

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jan Kapr

Souvislost mezi reakcí na špatně sbalené proteiny (UPR) a imunitou rostlin

Connection between Unfolded Protein Response (UPR) and plant immunity

Bakalářská práce

Školitel: doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 5. 5. 2021

.....

Jan Kapr

Poděkování

Děkuji MSc. Tetianě Kalachové, PhD. za cenné rady a odborný dohled nad přípravou této práce a zároveň školitelce doc. Ing. Lence Burketové, CSc. za ochotný přístup, trpělivost a umožnění provést experimenty, jež byly nepovinným doplňkem této práce.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na specifickou dráhu odezvy rostlinných buněk na stres endoplazmatického retikula – odpověď na špatně sbalené proteiny (Unfolded Protein Response, UPR) a její roli v signalizaci imunity rostlin. V práci jsou shrnuty základní dosavadní poznatky o molekulární podstatě rostlinné imunity a reakcí na přítomnost patogenu, přičemž některé významné molekuly těchto drah jsou dány do souvislosti právě s UPR. Zdůrazněna je mimo jiné role kyseliny salicylové, která spojuje signální dráhy UPR se vznikem lokální i systémové rezistence vůči patogenům. Je zde zmíněna rovněž role fosfolipidů, které se v poslední době ukázaly být významným komponentem signálních drah odezvy na biotický stres v rostlinách.

Klíčová slova: odpověď na špatně sbalené proteiny, endoplazmatické retikulum, imunita rostlin, kyselina salicylová, fosfolipidová signalizace, biotický stres

Abstract

This bachelor thesis is concerned with the specific pathway in a response to endoplasmic reticulum stress in plant cells – the Unfolded Protein Response (UPR) and its role in plant immunity signalling. The work summarizes the main recent knowledges of molecular components of plant immunity and response to plant pathogens, focusing on important molecules that are also connected to UPR. The role of salicylic acid as a molecule on a crossroad between UPR signalling pathways and local and systemic resistance, is highlighted in this work. Recently, the phospholipids have also been shown to be important component of signaling pathways in response to biotic stress in plants and their role is also mentioned.

Key words: Unfolded Protein Response, endoplasmic reticulum, plant immunity, salicylic acid, phospholipid signalling, biotic stress

Seznam použitých zkratek

ABA – kyselina abscisová (abscisic acid)

AvrRpm1, AvrRpt2 – bakteriální proteiny avirulence

BABA – kyselina β -aminomáselná

BiP – binding immunoglobulin protein (typ chaperonu)

BTH – benzothiadiazol

DAG – diacylglycerol

DGK – diacylglycerol kináza

ER – endoplazmatické retikulum

ETI – imunitní reakce vyvolaná bakteriálními efektory (Effector Triggered Immunity)

HR – hypersenzitivní reakce

IRE1 – Inositol-Requiring Enzyme 1

MAMPs – molekuly asociované s mikroorganismy (Microbe-Associated Molecular Patterns)

MTI – imunitní reakce vyvolaná MAMPs (MAMP Triggered Immunity)

NO – oxid dusnatý (nitric oxide)

NPR – Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes

PA – kyselina fosfatidová (phosphatidic acid)

PR proteiny – proteiny spojené s napadením rostliny patogenem (pathogenesis-related)

PCD – programovaná buněčná smrt (programmed cell death)

Pst – *Pseudomonas syringae* pathovar tomato

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

SA – kyselina salicylová (salicylic acid)

SAR – systémově získaná rezistence (systemic acquired resistance)

TF – transkripční faktor

Tm – tunicamycin

WT – wild type (linie *Arabidopsis thaliana* divokého typu)

Obsah

Úvod.....	1
Signalizace v imunitě rostlin.....	3
Imunita rostlin.....	3
Ukládání kalózy jako obranná reakce	5
Úloha kyseliny salicylové v imunitě rostlin.....	6
Souvislost UPR s imunitou rostlin	9
Vznik UPR u rostlin.....	9
Signalizace UPR.....	9
Úloha kyseliny salicylové v UPR	11
Stres ER vyvolává autofágii a buněčnou smrt.....	12
Souvislost mezi UPR a imunitou rostlin	12
Úloha fosfolipidové signalizace v imunitě rostlin	15
Obecné rysy fosfolipidové signalizace u rostlin	15
Souvislost stresu ER a fosfolipidové signalizace	15
Úloha diacylglycerol kináz a kyseliny fosfatidové v imunitě rostlin	16
Experimentální část	18
Metody a materiály.....	18
Pěstování rostlin.....	18
Ošetření rostlin.....	18
Hodnocení poškození listů v reakci na tunicamycin.....	18
Hodnocení tvorby ROS v reakci na tunicamycin.....	19
Výsledky.....	20
Hodnocení poškození listů v reakci na tunicamycin.....	20
Hodnocení tvorby ROS v reakci na tunicamycin.....	21
Závěr	26
Seznam použité literatury	27

Úvod

Rostliny neustále čelí útokům ze strany patogenů. Úspěšná obrana vyžaduje silnou reorganizaci metabolismu rostliny. Takové změny zahrnují intenzifikaci biosyntetických procesů, vyžadovaných k produkci antimikrobiálních látek (polysacharidů a proteinů). Tím dochází ke zvýšené zátěži na endoplazmatické retikulum (ER), jenž může vyústit ve specifickou reakci – stres vyvolaný špatně sbalenými proteiny (Unfolded Protein Response, UPR).

ER je místem syntézy většiny sekretovaných proteinů, rozpustných v cytosolu i asociovaných s membránou. Sekretované proteiny představují téměř třetinu všech buněčných proteinů. V ER rovněž dochází k syntéze a modifikacím mnoha druhů lipidů, jako jsou například mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem, fosfolipidy, sfingolipidy nebo také triglyceridy, které jsou složkou rostlinných olejů.

Nejprve byla dráha UPR popsána u živočichů a kvasinek, ale probíhá stejně také u rostlin. Z fyziologického hlediska je dráha spuštěna při akumulaci špatně sbalených proteinů v lumen ER, situaci označované jako „ER stres“, ke které dochází při abiotickém i biotickém stresu. Dráha UPR je konzervována napříč eukaryotními liniemi. Hlavní molekulární komponenty této dráhy byly objeveny v poslední dekádě u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. V rámci UPR dráhy u *A. thaliana* rozlišujeme dvě větve: jednu vedenou přes enzym závislý na inositolu (Inositol-Requiring Enzyme 1, IRE1), multidoménový protein ukotvený v membráně ER, a druhou, závislou na transkripčních faktorech bZIP17 a bZIP28. Prvně jmenovaná větev je aktivována neobvyklým sestřihem mRNA kódující bZIP60, za účasti IRE1. Tato událost, při které dochází ke ztrátě posledního intronu bZIP60, vede k posunu čtecího rámce (open reading frame) a vyúští v translaci proteinu rozpustného v cytosolu, který může být transportován do jádra. Aktivace druhé větve je zprostředkována regulovaným procesem intramembránové proteolýzy, což způsobí ztrátu transmembránové domény proteinů bZIP17 a bZIP28. Tím dochází k uvolnění těchto dvou transkripčních faktorů a jejich relokaci do jádra (Liu et al., 2007).

Tím, že je dráha UPR vyvolána v ER, ovlivňuje funkci různých proteinů lokalizovaných v ER. To je zvláště významné u proteinů zapojených v signalizaci, například fosfolipidové signalizaci. Ovšem vyvolání UPR při ošetření tunicamycinem (Tm) u rostlin *A. thaliana* neovlivňuje fosfolipidový profil, ale postihuje expresi několika genů zapojených v biosyntéze lipidů (Yu et al., 2018). Zároveň bylo zjištěno, že nově objevený protein SVB (SMALLER TRICHOMES WITH VARIABLE BRANCHES), zapojený v UPR, vykazuje schopnost vazby fosfoinositidů (Yu & Kanehara, 2020). Jiný enzym zúčastněný v metabolismu lipidů,

fosfoinositid-specifická fosfolipáza C (PLC) se ukázala být důležitá pro toleranci k UPR, jelikož rostliny *ple2*, mutované v tomto enzymu, vykazovaly zvýšenou citlivost k ošetření Tm (Kanehara et al., 2015). Nedávné práce rovněž poukazují na silnou vazbu mezi změnami v desaturaci membrán a aktivací UPR v rostlinách (Iwata et al., 2018; Nguyen et al., 2019). Bylo také zjištěno, že větev UPR vedoucí přes IRE1/bZIP60 u řasy *Chlamydomonas reinhardtii* reguluje specifické druhy fosfolipidů a mastných kyselin (Yamaoka et al., 2019). Větev IRE1/bZIP60 je navíc pod kontrolou kyseliny salicylové (SA), čímž se UPR dostává do souvislosti s lokální i systémově získanou rezistencí, regulovanou SA (Moreno et al., 2012; Zhang et al., 2015).

V této souvislosti se tedy zkoumání vztahu UPR a lipidové signalizace ukazuje jako zásadní. Fosforylací diacylglycerolu (DAG) katalyzovanou diacylglycerol kinázami (DGK) se tvoří kyselina fosfatidová (PA) (Arisz et al., 2009). DAG jako substrát pro DGK je poskytnut buď fosfoinositid-dependentními fosfolipázami C (PI-PLC), využívajícími fosforylované fosfoinositidy, nebo nespecifickými fosfolipázami C (NPC), které využívají strukturní fosfolipidy (Pokotylo et al., 2013). PA je považována za jednoho z hlavních druhých posílů v rostlinných buňkách (Cacas et al., 2017) Při napadení patogeny a při situaci mimikující infekci přidáním elicitorů, stejně jako při působení různých druhů abiotického stresu (sucho, chlad, osmotický stres) byla akumulace PA jednak prokázána farmakologickými postupy, jednak přímo potvrzena biochemickými metodami (Cacas et al., 2017; Hou et al., 2016) Je tedy pravděpodobné, že DGK se podílí na signalizaci ER stresu v mnoha z těchto situací skrze produkci PA.

Tato práce se mimo jiné zaměřuje na diacylglycerol kinázy (především DGK2) a jejich potenciální roli v UPR. DGK2, lokalizovaná v ER (Gómez-Merino et al., 2004), byla doposud dávána do souvislosti s odpověďmi na stres, avšak ne do souvislosti s UPR.

Cílem této práce je vytvořit literární přehled o molekulární podstatě UPR v rostlinách a souvislosti UPR s imunitou rostlin a fosfolipidovou signalizací. Nepovinnou součástí práce je rovněž experimentální část, cílená na testování indukce UPR a poškození listů po ošetření Tm. Hypotézou je, že v listech ošetřených Tm se budou tvořit reaktivní formy kyslíku (ROS) a bude pozorována buněčná smrt.

Signalizace v imunitě rostlin

Imunita rostlin

Obrana rostlin proti patogenům je založena na včasném rozpoznání patogenu a rychlé reakci umožňující patogen zlikvidovat. Některé prvky jsou společné i pro živočichy, ale v imunitě rostlin existují jistá specifika. Imunita rostlin se skládá z více úrovní. Základní úroveň imunitní obrany se aktivuje přítomností molekulárních vzorců asociovaných s mikroorganismy (Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMPs) v apoplastu. Tato úroveň se označuje jako imunita vyvolaná MAMPs (MAMP Triggered Immunity, MTI) a slouží k nespecifické ochraně rostlin proti mikroorganismům. MAMPs se vážou na plazmatické membráně na receptory PRR (Transmembrane Pattern Recognition Receptors) (Jones & Dangl, 2006).

Některé z PRR receptorů jsou závislé na zrání a kontrole kvality složení proteinu v ER (Saijo et al., 2009). Jinou bazální obrannou reakcí je sekrece antimikrobiálních proteinů do apoplastu (Van Loon et al., 2006). Jak receptory vážící MAMPs, tak i antimikrobiální proteiny sekretované do apoplastu procházejí ER. Skládání proteinů a sekreční kapacita ER jsou tedy klíčové pro rychlou a efektivní bazální úroveň obrany (Wang et al., 2005).

