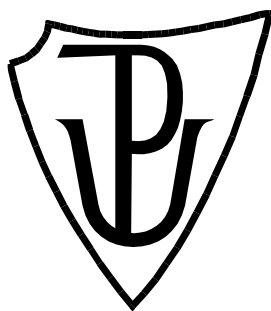


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Oddělení buněčné biologie, CRH



**Regulácia reaktívnych kyslíkových radikálov počas
oxidatívneho stresu**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor: **Bc. Dávid Lukáč**
Študijný program: B1406 Biochémia
Študijný odbor: Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia: Prezenčná
Vedúci práce: **doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.**
Rok: 2020

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

V Olomouci dňa

Chcel by som poďakovať vedúcemu mojej práce doc. Ing. Tomášovi Takáčovi Ph.D. a Mgr. Petrovi Dvořákovi za vecné rady, ochotu, trpezlivosť a venovaný čas pri spracovávaní tejto diplomovej práce. Ďalej by som chcel poďakovať pánovi prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi DrSc. a oddeleniu bunkovej biológie v Centre regiónu Haná pre biotechnologický a zemědělský výskum za príjemné pracovné prostredie. V neposlednej rade chcem poďakovať svojej rodine za podporu pri písaní tejto diplomovej práce. Táto práca bola vykonaná s podporou projektov IGA_PrF_2019_011 s názvom „Časné zmeny proteomu vojtěšky po ovlivnění elicitory pocházející z patogenních a symbiotických mikroorganizmů“ a IGA_PrF_2020_025 s názvom „Vývoj embrya a endospermu je ovlivňováno YODA-HSP90 signální kaskádou v *Arabidopsis thaliana*“ poskytovaných Internou grantovou agentúrou.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKÁCIA

Meno a priezvisko autora:	Bc. Dávid Lukáč
Názov práce:	Regulácia reaktívnych kyslíkových radikálov počas oxidatívneho stresu
Typ práce:	Diplomová
Pracovisko:	Oddelenie bunkovej biológie, Centrum regiónu Haná
Vedúci práce:	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020

Abstrakt: Reaktívne kyslíkové radikály (ROS) sú vysoko reaktívne molekuly kyslíka, produkované v aeróbných organizmoch. Vo vyššej koncentrácii majú ROS negatívny vplyv na bunku a spôsobujú bunkovú smrť. Ich funkcia môže byť aj signalizačná a majú úlohu v obrannej odpovedi rastlín voči patogénom. FeSOD1 je superoxiddizmutáza, ktorá konvertuje superoxid na peroxid vodíka a kyslík. Zistili sme, že FeSOD1 je vývojovo regulovaná v skorých postembryonálnych štádiách v Col-0. Detekovali sme nový pás zodpovedajúci MnSOD izoforme, prítomnej iba v 3 a 5 dňových rastlinách *Arabidopsis thaliana*. Menadión je redoxne aktívny chinón, ktorý indukuje produkciu superoxidových radikálov v mitochondriálnom elektrónovom transportnom reťazci. V našej práci sme sa zaoberali vplyvom menadiónu na rastliny *A.thaliana* ekotyp Col-0, mutantné *fsd1* rastliny a komplementované línie FSD1-GFP a GFP-FSD1. Naše výsledky nám naznačujú, že menadión má výrazný vplyv na fenotyp koreňa a viabilitu rastlín, spôsobuje zvýšenú produkciu laterálnych koreňov a inhibuje predĺžovanie primárneho koreňa vo všetkých líniách. FeSOD1 determinuje odolnosť rastlín voči oxidatívne stresu spôsobeného menadiónom. Flagelín 22 je konzervovaný bakteriálny elicitor o veľkosti 22 aminokyselín, ktorý spúšťa imunitnú odpoveď rastliny. V rámci diplomovej práce sme sa zaoberali bioinformatickou analýzou diferenciálneho proteómu divého typu a mutantnej KO *hvmpk3* línie rastlín *Hordeum vulgare* po ovplyvnení bakteriálnym flagelínom 22.

Kľúčové slová: ROS, FeSOD1, menadión, superoxid, flagelín 22, fenotyp, superoxiddizmutáza

Počet strán:

Počet príloh:

Jazyk: Slovenčina

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname: Bc. Dávid Lukáč

Title: Regulation of reactive oxygen species during oxidative stress.

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Cell Biology, Centrum regiónu Haná

Supervisor: doc. Ing. Tomáš Takač, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive molecules of oxygen, formed in aerobic organisms. In high concentrations, ROS have negative effect on cells and may cause a cell death. However, ROS can also function as a signaling molecules and are involved in plant defense responses against pathogens. FeSOD1 is an iron superoxide dismutase, which converts superoxide into hydrogen peroxide and molecular oxygen. Our results show, that FeSOD1 is developmentally regulated during early postembryonic development *Arabidopsis thaliana*. We also detected new band corresponding to MnSOD isoform, which is present only in 3 and 5 days old *Arabidopsis* plants. Menadione is a redox active quinon, which induces production of superoxide in mitochondrial electron transport chain. Aim of this study was to examine effects of menadione on *Arabidopsis* wild type, mutant *fsd1* plants and complemented lines FSD1-GFP and GFP-FSD1. Our results show, that menadione has a negative effect on root phenotype, causing increased production of lateral roots and inhibiting the elongation of primary root in all studied and viability of plants in high concentrations. FeSOD1 is important for plant tolerance to menadione induced oxidative stress. Flagellin 22 is conserved bacterial elicitor, which triggers plant immune responses. We performed bioinformatical analysis of differential proteome of wild type and mutant KO *hvmpk3* lines of *H. vulgare* after flagellin 22 treatment.

Keywords: ROS, Fe-SOD, menadione, superoxide, flagellin 22, superoxide dismutase

Number of pages:

Number of appendices:

Language: Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	10
2.1	Tvorba ROS u rastlín	10
2.1.1	Charakteristika ROS	10
2.1.2	Mechanizmy tvorby ROS	14
2.2	Enzymatická antioxidačná obrana	17
2.2.1	Všeobecná charakteristika	17
2.2.2	Indukcia oxidatívneho stresu	23
2.3	Tvorba ROS u rastlín počas PTI	25
2.4	Imúnna odpoveď a MAPK u jačmeňa	28
3	MATERIÁL A METÓDY	31
3.1	Biologický materiál	31
3.2	Zoznam použitých chemikálií	31
3.3	Zoznam použitých prístrojov	32
3.4	METÓDY	32
3.4.1	Príprava rastlinného materiálu	32
3.4.2	Fenotypová analýza a test odolnosti rastlín voči oxidatívne- mu stresu	33
3.4.3	Ovplyvnenie rastlín menadiónom na biochemické analýzy	33
3.4.4	Extrakcia proteínov	34
3.4.5	Meranie koncentrácie proteínov	34
3.4.6	Natívna elektroforéza	34
3.4.7	Imunoblotovanie	35
3.4.8	Detekcia aktivity SOD na natívnych géloch	36
3.4.9	Meranie koncentrácie chlorofylu	36
3.4.10	Vizualizácia superoxidových radikálov	37

3.4.11	Vizualizácia peroxidu vodíka	34
3.4.12	Proteomická analýza rastlín <i>H. vulgare</i> po ovplyvnení elicítormi	38
4	VÝSLEDKY	38
4.1	Analýza abundancie a aktivity FeSOD1 v skorých postembryonálnych štádiách <i>Arabidopsis</i>	40
4.2	Analýza odpovede mutantných a transgénnych rastlín na tvorbu ROS spôsobenú menadiónom	42
4.3	Fenotypová analýza odpovede mutantných a transgénnych rastlín na tvorbu ROS spôsobenú 15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom	43
4.4	Test odolnosti rastlín na 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadión	45
4.5	Vplyv menadiónu na aktivitu FeSOD1 v <i>Arabidopsis</i>	47
4.6	Vplyv FeSOD1 na hladinu superoxidových radikálov v menadiónom ovplyvnených rastlinách <i>Arabidopsis</i>	48
4.7	Vplyv FeSOD1 na hladinu peroxidu vodíka v menadiónom ovplyvnených rastlinách <i>Arabidopsis</i>	49
4.8	Detekcia fosforylovaných MAPK po ovplyvnení elicítormi v <i>H.vulgare</i>	50
4.9	Diferenciálny proteóm koreňov divého typu a mutantnej KO <i>hvmpk3</i> línie rastlín jačmeňa	52
4.10	Diferenciálny proteóm koreňov divého typu a mutantnej KO <i>hvmpk3</i> línie rastlín jačmeňa po ovplyvnení flagelínom 22	60
5	DISKUSIA	67
6	ZÁVER	72
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	73
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	84
9	PRÍLOHY	86

CIELE PRÁCE

Teoretické ciele:

Vypracovanie literárnej rešerše na témy tvorba ROS u rastlín, menadión a jeho mechanizmus účinku u rastlín, enzymatická antioxidačná obrana a superoxiddizmutázy u *Arabidopsis* a jačmeňa, MAPK u *Arabidopsis* a jačmeňa a imúnna odpoveď, proteomický pohľad na imúnnu odpoveď jačmeňa.

Praktické ciele:

- 1.) Vplyv FSD1 (Fe superoxiddizmutáza 1) na *Arabidopsis thaliana* v odbúravaní ROS indukovaných menadiónom: fenotyp, hladina ROS
- 2.) Proteomická analýza transgénneho jačmeňa v odpovedi na flagelín 22 (príprava, bioinformatické vyhodnotenie a interpretácia proteomických dát).

1. ÚVOD

Reaktívne kyslíkové radikály (ROS) sú chemicky reaktívne molekuly kyslíka. V biologickom kontexte sú ROS produkované ako prirodzený medziprodukt v rôznych metabolických reakciách v bunke ako aj pri odpovedi na abiotické/biotické stresové faktory. V zvýšených hladinách môžu mať negatívny efekt na bunkové štruktúry, čo môže viesť aj k bunkovej smrti. Tento negatívny efekt ROS na rastlinnú bunku sa nazýva oxidatívny stres. Pri vysokých hladinách sú ROS odbúravané antioxidantnými enzýmami, ktorých úloha v bunke je regulácia hladiny ROS. Okrem nežiadúcich efektov majú ROS úlohu aj pri signalizácii v bunke, hlavne pri pôsobení nežiadúcich vonkajších podmienok a vo vývine. Jedným z oxidantov, ktoré spôsobujú tvorbu ROS, patrí aj menadión, čo je redoxne aktívny chinón a indukuje produkciu superoxidových radikálov v elektróntransportnom reťazci v mitochondriách, a spôsobuje rapídnu oxidáciu chloroplastov, mitochondrií a cytozolu. *FSD1* je dôležitá superoxiddizmutáza pri antioxidantnej obrane rastliny. Je to jediná z *FSD* proteínov, ktorá je exprimovaná v koreňoch, čo môže naznačovať vývinové úlohy v rastline. Jej úloha v antioxidantnej obrane rastliny je stále nejasná a v publikovaných štúdiách sa pochybuje o jej dôležitom vplyve na celkovú antioxidantnú obranu rastliny.

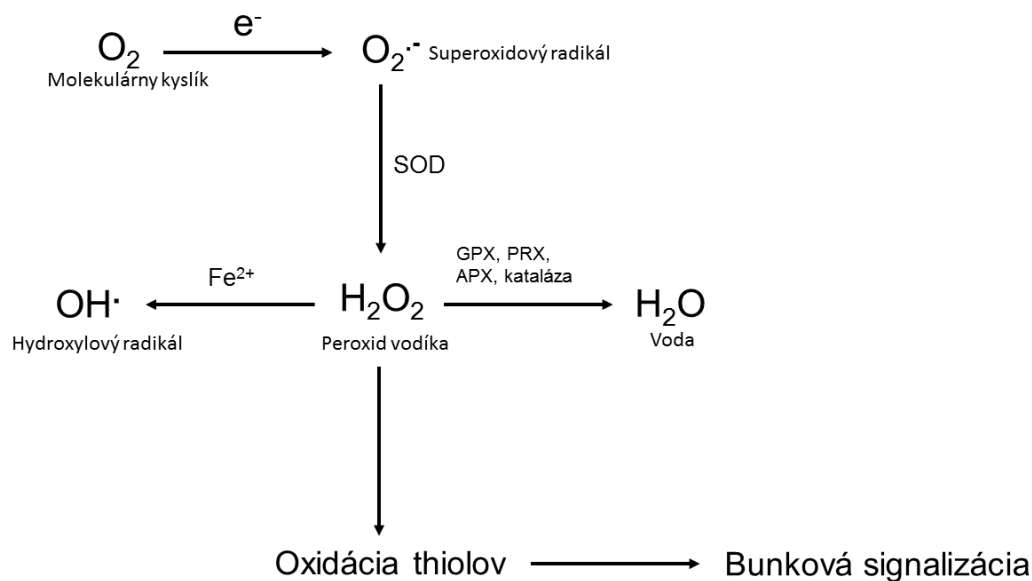
V prípade napadnutia rastliny patogénom, rastliny vyvinuli komplexný systém pre rozpoznanie bakteriálnych elicítorov. Flagelín, podjednotka bakteriálneho filamentu flagely, je identifikovaný ako všeobecný bakteriálny elicítor rozpoznávaný v rôznych rastlinných druhoch. Aktivita elicítora je spôsobená konzervovanou doménou na N-terminálnom konci flagelínu, ktorá sa nazýva flg22, zložená z 22 aminokyselín, ktorá indukuje imúnne odpovede v rastlinách už v nanomolárnych koncentráciách. Oxidatívny stres je indukovaný aj počas napadnutia patogénom a MAPK hrajú dôležitú úlohu v imúnnej odpovedi na biotický stres a v regulácii antioxidantnej obrane. Avšak, funkcia a úloha jačmenných MAPK pri imúnnej odpovedi rastliny na biotický stres je málo preštudovaná.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Tvorba ROS u rastlín

2.1.1 Charakteristika ROS

Reaktívne kyslíkové radikály (Reactive Oxygen Species; ROS) sú čiastočne redukované molekuly kyslíka produkované v aeróbných organizmoch (Del Río, 2015). Molekula kyslíku má dva nespárované elektróny s rovnakým spinom. Tento stav umožňuje kyslíku akceptovať namiesto dvoch aj jeden elektrón (čiastočná redukcia), čo vedie ku tvorbe ROS (del Río *et al.*, 2006). ROS sú produkované ako vedľajšie medzi produkty rôznych metabolických dráh, ktoré sa odohrávajú v bunkových štruktúrach ako sú chloroplasty, mitochondrie, peroxizómy (Mittler *et al.*, 2011) a v apoplaste (Gill a Tuteja, 2010). Medzi najdôležitejšie ROS patria superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), peroxid vodíka (H_2O_2), singletový kyslík (1O_2), hydroxyperoxyl (HO_2^{\cdot}) ako protonizovaná forma superoxidového radikálu alebo alkoxyl (RO^{\cdot} ; Obr. 1).



Obr. 1: Prehľadný obrázok znázorňujúci tvorbu superoxidového radikálu, peroxidu vodíka a hydroxylového radikálu z molekulárneho kyslíka. SOD – superoxiddizmutáza, GPX – glutatiónperoxidáza, PRX – peroxiredoxíny, APX - askorbátperoxidáza (prezaté z Sullivan, 2014)

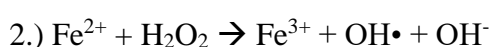
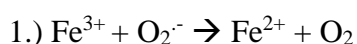
Aby rastlinná bunka predišla poškodzujúcim vplyvom ROS, rastliny vyvinuli komplexný antioxidačný obranný systém, ktorý efektívne zachytáva akumulované molekuly ROS v bunke počas stresových podmienok (Foyer *et al.*, 2005). Tento systém obsahuje enzymatické a ne-enzymatické komponenty, ktoré sú podrobne popísané v kapitole 3 Rovnováha medzi produkciou a zachytávaním ROS môže byť narušená rôznymi biotickými a abiotickými faktormi, medzi ktoré patria salinita, UV žiarenie, sucho, ťažké kovy, teplotné výkyvy, alebo rastlinné patogény. Tieto zmeny rovnováhy vedú k zvýšenej hladine intracelulárnych ROS, ktoré môžu značne poškodiť bunkové štruktúry (Mittler, 2017).

Reaktivita ROS k bunkovým štruktúram a akumulácia produktov z týchto reakcií spôsobujú oxidatívny stres, v rámci ktorého môže nastať peroxidácia lipidov, poškodenie proteínov, degradácia nukleotidov a následne bunková smrť (Demidchik, 2015). To, či ROS budú pôsobiť ako poškodzujúce, ochranné alebo signalizačné molekuly závisí od rovnováhy medzi produkciou a zachytávaním ROS v rastlinnej bunke (Gratao *et al.*, 2005). Sú taktiež dôležité pre vývin rastliny a jej odpovedi na vonkajší stres (Mittler *et al.*, 2011). Pri malých koncentráciách, ROS fungujú ako sekundárni poslovia pri aktivácii obranných génov (Foyer *et al.*, 2009). Singletový kyslík, superoxidový radikál a peroxid vodíka indukujú transkripciu špecifických sád génov v rastlinných bunkách (Gadjev *et al.*, 2006). Tento signalizačný systém kooperuje s ostatnými signalizačnými dráhami, ako napríklad fosforylačné kinázové kaskády alebo Ca^{2+} signalizačné kaskády, a je súčasťou regulačných sietí, ktoré prepájajú rastlinnú bunku s jej prostredím (Navrot, 2007).

Poškodzujúci vplyv ROS na rastlinné bunky môže byť interpretovaný ako systém obrany voči napadnutiu rastlinnými patogénmi, spôsobujúci bunkovú smrť ako hypersenzitívnu reakciu voči biotrofickým patogénom (Eckardt *et al.*, 2017). ROS dokážu kooperovať a spolupracovať aj so signalizačnými dráhami rastlinných hormónov ako napr. kyselinou jasmónovou, abscisovou, salicylovou alebo etylénom (Srivastava *et al.*, 2017). Individuálne ROS majú vysokú variabilitu v ich chemickom zložení, reaktivite a úlohe v redoxne signalizačných dráhach (Mittler, 2017). Reaktivita ROS môže byť ovplyvnená prítomnosťou voľných Fe^{2+} katiónov.

Hydroxylový radikál (OH•)

Hydroxylový radikál je považovaný za jeden z najreaktívnejších ROS z dôvodu jedného nespárovaného elektrónu, vďaka ktorému môže reagovať s mnohými biomolekulami v bunke. Medzi tieto biomolekuly patria DNA, RNA, lipidy a proteíny. Hydroxylový radikál vzniká cez Haber-Weissovú reakciu superoxidového radikálu katalyzovanú železitým kationom Fe^{3+} za vzniku Fe^{2+} a molekulárneho kyslíka a následne Fentonovou reakciou peroxidu vodíka (alebo dizmutovaného superoxidového radikálu) s Fe^{2+} :



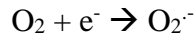
Hydroxylový radikál je odbúravajúci flavonoidmi, proflínom alebo askorbátom (Mittler, 2017). Polčas života hydroxylového radikálu je 1 ns. Avšak, oxidatívne vlastnosti hydroxylového radikálu nemusia mať nutne poškodzujúci vplyv. Bolo preukázané, že uľahčuje klíčenie semien (**cit**), zatváranie prieduchov (**cit**), imunitnú odpoveď rastliny (**cit**), bunkovú smrť (**cit**) alebo adaptáciu na stresové podmienky (Richards *et al.*, 2015).

Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$)

Singletový kyslík vzniká vo fotosyntetických membránach chloroplastov v reakciách medzi molekulami chlorofylu a molekulárnym kyslíkom (Mittler, 2002). Oxiduje hlavne lipidy a proteíny (Trp, His, Tyr, Met a Cys aminokyselinové zvyšky). Polčas života singletového kyslíka je 1-4 μs (Mittler, 2017). Singletový kyslík je schopný prechádzať difúzne cez membrány a reagovať s rôznymi biomolekulami, čím môže slúžiť ako sprostredkovateľ ich signalizačných funkcií (Dogra *et al.*, 2018). Medzi hlavných reakčných partnerov singletového kyslíka patria hlavne mastné kyseliny v tylakoidných membránach (Halliwell *et al.*, 2006). Ďalším zdrojom produkcie singletového kyslíka je aktivita enzýmu lipoxygenázy v rastlinách (Prasad *et al.*, 2017). Vysoko reaktívny singletový kyslík môže byť efektívne odbúraný nízkomolekulárnymi lipofilnými zlúčeninami, ako sú β -karotén alebo tokoferol, prípadne proteínom D1 vo fotosystéme II (Krieger-Liszkay *et al.*, 2008).

Superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$)

Superoxidový radikál je anionická, vysoko reaktívna nukleofilná molekula O_2 s polčasom života približne 1-4 μ s, vďaka čomu často slúži ako iniciátor reakčných kaskád pri produkcii ďalších ROS, hlavne peroxidu vodíka. Vzniká ako produkt jednoelektrónovej redukcie kyslíka.



Jeho biologická toxicita spočíva v inaktivácii Fe-S skupín na metabolicky dôležitých proteínoch, čím odštiepi Fe^{2+} , ktorý môže cez Fentonovu reakciu tvoriť veľmi reaktívny hydroxylový radikál (Halliwell *et al.*, 2006). Produkuje sa v chloroplastoch, apoplaste, mitochondriách, peroxizómoch a iných elektrónových transportných reťazcoch. Je odbúravateľný flavonoidmi a superoxiddizmutázami (Mittler, 2017). Superoxidový radikál dokáže reagovať s ostatnými radikálnymi skupinami, zahŕňajúc reaktívne molekuly dusíka (Reactive Nitrogen Species; RNS) ako napr. oxid dusnatý (Halliwell *et al.*, 2006).

Peroxid vodíka (H_2O_2)

Peroxid vodíka je najmenej reaktívny ne-radikálny ROS. Je zahrnutý v signalizačných dráhach cez interakcie s proteínmi obsahujúce redoxne senzitivné časti, akými sú napríklad proteínové centrá založené na kovoch či thiolová skupina cysteínu, ktorej oxidáciou sa zmení biologická aktivita proteínu (Rampon *et al.*, 2018). Polčas života peroxidu vodíka je približne 1 ms. Tvorí sa v apoplaste, peroxizómoch, chloroplastoch a mitochondriách. Je odbúravateľný enzýmami ako sú napr. kataláza, peroxidáza, askorbátperoxidáza alebo peroxiredoxíny (Mittler, 2017). V rastlinných bunkách môže peroxid vodíka difúzne prechádzať lipidovými membránami cez homológy akvaporínu, medzi ktoré patria PIP (Plasme membrane Intrinsic Factor) a TIP (Tonoplast Intrinsic Protein; Nordzieke a Medrano-Fernandez, 2018). Nadbytok peroxidu vodíka spôsobuje autofágiu chloroplastov a peroxizómov a programovanú bunkovú smrť (Smirnov a Arnaud, 2019).

2.1.2 Mechanizmy tvorby ROS

Chloroplasty

V chloroplastoch je produkcia ROS úzko spätá s fotosyntetickými reakciami. V tylakoidoch je produkovaný a akumulovaný peroxid vodíka cez O_2^- a následne redukovaný pomocou askorbátperoxidázy vo fotosystéme I. V stróme chloroplastov je peroxid vodíka môže byť odbúravaný aj askorbátperoxidázou, peroxiredoxínmi alebo glutatióperoxidázam podobnými enzýmami (Glutathione Peroxidase-Like Enzymes; GPXL; 3). Peroxid vodíka, generovaný aktivitou SOD, je následne redukovaný na vodu cez askorbát, katalyzovaný askorbátperoxidázou a askorbát je oxidovaný na monodehydroaskorbát (MDA). Následne je MDA priamo redukované na askorbát redukovaným ferredoxínom alebo NAD(P)H katalyzovaný chloroplastovou MDA reduktázou (Sano *et al.*, 2005). Unikátna je tiež tvorba ne-radikálneho, vysoko reaktívneho 1O_2 . Tento singletový stav kyslíka je vytváraný v tylakoidných membránach, prenosom energie z tripletového stavu primárneho elektrónového donoru ($^3P680^*$) vo fotosystéme II (Telfer *et al.*, 1994). Odbúravanie tejto formy kyslíka prebieha cez reakcie s neenzymatickými antioxidantami ako sú karotenoidy (Telfer *et al.*, 2003), tokoferoly (Munne-Bosch a Allegre, 2002) a membránové lipidy. Prechod elektrónov z molekúl vody cez fotosyntetický elektrónový transportný reťazec, následne cez superoxidový radikál na peroxid vodíka a späť na molekulu vody sa nazýva cyklus voda-voda (water-water cycle), ktorého funkcia je zbavenie sa prebytočných elektrónov.

Peroxizómy

Peroxizómy sú bunkové organely zodpovedné za oxidáciu mastných kyselín, fotorespiráciu, biosyntézu hormónov a pri metabolizme ROS (Johnson and Olsen, 2001). Sú to metabolicky aktívne organely, medzi ich hlavné úlohy patrí účasť na produkcii a degradácii peroxidu vodíka cez flavínom prepojené oxidázy (flavine-linked oxidases), katalázy a iných antioxidačných enzýmov (Pracharoenwattana and Smith, 2008). Peroxizómy produkujú ROS, ale môžu pomôcť ochrániť rastlinnú bunku pred ich samotným poškodzujúcim vplyvom. Vplyvom koncentrácie CO_2 v atmosfére a veľkého počtu katalytických cyklov RUBISCA, môže dôjsť k oxygenácii ribulózy-1,5-bisfosfátu miesto karboxylácie. Výsledný produkt, 2-fosfoglykolát, je metabolizovaný na glykolát a transportovaný do peroxizómov, kde sa premieňa oxidáciou na glyoxylát. Pri týchto reakciách vzniká veľké množstvo peroxidu vodíka. Jednou z hlavných funkcií

peroxizómov je obnova bunkových antioxidantov a zásobáreň antioxidantných enzýmov ako sú kataláza, peroxidáza, superoxid-dizmutáza, askorbátperoxidáza, glutatión alebo tioredoxínreduktáza (Eubel *et al.*, 2008).

Mitochondrie

Mitochondriálna respirácia, sprevádzaná priamym prenosom elektrónov z redukovaných substrátov na molekulárny kyslík cez dýchací reťazec na vnútornej mitochondriálnej membráne, je úzko spätá s produkciou ROS (Navrot, 2007). Produkcia superoxidového radikálu v mitochondriách prebieha v dýchacom reťazci jedoelektrónovou redukciou O_2 , avšak je mnohonásobne zvýšená pri inhibícii dýchacieho reťazca alebo pri nedostatku ADP, čím vznikne vysoko redukovaný stav v mitochondriálnom elektrónovom transportnom reťazci (Morgan *et al.*, 2008). ktoré boli produkované v mitochondriách, ovplyvňujú hlavne mitochondriálne dýchacie a bunkové funkcie, medzi ktoré patria hlavne signalizačné kaskády v bunkách, programovaná bunková smrť alebo obrana voči patogénom (Huang *et al.*, 2016). Známe miesta produkcie ROS v mitochondriách sú mitochondriálne komplexy I a III, kde sa tvorí superoxidový radikál, ktorý je následne premenený na peroxid vodíka (Sweetlove a Foyer, 2004). Peroxid vodíka môže následne reagovať s redukovaným Fe^{2+} a Cu^+ za vzniku hydroxylových radikálov, ktoré môžu penetrovať cez membrány a opustiť mitochondrie (Greene, 2002). Ubisemichinón, tvorený v mitochondriálnych komplexoch I a III je jeden z hlavných donorov elektrónov pre kyslík, pričom aj ostatné miesta na komplexe I môžu slúžiť ako potenciálne donory elektrónov pre kyslík za vzniku ROS (Sweetlove a Foyer, 2004).

