1, tak aby aj objem Griessovho činidla k stanovovanej vzorke bol v pomere 1:1, teda v mojom prípade sa k 500 μl odobratého roztoku zo suspenzie tabakových buniek pridáva 250 μl roztoku kyseliny sulfanilovej a 250 μl roztoku α -naftylamínu. Po 30 minútach státia pri laboratórnej teplote sa vytvorí ružové sfarbenie spôsobené vzniknutým azofarbivom, ktorého množstvo je úmerné koncentrácii NO_2^- vo vzorke. Intenzita tohto sfarbenia sa zmeria na spektrofotometri pri $\lambda = 540 \text{ nm}$.

Tab. 7.: Zloženie 1. variantu Griessovho činidla (pre $V=100 \text{ ml}$).

látka	koncentrácia	navážka na 100 ml
α -naftylamín	0,02 %	20 mg
kyselina sulfanilová	1 %	1 g
HCl	0,1 M	

Príprava prvého variantu Griessovho reagentu:

Do 100 ml 0,1 M HCl sa pridá 20 mg α -naftylamínu resp. 1 g kyseliny sulfanilovej a rozpustí sa to.



Obr. 19.: Reakcia Griessovho reagentu (1. variantu) s NO_2^- .

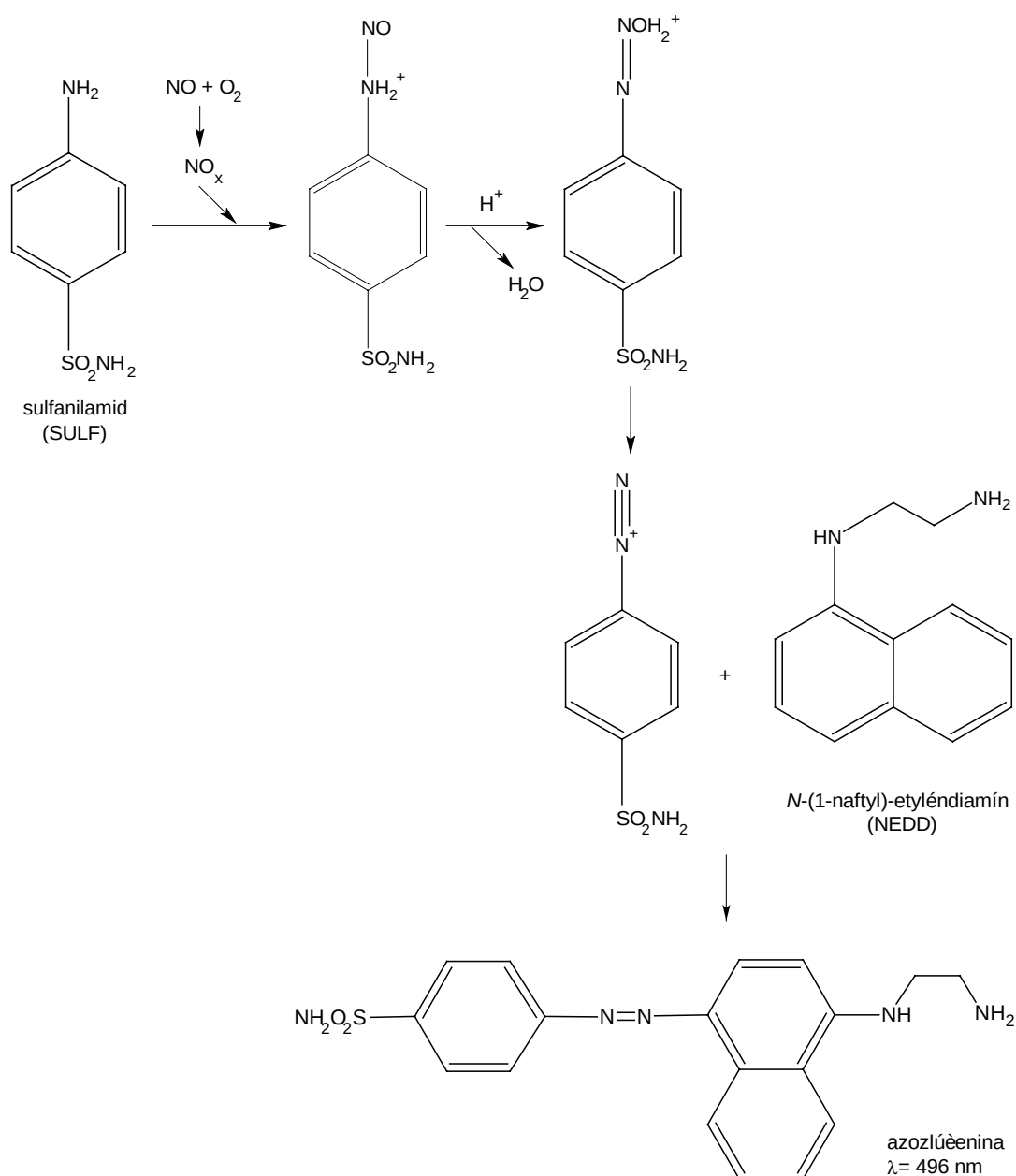
Druhý variant Griessovho činidla, ktoré sa dá použiť, je zmes sulfanilamidu (SULF) a N -(1-naftyl)etylendiamín dichloridu (NEDD) vo fosfátovom pufrí pH 7,4 (zloženie tab. 8, príprava pod tabuľkou). 500 μl tejto zmesi sa pridáva k 500 μl odobratého roztoku zo suspenzie buniek, nechá sa to stáť 30 minút a zmeria sa intenzita vytvoreného tentoraz oranžového sfarbenia pri $\lambda = 496 \text{ nm}$, ktorá je úmerná koncentrácii NO vo vzorke.

Tab. 8.: Zloženie 2. variantu Griessovho reagentu (pre V=100 ml).

látka	koncentrácia	navážka na 100 ml
NEDD	0,4 mM	10 mg
SULF	17 mM	0,5 g
fosfátový pufr pH 7,4	100 mM	13,78 g Na ₂ HPO ₄
		3,53 g NaH ₂ PO ₄

Príprava druhého variantu Griessovho činidla:

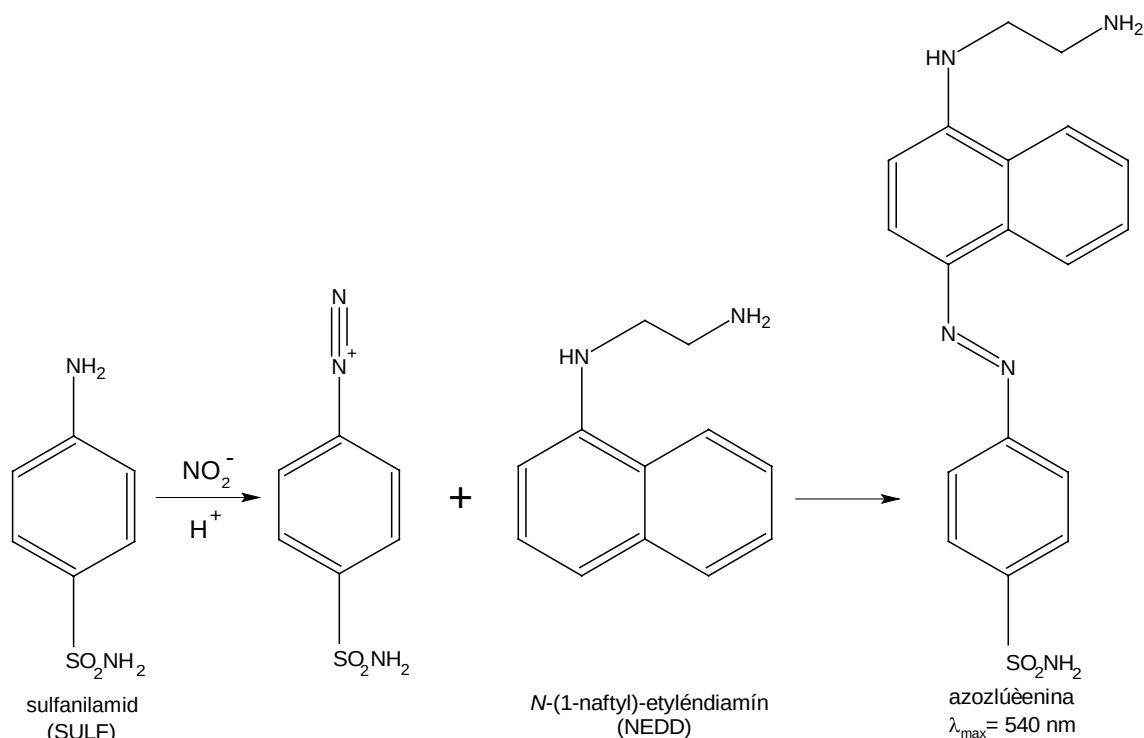
Do 100 ml fosfátového pufru pH 7,4 sa pridá 10 mg NEDD a 0,5 g SULF, nechá sa to miešať a mierne zahrievať 15-30 minút alebo dokým sa všetko nerozpustí [45].



Obr. 20.: Reakcia Griessovho činidla (2. variantu) s NO [45].

Pri meraniach NO a NO_2^- s Griessovým činidlom sa po ukončení prípravy na meranie suspenzia prefiltruje a bunky sa rozspuspendujú v I20 pH 8 (ten sa líši od I20 pH 5,8 jednou zložkou, namiesto 20mM MES obsahuje 20 mM HEPES) zase na objem 20 ml. Počas celého merania sú banky umiestnené v trepačke s vodným kúpeľom Elpan typ- 357 pri 25°C a frekvencii 150 otáčok/min. V čase 0 sa odoberie zo suspenzie prvých 500 μl roztoku nad bunkami do kyvety, ku ktorému sa pridá Griessov reagent, a pridá sa určité množstvo elicitora do bunkovej suspenzie. Každých 30 minút po dobu 2 hodín sa ďalej odoberá zo suspenzie 500 μl roztoku, v ktorom sa stanoví koncentrácia NO_2^- a NO.

Kvôli overeniu si toho, že NO_2^- vznikajú z NO po elicitácii, sa do niektorých baniek so suspenziou buniek pridáva inhibítor NOS – L-NMMA (výsledná koncentrácia 150 μM). V prípade merania s inhibítorom sa v príprave merania nahradí pufr I2 pH 5,8 pufr I20 pH 5,8. Po ukončení prípravy sa pridá do bunkovej suspenzie inhibítor, nechá sa to inkubovať 20 minút. Následne sa bunky premiestnia do roztoku I20 pH 8 a pridá sa elicitor, čo sa považuje za čas 0. V meraní sa pokračuje rovnakým spôsobom ako bez inhibítora. Po elicitácii suspenzie buniek tabaku s prídavkom inhibítora sa očakáva pokles množstva vytvorených NO_2^- oproti suspenzii, do ktorej sa žiadny inhibítor nepridal.



Obr. 21.: Reakcia Griessovho činidla (2. variantu) s NO_2^- [46].

5.5. VYHODNOCOVANIE NAMERANÝCH DAT

5.5.1. MERANIE ZMIEN KONCENTRÁCIE NO_2^- A NO PO ELICITÁCII

Namerané hodnoty zo spektrofotometra pri $\lambda = 540 \text{ nm}$ sa prepočítali na koncentrácie NO_2^- a pri $\lambda = 496 \text{ nm}$ na koncentrácie NO pomocou kalibračnej krivky. Kalibračná krivka pre stanovenie NO_2^- je uvedená na obr. 33. Pre vyhodnocovanie koncentrácie NO som použila kalibračnú krivku z článku z časopisu *Methods in enzymology* [45], pretože som v našom laboratóriu nemohla sama zmerať túto závislosť absorbancie na koncentrácii NO.

Množstvá NO_2^- vytvorené po elicitácii rôznymi elicitínmi v tých istých koncentráciách (50, 25 a 10 nM) boli merané v rôzne dni viackrát a z vyhodnotených výsledných grafov boli vybraté tzv. typické výsledky. Maximum tvorby NO_2^- sa v rôzne dni líšilo v závislosti na momentálnej citlivosti buniek ku kryptogéínu a MPOC a energetickej kondícii tabakových buniek. K tvorbe NO, z ktorého následne NO_2^- vznikajú je potrebné NADPH.

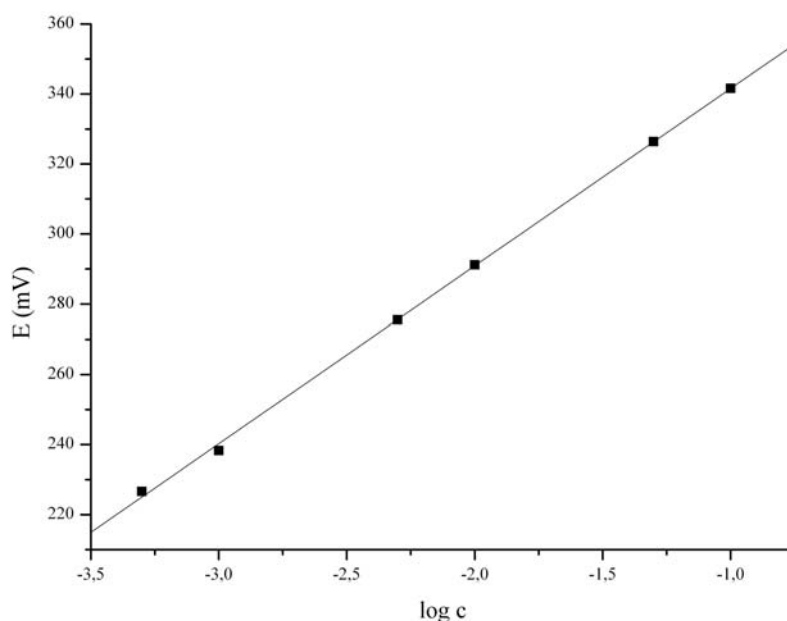
Pre vzájomné porovnanie produkcie NO_2^- a NO vyvolanej koncentráciami 50, 25, 10, 5, 1 a 0,5 nM daného elicitínu bol v rámci jedného pokusu v jeden deň pridávaný elicitín určitej koncentrácie do 2-3 baniek so suspenziou buniek. V rámci jedného pokusu boli merané 3 koncentrácie elicitínu a príslušné množstvá elicitínov pre dané výsledné koncentrácie boli pridávané v rôznom poradí do baniek so suspenziou (napr. pre 50 nM výslednú koncentráciu elicitínu bolo príslušné množstvo pridávané do baniek č. 1, 5 a 8). Z nameraných hodnôt množstiev NO_2^- a NO pre jednu koncentráciu určitého elicitínu som do grafu použila priemerné hodnoty.