Druhou fází imunity je obrana vůči efektorům, které jsou syntetizovány patogeny pro zvýšení jejich virulence. V souvislosti s tím existuje u gram-negativních bakterií, jako je například *Pseudomonas syringae*, sekreční systém III. typu. Tento systém zajišťuje syntézu efektorů, které manipulují hostitelské buňky, aby optimalizovaly prostředí pro růst patogenu. Třetí fází obrany je imunita vyvolaná efektozem (Effector Triggered Immunity, ETI), u rostlin dochází k syntéze intracelulárních receptorů efektorů (NB-LRR proteinů) a hypersenzitivní reakci (HR). Název receptorů je odvozen od přítomnosti nukleotid vazebného místa (NB, Nucleotid Binding) následovaného úsekem repetice bohatých na leucin (LRR, Leucin Rich Repeats). Tyto proteiny se také nazývají proteiny rezistence (R proteiny) a jsou kódovány specifickými geny rezistence (*R* geny). Funkcí R proteinů je rozpoznání přítomnosti efektorů patogenu při infekci. V genomu *A. thaliana* je kódováno zhruba 125 *R* genů. Rostliny jsou velmi polymorfní, co se týče přítomnosti NB-LRR proteinů, což souvisí s velkou diverzitou bakteriálních efektorů typu III vzniklých selekcí za účelem zvýšení úspěšnosti infekce. Reakce rostlin na sekreci efektorů patogenem je zahájena rapidním zvýšením toku kationtů Ca^{2+} , zvýšením koncentrace NO a ROS (Yang et al., 1997; Delledonne et al., 1998). Jsou aktivovány dráhy mitogenem aktivované protein kinázy (MAPKK) a transkripce v rostlinných buňkách je silně pozměněna (Asai et al., 2002). Je aktivován váčkový transport vedoucí ke zvýšené sekreci antimikrobiálních proteinů a složek buněčné stěny zesilujících její pevnost, jako je například

kalóza (Bestwick et al., 1995). Zároveň se akumuluje SA, látka vyvolávající obranu zejména proti biotrofním bakteriálním patogenům, jako je *P. syringae* (Glazebrook, 2005). Dráhy syntézy kalózy a akumulace SA mohou být v rostlinách vyvolány aplikací MAMPs, jako jsou lipopolysacharidy odvozené z buněčné stěny, cold shock protein, purifikovaný flagelinový peptid flg22 (epitop z nejkonzervovanější části bakteriálního flagelinu) a Elf18 (peptid reprezentující N-konec bakteriálního elongačního faktoru Tu) (Felix et al., 1999; Kunze et al., 2004).

U *A. thaliana* byly pro flg22 a Elf18 identifikovány specifické receptory. Změny v transkripci vyvolané přítomností MAMPs v rostlinách se značně překrývají a jejich výsledkem je blokace většiny nebo alespoň části obranných reakcí hostitele (Zipfel et al., 2006). Delece jediného typu efektoru patogenu významně snižuje jeho virulenci (He et al., 2004). Patogen tedy syntetizuje více funkčně se překrývajících efektorů, které nejsou homologní, což vyjadřuje hypotézu konvergentní evoluce, kde hnací silou je potřeba manipulovat cílové molekuly hostitele (Grant et al., 2006).

Různé typy efektorů interferují s různými složkami obranných reakcí rostlin. Proteiny AvrE a HopM1 blokují ukládání kalózy řízené signalizací SA (DebRoy et al., 2004). *P. syringae* využívá signalizaci pomocí kyseliny jasmínové (JA) nebo bakteriálního toxinu coronatinu s podobným účinkem jako JA, obě látky totiž reprimují signální dráhy SA (Kunkel & Brooks 2002; Brooks et al., 2005). Některé efekторы blokují HR rostlin a programovanou buněčnou smrt, která byla vyvolána jiným efektozem (Abramovitch et al., 2003). Podle homologie se známými proteiny byla předpovězena enzymatická funkce malé skupiny efektorů typu III. U *P. syringae* a několika dalších druhů jsou široce rozšířené homology podobné efektoru *Yersinia pestis* – proteáze inhibující MAP kinázu u živočichů, ovšem u rostlin tato aktivita prokázána nebyla (Grant et al., 2006). C-terminální doména, která je sdílena mezi efektozem z podskupiny HopAB2, je potřebná pro inhibici buněčné smrti (Janjusevic et al., 2006). Některé efektozem mají vlastnosti transkripčních faktorů. Jejich C-terminální doména může být přenesena do jádra a u rostlin včetně *A. thaliana* vyvolává transkripci (Szurek et al., 2001).

Rostlinné proteiny rezistence nereagují s efektozem přímo vazbou receptor-ligand. Rostlinný imunitní systém využívá proteiny rezistence k monitorování účinku efektorů na proteiny, které jsou patogenem manipulovány za účelem zvýšení jeho fitness a možnosti dalšího šíření. Proteiny NB-LRR tedy rozpoznávají modifikace proteinu, na který cílí efektor patogenu. Rozpoznání modifikace vede k aktivaci proteinu rezistence, který vyvolává rezistenci k chorobám (tzv. Guard model). Vzniká zvýšená a zrychlená obranná reakce, která bývá téměř vždy spojena s HR v místě infekce (Grant et al., 2006).

Ukládání kalózy jako obranná reakce

Kalóza je rostlinný polysacharid, amorfní polymer (β -1,3-glukan). V buněčné stěně je ukládán do útvarů zvaných papily, které se tvoří v místě infekce během raných stádií invaze patogenu. Složí jako matrix pro uložení antimikrobiálních látek. Ukládání kalózy typicky vyvolávají MAMPs, jako je například flg22 nebo Elf18 (Gomez-Gomez et al., 2000; Kunze et al., 2004). Kromě MAMPs mohou ukládání kalózy vyvolat i rostlinné molekulární vzory spojené s poškozením buněčné stěny (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs). V takovém případě je obranná reakce vyvolána oligogalakturonidy (Ridley et al., 2001).

Depozice kalózy vyvolaná MAMPs nebo poškozením buněčné stěny se v poslední době ukázala jako dobrý marker při studiu signálních drah vyvolaných MAMPs nebo studiu represe těchto drah účinkem efektorů zvyšujících virulenci patogenu. Na ukládání kalózy v čase a intenzitu ukládání mohou mít vliv signály z prostředí. Rostliny, které jsou vystaveny lokálnímu útoku patogenu, vyvolávají systémově získanou rezistenci, která je spojena s rozšiřující se depozicí kalózy při sekundární inokulaci patogenem. Kromě toho mohou rozšíření depozice kalózy vyvolat i látky aktivující rezistenci, jako například benzothiadiazol (BTH) – biologicky aktivní analog SA (Kohler et al., 2002) nebo kyselina β -aminomáselná (BABA) (Zimmerli et al., 2000). Ukázalo se, že u *A. thaliana* vyžaduje aktivace kalózy pomocí BABA dráhu závislou na kyselině abscisové (ABA). Jelikož ABA je rostlinným hormonem odpovědi na abiotický stres, je pravděpodobné, že ukládání kalózy aktivované patogeny je zároveň koregulováno abiotickými signály (Flors et al., 2005). ABA se tedy považuje za mnohostranný regulátor rezistence k chorobám. Role ABA však závisí na různých faktorech, především na růstových podmínkách.

Efekt aplikace ABA na ukládání kalózy byl testován za různých růstových podmínek. Pouze kombinace nízké intenzity osvětlení, pěstování na médiu s 5 % sacharózy a přítomnosti antioxidantních vitaminů (kyselina nikotinová, thiamin) zajišťovala podmínky, za kterých ABA potlačovala kalózu, zatímco veškeré jiné kombinace podmínek vykazovaly stimulační efekty ABA na ukládání kalózy. Jelikož kombinace nízké intenzity osvětlení, vyšší koncentrace sacharózy a přítomnost vitaminů potlačuje akumulaci peroxidu vodíku (H_2O_2), předpokládá se, že dopad ABA na změny v ukládání kalózy závisí na hladině ROS v buňce.

Podle experimentů sledujících dynamiku akumulace H_2O_2 v reakci na přítomnost Flg22 a chitosanu (polymeru z buněčné stěny hub), předchází depozici kalózy právě akumulace H_2O_2 . Dynamika odpovědi na použité MAMPs se však lišila. U semenáčků ošetřených chitosanem se peroxid akumuloval v podobných místech jako se ukládala kalóza indukovaná chitosanem. Při působení Flg22 však tato souvislost pozorována nebyla. Ukládání kalózy vyvolané v reakci na

různé MAMPs je tedy zřejmě pod kontrolou různých signálních drah. Rostliny *cat2-1*, mutované v peroxisomální kataláze, vykazovaly výrazně zvýšené hodnoty H₂O₂ vyvolaného přítomností MAMPs, s tím korelovaly i zvýšené hodnoty kalózy. Tento fenotyp odpovídal úloze peroxidu v ukládání kalózy, jelikož mutant má sníženou schopnost odbourávat ROS. Mutant *rbohD*, zasažený v genu *RBOHD* pro NADPH oxidázu (vyvolávající vznik superoxidu) akumuloval při působení Flg22 snížené množství peroxidu a neukládal velké množství kalózy. Za přítomnosti chitosanu mutant *rbohD* ukládal běžné množství kalózy navzdory snížené produkci peroxidu. Ukládání kalózy indukované chitosanem tedy funguje nezávisle na peroxidu produkovaném RBOHD. Mutant *vtc1-1*, jenž hromadí desetkrát nižší koncentrace kyseliny askorbové než rostliny divokého typu (wild type – WT, Col-0), akumuloval silně zvýšené hodnoty H₂O₂ za všech testovaných podmínek, což koreluje se zvýšenými hladinami kalózy syntetizované jako forma bazální rezistence i jako reakce na chitosan. Avšak stejné rostliny nevykazovaly zvýšení hladiny kalózy po působení Flg22.

V rámci ukládání kalózy byl rovněž sledován příspěvek kalóza syntázy PMR4. Rostliny *pmr4-1* (mutantní v kalóza syntáze), syntetizovaly nízké množství kalózy syntetizované a na Flg22 nereagovaly. Chitosan u těchto mutantů sice vyvolal částečnou odpověď v podobě ukládání kalózy, ale hodnoty kalózy byly oproti nemutovaným rostlinám sníženy o 90 %. Kalóza aktivovaná v reakci na Flg22 je tedy zcela odvozena od PMR4, zatímco přibližně 10 % kalózy syntetizované v reakci na chitosan se syntetizuje pomocí jedné nebo více syntáz než PMR4 (Luna et al., 2011).

Úloha kyseliny salicylové v imunitě rostlin

Kyselina salicylová je metabolit široce rozšířený mezi prokaryoty i eukaryoty. Jedná se o beta hydroxy fenolovou kyselinu. V rostlinách byla objevena v relativně malých koncentracích jako chemický posel regulující biologické procesy. Byla tedy jmenována „šestým“ hlavním fytohormonem (rostlinným hormonem). Nejvíce prostudovaná je její funkce „hormonu obrany“ (Raskin, 1992). Jednou z imunitních reakcí rostlin je i vyvolání HR, která může snížit možnost penetrace a šíření patogenu prostřednictvím buněčné smrti v místě infekce. Mutant *A. thaliana hrr1* (nevytváří HR) akumuluje velké množství SA a vykazuje nižší tok iontů spojený s HR (Devadas & Raina, 2002). Mutantní rostliny deficientní v SA naopak vykazují zesílený tok iontů spojený se signalizací imunity (Radojičić et al., 2018). Tato pozorování potvrzují důležitou úlohu SA (případně jejích metabolitů) v regulaci HR a buněčné smrti.

Dalším důležitým aspektem imunity rostlin, v němž je SA zapojena, je systémově získaná rezistence (SAR – systemic acquired resistance). SA byla identifikována jako jedna z několika

molekul zajišťujících mobilní signál pro vyvolání SAR, protože zvýšení koncentrace SA při infekci patogenem bylo pozorováno jak v místě primární infekce, tak i v neinfikovaných pletivech (Malamy et al., 1990). Rostliny exprimující *NahG* (gen *Pseudomonas putida* kódující salicylát hydroxylázu, enzym štěpící SA), jsou deficientní v SAR (Gaffney et al., 1993). Různé studie tedy potvrdily, že zvyšující se koncentrace SA v místě primární infekce i v distálních pletivech je žádoucí pro vznik rezistence k patogenu a zvyšuje rychlost odpovědi na případné budoucí vniknutí patogenu. SA je tedy v rostlině vyvolána endogenně při rozpoznání patogenu, ale imunitní reakce lze vyvolat i exogenně působením SA na rostliny. Genetické pokusy u mutantních rostlin necitlivých na přítomnost SA pomohly identifikovat gen nezbytný pro odpověď na SA, *Nonexpresser of PR gene 1 (NPR1)*. Rostliny mutované v tomto genu jsou náchylné k bakteriálním patogenům (Cao et al., 1994). U *A. thaliana* nacházíme pět paralogů NPR1 – NPR2, NPR3, NPR4, BOP1 a BOP2 (Blade On Petiole), které mají domény typické pro vazbu protein-protein a také domény obvyklé u transkripčních regulátorů. Role NPR1 a NPR2 se ukázala jako pozitivní v downstream regulaci genů odpovědi na SA, zatímco NPR3 a NPR4 jsou negativními regulátory (Castelló et al., 2018). Dráha odpovědi ještě není zcela objasněna, dosavadní modely ukazují, že vyšší koncentrace SA vyvolá monomerizaci NPR1 a jeho translokaci do jádra, kde se váže na transkripční faktory TGA a aktivuje masivní transkripci genů závislých na NPR1. Přímá vazba SA na NPR3 a NPR4 tyto regulátory reprimuje, což ještě zesílí expresi genů závislých na NPR1 (Ding et al., 2018). Kromě změn v transkripci je součástí imunitní reakce zprostředkované SA i produkce složek buněčné stěny zvyšujících její pevnost (např. kalózy a ligninu) a také produkce antimikrobiálních proteinů, například glukonáz a chitináz, které degradují buněčnou stěnu patogenu (Pieterse et al., 2009).