Apoplast

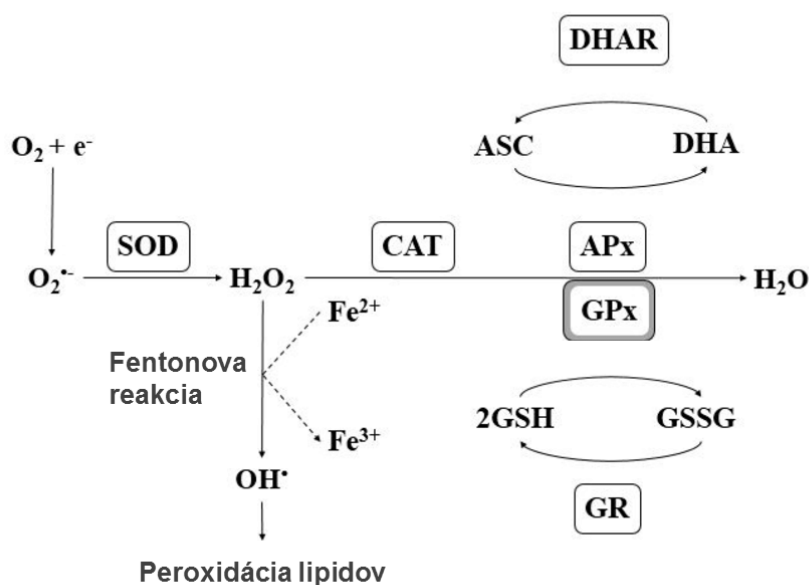
K enzýmom, zodpovedným za vznik ROS v apoplaste pri odpovedi na pôsobenie nepriaznivých podmienok, patria NADPH oxidázy, známe ako Respiratory Burst Oxidase Homologues lokalizované na plazmatickej membráne (Wu *et al.*, 2013). Superoxidový radikál je v apoplaste produovaný cez RBOH, ktorý je následne dizmutovaný na peroxid vodíka. V apoplaste, peroxid vodíka je taktiež produkovaný aj apoplastickými peroxiredoxínmi. Navyše, apoplastické ROS môžu vznikáť aj pri pôsobení ozónu alebo xantínoxidázou a glukózaoxidázou (Vaahtera *et al.*, 2013). RBOH sú považované za jedného z hlavných zdrojov produkcie ROS pri odpovedi rastliny na patogény (Nuhse *et al.*, 2007). Genóm *Arabidopsis* obsahuje 10 NADPH oxidázových génov (AtRboh A-J),

ktoré majú rôznu úroveň expície pri vývine rastliny a pri odpovedi na environmentálne faktory (Fluhr, 2009). Štruktúra rastlinných NADPH oxidáz obsahuje šesť konzervovaných transmembránových helixov, z ktorých tretí a piaty helix viaže dve hemové skupiny cez štyri histidínové zvyšky. Hemové skupiny sú esenciálne pre prenos elektrónov cez membránu na molekulárny kyslík ako akceptor v extracelulárnom priestore (Torres a Dangl, 2005). Obsahujú taktiež N-terminálny Ca^{2+} väzbový motív a cytozolické FAD a NADPH väzbové motívy v C-terminálnej oblasti. Aktivita RBOH a lokalizácia sú kontrolované cez fosforyláciu proteínovými kinázami z rôznych rodín, zahŕňajúc proteínové kinázy závislé na vápniku a kalmodulíne (Calcium and calmodulin Dependent Protein Kinases; CDPK; Asai *et al.*, 2013). Produkt reakcie katalyzovanej NADPH oxidázou je superoxidový aniónový radikál, ktorý nedokáže byť transportovaný membránami kvôli jeho zápornému náboju. Avšak pri zníženom pH je superoxidový radikál protonizovaný a dokáže difúzne prechádzať cez membrány (cit). V rastlinách, kde je fyziologický rozsah pH približne 5,5-7,5, zhruba 16% superoxidu produkovaného cez RBOH dokáže difúzne prechádzať membránami v rastlinnej bunke (Sagi a Fluhr, 2006).

2.2 Enzymatická antioxidačná obrana

2.2.1 Všeobecná charakteristika

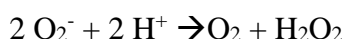
Rastlinné bunky disponujú rozsiahlym spektrom enzymatických a neenzymatických antioxidantov, ktoré sa nachádzajú v miestach produkcie ROS. Ich úlohou je regulovať hladinu ROS a tak eliminovať ich negatívne efekty (Corpas *et al.*, 2015). Medzi hlavné antioxidačné enzýmy patria superoxiddizmutáza (SOD), kataláza (CAT), askorbátperoxidáza (APX), peroxidázy (POD), glutatiónperoxidáza (GPX), peroxiredoxíny (Prx) alebo thioredoxíny (Trx). V rastlinnej bunke sa nachádzajú aj ďalšie typy enzýmov, ktoré sú dôležité pri udržiavaní redoxného stavu bunky. Ich funkcia je buď priame odbúravanie ROS a ich medziproduktov alebo regenerácia antioxidačných enzýmov. Medzi tieto enzýmy patria dehydroaskorbátreduktáza (DAR), monodehydroaskorbátreduktáza (MDAR), glutatión-S-transferázy (GST), glutatiónreduktázy (GR) a alternatívne oxidázy (AOX; Obr. 2). APX, MDAR, DAR a GR synergicky kooperujú cez askorbátovo-glutatiónový cyklus, ktorý je bohato zastúpený v bunkových štruktúrach v rastlinných bunkách. Okrem enzymatickej antioxidačnej obrany môžu byť ROS eliminované aj ne-enzymaticky ako napr. kyselinou askorbovou (vitamín C, ASC), glutatiónom (GSH), tokoferolom (vitamín E) a karoténmi (provitamín A). Ich úlohou je pomôcť antioxidačným enzýmom pri zadržiavaní intracelulárnych ROS, čo vedie k zlepšeniu rastu rastliny, hormonálnej signalizácie, alebo posilneniu odpovede na biotické a abiotické environmentálne faktory (Gupta *et al.*, 2018).



Obr. 2: Prehľadný obrázok znázorňujúci vzťah medzi antioxidantnými enzýmami a ROS v rastlinných bunkách. SOD – superoxididizmutáza, CAT – kataláza, APx – askorbátperoxidáza, ASC – askorbát, DHA – dehydroaskorbát, DHAR – dehydroaskorbátreduktáza, GSH – redukovaný glutatión, GSSG – glutatióndisulfid, GR – glutatiónreduktáza (prevzaté z Chomchan *et al.*, 2017)

Superoxiddizmutázy

SOD je antioxidantný enzým objavený v roku 1969 v hovädzích erythrocytoch (McCord a Fridovich 1969). Je jedným z najefektívnejších komponent v antioxidantnom obrannom systéme rastlinných buniek voči toxicite ROS. Premieňa superoxidové radikály na molekulárny kyslík a peroxid vodíka (McCord a Fridovich 1969).



SOD patria medzi metaloenzýmy líšiac sa centrálnym kovovým atómom v aktívnom mieste. Delia sa do štyroch skupín na základe ich centrálného kovového atómu: SOD obsahujúca meď a zinok (Cu/ZnSOD), SOD obsahujúca mangán (MnSOD), SOD obsahujúca železo (FeSOD) a SOD obsahujúca nikel (NiSOD), ktorá bola objavená ako posledná. Bola izolovaná z baktériálneho kmeňa *Streptomyces*, nenachádza sa však vo vyšších rastlinách (Bryngelson *et al.*, 2004). MnSOD a FeSOD sú veľmi podobné v primárnej, sekundárnej a terciárnej štruktúre a sú veľmi odlišné od Cu/ZnSOD. MnSOD a FeSOD sa nachádzajú aj v prokaryotických a eukaryotických organizmoch, pričom Cu/Zn-SOD hlavne v eukaryotických organizmoch. Predpokladá sa, že MnSOD

a FeSOD sa vyvinuli z jedného ancestrálneho enzýmu, pričom Cu/ZnSOD sa vyvinula samostatne v eukaryotických organizmoch (Smith a Doolittle, 1992). Citlivosť týchto izozýmov voči inhibítorm sa výrazne líši. FeSOD je rezistentná na kyanid draselný, ale môže byť inhibovaná peroxidom vodíka. Štruktúrne má homodimérne a homotetramérne formy. MnSOD môže byť homodimerická a homotetramerická a je rezistentná na kyanid draselný a peroxid vodíka, pričom Cu/ZnSOD môže byť inhibovaná oboma inhibítormi (Sharma *et al.*, 2012). Genóm *Arabidopsis* kóduje 7 génov SOD. Bolo dokázané, že ako u ostatných antioxidantných enzýmov, ako napríklad GR alebo APX, aktivita SOD môže byť regulovaná kyselinou abscisovou (Gepstein a Glick, 2013). Vo vyšších rastlinách sú izoformy SOD lokalizované v rôznych bunkových organelách. MnSOD je prítomná v mitochondriách a peroxizómoch, Cu/ZnSOD je lokalizovaná v cytozóle, chloroplastoch, peroxizómoch a apoplaste. FeSOD1 je lokalizovaná primárne v chloroplastoch ale aj v cytozóle (Dvořák *et al.*, 2020).

FeSOD

V *Arabidopsis* sa nachádzajú tri izoformy FeSOD a to FSD1, FSD2 a FSD3, pričom FSD1 je najabundantnejšia Fe-SOD. Expresia mRNA transkriptu FSD1 je úzko spojená s hladinou Cu ale aj Fe (Greco *et al.*, 2011). FSD1 má translokačnú sekvenciu aj pre lokalizáciu do chloroplastov (Kuo *et al.*, 2012) a fúzia s GFP vykazuje lokalizáciu FSD1 v cytozóle (Myouga *et al.*, 2008). FSD2 a FSD3 sú chloroplastové superoxidizmutázy, ktoré obsahujú translokačnú sekvenciu pre lokalizáciu do chloroplastov. FSD2 je naviazaná na tylakoidnej membráne chloroplastu a FSD3 je kolokalizovaná na chloroplastových nukleoidoch, ktoré chráni pred pôsobením oxidatívneho stresu cez heterodimerické komplexy s FSD2 (Myouga *et al.*, 2008). Vplyvom soľného stresu mierne stúpa aktivita FeSOD v cytozóle pričom v chloroplastoch má aktivitu omnoho vyššiu. Abundancia FSD2 a FSD3 je silno regulovaná narozdiel od FSD1. Možný dôvod je cirkadiálna regulácia FSD1, kedy abundancia mRNA FSD1 nie je moc stabilná, ale je vyššia než FSD2 a FSD3. (Xing *et al.*, 2015). V prípade deficiencie FSD2 a FSD3, Gallie *et al.*, 2019 navrhujú, že FSD1 môže kompenzovať deficienciu týchto génov nadexpresiou, čím sa môžeme domnievať, že v prípade straty funkcie niektorej z FSD génov, ostatné môžu kompenzovať jej funkciu.

Kataláza

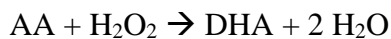
Kataláza je antioxidačný enzým, ktorý odbúrava peroxid vodíka a predchádza jeho akumulácií v bunke. Je to tetramér zložený zo 4 polypeptidových reťazcov o dĺžke približne 500 aminokyselín. Polypeptidové reťazce obsahujú 4 hemové skupiny, ktoré dovoľujú enzýmu reagovať s peroxidom vodíka (de Carvalho, 2008). Katalyzuje reakciu premeny peroxidu vodíka na molekulu vody a kyslíka.



Genóm *Arabidopsis* kóduje tri katalázové proteíny, ktoré sú zložené z 492 aminokyselín a zdieľajú vysokú podobnosť sekvencií. Lokalizácia kataláz je predominantne v peroxizómoch (Mullen *et al.*, 1997). Aj keď expresia katalázových génov bola objavená vo väčšine rastlinných pletív, expresia a aktivita sú vyššie v nadzemných pletivách než v koreňových pletivách. To naznačuje, že katalázy hrajú dôležitú úlohu pri detoxifikačných procesoch, ktoré sú úzko spojené s fotosyntézou a fotorespiráciou (Mhamdi *et al.*, 2012). Kataláza je taktiež dôležitá pri odpovedi rastlín na stres zo sucha (Zhang a Kirkham, 1994), ťažkých kovov (Corpas a Barroso, 2017), alebo salinitu (Sofa *et al.*, 2015).

Askorbátperoxidáza

Askorbátperoxidáza (APX) patrí medzi rodiny peroxidáz obsahujúcich hem, čo umožňuje enzýmu reagovať s peroxidom vodíka (Wellinder, 1992). Katalyzuje premenu peroxidu vodíka na vodu a dehydroaskorbát (DHA) pomocou askorbátu ako elektrónového donoru, pričom vzniká monodehydroaskorbát (MDHA), jednomocný oxidant askorbátu (AA).

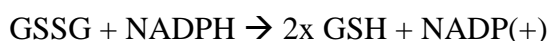


Vo vyšších rastlinách má APX rôzne izoformy, ktoré sú lokalizované v cytozóle (cAPX), chloroplastoch (chAPX), mitochondriách (mitAPX), a peroxizómoch (pAPX; Shigeoka *et al.*, 2002; Maruta *et al.*, 2016). Chloroplastové izoformy APX sú delené do troch typov: stromálna (sAPX), APX viazaná na tylakoidnú membránu (tAPX) a APX viazaná na membrány (mAPX; Asada 1999). V dôsledku prítomnosti týchto izozýmů dokážu rastliny plne využiť askorbát, jeden z najabundantnejších antioxidantov, na zachytávanie peroxidu vodíka (Shigeoka *et al.*, 2002). Bolo publikované, že aktivita tAPX je v pšenici inhibovaná fosforyláciou prostredníctvom proteínovej kinázy WKS1.1

(Wheat Kinase Start 1.1), po napadnutí patogénmi, v čoho dôsledku sa zvyšuje hladina peroxidu vodíka (Gou *et al.*, 2015). Z pohľadu tolerancie na stresové podmienky, cytozolická APX je dôležitejšia než ostatné izoformy. Mutantné rastliny *Arabidopsis apx1*, deficientné v cytozólickej APX, sú viac citlivé na svetlo vysokej intenzity, oxidatívny stres indukovaný metylviologénom, poranením a kombinácií sucha a teplotného stresu než divý typ (Davletova *et al.*, 2005; Koussevitzky *et al.*, 2008; Maruta *et al.*, 2012a). Počas vplyvu oxidatívneho stresu je oxidácia cytozolických a organelových proteínov zvýšená v *apx1* mutante (Maruta *et al.*, 2012a). V cytozóle môže cAPX chrániť organely pred pôsobením oxidatívneho stresu zabránením transportu peroxidu vodíka v bunke. Tento efekt je známy ako „cross-compartment protection“ (Davletova *et al.*, 2015).

Glutatiónreduktáza

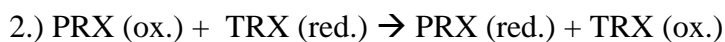
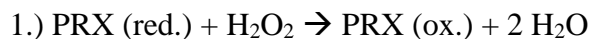
Glutatiónreduktáza je konzervovaný antioxidantný enzým prítomný v prokaryotách a eukaryotách (Couto *et al.*, 2013). Funkcia glutatiónreduktázy je katalytická redukcia glutatióndisulfidu (GSSG), čo sú 2 molekuly glutatiónu spojené disulfidovou väzbou, na redukovaný glutatión (GSH), ktorý má dôležitú úlohu v bunke pri ochrane voči škodlivým vplyvom ROS.



Vo vyšších rastlinách sa nachádzajú dva gény kódujúce glutatiónreduktázu, a to GR1 a GR2. GR1 je kratšia cytozolická a peroxizómová izoforma, GR2 má dlhšiu N-terminálnu sekvenciu a je lokalizovaná hlavne v chloroplastoch a mitochondriách (Kataya a Reumann 2010). Bolo publikované, že vplyvom soľného stresu sa výrazne zvyšuje aktivita glutatiónreduktázy v *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 2015). Ding *et al.*, 2016 publikovali, že pod silnými svetelnými podmienkami, je zvýšená expresia génu kódujúceho GR2, ktorého funkcia je oprava fotosystému II, čím zabraňuje akumulácií peroxidu vodíka v *Arabidopsis*. Glutatiónreduktáza je regulovaná svetlom aj signálmi z chloroplastov. Pri prenose rastlín *Arabidopsis* z tmavých podmienok do svetelných je zvýšená indukcia oboch GR génov už po 4 hodinách po prenose na svetlo (Garnik *et al.*, 2016). GR je dôležitý enzým aj pri odpovedi *Arabidopsis* na stres zo sucha (Tanaka *et al.*, 1990), herbicídov (Schmidt a Kunert, 1986) alebo pri nízkych teplotách (de Kok a Oosterhuis, 1983).

Peroxiredoxíny a tioredoxíny

Peroxiredoxíny (PRX) sú antioxidantné enzýmy s peroxidázovou aktivitou na širokej škále peroxidových substrátov, medzi ktoré patria hlavne peroxid vodíka, alkyl hydroxyperoxy (ROOH) a peroxyinitrid (ONOOH). Mechanizmus účinku peroxiredoxínov je odbúravanie peroxidu vodíka redukovanou formou peroxiredoxínu za vzniku molekuly vody a oxidovaného peroxiredoxínu, ktorý je následne cez reakciu s redukovaným tioredoxínom (TRX) premenený na redukovaný peroxiredoxín (Rhee *et al.*, 2001).



Peroxiredoxíny sú prítomné vo väčšine živých organizmov a majú radu izozýmov lokalizovaných v cytozóle, mitochondriách, peroxizómoch, jadre, chloroplastoch a dokonca aj v extracelulárnom priestore bunky. Sú dôležité pri odpovedi *Arabidopsis* na oxidatívny stres alebo stres z vysokej intenzity svetla (Horling *et al.*, 2003). Jedna z klasifikácií peroxiredoxínov je založená na konzervovaných sekvenciách, kde sa delia do šiestich podrodín, z toho prvé štyri sa nachádzajú vo vyšších rastlinách: AhpC/prx1, prx5, prx6, Bcp, AhpE a Tpx (Poole a Nelson 2016). Peroxiredoxíny typu prx1 sú lokalizované v plastidoch, v ktorých patria k najabundantnejším proteínom v stróme. V genóme *Arabidopsis* sa nachádzajú dva gény kódujúce chloroplastové peroxiredoxíny, 2-CysPrxA a 2-CysPrxB (Horling *et al.*, 2003). Rastlinné genómy obsahujú iba jeden gén kódujúci peroxiredoxín typu prx6, a to Per1. *PER1* je exprimovaný v semenách, konkrétne v aleurónovej vrstve a embryu (Stacy *et al.*, 1996). Prx5 peroxiredoxíny sú najviac diverzifikované a široko distribuované peroxiredoxíny v rastlinách. *Arabidopsis* exprimuje tri identické cytozólcké izozýmy (AtPrx IIB, C, D), jeden v stróme chloroplastov (AtPrx IIE) a jeden lokalizovaný v mitochondriálnej matrix (AtPrx IIF; Bréhélin *et al.*, 2003). Rastlinné Bcp-peroxiredoxíny sú špecificky pomenované Prx Q. Bolo publikované, že PrxQ sa nachádzajú vo všetkých rastlinných orgánoch *Arabidopsis* s výnimkou koreňa (Lamkemeyer *et al.*, 2006). Tioredoxíny sú malé redoxné proteíny (14kDa), prítomné vo vyšších rastlinách, ale aj v prokaryotách a *Archea* (Holmgren, 1985) Ich úlohou je redukcia špecifických disulfidových väzieb na cieľových proteínoch, čím regulujú ich štruktúru a funkciu. Trx sú zahrnuté pri odpovedi na abiotický stres a bolo publikované, že ich prítomnosť pomáha ustáliť redoxné prostredie v bunke a zlepšiť

prenos signálu pod vplyvom stresu zo zasolenia (Rouhier a Jacquot, 2005). Podieľajú sa aj na oprave oxidovaných proteínov pôsobením environmentálnych faktorov (Dos Santos a Rey, 2006)

2.2.2 Indukcia oxidatívneho stresu

Paraquat

Paraquat (metylviologén) je ne-selektívny herbicíd na báze dusíka a je používaný pre štúdium oxidatívneho stresu. Herbicídna aktivita paraquatu spočíva v interferenciách s fotosyntetickým elektróntransportným reťazcom. V chloroplastoch, paraquat inhibuje fotosyntézu, kde môže pôsobiť ako akceptor elektrónov vo fotosystéme I, čím spôsobuje inhibíciu redukcie ferredoxínu a NADP na NADPH (Krieger-Liszka *et al.*, 2010). Táto interferencia spôsobuje tvorbu superoxidového aniónu, singletového kyslíka ako aj hydroxylových a peroxylových radikálov. Cantavenera *et al.*, 2007 ukázali, že paraquat má mutagénne vlastnosti. Jeho genotoxický efekt bol študovaný v rôznych organizmoch ako sú rastliny, mikroorganizmy a kultúry cicavčích buniek (Dinis-Oliveira *et al.*, 2006; Jovtchev *et al.*, 2009; Zega *et al.*, 2010). V nefotosyntetických organizmoch spôsobuje paraquat tvorbu ROS hlavne v mitochondriách, kde má funkciu ako akceptor elektrónov pre oxidoreduktázy. Z dôvodu inhibície prerušenia elektrónového transportu v chloroplastoch a nadprodukcie ROS, spôsobuje paraquat inhibíciu rastu *Arabidopsis* (Qian *et al.*, 2014). Štúdie ukázali, že paraquat ovplyvňuje zníženie regulácie génov, ktorých úloha je v metabolizme tvorby chlorofylu a porfyrínu ako aj génov, ktorých funkcia súvisí fotosyntézou (Kobayashi *et al.*, 2008; Paddock *et al.*, 2010).

Alloxan

Alloxan (5,5-dihydroxyl pyrimidín-2,4,6-trión) je nestabilný a toxický glukózový analóg, ktorý patrí medzi deriváty pyrimidínu so silnými oxidatívnymi vlastnosťami. V prítomnosti s intracelárnymi tiolmi, hlavne glutatiónom, produkuje ROS v cyklických redox reakciách. Oxidatívny stres indukovaný alloxanom spôsobuje zníženie hladiny redukovaného glutatiónu v bunkách (Lenzen, 2008). Alloxan spôsobuje dočasné zvýšenie hladiny superoxidového radikálu v elongačných a diferenciačných zónach koreňovej špičky jačmeňa (Liptáková *et al.*, 2012). Skoršie štúdie ukázali, že alloxan znižuje hladinu PIN1 a PIN3 génov v *Arabidopsis* (Pasternak

et al., 2005). Oplyvnenie alloxanom v transgénnej línii *Arabidopsis* exprimujúcej α -tubulín značený GFP viedlo k rozpadu mikrotubulov, a ich následnému zhlukovaniu do proteínových agregátov po 6 hodinách ovplyvnenia (Wu *et al.*, 2020).

Menadión

Menadión (vitamín K3) je syntetická zlúčenina, ktorá patrí do triedy vitamínov rozpustných v tukoch (Klack a Carvalho, 2006). Je to redoxne aktívny chinón, ktorý indukuje produkciu superoxidových radikálov v mitochondriálnom elektrónovom transportnom reťazci súperením s ubiquinónom o voľné elektróny. Je preukázané, že ovplyvňuje chloroplasty a indukuje rapídnu oxidáciu mitochondrií, chloroplastov a cytozólu (Lehmann *et al.*, 2009). Lehmann *et al.*, 2009 ukázali, že rastlinné bunky ovplyvnené oxidatívnym stresom vykazovali vyšší dopyt po NADPH než po NADH, z dôvodu zvýšenej produkcie NADPH a aktivácie oxidatívneho pentóza-fosfátového cyklu v koreňoch *Arabidopsis*. Okrem iného, oxidatívny stres indukovaný menadiónom môže spôsobiť degradáciu pyrimidínových nukleotidov. Baxter *et al.*, 2007 publikovali, že rastlinné bunky ovplyvnené menadiónom nedokážu obnoviť hladinu askorbátu do kontrolných hodnôt po pôsobení oxidatívneho stresu ako pred ovplyvnením, čo naznačuje silné poškodenie buniek oxidatívnym stresom a pravdepodobne problém recyklovať oxidovaný askorbát cez askorbát-glutatiónový cyklus. Navyše, po pôsobení menadiónom je v rastlinných bunkách zvýšená akumulácia treonátu, vedľajšieho produktu askorbátu. Menadión spôsobuje zníženie hladiny transkriptov kódujúcich enzýmov v inhibovaných metabolických dráhach. Medzi tieto dráhy patria biosyntéza aminokyselín, biosyntéza lipidov alebo metabolizmus nukleotidov (Baxter *et al.*, 2007).

2.3 Tvorba ROS a ich úloha počas PTI

Rastliny využívajú svoj imunitný systém aj na detekciu a odpoveď voči patogénnym organizmom. Imunitné receptory s extracelulárnymi doménami slúžia na rozoznanie konzervovaných mikrobiálnych domén, v čoho dôsledku sa vyvinula primárna imúnna odpoveď, tzv. imunita vyvolaná mikrobiálnym vzorom (Pattern-Triggered Immunity; PTI). Tieto domény sa nazývajú molekulárne vzory asociované s patogénom alebo mikróbom (Pathogen / Microbe Associated Molecular Pattern; PAMPs / MAMPs). K najlepšie preštudovaným PAMPs patria bakteriálny flagelín a hubový chitín (Thomma *et al.*, 2011). Imúnna odpoveď na tieto PAMPs spočíva v tvorbe ROS v apoplaste, dočasnom transporte molekúl vápnika do apoplastu a v aktivácii mitogénom aktivovaných proteín kináz (Mitogen Activated Protein Kinase; MAPK), proteínových kináz založených na vápniku (Calcium Dependent Protein Kinase; CDPK) ako aj v zmenách na úrovni transkripcie obranných génov (Couto a Zipfel, 2016). Extracelulárne ROS môžu slúžiť ako antimikrobiálne molekuly alebo ako sekundárne posly pri signalizácii pre aktiváciu imunitnej odpovede (Kadota *et al.*, 2015).

Jednou z najlepšie preštudovaných receptorových kináz rozoznávajúcich PAMP je FLS2 (Flagellin Sensing 2), ktorá reaguje na konzervovaný epitóp bakteriálneho flagelínu o veľkosti 22 aminokyselín spolu s BAK1 kinázou (BRI1 – Associated Kinase 1; Chnichilla *et al.*, 2006). Ak sa flagelín 22 naviaže na FLS2 receptor, komplex FLS2-BAK1 iniciuje signalizačnú kaskádu a spúšťa imúnne odpovede na napadnutie patogénom, zvýšenie produkcie ROS (13), modifikáciu fosforylačných miest proteínov asociovaných s imúnnou odpoveďou (14) a zmenu expície génov (15). Okrem BAK1, BIK1 kináza, ktorý je členom cytoplazmatických kináz podobných receptorom (Receptor – Like Cytoplasmic Kinase; RLCK) je úzko spojená s aktivitou FLS2 receptoru. BIK1 je viazaná s komplexom FLS2, ktorý je priamo fosforylovaný po rozoznaní flg22. Aktivovaná BIK1 je kináza je následne uvoľnená z FLS2 komplexu a fosforyluje NADPH oxidázu pre aktiváciu produkcie extracelulárnych ROS (Kadota *et al.*, 2014). 2 MAPK kaskády NPK1-MEK1-NTF6 a MEK2-SIPK sú zodpovedné za reguláciu tvorby ROS cez RBOH na odpoveď voči napadnutiu patogénom (Asai *et al.*, 2008). MAPK kaskády, ktoré sú zodpovedné za imúnna odpoveď rastliny voči napadnutiu patogénom v *Arabidopsis* sú MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 (Asai *et al.*, 2002). V *Arabidopsis* MAP3K kináza, MEKK1, je aktivovaná okrem abiotických stresových faktorov aj bakteriálnymi a hubovými elicítormi (Xing *et al.*, 2015). ROS, ktoré sú produkované po napadnutí

patogénom, aktivujú MEKK1 a tá následne aktivuje MKK4/5-MPK3/6-VIP1/ACS6 signálnu kaskádu ako odpoveď na biotický stres (Meng a Zhang, 2013). V *Arabidopsis* sa nachádza 10 členov rodiny RBOH, pričom RBOHD a RBOHF sú najdôležitejšie pri napadnutí patogénom a spúšťajú rapídnu a dočasnú produkciu ROS (Nuhse *et al.*, 2007). Identifikácia RBOH, ako hlavnej rodiny enzýmov zodpovedných za produkciu ROS pri napadnutí patogénmi bola, okrem iného, dokázaná aj mutantnými líniami *atrbohD/atrbohF Arabidopsis*. Táto dvojité mutantná línia vykazovala zníženú hypersenzitívnu reakciu pri napadnutí avirulentnou baktériou a nevykazovala potlačenie vplyvu patogénu v rastlinných pletivách. Avšak, tá istá línia, vykazovala zvýšenú bunkovú smrť a rezistenciu na slabý virulentný kmeň *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Torres *et al.*, 2002). Tieto zistenia môžu naznačovať, že RBOH oxidázy sú zodpovedné za produkciu extracelulárnych ROS, zodpovedné za signalizáciu, pri odpovedi na rastlinné patogény, avšak typ odpovede sa líši v závislosti od interakcie so špecifickým patogénnym druhom.

ROS po napadnutí patogénom môžu tvoriť deriváty lipidov ne-enzymatickou oxygenáciou, ktoré môžu poškodiť membrány napadnutých buniek alebo signálne molekuly ako napr. cyklické oxylipíny (Montillet *et al.*, 2015). Dokážu taktiež indukovať tvorbu fytoalexínov a sekundárnych metabolitov, ktoré dokážu zachytiť a zastaviť ďalšie rozširovanie patogénu v rastlinných pletivách (Thoma *et al.*, 2003). Avšak, ROS sú najviac spojované s hypersenzitívnu reakciou pri napadnutí patogénom, v čoho dôsledku sa spúšťa programovaná bunková smrť (Mur *et al.*, 2008). Dynamické zmeny podmienok v apoplaste počas imunitných odpovedí ovplyvňujú homeostázu ROS v rastlinnej bunke. Po detekcii MAMPs / PAMPs, je apoplast alkalizovaný cez inhibíciu ATPázovej aktivity cez receptory PRR (Pattern Recognition Receptors; Ryan *et al.*, 2003). Tento efekt spôsobuje zvýšenie pH v apoplaste, čím sa zlepšujú podmienky pre peroxidázy typu III (Type III Peroxidases), ktorých funkciou sa zvyšuje tvorba peroxidu vodíka v apoplaste. Z tohoto dôvodu, gény *Arabidopsis* PRX33 a PRX34 sú dôležité pri ROS signalizácií v odpovedi počas PTI na bakteriálne patogény (Daudi *et al.*, 2012). Medzi ďalšie zdroje ROS v apoplaste po napadnutí patogénmi sú polyamínové oxidázy závislé na FAD, oxalát oxidáza alebo diamín oxidáza (Yoda *et al.*, 2009). Pohyb ROS cez membrány pri v odpovedi počas PTI je regulovaný membránovými proteínmi. V *Arabidopsis*, aquaporín PIP1;4 je aktivovaný pri odpovedi počas PTI a transportuje apoplastické ROS do cytoplazmy. Mutantné línie *Arabidopsis pip1;4* sú viac náchylné na

napadnutie patogénom a majú potlačenú transkripciu obranných génov, ako napr. PR1 a NPR1 než divé typy (Tian *et al.*, 2016).