VÝSLEDKY

6. MERANIE ZMIEN KONCENTRÁCIE K^+ IÓNOV V EXTRACELULÁRNOM PROSTREDÍ PO ELICITÁCII

6.1. KALIBRÁCIA DRASELNEJ ELEKTRÓDY

Pre kalibráciu ISE pre K^+ ióny som si pripravila roztoky KCl v 175 mM manitole v rozmedzí koncentrácií 0,0005 – 0,1 M. Zostrojila som kalibračnú priamku (obr. 22), jej smernica je 50,65 mV a $R^2 = 0,9994$.



Obr. 22.: Kalibračná priamka ISE pre K^+ pre roztoky KCl v 175 mM manitole.

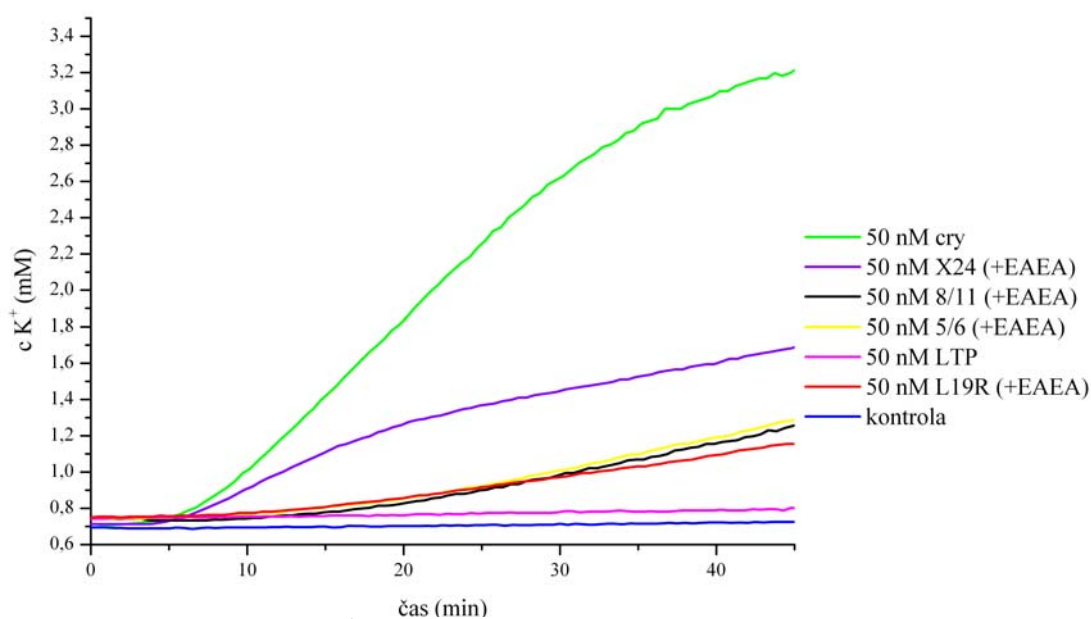
6.2. MERANIE S ISE PRE K^+ PO ELICITÁCII

K vyvolaniu obrannej reakcie som použila kryptogéin, MPOC a X24 rozpustené vo vode, 100, 50, 25 a 10 nM koncentrácie. MPOC 5/6, 8/11 a L19R mali na N-konci navyše signálnu sekvenciu EAEA. Na elicitáciu som použila aj L19R bez signálnej sekvencie. Ako kontrolu som použila čistú suspenziu buniek bez pridania elicitínov.

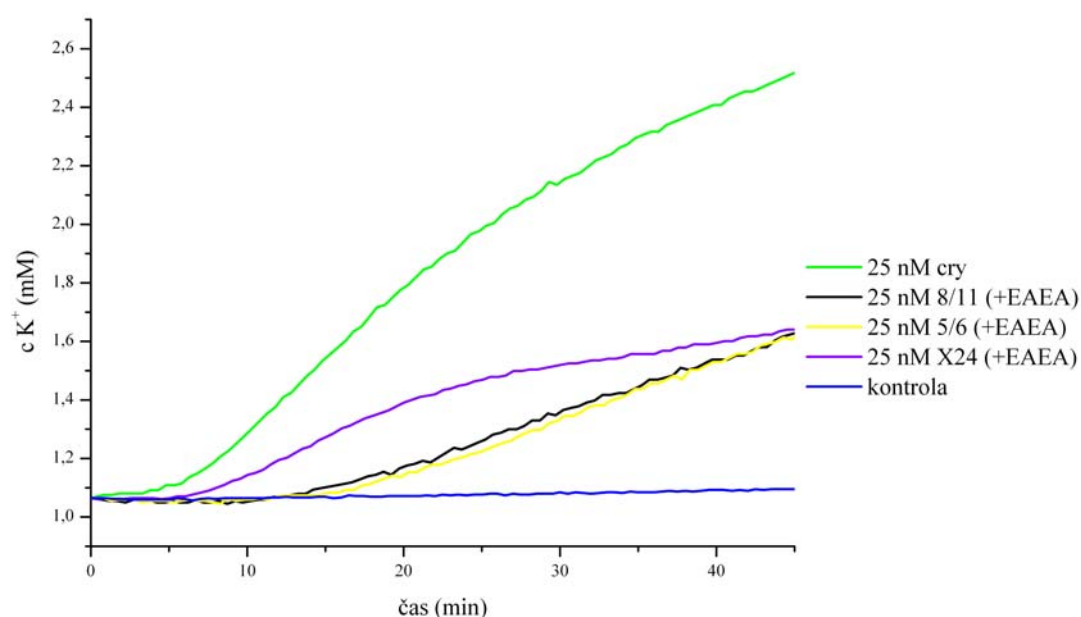
Zistila som, že k najväčšiemu nárastu koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí dochádza po elicitácii samotným kryptogéinom. Intenzita odpovede, čiže množstvo pretečených K^+ do extracelulárneho prostredia, sa líšila v závislosti od pridaného elicitínu a i od jeho koncentrácie.

Po pridaní MPOC a elicitínu označeného X24 poklesol výtok K^+ von z buniek oproti kryptogéinu (cry) v tomto poradí: o viac ako polovicu pre X24, a o tri štvrtiny

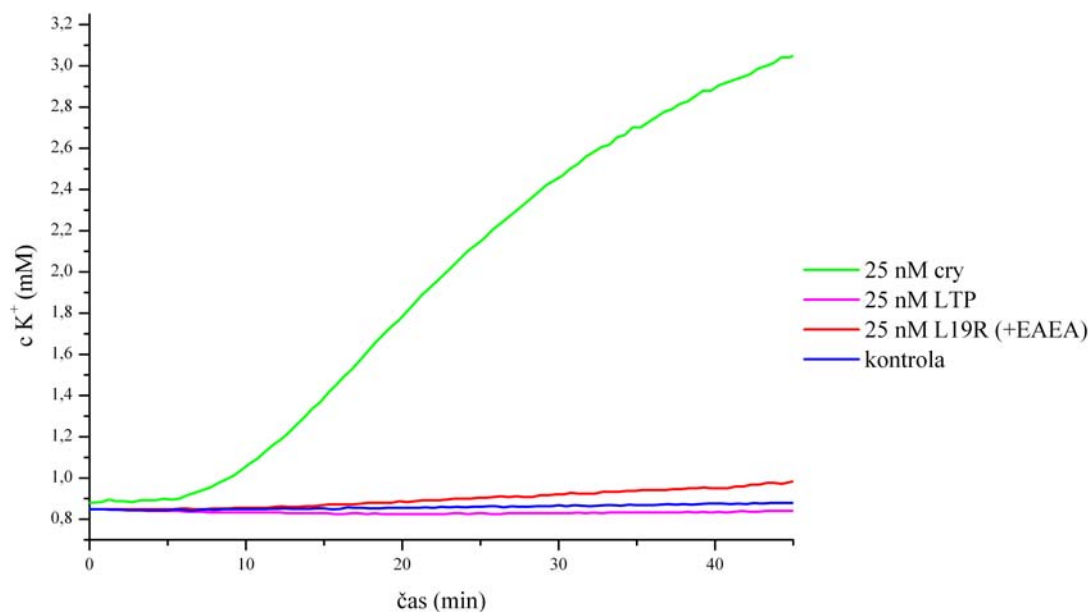
pre 5/6, 8/11 a L19R (+EAEA) pre 50 nM koncentrácie elicitínov (obr. 23). Pre 25 nM koncentrácie sa poradie pre 5/6 a 8/11 obrátilo, celkovo 5/6 a 8/11 vyvolávali veľmi podobné odozvy, odpoveď 5/6, 8/11 a X24 bola približne tretinová oproti reakcii na kryptogén (obr. 24), L19R (+EAEA) vyvolala len minimálnu odozvu (obr. 25). Poradie intenzity zmien extracelulárnej koncentrácie K^+ pre 10 nM koncentrácie jednotlivých elicitínov sa zhoduje s poradím pre 50 nM koncentrácie, X24 spôsobila polovičnú odpoveď, 5/6, 8/11 tretinovú a L19R (+EAEA) len minimálnu reakciu (obr. 26).



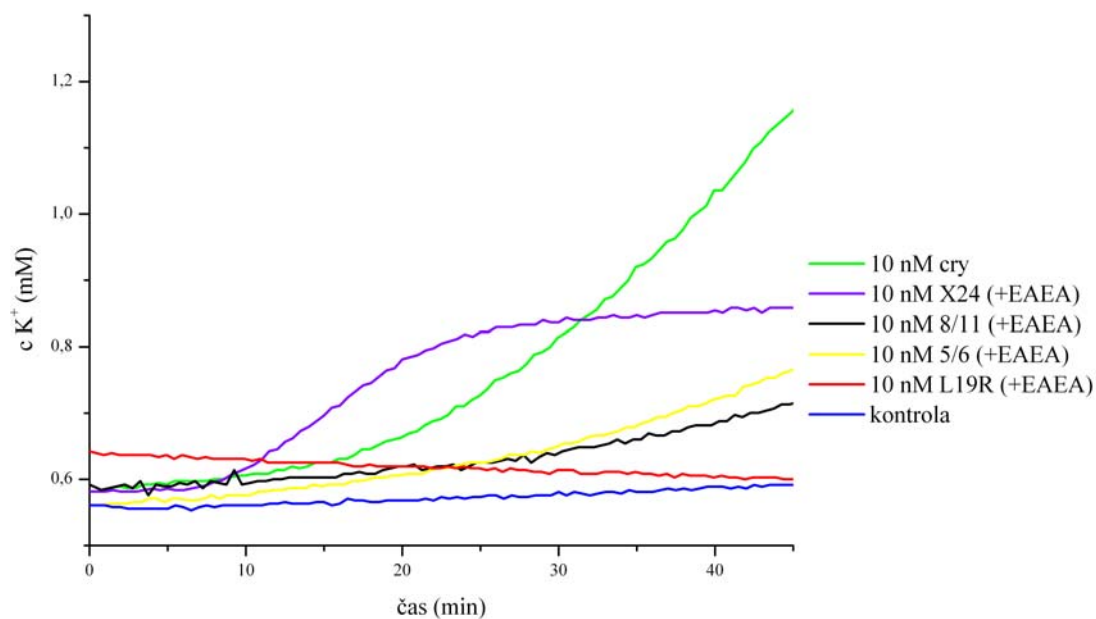
Obr. 23.: Zmena koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí v čase po elicitácii 50 nM elicitínmi.



Obr. 24.: Zmena koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí v čase po elicitácii 25 nM elicitínmi.



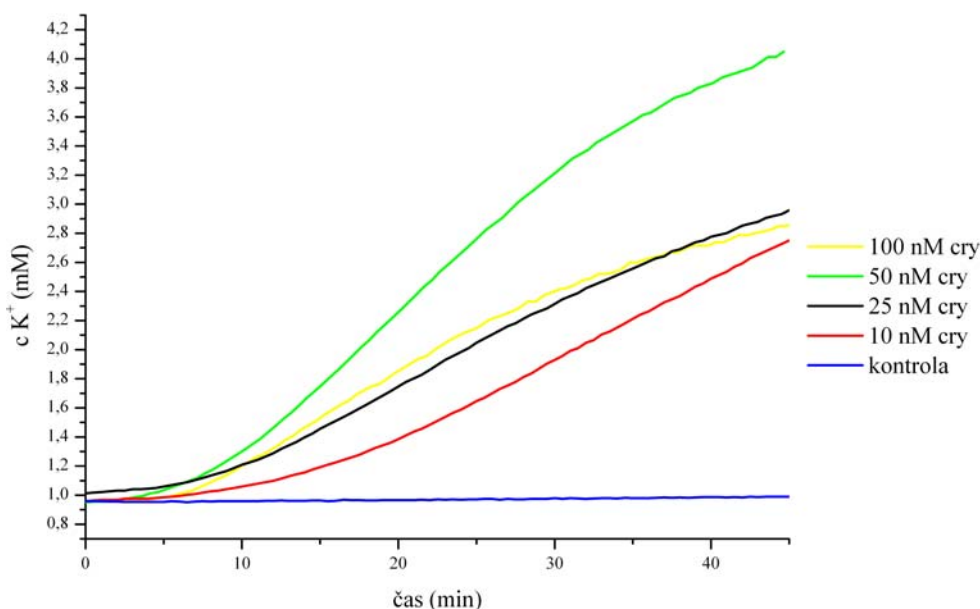
Obr. 25.: Časová zmena koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí po elicitácii 25 nM elicitínmi.