Rostliny často musejí řešit kompromis mezi investicí do růstu a investicí do imunity. Právě SA je látkou, která výrazně ovlivňuje rovnováhu mezi růstem a imunitou. Pokusy na mutantních rostlinách *A. thaliana* ukázaly, že rostliny akumulující SA (např. *dmr6 dlo1*, dvojitý mutant v salicylát hydroxyláze aj.) jsou menší (Zeilmaker et al., 2015; Pluhařová et al., 2019). SA totiž působí na procesy spojené s auxinem. – inhibuje vnímání auxinu a s tím spojenou genovou expresi, a zasahuje také do aktivního mezibuněčného transportu auxinu, jenž je zásadní pro vývoj kořene a prýtu. Transport auxinu kořenem je ovlivněn SA skrze sníženou expresi genu *PID (PINOID)* kódujícího kinázu, která reguluje lokalizaci přenašečů auxinu PIN (Armengot et al., 2016). Vliv SA na transport zprostředkovaný proteiny PIN tedy zřejmě způsobuje změnu distribuce auxinu v kořeni. Rostliny *A. thaliana* ošetřené SA vykazují menší velikost prýtu, kratší kořeny a méně postranních kořenů (Pasternak et al., 2019).

Redukovaný růst mají i rostliny se zesíleným stresem v ER (Ruberti et al., 2017). Stres ER vzniká kvůli masivní transkripci aktivované SA, která řídí syntézu antimikrobiálních proteinů, ale i proteinů lokalizovaných v ER, napomáhajících správnému transportu proteinů v rámci ER, a také proteinů spojených s UPR, jako jsou transkripční faktory bZIP60 a bZIP28 (Nagashima et al., 2014). Procesy spojené s růstem a vývojem rostliny mohou signalizaci a imunitu vyvolanou SA oslabovat. V listech *A. thaliana* a *Nicotiana tabacum* se s jejich věkem postupně snižuje represe signalizace SA. Ve starších listech je tedy silnější exprese PR1 (marker signální dráhy SA) (Berens et al., 2019). Nejvíce studovaným hormonem, co se týče řešení kompromisu mezi růstem a imunitou vyvolanou SA, je auxin. U mutantů necitlivých na auxin (např. *axr2-1*) byla pozorována zvýšená rezistence vůči *Pseudomonas* sp., u dvojitých mutantů v transkripčním faktoru odpovědi na auxin (*ant ail6*) byla snížena auxinová signalizace a zvýšené hladiny SA (Krizek et al., 2016). Avšak ukazuje se, že zvýšená exprese některých genů aktivovaná působením SA za účelem zvýšení imunity nemá vliv na růst a vývoj některých druhů rostlin. Například zesílená exprese genu *AtNPR1* zvýšila rezistenci a v laboratorních podmínkách nijak neovlivnila růst u *A. thaliana* nebo *N. tabacum*, ale u *Oryza sativa* měla negativní dopad na růst rostliny (Silva et al., 2018).

Souvislost UPR s imunitou rostlin

Vznik UPR u rostlin

Nejen vnitřní faktory, jako jsou genetické mutace a dědičné metabolické poruchy, ale i vnější faktory, jako jsou různé abiotické i biotické stresory, vyvolávají v rostlinných buňkách stres ER. Aberantní proteosyntéza, inhibice glykosylace proteinů nebo tvorba disulfidických vazeb, nesprávný transport do Golgiho aparátu a vyčerpání kationtů v ER může vést ke hromadění nesložených a nesprávně složených proteinů v lumen ER. To v rostlinách vyvolává odpověď na nesprávně složené proteiny (Unfolded Protein Response, UPR). UPR se většinou objevuje jako část komplexních odpovědí na stres. Avšak UPR je možné vyvolat také ošetřením rostlin tunicamycinem (Tm) (Okushima et al., 1999). Tm je antibiotikum izolované z bakterie *Streptomyces lysosuperificus* (Takatsuki et al., 1971) a k vyvolání UPR se používá také u kvasinek (Normington et al., 1989) a savců (Brewer et al., 1999). U semenáčků *A. thaliana* ošetřených Tm je inhibována N-glykosylace, což indukuje transkripci chaperonů a enzymů účastnících se glykosylace, skládání a transportu proteinů v sekreční dráze a v signalizaci UPR (Iwata et al., 2008). Součástí odpovědi na stres ER rostlinných buněk je také signalizace do jádra za účelem regulace transkripce genů zapojených ve skládání, ale i degradaci proteinů v ER (ER-Associated Degradation, ERAD) (Kamauchi et al., 2005; Chen et al., 2020).

Signalizace UPR

U rostlin byly v rámci signalizace UPR rozpoznány dvě hlavní větve. Jedna větev zahrnuje membránově vázané transkripční faktory bZIP17 a bZIP28, které jsou po aktivaci uvolněny a přesunuty do jádra, kde se účastní upregulace genů spojených s UPR. Druhá větev je vedena enzymem IRE1, proteinkinázou s duální funkcí (Liu et al., 2007; Nagashima et al., 2011).

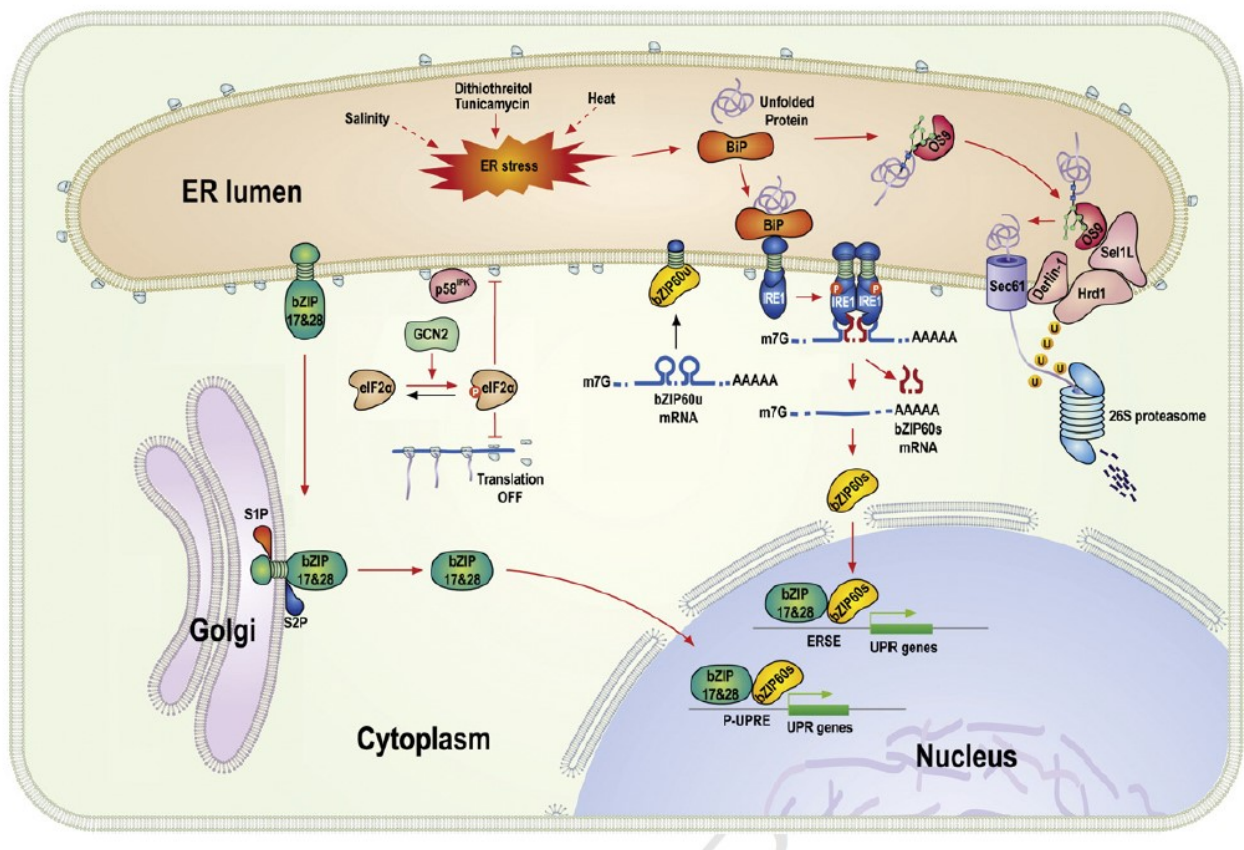
bZIP17 a bZIP28 jsou transkripční faktory (TF) lokalizované v membráně ER. Fungují jako převaděče signálu z ER do jádra při stresu ER. Oba proteiny se skládají z N-koncové bZIP domény, transmembránového segmentu a SIP štěpícího místa na C-koncové doméně transmembránového segmentu. V odpovědi na stres ER jsou bZIP17 a bZIP28 translokovány z ER do Golgi, kde jsou uvolněny N-terminální oblasti za vzniku aktivních transkripčních faktorů. Ty se přesouvají do jádra, kde aktivují transkripci genů signálních drah UPR. Některé geny pozitivně regulované účinkem bZIP28 kódují komponenty drah skládání proteinů v ER, jako například BiP3, calnexin, calreticulin a protein disulfid izomerázu (PDI). Mnoho z těchto genů sdílí ve svém promotoru element 1 odpovědi na stres ER (ERSE1). Tento element váže jak

dimery bZIP, tak i obecné TF. Stres v ER tedy aktivuje jak specifický faktor bZIP28, tak i obecné TF (Liu & Howell, 2010).

Druhé rameno signalizace UPR vedoucí přes enzym IRE1 se zdá být evolučně starší, neboť bylo nalezeno také u modelových organismů *Saccharomyces cerevisiae* (Cox & Walter, 1996), *Caenorhabditis elegans* (Shen et al., 2001), *Drosophila melanogaster* (Hollien a Weissman 2006) a u savců (Tirasophon et al., 1998). U *A. thaliana* existují dva homology enzymu IRE1 – IRE1A a IRE1B. Klíčovými strukturami obou homologů, které jsou sdíleny i v rámci kvasinek a živočichů, jsou N-koncová senzorová doména vystavená do lumenu ER, transmembránová doména a C-koncová kinázová a ribonukleázová doména vystavená do cytosolu (Koizumi et al., 2001). Při stresu ER katalyzuje IRE1 sestřih *bZIP60* mRNA (*bZIP60u*), čímž vzniká sestřižená *bZIP60* mRNA (*bZIP60s*), která kóduje TF bZIP60 s posunutým čtecím rámcem (Open Reading Frame, ORF) v C-koncové oblasti.

U *A. thaliana* může být sestřih vyvolán látkami způsobujícími stres ER, jako je tunicamycin nebo dithiothreitol. Aktivní TF bZIP60 je transportován do jádra k aktivaci transkripce genů spojených s UPR (Deng et al., 2011, Nagashima et al., 2011). Rostliny mutované v jednom ze dvou enzymů (IRE1A nebo IRE1B) nevykazovaly změny v sestřihu *bZIP60* mRNA, avšak u dvojitého mutantu *ire1a ire1b* nebyl tento sestřih detekován. To značí, že IRE1A a IRE1B jsou v sestřihu *bZIP60* mRNA funkčně nadbytečné. Mutant *bZIP60* má v porovnání s WT rostlinami velmi redukovanou aktivaci genů odpovědi na stres ER (Nagashima et al., 2011). TF bZIP60 aktivuje nejen transkripci genů *BiP1/BiP2* a *BiP3*, ale také transkripci sebe samého, což značí, že tento TF je svým vlastním aktivátorem v pozitivní zpětnovazebné smyčce (Iwata & Koizumi, 2005). IRE1A v *A. thaliana* zřejmě hraje roli také v ustavení SAR. Enzym je v tomto případě vyžadován pro aktivaci proteinů zúčastněných v imunitních reakcích při ošetření SA. U mutantů *ire1a* byla pozorována zvýšená náchylnost k bakteriálním patogenům, zatímco u mutantů *ire1b* nedošlo k rozvoji infekce (Moreno et al., 2012).

Tyto dvě dráhy signalizace UPR v rostlinách spolu zřejmě konvergují za účelem pozitivní regulace cílových genů. Některé geny, jako například *BiP3*, jsou totiž částečně závislé na obou faktorech (bZIP28 i bZIP60), aby se aktivovala jejich transkripce (Iwata et al., 2008; Liu & Howell, 2010).