Bolo zistené, že ROS môžu spôsobovať zmeny pH a zmeny toku iónov v bunke, v čoho dôsledku sú aktivované špeciálne proteázy, ktoré dokážu eliminovať patogénne mikroorganizmy (Segal, 2008). Ďalšia funkcia ROS pri signalizácii je interakcia s ostatnými signalizačnými molekulami a rastlinnými hormónmi. ROS úzko interagujú s vápnikovou signalizáciou alebo s fosforylačnými kaskádami. Mnohé obranné reakcie ROS pri napadnutí patogénom boli taktiež asociované s rastlinnými hormónmi, ako napr. kyselinou salicylovou (SA; Torres *et al.*, 2006) alebo kyselinou abscisovou (ABA; Kwak *et al.*, 2003). V kontraste so signalizačnými kaskádami ako napr. MAPK kaskády, ktoré interagujú so špecifickými miestami na cieľových proteínoch, ROS priamo modifikujú cieľové proteíny cez aminokyselinové zvyšky ako sú napr. cysteín a metionín. Takto modifikované proteíny môžu slúžiť ako ROS senzory. Medzi takéto senzory patria napr. CRK lokalizované na plazmatickej membráne (Plasma Membrane-Localized Cysteine Rich Receptor Like Kinases; Kimura *et al.*, 2017). Proteín CRK28 patrí k cieľovým proteínom ROS, kvôli cysteínovým aminokyselinovým zvýškom v extracelulárnej doméne a interaguje s FLS2 po rozoznaní flg22. Nadexpresia CRK28 spôsobuje tvorbu ROS v odpovedi na flg22 a spôsobuje bunkovú smrť (Yadeta *et al.*, 2017). Medzi ROS senzory v odpovedi počas PTI, môžu patriť aj transkripčné faktory. Môžu byť priamo modifikované v jadre a občas aj v cytozóle. K prípadom priamej modifikácie transkripčných faktorov patria napr. R2R3-MYB proteíny. Obsahujú dva konzerované cysteínové zvyšky, ktoré po modifikácii ROS, formujú disulfidovú väzbu, ktorá bráni naviazaniu sa na DNA (Heyne *et al.*, 2004). Cieľovými proteínmi ROS pri napadnutí patogénom sú aj iné proteínové kinázy. V *Arabidopsis*, OXI1 kináza (Oxidative Signal-Inducible 1) je serín/treonínová kináza, ktorá ovplyvňuje rast koreňových vláskov a vplýva na imunitnú odpoveď rastliny pri napadnutí patogénom. Jej kinázová aktivita je priamo aktivovaná peroxidom vodíka, čím zapája MAPK do imunitnej signalizácie (Rentel a Knight, 2004). Podobne ako OXI1, aj MAP3K kináza, ANP1, je tiež aktivovaná peroxidom vodíka, čím zapája do imunitnej signalizácie aj MPK3 a MPK6 (Nishihama *et al.*, 1997).

2.2.4 Imúnna odpoveď a MAPK u jačmeňa

MAPK kaskády sú zložené z troch komponentov: mitogénom aktivované proteín kinázy kinázy kinázy (MAPKKK), mitogénom aktivované proteín kinázy kinázy (MAPKK) a mitogénom aktivované proteín kinázy (MAPK), ktoré sú aktivované fosforyláciou na aktívnych miestach týchto kináz (Zhang *et al.*, 2006). MAP kinázy sú fosforylované na konzervovaných treonínových a tyrozínových aminokyselinových zvyškoch v aktivačnej slučke (T-slučka) MAP kinázami vyššej úrovne. Fosforylačné motívy sa ale líšia v závislosti na úrovni kaskády. V rastlinách majú MAP kinázové kaskády úlohu hlavne v regulácii bunkových procesov, ako sú napr. bunkové delenie, rast a vývin rastliny a odpoveď na biotický a abiotický stres, medzi ktoré patria napr. salinita, stres zo sucha, stres z vysokých a nízkych teplôt a stres pri napadnutí patogénmi. Rastlinné MAP kinázy sú najviac preštudované v modelovej rastline *A.thaliana*. Aj keď genóm *Arabidopsis* obsahuje 20 génov kódujúcich MAPK, iba 3 sú najviac preskúmané: *AtMPK3*, *AtMPK4* a *AtMPK6* (Rasmussen *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 2010; Sinha *et al.*, 2011). *AtMPK4* je aktivovaná PAMPs napr. flagelínom 22 a je negatívny regulátor produkcie kyseliny salicylovej a pozitívny regulátor kyseliny jasmónovej (Petersen *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2008). *AtMPK3* a *AtMPK6* sú tiež aktivované PAMPs a regulujú produkciu camalexínu. *AtMPK3/4/6* sú taktiež aktivované aj abiotickými stresovými faktormi a hrajú úlohu aj vo vývinových procesoch (Ichimura *et al.*, 2000). Okrem modelovej rastliny *Arabidopsis*, MAP kinázy sú skúmané aj v iných plodinách napr. ryža (Rohila a Yang, 2007), *Brachypodium* (Chen *et al.*, 2014) alebo kukurici (Liu *et al.*, 2013).

V rastlinách jačmeňa bolo identifikovaných celkovo 156 HvMAPKKK, 6 HvMAPKK a 20 HvMAPK. Dĺžka HvMAP kináz je rôznorodá, siahajúc od 100 do 1332 aminokyselín, s priemernou dĺžkou 596 aminokyselín. Molekulová hmotnosť HvMAP kináz je v rozmedzí od 11,2 kDa do 147,1 kDa a líšia sa aj v hodnote izoelektrického bodu, ktorá siaha od 4,22 do 9,73 pI. Signifikantné rozdiely vo fyzikálnych a chemických vlastnostiach môžu súvisieť so sub- a neofunkcionalizáciou génov HvMAP kináz, ktorá mohla prebehnúť medzi génmi kódujúcimi HvMAP v jačmeni (Wang *et al.*, 2016). Analýza subcelulárnej lokalizácie HvMAP kinázových génov ukázala, že 52 HvMAP kinázových génov je lokalizovaných v jadre, 45 v plazmatickej membráne a 43 v cytoplazme, pričom ostatné HvMAP kinázy sa môžu nachádzať v chloroplastoch, mitochondriách alebo extracelulárnom priestore. Identifikované HvMAPK obsahujú

proteínové domény a motívy asociované s MAPK: 5 HvMAPK obsahuje TEY fosforylačný motív a 10 HvMAPK obsahuje TDY fosforylačný motív. Podobný pomer medzi TEY a TDY MAPK bol pozorovaný aj v ostatných jednoklíčnolistových kultúrnych plodinách ako napr. ryža (5 TEY ku 11 TDY MAPK), kukurica (7 TEY ku 11 TDY MAPK) a pšenica (5 TEY ku 9 TDY MAPK; Zhang et al., 2006; Lian *et al.* 2012; Liu *et al.* 2013). 20 génov HvMAPK obsahuje špecifický konzervovaný motív T(E/D)YVxTRWYRAPE(L/V) a 6 génov HvMAPKK VGTxxYMSPER motív. Zvyšných 156 génov, ktoré patria do podrodiny HvMAPKKK môžu byť rozdelené do 3 skupín na základe ich konzervovaných motívov G(T/S)Px(W/Y/F)MAPEV (podrodina MEKK kináz), GTxx(W/Y)MAPE (podrodina Raf-like kináz) a GTPEFMAPE(L/V)Y (podrodina ZIK kináz). Okrem proteín kinázových domén, boli identifikované aj ostatné, široko distribuované domény v HvMAP kinázach ako napr. Bulb-type lectin doména, S-locus glycoprotein doména a PAN/Apple doména. Je predpokladané, že tieto domény sú zahrnuté v raste a vývine rastliny ako aj v prenose signálu (Colcombet a Hirt, 2008). Navyše, bolo identifikovaných 27 cis-elementov, z ktorých SARE (Salicylic Acid Responsiveness) a TGA (Auxin responsive) doména boli prítomné iba v 10 génoch HvMAPK kináz, pričom SKn-1 doména, vyhodnotená ako najviac abundantná doména, bola prítomná v 159 HvMAP kinázach. Motív Skn-1 je regulačný element dôležitý pre odpoveď na oxidatívny stres v eukaryotách navrhujúc, že MAPK kaskády hrajú dôležitú úlohu pri regulácii vývinu jačmeňa a odpovedi na stres. V prípade vývojových štádií, bolo identifikovaných 75 HvMAP kináz, ktoré sú exprimované minimálne v jednom orgáne alebo konkrétnom vývinovom štádiu. *HvMAPK1*, *HvMAPK4*, *HvRaf-like 63*, *HvRaf-like87* a *HvZIK2* sú zodpovedné pre reguláciu cirkadiálnych rytmov, čase kvitnutia a majú úlohu aj vo vývoji rastlinných orgánov. *HvRaf-like 103* a *HvRaf-like 49* sú prítomné v senescenčných listoch, pričom *HvRaf-like 66*, *HvRaf-like 47*, *HvRaf-like 93* a *HvMAPK7*, sú preferenčne exprimované v koreňoch, epiderme alebo klásku, za účelom tkanivovo-špecifického vývoja týchto orgánov (Cui *et al.*, 2019).

HvMPK2, *HvMPK17* a *HvMPK8* boli špecificky podregulované počas imunitnej odpovede spôsobenej efektorom (Effector Triggered Immunity; ETI) pri interakcii s patogénom *P. hordei*. *HvMPK5/6/7* a *12* môžu mať úlohu pri pozitívnej regulácii ETI indukovanej pri interakcii s *P.hordei*, pričom *HvMPK2/17/8* fungujú pri negatívnej regulácii ETI a programovanej bunkovej smrti. Ako regulátor rezistencie pri interakcii s hemibiotrofickým patogénom *M. oryzae* môže fungovať aj *HvMPK4*. V rastlinách

jačmeňa, v ktorých je HvMPK4 nadexprimovaná, sú znížené hladiny kyseliny salicylovej a peroxidu vodíka. Na druhú stranu, po napadnutí patogénom *M.oryzae* bola zvýšená hladina etylénu a aktivita katalázy (Abass, 2011). Abbas a Morris, 2013 publikovali, že hladina voľnej SA bola podobná v divom type, rastlinách nadexprimujúcich *HvMPK4* a antisense líniách s nízkou expresiou *HvMPK4* v kontrolných podmienkach, avšak hladina SA a peroxidu vodíka bola mimoriadne zvýšená v antisense líniách po interakcii s patogénom *M.grisea*, spôsobujúc zvýšenú rezistenciu týchto línií. Bolo navrhnuté, že funkcia *HvMPK4* v rastlinách jačmeňa súvisí s negatívnou reguláciou produkcie SA. Ďalším dôkazom, že signálne MAPK kaskády hrajú dôležitú úlohu pri imúnnej odpovedi jačmeňa na patogény, je nadexpresia *HvMPK1* po ovplyvnení patogénmi *Agrobacterium* a *Fusarium* (Sarraf *et al.*, 2019).

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 Biologický materiál

Rastliny *A. thaliana* ekotyp Columbia (v práci označované ako Col-0), mutantné rastliny *fsd1-1* (SALK_029455) a *fsd1-2* (GABI_740E11) a mutant *fsd1* exprimujúci C-terminálny *proFSD1::FSD1:GFP* konštrukt (v práci označovaný ako FSD1-GFP) a N-terminálny *proFSD1::GFP:FSD1* konštrukt (v práci označovaný ako GFP-FSD1; Dvořák *et al.*, 2020). Rastliny *Hordeum vulgare* divý typ a mutantné línie jačmeňa, odrody Golden Promise s vyradeným génom pre HvMMPK3 pripravené TALEN technológiou. Semená boli poskytnuté Ing. Pavlom Křenkom, Ph.D

3.2 Zoznam použitých chemikálií

Zoznam použitých chemikálií

2-merkptoetanol (Sigma-Aldrich), 40% akrylamid/bis 39,5:1 (Biorad), 4x Laemmli pufor (Biorad), acetón (Sigma-Aldrich), acetonnitril (Sigma-Aldrich), amid kyseliny jódoctovej (Sigma-Aldrich), 5x Bradford protein reagent (Biorad), brómfenolová modrá (Sigma-Aldrich), diaminobenzidín (DAB; Sigma-Aldrich), dimetylformamid (Sigma-Aldrich), dimetyl (3-(propyl)azaniumylpropán)-1-sulfonát (CHAPS; Sigma-Aldrich), chlorid draselný (Sigma-Aldrich), chlorid horečnatý (Sigma-Aldrich), chlorid sodný (Sigma-Aldrich), Clarity ECL Western blotting substrate (Biorad), Complete (Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche), dithiotreitol (Sigma-Aldrich), dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich), etanol (PENTA), fenol pufrovaný trisom (pH 8,8; Sigma-Aldrich), fluorid sodný (Sigma-Aldrich), Gellan Gum (Alfa Aesar), Glycerol (Sigma-Aldrich), glycín (Sigma-Aldrich), HEPES (Duchefa), hovädzí sérový albumín (Sigma-Aldrich), Hydrogénfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich), hypochlorid sodný (Sigma-Aldrich), kyanid draselný (Sigma-Aldrich), kyselina askorbová (Sigma-Aldrich), kyselina etyléndiamíntetraoctová (Sigma-Aldrich), kyselina etylénglykoltetraoctová (Sigma-Aldrich) kyselina chlórovodíková (Sigma-Aldrich), kyselina octová (Sigma-Aldrich), kyselina trifluórooctová (Sigma-Aldrich), menadión (Sigma-Aldrich), MES (Sigma-Aldrich), metanol (Sigma-Aldrich), močovina (Sigma-Aldrich), Murashige a Skoog médium (Duchefa), nitroblue tetrazolium chloride (Sigma-Aldrich), octan amónny (Sigma-Aldrich), peroxid vodíka (Sigma-Aldrich), peroxidisíran amónny (APS; Biorad), Phostop (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets; Roche), riboflavín (Sigma-Aldrich), sacharóza (Sigma-Aldrich), sušené odtučnené

mlieko (Biorad), TGX Stain Free FastCast Acrylamide Kit 10% (Biorad), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), tetrametyléndiamín (TEMED; Sigma-Aldrich), tiomočovina (Sigma-Aldrich), Tris (Sigma-Aldrich), trypsín (Sigma-Aldrich), Tween-20 (Sigma-Aldrich).

Zoznam použitých protilátok

Goat anti-rabbit IgG konjugovaná s chrenovou peroxidázou (Sigma-Aldrich), anti-FeSOD1 (Agrisera), anti-MnSOD (Agrisera), anti-pERK (Cell Signalling).

3.3 Zoznam použitých prístrojov

Analytické váhy (XA/110 2X; RADWAG), aparatura pre SDS-PAGE (Biorad), Centrifúga (Allegra 64R; Beckman a Coulter), ChemidocTM MP Imaging System (Biorad), digestor (Merci), flowbox (Merci), fotoaparát (Nikon), Infinite M Nano (Tecan), pH meter (PC 2700; Eutech-Instruments), Rocker-Shaker MR-12 (Biorad), Simplicity UV Water Purifications Systems (Merck Millipore), Thermoshaker TS-100 (Biosan), Trans Blot Turbo Transfer System (Biorad), Vortex-2-Genie (Scientific Industries), zoomovací mikroskop Axio Zoom V16 (Zeiss).

3.4 Metódy

3.4.1 Príprava rastlinného materiálu

Sterilizácia semien *A.thaliana* prebiehala v sterilnom boxe premývaním 70% (v/v) etanolom po dobu 5 minút, 96% (v/v) etanolom po dobu 3 minút a nakoniec premývaním sterilnou destilovanou vodou. Po sterilizácii boli semená *A.thaliana* ponechané na filtračnom papieri. Následne boli semená nanesené na ½ MS médium (10 g.l⁻¹ sacharóza, 2,15 g.l⁻¹ MS basal salt mixture, 1 g.l⁻¹ MES, 6 g.l⁻¹ Gellan gum (pH 5,8)) a uložené do chladničky cez noc kvôli stratifikácii. Semená boli prenesené do fytotronu a uložené vertikálne pri svetelnom režime 16h /8h (svetlo/tma), konštatných 21°C a intenzite osvetlenia 150 μmol m⁻² s⁻¹. Sterilizácia semien *H. vulgare* prebiehala v sterilnom boxe premývaním 70% (v/v) etanolom po dobu 30 sekúnd, krátkym premytím v destilovanej vode, následne inkubovaním semien v 5% (v/v) roztoku hypochloridu s prídavkom Tween-20 po dobu 6 minút, potom premývaním 30 sekúnd 70% (v/v) etanolom a následne 6 násobným premývaním destilovanou vodou. Semená *H.vulgare* boli následne uložené v destilovanej vode cez noc. Pri biochemických analýzách boli rastliny *Arabidopsis* odoberané pre ovplyvnenia rôznej dĺžky v rovnaký čas v priebehu dňa pre vylúčenie vplyvu cirkadiálnej regulácie FeSOD1.

3.4.2 Fenotypová analýza a test odolnosti rastlín voči oxidatívnemu stresu

Päť dňové klíčence *A. thaliana* ekotyp Col-0, mutantné *fsd1-1* a *fsd1-2* rastliny a obe komplementované línie (FSD1-GFP a GFP-FSD1) boli sterilne prenesené na pevné ½ MS médium s prídavkom menadiónu ($15 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a uložené do fytotronu vertikálne pri svetelnom režime 16h /8h (svetlo/tma) a konštantných 21°C a intenzite osvetlenia $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ako kontroly boli použité rastliny na pevnom ½ MS médiu s prídavkom 96% etanolu v objeme zodpovedajúcem prídavku menadiónu. Fenotyp bol vyhodnotený v experimente $15 \mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom počtom laterálnych koreňov a dĺžkou primárneho koreňa. Pri experimente s $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom bola odolnosť vyhodnotená počtom živých (zelených) klíčencov, klíčencov s bielymi klíčovými listami a klíčencov s čiastočne bielymi klíčovými listami po 2 dňoch od prenesenia na ½ MS médium s prídavkom menadiónu. Dokumentácia klíčencov bola uskutočnená pomocou fotoaparátu (Nikon). Experiment prebehol z 5 biologických opakovaní ($n=10$) z každej línie *Arabidopsis*. Štatistická analýza bola uskutočnená pomocou programu MS Excel a dáta boli podrobené t-testu.

3.4.3 Ovplyvnenie rastlín na biochemické analýzy

Štrnásť dňové klíčence *A. thaliana* ekotyp Col-0, mutantné *fsd1-1* a *fsd1-2* rastliny a obe komplementované línie (FSD1-GFP a GFP-FSD1) boli prenesené do tekutého ½ MS média s obsahom 15 a $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónu. Ako kontroly boli použité rastliny prenesené do tekutého ½ MS média s prídavkom 96% etanolu v objeme zodpovedajúcem prídavku menadiónu. Petriho misky s rastlinami boli následne inkubované vo fytotrone po dobu 1, 4 a 8 hodín pri štandardných podmienkach za pomalého kývania. V experimente boli použité aj rastliny, ktoré boli odobraté pred vystavením oxidatívnemu stresu. Experiment prebehol v 1 opakovaní po 10 rastlín z každej línie *Arabidopsis*. 6 dňové rastliny divého typu a mutantnej KO *hvmprk3* línie jačmeňa boli pre biochemickú analýzu ovplyvnené bakteriálnymi elicítormi chitínom, flagelínom 22 a 18 v 200nmol.l^{-1} koncentrácií v tekutom ½ MS médiu polhodinu, pri štandardných podmienkach za pomalého kývania. V experimente boli použité aj kontrolné rastliny, ktoré boli ovplyvnené iba tekutým ½ MS médiom.

3.4.4 Extrakcia proteínov

Rastlinný materiál *A.thaliana* a *H. vulgare* boli homogenizované na jemný prášok v trecej miske pomocou tekutého dusíka. Homogenát bol prenesený do plastovej 1,5 ml skúmavky, kde bol k nemu pridaný natívny extrakčný pufo (50 mmol.l⁻¹ Na-fosfátový pufo (pH 7,8); 2 mmol.l⁻¹ kyselina askorbová, 2 mmol.l⁻¹ EDTA, 10% (v/v) glycerol) v množstve 0,5 ml natívneho pufru na 0,5 g homogenátu a po premiešaní sa nechal inkubovať na ľade 30 minút. Extrakcia proteínov z rastlín *H. vulgare* prebiehala použitím extrakčného E-pufru (50 mmol.l⁻¹ HEPES; 75 mmol.l⁻¹ NaCl; 1 mmol.l⁻¹ EGTA; 1 mmol.l⁻¹ MgCl₂; 1 mmol.l⁻¹ NaF; 10% (v/v) glycerol s prídavkom inhibítorov proteáz a fosfatáz a 1 mmol.l⁻¹ DTT). Extrakty boli následne vortexované a uložené na ľade 30 minút. Následne boli extrakty centrifugované 15 minút pri 13000 g a 4°C. Po centrifugácii boli supernatanty prenesené do novej plastovej 1,5 ml skúmavky a uložené na ľade. Pre dlhodobé uskladnenie boli extrakty uchované pri -80°C.

3.4.5 Meranie koncentrácie proteínov

Koncentrácie proteínov boli stanovené metódou podľa Bradforda (**cit**). Meranie prebiehalo v mikrotitračných 96 jamkových platničkách, kde bola pripravená zmes (239 µl destilovaná voda, 60 µl 5x Bradford protein reagent a 1 µl proteínový extrakt). Meranie koncentrácie prebiehalo po 10 minútovej inkubácii pri izbovej teplote na prístroji Infinite M Nano (Tecan) pri 595 nm. Koncentrácie boli odrátané z kalibračnej krivky pripravenej hovädzím sérovým albumínom.

3.4.6 Natívna elektroforéza

Proteínové extrakty obsahujúce 20 µg proteínov určené na detekciu aktivity izoforiem SOD boli nanosené na natívny 12% polyakrylamidový gél (rozdeľovací gél: 40% (v/v) akrylamid/bis 39,5:1; 1,5 mol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,8); destilovaná voda, 0,1% (v/v) TEMED, 10% APS (w/v); zaoštrovací gél: 40% (v/v) akrylamid/bis 39,5:1; 0,5 mol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 6,8); destilovaná voda, 0,1% (v/v) TEMED, 10% (w/v) APS). Po nanosení bola spustená natívna PAGE (Polyakrylamidová gélová elektroforéza) v prostredí 10% elektródového transferového pufru (3g.l⁻¹ Tris, 14,4 g.l⁻¹ glycín), 2 hodiny pri konštantných 10 mA/ gél pri 4°C.

3.4.7 Imunoblotovanie

Pre imunoblotovanie boli natívne extrakty a extrakty z rastlín *H.vulgare* denaturované 4x Laemmli pufrom (finálne koncentrácie zložiek: 62,5 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 6,8); 10% (v/v) glycerol; 1% (w/v) SDS; 0,005% (w/v) brómfenolová modrá) s prídavkom 5% (v/v) 2-merkptoetanolu. Po pridaní sa proteínové vzorky nechali povariť 7 minút pri 95°C. Po povarení boli vzorky centrifugované 10 minút pri 13000 g a 12°C a supernatant bol prenesený do nových plastových 1,5 ml skúmaviek. Následne boli proteínové extrakty s obsahom 15 µg proteínov nanosené na denaturujúci 10% polyakrylamidový TGX Stain-Free™ Fast Cast™ gél (Bio-Rad). Po nanosení bola spustená denaturačná polyakrylamidová gélová elektroforéza v prostredí 10% SDS elektródového pufru (3 g.l⁻¹ Tris, 14,4 g.l⁻¹ glycín, 1 g.l⁻¹ SDS) 1 hodinu pri konštatných 180V

Transfer bielkovín z gélu na PVDF membránu bol uskutočnený polosuchou metódou pomocou prístroja TransBlot Turbo Transfer System (Biorad; Kurien *et al.*, 2015). PVDF membrána bola rehydratovaná 30 sekúnd v 100% metanole a následne inkubovaná 5 minút v transferovom pufrí (20 ml 5x Trans Blot Turbo Transfer Buffer (Biorad), 20 ml 96% etanol, 60 ml destilovaná voda). Filtračné papiere sa inkubovali 5 minút v transferovom pufrí. Po inkubácii boli v kazete transferového prístroja navrstvené filtračné papiere, membrána, gél a nakoniec filtračné papiere. Jednotlivé vrstvy boli jemne pretláčané valčekom na elimináciu vzduchových bublín. Prenos prebiehal 10 minút pri 10 mA. Membrány boli po prenose inkubované v blokovacím roztoku, ktorého zloženie záviselo na použitej primárnej protilátke. V prípade anti-FeSOD1 a anti-MnSOD bolo použité 5% sušené odtučnené mlieko (w/v) v TBS-T. V prípade anti-pERK protilátky bolo použité 5% (w/v) hovädzí sérový albumín v TBS-T cez noc pri 4°C. Na druhý deň boli membrány inkubované primárnou protilátkou (anti-FeSOD (Agrisera), polyklonálna protilátka; riedená 1:3000 v TBS-T s obsahom 0,5% (w/v) sušeného odtučneného mlieka; anti-MnSOD (Agrisera), polyklonálna protilátka; riedená 1:2000 v TBS-T s obsahom 0,5% (w/v) sušeného odtučneného mlieka; v prípade fosforylovaných MAPK v *H. vulgare* bola použitá anti-pERK (Cell Signalling), polyklonálna protilátka; riedená 1:1000 v TBS-T s prídavkom 0,5% (w/v) BSA) po dobu 5 hodín (v prípade fosforylovaných MAPK v *H. vulgare* cez noc pri 4°C) pri izbovej teplote pri miernom kývaní. Následne prebehla inkubácia so sekundárnou protilátkou (anti-rabbit IgG, konjugovaná s chrenovou peroxidázou; riedená 1:5000 v TBS-T

s obsahom 0,5% (w/v) sušeného odtučneného mlieka) po dobu 1,5 hodiny pri izbovej teplote pri miernom kývaní. Po inkubáciách s protilátkami boli membrány premývané TBS-T 5 x 7 minút pri intenzívnom kývaní. Chemiluminescentný signál na membránach bol detekovaný použitím „Enhanced chemiluminescence“ (ECL, Biorad) substrátu na dokumentačnom prístroji Chemidoc™ (Biorad). Kvantifikácia optickej hustoty proteínových pásov bola uskutočnená pomocou programu ImageJ a ImageLab™. Experimenty prebehli v 1 opakovaní.

3.4.8 Detekcia aktivity SOD na natívnych géloch

Po separácii na natívnej PAGE bol gél prenesený do roztoku 50 mmol.l⁻¹ Na fosfátového pufru (pH 7,8) kde bol inkubovaný 10 minút pri miernom kývaní pri izbovej teplote. Následne bol prenesený do roztoku 50 mmol.l⁻¹ Na-fosfátového pufru (pH 7,8) s prídavkom 0,6 mmol.l⁻¹ NBT 20 minút v tme. Ďalším krokom bola inkubácia v roztoku 50 mmol.l⁻¹ Na-fosfátového pufru (pH 7,8) s prídavkom 5 mmol.l⁻¹ EDTA, 0,25% (v/v) TEMED a 0,06 mmol.l⁻¹ riboflavínu 15 minút v tme. Aktivita SOD bola vizualizovaná vystavením gélu studenému svetlu po dobu 5 minút za občasného premiešania ako bledé pásy na tmavom pozadí.

Pre inhibíciu SOD izoforiem boli pripravené 3 natívne gély, ktoré boli po separácii natívnou PAGE podrobené ovplyvneniu inhibítormi SOD izoforiem. Kontrolný gél bol predinkubovaný v 50 mmol.l⁻¹ Na-fosfátovom pufre, kde aktivita SOD izoforiem nie je inhibovaná. Pre inhibíciu aktivity FeSOD1 a Cu/ZnSOD izoforiem, bol natívny gél predinkubovaný 15 minút v 50 mmol.l⁻¹ Na-fosfátovom pufre s prídavkom 5 mmol.l⁻¹ peroxidu vodíka. Pre inhibíciu aktivity Cu/ZnSOD izoformy, bol natívny gél predinkubovaný v 50 mmol.l⁻¹ Na-fosfátovom pufre s prídavkom 2 mmol.l⁻¹ KCN. Po predinkubácii boli gély následne podrobené vizualizácii aktivít SOD postupom opísaným vyššie. Dokumentácia pásov SOD bola uskutočnená na dokumentačnom prístroji Chemidoc™ (Biorad) alebo skeneri. Kvantifikácia optickej hustoty proteínových pásov bola uskutočnená pomocou programu ImageJ. Experiment prebehol v 1 opakovaní.