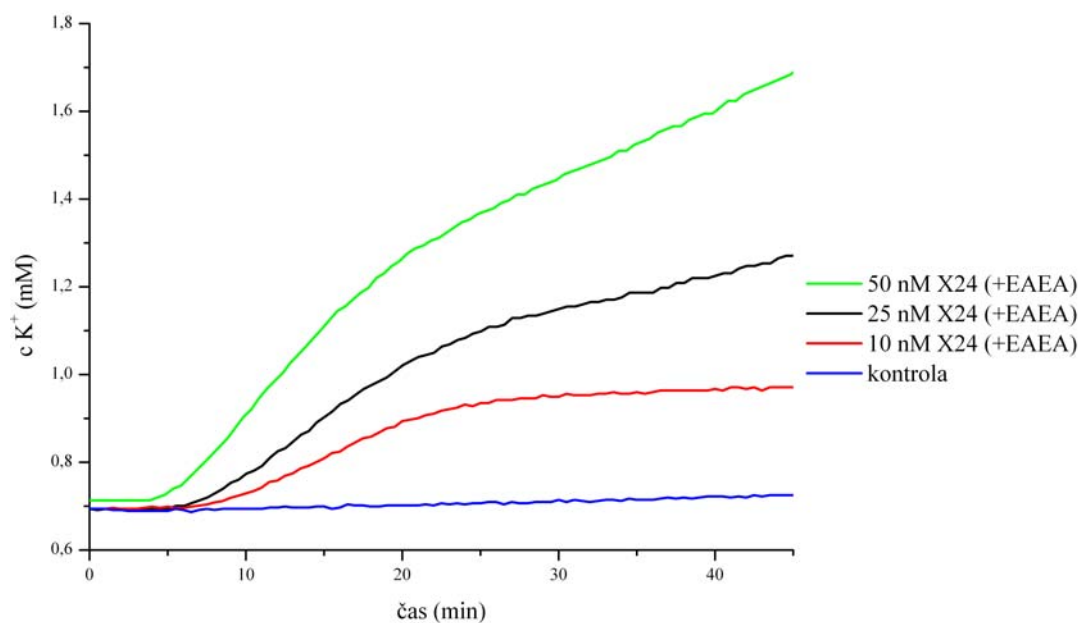
Obr. 26.: Zmena koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí v čase po elicitácii 10 nM elicitínmi.

Pre koncentrácie 50, 25 a 10 nM daného elicitínu platí pre kryptogéin, X24, L19R (+EAEA) i L19R, že so zvyšujúcou koncentráciou elicitínu, výtok K^+ iónov do extracelulárneho prostredia taktiež rastie. Koncentrácia K^+ v extracelulárnom prostredí po elicitácii 50 nM kryptogéinom vzrástla približne o tretinu oproti po aplikácii 25 a 10 nM kryptogéinu do bunkovej suspenzie (obr. 27). Po pridaní 100 nM kryptogéinu bola intenzita odpovede nižšia ako pre 50 nM, zhodná s odpoveďou pre 25 nM kryptogéin. 10 nM X24 spustil približne tretinový, 25 nM X24 dvojtretinový nárast množstva K^+ oproti 50 nM X24 (obr.28). 50 nM L19R (+EAEA)

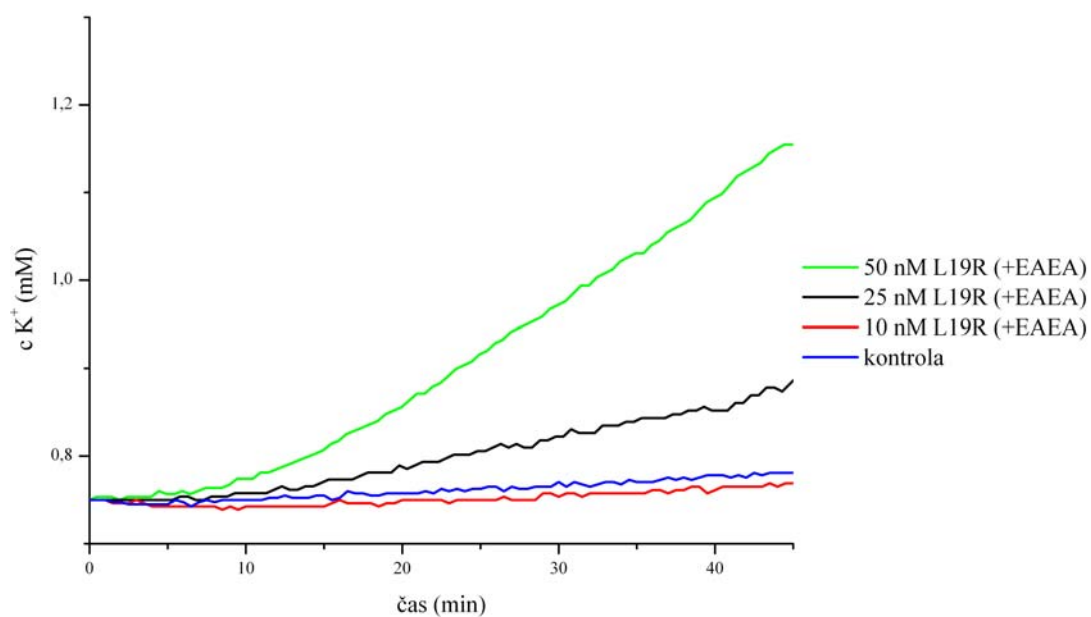
vyvolal o dve tretiny vyšší výtok K^+ ako 25 nM L19R (+EAEA) (obr. 29). Pridaním 10 nM L19R k suspenzii buniek bola vyvolaná viac ako tretinová odozva a po pridaní 25 nM L19R viac ako dvojtretinová v porovnaní s odpoveďou po elicitácii 50 nM L19R (obr. 30). Pre 811 je nárast najväčší pre 25 nM koncentráciu, menší pre 50 nM a pre 10 nM je reakcia na tento elicitín približne štvrtinová (obr. 31). Pre 5/6 je zvyšovanie koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí od času 30 minút rovnaké pre 25 nM a 50 nM, v čase 0 až 30 minút bolo pre 50 nM 5/6 intenzívnejšie, 10 nM 5/6 vyvoláva najmenej intenzívne – tretinové zvýšenie (obr. 32). LTP v akejkoľvek koncentrácii vyvolávalo minimálny nárast koncentrácie K^+ iónov (obr. 23 a 25).



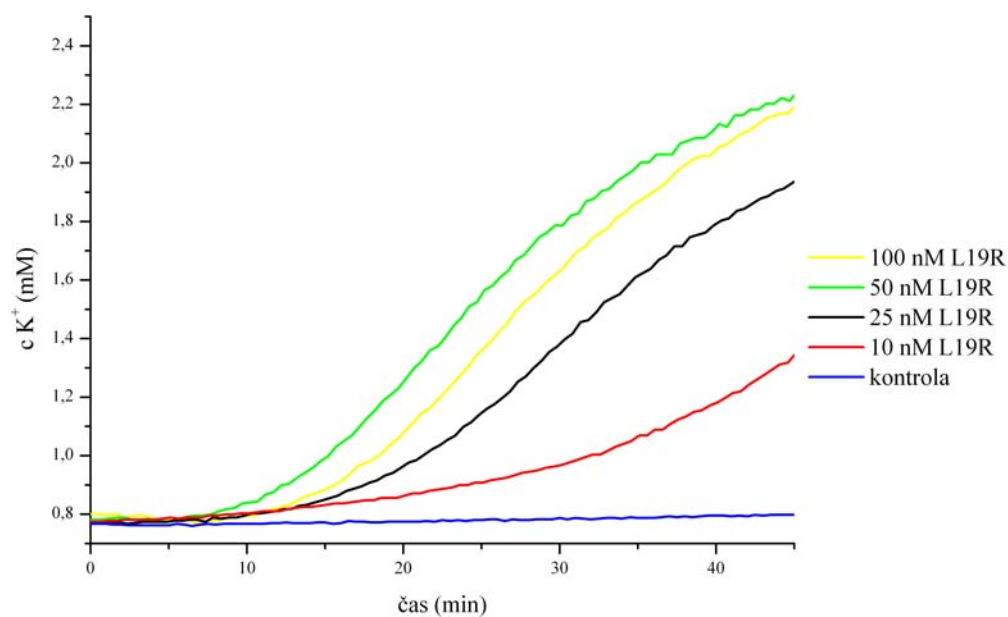
Obr. 27.: Časová zmena koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí po elicitácii 100, 50, 25, 10 nM kryptogeínom.



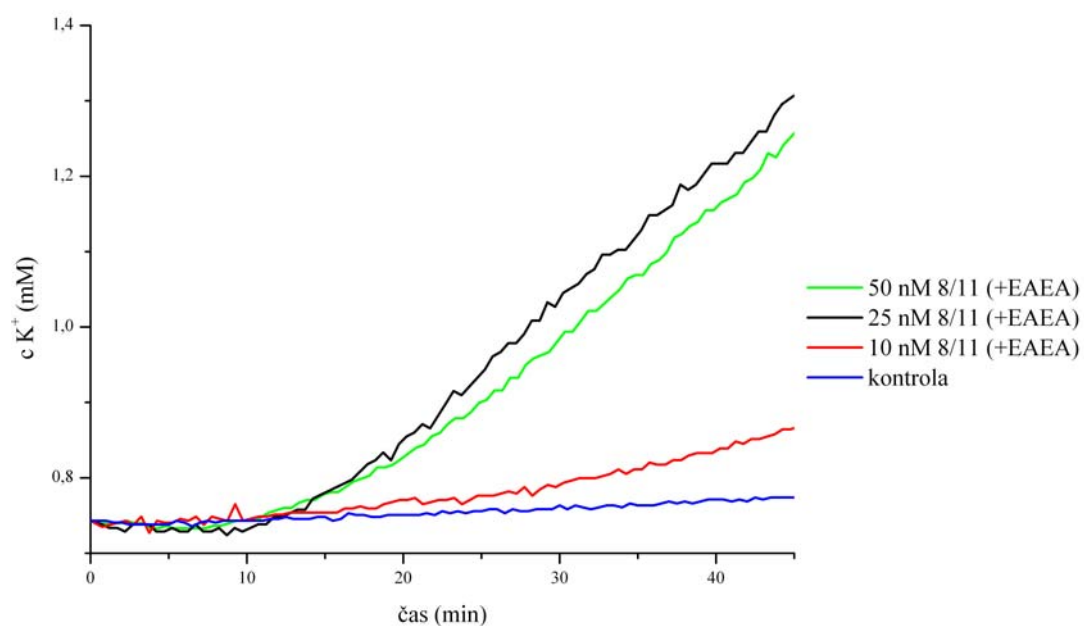
Obr. 28.: Zmena koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí po elicitácii 50, 25, 10 nM X24 (+EAEA).



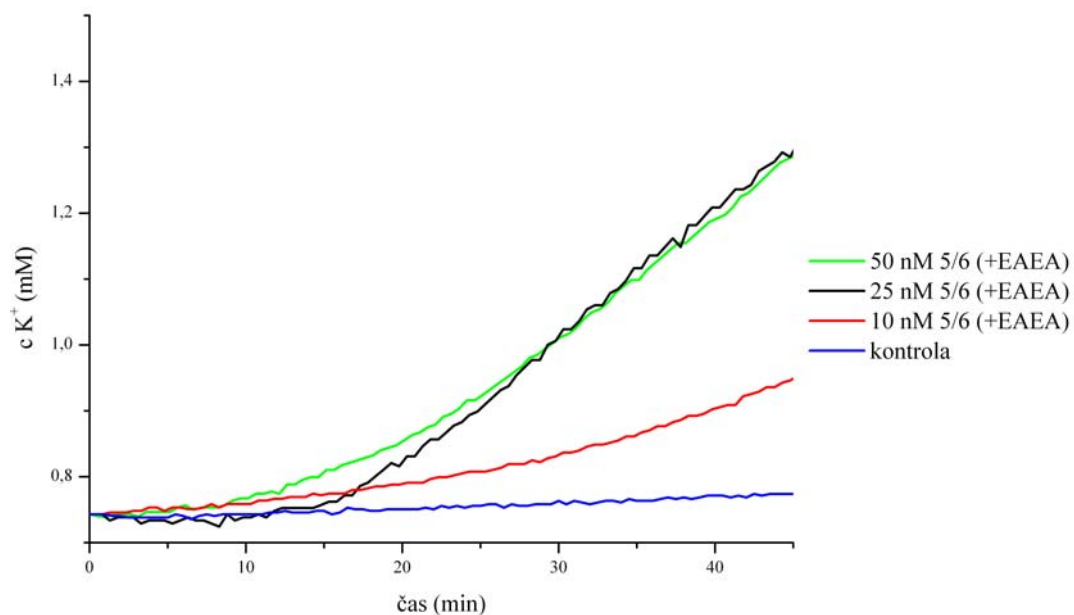
Obr. 29.: Zmena koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí v čase po elicitácii 50, 25, 10 nM L19R (+EAEA).