Obr. 1: Schéma drah UPR v rostlinách. (Howell, 2013)

Úloha kyseliny salicylové v UPR

SA u *A. thaliana* indukuje transkripci genů pro chaperony ER. Aktivace genů, jako je *BiP2* je zřejmě závislá na NPR1, proteinu ze signální dráhy SA (Wang et al., 2005). Byl popsán také transkripční faktor TBF1 (HsfB1), který reguluje tyto geny během infekce patogenem a ošetření SA (Pajeroska-Mukhtar et al., 2012). Později bylo zjištěno, že regulace UPR vlivem SA probíhá nezávisle na TBF1.

SA aktivuje transkripci genů *BiP2* i *BiP3*. Jelikož je *BiP3* pod kontrolou dráhy IRE1-bZIP60, bylo testováno, zda je SA také schopna aktivovat tuto dráhu. Transkripce *bZIP60* probíhala ve WT rostlinách, ale neprobíhala u mutantu *ire1a ire1b* při ošetření SA. SA tedy skutečně aktivuje dráhu IRE1-bZIP60. Aktivace této dráhy vlivem SA byla prokázána také díky experimentům na mutantech *NahG*, linie *A. thaliana* necitlivé k SA, neboť SA je u těchto rostlin přeměňována na katechol. Ošetření těchto rostlin SA neaktivovalo transkripci *bZIP60s*, *BiP3*, *SAR1* ani *PRI*. Přítomnost bZIP28n (bZIP28 nucleus form – jaderná forma bZIP28) u mutantu *npr1-1* naznačuje, že SA aktivuje také dráhu bZIP28. bZIP28 je navíc aktivován dříve než bZIP60 (alespoň v laboratorních podmínkách).

Protein NPR1 je důležitým aktivátorem genů odpovědi na SA, mezi nimiž jsou i *PR* geny pro proteiny související s infekcí patogeny (Pathogenesis-Related, PR proteiny). Experimenty s mutanty v NPR1 prokázaly, že transkripce většiny genů UPR není závislá na NPR1, ale existují výjimky, například *BiP2*. (Nagashima et al., 2014).

Stres ER vyvolává autofágii a buněčnou smrt

Kromě reakcí na různé abiotické faktory je autofágie u rostlin také reakcí na infekci. Autofágie v reakci na látky vyvolávající stres ER (např. Tm) způsobuje pohlcení membrán, což bylo pozorováno na některých autofagozómech obsahujících membrány ER i s ribozómy. Pozorování rostlin *A. thaliana* mutovaných v enzymu IRE1B ukázalo, že tyto rostliny mají narušenou tvorbu autofagozómů. To naznačuje, že IRE1B bude klíčový v signální dráze mezi stresem ER a autofágií. Mutant v TF bZIP60 vykazoval normální tvorbu autofagozómů. Role IRE1B spojující stres ER a autofágii tedy bude jiná než role spočívající v sestřihu mRNA (Liu et al., 2012)

Pokud v rostlinných buňkách selže odpověď na hromadění nesprávně sbalených proteinů, vede dlouhotrvající stres ER až k programované buněčné smrti (PCD). Jako „faktor přežití“ byl v rostlinách označen protein Bax Inhibitor 1 (BI1), který funguje jako supresor proteinu Bax vyvolávajícího buněčnou smrt (Watanabe et al., 2008). Proteiny NRP-A a NRP-B objevené u *Glycine max* jsou také komponenty procesu apoptózy vyvolané stresem ER. Transkripce genů pro tyto proteiny je pozitivně regulována proteinem ERD15, syntetizovaného za stresu ER. Zvýšená koncentrace proteinů NRP vyvolá fragmentaci DNA a kaspázovou aktivitu enzymů VPE (Vacuolar Processing Enzymes). Aktivitou těchto enzymů dochází k prasknutí tonoplastu a vylití hydrolytických enzymů, což je typický proces PCD u rostlin (Costa et al., 2008).

Souvislost mezi UPR a imunitou rostlin

Zpracování proteinů je podstatnou funkcí ER k regulaci životních dějů buňky, ale zatím není mnoho důkazů o roli ER v imunitě rostlin. Vztah ER a imunity lze studovat pomocí Tm, jako aktivátoru stresu ER. Imunitní systém rostlin je oslabován stresem ER v reakci na Tm skrze narušení posttranslačních modifikací proteinů důležitých pro vznik imunity a následnou apoptózu a buněčnou smrt.

Při infiltraci Tm do listů *A. thaliana* se akumuluje protein PR1 a kalóza, což značí, že stres ER způsobený Tm by mohl vyvolávat v rostlinách dráhy MTI. K otestování vztahu mezi MAMPs a stresem ER v růstu bakteriálních patogenů byla sledována aktivace PR1 v rostlinách ošetřených Tm, Flg22 nebo oběma látkami zároveň. Akumulace a vyšší hladina transkripce PR1

při ošetření oběma látkami naznačuje, že akumulace PR1 po ošetření Tm je nezávislá na drahách MTI. Inokulace bakteriálních kmenů zahrnujících kompatibilní i nekompatibilní patogeny, včetně kmenů deficientních v sekrečním systému III. typu, vyvolává výrazné symptomy choroby v listech předem ošetřených Tm. Například patogen *P. syringae* pv *phaseolicola* bez své hostitelské rostliny (*Phaseolus vulgaris*) i nekrotrofní patogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* vykazují až stokrát vyšší růst a výraznější symptomy infekce v listech *A. thaliana* ošetřených Tm než v listech bez ošetření. Nadměrný stres ER v důsledku vysoké koncentrace Tm (10 µg/ml) a HR vyvolaná dráhami ETI nakonec vede k buněčné smrti. U listů ošetřených Tm a bakterií *P. syringae* pv *tomato* DC3000 obsahující prázdný vektorový plasmid (Pst EV) nastává buněčná smrt ve větší míře než u listů inokulovaných jen bakteriemi, což značí, že buněčná smrt nastává primárně v důsledku působení Tm.

Ošetření listů Tm a bakteriálními kmeny exprimujícími efektorový protein – *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (Pst DC3000), linie *AvrRpm1* a *AvrRpt2* – které jsou s *A. thaliana* nekompatibilní, na druhou stranu odhalilo aditivní efekt na buněčnou smrt. Dráha vedoucí k buněčné smrti vyvolané Tm je tedy nezávislá na HR způsobené ETI. Jak lze předpokládat, působení bakteriálního kmenu Pst DC3000 *hrcC*⁻, deficientního v sekreci efektorů, tento aditivní efekt nemá. Přestože autoři pozorovali ve svých experimentech aktivaci PR1 a akumulaci kalózy jakožto markery imunity vyvolané MAMPs, hlavním podporovatelem růstu bakterií a buněčné smrti je stres ER vyvolaný působením Tm (Chakraborty et al., 2017).

Ošetření rostlin látkami flg22 a Elf18 aktivuje během jedné až dvou hodin geny *IRE1A* a *IRE1B* asi 1,5-2 x rychleji. Expres genů *IRE1A* a *IRE1B* tedy rychle vzrůstá po inokulaci MAMPs. Inokulací listů variant WT, *ire1a*, *ire1b* a *ire1a/b* (dvojitý mutant v obou variantách *IRE1*) bakterií Pst DC3000 nebyly zjištěny žádné výrazné rozdíly v symptomech ani růstu bakterií mezi WT rostlinami a mutanty. To vedlo k závěru, že příspěvek IRE1 k imunitě zřejmě nebude významný. Jelikož předchozí experimenty prokázaly vyšší náchylnost rostlin ošetřených Tm k bakteriální infekci, byla role IRE1 zkoumána ještě za stresu ER. Rostliny infiltrované kombinací Pst DC3000 a Tm vykazovaly zvýšenou náchylnost k patogenu. U dvojitého mutantu *ire1a/b* byl růst bakterií překvapivě vyšší. To potvrzuje, že dvě kopie *IRE1* jsou schopné vzájemně kompenzovat funkce jedna druhé, pokud jedna verze chybí.

Příspěvek IRE1 byl zkoumán v reakcích vyvolaných MAMPs. Očekává se, že pokud je IRE1 zapojen do inhibice bakterií v návaznosti na MTI, nebude flg22 schopen inhibovat růst bakterií u mutantů *ire1*, protože IRE1 inhibuje v *A. thaliana* růst virulentních gram-negativních bakterií. Po infiltraci WT rostlin a mutantů v IRE1 flg22 a bakterií Pst DC3000 nebyl ve výsledku žádný podstatný rozdíl mezi WT a mutantními rostlinami, což značí, že příspěvek IRE1

k reakcím MTI nebude významný. MAMPs indukují expresi specifické skupiny obranných genů skrze transkripční faktory, jako je například skupina proteinů WRKYs. Ačkoliv hladina exprese některých TF je vyšší u WT oproti mutantu *ire1a/b* (například *WRKY29*), hladina jiných TF naopak nevykazuje rozdíly mezi WT a mutantními rostlinami (například *FRK1*). IRE1 tedy nemá zásadní funkci v MTI (Chakraborty et al., 2020)

U *A. thaliana* je protein RIN4 klíčový pro identifikaci bakteriálních efektorů. Degradaci RIN4 se aktivují proteiny rezistence RPM1 a RPS2, které rozpoznávají přítomnost bakteriálních efektorů AvrRpm1 a AvrRpt2 (Mackey et al., 2002). Další možnost zapojení IRE1 v rostlinné imunitě byla studována s využitím linie bakterií *hrcC*, mutantní v sekreci efektorů typu III. Růst bakterií byl omezený ve srovnání s virulentními liniemi, ale v porovnání mezi WT rostlinami a mutanty v *IRE1* nevykazoval žádné signifikantní rozdíly. Přítomnost virulentních bakterií, jako například *Pst* DC3000, exprimujících *AvrRpm1* nebo *AvrRpt2*, prokázal vyšší růst bakterií vyvolaný AvrRpt2 u mutantů v *IRE1*, přičemž dvojitý mutant *ire1a/b* vykazoval vyšší citlivost k AvrRpt2. IRE1 je tedy zapojen do imunity vyvolané efektor, zprostředkované RPS2, ale není zapojen do imunity zprostředkované RPM1 za stresu ER.

V souvislosti s imunitou vyvolanou bakteriálními efektor často dochází i ke vzniku hypersenzitivní reakce (HR). AvrRpt2 skutečně vyvolává časnou HR v *ire1* mutantech, avšak u dvojitého mutantu *ire1a/b* není reakce podstatně vyšší než u mutantů v jedné z verzí *IRE1*. Experimenty využívající infiltrace AvrRpt2 po ošetření Tm odhalily, že buněčná smrt vyvolaná stresem ER a efektor bakterií byla aditivní. Nebyly pozorovány žádné rozdíly v buněčné smrti mezi dvojitým mutantem *ire1a/b* a jednoduchými mutanty v *IRE1*, ani mezi všemi genotypy při kontrolním ošetření rostlin bakterií *Pst* DC3000. Tyto poznatky značí, že buněčná smrt vyvolaná stresem ER zesiluje HR vyvolanou díky ETI (Chakraborty et al., 2020).

Degradaci proteinu RIN4 se u *A. thaliana* aktivuje RPS2, schopný rozpoznávat AvrRpt2, a tím se aktivuje HR v místě infekce (Mackey et al., 2003). Testování role IRE1 v degradaci RIN4 aktivované AvrRpt2 u rostlin WT, *ire1a*, *ire1b* a *ire1a/b* prokázalo přítomnost RIN4 u všech testovaných genotypů za přítomnosti i nepřítomnosti Tm. U mutantních rostlin bylo po infekci degradováno pouze 30 % RIN4 v porovnání s WT rostlinami. Konformační změny proteinu RIN4 působením AvrRpm1 jsou dostatečné pro aktivaci RPM1. Fosforylace RIN4 působením AvrRpm1 byla zkoumána u rostlin WT, *ire1a*, *ire1b* a *ire1a/b*, ošetřených i neošetřených Tm. Podobné hodnoty fosforylace pozorované u všech genotypů za obou podmínek značí, že fosforylace RIN4 aktivovaná bakteriálními efektor není ovlivněna stresem ER (Chakraborty et al., 2020).

Úloha fosfolipidové signalizace v imunitě rostlin

Obecné rysy fosfolipidové signalizace u rostlin

Fosfolipidy jsou běžnou strukturní součástí lipidové dvojvrstvy plazmatické membrány i jiných buněčných membrán. Fungují však také v přenosu signálu. Jejich přeměnou vzniká vícero bioaktivních lipidů i solubilních molekul, které vazbou na cílové proteiny ovlivňují aktivitu enzymů, váčkový transport i iontový tok a tím se podílejí na utváření metabolismu buňky. Fosfolipidová signalizace je u rostlin striktně regulována a je schopna vysoce reagovat na různé signály z prostředí. Její komponenty se ukázaly být podstatné pro růst a adaptabilitu rostlin.