3.4.9 Meranie koncentrácie chlorofylu

Obsah chlorofylu bol stanovený metódou podľa Harrisa *et al.*, 2013. Päť dňové klíčence *A.thaliana* ekotyp Col-0, mutantné *fsd1-1* a *fsd1-2* rastliny a obe komplementované línie (FSD1-GFP a GFP-FSD1) ovplyvnené 30 μmol.l⁻¹ menadiónom

na pevnom ½ MS médiu boli prenesené po 10 rastlinách do plastovej 1,5 ml skúmavky s prídavkom 300 µl dimetylformamidu a uložené do chladničky cez noc pri 4°C. Následne boli extrakty z plastových 1,5 ml skúmaviek prenesené na mikrotitračnú 96 jamkovú doštičku. Obsah chlorofylu bol meraný spektrofotometricky na prístroji Infinite M Nano (Tecan) pri absorbancii 647 a 664,5 nm. Meranie obsahu chlorofylu prebehlo v 5 opakovaníach z 10 rastlín z každej línie. Celkový obsah chlorofylu vychádzal z čerstvej hmotnosti semenáčikov pred meraním a zo vzorca:

Obsah chlorofylu **a** (µg/ml): $(12 \cdot A_{664.5}) - (2,79 \cdot A_{647})$

Obsah chlorofylu **b** (µg/ml): $(20,78 \cdot A_{647}) - (4,88 \cdot A_{664.5})$

Celkový obsah chlorofylu (µg/ml): chlorofyl **a** + chlorofyl **b**

3.4.10 Vizualizácia superoxidových radikálov

Pre vizualizáciu superoxidových radikálov boli použité celé štrnásť dňové rastliny *A.thaliana* ekotyp Col-0, mutantné *fsd1-1* a *fsd1-2* rastliny a obe komplementované línie (FSD1-GFP a GFP-FSD1), ktoré boli ovplyvnené 50 µmol.l⁻¹ menadiónom po dobu 4 a 8 hodín. V experimente boli použité aj kontrolné rastliny, ktoré boli ovplyvnené tekutým ½ MS médiom s prídavkom 96% etanolu zodpovedajúcemu objemu menadiónu. Po ovplyvnení boli rastliny odobraté a vložené do roztoku 10 mmol.l⁻¹ Na fosfátového pufru (pH 7,8) s prídavkom 4,3 mmol.l⁻¹ NBT, ktoré bolo infiltrované do rastlinných pletív vo vákuu (3 x 30 sekúnd). Po infiltrácii boli nadzemné časti inkubované v tme počas 30 minút. Po inkubácii boli rastliny varené v odfarbovacom roztoku (20% (v/v) kyselina octová, 20% (v/v) glycerol, 60% (v/v) etanol) vo vodnom kúpeli po dobu 5 minút a uložené v roztoku obsahujúcom 20% (v/v) glycerol a 80% (v/v) etanol. Superoxid bol vizualizovaný ako fialové sfarbenie formazánu, ktorý sa tvorí redukciou NBT. Dokumentácia jednotlivých línií bola uskutočnená pomocou fotoaparátu (Nikon). Experiment prebehol v 1 opakovaní.

3.4.11 Vizualizácia peroxidu vodíka

Pre vizualizáciu peroxidu vodíka boli použité nadzemné celé štrnásť dňové rastliny *A.thaliana* ekotyp Col-0, mutantné *fsd1-1* a *fsd1-2* rastliny o obe komplementované línie (FSD1-GFP a GFP-FSD1), ktoré boli ovplyvnené 50 µmol.l⁻¹ menadiónom po dobu 4 a 8 hodín v tekutom ½ MS médiu. V experimente boli použité aj kontrolné rastliny,

ktoré boli ovplyvnené tekutým ½ MS médium s prídavkom 96% etanolu v objeme zodpovedajúcej prídavku menadiónu. Po ovplyvnení boli rastliny odobraté a vložené do roztoku 10 mmol.l⁻¹ Na fosfátového pufru (pH 7,0) s prídavkom 4,3 mmol.l⁻¹ DAB a 0,05% (v/v) Tween-20 a uložené v tme cez noc pri izbovej teplote. Následne boli rastliny varené v odfarbovacom roztoku (20% (v/v) kyselina octová, 20% (v/v) glycerol, 60% (v/v) etanol) vo vodnom kúpeli po dobu 15 minút a uložené v roztoku obsahujúcom 20% (v/v) glycerol a 80% (v/v) etanol. Produkcia peroxidu vodíka bola vizualizovaná ako hnedý precipitát oxidovaného DAB. Následne sa z jednotlivých listov pripravil preparát pre mikroskopické pozorovanie. Dokumentácia jednotlivých listov určitej línie bola uskutočnená pomocou zoomovacieho mikroskopu (Axio Zoom V16; Zeiss). Experiment prebehol v 1 opakovaní.

3.4.12 Proteomická analýza rastlín *H. vulgare* po ovplyvnení elicítormi

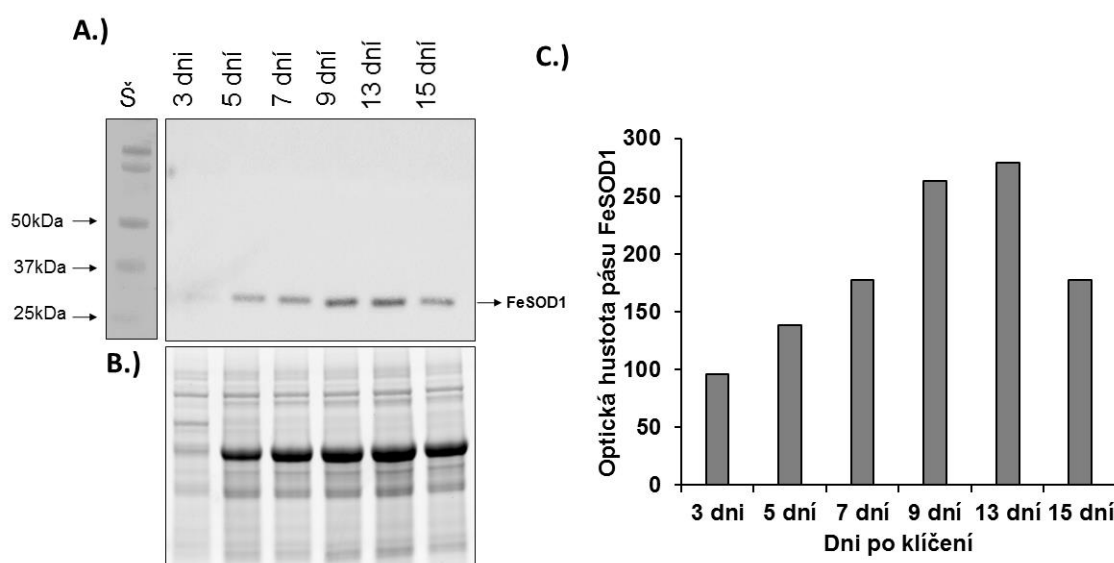
Šesť dňové rastliny divého typu a mutantnej KO *hvmpr3* línie *H. vulgare* boli ovplyvnené 200 nmol.l⁻¹ flagelínom 22 v tekutom ½ MS médiu 6 hodín pri štandardných podmienkach za pomalého kývania. V experimente boli použité aj kontrolné rastliny, ktoré boli ovplyvnené iba tekutým ½ MS médiom. Experiment prebehol v biologickom triplikáte. Následne bol rastlinný materiál homogenizovaný na jemný prášok v trecej miske s použitím tekutého dusíka. Vzorky boli pripravené v biologickom triplikáte. Po homogenizácii sa k 0,5 g homogenátu pridalo 0,5 ml extrakčného pufru (0,9 mol.l⁻¹ sacharóza; 0,1 mol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,8); 10 mmol.l⁻¹ EDTA; 100 mmol.l⁻¹ KCl; 0,4% (v/v) 2-merkaptóetanol) a nechal sa inkubovať na ľade 15 minút. Po pridaní 0,5 ml Trisom pufovaného fenolu (pH 8,8) sa zmes premiešala a inkubovala na ľade 30 minút. Po centrifugácii (5 minút pri 6000 g a 4°C) bola odobratá vrchná fenolová fáza do novej 1,5 ml plastovej skúmavky. K extraktu sa znovu pridal 0,5 ml Trisom pufovaný fenol. Po premiešaní bola zmes znovu centrifugovaná v tých istých podmienkach, vrchná fenolová fáza bola znovu odobratá a obe fenolové fázy boli zmiešané. Následne boli proteíny precipitované pridaním 5 násobného objemu 100 mmol.l⁻¹ acetátu amónneho v 100% metanole a zmes bola inkubovaná cez noc pri -20°C. Na druhý deň bol precipitát centrifugovaný 20 minút pri 13000 g a 4°C. Po centrifugácii bol pelet premývaný acetátom amónnym, dva krát 80% acetónom, 70% etanolom a znovu 80% acetónom. Medzi jednotlivými premývaniami bol pelet v roztoku uložený 15 minút pri -20°C a následne centrifugovaný 15 minút pri 13000 g a 4°C. Po poslednom premytí bol pelet vysušený v digestore 15 minút. Následne boli proteíny rozpustené v 50 µl rehydratačného

pufri (6 mol.l⁻¹ močovina; 2 mol.l⁻¹ tiomočovina; 2% (w/v) CHAPS; 2% (v/v) Triton X-100; 50 mmol.l⁻¹ DTT) inkubáciou 1 hodinu pri izbovej teplote. Obsah proteínov v extrakte bol stanovený metódou podľa Bradforda (cit). Nasledovala redukcia disulfidických väzieb prostredníctvom prídania 5 mmol.l⁻¹ DTT a inkubácie 1 hodinu pri izbovej teplote. Následne sa SH skupiny stabilizovali alkyláciou pomocou prídania 12,5 mmol.l⁻¹ IAA inkubáciou 1 hodinu pri izbovej teplote. Nadbytočný IAA sa eliminoval prídanim 5 mmol.l⁻¹ DTT. Pred samotným štiepením sa koncentrácia močoviny zriedila destilovanou vodou na menej ako 1 mol.l⁻¹ a kvôli zabráneniu inhibície štiepenia trypsínom. Štiepenie prebehlo cez noc (12 hodín) pri 37°C prídanim trypsínu (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) v pomere 1 µg trypsínu k 50 µg proteínov. Štiepenie bolo zastavené prídanim 4 µl koncentrovanej kyseliny octovej. Následne sa zmes centrifugovala 5 minút pri 14000 g a 4°C pre odstránenie prebytočného precipitátu. Peptidy boli následne odsolené pomocou odsolovacích SEP PAK C18 kolón. Kolóny boli aktivované 1 ml 50% (v/v) acetonitrilu a následne premyté 0,1% (v/v) TFA vo vode. Po aktivácii bolo na kolónu nanosených 400 µl peptidovej zmesi. Nežiaduce zložky boli z kolóny odstránené prídanim 0,5% (v/v) TFA v 5% (v/v) acetonitrile pre odstránenie nežiadúcich komponentov z kolóny. Nakoniec sa pridal do kolóny 90% (v/v) acetonitril pre elúciu peptidov. Eluát bol následne vysušený vo vákuovej odparke a peptidy boli uložené pri -80°C. Analýza peptidov prebiehala externe (v laboratóriu Institute for Genomics, Biocomputing and Biotechnology, Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station, Mississippi State University pomocou hmotnostnej spektrometrie kombinovanej s HPLC (Takáč *et al.*, 2016). Vyhodnotenie diferenciálneho proteómu bolo uskutočnené pomocou softvéru OmicsBox. Diferenciálne abundantné proteíny boli anotované cez analýzu pomocou génovej ontológie (GO) softvérom Blast2go. Blast bol uskutočnený voči NCBI databáze *A. thaliana*. Parametre anotácie zahŕňovali: (e-value: 1e⁻⁶; annotation cutoff: 55; GO weight 5; GO Slim).

4 VÝSLEDKY

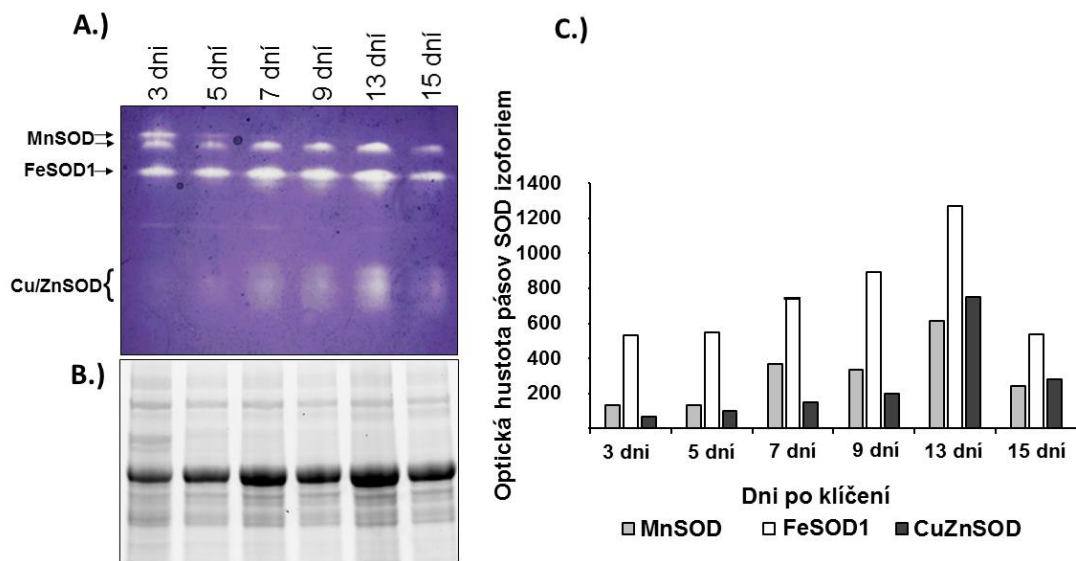
4.1 Analýza abundancie a aktivity FeSOD1 v skorých postembryonálnych štádiách *Arabidopsis*

Pomocou anti-FeSOD protilátky sme detekovali proteínový pás s Mr 22 kDa. Tento pás zodpovedá FeSOD1 proteínu (Dvořák *et al.*, 2020; Obr. 3A). Abundancia proteínových pásov FeSOD1 proteínu graduálne stúpa v závislosti od vývojového štádia Col-0 (Obr. 3C) po 13 deň rastu pričom dochádza následne k poklesu o polovicu v 15 dňových rastlinách (Obr. 3C).



Obr. 3: **Imunoblotová analýza abundancie FeSOD1 počas postembryonálneho rastu *Arabidopsis*** (A) Imunoblot z proteínových extraktov celých rastlín *A.thaliana*, ekotyp Col-0 v skorých postembryonálnych štádiách v rozmedzí od 3 dní do 15 dní po klíčení s použitím špecifickej anti-FeSOD protilátky, (B) vizualizácia proteínov na PVDF membráne po polosuchom prenose v dokumentačnom prístroji Chemidoc™, (C) kvantifikácia optickej hustoty proteínového pásu FeSOD1 použitím softvéru ImageLab™. Šípka ukazuje na FeSOD1 izoformu. kDa – molekulová hmotnosť, Š – proteínový štandard

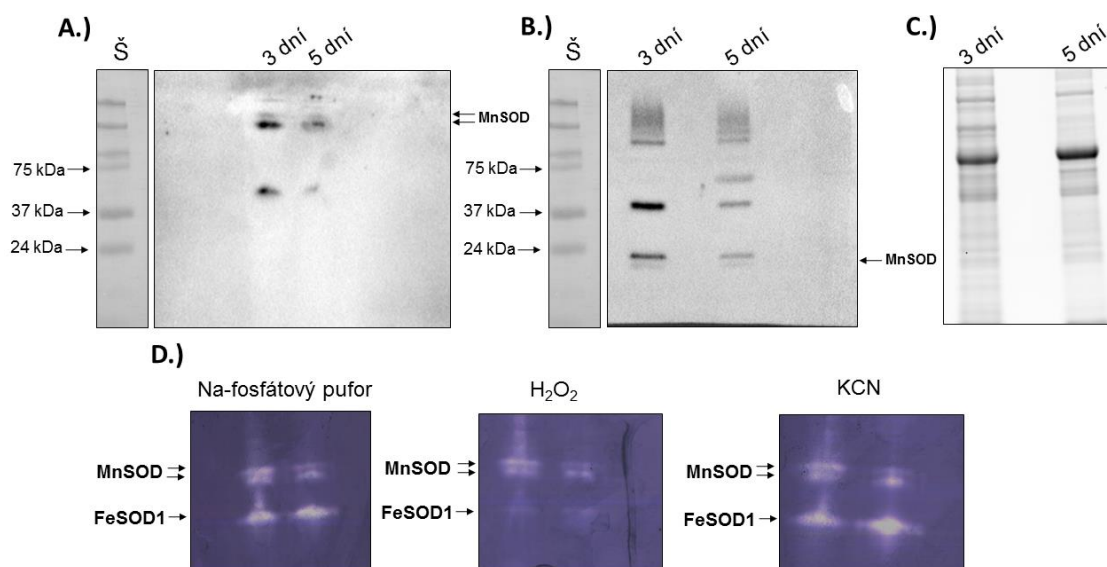
Podobné výsledky sme zaznamenali aj v aktivite FeSOD1 (Obr. 4A). Na základe analýz s využitím mutantov bolo zistené, že pás Mr 22 kDa (Obr.4A) zodpovedá FeSOD1 (Dvořák *et al.*, 2020). Najnižšia hodnota aktivity je zaznamenaná v 3 dňových rastlinách, postupne narastá a dosahuje maximum v 13 dňových rastlinách, pričom hodnota aktivity klesá v 15 dňových rastlinách približne o polovicu. Rovnaký trend je zaznamenaný aj v prípade Cu/ZnSOD a MnSOD (Obr. 4C). Tieto výsledky môžu naznačovať, že aktivita a abundancia FeSOD1 je vývinovo regulovaná počas skorého postembryonálneho vývinu Col-0.



Obr. 4: **Analýza aktivít SOD izoforiem počas skorých postembryonálnych štádií Col-0** (A) Vizualizácia SOD izoforiem na 12% géli z proteínových extraktov celých rastlín *A.thaliana*, ekotyp Col-0 v skorých postembryonálnych štádiách v rozmedzí od 3 dní do 15 dní od klíčenja, (B) vizualizácia proteínov na géli po SDS-PAGE, (C) kvantifikácia optickej hustoty pásov SOD izoforiem použitím softvéru ImageJ. Šípky ukazujú na SOD izoformy.

V skorých postembryonálnych štádiách bol detekovaný aj jeden nový pás s aktivitou SOD, a to iba v 3 dňových a 5 dňových rastlinách (Obr. 4A). Pre identifikáciu tejto izoformy, bola využitá rôzna citlivosť FeSOD, MnSOD a Cu/ZnSOD na inhibítory KCN a H₂O₂ (Obr.5D). Predinkubácia gélov v KCN a H₂O₂ s následnou vizualizáciou aktivity naznačuje, že nový pás zodpovedá MnSOD izoforme, pretože narozdiel od FeSOD1 a Cu/ZnSOD nepodlieha inhibícií ani KCN a ani H₂O₂. Tento pás sme detekovali aj pomocou imunoblotovania po natívnej PAGE v 3 dňových rastlinách a 5 dňových rastlinách (Obr. 5A). Následne sme sa pokúsili detekovať nový pás aj pomocou SDS-PAGE. Zaznamenali sme proteínový pás, ktorý zodpovedá Mr MnSOD (24 kDa; Obr. 5B). Okrem MnSOD boli detekované aj iné, nešpecifické pásy. Cieľom experimentu bolo zistiť, či sa nejedná o oligoméernu formu MnSOD. Detekovali sme proteínové pásy v oblasti 50 kDa, čo môže naznačovať diméernu formu MnSOD, pričom výraznejší signál sa nachádza v 3 dňových rastlinách oproti 5 dňovým, podobne ako pri aktivite MnSOD (Obr. 4A). Ďalšie spoločné pásy sa nachádzajú v oblasti nad 100 kDa. V tomto prípade by sa mohlo jednať o tetraméernu formu MnSOD, avšak pre objasnenie je potrebné uskutočniť ďalšie experimenty spolu s mutantnou *msd1* líniou s vyradeným génom pre

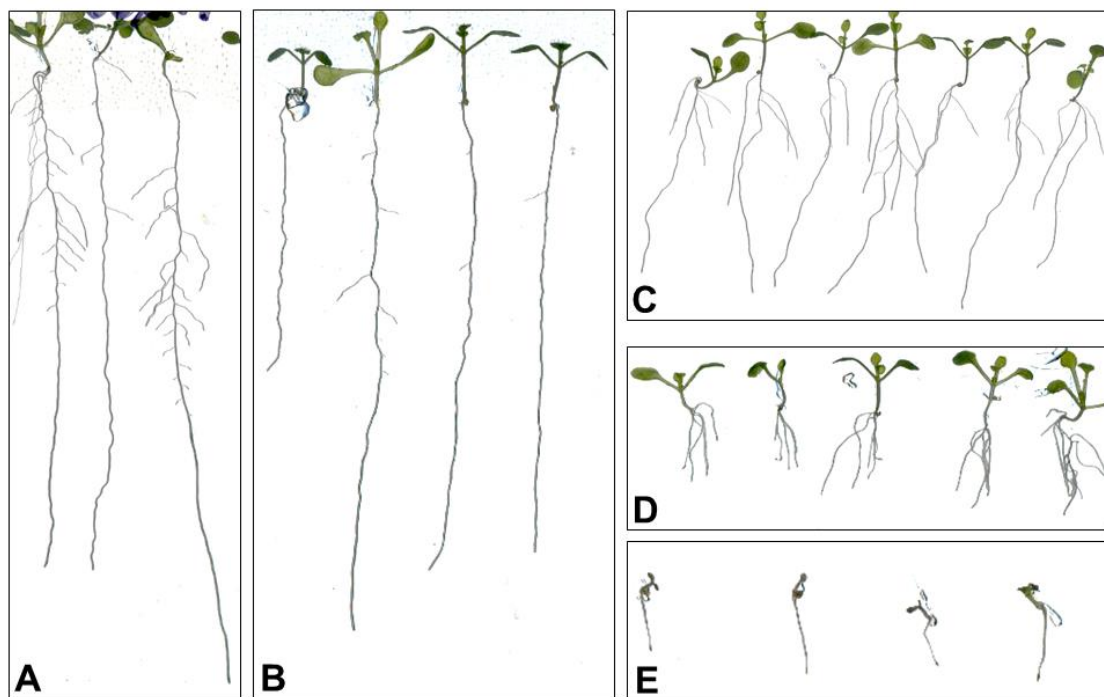
MnSOD z dôvodu identifikácie špecifických proteínových pásov zodpovedajúcich MnSOD.



Obr. 5: **Analýza identity pásu z obr. 2A.** (A) Imunoblot pripravený z natívnych extraktov použitých na obr. A s využitím špecifickej anti-MnSOD1 protilátky (B) Imunoblot pripravený z denaturovaných extraktov použitých na obr. A s využitím špecifickej anti-MnSOD1 protilátky, (C) vizualizácia proteínov PVDF membráne po prenose, (D) Vizualizácia aktivít MnSOD a FeSOD1 izoforiem na 12% géli z proteínových extraktov 3 a 5 dňových celých rastlín *A.thaliana*, ekotyp Col-0 po predinkubácii gélu v Na-fosfátovom pufri, H₂O₂ a KCN. Šípky ukazujú na MnSOD a FeSOD1 izoformy. kDa – molekulová hmotnosť, Š – proteínový štandard

4.2 Analýza odpovede mutantných a transgénnych rastlín na tvorbu ROS spôsobenú menadiónom

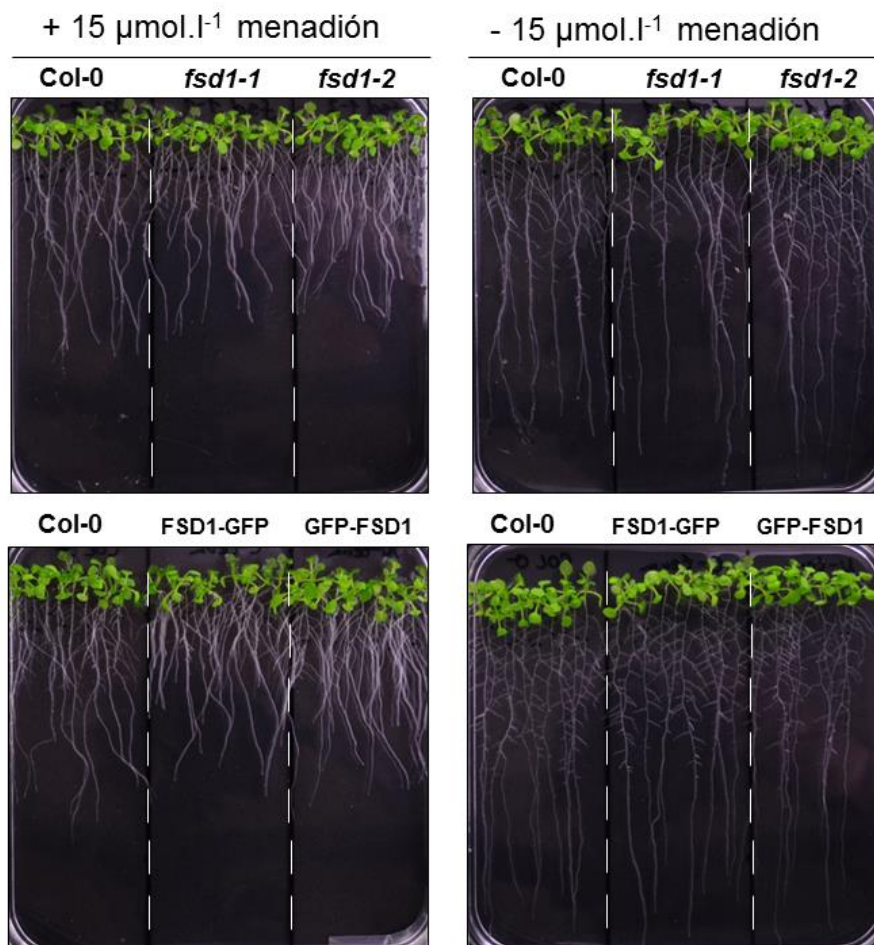
Pred samotnými experimentami bol vykonaný test odpovede rastlín Col-0 na rôzne koncentrácie menadiónu v pevnom ½ MS médiu (Obr. 6). Na základe fenotypov bola vyselektovaná koncentrácia 15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pre fenotypové analýzy a koncentrácia 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pre test vitality rastlín.



Obr. 6: **Test odpovede rastlín na rôzne koncentrácie menadiónu.** Fenotyp rastlín *A.thaliana*, ekotyp Col-0, rastúcich 7 dní na pevných $\frac{1}{2}$ MS médiách s rôznymi koncentraciami menadiónu: A: kontrola (96% etanol); B: $1\mu\text{mol.l}^{-1}$; C: $10\mu\text{mol.l}^{-1}$; D: $20\mu\text{mol.l}^{-1}$; E: $50\mu\text{mol.l}^{-1}$.

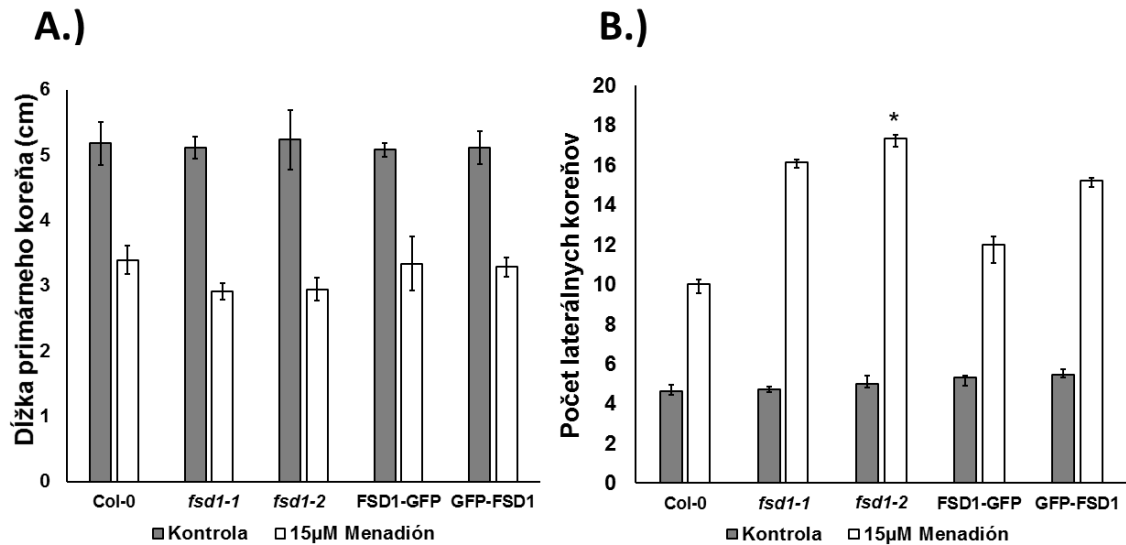
4.3 Fenotypová analýza odpovede mutantných a transgénnych rastlín na tvorbu ROS spôsobenú $15\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom

V rámci fenotypovej analýzy rastlín v odpovedi na $15\mu\text{mol.l}^{-1}$ bola meraná dĺžka primárneho koreňa (Obr. 8A) a počet laterálnych koreňov (Obr. 8B). Menadión výrazne spomalil rast primárneho koreňa všetkých testovaných línií. Mutantné *fsd1-1* a *fsd1-2* rastliny majú menšiu dĺžku primárneho koreňa než Col-0 po ovplyvnení menadiónom, avšak tento rozdiel je malý a nie je štatisticky signifikantný. Komplementované línie vykazujú rovnakú dĺžku primárneho koreňa ako Col-0 po ovplyvnení menadiónom (Obr. 8A). V rámci kontrolných rastlín sa dĺžka primárneho koreňa javí bez rozdielu medzi líniami. Zistili sme, že menadión zvýšil počet laterálnych koreňov vo všetkých líniách (Obr. 7 a 8B). V kontrolných rastlinách sme nezaznamenali signifikantné rozdiely v počte laterálnych koreňov.