Obr. 30.: Zmena koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí v čase po elicitácii 100, 50, 25, 10 nM L19R.



Obr. 31.: Zmena koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí v čase po elicitácii 50, 25, 10 nM 8/11 (+EAEA).

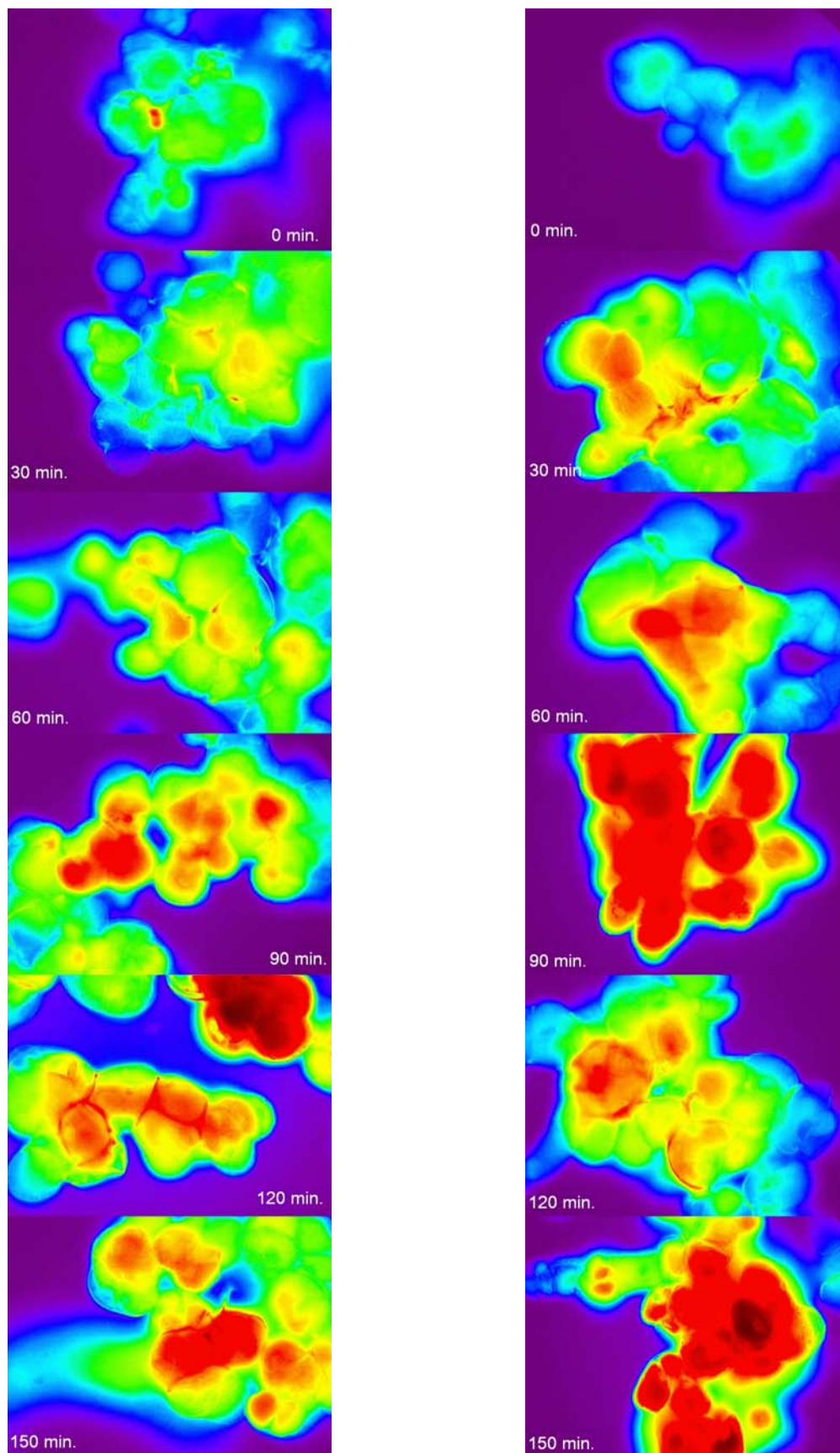


Obr. 32.: Zmena koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí v čase po elicitácii 50, 25, 10 nM 5/6.

6.3. SLEDOVANIE ZMIEN KONCENTRÁCIE OXIDU DUSNATÉHO V BUNKÁCH PO ELICITÁCII S FLUORESCENČNOU SONDOU

Po pridaní 50 nM kryptogéínu do suspenzie buniek som pozorovala pod fluorescenčným mikroskopom nárast fluorescence DAF-5T v čase, v priebehu 150 minút (obr. 32). Keď sa do suspenzie pridal aj L-NMMA, inhibítor NOS, došlo k poklesu intenzity fluorescence, čo je dôkaz toho, že fluorescencia bola spôsobená prítomnosťou NO.

Zmenu koncentrácie NO som sa pokúšala sledovať aj pomocou merania zmien fluorescence na doštičkovom fluorimetri Perkin Elmer LS 50, ale metóda a prístroj neboli dostatočne citlivé, zmena fluorescence nebola pozorovateľná.

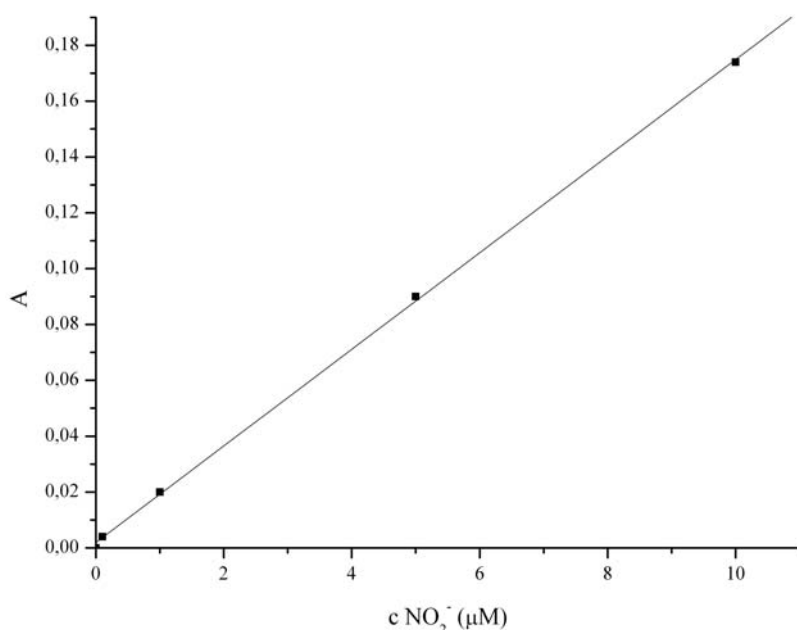


Obr. 32.: Bunky suspenzie tabaku pred elicáciou inkubované s DAF-5DA, elicítované kryptogéinom bez prídavku inhibítora (vpravo), s prídavkom L-NMMA (vľavo), pozorované fluorescenčným mikroskopom. Fotky boli následne upravené v programe Origin, modrá znázorňuje najslabšiu fluorescenciu, červená najsilnejšiu.

6.4. MERANIE ZMIEN KONCENTRÁCIE OXIDU DUSNATÉHO PO ELICITÁCII GRIESSOVOU REAKCIOU

6.4.1. MERANIE ZMIEN KONCENTRÁCIE NO_2^- PO ELICITÁCII

Pre kvantifikáciu množstva vytvorených NO_2^- po vyvolaní obrannej reakcie som si zostrojila kalibračnú priamku (obr. 33), ktorej jednotlivé body som získala zmeraním absorbancie azofarbiva vzniknutého po pridaní Griessovho činidla zloženým z kyseliny sulfanilovej a α -naftylamínu do 0,1 – 10 μM roztoku NaNO_2 . Smernica kalibračnej priamky je 0,0175 a $R^2 = 0,9990$.

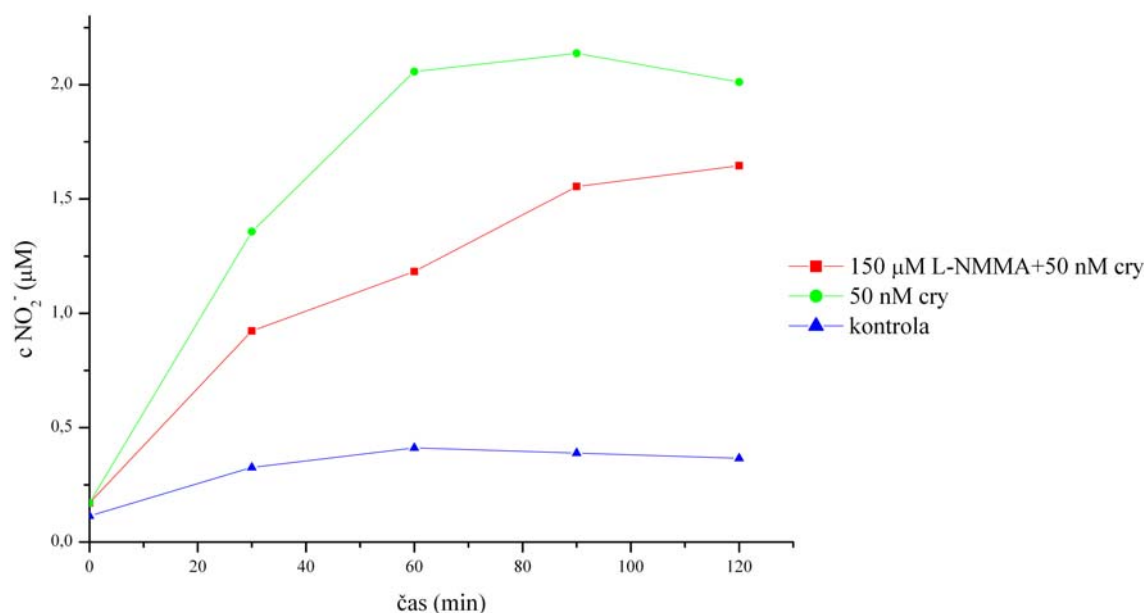


Obr. 33.: Kalibračná závislosť absorbancie na koncentrácii NO_2^- .

Stanovenia koncentrácie NO_2^- som realizovala kolorimetrickou metódou s Griessovým činidlom zloženým z kyseliny sulfanilovej a α -naftylamínu, intenzitu vzniknutého ružového azofarbiva som merala spektrofotometrom pri $\lambda = 540 \text{ nm}$. K elicitácii bunkovej suspenzie som použila kryptogén a MPOC rozpustené vo vode, 50, 25, 10, 5, 1 a 0,5 nM koncentrácie. MPOC použité pre tieto merania neobsahovali vo svojej štruktúre signálnu sekvenciu EAEA na N-konci. Ako kontrolu som použila čistú suspenziu buniek bez prídavku elicítinov.

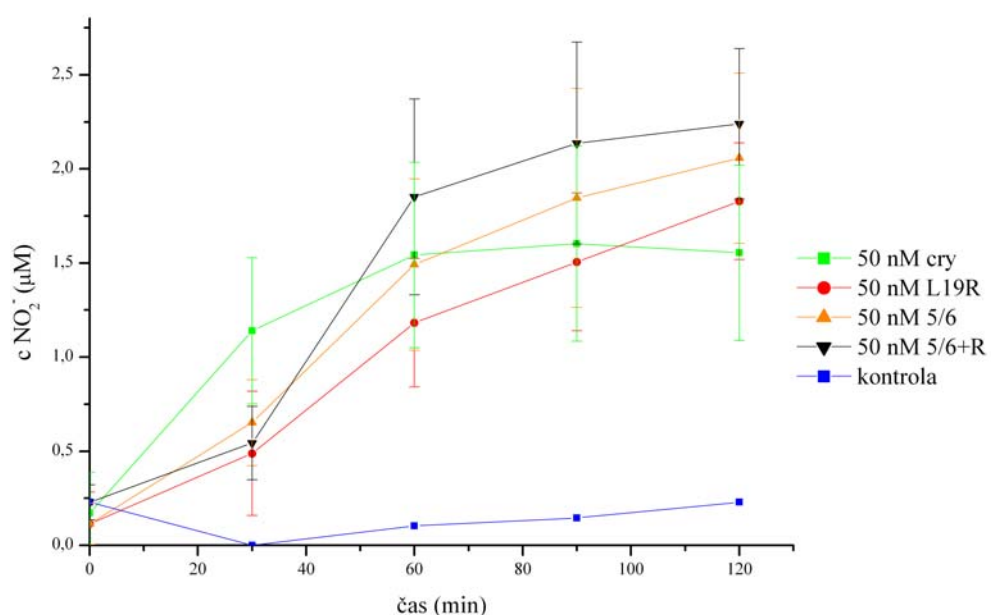
Najskôr som do bunkových suspenzií pridala 50 nM kryptogén a 50 nM kryptogén so 150 μM L-NMMA, očakávala som pokles množstva vytvorených NO_2^- v suspenzii s prídavkom inhibítora oproti množstvu NO_2^- v suspenzii, do ktorej sa žiadny inhibítor

nepridalo, čo sa potvrdilo (obr. 34) a z tohto pokusu možno usudzovať, že NO_2^- vznikajú z NO po elicitácii.