V membráně jsou k fosfolipidům vázány membránové receptory. Vazba látky z extracelulárního prostředí je signál, kterým se receptor aktivuje. Aktivita receptoru se pak přenáší na aktivitu efektorového enzymu, jenž přeměňuje lipidy na signální molekuly. Takových enzymů existuje více a aktivita každého z nich ústí v jinou signální dráhu. U rostlin se vyskytují fosfolipázy (fosfolipáza A1, A2, C a D), s různou preferencí k substrátům, které hydrolyzují (fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin ad.), a lipidové kinázy fosforylující diacylglycerol (diacyl glycerol kinázy, DGK), inositolfosfát nebo inositolbisfosfát. Aktivitou fosfolipáz i lipidových kináz vznikají významné lipidové signální molekuly (Meijer et al., 2003, Ruelland et al., 2015).

Souvislost stresu ER a fosfolipidové signalizace

Vícero experimentů v poslední době poukázalo na souvislost stresu ER a fosfolipidové signalizace. Komunikace mezi proteiny ER a fosfolipidy byla sledována u proteinových tělísek *Zea mays*, odvozených přímo z membrány ER. Mutace v zásobním proteinu zeinu vyvolala stres ER a zvýšení enzymatické aktivity, včetně aktivity DGK (Shank et al., 2001). U *A. thaliana* se ukázala také fosfolipáza C (AtPLC2) jako důležitý enzym odpovědi na stres ER, neboť rostliny *plc2-1*, mutované v tomto enzymu, vykazovaly zvýšenou náchylnost k ošetření Tm (Kanehara et al. 2015). Pozorování UPR vyvolané u rostlin *A. thaliana* ošetřených Tm odhalilo, že za stresu ER je udržována rovnováha mezi membránovými fosfolipidy, ale transkripce enzymů zapojených v biosyntéze fosfolipidů, je zvýšena (Yu et al., 2018). Další enzymy hrající roli ve stresu ER jsou desaturázy mastných kyselin. Desaturázy glycerolipidů ER jsou významné v odpovědi na stres ER, neboť mutace v těchto enzymech vyvolává při ošetření Tm hypersenzitivní reakci (Nguyen et al., 2019). Vazbu mezi metabolismem lipidů v chloroplastech a stresem ER prokázala studie, kde rostliny mutované v genu *SSI2* (*SUPPRESSOR OF*

SALICYLIC ACID INSENSITIVITY2) pro desaturázu mastných kyselin akumulovaly vyšší hladinu proteinu BiP3 (Iwata et al., 2018). Nově objevený protein SVB (SMALLER TRICHOMES WITH VARIABLE BRANCHES), lokalizovaný v ER a dalších organelách, má schopnost vázat fosfoinositidy a rostliny mutované v tomto proteinu vykazují zvýšenou toleranci ke stresu ER. Transkripce *SVB* je pod kontrolou dráhy UPR IRE1/bZIP60 a je zesílena při stresu vyvolaném Tm (Yu & Kanehara, 2020). U řasy *Chlamydomonas reinhardtii* je v rámci stresu ER důležitý TF CrbZIP1. Výzkum CrbZIP1 odhalil, že tento TF aktivuje expresi enzymů zúčastněných v syntéze některých fosfolipidů a mastných kyselin, a díky tomu je důležitou součástí odpovědi na stres ER skrze přestavbu lipidových molekul (Yamaoka et al., 2019).

Úloha diacylglycerol kináz a kyseliny fosfatidové v imunitě rostlin

Diacylglycerol kinázy (DGK) jsou enzymy mající důležitou funkci v lipidové signalizaci u rostlin. Jejich role spočívá v katalýze fosforylace diacylglycerolu (DAG), závislé na ATP, přičemž vzniká kyselina fosfatidová (PA), zásadní molekula rostlinných metabolických drah vedoucích k odpovědi na stres působící z vnějšího prostředí (Testerink & Munnik, 2005). Aktivita DGK je tedy podstatná pro lipidovou homeostázi skrze udržování dostatečného množství DAG a PA, což zároveň ovlivňuje deriváty PA a jejich aktivitu v lipidové signalizaci (Eichmann & Lass, 2015). Pochopení fungování DGK by tedy mělo být výhodou v dalším zkoumání mechanismu adaptací rostlin na stres. U rostlin se vyskytuje více různých isoform DGK. U *A. thaliana* bylo prokázáno 7 isoform DGK (AtDGK) (Gómez-Merino et al., 2004). V rostlinných buňkách byla jejich aktivita zaznamenána nejprve v jádře (Topham et al., 1998), plazmatické membráně (Lundberg & Sommarin 1992) a chloroplastech (Tan et al., 2018), ale metody bioinformatiky v poslední době předpověděly jako jejich hlavní destinaci ER a další klíčové organely (Carther et al., 2019).

DGK2 u *A. thaliana* obsahuje N-koncovou transmembránovou doménu, která je nezbytná pro lokalizaci tohoto enzymu do membrán, primárně však do membrány ER (Vaultier et al., 2008). U několika rostlinných druhů včetně *A. thaliana* byly provedeny studie role DGK v adaptaci na stres z prostředí. U DGK2 byla zatím prokázána jen úloha v odezvě na působení nízkých teplot (Gómez-Merino et al., 2004; Lee et al., 2005) a sucha (Tan & Wang, 2020). Při ošetření různými druhy MAMPs (například chitosanem) nebo přítomnosti bakteriálních efektorů typu III (AvrRpm1, AvrRpt2) byla u více druhů rostlin pozorována akumulace PA, vzniklá zvýšenou enzymatickou aktivitou nesespecifikovanými isoformami DGK. (Andersson et al., 2006; Raho et al., 2011). PA je významný lipidový sekundární posel, zapojený v odezvách na abiotický

i biotický stres. Jedná se o nejjednodušší fosfoglycerolipid, složený z diacylglycerolu s fosforylovou skupinou, esterifikovanou na sn-3 hydroxyly glycerolové kostry. Specifické interakce hostitel-patogen, ale i obecné elicitory vyvolávají dvoufázovou odpověď prostřednictvím PA, kde první fáze je velmi rychlá (v řádu minut) a zahrnuje dráhy využívající DGK a fosfolipázy C a druhá fáze (v řádu hodin) zahrnuje dráhy fosfolipáz D (Andersson et al., 2006). Současně s tím dochází k akumulaci ROS, což je zřejmě aktivováno díky PA. Po tvorbě ROS a oxidačním vzplanutí často následuje HR, jenž zahrnuje tvorbu antimikrobiálních látek, syntézu PR proteinů a programovanou buněčnou smrt v místě infekce (Testerink & Munnik, 2005; Arisz et al., 2009).

Experimenty s BTH, analogem kyseliny salicylové zvyšujícím rezistenci vůči patogenům, ukázaly aktivaci transkripce genu *OsBIDK1* pro DGK u *Oryza sativa* při působení BTH nebo při infekci houbou *Magnaporthe grisea*. Rostliny *N. tabacum* navíc vykazovaly při zesílené expresi genu *OsBIDK1* zvýšenou rezistenci vůči infekci virem tabákové mozaiky a patogenem *Phytophthora parasitica* (Zhang et al., 2008). Ošetření buněk *N. tabacum* cryptogeinem, proteinem sekretovaným houbou *Phytophthora cryptogea*, vyvolává akumulaci PA, vzniklé aktivitou fosfolipáz C i DGK. Použití inhibitorů DGK způsobuje sníženou produkci PA a silný pokles oxidativního vzplanutí zprostředkovaného NADPH oxidázovou aktivitou enzymu RBOHD. Při ošetření cryptogeinem bylo u *N. tabacum* pozorováno zvýšení exprese DGK5. Ukázalo se tedy, že PA vzniklá aktivitou DGK kontroluje NADPH-oxidázovou aktivitu a DGK5 je zapojena v obranných reakcích na přítomnost MAMPs (Cacas et al., 2017).

Experimentální část

Metody a materiály

Pěstování rostlin

Semena *A. thaliana* linie Col-0 byla sterilizována, ponechána dva dny při teplotě 4 °C k přerušení dormance a poté zaseta do rašelinových tablet Jiffy. Rostliny byly kultivovány v rašelinových tabletách v kultivačním boxu Snijders po dobu čtyř týdnů od zasetí semen v režimu krátkého dne (10 hodin světla, 14 hodin tmy), při 70% vlhkosti, teplotě 22 °C a intenzitě světla 100–130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (podle Ishiga et al., 2011)

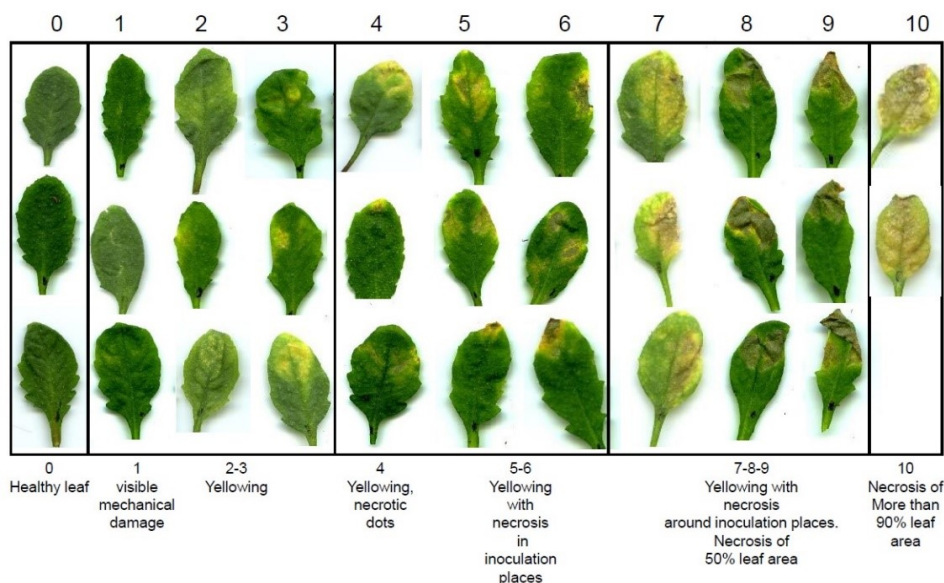
Ošetření rostlin

U každé rostliny staré čtyři týdny byly vždy tři plně vyvinuté pravé listy ošetřeny buď kontrolním 1 μM roztokem „mock“ (voda a DMSO), roztokem latrunculinu B o koncentraci 1 μM (rozpuštěním latrunculinu B ve vodě) nebo roztokem tunicamycinu (Tm) o koncentraci 0,5 mg/ml (rozpuštěním Tm ve vodě). Roztok DMSO navozuje nestresové podmínky, slouží jako kontrolní ošetření. Tm navozuje stres ER a latrunculin B (LatB) narušuje aktinový cytoskelet. Po ošetření byly rostliny dále kultivovány v kultivačním boxu Snijders ve stejném režimu po dobu 24 hodin nebo čtyř dnů.

Hodnocení poškození listů v reakci na tunicamycin

Míra poškození jednotlivých listů vlivem použitých látek byla hodnocena čtyři dny po ošetření. K hodnocení byla použita níže přiložená škála (Obr. 2) s hodnotami od 0 do 10, kde 0 odpovídá zcela zdravému nepoškozenému listu a 10 odpovídá listu, kde nekróza zasahuje více než 90 % plochy. Byl vypočítán aritmetický průměr míry poškození listů v rámci jednotlivých použitých látek (mock/LatB/Tm).