Obr.7: Fenotyp rastlín *A. thaliana* po ovplyvnení 15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom. Reprezentatívne obrázky rastlín *A.thaliana* ekotyp Col-0, mutantných *fsd1-1* a *fsd1-2* rastlín a oboch komplementovaných línií (FSD1-GFP a GFP-FSD1) na pevnom $\frac{1}{2}$ MS médiu s prídavkom 15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónu a v kontrolných podmienkach (96% etanol). Prerušované čiary oddeľujú jednotlivé línie.

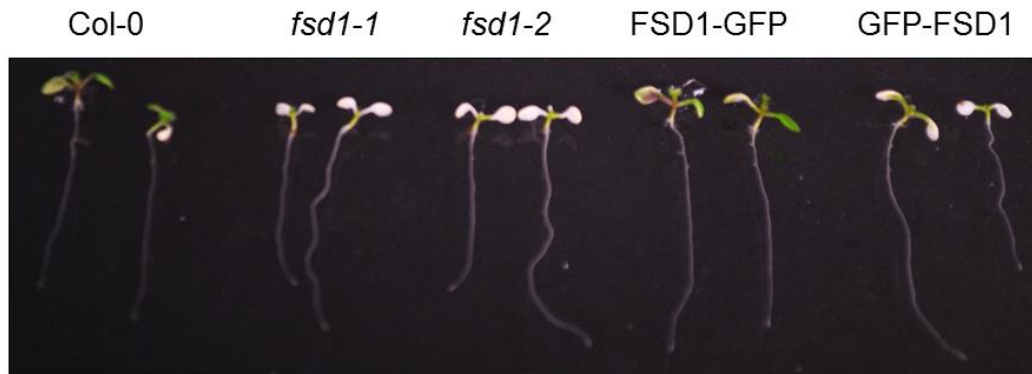
V ovplyvnených rastlinách boli zaznamenané rozdiely medzi jednotlivými líniami. Oproti Col-0, mutantné rastliny majú väčší počet laterálnych koreňov, pričom signifikantný rozdiel je medzi Col-0 a mutantnou *fsd1-2* líniou. V rámci komplementovaných línií, podobný počet laterálnych koreňov ako Col-0 má FSD1-GFP línia. GFP-FSD1 línia má už signifikantne väčší počet laterálnych koreňov ako Col-0, avšak nedosahuje hodnoty ako mutantné *fsd1* rastliny (Obr. 8B). Ako aj v prípade analýzy dĺžky primárneho koreňa, mutantné *fsd1-1* a *fsd1-2* rastliny sú najviac senzitívne na vplyv menadiónu oproti Col-0 a komplementovaným líniám. Z výsledkov vyplýva, že menadión môže výrazne ovplyvňovať tvorbu laterálnych koreňov a proces predĺžovania primárneho koreňa u rastlín *Arabidopsis*.



Obr. 8: **Kvantitatívna analýza fenotypu rastlín *A.thaliana* po ovplyvnení 15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom** (A) Graf znázorňujúci dĺžku primárneho koreňa (v cm) rastlín *A.thaliana*, ekotyp Col-0, mutantných *fsd1-1* a *fsd1-2* rastlín a oboch komplementovaných línií (FSD1-GFP a GFP-FSD1) v kontrolných (96% etanol; šedé stĺpce) a stresových (15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadión; biele stĺpce) podmienkach, (B) graf znázorňujúci počet laterálnych koreňov v rastlinách *A.thaliana*, ekotyp Col-0, mutantných rastlín *fsd1-1* a *fsd1-2* a oboch komplementovaných línií (FSD1-GFP a GFP-FSD1) v kontrolných (96% etanol; šedé stĺpce) a stresových (15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadión; biele stĺpce) podmienkach. Počet laterálnych koreňov je vyjadrený na 1 cm dĺžky primárneho koreňa. Analýza prebiehala štyri dni od prenosu na $\frac{1}{2}$ MS médium s prídavkom 15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónu. Hviezdička znázorňuje štatisticky významnú zmenu v porovnaní s Col-0 (t-test; * $p < 0,05$)

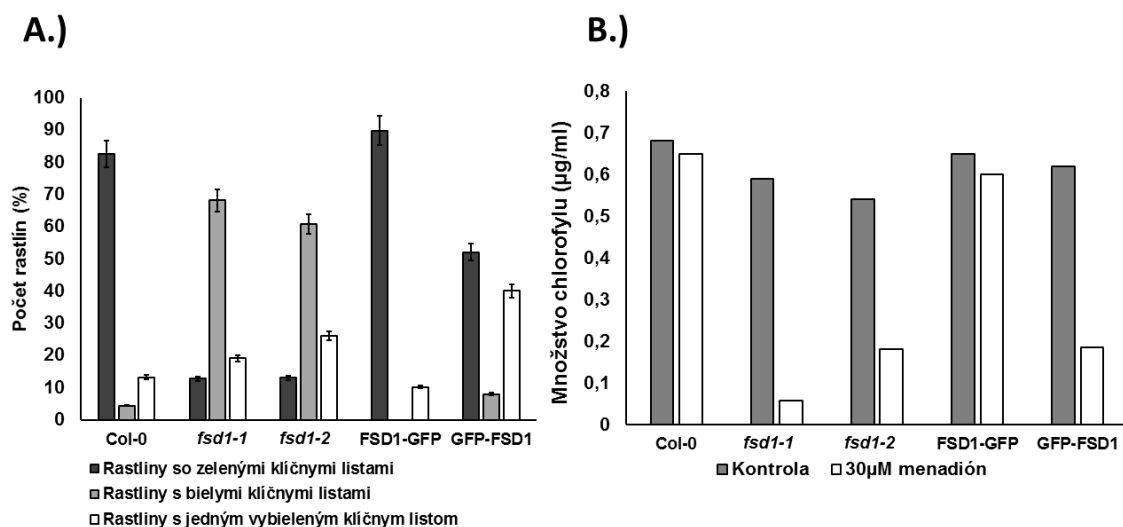
4.4 Test odolnosti rastlín na 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadión

Päť dňové rastliny *A.thaliana* ekotyp Col-0, mutantné rastliny *fsd1-1* a *fsd1-2* a obe komplementované línie (FSD1-GFP a GFP-FSD1) boli prenesené na $\frac{1}{2}$ MS médiá s prídavkom 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónu (Obr. 9). Najnižšiu mieru vitality po ovplyvnení menadiónom vykazujú mutantné *fsd1-1* (12%) a *fsd1-2* (13%) rastliny. Najvyššiu mieru vitality majú Col-0 (82%) a FSD1-GFP (90%) línie, pričom strednú mieru vitality po pôsobení menadiónu vykazuje GFP-FSD1 (52%) línia (Obr. 10A). Mutantné rastliny *fsd1-1* a *fsd1-2* sú vysoko senzitivne na vplyv menadiónu v pevných médiách a vyznačovali najvyšším počtom rastlín s bielymi klíčovými listami, čo je dôsledkom degradácie chlorofylu v listoch vplyvom oxidatívneho stresu, ktorý menadión spôsobuje (Obr. 9).



Obr. 9: **Reprezentatívny obrázok rastlín *A.thaliana* po ovplyvnení 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom.** Rastliny *A. thaliana* ekotyp Col-0, mutantné rastliny *fsd1-1* a *fsd1-2* a obe komplementované línie (FSD1-GFP a GFP-FSD1) na pevnom $\frac{1}{2}$ MS médiu s prídavkom 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónu po 2 dňoch od prenesenia.

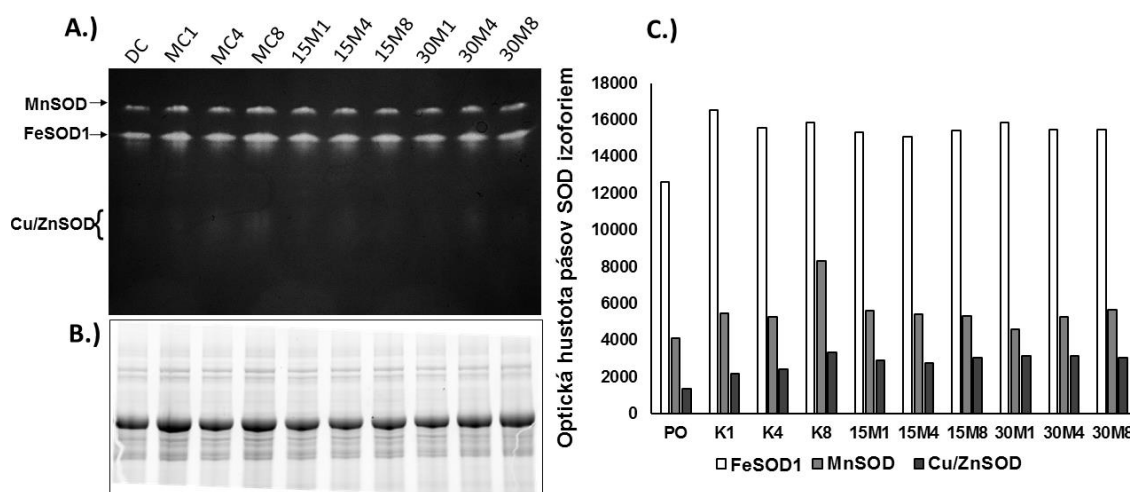
Na druhú stranu, komplementované línie nevykazujú fenotyp ako mutantné *fsd1-1* a *fsd1-2* rastliny. FSD1-GFP vykazuje vysokú mieru vitality, približnú s Col-0 a zároveň má najnižší počet rastlín s jedným vybieleným klíčnym listom. GFP-FSD1 vykazuje strednú mieru citlivosti na menadión a zároveň má najvyšší počet rastlín s jedným vybieleným klíčnym listom. Môžeme sa domnievať, že komplementácia vplýva určitým spôsobom na antioxidačnú obranu rastliny voči oxidatívne stresu, pričom FSD1-GFP sa javí ako odolnejšia oproti GFP-FSD1 (Obr. 10A). Následne boli tieto rastliny podrobené meraniu obsahu chlorofylu. Najvyšší obsah chlorofylu majú Col-0 a FSD1-GFP línie, ktoré majú aj najvyššiu mieru vitality, pričom najnižší obsah chlorofylu má mutantná *fsd1-1* línia (Obr. 10B). Zhodný obsah chlorofylu majú mutantná *fsd1-2* línia a GFP-FSD1 línia. V prípade mutantných rastlín, za nízkym obsahom chlorofylu sú pravdepodobne zodpovedné biele klíčne listy z dôvodu degradácie chlorofylu. Na druhú stranu, je zaujímavý nízky obsah chlorofylu v prípade GFP-FSD1 línie. GFP-FSD1 má obsah chlorofylu totožný s mutantnou *fsd1-2* líniou, avšak vitalita GFP-FSD1 je vyššia než u mutantných *fsd1* rastlín (Obr. 10B).



Obr. 10: **Obsah chlorofylu a štatistická analýza vitality rastlín *A.thaliana* po ovplyvnení 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom** (A) Graf znázorňujúci počet (v %) a stav vitality rastlín *A. thaliana* ekotyp Col-0, mutantných rastlín *fsd1-1*, *fsd1-2* a oboch komplementovaných línií (FSD1-GFP a GFP-FSD1) po ovplyvnení 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom na pevných $\frac{1}{2}$ MS médiách, (B) Graf znázorňujúci obsah chlorofylu v kontrolných (96% etanol; šedé stĺpce) stresových (30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadión; biele stĺpce) podmienkach v rastlinách *Arabidopsis* Col-0, *fsd1-1*, *fsd1-2*, FSD1-GFP a GFP-FSD1 po ovplyvnení 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom na pevných $\frac{1}{2}$ MS médiách.

4.5 Vplyv menadiónu na aktivitu FeSOD1 v *Arabidopsis*

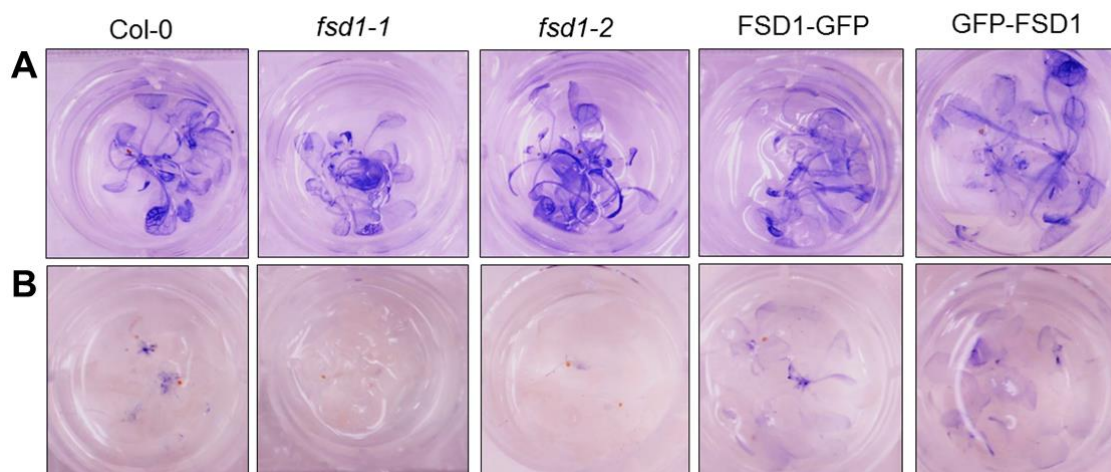
Cieľom ďalšieho experimentu bolo zistiť, ako sa menia aktivity FeSOD1 v rastlinách Col-0 v odpovedi na 2 rôzne koncentrácie menadiónu. Naším zámerom bolo vedieť krátkodobé efekty menadiónu, čo by zaistilo čo najšpecifickejšiu reakciu FeSOD1 na tento induktor tvorby ROS (Obr. 11A). Výsledky ukazujú, že po ovplyvnení menadiónom sa za daných podmienok aktivita FeSOD1 výraznejšie nemení (Obr. 11C). Aktivita FeSOD1 mierne stúpa v priebehu ovplyvnenia v kontrole ale tiež v ovplyvnených rastlinách (Obr. 11C). Z toho vyplýva, že ovplyvnenie rastlín 15 a 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom výrazný vplyv na aktivitu FeSOD1.



Obr. 11: **Analýza aktivít SOD izoforiem po ovplyvnení 15 a 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom** (A) Vizualizácia SOD izoforiem na 12% géli z natívnych proteínových extraktov celých rastlín *A.thaliana*, ekotyp Col-0 v kontrolných podmienkach hneď po odobratí z média (PO), v čase 1 hodiny, 4 hodín a 8 hodín (K1, K4, K8; 96% etanol) a stresových podmienkach použitím 15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónu v čase 1 hodiny, 4 hodín a 8 hodín (15M1, 15M4, 15M8) a 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónu v čase 1 hodiny, 4 hodín a 8 hodín (30M1, 30M4, 30M8), (B) vizualizácia proteínov na gély po SDS-PAGE, (C) kvantifikácia optickej hustoty pásov SOD izoforiem použitím softvéru ImageJ. Experiment bol uskutočnený v jednom biologickom opakovaní. PO – pred ovplyvnením, K – kontrola ovplyvnená 96% etanolom.

4.6 Vplyv FeSOD1 na hladinu superoxidových radikálov v menadiónom ovplyvnených rastlinách *Arabidopsis*

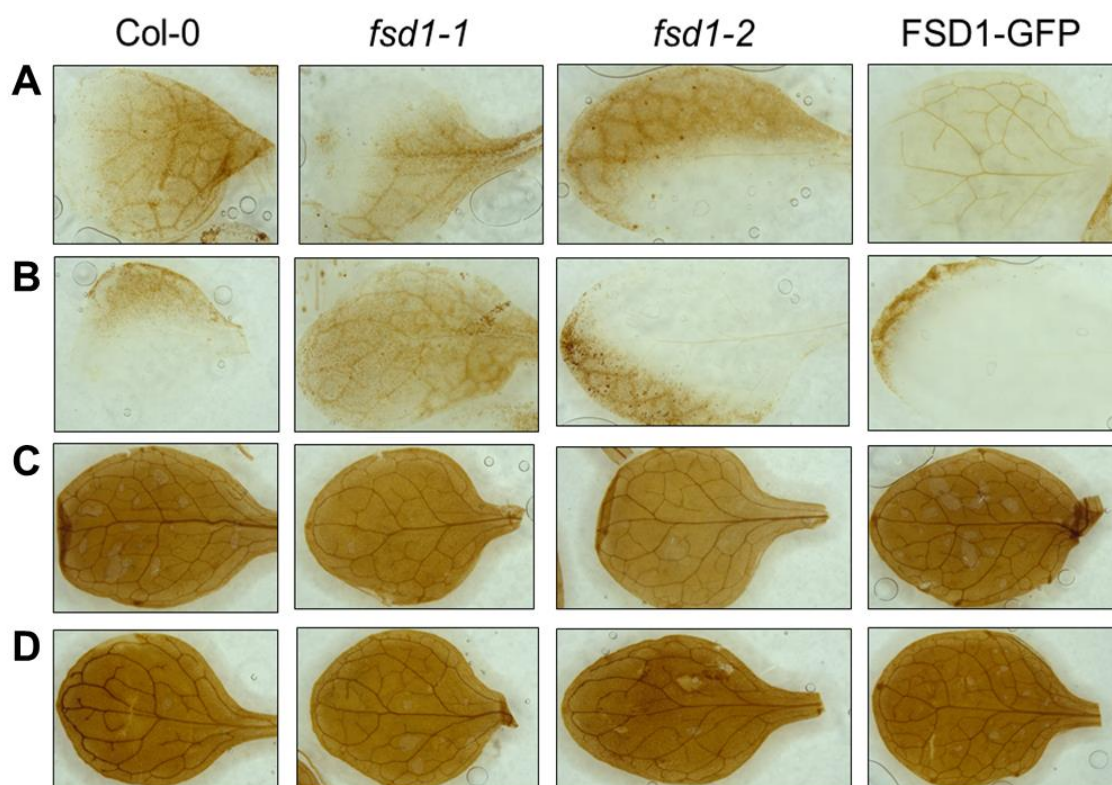
Rastliny *A.thaliana* ekotyp Col-0, mutantné rastliny *fsdl-1* a *fsdl-2* a obe komplementované línie (FSD1-GFP a GFP-FSD1) boli podrobené ovplyvneniu 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom a následne histochemickej vizualizácii superoxidových radikálov pomocou NBT (Obr. 12). Výsledky naznačujú, že u rastlín po krátkodobom ovplyvnení 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom sme zaznamenali v každej línii výrazne slabší signál (Obr. 12B) narozdiel od rastlín rastúcich v kontrolných podmienkach (Obr. 12A). Môžeme sa domnievať, že došlo k inhibícii procesov vedúcich k tvorbe superoxidového radikálu, pričom mutantné rastliny *fsdl* vykazujú väčšiu citlivosť, pričom v komplementovaných líniiach a Col-0 sme detekovali vyššie hladiny superoxidu oproti mutantným *fsdl* rastlinám (Obr. 12B).



Obr. 12: **Histochemická vizualizácia superoxidových radikálov.** Histochemické farbenie superoxidu v nadzemných častiach rastlín *A.thaliana* ekotyp Col-0, mutantných rastlín *fsd1-1* a *fsd1-2* a komplementovaných líniiach (FSD1-GFP a GFP-FSD1) v kontrolných podmienkach (A) a po vplyve $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónu po 8 hodinách (B).

4.7 Vplyv FeSOD1 na hladinu peroxidu vodíka v menadiónom ovplyvnených rastlinách *Arabidopsis*

Rastliny *A.thaliana* ekotyp Col-0, mutantné rastliny *fsd1-1* a *fsd1-2* a komplementovaná línia FSD1-GFP boli podrobené histochemickej vizualizácii peroxidu vodíka pomocou DAB po 4 hodinovom a 8 hodinovom ovplyvnení $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom (Obr. 13). Výsledky ukazujú, že menadión zvýšil akumuláciu peroxidu vodíka v listoch všetkých línii už po 4 hodinách (Obr. 13 A a C). Intenzita akumulácie peroxidu vodíka sa medzi jednotlivými líniami nelíšila (Obr. 13 C, D)



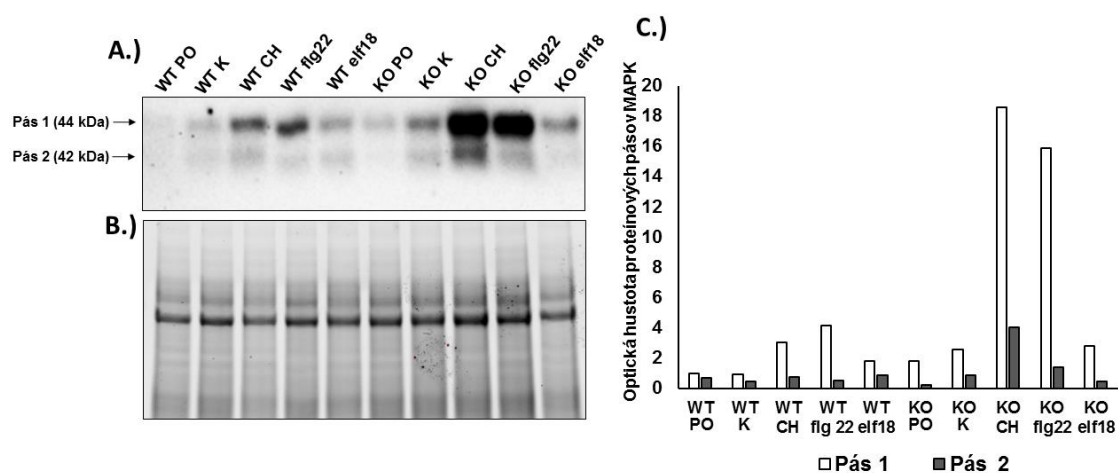
Obr. 13: **Histochemická detekcia peroxidu vodíka.** Histochemické farbenie v listoch rastlín *A.thaliana* ekotyp Col-0, mutantných *fsd1-1* a *fsd1-2* rastlín a komplementovanej línie FSD1-GFP v kontrolných podmienkach v čase 4 hodín (A) a 8 hodín (B) a po vplyve 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónu po 4 (C) a 8 hodinách (D).

4.8 Detekcia fosforylovaných MAPK po ovplyvnení elicítormi v *H. vulgare*

Rastliny divého typu *H. vulgare* (odroda Golden Promise) a mutantná KO *hvmpk3* línia boli podrobené 30 minútovému ovplyvneniu patogénnymi elicítormi chitínom, flagelínom 22, elf18 a MAPK aktivity boli analyzované pomocou imunoblotovania v koreňoch (Obr. 14A) a nadzemných častiach (Obr. 15A). Pomocou anti-pERK protilátky boli detekované 2 pásy s Mr 42 a 44 kDa. Anti-pERK protilátka rozpoznáva pTEpY motív charakteristický pre MPK (posledná úroveň MAPK kaskády). Fosforylačný motív TEY v rastlinách jačmeňa majú *HvMAPK1/2/3/5/6* (Křenek *et al.*, 2015). Z dosiahnutých výsledkov vidieť, že intenzita signálu proteínového pásu o Mr 44 kDa v koreňoch divého typu a mutantnej KO *hvmpk3* línie v jačmeni sa výrazne zvyšuje po ovplyvnení chitínom a flagelínom 22 oproti kontrolným podmienkam v divom type ako aj mutantnej KO *hvmpk3* línií (Obr. 14C). MAPK boli aktivované chitínom a flagelínom 22, pričom aktivácia chitínom je mierne silnejšia. Intenzita proteínových pásov s Mr 42

a 44 kDa sa po ovplyvnení rastlín elf 18 výraznejšie nemení ani v divom type ani v mutantnej KO *hvmpk3* línii.

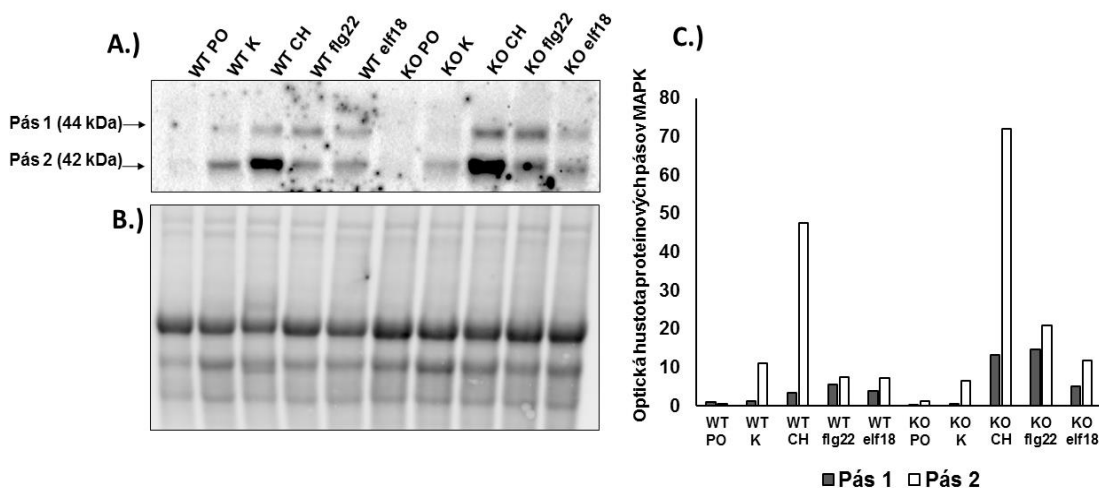
Okrem zmeny intenzity pásov v kontrolných a stresových podmienkach, bol zaznamenaný aj výrazný rozdiel medzi líniami. Proteínový pás s Mr 44 kDa má výrazne vyššiu intenzitu signálu v mutantnej KO *hvmpk3* línii než v divom type po ovplyvnení chitínom a flagelínom 22 (Obr.14C). Intenzita signálu proteínového pásu s Mr 42 kDa je mierne nižšia v divom type oproti mutantnej KO *hvmpk3* línii po ovplyvnení chitínom a flagelínom 22 (Obr. 14C).



Obr.14: **Imunoblotová analýza aktivácie MAPK po ovplyvnení elicítormi v koreňoch rastlín *H.vulgare*** (A) Imunoblot pripravený z koreňov divého typu a mutantnej KO *hvmpk3* línii rastlín jačmeňa s použitím špecifickej anti-pERK protilátky (B) vizualizácia proteínov na PVDF membráne po prenose, (C) graf optickej hustoty fosforylovaných proteínových pásov MAPK vyhodnotený pomocou softvéru ImageLab™. WT – divý typ, KO – mutantná KO *hvmpk3* línii, PO – pred ovplyvnením, K – ovplyvnená kontrola, CH – chitín, flg22 – flagelín 22.

Podobne ako v koreňoch, aj v nadzemných častiach boli detekované proteínové pásy s Mr 42 a 44 kDa. Na rozdiel od koreňov bola intenzívnejšia fosforylácia MAPK s Mr 42 kDa vyššia v porovnaní s pásom s Mr 44 kDa (Obr. 15C). Chitín a flagelín 22 spôsobili zvýšenie intenzity signálu proteínového pásu s Mr 42 kDa. Aktivácia MAPK s Mr 42 kDa je vyššia v mutantnej KO *hvmpk3* línii po ovplyvnení chitínom oproti divému typu. Intenzita signálu proteínového pásu s Mr 42 kDa po ovplyvnení flagelínom 22 mierne vyššia v mutantnej KO *hvmpk3* línii než v divom type, avšak nižšia než po ovplyvnení chitínom (Obr. 15C). Po ovplyvnení elf 18 sme nezaznamenali významnejšie rozdiely v abundancii proteínových pásov s Mr 42 a 44 kDa ani v divom type ani

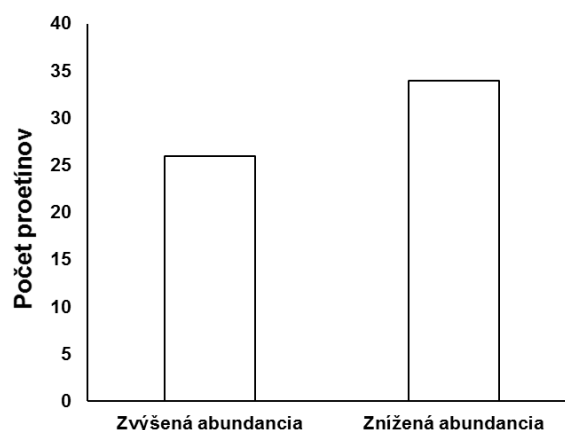
v mutantnej KO *hvmpk3* línii. Aktivácia MAPK v mutantnej KO *hvmpk3* línii má vysoké hodnoty aj v prípade vyradenia *MPK3* génu, ktorý hrá dôležitú úlohu pri obrane rastliny voči napadnutiu patogénmi. Z toho dôvodu sa môžeme domnievať, že v mutantnej KO *hvmpk3* línii, môže dochádzať ku kompenzácií vyradeného génu *MPK3* inými MAPK kinázami.