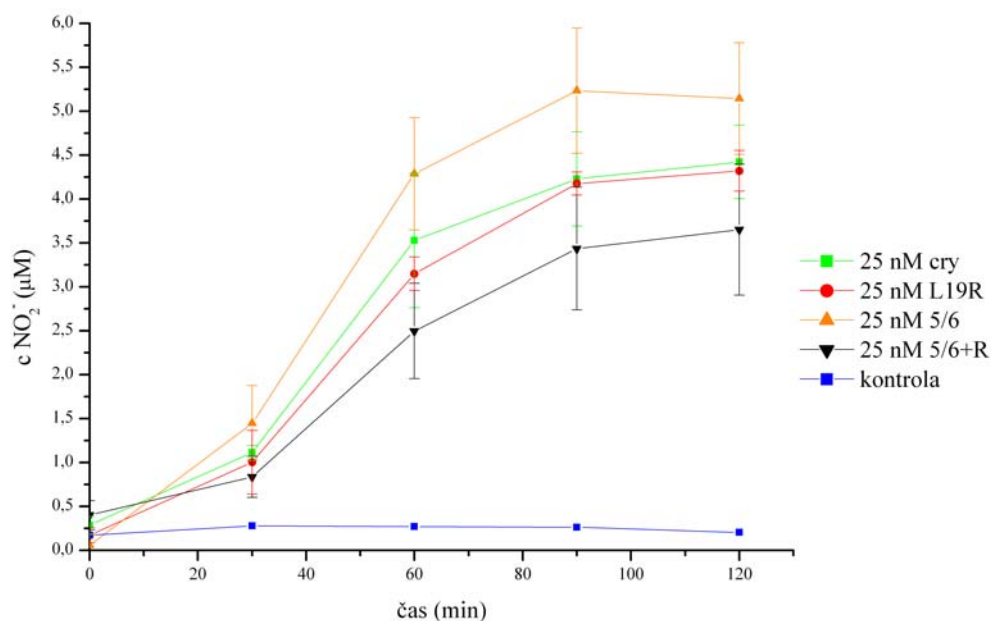


Obr. 34.: Tvorba NO_2^- v čase po elicitácii 50 nM kryptogéinom a 50 nM kryptogéinom so 150 μM L-NMMA.

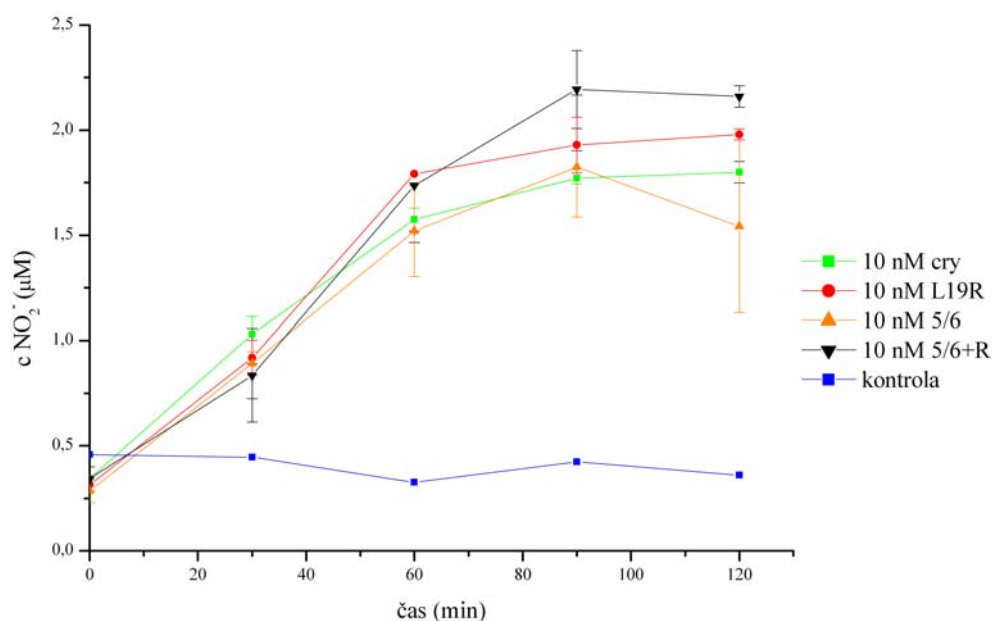
Výsledky meraní tvorby NO_2^- v čase v závislosti na pridanom elicitoru a jeho koncentrácii sú znázornené na nižšie uvedených obrázkoch 35-43. Tvorba NO_2^- vyvolaná jednotlivými elicitínmi danej koncentrácie v 50, 25 a 10 nM koncentracii bola kvantitatívne rovnaká v rámci smerodatných odchýliek merania (obr. 35-37).



Obr. 35.: Vytvorené množstvo NO_2^- v čase po elicitácii rôznymi 50 nM elicitínmi.

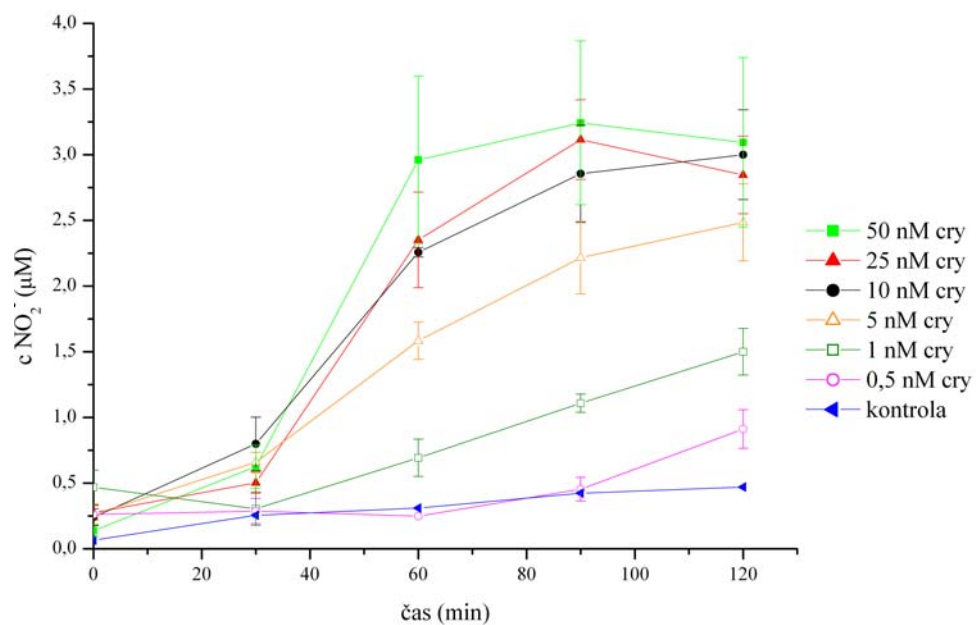


Obr. 36.: Koncentrácia NO₂⁻ v čase po elicitácii rôznymi 25 nM elicitínmi.

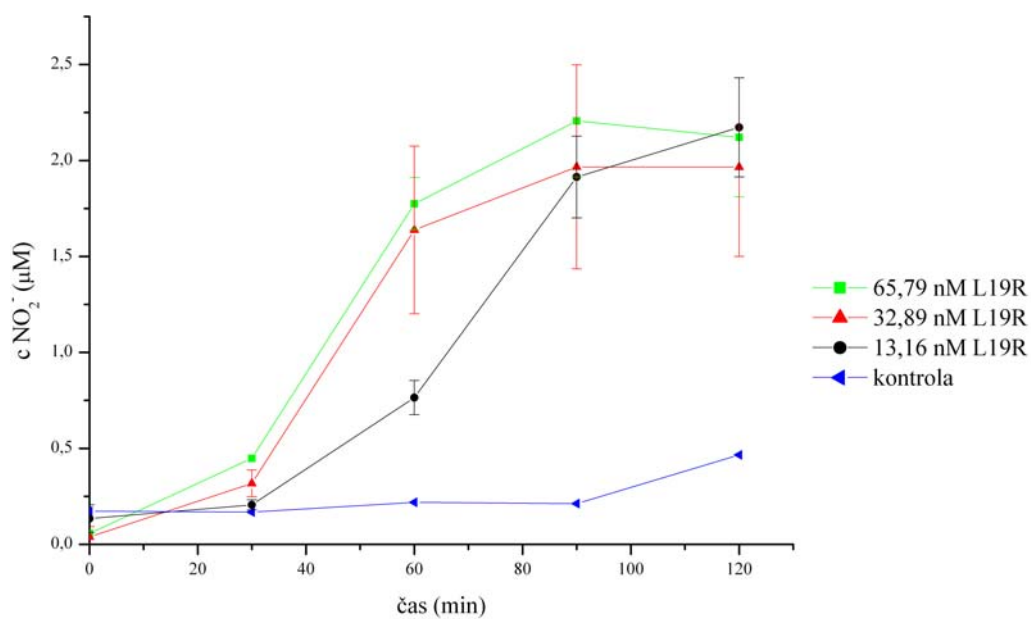


Obr. 37.: Vplyv rôznych 10 nM elicitínov na tvorbu NO₂⁻.

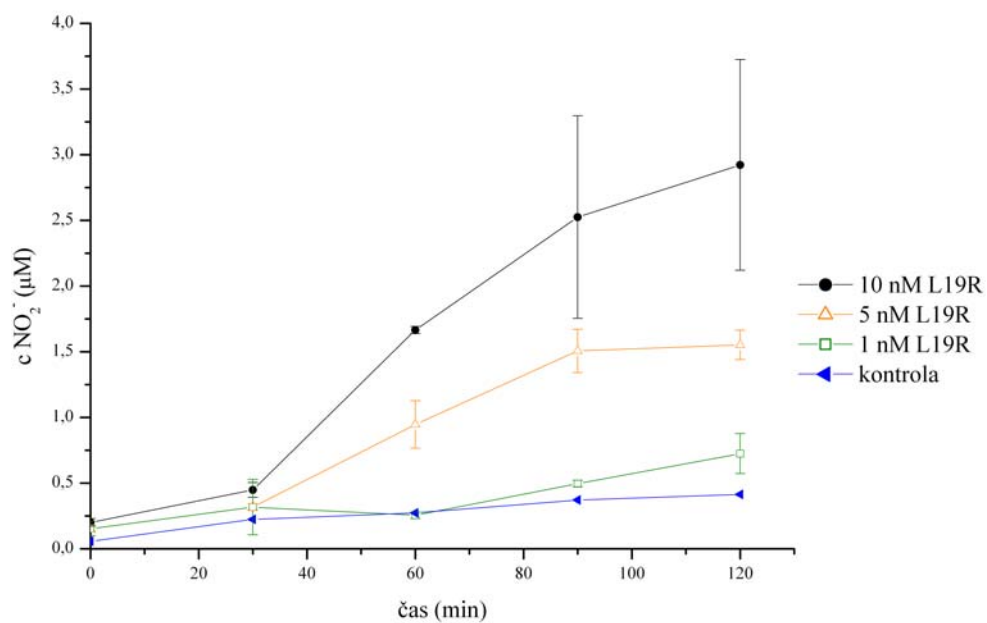
Pre 50, 25 a 10 nM koncentrácie určitého elicitínu porovnávaných navzájom bola tiež pozorovaná rovnaká kvantitatívna odozva v rámci smerodatných odchýliek merania. Toto platilo pre všetky použité elicitíny. Pre nižšie koncentrácie elicitínov 5, 1 a 0,5 nM množstvo vzniknutých NO₂⁻ priamo úmerne klesalo, prahová koncentrácia kryptogéínu vyvolávajúca tvorbu stanoviteľného množstva NO₂⁻ je 0,5 nM (obr. 38), pre ostatné mnou používané elicitíny je 0,5 nM pre 5/6 (obr. 43), 1 nM pre L19R (obr. 40) a 1-5 nM pre 5/6+R (obr. 41).



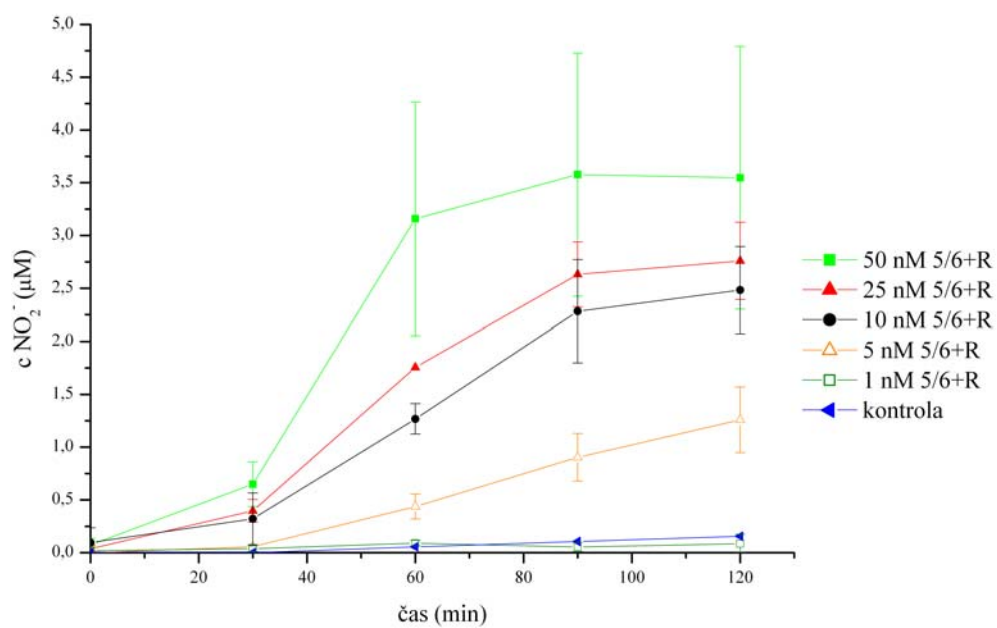
Obr. 38.: Závislosť tvorby NO_2^- v čase na koncentrácii kryptogeynu.