LatB induced symptoms evaluation



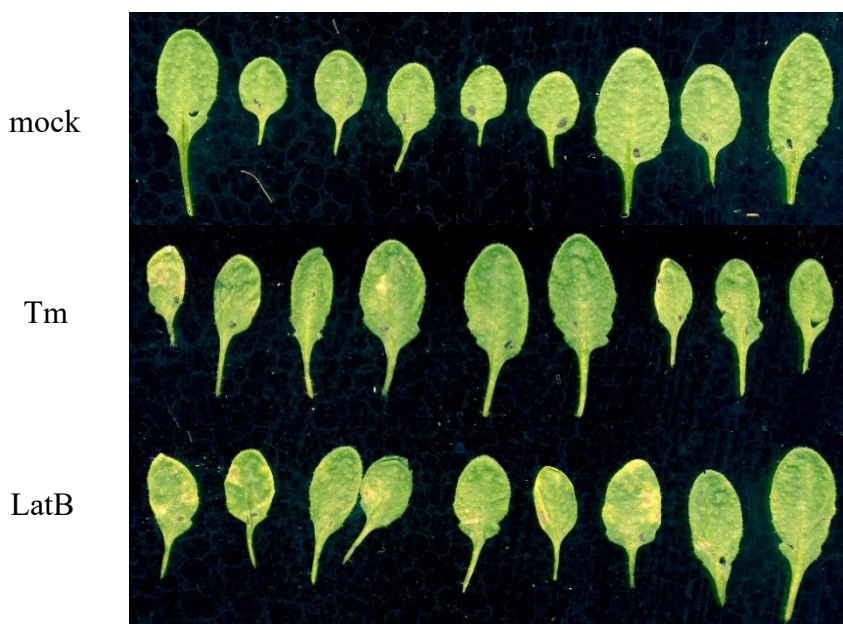
Obr. 2: Škála symptomů na listech po ošetření k hodnocení míry poškození (protokol Laboratoře patofyziologie rostlin ÚEB AV ČR)

Hodnocení tvorby ROS v reakci na tunicamycin

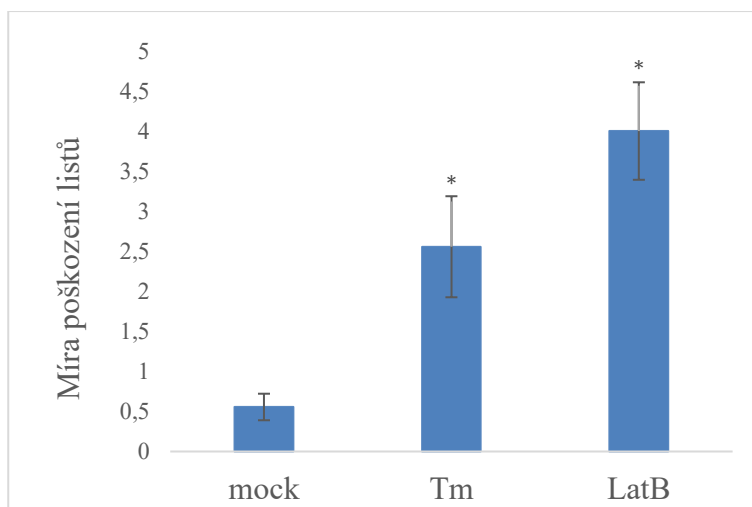
Ošetřené listy byly v čase 24 hodin po ošetření a čtyři dny po ošetření odstřiženy a ve vakuovém exsikátoru infiltrovány roztokem diaminobenzidinu (DAB) o koncentraci 1 mg/ml (DAB rozpuštěn v 10mM TRIS pufru pH 7,8), případně roztokem nitrotetrazoliové modři (NBT) o koncentraci 2 mg/ml (NBT rozpuštěno v 10mM TRIS pufru pH 7,8). DAB se v přítomnosti peroxidu vodíku oxiduje za vzniku hnědého zbarvení, NBT reaguje se superoxidovým aniontem za vzniku nerozpustného tmavě modrého produktu. Po infiltraci byly listy ponechány 2 hodiny na světle a poté ponořeny na 3 dny do 80% ethanolu za účelem odbarvení chlorofylu. Po třech dnech byly listy omyty destilovanou vodou a skenovány (skener Epson, program Epson Scan) pro následnou kvantifikaci tvorby ROS v programu Fiji (Schindelin et al., 2012). Pro každý typ ošetření (mock/Tm/LatB) byla vypočítána průměrná plocha listu, na které se podařilo barvením prokázat vznik ROS (podle Thordal-Christensen et al., 1997; Kumar et al., 2013).

Výsledky

Hodnocení poškození listů v reakci na tunicamycin



Obr. 3: Symptomy na listech v rámci jednotlivých typů ošetření čtyři dny po ošetření



Obr. 4: Míra poškození listů čtyři dny po ošetření. Míra poškození je dána škálou od 0 do 10, kde 0 odpovídá zcela zdravému listu a 10 odpovídá listu, kde je nekrotizováno více než 90 % plochy listu. Graf vyjadřuje aritmetický průměr poškození listů v rámci jednotlivých typů ošetření. Kontrolní roztok „mock“ ($1 \mu\text{M}$) odpovídá nestresovým podmínkám, roztok Tm ($0,5 \text{ mg/ml}$) navodil stres ER a roztok LatB ($1 \mu\text{M}$) narušil aktinový cytoskelet. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru (SEM).

Na Obr. 3 jsou zobrazeny symptomy na listech v rámci jednotlivých typů ošetření čtyři dny po ošetření. Poškození listů bylo kvantifikováno podle výše uvedené škály (Obr. 2). Obr. 4 zobrazuje průměrnou hodnotu poškození listů. V případě kontrolně ošetřených listů (mock) byla

průměrná hodnota poškození nejmenší - 0,56. Po ošetření Tm byla průměrná hodnota poškození listů 2,56. Největší průměrné poškození listů způsobilo ošetření LatB - 4,00.

Hodnocení tvorby ROS v reakci na tunicamycin

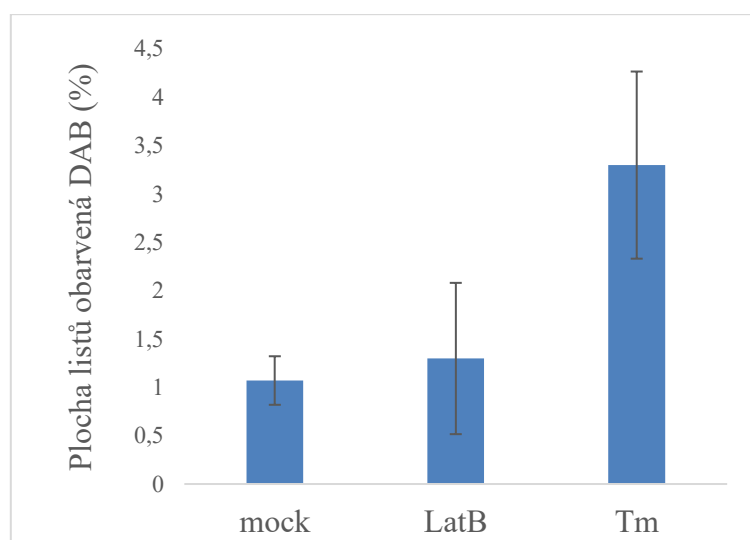
Ošetření rostlin Tm indukovalo stres ER následovaný tvorbou ROS a buněčnou smrtí.

Následující výsledky ukazují kvantifikaci ROS v listech v rámci jednotlivých typů ošetření.

Lokalizace ROS v listech 24 hodin po ošetření



Obr. 5: Vizualizace ROS po barvení DAB v rámci jednotlivých typů ošetření 24 hodin po ošetření. Hnědé skvrny zobrazují přítomnost ROS na základě oxidace DAB účinkem peroxidu.



Obr. 6: Kvantifikace ROS v ošetřených listech pomocí DAB. Graf vyjadřuje aritmetický průměr plochy listů obarvených DAB v rámci jednotlivých ošetření – kontrolním roztokem „mock“ ($1 \mu\text{M}$), roztokem LatB ($1 \mu\text{M}$) narušujícím aktinový cytoskelet a roztokem Tm ($0,5 \text{ mg/ml}$) indukujícím stres ER. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru (SEM). Kvantifikováno pomocí programu Fiji.

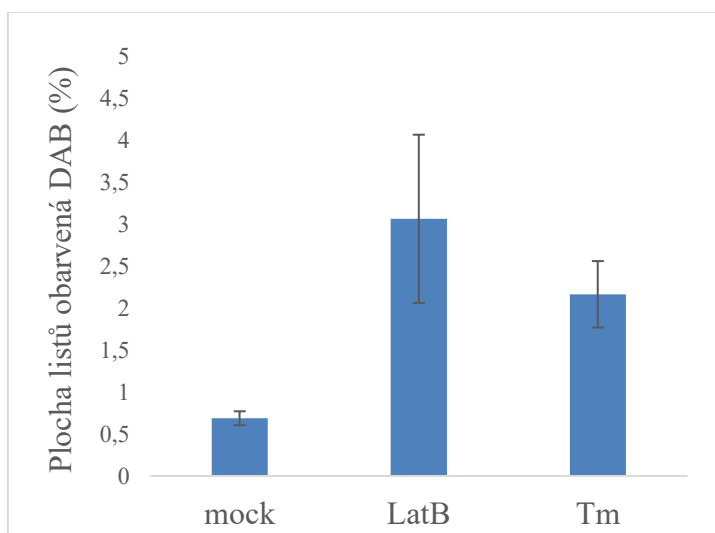
Na Obr. 5 je přítomnost ROS v listech 24 hodin po ošetření zobrazena díky oxidaci DAB v přítomnosti peroxidu. Obr. 6 zobrazuje výsledky kvantifikace ROS v listech. Barvení DAB

vizualizovalo nejméně ROS v kontrolně ošetřených listech (mock) – v průměru na 1,07 % plochy listu. V listech ošetřených LatB byly vizualizovány ROS v průměru na 1,30 % plochy listu. V listech ošetřených Tm vznikaly ROS nejvíce – v průměru na 3,30 % plochy listu.

Lokalizace ROS v listech čtyři dny po ošetření



Obr. 7: Vizualizace ROS po barvení DAB v rámci jednotlivých typů ošetření čtyři dny po ošetření. Hnědé skvrny zobrazují přítomnost ROS na základě oxidace DAB účinkem peroxidu.



Obr. 8: Kvantifikace ROS v ošetřených listech pomocí DAB. Graf vyjadřuje aritmetický průměr plochy listů obarvených DAB v rámci jednotlivých ošetření – kontrolním roztokem „mock“ ($1 \mu\text{M}$), roztokem LatB ($1 \mu\text{M}$) narušujícím aktinový cytoskelet a roztokem Tm ($0,5 \text{ mg/ml}$) indukujícím stres ER. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru (SEM). Kvantifikováno pomocí programu Fiji.

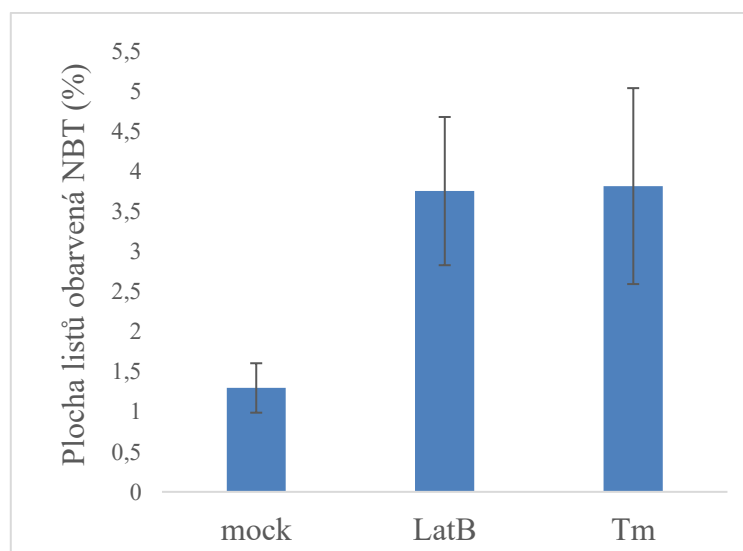
Přítomnost ROS v listech čtyři dny po ošetření je zobrazena díky barvení DAB (Obr. 7). Výsledky kvantifikace ROS v listech zobrazuje Obr. 8. Barvení DAB vizualizovalo nejméně

ROS v kontrolně ošetřených listech (mock) – v průměru na 0,69 % plochy listu. V listech ošetřených LatB bylo vizualizováno ROS nejvíce – v průměru na 3,07 % plochy listu. V listech ošetřených Tm byly vizualizovány ROS na 2,17 % plochy listu.

Lokalizace superoxidového radikálu 24 hodin po ošetření



Obr. 9: Vizualizace superoxidového radikálu po barvení NBT v rámci jednotlivých typů ošetření 24 hodin po ošetření. Modré zabarvení zobrazuje přítomnost superoxidového radikálu díky reakci NBT se superoxidem.

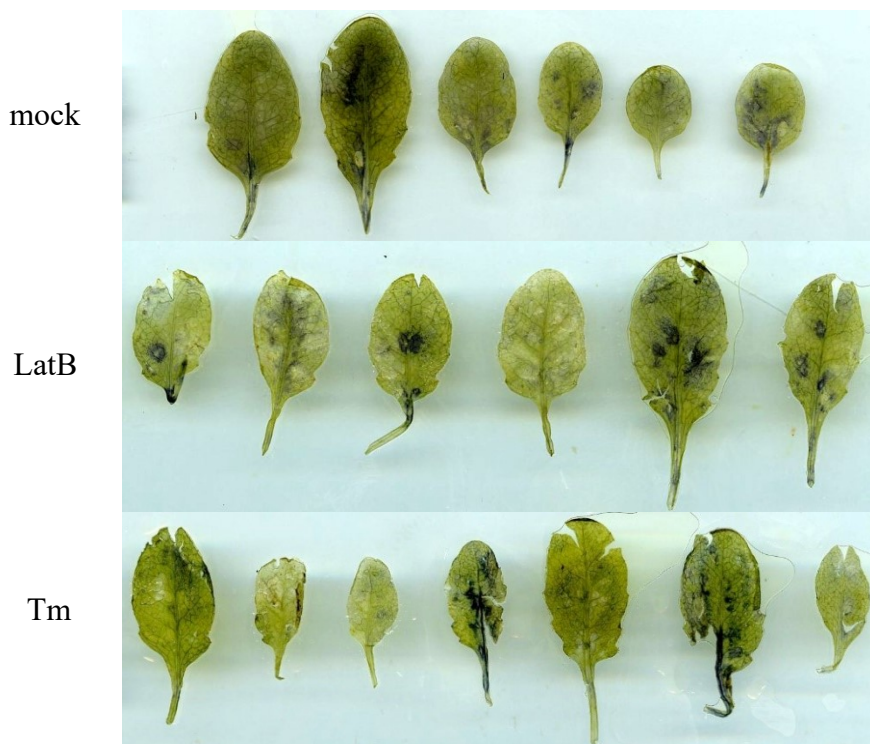


Obr. 10: Kvantifikace superoxidového radikálu v ošetřených listech pomocí NBT. Graf vyjadřuje aritmetický průměr plochy listů obarvených NBT v rámci jednotlivých ošetření – kontrolním roztokem „mock“ (1 μ M), roztokem LatB (1 μ M) narušujícím aktinový cytoskelet a roztokem Tm (0,5 mg/ml) indukujícím stres ER. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru (SEM). Kvantifikováno pomocí programu Fiji.