Obr. 15: **Imunoblotová analýza aktivácie MAPK po ovplyvnení elicítormi v nadzemných častiach rastlín *H.vulgare*** (A) Imunoblot pripravený z divého typu a mutantnej KO *hvmpk3* línii celých rastlín jačmeňa s použitím špecifickej anti-pERK protilátky, (B) vizualizácia proteínov na PVDF membráne po prenose, (C) graf optickej hustoty fosforylovaných proteínových pásov MAPK vyhodnotený pomocou softvéru ImageLab™. WT – divý typ, KO – mutantná KO *hvmpk3* lúnia, PO – pred ovplyvnením, K – ovplyvnená kontrola, CH – chitín, flg22 – flagelín 22.

4.9 Diferenciálny proteóm koreňov divého typu a mutantnej KO *hvmpk3* lúnie rastlín *H.vulgare*

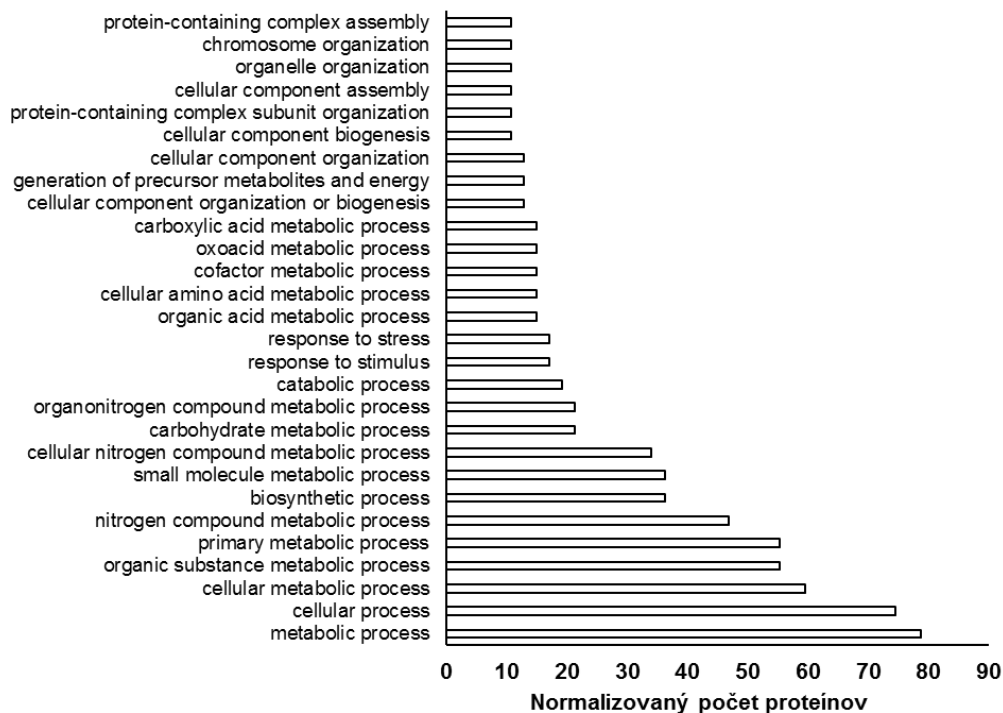
Cieľom ďalšieho experimentu bolo porovnať proteóm koreňov divého typu a mutantnej KO *hvmpk3* lúnie rastlín *H.vulgare* rastúcich v kontrolných podmienkach. Spolu bolo identifikovaných 73 proteínov so zmenenou abundanciou v KO *hvmpk3* lúinii v porovnaní s divým typom. Z nich malo 26 zvýšenú a 34 zníženú expresiu v transgénej lúinii (Obr. 16). Bolo tiež nájdených niekoľko proteínov, ktoré sa v jednej z dvoch vzoriek nenachádzali (pre všetky 3 opakovania). Zoznam diferenciálne regulovaných proteínov je uvedený v Tab.4. Takto bolo identifikovaných 9 unikátnych proteínov pre transgénnu lúinii a 4 unikátne proteíny pre divý typ. Pre funkčnú charakterizáciu diferenciálneho proteómu boli proteíny bioinformaticky vyhodnotené.



Obr. 16: Graf znázorňujúci počet proteínov so zvýšenou a zníženou abundanciou v koreňoch mutantnej KO *hvmpk3* línie v kontrolných podmienkach

Proteíny boli klasifikované pomocou tzv. ontologickej génovej anotácie („Gene ontology annotation“) na základe biologického procesu (Obr. 17), lokalizácie (Obr. 18) a molekulej funkcie (Obr. 19). Bola tiež vyhodnotená prítomnosť proteínových domén (Obr. 20) a zaradenie proteínov do rodín (Obr. 21). Podobne bolo vyhodnotené zastúpenie jednotlivých typov enzýmov (Obr. 22).

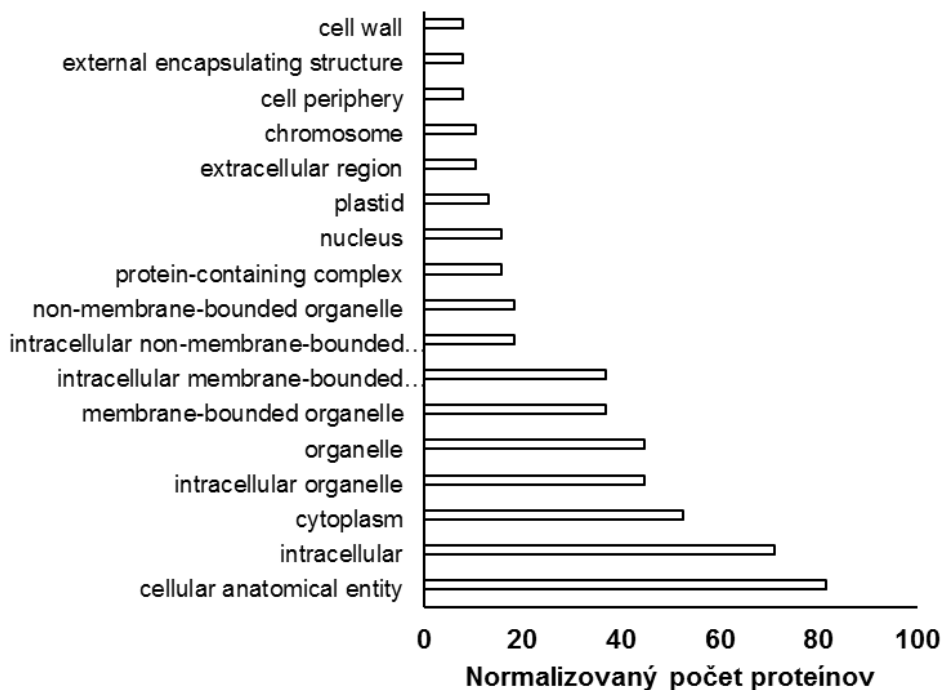
V rámci génovej ontologickej anotácie podľa biologického procesu bolo klasifikovaných spolu 47 proteínov. Najväčší počet proteínov na základe bunkového biologického procesu je klasifikovaných v metabolických procesoch, katabolických a biosyntetických procesoch a procesoch metabolizmu dusíkatých zlúčenín (metabolic process, cellular process, cellular metabolic process, organic substance metabolic process, biosynthetic process, nitrogen compound metabolic process, small molecule metabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, carbohydrate metabolic process, catabolic process, organic compound metabolic process). Približne 20% proteínov je zaradených v anotáciách s názvom „odpoveď na stres“ (response to stress) a „odpoveď na podnet“ (response to stimulus; Obr. 17).



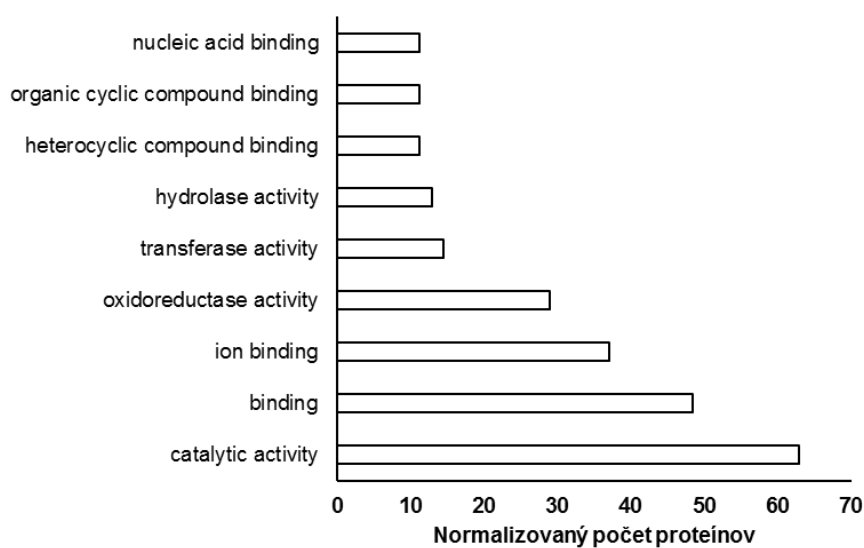
Obr. 17: Klasifikácia diferencielne abundantných proteínov v mutantnej KO *hvmpk3* línii pomocou ontologickej génovej anotácie na základe biologického procesu. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke.

Významné množstvo proteínov bolo zaradených do anotácie organizácia bunkových štruktúr (20%, cellular component organisation), organizácia chromatinu (15%, chromosome organisation), a skladba proteínových komplexov (15%, protein – containing complex assembly). Ontologická anotácia diferencielne regulovaných proteínov na základe lokalizácie (spolu 38 klasifikovaných proteínov) ukázala, že najväčší počet proteínov sa nachádza v intracelulárnom priestore, cytoplazme, organelách (intracellular, cytoplasm, intracellular organelle, organelle; Obr. 18). Pozoruhodné je vysoké zastúpenie proteínov v proteínových komplexoch. To indukuje, že HvMPK3 môže ovplyvňovať stabilitu proteínových komplexov. 20% proteínov bolo klasifikovaných v anotácii „jadro“. Na základe molekulovej funkcie, najviac proteínov je klasifikovaných v anotáciách katalytická aktivita, väzobné proteíny, proteíny viažúce ióny a oxidoreduktázová aktivita (catalytic activity, binding, ion binding, oxidoreductase activity; viac ako 30%). Menšie percentuálne zastúpenie majú anotácie transferázová a hydrolázová aktivita, väzba na cyklické a heterocyklické zlúčeniny a väzba na nukleové

kyseliny (transferase activity, hydrolase activity, heterocyclic compound binding, organic cyclic compound binding, nucleic acid binding; Obr. 19)

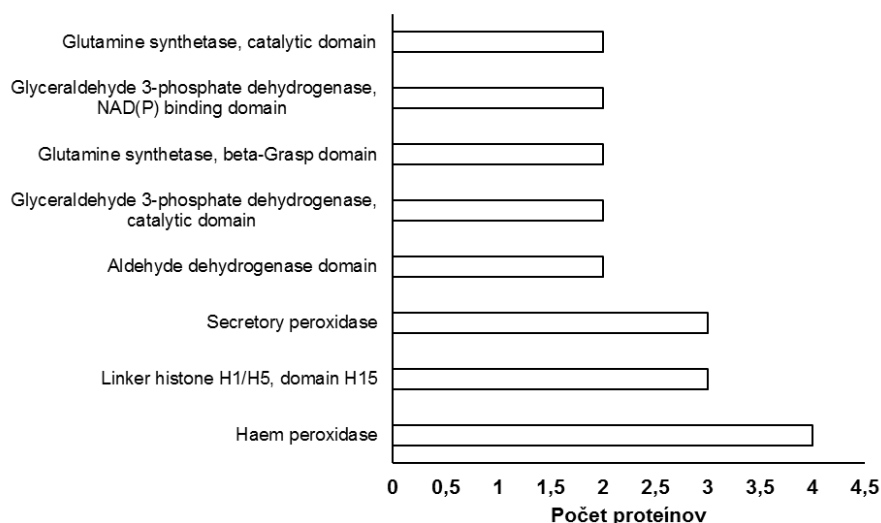


Obr. 18: Klasifikácia diferenciálne abundantných proteínov v mutantnej KO *hvmpk3* línii pomocou ontologickej génovej anotácie na základe lokalizácie v bunke. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke.

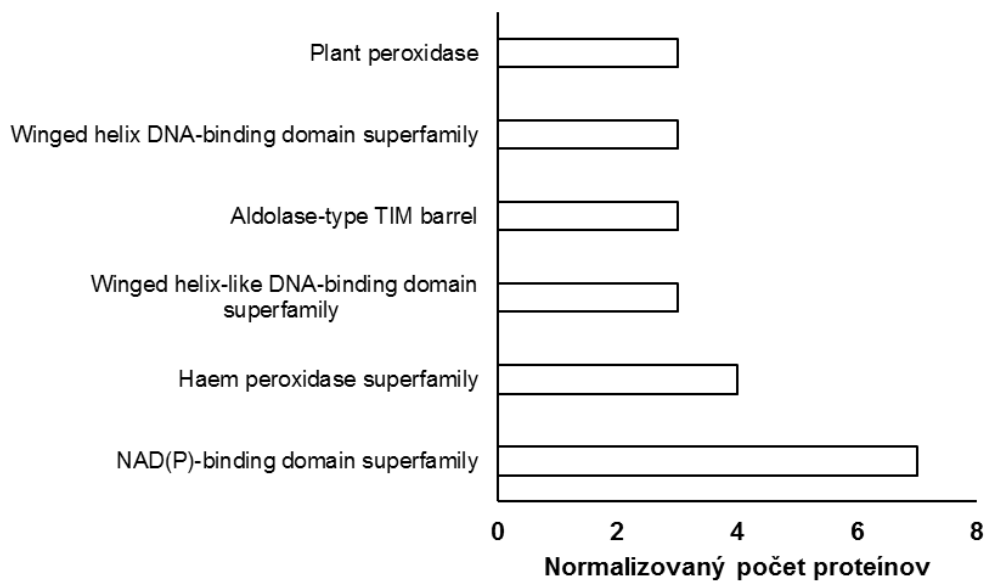


Obr. 19: Klasifikácia diferenciálne abundantných proteínov v mutantnej KO *hvmpk3* línii pomocou ontologickej génovej anotácie na základe molekulovej funkcie v bunke. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke

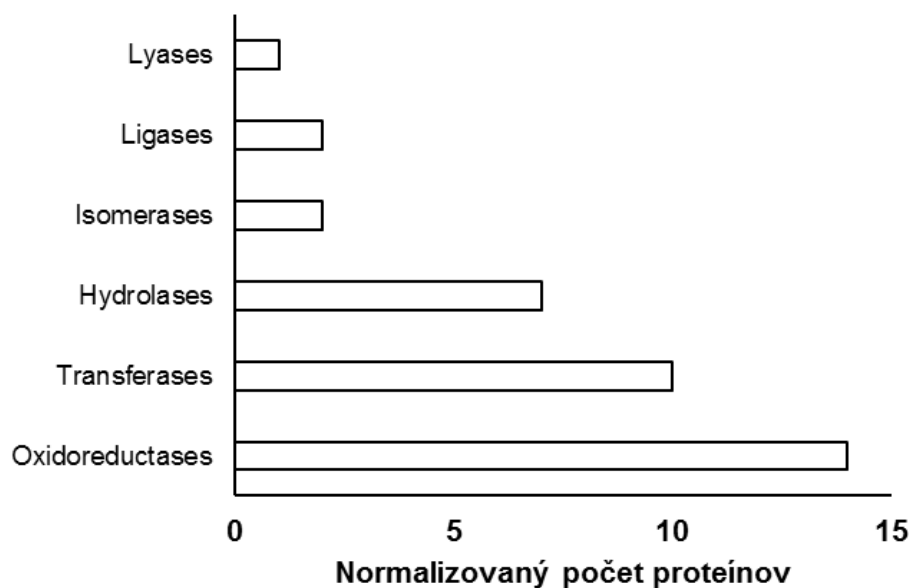
Z hľadiska výskytu proteínových domén, 4 proteíny obsahujú hem-peroxidázovú doménu a 3 proteíny histónovú doménu H15 a doménu sekretorickej peroxidázy (Haem peroxidase, linker histone H1/H5, domain H15). Ďalšie domény ako sú katalytická a NAD(P) väzobná doména glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy majú 2 proteíny ako aj katalytickú doménu glutamínsyntetázy (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, catalytic domain; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NAD(P) binding domain; glutamine synthetase, catalytic domain; Obr. 20). V prípade proteínových rodín, 7 proteínov patrí do rodiny proteínov viažúcich NAD(P) a 4 do rodiny hemových peroxidáz (NAD(P)-binding domain superfamily, haem peroxidase superfamily; Obr. 21). V rámci anotácie jednotlivých typov enzýmov, k najviac abundnantým patria oxidoreduktázy, transferázy a hydrolázy (oxidoreductases, transferases, hydrolases). Menšie zastúpenie majú izomerázy, ligázy a lyázy (isomerases, lyases, ligases; Obr 22).



Obr. 20: Klasifikácia diferencielne abundantných proteínov v mutantnej KO *hvmk3* línii z hľadiska výskytu proteínových domén. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke



Obr. 21: Klasifikácia diferencielne abundantných proteínov v mutantnej KO *hvmpk3* línii z hľadiska zaradenia do proteínových rodín. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke



Obr. 22: Klasifikácia diferencielne abundantných proteínov v mutantnej KO *hvmpk3* línii jednotlivých z hľadiska typov enzýmov. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke

Tab.1: Charakteristika stresových a obranných proteínov diferencielne regulovaných v KO *hvmprk3* mutante

V rámci diferencielnej regulácie proteínov, klasifikovaných ako stresových proteínov, sme identifikovali 5 z 8 proteínov malo zníženú abundanciu (Similar to glutathione S-transferase GSTF1; similar to ANN4 Annexin D4; similar to germin-like protein 1-1; similar to ANN3 Annexin D3; similar to APX2 cytosolic L-ascorbate peroxidase 2; cytosolic glutathione peroxidase). Na druhú stranu, v mutantnej KO *hvmprk3* línii bolo identifikovaných 3 z 8 proteínov, ktoré mali abundanciu zvýšenú (Similar to GLY3 mitochondrial persulfide dioxygenase ETHE1 homologue; betaine aldehyde dehydrogenase; similar to CBF5 H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4; Tab. 2). V rámci antioxidantných enzýmov, 5 zo 6 proteínov mali výrazne zníženú abundanciu (Probable glutathione S-transferase, similar to APX2 L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic glutathione reductase) pričom 1 mal výrazne zvýšenú abundanciu (Cationic peroxidase SPC4 similar to PER12 peroxidase). Môžeme sa domnievať, že defícia *HvMPK3* môže negatívne ovplyvňovať reguláciu niektorých biotických a abiotických stresových proteínov a že mutantná KO *hvmprk3* línia má zníženú imúnnu obranu. Toto zistenie môže podporovať aj znížená abundancia proteínu Thaumatin-like protein TLP7, ktoré patria k proteínom spojených s patogenezou.

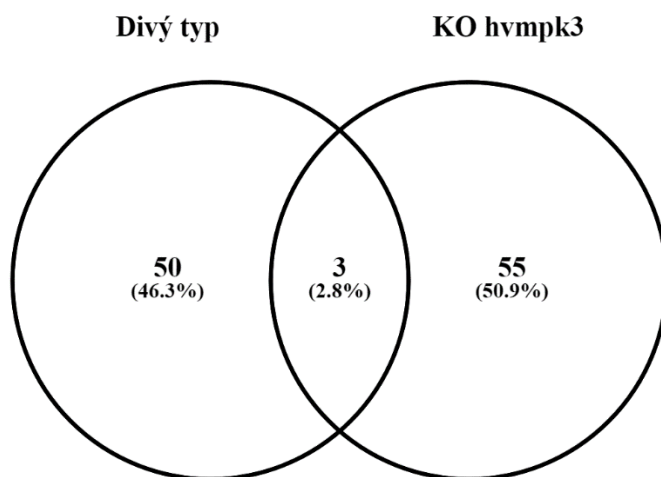
Databázové číslo	Názov	Fold change	p-value
326532030	"Similar to GSTF1 Probable glutathione S-transferase GSTF1 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,61	0,03
326489251	"Similar to ANN4 Annexin D4 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	Unique in KO	NA
326491825	"Similar to GER4 Germin-like protein 1-1 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,29	0,01
326498153	"Similar to ANN3 Annexin D3 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,40	0,01
257286412	"Similar to APX2 L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,65	0,01

326533446	"Similar to GLY3 Persulfide dioxygenase ETHE1 homolog, mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,00	0,04
15147873	Betaine aldehyde dehydrogenase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	1,81	0,04
157362219	Cytosolic glutathione reductase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	0,47	0,04
326525859	"Similar to CBF5 H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,93	0,01
326494252	"Similar to Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GIII (Hordeum vulgare OX=4513)"	0,55	0,04
326495784	"Similar to PER12 Peroxidase 12 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,59	0,04
326502418	"Similar to OLE9 Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (Olea europaea OX=4146)"	Unique in KO	NA
326496709	"Similar to PER12 Peroxidase 12 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,28	0,02
14164981	Thaumatococcus-like protein TLP7 [Hordeum vulgare]	0,55	0,02
14164983	Thaumatococcus-like protein TLP8 [Hordeum vulgare]	Unique in WT	NA
326494042	"Similar to UXS4 UDP-glucuronic acid decarboxylase 4 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,32	0,02
326506728	"Similar to THI2 Thionin (Brassica rapa subsp. pekinensis OX=51351)"	Unique in WT	NA
916339672	UDP-arabinose mutase 1 [Hordeum vulgare]	1,76	0,05
326529001	"Similar to Sb03g046810 Cationic peroxidase SPC4 (Sorghum bicolor OX=4558)"	2,94	0,01

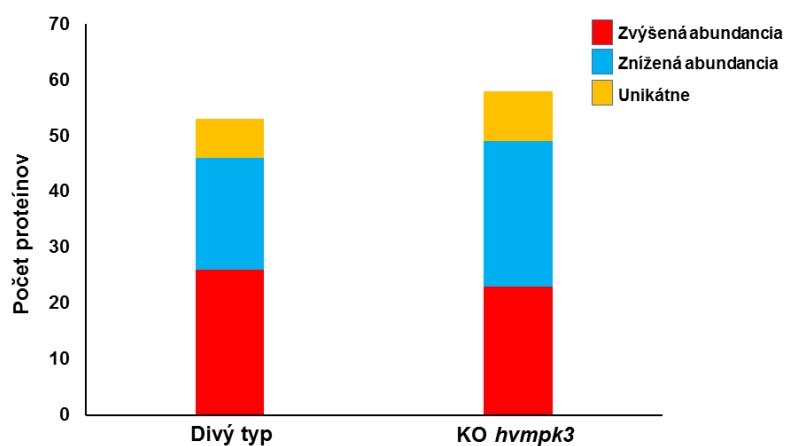
4.10 Diferenciálny proteóm koreňov divého typu a mutantnej KO *hvmpk3* línie rastlín *H.vulgare* po ovplyvnení flagelínom 22

Po ovplyvnení divého typu a mutantnej KO *hvmpk3* línie rastlín jačmeňa flagelínom 22 bolo identifikovaných 53 diferenciálne regulovaných proteínov (Obr. 23), z toho 26 proteínov malo zvýšenú abundanciu, 20 zníženú, a 7 proteínov bolo unikátnych pre ovplyvnenie kontrolným tekutým ½ MS médiom v divom type (Obr. 24). V prípade mutantnej KO *hvmpk3* línie bolo identifikovaných 58 diferenciálne regulovaných proteínov (Obr. 24), z toho 23 malo zvýšenú abundanciu a 26 zníženú abundanciu (Obr. 23). Zoznamy diferenciálne regulovaných proteínov v divom type a mutantnej KO *hvmpk3* línií je uvedený v prílohe 2 a 3.

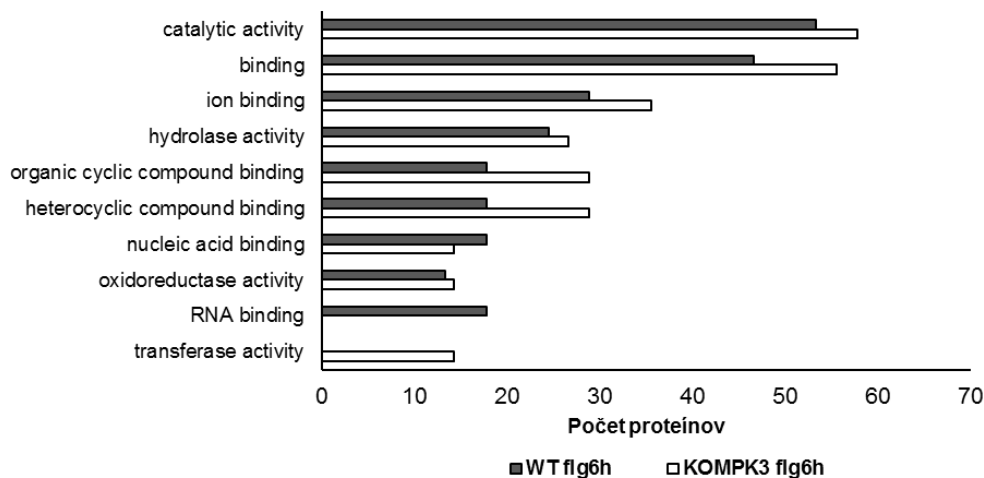
Na základe molekulovej funkcie (spolu klasifikovaných 94 proteínov) sme identifikovali proteíny, rozdielne exprimované medzi jednotlivými líniami. Mutantná KO *hvmpk3* línia má vyšší počet proteínov, ktoré sú klasifikované v anotáciách katalytická aktivita, hydrolázová aktivita, väzobné proteíny, proteíny viažúce ióny, proteíny viažúce cyklické a heterocyklické zlúčeniny (catalytic activity, hydrolase activity, binding, ion binding, heterocyclic compound binding, organic cyclic compound binding). Na druhej strane, divý typ má vyšší počet proteínov, ktoré sú klasifikované v anotáciách proteíny viažúce nukleové kyseliny (nucleic acid binding). Boli identifikované tiež unikátne anotácie ako pre mutantnú KO *hvmpk3* líniu ako aj pre divý typ. V mutantnej KO *hvmpk3* línií sa nachádzajú proteíny s transferázovou aktivitou (14% proteínov), ktoré sa ale nenachádzali v divom type po ovplyvnení flagelínom 22 po 6 hodinách. Divý typ obsahuje 17% proteínov viažúcich sa na RNA (RNA binding; Obr.25).



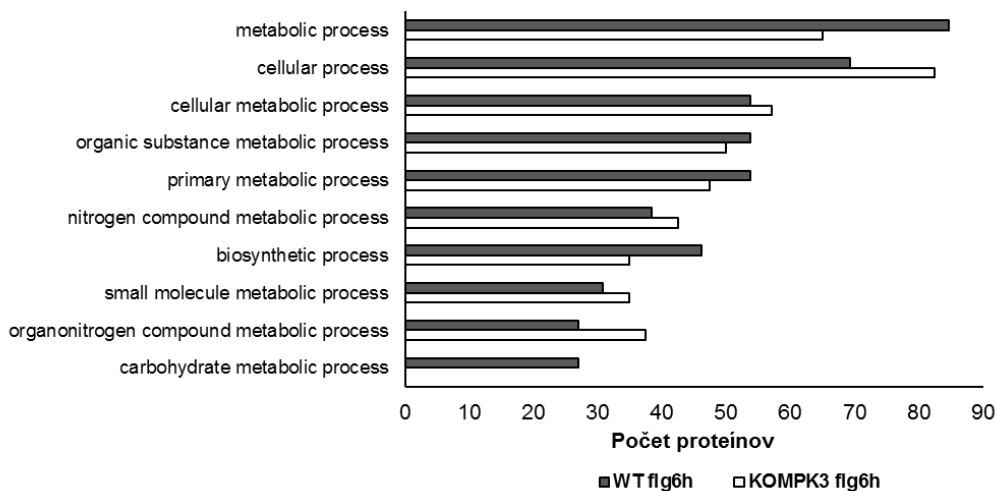
Obr. 23: Vennov diagram znázorňujúci počet diferenciálne regulovaných proteínov v divom type a mutantnej KO *hvmpk3* línii rastlín jačmeňa.