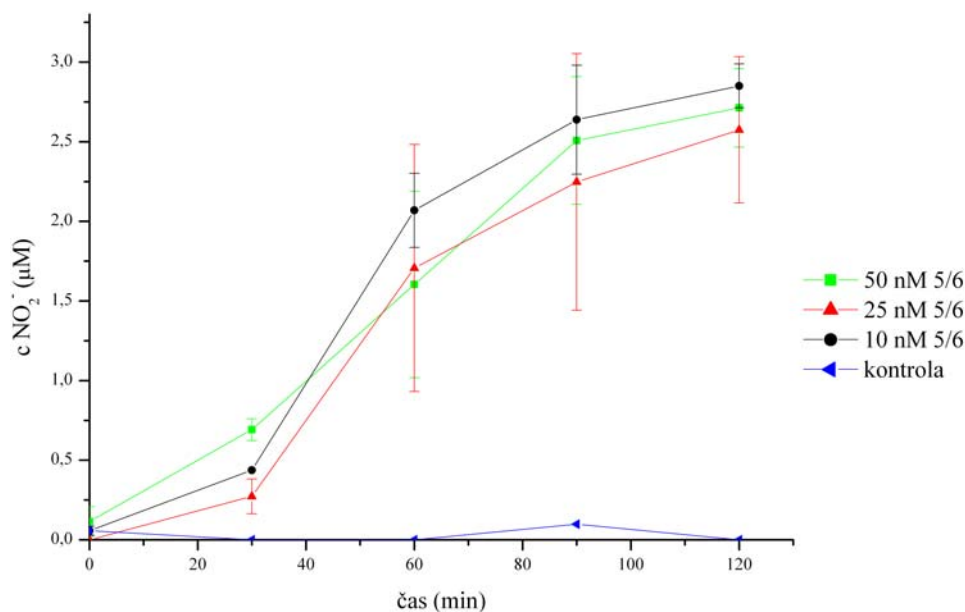
Obr. 39.: Vplyv rôznych koncentrácií L19R na tvorbu NO_2^- v čase.



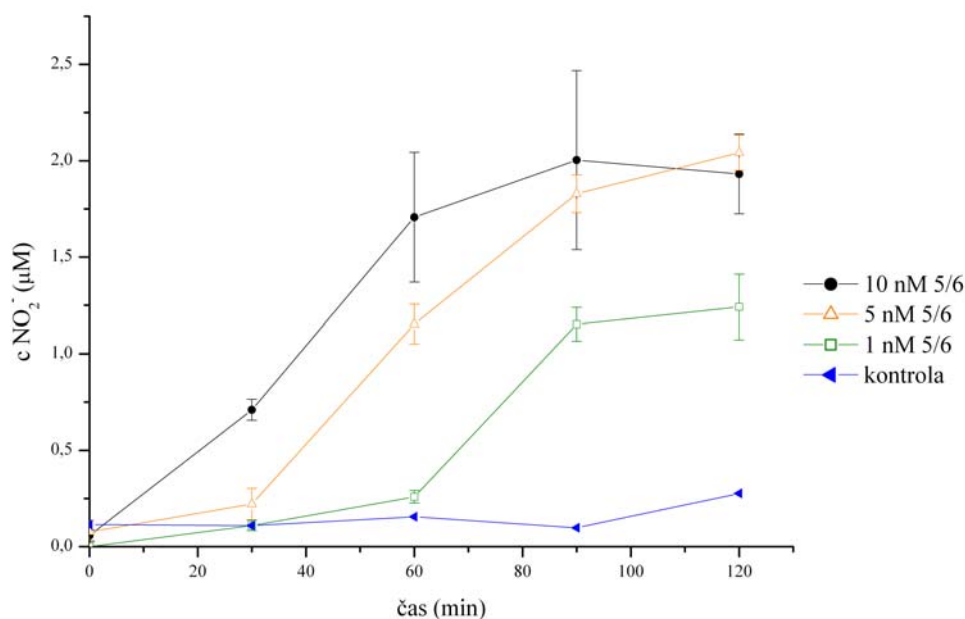
Obr. 40.: Vplyv 1-10 nM L19R na tvorbu NO_2^- v čase.



Obr. 41.: Závislosť tvorby NO_2^- v čase na koncentrácii 5/6+R.



Obr. 42.: Vplyv rôznych koncentrácií 5/6 na tvorbu NO_2^- v čase.



Obr. 43.: Vplyv rôznych koncentrácií 5/6 na tvorbu NO_2^- v čase.

6.4.2. MERANIE ZMIEN KONCENTRÁCIE NO PO ELICITÁCII

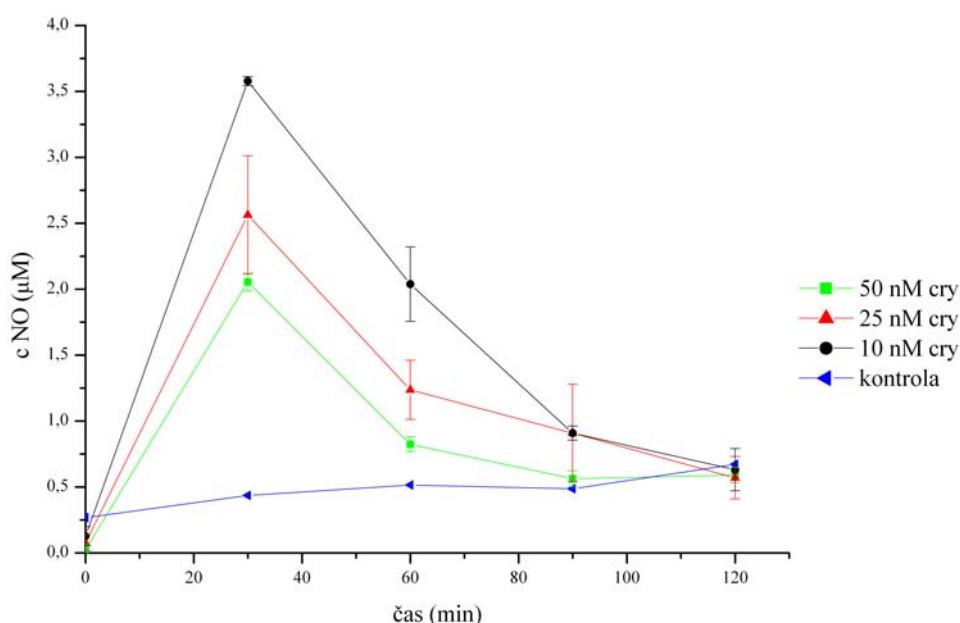
Pre vyhodnocovanie koncentrácie NO som použila kalibračnú priamku z článku z časopisu *Methods in enzymology* [45], jej smernica je 0,0131 a $R^2 = 0,997$.

Koncentráciu NO som stanovovala kolorimetrickou metódou s Griessovým činidlom zloženým zo sulfanilamidu a *N*-(1-naftyl)etylendiamín dichloridu, intenzitu vzniknutého oranžového azofarbiva som merala spektrofotometrom pri $\lambda = 496 \text{ nm}$. K elicitácii bunkovej suspenzie som použila kryptogén a MPOC bez signálnej sekvencie EAEA

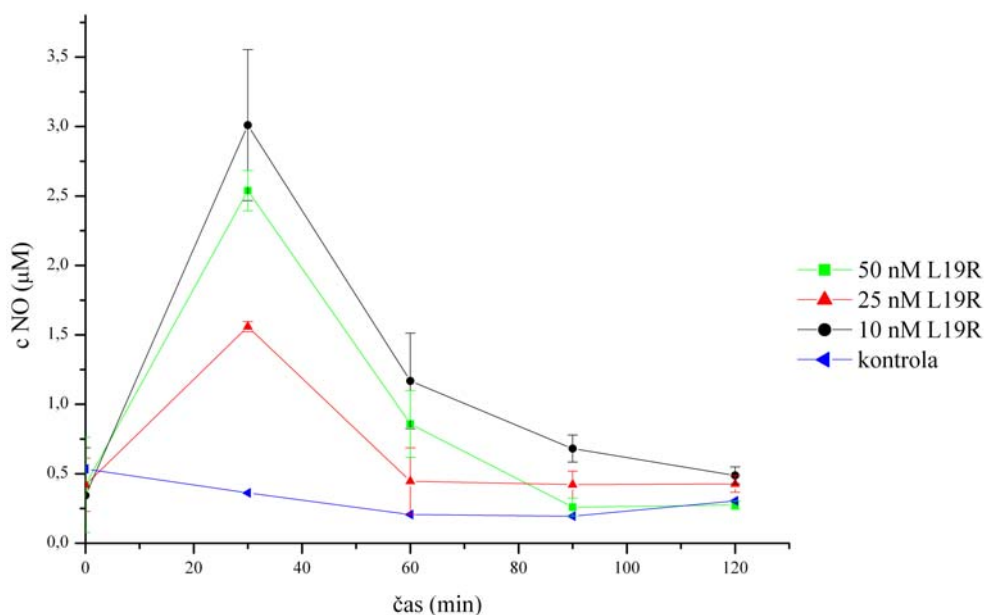
na N-konci rozpustené vo vode, 50, 25, 10, 5, 1 a 0,5 nM koncentrácie. Ako kontrolu som použila čistú suspenziu buniek bez prídavku elicitínov.

Výsledky meraní zmien koncentrácie NO v čase v závislosti na koncentrácii pridaného elicitora sú znázornené na nižšie uvedených obrázkoch 44-47. Pre všetky zmerané elicitíny mi vyšlo, že najväčšiu zmenu produkcie NO vyvoláva daný elicitín v 10 nM koncentrácii.

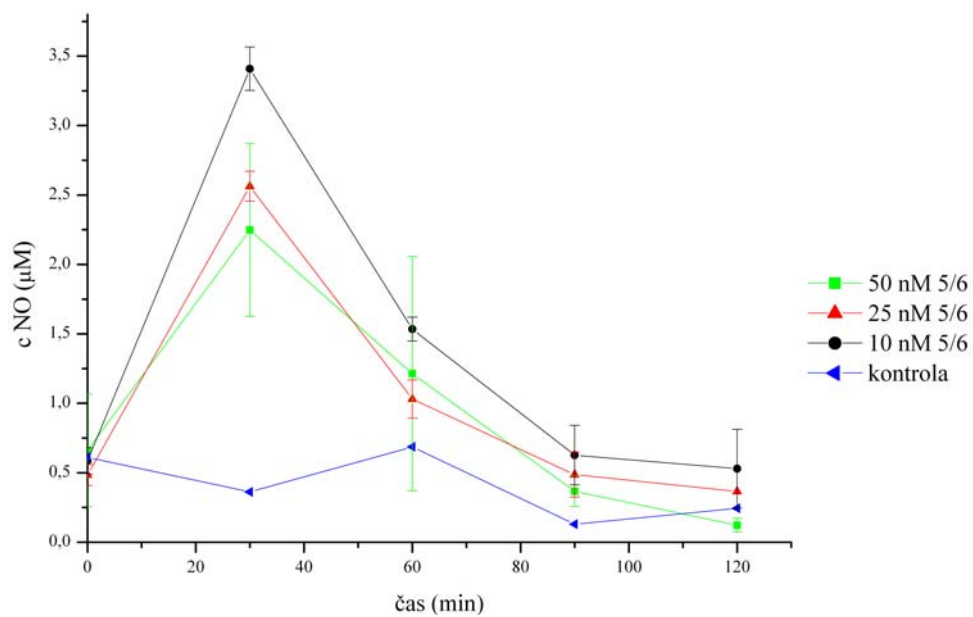
Výsledky získané touto metódou dokazujú, že po vyvolaní obrannej reakcie elicitínmi sa zvýši koncentrácia NO a následne z neho vznikajú NO_2^- . Maximum koncentrácie NO som namerala v čase 30 minút od prídania elicitínu.



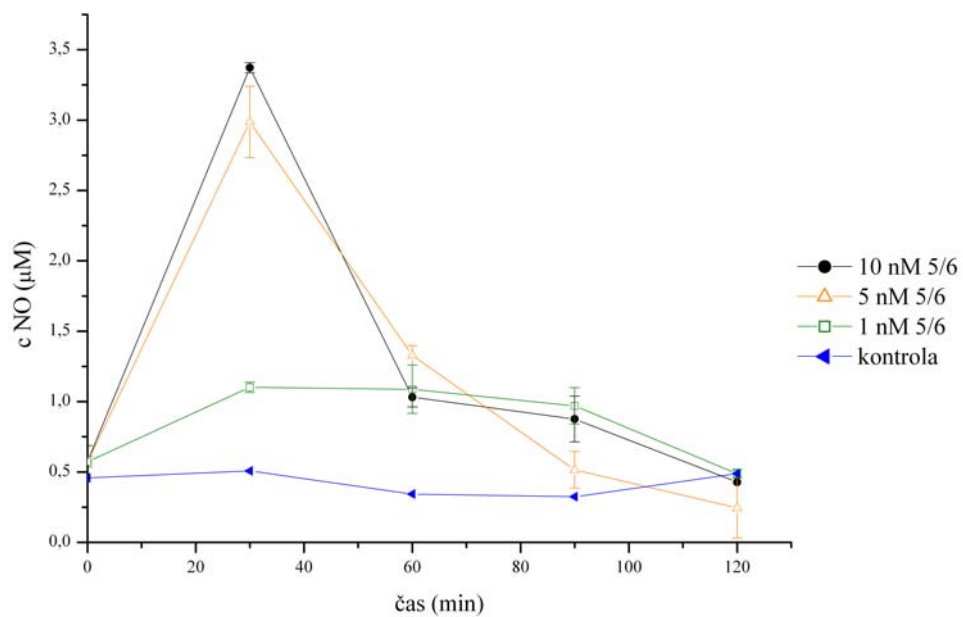
Obr. 44.: Vplyv rôznych koncentrácií kryptogeínu na tvorbu NO v čase.