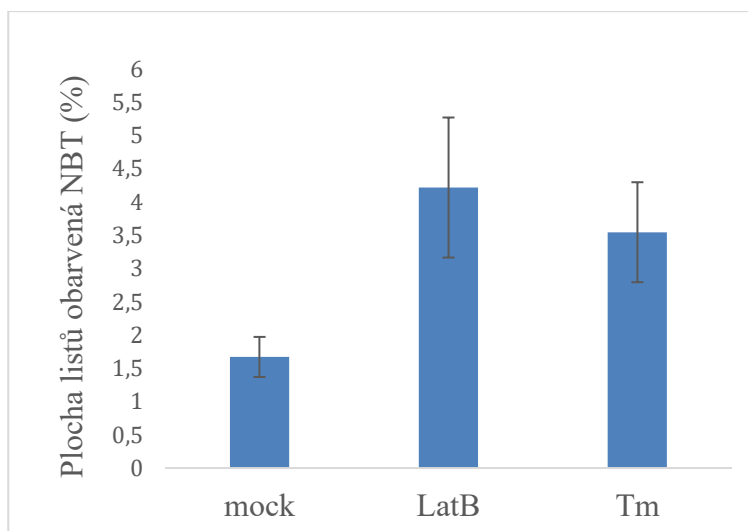
Přítomnost superoxidového radikálu 24 hodin po ošetření vizualizovalo barvení NBT (obr. 9). Výsledky kvantifikace ROS v listech zobrazuje Obr. 10. Nejméně superoxidového radikálu vizualizovalo barvení NBT v kontrolně ošetřených listech (mock) v průměru na 1,30 % plochy

listu. V listech ošetřených LatB byl superoxidový radikál vizualizován v průměru na 3,76 % plochy listu. V listech ošetřených Tm bylo vizualizováno superoxidového radikálu nejvíce, byl lokalizován v průměru na 3,82 % plochy listu.

Lokalizace superoxidového radikálu čtyři dny po ošetření



Obr. 11: Vizualizace superoxidového radikálu po barvení NBT v rámci jednotlivých typů ošetření 24 hodin po ošetření. Modré zabarvení zobrazuje přítomnost superoxidového radikálu díky reakci NBT se superoxidem.



Obr. 12: Kvantifikace superoxidového radikálu v ošetřených listech pomocí NBT. Graf vyjadřuje aritmetický průměr plochy listů obarvených NBT v rámci jednotlivých ošetření – kontrolním roztokem „mock“ (1 μ M), roztokem LatB (1 μ M) narušujícím aktinový cytoskelet a roztokem Tm (0,5 mg/ml) indukujícím stres ER. Chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru (SEM). Kvantifikováno pomocí programu Fiji.

Přítomnost superoxidového radikálu v listech 4 dny po ošetření byla vizualizována barvením NBT (obr. 11) Obr. 12 uvádí výsledky kvantifikace ROS v listech. Barvení NBT vizualizovalo nejméně superoxidového radikálu v kontrolně ošetřených listech (mock) - v průměru na 1,67 % plochy listu. Nejvíce superoxidového radikálu bylo vizualizováno v listech ošetřených LatB – v průměru na 4,22 % plochy listu. V listech ošetřených Tm byl superoxidový radikál vizualizován v průměru na 3,54 % plochy listu.

Experimenty potvrdily, že tunicamycin v listech *A thaliana* indukuje UPR následovanou vznikem ROS a buněčnou smrtí. Vznik ROS je běžným dějem při UPR, protože oxidativní prostředí napomáhá správnému skládání proteinů. Přemíra ROS však vyvolává buněčnou smrt. Existence ROS byla prokázána díky infiltraci DAB, případně NBT. Infiltrace DAB i NBT 24 hodin po ošetření ukázala větší plochu zasaženou ROS v listech předem ošetřených Tm. Rozdíl v množství ROS vizualizovaných pomocí infiltrace DAB a NBT byl pravděpodobně způsoben nedostatečnou infiltrací DAB do listů. Infiltrací DAB čtyři dny po ošetření bylo zjištěno, že v tomto čase je více ROS přítomno v listech ošetřených LatB než v listech ošetřených Tm. Buněčná smrt v reakci na Tm se projevila nekrotizací na listech. Hodnocení symptomů čtyři dny po ošetření prokázalo, že Tm vyvolává symptomy poškození na listech, ale ne tak výrazně jako LatB. Tato metoda může být použita jako základ pro další zkoumání UPR v souvislosti s imunitou rostlin.

Závěr

Studie poslední doby prokázaly jasnou souvislost mezi UPR a imunitou rostlin. Obrana rostliny v přítomnosti patogenu vyvolává poptávku po masivní transkripci, což může způsobit hromadění nesprávně složených proteinů a tím stres v ER. V důsledku toho se aktivují signální dráhy UPR a dochází k transkripci specifických genů odezvy na stres ER. Jako zásadní se ukazuje role kyseliny salicylové, neboť spojuje signalizaci UPR skrze aktivaci dráhy IRE1/bZIP60 (Nagashima et al., 2014) a vznik lokální i systémové rezistence, důležité v obraně proti šíření patogenů v rostlině. Byla také potvrzena role enzymu IRE1 v imunitě vyvolané bakteriálními efekty (Chakraborty et al., 2020). Přibývají rovněž důkazy o zapojení fosfolipidů v signalizaci imunity rostlin. Prokázána je role kyseliny fosfatidové (Andersson et al., 2006; Arisz et al., 2009), dále je třeba objasnit i roli diacylglycerol kináz.

V doplňkové experimentální části práce byla navržena a testována metoda na hodnocení projevů UPR pomocí tunicamycinu. Byly potvrzeny hypotézy, že ošetření listů *A thaliana* Tm bude indukovat UPR, přičemž bude následovat vznik ROS, tvorba nekrotických buněk a buněčná smrt. Přítomnost ROS byla vizualizována barvením DAB, případně NBT a následně kvantifikována. Hodnocením symptomů na listech bylo prokázáno, že Tm vyvolává nekrotické změny na listech.

Přestože signalizace imunity rostlin je již důkladně popsána, jistě o ní není známo vše. Nyní bude důležitým předmětem výzkumu imunity rostlin především role fosfolipidové signalizace a zapojení různých enzymů účastnících se metabolismu lipidů v souvislosti s UPR. Tento výzkum by mohl objasnit další část už tak komplexní rostlinné imunity.

Seznam použité literatury

- Abramovitch, R. B., Kim, Y. J., Chen, S., Dickman, M. B., & Martin, G. B. (2003). Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO Journal*, 22(1), 60–69.
- Andersson, M. X., Kourtchenko, O., Dangl, J. L., Mackey, D., & Ellerström, M. (2006). Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 47(6), 947–959.
- Arisz, S. A., Testerink, C., & Munnik, T. (2009). Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(9), 869–875.
- Armengot, L., Caldarella, E., Marquès-Bueno, M. M., & Martínez, M. C. (2016). The protein kinase CK2 mediates cross-talk between auxin- and salicylic acid-signaling pathways in the regulation of PINOID transcription. *PLoS ONE*, 11(6), 1–15.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., & Sheen, J. (2002). Map kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415(6875), 977–983.
- Berens, M. L., Wolinska, K. W., Spaepen, S., Ziegler, J., Nobori, T., Nair, A., Krüler, V., Winkelmüller, T. M., Wang, Y., Mine, A., Becker, D., Garrido-Oter, R., Schulze-Lefert, P., & Tsuda, K. (2019). Balancing trade-offs between biotic and abiotic stress responses through leaf age-dependent variation in stress hormone cross-talk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(6), 2364–2373.
- Bestwick, C. S., Bennett, M. H., & Mansfield, J. W. (1995). Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiology*, 108(2), 503–516.
- Brewer, J. W., Hendershot, L. M., Sherr, C. J., & Diehl, J. A. (1999). Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8505–8510.
- Brooks, D. M., Bender, C. L., & Kunkel, B. N. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, 6(6), 629–639.
- Cacas, J. L., Gerbeau-Pissot, P., Fromentin, J., Cantrel, C., Thomas, D., Jeannette, E., Kalachova, T., Mongrand, S., Simon-Plas, F., & Ruelland, E. (2017). Diacylglycerol kinases activate tobacco NADPH oxidase-dependent oxidative burst in response to cryptogein. *Plant Cell and Environment*, 40(4), 585–598.
- Cao H., Bowling, S. A., Gordon, A. S., & Dong Xinnian. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 6(11), 1583–1592.
- Carther, K. F. I., Ketchouli, T., Ye, N., Yang, Y. H., Wang, N., Dong, Y. Y., Yao, N., Liu, X. M., Liu, W. C., Li, X. W., Wang, F. W., & Li, H. Y. (2019). Comprehensive genomic analysis and expression profiling of diacylglycerol kinase (DGK) gene family in soybean (*Glycine max*) under abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6).
- Castelló, M. J., Medina-Puche, L., Lamilla, J., & Tornero, P. (2018). NPR1 paralogs of *Arabidopsis* and their role in salicylic acid perception. *PLoS ONE*, 13(12), 1–20.

- Costa, M. D. L., Reis, P. A. B., Valente, M. A. S., Irsigler, A. S. T., Carvalho, C. M., Loureiro, M. E., Aragão, F. J. L., Boston, R. S., Fietto, L. G., & Fontes, E. P. B. (2008). A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 20209–20219.
- Cox, J. S., & Walter, P. (1996). A Novel Mechanism for Regulating Activity of a Transcription Factor That Controls the Unfolded Protein Response. *Cell*, 87, 391–404.
- DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y. B., Nomura, K., & He, S. Y. (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9927–9932.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394(6693), 585–588.
- Deng, Y., Humbert, S., Liu, J. X., Srivastava, R., Rothstein, S. J., & Howell, S. H. (2011). Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), 7247–7252.
- Devadas, S. K., & Raina, R. (2002). Preexisting systemic acquired resistance suppresses hypersensitive response-associated cell death in Arabidopsis hrl1 mutant. *Plant Physiology*, 128(4), 1234–1244.
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell*, 173(6), 1454–1467.e10.
- Eichmann, T. O., & Lass, A. (2015). DAG tales: The multiple faces of diacylglycerol - Stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(20), 3931–3952.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., & Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, 18(3), 265–276.
- Flors, V., Ton, J., Jakab, G., & Mauch-Mani, B. (2005). Abscisic acid and callose: Team players in defence against pathogens? *Journal of Phytopathology*, 153(7–8), 377–383.
- Foka, I. C. K., Ketchouli, T., Zhou, Y., Li, X. W., Wang, F. W., & Li, H. (2020). The emerging roles of diacylglycerol kinase (DGK) in plant stress tolerance, growth, and development. *Agronomy*, 10(9), 1–26.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261(5122), 754–756.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205–227.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., & Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 18(3), 277–284.
- Gómez-Merino, F. C., Brearley, C. A., Ornatowska, M., Abdel-Haliem, M. E. F., María-Inés, Z., & Mueller-Roeber, B. (2004). AtDGK2, a novel diacylglycerol kinase from Arabidopsis thaliana, phosphorylates 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol and 1,2-dioleoyl-sn-glycerol and exhibits cold-inducible gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 8230–8241.

- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., & Dangl, J. L. (2006). Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *60*(6), 425–449.
- He, P., Chintamanani, S., Chen, Z., Zhu, L., Kunkel, B. N., Alfano, J. R., Tang, X., & Zhou, J. M. (2004). Activation of a COI1-dependent pathway in Arabidopsis by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant Journal*, *37*(4), 589–602.
- Hollien, J., & Weissman, J. S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*, *313*, 104–107.
- Hou, Q., Ufer, G., & Bartels, D. (2016). Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell and Environment*, *39*(5), 1029–1048.
- Chakraborty, R., Macoy, D. M., Lee, S. Y., Kim, W. Y., & Kim, M. G. (2017). Tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress suppresses plant immunity. *Applied Biological Chemistry*, *60*(6), 623–630.
- Chakraborty, R., Uddin, S., Macoy, D. M., Park, S. O., Van Anh, D. T., Ryu, G. R., Kim, Y. H., Lee, J. Y., Cha, J. Y., Kim, W. Y., Lee, S. Y., & Kim, M. G. (2020). Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) plays for AvrRpt2-triggered immunity and RIN4 cleavage in Arabidopsis under endoplasmic reticulum (ER) stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *156*(8), 105–114.
- Chen, Q., Yu, F., & Xie, Q. (2020). Insights into endoplasmic reticulum-associated degradation in plants. *New Phytologist*, *226*(2), 345–350.
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Uppalapati, S. R., & Mysore, K. S. (2011). Arabidopsis seedling flood-inoculation technique: a rapid and reliable assay for studying plant-bacterial interactions. *Plant Methods*, *7*(1), 32.
- Iwata, Y., Fedoroff, N. V., & Koizumi, N. (2008). Arabidopsis bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Plant Cell*, *20*(11), 3107–3121.
- Iwata, Y., Iida, T., Matsunami, T., Yamada, Y., Mishiba, K. I., Ogawa, T., Kurata, T., & Koizumi, N. (2018). Constitutive BiP protein accumulation in Arabidopsis mutants defective in a gene encoding chloroplast-resident stearyl-acyl carrier protein desaturase. *Genes to Cells*, *23*(6), 456–465.
- Iwata, Y., & Koizumi, N. (2005). An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(14), 5280–5285.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B., & Stebbins, C. E. (2006). A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science*, *311*(5758), 222–226.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329.
- Kamauchi, S., Nakatani, H., Nakano, C., & Urade, R. (2005). Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis thaliana. *FEBS Journal*, *272*(13), 3461–3476.
- Kanehara, K., Yu, C., Cho, Y., Cheong, W., & Torta, F. (2015). Arabidopsis AtPLC2 is a primary phosphoinositide-specific phospholipase C in phosphoinositide metabolism and the endoplasmic reticulum stress response. *PLOS Genetics*, *11*(9), 1–19.

- Kohler, A., Schwindling, S., & Conrath, U. (2002). Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *128*(3), 1046–1056.
- Koizumi, N., Martinez, I. M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., & Chrispeels, M. J. (2001). Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiology*, *127*(3), 949–962.
- Krizek, B. A., Bequette, C. J., Xu, K., Blakley, I. C., Fu, Z. Q., Stratmann, J. W., & Loraine, A. E. (2016). RNA-seq links the transcription factors AINTEGUMENTA and AINTEGUMENTA-LIKE6 to cell wall remodeling and plant defense pathways. *Plant Physiology*, *171*(3), 2069–2084.
- Kunkel, B. N., & Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(4), 325–331.
- Kumar, D., Yusuf, M. A., Singh, P., Sardar, M. and Sarin, N. B. (2014). Histochemical detection of superoxide and H₂O₂ accumulation in *Brassica juncea* seedlings. *Bio-protocol* *4*(8): e1108.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell*, *16*(12), 3496–3507.
- Lee, B. H., Henderson, D. A., & Zhu, J. K. (2005). The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell*, *17*(11), 3155–3175.
- Liu, J. X., & Howell, S. H. (2010). bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, *22*(3), 782–796.
- Liu, J. X., Srivastava, R., Che, P., & Howell, S. H. (2007). An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell*, *19*(12), 4111–4119.
- Liu, Y., Burgos, J. S., Deng, Y., Srivastava, R., Howell, S. H., & Bassham, D. C. (2012). Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis. *Plant Cell*, *24*(11), 4635–4651.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Ton, J. (2011). Callose deposition: A multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *24*(2), 183–193.
- Lundberg, G. A., & Sommarin, M. (1992). Diacylglycerol kinase in plasma membranes from wheat. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1123*(2), 177–183.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Dangl, J. L., Hall, R. K., Hill, C., Carolina, N., & Jolla, L. (2003). Arabidopsis RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell*, *112*(3), 379–389.
- Mackey, D., Iii, B. F. H., Wiig, A., Dangl, J. L., Hill, C., & Carolina, N. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* *108*(6), 743–754.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., & Raskin, I. (1990). Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, *250*(4983), 1002–1004.

- Meijer, H. J. G., & Munnik, T. (2003). Phospholipid-Based Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 265–306.
- Moreno, A. A., Mukhtar, M. S., Blanco, F., Boatwright, J. L., Moreno, I., Jordan, M. R., Chen, Y., Brandizzi, F., Dong, X., Orellana, A., & Pajeroska-Mukhtar, K. M. (2012). IRE1/bZIP60-mediated unfolded protein response plays distinct roles in plant immunity and abiotic stress responses. *PLoS ONE*, 7(2), 1-15.
- Nagashima, Y., Iwata, Y., Ashida, M., Mishiba, K., & Koizumi, N. (2014). Exogenous salicylic acid activates two signaling arms of the unfolded protein response in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, 55(10), 1772-1778.
- Nagashima, Y., Mishiba, K. I., Suzuki, E., Shimada, Y., Iwata, Y., & Koizumi, N. (2011). Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Scientific Reports*, 1(1), 1-10.
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M. J., & Sambrook, J. (1989). *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell*, 57(7), 1223–1236.
- Nguyen, V. C., Nakamura, Y., & Kanehara, K. (2019). Membrane lipid polyunsaturation mediated by FATTY ACID DESATURASE 2 (FAD2) is involved in endoplasmic reticulum stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 99(3), 478–493.
- Okushima, Y., Koizumi, N., & Sano, H. (1999). Glycosylation and its adequate processing is critical for protein secretion in tobacco BY2 cells. *Journal of Plant Physiology*, 154(5–6), 623–627.
- Pajeroska-Mukhtar, K. M., Wang, W., Tada, Y., Oka, N., Tucker, C. L., Fonseca, J. P., & Dong, X. (2012). The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. *Current Biology*, 22(2), 103–112.
- Pasternak, T., Groot, E. P., Kazantsev, F. V., Teale, W., Omelyanchuk, N., Kovrizhnykh, V., Palme, K., & Mironova, V. V. (2019). Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner. *Plant Physiology*, 180(3), 1725–1739.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308–316.
- Pluhařová, K., Leontovyčová, H., Stoudková, V., Pospíchalová, R., Maršík, P., Klouček, P., Starodubtseva, A., Iakovenko, O., Krčková, Z., Valentová, O., Burketová, L., Janda, M., & Kalachova, T. (2019). “Salicylic Acid Mutant Collection” as a Tool to Explore the Role of Salicylic Acid in Regulation of Plant Growth under a Changing Environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 1–15.
- Pokotylo, I., Pejchar, P., Potocký, M., Kocourková, D., Krčková, Z., Ruelland, E., Kravets, V., & Martinec, J. (2013). The plant non-specific phospholipase C gene family. Novel competitors in lipid signalling. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 62–79.
- Radojčić, A., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Salicylic acid: A double-edged sword for programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, 9(8), 1–5.
- Raho, N., Ramirez, L., Lanteri, M. L., Gonorazky, G., Lamattina, L., ten Have, A., & Laxalt, A. M. (2011). Phosphatidic acid production in chitosan-elicited tomato cells, via both phospholipase D and phospholipase C/diacylglycerol kinase, requires nitric oxide. *Journal of Plant Physiology*, 168(6), 534–539.

- Raskin, I. (1992). Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiology*, *99*(1992), 799–803.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, *57*(6), 930-958.
- Ruberti, C., YaShiuan, C., & Brandizzi, F. (2017). Recovery from temporary ER stress in plants relies on tissue specific and largely independent roles of bZIP28 and bZIP60, as well as an antagonizing function of BAX-Inhibitor 1 onto the pro-adaptive signaling mediated by bZIP28. *The Plant Journal*, *93*(1), 155-165
- Ruelland, E., Kravets, V., Derevyanchuk, M., Martinec, J., Zachowski, A., & Pokotylo, I. (2015). Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Environmental and Experimental Botany*, *114*, 129–143.
- Saijo, Y., Tintor, N., Lu, X., Rauf, P., Pajerowska-Mukhtar, K., Häweker, H., Dong, X., Robatzek, S., & Schulze-Lefert, P. (2009). Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity. *EMBO Journal*, *28*(21), 3439–3449.
- Shank, K. J., Su, P., Brglez, I., Boss, W. F., Dewey, R. E., & Boston, R. S. (2001). Induction of lipid metabolic enzymes during the endoplasmic reticulum stress response in plants. *Plant Physiology*, *126*(1), 267–277.
- Shen, X., Ellis, R. E., Lee, K., Liu, C. Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D. M., Mori, K., & Kaufman, R. J. (2001). Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell*, *107*(7), 893–903.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682.
- Silva, K. J. P., Mahna, N., Mou, Z., & Folta, K. M. (2018). NPR1 as a transgenic crop protection strategy in horticultural species. *Horticulture Research*, *5*(1), 16–18.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., & Van Ackerveken, G. Den. (2001). Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: Protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant Journal*, *26*(5), 523–534.
- Takatsuki, A., Arima, K., & Tamura, G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, *24*(4), 215–223.
- Tan, W. J., Yang, Y. C., Zhou, Y., Huang, L. P., Xu, L., Chen, Q. F., Yu L. J., & Xiao, S. (2018). DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE and DIACYLGLYCEROL KINASE modulate triacylglycerol and phosphatidic acid production in the plant response to freezing stress. *Plant Physiology*, *177*(3), 1303–1318.
- Tan, Y., & Wang, L. (2020). MpDGK2, a novel diacylglycerol kinase from *Malus prunifolia*, confers drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, *38*(3), 452–460.
- Testerink, C., & Munnik, T. (2005). Phosphatidic acid: A multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science*, *10*(8), 368–375.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barely-powdery mildew interaction. *Plant Journal*, *11*(6), 1187-1194.

- Tirasophon, W., Welihinda, A. A., & Kaufman, R. J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes and Development*, *12*(12), 1812–1824.
- Topham, M. K., Bunting, M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Blackshear, P. J., & Prescott, S. M. (1998). Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase-zeta. *Nature*, *694*(6694), 697–700.
- Van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, *44*, 135–162.
- Vaultier, M. N., Cantrel, C., Guerbette, F., Boutté, Y., Vergnolle, C., Çiçek, D., Bolte, S., Zachowski, A., & Ruelland, E. (2008). The hydrophobic segment of Arabidopsis thaliana cluster I diacylglycerol kinases is sufficient to target the proteins to cell membranes. *FEBS Letters*, *582*(12), 1743–1748.
- Wang, D., Weaver, N. D., Kesarwani, M., & Dong, X. (2005). Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science*, *308*(5724), 1036–1040.
- Watanabe, N., & Lam, E. (2008). BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(6), 3200–3210.
- Yamaoka, Y., Shin, S., Choi, B. Y., Kim, H., Jang, S., Kajikawa, M., Yamano, T., Kong, F., Légeret, B., Fukuzawa, H., Li-Beisson, Y., & Lee, Y. (2019). The BZIP1 transcription factor regulates lipid remodeling and contributes to ER stress management in Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Cell*, *31*(5), 1127–1140.
- Yang, Y., Shah, J., & Klessig, D. F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes and Development*, *11*(13), 1621–1639.
- Yu, C. Y., Nguyen, V. C., Chuang, L., & Kanehara, K. (2018). Membrane glycerolipid equilibrium under endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis thaliana. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *500*(2), 103–109.
- Yu, C. Y., & Kanehara, K. (2020). The unfolded protein response modulates a phosphoinositide-binding protein through the IRE1-bZIP60 pathway. *Plant physiology*, *183*(1), 221–235.
- Zeilmaker, T., Ludwig, N. R., Elberse, J., Seidl, M. F., Berke, L., Van Doorn, A., Schuurink, R. C., Snel, B., & Van Den Ackerveken, G. (2015). Downy mildew resistant 6 and DMR6-like oxygenase 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in Arabidopsis. *Plant Journal*, *81*(2), 210–222.
- Zhang, L., Chen, H., Brandizzi, F., Verchot, J., & Wang, A. (2015). The UPR branch IRE1-bZIP60 in plants plays an essential role in viral infection and is complementary to the only UPR pathway in yeast. *PLoS Genetics*, *14*(4), 1–37.
- Zhang, W., Chen J., Zhang, H., Song F. (2008). Overexpression of a rice diacylglycerol kinase gene OsBIDK1 enhances disease resistance in transgenic tobacco. *Molecules and Cells*, *26*(3), 258–264.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Métraux, J. P., & Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by β -aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(23), 12920–12925.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell*, *125*(4), 749–760.