Obr. 24: Graf znázorňujúci počet proteínov so zvýšenou a zníženou abundanciou identifikovaných v divom type a mutantnej KO *hvmpk3* línii rastlín jačmeňa po ovplyvnení flagelínom 22.



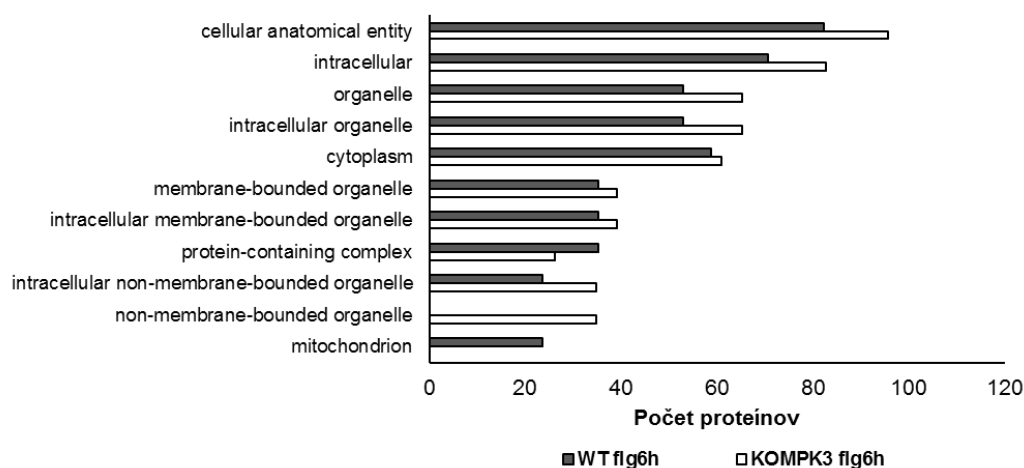
Obr. 25: Klasifikácia diferencielne abundantných proteínov v KO *hvmpk3* línii pomocou ontologickej génovej anotácie z hľadiska molekulovej funkcie. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke. WT – divý typ, KOMP3 – mutantná KO *hvmpk3* lúnia, flg – flagelín 22



Obr. 26: Klasifikácia diferencielne abundantných proteínov v KO *hvmpk3* línii (biele stĺpce) a v divom type (šedé stĺpce) pomocou ontologickej génovej anotácie z hľadiska biologického procesu. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke. WT – divý typ, KOMP3 – mutantná KO *hvmpk3* lúnia, flg – flagelín 22

V rámci génovej ontologickej anotácie identifikovaných proteínov na základe biologického procesu (66 proteínov) boli identifikované 4 biologické procesy s vyšším počtom proteínov nachádzajúce sa v divom type oproti mutantnej KO *hvmpk3* línii. Ide o biologické procesy týkajúce sa metabolizmu, metabolizmu organických zlúčenín, metabolizmu primárnych zlúčenín a biosyntetickým procesom (metabolic process, organic substance metabolic process, primary metabolic process, biosynthetic process;

Obr. 26). Mutantná KO *hvmpk3* línia má väčší počet proteínov v prípade metabolizmu malých molekúl, metabolizmu dusíkatých zlúčenín a metabolizmu zlúčenín s organickým dusíkom (small molecule metabolic process, nitrogen compound metabolic process, organonitrogen compound metabolic process; Obr. 26). Boli identifikované aj biologické procesy špecifické pre divý typ (26% proteínov; carbohydrate metabolic process).

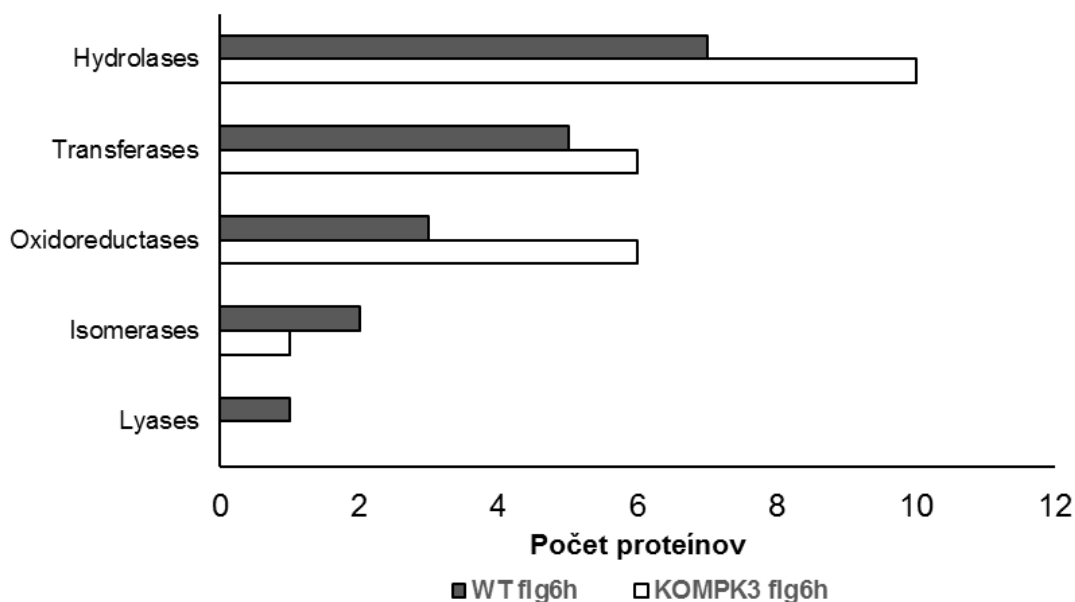


Obr. 27: Klasifikácia diferenciálne abundantných proteínov v KO *hvmpk3* línií (biele stĺpce) a v divom type (šedé stĺpce) pomocou ontologickej génovej anotácie na základe lokalizácie v bunke. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke. WT – divý typ, KOMP3 – mutantná KO *hvmpk3* línia, flg – flagelín 22

Génová ontologická anotácia na základe lokalizácie v bunke ukázala, že mutantná KO *hvmpk3* línia obsahuje vyšší počet proteínov vo väčšine bunkových štruktúr oproti divému typu. Najväčšie zmeny sa týkajú intracelulárneho priestoru, bunkových organel a intracelulárnych bunkových organel (intracellular organelle, intracelullar space, organelle), ktorých počet je vyšší v mutantnej KO *hvmpk3* línií. Divý typ obsahuje vyšší počet proteínov, ktoré sa nachádzajú v mitochondriách, pričom v mutantnej KO *hvmpk3* línií sme nezaznamenali takéto proteíny (Obr. 27). Pozoruhodný je aj počet proteínov, unikátny pre mutantnú KO *hvmpk3* líniu, ktoré sa nachádzajú na ne-membránových organelách (36%; non-membrane-bounded organelle)

V prípade jednotlivých typov enzýmov (spolu klasifikovaných 26 proteínov), boli najväčšie rozdiely zaznamenané pri typoch enzýmov ako sú hydrolázy, transferázy

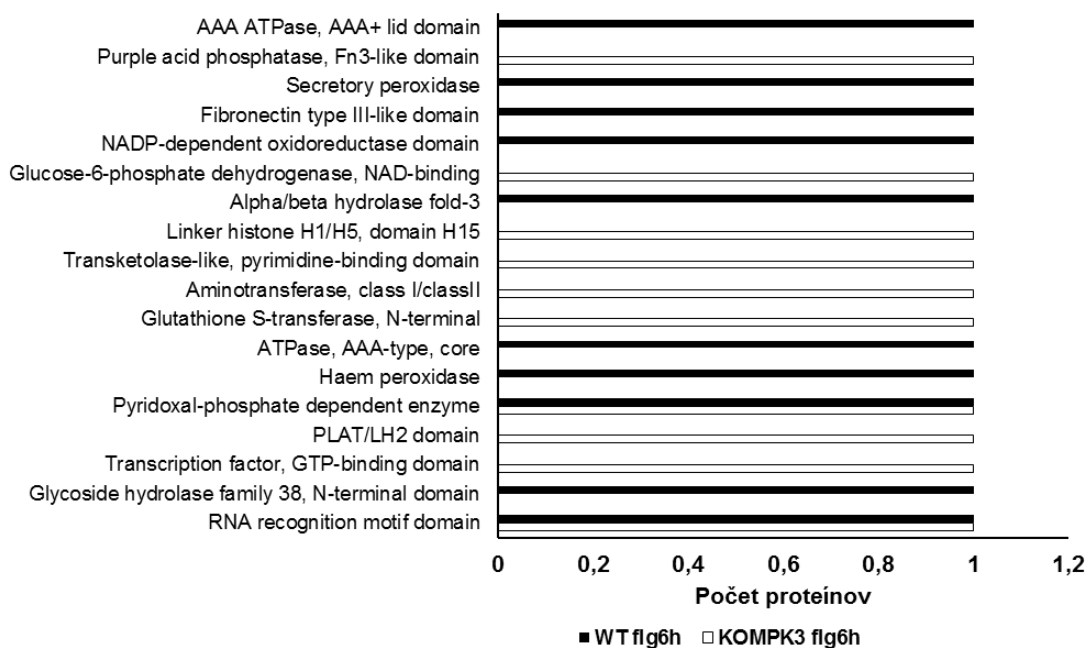
a oxidoreduktázy, ktorých počet je vyšší v mutantnej KO *hvmprk3* línii (hydrolases – 10 proteínov, transferases - 6 proteínov, oxidoreductases – 6 proteínov). Naopak, boli identifikované aj enzýmy v divom type (isomerases – 1 proteín, lyases – 2 proteíny), ktoré sa v mutantnej KO *hvmprk3* línii nenachádzajú (Obr.28).



Obr. 28: Klasifikácia diferenciálne abundantných proteínov v KO *hvmprk3* línii (biele stĺpce) a v divom type (šedé stĺpce) na základe jednotlivých typov enzýmov. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke. WT – divý typ, KOMP3 – mutantná KO *hvmprk3* línia, flg – flagelín 22

Z hľadiska výskytu proteínových domén sme identifikovali 8 domén, špecifických pre mutantnú KO *hvmprk3* línii. Ide o doménu podobnej Fn3, NAD väzbovú doménu glukózy-6-fosfát dehydrogenázy, H15 doménu, pyrimidín väzbovú doménu, aminotransférázovú doménu triedy I a II, N-terminálnu doménu glutatión-S-transferázy, LH2/PLAT doménu a GTP väzbovú doménu (Fn3-like domain, purple acid phosphatase; glucose-6-phosphate dehydrogenase, NAD binding domain; linker histone H1/H5, H15 domain; transketolase-like; pyrimidine binding domain, aminotransferase class I/ classII; glutathione-S-transferase, N-terminal domain; PLAT/LH2 domain; Transcription factor, GTP binding domain). Podobne bolo identifikovaných 7 proteínov v divom type, ktoré obsahovali špecifické domény ako sú AAA+ doména, doména sekretorických peroxidáz, doména podobná fibronektínu typu 3, hemová peroxidáza alebo N-terminálna doména glykozid hydrolázy (AAA ATPase, AAA+ lid domain; secretory peroxidase; fibronectin

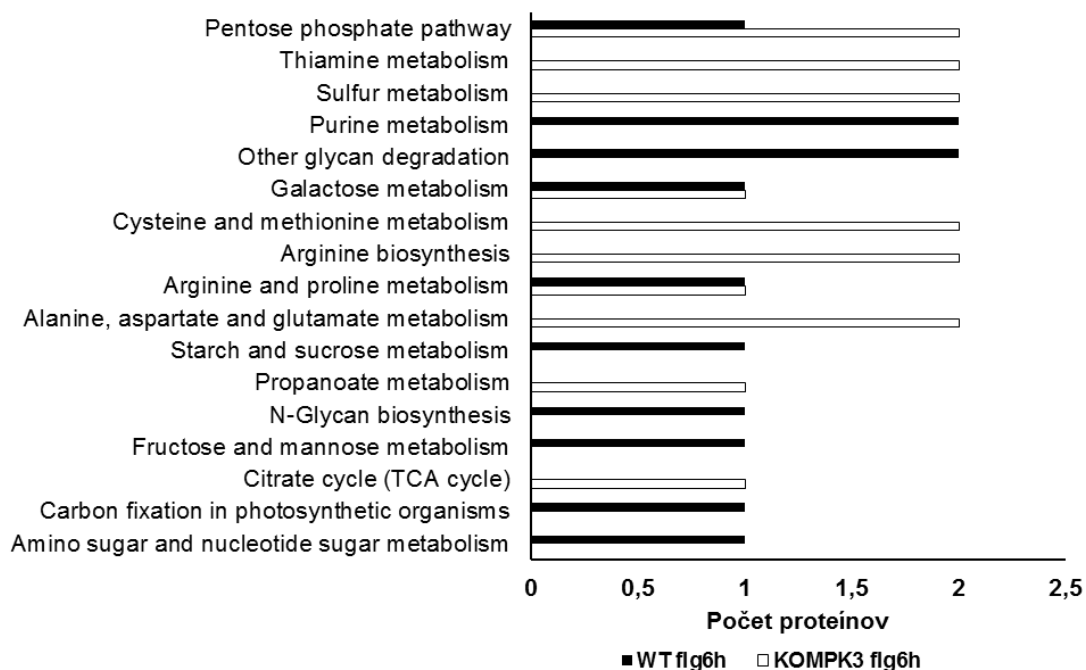
type III-like domain, haem peroxidase; glycoside hydrolase family, N-terminal domain). Boli identifikované aj 2 proteíny, ktoré mali spoločné domény aj v divom type aj v mutantnej KO *hvmprk3* línii (pyridoxal phosphate dependent enzyme, RNA recognition motif domain; Obr. 29)



Obr. 29: Klasifikácia diferencielne abundantných proteínov v KO *hvmprk3* línii (biele stĺpce) a v divom type (šedé stĺpce) z hľadiska obsahu proteínových domén. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke. WT – divý typ, KOMPK3 – mutantná KO *hvmprk3* línia, flg – flagelín 22

V prípade zaradenia do proteínových rodín, boli identifikované 2 proteíny patriace do rodiny metabolizmu tiamínu (thiamine metabolism), 2 proteíny do metabolizmu síry (sulfur metabolism), 6 proteínov do metabolizmu cysteínu, methionínu, alanínu, aspartátu, glutamátu a arginínu (metabolism of cystein, methionin, alanin, aspartate, glutamate, arginine), 1 proteín do metabolizmu propanoátu (propanoate metabolism) a 1 proteín patriaci do rodiny zahrnutej v cykle trikarboxylových kyselín (TCA cycle) v prípade mutantnej KO *hvmprk3* línii. V divom type boli identifikované 2 proteíny patriace do rodín metabolizmu purínov (purine metabolism), degradácie glykanov (glycan degradation) a 1 proteín patriaci do rodín biosyntézy N-glykanu (N-glycan biosynthesis), fixácií uhlíka (carbon fixation), metabolizmu cukrov nukleových kyselín a aminokyselín (amino sugar and nucleotide sugar metabolism). Spoločné proteíny pre divý typ a mutantnú KO *hvmprk3* líniiu boli identifikované ako proteíny patriace do rodín

zahrnuté v metabolizme galaktózy (galactose metabolism), metabolizme arginínu a prolínu (arginine and proline metabolism), a metabolizme pentóza fosfátu (pentose phosphate metabolism; Obr. 30).



Obr. 30: Klasifikácia diferenciálne abundantných proteínov v KO *hvmpr3* línii (biele stĺpce) a v divom type (šedé stĺpce) z hľadiska zaradenia do proteínových rodín. Počet proteínov v anotácii bol normalizovaný na celkový počet anotácií vo vzorke. WT – divý typ, KOMP3 – mutantná KO *hvmpr3* lúnia, flg – flagelín 22

5 DISKUSIA

ROS majú dôležitú úlohu vo vývine rastliny a rastlinných orgánov a ich hladina musí byť regulovaná počas vývinových procesov. Počas rastu listov, je zvýšené bunkové delenie závislé na ROS v oblasti rastu listu. Táto zóna je aj miestom akumulácie ROS a NADPH oxidáz pomocou DPI zároveň inhibuje rast listu (Rodriguez *et al.*, 2002). ROS regulujú aj predĺžovanie primárneho koreňa. NADPH oxidáza RHD2/AtrohC (ROOT HAIR DEFECTIVE2) je esenciálny proteín dôležitý pre predĺžovanie koreňa. Korene rastlín *Arabidopsis*, ktoré majú vyradený gén *RHD2* majú zníženú hladinu ROS až o 20% a sú kratšie než korene divých typov rastlín *Arabidopsis* (Renew *et al.*, 2005). Antioxidačné enzymy sú taktiež vývojovo regulované v skorých postembryonálnych štádiách. Mutantné rastliny, s vyradeným génom *MSD1*, majú vývinové defekty v skorých vývinových štádiách v prípade rastu primárneho koreňa (Morgan *et al.*, 2008).

Naše výsledky potvrdili vývinovú reguláciu FeSOD1 v skorých postembryonálnych štádiách v Col-0 pomocou imunoblotovania. Pilon *et al.*, (2011) uvádza že *FSD1* je vývinovo regulovaná a je abundantne exprimovaná v skorých postembryonálnych štádiách. Tieto dáta sa opierajú o transkriptomické analýzy expresie (Genvestigator). Naše výsledky ukazujú vývinovú reguláciu na proteínovej úrovni a úrovni aktivity enzýmu. Jej abundancia a aktivita koreluje so stavbou ružice a koreňového systému. Podobné výsledky sme zaznamenali aj v aktivite FeSOD, kde sme zaznamenali podobný graduálny nárast ako pri abundancii FeSOD. Podarilo sa nám detekovať aj nový špecifický pás, zodpovedajúci MnSOD izozýmu v skorých vývojových štádiách *Arabidopsis*. Genóm *Arabidopsis* obsahuje 1 gén kódujúci MnSOD (*MSD1*; **cit.**). Môže sa jednať o alternatívnu formu MnSOD prítomnú iba v skorých vývojových štádiách alebo o alternatívny zostrih RNA kódujúcej daný proteín. MnSOD môže existovať ako dimér hlavne v prokaryotických organizmoch napr. *Thermus thermophilus* (Wagner *et al.*, 2003), *Escherichia coli* (Edwards *et al.*, 1998) alebo *Deinococcus radiodurans* (Abreu *et al.*, 2008) a ako tetramér v eukaryotických organizmoch napr. *Saccharomyces cerevisiae* (Ravindranath a Fridovich, 1975), *Caenorhabditis elegans* (Trinh *et al.*, 2008) alebo *Aspergillus fumigatus* (Fluckiger *et al.*, 2002), avšak možná oligomerizácia MnSOD proteínu v rastlinných organizmoch nebola publikovaná. Z týchto výsledkov vyplýva, že FSD1 môže byť dôležitá pre tieto procesy a môže sa podieľať na redox regulácii v skorých postembryonálnych štádiách spoločne s MnSOD a Cu/ZnSOD. Môže to súvisieť aj s mitochondriálnymi funkciami (napr. respirácia)

súvisiacimi prechodom z heterotrofnej na autotrofnú výživu, pretože v prvých fázach vývinu po klíčení, klíčence čerpajú živiny zo semena.

Menadión, je redoxne aktívny chinón, ktorý generuje tvorbu ROS v mitochondriálnych a plastidových elektrónových transportných reťazcoch. Menadión dokáže plynulo prechádzať biologickými membránami a spôsobovať indukciu tvorby ROS ako sú superoxid, peroxid vodíka a hydroxylový radikál (Lehmann *et al.*, 2009). Môžeme sa domnievať, že tvorba ROS spôsobená menadiónom, indukuje zvýšenú tvorbu laterálnych koreňov a spôsobuje inhibíciu rastu primárneho koreňa v *Arabidopsis* podobne ako napr. peroxid vodíka. Rastliny *Arabidopsis* vystavené vplyvu peroxidu vodíka formujú rozvetvené koreňové systémy s vyšším počtom laterálnych koreňov a menšou dĺžkou primárneho koreňa než kontrolné rastliny (Su *et al.*, 2016). Pasternak *et al.*, 2005 uvádzajú, že po ovplyvnení aloxanom (induktor tvorby peroxidu vodíka) a paraquatom dochádza k zvýšenej tvorbe laterálnych koreňov a inhibície rastu primárneho koreňa v *Arabidopsis* oproti kontrolným podmienkam ROS slúžia tiež ako dôležité signalizačné molekuly v koreňoch *Arabidopsis* počas tvorby laterálnych koreňov, ktorý je regulovaný auxínom. Korene *Arabidopsis* vystavené ROS vykazujú vyšší počet laterálnych koreňov oproti kontrolným rastlinám, z dôvodu aktivácie bunkového delenia v miestach tvorby laterálnych koreňov a primordií laterálnych koreňov (Ligeza *et al.*, 2016). Tsukagoshi *et al.*, 2010 identifikovali transkripčný faktor UPB1, ktorý reguluje expresiu génov kódujúcich peroxidázy, ktoré su zahrnuté pri regulácii ROS medzi zónami bunkového delenia a bunkového predĺžovania v koreňovom meristéme. Regulácia aktivity týchto peroxidáz, prostredníctvom UPB1 (UPBeat 1), reguluje vznik laterálnych koreňov cez signalizáciu pomocou ROS, pravdepodobne prechodom z proliferáčnej do diferenciačnej fázy. Pomocou genetických analýz bolo dokázané, že aktivita peroxidáz je nutná pre vznik laterálnych koreňov v koreňovom meristéme *Arabidopsis*. Naše analýzy ukazujú, že rastliny vystavené vplyvu menadiónu majú vyšší počet laterálnych koreňov vo všetkých líniiach. Mutantné *fsdl-1* a *fsdl-2* rastliny vykazujú dokonca najvyšší počet laterálnych koreňov oproti komplementovaným líniiam a Col-0. Yamamoto *et al.*, 2003 uvádzajú, že pri strese spôsobenom ťažkými kovmi, konkrétne hliníkom, je inhibovaný rast primárneho koreňa. Miesto akumulácie hliníka je v koreňovom meristéme, kde spôsobuje peroxidáciu lipidov a rapídnu produkciu ROS v koreňovom pletive. Podobne ako stres spôsobený ťažkými kovy, salinita má tiež efekt na rast primárneho koreňa. Stres zo zasolenia vedie k produkcii peroxidu vodíka v koreňovej špičke a inhibícií rastu

primárneho koreňa v rastlinách *Arabidopsis* (Duan *et al.*, 2010). Naše výsledky naznačujú, že menadión, rovnako ako ostatné oxidanty, ovplyvňuje dĺžku primárneho koreňa, kedy rastliny vystavené vplyvu oxidatívneho stresu mali menšie primárne korene než kontrolné rastliny. Zaznamenali sme aj malý rozdiel medzi líniami, kedy mutantné *fsd1-1* a *fsd1-2* rastliny mali menšiu dĺžku primárneho koreňa než komplementované línie a divý typ. Menadión spôsobuje dlho trvajúcu redox nerovnováhu v koreňoch *Arabidopsis*, čo spôsobuje vyššiu percentuálnu možnosť bunkovej smrti (Lehmann *et al.*, 2009). Môžeme sa domnievať, že nižšia koncentrácia menadiónu indukovala signálne funkcie ROS, v čoho dôsledku sa mohla zvýšiť indukcia tvorby laterálnych koreňov vo všetkých línách, pričom vyššie koncentrácie indukovali negatívne účinky na viabilitu rastlín. Menadión neovplyvnil aktivitu FeSOD1 pri krátkodobom ovplyvnení v tekutom ½ MS médiu, pravdepodobne z dôvodu ovplyvnenia, kde systém ovplyvnenia na pevných médiách je odlišný od ovplyvnenia v tekutých médiách. Pre podrobnejšie objasnenie zmeny aktivity FeSOD na krátkodobé ovplyvnenie menadiónom, je potrebné experimenty zopakovať pri vyšších koncentráciách.

V prípade testu odolnosti na menadión sme zaznamenali stratu viability mutantných rastlín *fsd1-1* a *fsd1-2* po ovplyvnení 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ menadiónom na pevných ½ MS médiách narozdiel od komplementovaných línií a Col-0. Vysoká úmrtnosť týchto mutantných rastlín je pravdepodobne spôsobená deficienciou génu *FSD1*, ktorý hrá jednu z primárnych úloh pri antioxidačnej obrane rastliny. Pri vystavení oxidatívne stresu, nedochádza ku kompenzácií ostatnými SOD izoformami. Môžeme sa domnievať, že zvýšenie hladiny superoxidových radikálov v bunke a cez ich následné nedostatečné odbúranie kvôli deficiencii *FSD1* génu, môže viesť k samovoľnej premene na hydroxylový radikál cez vznikajúci peroxid vodíka. Peroxid vodíka môže následne poškodzovať rastlinné tkanivá a vďaka nedostatočnej antioxidačnej obrane rastliny môže dôjsť k bunkovej smrti v pletivách mutantných rastlín skôr ako komplementovaných línií a divého typu, z čoho môže vyplývať, že deficiencia *FSD1* narúša celkovú antioxidačnú obranu rastliny aj v prípade, že *FSD1* odbúrava len superoxid. Komplementované línie ale dokázali zvrátiť fenotyp mutantných rastlín. *FSD1*-GFP vykazuje fenotyp podobný divému typu, pričom GFP-*FSD1* sa zdá byť menej odolná na stresové podmienky spôsobené menadiónom.

Vizualizáciou superoxidových radikálov histochemickým farbením sme detekovali nižšie hladiny superoxidu v ovplyvnených rastlinách ako v kontrolných. Ku

zvýšeniu hladiny superoxidu mohlo dôjsť už v čase pred začatím analýzy. Detekcia superoxidových radikálov pomocou NBT po ovplyvnení paraquatom, ukázala zvýšené hladiny superoxidu v rastlinách *Fragaria* (Buornonville a Diaz-Ricci, 2011). Vizualizácia superoxidu bola detekovaná aj v prípade ovplyvnenia osmotickým stresom 80 mmol.l⁻¹ sacharózou v rastlinách *Arabidopsis* (Ramel *et al.*, 2009). Dôvodom neprítomnosti superoxidového radikálu môže byť inhibícia fotosyntetických procesov v bunke vedúcich k jeho tvorbe. Superoxid mohol byť premenený buď neenzymaticky (tokoferol) alebo samovoľne na peroxid vodíka. K indukcii superoxidu zrejme dochádza v skorých fázach ovplyvnenia v tekutom ½ MS médiu. Po vizualizácií peroxidu vodíka, sme zaznamenali zvýšenu akumuláciu v divom type, mutantných rastlinách *fsd1-1* a *fsd1-2* a FSD1-GFP po 4 a po 8 hodinách. Liu *et al.*, 2009 publikovali, že akumulácia peroxidu vodíka vzniká aj po ovplyvnení fenantrénom v listoch, ktorý spôsobuje oxidatívny stres. K akumulácií peroxidu vodíka dochádza aj po ovplyvnení paraquatom po 4 hodinách od ovplyvnenia v rastlinách *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2017).

MAPK sú dôležité signálne molekuly, ktoré majú úlohu v prenose signálu pri odpovedi na environmentálne stimuly. V rastlinách *A. thaliana* *AtMPK3* je jedným z najlepšie preštudovaných MAPK, ktoré majú dôležitú úlohu pri imúnnej odpovedi na biotický stres. Po ovplyvnení flagelínom 22 je MPK3 aktivovaná kinázami vyššej úrovne MKK4/MKK5 (Asai *et al.*, 2002). Takáč *et al.*, 2016 uvádza, že proteíny, ktoré majú úlohu pri imúnnej odpovedi rastliny na patogény boli výrazne podregulované v *mpk4* mutante *Arabidopsis*. V rastlinách jačmeňa je ale úloha HvMPK3 stále nejasná. Karre *et al.*, 2016 publikovali, že pri interakcii s patogénom *Fusarium garminearum* v jačmeni, *HvMPK3* je signifikantne nadregulovaná. Křenek *et al.*, 2015 publikovali, že 4 HvMAPK, konkrétne *HvMPK5*, *HvMPK6*, *HvMPK7* a *HvMPK12* boli vysoko aktivované pri interakcii s patogénom *P. hordei* 2 až 5 dní po inokulácii. V rámci bioinformatickej analýzy sme identifikovali 8 stresových proteínov v diferenciálnom proteóme koreňov v mutantnej KO *hvmpk3* línii, z toho 5 malo signifikantne zníženú abundanciu v kontrolných podmienkach. V mutantnej KO *hvmpk3* línii sme identifikovali 4 stresové proteíny, z toho všetky boli výrazne podregulované po ovplyvnení flagelínom 22. *HvMPK3* môže potenciálne regulovať aj odpoveď na oxidatívny stres, lebo sme našli niekoľko antioxidantných enzýmov s rozdielnou abundanciou. Môžeme sa domnievať, že *HvMPK3* hrá dôležitú úlohu pri imúnnej odpovedi jačmeňa na rastlinné patogény a že deficiencia *HvMPK3* môže negatívne vplyvať na imúnnu odpoveď jačmeňa voči

biotickému alebo abiotickému stresu. V tomto smere sa vie, že MAPKs môžu regulovať ich transkripciu pri vplyve oxidatívneho stresu. Xing *et al.*, 2015 identifikovali signálnu dráhu MAPK kaskád zloženú z AtMKK1 a AtMPK6, indukovanou ABA, ktorá ovplyvňuje expresiu CAT1 proteínu ako antioxidantného proteínu. Ďalšia kináza MKK5, ovplyvňuje expresiu 2 Cu/ZnSOD, CSD1 a CSD2, ktoré majú úlohu v oxidatívnej adaptácii rastliny na stres z vysokej intenzity osvetlenia (Xing *et al.*, 2013).