Obr.45.: Závislosť produkcie NO v čase na koncentrácii L19R.



Obr. 46.: Vplyv rôznych koncentrácií 5/6 na tvorbu NO v čase.



Obr. 47.: Vplyv 1-10 nM 5/6 na produkciu NO v čase.

DISKUSIA

Na základe postupne získavaných poznatkov sa snažíme v našom laboratóriu nájsť alebo pripraviť riadenou mutagenézou vylepšený rekombinantný proteínový elicitor, ktorý by navodil čo najdlhšiu systémovú rezistenciu rastliny proti širokej škále patogénov bez ohrozenia jej ďalšieho života a úrody. Boli pripravené mutantné proteíny odvodené od kryptogéínu so zamenenými aminokyselinovými zvyškami, u ktorých sa predpokladalo, že ovplyvňujú väzbu kryptogéínu so sterolmi [9]. Sledovali sa a sledujú ich pozmenené schopnosti viazania sterolov, mastných kyselín, spustenia syntézy AOS [9], zmien pH [9], produkcie fytoalexínov [47] a ich spôsobilosť viazania sa na väzbové miesta – receptory na cytoplazmatickej membráne [48].

Mojou úlohou bolo zmerať zmenu koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí po elicitácii tabakovej suspenzie kryptogéínom a MPOC, dokázať zvýšenú tvorbu NO po aplikácii kryptogéínu a porovnať kvantitatívne tvorbu NO po pridaní rôznych koncentrácií MPOC a kryptogéínu do suspenzie buniek a tým prispieť k poznatkom ako mutácia zasahuje do rozpoznania elicitoru rastlinou a ako sa mení intenzita a sled jednotlivých krokov vyvolanej obrannej reakcie.

Tok K^+ iónov do extracelulárneho prostredia spolu s vtokom Ca^{2+} a výtokom Cl^- iónov je súčasťou kaskády obrannej reakcie tabakových buniek vyvolanej kryptogéínom. Sledovala som koncentračnú závislosť zmeny množstva K^+ iónov v extracelulárnom prostredí spôsobenú kryptogéínom a porovnávala so zmenami vyvolanými MPOC.

Množstvo K^+ iónov v extracelulárnom médiu sa menilo v závislosti od použitého elicítinu a i od jeho koncentrácie. Zistila som, že najintenzívnejšiu reakciu buniek tabaku po elicitácii, v podobe nárastu koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí, spomedzi testovaných elicítinov spúšťa kryptogéín (obr. 23-26). Z časovej závislosti množstva pretečených K^+ iónov do extracelulárneho prostredia po pôsobení rôznymi koncentraciami kryptogéínu je vidieť, že 50 nM koncentrácia tohto elicítinu je pre vyvolanie výtoku K^+ najúčinnnejšia (obr. 27), po pridaní 100 nM kryptogéínu nebola pozorovaná intenzívnejšia odpoveď. Podľa literatúry ďalšie kryptogéínom vyvolané odpovede, ako extracelulárna alkalizácia, produkcia AOS a fytoalexínov, dosahujú maximálnu intenzitu po elicitácii buniek práve 50 nM koncentráciou tohto elicítinu [49], namerané výsledky dopĺňajú a potvrdzujú publikované výsledky. Ďalej moje merania súhlasia s výsledkami získanými Viardom [19], ktorý udáva, že zmena

koncentrácie K^+ v extracelulárnom prostredí spôsobená kryptogéinom dosiahne maximum po 30-40 minútach.

Pre sledovanie zmien koncentrácie NO bola predom vybratá fluorescenčná metóda s permeabilnou sondou DAF-5DA. Diaminofluoresceíny sú deriváty fluoresceínu často používané ako sondy pre NO [50]. V literatúre je uvádzané, že diaminofluoresceíny nereagujú v neutrálnom roztoku s ďalšími oxidovanými formami NO ako NO_2^- alebo NO_3^- , ani s ďalšími reaktívnymi zlúčeninami ako O_2^- , H_2O_2 , $ONOO^-$ za tvorby fluorescenčného produktu, taktiež že sa za fyziologických podmienok triazolfluoresceín netvorí v neprítomnosti NO [50].

Meranie koncentrácie NO pomocou permeabilnej fluorescenčnej sondy už bolo realizované so suspenziou tabakových buniek použitím flow cytometrie a spektrofluorimetrie [37], a s epidermálnymi bunkami tabaku v spojení s konfokálnou laserovou skenovacou mikroskopiou pre zobrazenie NO v reálnom čase v živých rastlinných bunkách [51]. Lamotte publikoval overenie účinnosti tejto metódy [37], ktoré bolo prevedené inkubáciou tabakových buniek s DAF-2DA a následne s donorm NO dietylamin-NONOátom a meraním úrovne relatívnej fluorescence v pravidelných intervaloch po dobu 5 hodín. Donor vyvolával silný nárast fluorescence, ktorý bol inhibovaný špecifickým NO vychytávačom cPTIO, čo dokazovalo, že fluorescencia bola spôsobená prítomnosťou NO.

Metódu sledovania zmien koncentrácie NO v čase pomocou fluorescenčnej sondy som použila v spojení s fluorescenčnou mikroskopiou pre dokázanie zvýšenej produkcie NO po pridaní kryptogéinu do suspenzie tabakových buniek (obr. 32). Produkcia NO sa prejavila superfluorescenciou DAF-5T. Obdobný nárast fluorescence po elicitácii suspenzie kryptogéinom pozorovali Lamotte [37] a po elicitácii epidermálnych buniek Foissner [51]. Po použití vychytávačov NO a inhibítorov NOS spolu s elicitorom sledovali pohasnutie NO-indukovanej fluorescence, čo bolo výsledkom aj môjho pokusu po pridaní inhibítora NOS L-NMMA spolu s kryptogéinom do suspenzie buniek (obr. 32). Tento pokus preukázal, že zelená superfluorescencia bola naozaj zapríčinená reakciou sondy s NO.

Prakticky som počas pokusu sledovala zmenu medzi zelenou fluorescenciou na začiatku a zelenou superfluorescenciou na konci pod fluorescenčným mikroskopom. Preto som výsledky sledovania zmien koncentrácie NO v podobe fotiek ďalej spracovávala v programe Origin, pseudokolorovala som ich na základe intenzity fluorescence, čo sa ale zle kvantifikuje. Ďalej je známe, že výsledok sledovania

pod mikroskopom je ovplyvnený subjektívnym výberom pozorovaných konkrétnych buniek, nedá sa naraz sledovať zmena intenzity celého preparátu. Kvôli lepšiemu a presnejšiemu vyhodnocovaniu veľkosti zmeny koncentrácie NO sme hľadali modifikáciu tejto metódy alebo inú metódu, ktorú by som mohla použiť k porovnaniu produkcie NO po elicitácii suspenzie buniek rôznymi MPOC.

Na základe posteru [52], ktorého obsahom bolo aj stanovenie produkcie NO Griessovou metódou v extrakte pletiva z infikovaných listov paradajky biotrofnou parazitickou hubou *Oidium neolycopersici*, následne článku o Griessovej metóde stanovenia NO_2^- [46] a technickom bulletíne o Griessovom činidle od firmy Sigma sme sa rozhodli, že zmeriam zmenu koncentrácie NO_2^- po elicitácii bunkovej suspenzie kryptogéinom a následne kryptogéinom za prídania inhibítora NOS L-NMMA. Predpokladali sme na základe literatúry, že NO_2^- vznikajú z NO následnými reakciami [44].

Najskôr som merala zmeny koncentrácie NO_2^- po elicitácii suspenzie v pufrach s rôznym pH, najoptimálnejšie výsledky som získala, keď som bunky nachystané na meranie umiestnila počas elitácie a merania do pufru s pH 8. Predpokladala som zvýšenie množstva NO_2^- po elicitácii suspenzie kryptogéinom, čo sa potvrdilo (obr. 34). Po pridaní inhibítora NOS L-NMMA spolu s kryptogéinom som pozorovala pokles množstva vytvorených NO_2^- v suspenzii oproti množstvu NO_2^- v suspenzii, do ktorej sa žiadny inhibítor nepridal (obr. 34). L-NMMA zainhiboval tvorbu NO po elicitácii a zároveň došlo i k poklesu množstva vytvorených NO_2^- , takže z toho možno vyvodiť, že predpoklad: NO_2^- vznikajú z NO po elicitácii, bol správny, podľa literatúry je to reakciami uvedenými na obrázku 18.

Porovnávala som tvorbu NO_2^- spôsobenú elicitáciou buniek kryptogéinom a MPOC danej koncentrácie navzájom a rôznymi koncentráciami určitého elicítinu. Prišla som k výsledku, že tvorba NO_2^- vyvolaná jednotlivými elicítinmi určitej koncentrácie v 50, 25 a 10 nM koncentrácii bola kvantitatívne rovnaká v rámci smerodatných odchýliek merania (obr. 35-37). Rovnaké tvrdenie, platiace pre všetky elicítiny, je výsledkom vzájomného porovnania 50, 25 a 10 nM koncentrácii vždy jedného elicítinu (obr. 38, 39, 41 a 42). Z výsledkov vyplýva, že mutácie v štruktúre MPOC (zamenené aminokyselinové zbytky v mieste určenom pre väzbu sterolu) nemajú na tvorbu NO_2^- žiadny vplyv pri 10, 25, 50 nM koncentráciách elicítinov. Pri meraní s nižšími koncentráciami elicítinov 5 a 1 nM mi vyšlo, že intenzita tvorby NO_2^- je nižšia po vyvolaní obrannej reakcie L19R a 5/6+R ako po elicitácii buniek kryptogéinom

a 5/6. Je to dôsledkom aminokyselinovej zámény, v proteíne L19R je zamenená hydrofóbná aminokyselina za bazickú, a pridania bazickej aminokyseliny do mutantného proteínu 5/6+R.

V literatúre je uvedené, že rýchlosť NO produkcie pravdepodobne klesá na nulu medzi 2. až 3. hodinou po expozícii kryptogeínom [37], čo je pozorovateľné i v mojich grafoch časovej závislosti zmeny koncentrácie NO_2^- v suspenzii. V čase 120 minút dochádzalo len k minimálnemu zvýšeniu množstva NO_2^- oproti už naakumulovanému.

Po nájdení článku v časopise *Methods in enzymology* sme zistili, že aj priamo NO sa dá kvantifikovať spektrofotometricky Griessovou metódou, ale stanovenie musí byť prevedené za neutrálneho pH, konkrétne 7,4 a vzniknuté sfarbenie zmerané pri inej vlnovej dĺžke $\lambda = 496 \text{ nm}$. Meraniami som získala ďalší dôkaz nezávislou metódou, že NO vzniká po elicitácii kryptogeínom a MPOC. Maximum produkcie NO je v 30. minúte a jej intenzita je rádovo rovnaká s nameranými hodnotami koncentrácie vytvorených NO_2^- . Priebeh závislosti tvorby NO v čase po aplikácii elicitínu podporuje výrok o vzniku NO_2^- z NO z časového hľadiska, najskôr sa po naštartovaní obrany tvorí NO a až potom NO_2^- .

Vyhodnotením závislosti produkcie NO v čase na koncentrácii elicitínu (50, 25, 10 nM) mi vyšlo, že najväčšiu zmenu produkcie NO vyvoláva daný elicitín v 10 nM koncentrácii (obr. 44-46). Líši sa to od výsledku, ktorý som získala pri meraní zmien koncentrácie NO_2^- – pre 50, 25 a 10 nM koncentrácie elicitínu bola tvorba NO_2^- kvantitatívne rovnaká v rámci smerodatných odchýliek merania. Na výsledok merania zmeny produkcie NO môže mať vplyv oxidačný stav bunky a tým ďalšia odpoveď prebiehajúca súčasne po vyvolaní obrannej reakcie – tvorba AOS. Produkcia AOS je závislá na koncentrácii elicitínu použitého k vyvolaniu obrannej reakcie. Pre koncentrácie 10, 25, 50 nM platí priama úmernosť, so zvyšujúcou koncentráciou použitého elicitínu je i tvorba AOS intenzívnejšia. AOS by mohli ničiť vznikajúci NO následnými reakciami s ním, napr. vznik ONOO^- . Dôsledkom by mohlo byť, že vďaka rozdielne intenzívnej tvorby AOS sa zdá, že najväčšiu produkciu NO vyvoláva daný elicitín v 10 nM koncentrácii, ale v skutočnosti všetky koncentrácie (10, 25, 50 nM) vyvolávajú produkciu rovnakého množstva NO. Pre inhibíciu tvorby AOS sa používa inhibítor difenyljodónium, ktorý som však pri svojich meraniach nemohla použiť, pretože blokuje aj NOS.

Keď som pridala k roztoku NaNO_2 mikromolárnej koncentrácie 2. variant Griessovho činidla, ktorého pH je 7,4, nevytvorilo sa žiadne ani ružové a ani oranžové

sfarbenie. Po následnom okyselení došlo k vytvoreniu ružového azofarbiva, ktoré je základom stanovenia Griessovou reakciou pri $\lambda = 540$ nm. Z toho vyplýva, že stanovenia NO a NO_2^- sú naozaj navzájom oddelené a tým selektívnym faktorom je pH, ako to bolo i publikované v časopise *Methods in enzymology* [45], kde je uvedené aj, že prítomnosť NO_2^- bráni vzniku azokomplexu NO s činidlom v 10 mM koncentrácii.

V rámci dlhodobejšieho cieľa nájdenia a prípravy elicítinu, ktorý by navodzoval v rastline čo najdlhšiu rezistenciu voči širokej škále patogénov bez nekrózy rastliny a zníženia úrody, z hľadiska mnou meraných odpovedí, treba nájsť alebo pripraviť elicítin spôsobujúci čo najintenzívnejšiu produkciu NO a taktiež čo najrozsiahlejšiu alkalizáciu extracelulárneho média. Alkalizácia je zapríčinená hlavne činnosťou antiporteru K^+/H^+ , prenášajúceho H^+ do intracelulárneho prostredia a K^+ smerom von z bunky, takže by ten elicítin mal zapričiniť aj čo najvyšší výtok K^+ . Z mnou testovaných elicítinov tieto kritéria najlepšie spĺňa kryptogéin. Ale bohužiaľ kryptogéin spúšťa i veľmi intenzívnu produkciu H_2O_2 , ktorý spôsobuje nekrózu rastliny v mieste napadnutia, čiže kryptogéin pre nás nie je hľadaným elicítinom.

ZÁVER

Zistila som, že tok K^+ iónov do extracelulárneho prostredia a produkcia NO počas obrannej reakcie naštartovanej elicitínmi sú závislé na koncentrácii i druhu použitého elicitínu. Zmerala som závislosť zmeny koncentrácie K^+ iónov a produkcie NO od koncentrácie a druhu elicitínu po vyvolaní obrannej reakcie.

Zistila som, že najintenzívnejší nárast koncentrácie K^+ iónov v extracelulárnom prostredí spomedzi testovaných elicitínov spúšťa kryptogén a 50 nM koncentrácia tohto elicitínu je pre vyvolanie odpovede najúčinnnejšia.

Dokázala som zvýšenú produkciu NO po vyvolaní obrannej reakcie kryptogénom a MPOC v suspenzii tabakových buniek nezávislými metódami – meraním s fluorescenčnou sondou pre NO a Griessovou reakciou.

Potvrdila som, že NO_2^- vznikajú z NO po elicitácii.

Zmerala som, že maximum tvorby NO je v čase 30 minút od pridania elicitínu.

Prišla som k výsledku, že tvorba NO_2^- vyvolaná jednotlivými elicitínmi určitej koncentrácie v 50, 25 a 10 nM koncentrácii bola kvantitatívne rovnaká v rámci smerodatných odchýliek merania. Rovnaké tvrdenie, platiace pre všetky elicitíny, je výsledkom vzájomného porovnania 50, 25 a 10 nM koncentracii vždy jedného elicitínu.

Výsledky dopĺňajú predchádzajúce poznatky o tom, ako sa zmení intenzita odpovedí obrannej reakcie po elicitácii tabakovej bunkovej suspenzie kryptogénom a mutagénmi proteínmi od neho odvodenými.

ZOZNAM SKRATIEK

- AOS – aktívne formy kyslíka
- AtNOS1 – hormonálne aktivovaná NO syntáza
- cPTIO – 2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetrametylimidazolin-3-oxid-1-oxyl
- cry – kryptogéin
- DAF – diaminofluoresceín
- DHE – $\Delta^{5,7,9(11)22}$ -ergostatetraen-3- β -ol dehydroergosterol
- H₄B – tetrahydrobiopterín
- HEPES – *N*-(2-hydroxyetyl)piperazín-*N'*-(2-etánsulfónová kyselina)
- Hsp – heat shock protein
- iNOS – inducibilná NO syntáza
- IRP-1 – železo regulujúci proteín (iron regulatory protein)
- ISE – iónovo-selektívna elektróda
- L-NMMA – L- *N*^G-monometylarginín monoacetát
- LTP – lipid transfer protein
- MES – kyselina 2-N-morfolinoetylsulfónová
- MoCo – molybdénový kofaktor
- MPOC – mutantné proteíny odvodené od kryptogéinu
- NEDD – *N*-(1-naftyl)etylendiamín dichlorid
- Ni-NOR – nitrit: NO-reduktáza
- NiR - nitritreduktáza
- NOS – NO syntáza
- NR – nitrátreduktáza
- PAL – fenylalanínamoniaklyáza
- PCD – programovaná bunková smrť
- PR – „pathogenesis-related“ proteín
- RYR – ryanodínový receptor
- SA – kyselina salicylová
- SAR – systémová získaná rezistencia
- SCP – sterol carrier proteín
- SULF – sulfanilamid
- TMV – vírus tabakovej mozaiky
- XOR – xantínoxidoreduktáza

LITERATÚRA:

- [1]. J. Krátka a kol.: *Phytophthora fragariae* a *Colletotrichum acutatum* – karanténní houbové patogeny jahodníku (identifikace a diagnostika). ÚZPI Praha, 9/2001.
- [2]. W. E. Fry, S. B. Goodwin: Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant disease*, December 1997, 81, 12, 1349-1357.
- [3]. M. Latijnhouwers, P. J. G. M. de Wit, F. Govers: Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in microbiology*, October 2003, 11, 10, 462-469.
- [4]. E. Blumwald, G. S. Aharon, B. C.-H. Lam: Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science*, September 1998, 3, 9, 342-346.
- [5]. M. Ponchet, F. Panabieres, M.-L. Milat, V. Mikeš, J.-L. Montillet, L. Suty, C. Triantaphylides, Y. Tirilly, J.-P. Blein: Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999, 56, 1020-1047.
- [6]. E. Tavernier, V. Stallaert, J.-P. Blein, A. Pugin: Changes in lipid composition in tobacco cells treated with cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant science*, 1995, 104, 117-125.
- [7]. V. Mikeš, M.-L. Milat, M. Ponchet, P. Ricci, J.-P. Blein: The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Letters*, 1997, 416, 190-192.
- [8]. V. Mikeš, M.-L. Milat, M. Ponchet, F. Panabieres, P. Ricci, J.-P. Blein: Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 1998, 245, 133-139.
- [9]. J. Lochman, T. Kašparovský, J. Damborský, H. Osman, A. Marais, R. Chaloupková, M. Ponchet, J.-P. Blein, V. Mikeš: Construction of cryptogein mutants, proteinaceous elicitor from *Phytophthora*, with altered abilities to induce defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry*, May 2005, 17, 44, 6565-6572.
- [10]. S. Bourque, M.-N. Binet, M. Ponchet, A. Pugin, A. Lebrun-Garcia: Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *Journal of biological chemistry*, December 1999, 274, 49, 34699-34705.
- [11]. F. Lecourieux-Ouaked, A. Pugin, A. Lebrun-Garcia: Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Molecular plant-microbe interactions*, 2000, 13, 8, 821-829.
- [12]. A. Garcia-Brugger, O. Lamotte, E. Vandelle, S. Bourque, D. Lecourieux, B. Poinssot, D. Wendehenne, A. Pugin: Early signaling events induced by elicitors of plant defense. *Molecular plant-microbe interactions*, 2006, 19, 7, 711-724.

- [13]. S. Zimmermann, J.-M. Frachisse, S. Thomine, H. Barbier-Brygoo, J. Guern: Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol. Biochem.*, 1998, 9, 36, 665-674.
- [14]. A. Lebrun-Garcia, F. Ouaked, A. Chiltz, A. Pugin: Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *The plant journal*, 1998, 15, 6, 773-781.
- [15]. T. Munnik, R.F. Irvine, A. Musgrave: Phospholipid signalling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1389, 222-272.
- [16]. D.Lecourieux, C. Mazars, N. Pauly, R. Ranjeva, A. Pugin: Analysis and effects of cytosolic free calcium elevations in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*, 2002, 14, 2627-2641.
- [17]. D. Lecourieux, O. Lamotte, S. Bourque, D. Wendehenne, C. Mazars, R. Ranjeva, A. Pugin: Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium*, 2005, 38, 527-538.
- [18]. R. Mittler: Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, September 2002, 7, 9, 405-410.
- [19]. M. P. Viard, F. Martin, A. Pugin, P. Ricci, J.-P. Blein: Protein Phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant physiology*, 1994, 104, 1245-1249.
- [20]. F. Simon-Plas, C. Rustérucci, M.-L. Milat, C. Humbert, J.-L. Montillet, J.-P. Blein: Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant, cell and environment*, 1997, 20, 1573-1579.
- [21]. Ch. Rustérucci, V. Stallaert, M.-L. Milat, A. Pugin, P. Ricci, J.-P. Blein: Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant physiology*, 1996, 111, 885-891.
- [22]. R. A. Leigh: Potassium homeostasis and membrane transport. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 2001, 164, 193-198.
- [23]. A.-A. Véry, H. Sentenac: Molecular mechanisms and regulation of K^+ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2003, 54, 575-603.
- [24]. D. P. Schachtman: Molecular insights into the structure and function of plant K^+ transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1465, 127-139.
- [25]. M. E. Senn, F. Rubio, M. A. Banuelos, A. Rodriguez-Navarro: Comparative functional features of plant potassium HvHAK1 and HvHAK2 transporters. *Journal of biological chemistry*, November 2001, 276, 48, 44563-44569.

- [26]. F. Gamble, N. Uozumi: Properties of *Shaker*-typ potassium channels in higher plants. The journal of membrane biology, February 2006, 210, 1-19.
- [27]. D. Wendehenne, A. Pugin, D. F. Klessig, J. Durner: Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. Trends in plant science, April 2001, 6, 4, 177-183.
- [28]. S. J. Neill, R. Desikan, J. T. Hancock: Nitric oxide signalling in plants. New phytologist, 2003, 159, 11-35.
- [29]. M. R. Chandok, A. J. Ytterberg, K. J. van Wijk, D. F. Klessig: The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. Cell, May 2003, 113, 469-482.
- [30]. O. Lamotte, C. Courtois, L. Barnavon, A. Pugin, D. Wendehenne: Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. Planta, 2005, 221, 1-4.
- [31]. D. Wendehenne, J. Durner, D. F. Klessig: Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. Current opinion in plant biology, 2004, 7, 449-455.
- [32]. M. C. Romero-Puertas, M. Perazzolli, E. D. Zago, M. Delledonne: Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. Cellular microbiology, 2004, 6, 9, 795-803.
- [33]. L. A. del Río, F. J. Corpas, J. B. Barroso: Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. Phytochemistry, 2004, 65, 783-792.
- [34]. C. Stöhr, F. Strube, G. Marx, W. R. Ullrich, P. Rockel: A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. Planta, 2001, 212, 835-841.
- [35]. J. Durner, D. F. Klessig: Nitric oxide as a signal in plants. Current opinion in plant biology, 1999, 2, 369-374.
- [36]. X. Hung, E. Kiefer, U. von Rad, D. Ernst, I. Foissner, J. Durner: Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants. Plant physiology and biochemistry, 2002, 40, 625-631.
- [37]. O. Lamotte, K. Gould, D. Lecourieux, A. Sequeira-Legrand, A. Lebrun-Garcia, J. Durner, A. Pugin, D. Wendehenne: Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. Plant physiology, May 2004, 135, 516-529.

- [38]. P. Bonnet, E. Bourdon, M. Ponchet, J.-P. Blein, P. Ricci: Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology*, 1996, 102, 181-192.
- [39]. L. Suty, J.-P. Blein, P. Ricci, A. Pugin: Early changes in gene-expression in tobacco cells elicited with cryptogein. *Molecular plant-microbe interactions*, September-October 1995, 5, 8, 644-651.
- [40]. D. F. Klessig, J. Durner, R. Noad, D. A. Navarre, D. Wendehenne, D. Kumar, J. M. Zhou, J. Shah, S. Zhang, P. Kachroo, Y. Trifa, D. Pontier, E. Lam, H. Silva: Nitric oxide a salicylic acid signaling in plant defense. *PNAS*, August 2000, 97, 16, 8849-8855.
- [41]. H. Keller, N. Pamboukdjian, M. Ponchet, A. Poupet, R. Delon, J.-L. Verrier, D. Roby, P. Ricci: Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant cell*, February 1999, 2, 11, 223-235.
- [42]. M. T. Chandler, N. Tandeau de Marsak, Y. Kouchkovsky: Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Can. J. Bot.*, 1972, 50, 2265-2270.
- [43]. A. Gomes, E. Fernandes, J. L. F. C. Lima: Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. *Journal of fluorescence*, January 2006, 16, 1, 119-139.
- [44]. E. Planchet, W. M. Kaiser: Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *Journal of experimental botany*, August 2006, 8, 1-13.
- [45]. R. W. Nims, J. C. Cook, M. C. Krishna, D. Christodoulou, C. M. B. Poore, A.M. Miles, M. B. Grisham, D. A. Wink: Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds. *Methods in enzymology*, 1996, 268, 93-105.
- [46]. K. M. Miranda, M. G. Espey, D. A. Wink: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide: biology and chemistry*, 2001, 5, 1, 62-71.
- [47]. Diplomová práca Petry Literákovéj
- [48]. Diplomová práca Zuzany Svozilovej
- [49]. E. Tavernier, D. Wendehenne, J.-P. Blein, A. Pugin : Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant physiology*, 1995, 109, 1025-1031.

- [50]. H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano: Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*, 1998, 70, 13, 2446-2453.
- [51]. I. Foissner, D. Wendehenne, C. Langebartels, J. Durner: *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *The plant journal*, 2000, 23, 6, 817-824.
- [52]. Š. Adámková, L. Luhová, M. Petřivalský, B. Mieslerová, A. Lebeda, P. Peč: The production of nitric oxide and the activity of NO synthase during pathogenesis in tomato. XX. *Biochemický zjazd*, 2006, 286.