6 ZÁVER

V predloženej diplomovej práci sme sa zaoberali úlohami FeSOD1 vo vývine a v odpovedi *Arabidopsis* na tvorbu ROS a oxidatívny stres vyvolaný menadiónom. Skúmali sme aj vplyv bakteriálnych elicítov na divý typ a mutantnú KO *hvmprk3* líniu rastlín *H. vulgare* a uskutočnili sme proteomickú analýzu týchto rastlín v kontrolných podmienkach a po 6 hodinovom ovplyvnení flagelínom 22.

Zistili sme, že FeSOD1 je spolu s MnSOD a CuZn/SOD vývinovo regulovaná v skorých postembryonálnych štádiách v Col-0. MnSOD1 pravdepodobne podlieha oligomerizácii v 3 a 5 dňových rastlinách *Arabidopsis* v Col-0. Ukázalo sa, že ROS indukované menadiónom inhibujú rast primárneho koreňa a zvyšuje tvorbu laterálnych koreňov. *FSD1* je dôležitá pre odolnosť voči oxidatívne stresu prostredníctvom regulácie superoxidových radikálov, avšak na akumuláciu H_2O_2 pravdepodobne *FSD1* nemá výrazný vplyv. Tento fakt bude potrebné v budúcnosti detailnejšie preštudovať.

Môžeme konštatovať, že menadión má negatívny efekt na fenotyp koreňov rastlín *Arabidopsis* a že *FSD1* patrí k jedným z esenciálnych génov pre celkovú antioxidačnú obranu, čo otvára možnosti ďalšieho skúmania *FSD1* pre zvýšenie antioxidačnej obrany u rastlín *Arabidopsis*.

V rámci pozorovania aktivácie MAPK v rastlinách jačmeňa bakteriálnymi elicítormi chitínom, flagelínom 22 a elf 18 sme zistili, že MAPK sú najviac aktivované chitínom a flagelínom 22 v koreňoch aj nadzemných častiach. V rámci bioinformatickej analýzy sme porovnávali diferenciálny proteóm v koreňoch u rastlín jačmeňa v kontrolných podmienkach a po ovplyvnení flagelínom 22. Zistili sme, že mutantná KO *hvmprk3* línia má výrazne podregulované stresové proteíny na rozdiel od divého typu v kontrolných podmienkach aj po ovplyvnení flagelínom 22.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Abbas H.M. (2011): Analysis of the role of the HvMAPK4 gene in the barley biotic stress response. Thesis
- Abbas H.M., Morris P. (2013): The *Hordeum vulgare* signalling protein MAP kinase 4 is a regulator of biotic and abiotic stress responses. *Journal of Plant Physiology* **170**, 15.
- Abreu I.A., Hearn A., An H., Nick H.S., Silverman D.D. (2008): The kinetic mechanism of manganese-containing superoxide dismutase from *Deinococcus radiodurans*: a specialized enzyme for the elimination of high superoxide concentrations. *Biochemistry* **47**, 2350-2356.
- Asada K. (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology* **50**, 601–639.
- Asai S., Ichikawa T., Nomura H., Kobayashi M., Kamiyoshihara Y., Mori H., Kadota Y., Zipfel C., Jones J.D.G., Yoshioka H. (2013): The variable domain of plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) confers subcellular localization and substrate recognition for NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 14332-14340.
- Asai S., Yoshioka H. (2008): The role of radical burst via MAPK signaling in plant immunity. *Plant Signalling and Behaviour* **3**, 920-922.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willman R.M., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel M.F., Sheen J. (2002): MAP Kinase Signalling Cascade in *Arabidopsis* Innate Immunity. *Nature* **28**, 977-983
- Baxter J.CH., Redestig H., Schauer N., Repsilber D., Patil R.K., Nielsen J., Selbig J., Liu J., Fernie R.A., Sweetlove J.L. (2007): The Metabolic Response of Heterotrophic *Arabidopsis* Cells to Oxidative Stress. *Plant Physiology* **143**, 312-325.
- Bournonville C.F., Díaz-Ricci J.C (2011): Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. *Phytochemical Analysis* **22**, 268-271.
- Bréhélin C., Meyer H.E., de Souris J.P., Bonnard G., Meyer Y. (2003): Resemblance and Dissemblance of *Arabidopsis* Type II Peroxiredoxins: Similar Sequences for Divergent Gene Expression, Protein Localization, and Activity. *Plant Physiology* **132**, 2045-2057.
- Brnygelson A.O., Arobo E.S., Pinkham L.J., Cabelli E.D., Maroney J.M. (2004): Expression, Reconstitution, and Mutation of Recombinant *Streptomyces coelicolor* NiSOD. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 460-461.
- Cantavenera J.M., Catanzaro I., Loddo V., Palmisano L., Sciandrello G. (2007): Photocatalytic degradation of paraquat and genotoxicity of its intermediate products. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **185**, 277-282.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217.
- Corpas J.F., Barroso B.J. (2017): Lead-induced stress, which triggers the production of nitric oxide (NO) and superoxide anion (O₂⁻) in *Arabidopsis* peroxisomes affects catalase activity. *Nitric Oxide* **68**, 103-110.

- Corpas J.F., Gupta K.D., Palma J.M. (2015): Production Sites of Reactive Oxygen Species (ROS) in Organelles from Plant Cells. *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress* 1-22.
- Couto D., Zipfel C. (2016): Regulation of Pattern Recognition Receptor Signalling in Plants. *Nature Reviews Immunology* **9**, 537-552.
- Couto N., Malys N., Gaskell J.S., Barber J. (2013): Partition and Turnover of Glutathione Reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: A Proteomic Approach. *Journal of Proteome Research* **6**, 2885-2894.
- Cui L., Yang G., Yan J. et al. (2019): Genome-wide identification, expression profiles and regulatory network of MAPK cascade gene family in barley. *BMC Genomics* **20**, 750
- Daudi A., Cheng Z., O'Brien J.A., Mammarella N., Khan S., Ausubel F.M., Bolwell G.P. (2012): The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern triggered immunity. *Plant Cell* **24**, 275–287.
- Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D.J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K., Mittler R. (2005): Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 268–281.
- De Carvalho C.H.M. (2008): Drought stress and reactive oxygen species production, scavenging and signaling. *Plant Signalling and Behaviour* **3**, 156-165.
- De Kok L.J., Oosterhuis F.A (1983): Effects of frost-hardening and salinity on glutathione and sulfhydryl levels and on glutathione reductase activity in spinach leaves. *Physiologia Plantarum* **58**, 47-61.
- Del Río L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B. (2006): Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signalling. *Plant Physiology* **141**, 330-335.
- Del Río L.A. (2015): ROS and RNS in Plant Physiology: An Overview. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2827-2837
- Demidchik V. (2015): Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* **109**, 212-228.
- Ding S., Jiang R., Lu Q., Wen X., Lu C. (2016): Glutathione reductase 2 maintains the function of photosystem II in *Arabidopsis* under excess light. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* **1887**, 665-667.
- Dinis-Oliveira R.J., Remião F., Duarte J.A., Ferreira A., Navarro S.A., Bastos M.L., Carvalho F. (2006): P-glycoprotein induction: an antidotal pathway for paraquat-induced lung toxicity. *Free Radical Biology & Medicine* **41**, 1213-1224.
- Dogra V., Rochaix J.D., Kim C. (2018): . Singlet oxygen-triggered chloroplast-to-nucleus retrograde signalling pathways: An emerging perspective. *Plant, Cell & Environment* **41**, 1727-1738.
- Dos Santos V.CH., Rey P. (2006): Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science* **11**, 329-334.

- Duan Y., Zhang W., Li B., Wang Y., Li K., Chunyu S., Yizhang H., Li X. (2010): An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **186**, 681-695.
- Dvořák P., Krasylenko Y., Ovečka M., Basheer J., Zapletalová V., Šamaj J., Takáč T. (2020): FSD1: Developmentally-Regulated Plastidial, Nuclear and Cytoplasmic Enzyme With Anti-Oxidative and Osmoprotective Role. *Plant, Cell and Environment*
- Eckardt N.A. (2017): The Plant Cell Reviews Plant Immunity: Receptor-Like Kinases, ROS-RLK Crosstalk, Quantitative Resistance, and the Growth/Defense Trade-Off. *Plant Cell* **29**, 601-602.
- Edwards R.A., Baker H.M., Whittaker M.M., Whittaker J.W., Jameson G.B., (1998): Crystal structure of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase at 2.1-angstrom resolution. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **3**, 161–171.
- Eubel H., Meyer H.E., Taylor L.N., Bussell D.J., O'Toole N., Heazlewood L.J., Castleden I., Small D.I., Smith M.S., Millar H.A. (2008): Novel Proteins, Putative Membrane Transporters, and an Integrated Metabolic Network Are Revealed by Quantitative Proteomic Analysis of *Arabidopsis* Cell Culture Peroxisomes. *Plant Physiology* **148**, 1809-1829.
- Fluckiger S., Mittl P.R., Scapozza L., Fijten H., Folkers G. (2002): Comparison of the crystal structures of the human manganese superoxide dismutase and the homologous *Aspergillus fumigatus* allergen at 2-Å resolution. *Journal of Immunology* **168**, 1267–1272.
- Fluhr R. (2009): Reactive Oxygen-Generating NADPH Oxidases in Plants. *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*, 1-23.
- Foyer C.H., Noctor G. (2009):) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signalling* **11**, 861-905.
- Foyer C.H., Trebst A., Noctor G. (2005):) Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate, and glutathione. *In Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*
- Gadjev I., Vanderauwera S., Gechev S.T., Laloi Ch., Minkov N.I., Shulaev V., Apel K., Inzé D., Mittler R., Breusgem F. (2006): Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**, 436-445.
- Gallie D. R., Chen Z. (2019): Chloroplast-localized iron superoxide dismutases FSD2 and FSD3 are functionally distinct in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* **14**, e0220078.
- Garnik Y.E., Belkov I.V., Tarasenko I.V., Korzun M.A., Konstantinov M.Y (2016): Glutathione reductase gene expression depends on chloroplast signals in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry (Moscow)* **81**, 364–372.
- Gepstein S., Glick R.B. (2013): Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant Molecular Biology* **82**, 623-633.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909-930.
- Gou J.Y., Li K., Wu K., Wang X., Lin H., Cantu D., Uauy C., Dobon-Alonso A., Midorikawa T., Inoue K., Sánchez J., Fu D., Blechl A., Wallington E., Fahima T., Meeta M., Epstein L.,

- Dubcovsky J. (2015): Wheat stripe rust resistance protein WKS1 reduces the ability of the Thylakoid-associated ascorbate peroxidase to detoxify reactive oxygen species. *Plant Cell* **27**, 1755–1770.
- Grafão P.L., Polle A., Lea P.J., Azevedo R.A. (2005): Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* **32**, 481-494.
- Greco M., Chiappetta A., Bruno L., Bitonti B.M (2012): In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *Journal of Experimental Botany* **69**, 695-709.
- Gupta K.D., Corpas J.F., Palma J.M. (2018): Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants. **Springer**
- Halliwell B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**, 312-322.
- Harris J.C., Baulcombe C.D. (2013): Chlorophyll Content Assay to Quantify the Level of Necrosis Induced by Different R Gene/Elicitor Combinations After Transient Expression. *Bio-protocol* **5**, 1670.
- Heyne K., Mannebach S., Wuertz E., Knaup K.X., Mahyar-Roemer M., Roemer K. (2004): Identification of a putative p53 binding sequence within the human mitochondrial genome. *FEBS Letters* **578**, 198–202.
- Holmgren A. (1985): Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry* **54**, 237-271.
- Horling F., Lamkemeyer P., König J., Finkemeier I., Baier M., Kandlbinder A., Dietz K.J. (2003): Divergent light-, ascorbate- and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **131**, 317-325
- Huang S., Van Aken O., Schwarzlander M., Belt K., Millar A.H. (2016): The Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cellular Signaling and Stress Response in Plants. *Plant Physiology* **171**, 1551-1559.
- Huang Q., Wang Y., Li B., Chang J., Chen M., Li K., Yang G., He G. (2015): TaNAC29, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **15**, 174-178.
- Chen L., Hu W., Tan S., Wang M., Ma Z., Zhou S., Deng X., Zhang Y., Huang C., Yang G. (2012): Genome-wide identification and analysis of MAPK and MAPKK gene families in *Brachypodium distachyon*. *PLoS One* **10**, 46744.
- Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T., Felix G. (2006): The *Arabidopsis* Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Johnson L.T., Olsen J.L. (2001): Building New Models for Peroxisome Biogenesis. *Plant Physiology* **127**, 731-739.
- Jovtchev G., Gateva S., Stergios M., Kulekova S. (2010): Cytotoxic and genotoxic effects of paraquat in *Hordeum vulgare* and human lymphocytes in vitro. *Environmental Toxicology* **25**, 294-303.

- Kadota Y., Shirasu K., Zipfel C. (2015): Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiology* **56**, 1472-1480.
- Kadota Y., Sklenar J., Derbyshire P., Stransfeld L., Asai S., Vards N., Jones J.D.G., Shirasu K., Menke F., Jones A., Zipfel C. (2014): Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-associated Kinase BIK1 During Plant Immunity. *Molecular Cell* **54**, 43-55.
- Karre S., Kumar A., Dhokane D., Kushalappa A.C. (2017): Metabolo-transcriptome profiling of barley reveals induction of chitin elicitor receptor kinase gene (HvCERK1) conferring resistance against *Fusarium graminearum*. *Plant Molecular Biology* **93**, 247-267.
- Kataya R.A.A., Reumann S. (2010): *Arabidopsis* glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol. *Plant Signalling and Behaviour* **5**, 171-175.
- Kim Y.S., An C., Park S., Gilmour J.S., Wang L., Renna L., Brandizzi F., Grumet R., Thomashow F.M. (2017): CAMTA-Mediated Regulation of Salicylic Acid Immunity Pathway Genes in *Arabidopsis* Exposed to Low Temperature and Pathogen Infection. *Plant Cell* **29**, 2465-2477.
- Kimura S., Waszczak C., Hunter K., Wrzaczek M. (2017): Bound by fate: reactive oxygen species in receptor-like kinase signaling. *Plant Cell* **29**, 638-654.
- Klack K., Carvalho J.F. (2006): Vitamina K: Metabolismo, fontes e interacao com o anticoagulante varfarina. *Revista Brasileira de Reumatologia* **46**, 398-406.
- Koussevitzky S., Suzuki N., Huntington S., Armijo L., Sha W., Cortes D., Shulaev V., Mittler R. (2008): Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 34197-34203.
- Krieger-Liszkay A., Fufezan C., Trebst A. (2008): Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* **98**, 551-564.
- Krieger-Liszkay A., Kós B.O., Hideg É. (2010): Superoxide anion radicals generated by methylviologen in photosystem I damage photosystem II. *Physiologia Plantarum* **142**, 17-25.
- Křenek P., Niks E.R., Vels A., Vypelová P., Šamaj J. (2015): Genome-wide analysis of the barley MAPK gene family and its expression patterns in relation to *Puccinia hordei* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* **37**, 11.
- Kuo W.Y., Huang C.H., Liu A.C., Cheng C.P., Li S.H., Chang C.W., Weiss C., Azem A., Jinn T.L. (2013): CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in *Arabidopsis* chloroplasts. *New Phytologist* **197**, 99-110.
- Kwak M.J., Mori C.I., Pei Z., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl L.J., Bloom E.R., Bodde S., Jones D.G.J., Schoreder I.J. (2003): NADPH Oxidase AtrbohD and AtrbohF Genes Function in ROS-dependent ABA Signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **22**, 2623-2633.
- Lamkemeyer P., Laxa M., Collin V., Li W., Finkemeier I., Schottler A.M., Holtkamp V., Tognetti B.V., Bourguet I.E., Kandlbinder A., Weis E., Miginiac-Maslow M., Dietz J.K. (2006): Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. *The Plant Journal* **45**, 968-981.
- Lehmann M., Schwarzlander M., Obata T., Sirikantaramas S., Burow M., Olsen E.C., Tohge T., Fricker D.M., Moller L.B., Fernie R.A., Sweetlove J.L., Laxa M. (2009): The Metabolic

- Response of *Arabidopsis* Roots to Oxidative Stress is Distinct from that of Heterotrophic Cells in Culture and Highlights a Complex Relationship between the Levels of Transcripts, Metabolites, and Flux. *Molecular Plant* **2**, 390-406.
- Lenzen S. (2008): The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced Diabetes. *Diabetologia* **51**, 216-226.
- Lian W., Tang Y., Gao S., Zhang Z., Zhao X., Zhao Ch. (2012): Phylogenetic Analysis and Expression Patterns of the MAPK Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum* L). *Journal of Integrative Agriculture* **11**, 1227-1235
- Ligeza O.B., Parizot B., de Rycke R., Fernandez A., Himschoot E., van Breusgem F., Bennett J.M., Périlleux C., Beeckman T., Draye X. (2016): RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in *Arabidopsis*. *Development* **143**, 3328-3339.
- Liptáková Ľ., Bočová B., Huttová J., Mistřík I. (2012): Superoxide production induced by short-term exposure of barley roots to cadmium, auxin, alloxan and sodium dodecyl sulfate. *Plant Cell Reports* **31**, 12.
- Liu H., Bo C., Bei Y.Y., Ling T., Hua Z.W. (2009): Early reactions of *Arabidopsis thaliana* to phenanthrene polycyclic aromatic hydrocarbon stress. *Chinese Journal of Eco-Agriculture* **17**, 949-93.
- Liu Y., Zhang D., Wang L., Li D. (2013): Genome-wide analysis of mitogen-activated protein kinase gene family in maize. *Plant Molecular Biology Reporter* **31**, 1446–60.
- Maruta T., Inoue T., Noshi M., Tamoi M., Yabuta Y., Yoshimura K., Ishikawa T., Shigeoka S. (2012a): Cytosolic ascorbate peroxidase 1 protects organelles against oxidative stress by wounding and jasmonate-induced H₂O₂ in *Arabidopsis* plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1820**, 1901–1907.
- Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S., Ishikawa T. (2016): Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: more than just a classical antioxidant enzyme? *Plant Cell Physiology* **57**, 1377–1386.
- McCord M.J., Fridovich I. (1969): Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* **244**, 6049-6055.
- Meng X., Zhang S. (2013): MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 245-266.
- Mhamdi A., Hager J., Chaouch S., Queval G., Han Y., Taconnat L., Saindrenan P., Gouia H., Issakidis-Bourquet E., Renou J.P., Noctor G. (2010): *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiology* **153**, 1144-1160.
- Mittler R. (2002): Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends in Plant Science* **9**, 405-410.
- Mittler R. (2017): ROS are good. *Trends in Plant Science* **22**, 11-19.
- Montillet L.J., Cacas L.J., Garnier L., Montané H.M., Douki T., Bessoule J.J., Polkowska-Kowalczyk L., Maciejewska U., Agnel P.J., Vial A., Triantaphylidés Ch. (2004): The upstream

- oxylin profile of *Arabidopsis thaliana* : a tool to scan for oxidative stresses. *The Plant Journal* **40**, 439-451.
- Morgan M.J., Lehmann M., Schwarzlander M., Baxter C.J., Sienkiewicz-Porzucek A., Williams T.C. (2008): Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiology* **147**, 101-114.
- Morgan, M. J., Lehmann, M., Schwarzländer, M., Baxter, C. J., Sienkiewicz-Porzucek, A., Williams, T. C., Schauer, N., Fernie, A. R., Fricker, M. D., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., Finkemeier, I. (2008): Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant physiology* **147**, 101–114.
- Mullen T.R., Lee S.M., Trelease N.R. (1997): Identification of the peroxisomal targeting signal for cottonseed catalase. *Plant Journal* **12**, 313-322.
- Munne-Bosch S., Alegre L. (2002): The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* **21**, 31–57.
- Mur A.J.L., Kenton P., Lloyf J.A., Ougham H., Prats E. (2008): The Hypersensitive Response; The Centenary Is Upon Us but How Much Do We Know? *Journal of Experimental Botany* **59**, 501-520.
- Myouga F., Hosoda C., Umezawa T., Iizumi H., Kuromori T., Motohashi R., Shono Y., Nagata N., Ikeuchi M., Shinozaki K. (2008): A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**, 3148–3162.
- Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J.P. (2007): Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* **129**, 185-195.
- Nishihama R., Banno H., Kawahara E., Irie K., Machida Y. (1997): Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of *Arabidopsis* ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKKs). *The Plant Journal* **12**, 39-48.
- Nordziede D.E., Medraño-Fernandez I. (2018): The Plasma Membrane: A Platform for Intra- and Intercellular Redox Signaling. *Antioxidants* **7**, 168.
- Nühse T.S., Bottrill A.R., Jones A.M.E., Peck S.C. (2007): Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanism of pnat innate immune responses. *The Plant Journal* **51**, 931-940.
- Pasternak T., Potters G., Caubergs R., Jansen A.K.M. (2005): Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1991-2001.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen H., Nielsen B., Lacy M., Austin J.M., Parker E.J., Sharma B.S., Klessig F.G., Martienssen R., Mattson O., Jensen B.A., Mundy J. (2000): Arabidopsis MAP Kinase 4 Negatively Regulates Systemic Acquired Resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.

- Pilon M., Ravet K., Tabken W. (2011): The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 989-998.
- Poole B.L., Nelson J.K. (2016): Distribution and Features of the Six Classes of Peroxiredoxins. *Molecules and Cells* **39**, 53-59.
- Pracharoenwattana I., Smith M.S. (2008): When is a peroxisome not a peroxisome? *Trends in Plant Science* **13**, 522-525.
- Prasad A., Sedlářová M., Kale R.S., Pospíšil P. (2017): Lipoxygenase in singlet oxygen generation as a response to wounding: *In vivo* imaging in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports* **7**, 9831.
- Qiu L.J., Zhou L., Yun W.B., Nielsen B.H., Fiil K.B., Petersen K., MacKinlay J., Loake J.G., Mundy J., Morris C.P. (2008): Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases MKK1 and MKK2 Have Overlapping Functions in Defense Signaling Mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Cell Biology and Signal Transduction* **148**, 212-222.
- Rabindranath S.D., Fridovich I. (1975): Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 6107-6112.
- Ramel F., Sulmon C., Bogard M., Couée I., Gouesbet G. (2009): Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology* **9**, 28.
- Rampon C., Volovitch M., Joliot A., Vriz S. (2018): Hydrogen Peroxide and Redox Regulation of Developments. *Antioxidants* **7**, 159
- Rasmussen W.M., Roux M., Petersen M., Mundy J. (2012): MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **3**, 169.
- Renew S., Heyno E., Schopfer P., Liskay A. (2005): Sensitive detection and localization of hydroxyl radical production in cucumber roots and *Arabidopsis* seedlings by spin trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Plant Journal* **44**, 342-347.
- Rentel C.M., Knight R.M. (2004): Oxidative Stress-Induced Calcium Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 1471-1479.
- Rhee G.S., Kang W.S., Chang T.S., Jeong W., Kim K. (2001): Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. *IUBMB Life* **52**, 35-41.
- Richards S.L., Wilkins K.A., Swarbreck S.M., Anderson A.A., Habib N., Smith A.G., McAinsh M., Davies J.M. (2015): The hydroxyl radical in plants: From seed to seed. *Journal of Experimental Botany* 2015 **66**, 37-46.
- Rodríguez A.A., Grunberg A.K., Taleisnik L.E. (2002): Reactive Oxygen Species in the Elongation Zone of Maize Leaves Are Necessary for Leaf Extension. *Plant Physiology* **129**, 1627-1632.
- Rodríguez M.C.S., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621-649.
- Rohila J.S., Yang Y. (2007): Rice mitogen-activated protein kinase gene family and its role in biotic and abiotic stress response. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 751-759.

- Rouhier N., Jacquot J.P. (2005): The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* **38**, 1413-1421.
- Sagi M., Fluhr R. (2006): Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases. *Plant Physiology* **141**, 336-340.
- Sarraf E.N., Gurel F., Tufan F., McGuffin J.L (2019): Characterisation of HvVIP1 and expression profile analysis of stress response regulators in barley under *Agrobacterium* and *Fusarium* infections. *PLoS One* **14**
- Segal A.W. (2008): The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates and mammals. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 604-618.
- Sharma P., Jha B.A., Dubey S.R., Pessarakli M. (2012): Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* **2012**, 26.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. (2002): Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1305–1319.
- Schmidt A., Kunert J. (1986): Lipid Peroxidation in Higher Plants. *Plant Physiology* **82**, 700-702.
- Sinha A.K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signalling and Behaviour* **2**, 196-203.
- Smirnoff N., Arnaud D. (2019): Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist* **221**, 1197-1214.
- Smith W.M., Doolittle R. (1992): A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Evolution* **34**, 175-184.
- Sofa A., Scopa A., Nuzzaci M., Vitti A (2015): Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 13561-13578.
- Srivastava, A.; Redij, T.; Sharma, B.; Suprasanna, P. Interaction between Hormone and Redox Signaling in Plants: Divergent Pathways and Convergent Roles. *In Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress*
- Stacy A.P.R., Munthe E., Steinum T., Sharma B., Aalen B.R (1996): A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, Per1, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant Molecular Biology* **31**, 1205-1216.
- Sweetlove L.J., Foyer C.H. (2004): Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. *From Genome to Function* **1**, 307-320.
- Takáč T., Vadovič P., Pechan, T. Luptovčíak I., Šamajová O., Šamaj J. (2016): Comparative proteomic study of *Arabidopsis* mutants *mpk4* and *mpk6*. *Scientific Reports* **6**, 28306.
- Tanaka K., Machida T., Sugimoto T. (1990): Ozone Tolerance and Glutathione Reductase in Tobacco Cultivars. *Agricultural and Biological Chemistry* **54**, 1061-1062.

- Telfer A., Bishop S.M., Phillips D., Barber J. (1994): Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 13244–13253.
- Telfer A., Frolov D., Barber J., Robert B., Pascal A. (2003): Oxidation of the two β -carotene molecules in the photosystem II reaction center. *Biochemistry* **42**, 1008–1015.
- Thoma I., Loeffler C., Sinha A.K., Gupta M., Krishke M., Steffan B., Roitsch T., Mueller J.M. (2003): Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant Journal* **34**, 363-375.
- Thomma P.H.J.B., Nurnberger T., Joosten H.A.J.M. (2011): Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *Plant Cell* **23**, 4-15.
- Tian S., Wang X., Li P., Wang H., Ji H., Xie J., Qiu Q., Shen D., Dong H. (2016): Plant Aquaporin AtPIP1;4 Links Apoplastic H₂O₂ Induction to Disease Immunity Pathways. *Plant Physiology* **171**, 1635-1650.
- Torres M.A., Dangl J.L. (2005): Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 397–403.
- Torres M.A., Dangl J.L., Jones J.D. (2002): *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**, 517–522.
- Torres M.A., Jones D.G.J., Dangl L.J. (2006): Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* **141**, 373-378.
- Trinh C.H., Hunter T., Stewart E.E., Phillips S.E., Hunter G.J. (2008): Purification, crystallization and X-ray structures of the two manganese superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans*. *Acta Crystallographica Section F* **64**, 1110–1114.
- Tsukagoshi H., Busch W., Benfey N.P. (2010): Transcriptional Regulation of ROS Controls Transition from Proliferation to Differentiation in the Root. *Cell* **143**, 606-616.
- Wagner U.G., Patridge K.A., Ludwig M.L., Stallings W.C., Werber M.M. (1993): Comparison of the crystal structures of genetically engineered human manganese superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*: differences in dimer-dimer interaction. *Protein Science* **2**, 814-825.
- Wang M., Yue H., Feng K., Deng P., Song W., Nie X. (2016): Genome-wide identification, phylogeny and expressional profiles of mitogen activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) gene family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics* **17**, 668.
- Wellinder K.G. (1992): Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* **2**, 388-393.
- Wu H., Zhang W., Schuster M., Moch M., Windoffer R., Steinberg G., Staiger J.C.H., Panstruga R. (2020): Alloxan Disintegrates the Plant Cytoskeleton and Suppresses mlo-Mediated Powdery Mildew Resistance. *Plant and Cell Physiology* **61**, 505-518.
- Wu J., Wang L., Wunsche H., Baldwin I.T., (2013): Narboh D, a respiratory burst oxidase homolog in *Nicotiana attenuata*, is required for late defence responses after herbivore attack. *Journal of Integrative Plant Biology* **55**, 187-198.

- Xing Y., Chen W., Jia W., Zhang J. (2015): Mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5)-mediated signalling cascade regulates expression of iron superoxide dismutase gene in *Arabidopsis* under salinity stress. *Journal of Experimental Botany* **66**, 5971–5981.
- Xing Y., Cao Q., Zhang Q., Qin L., Jia W., Zhang J. (2013): MKK5 Regulates High Light-Induced Gene Expression of Cu/Zn Superoxide Dismutase 1 and 2 in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **54**, 1217–1227.
- Yadeta A.K., Elmore M.J., Creer Y.A., Feng B., Franco Y.J., Rufian S.J., He P., Phinney B., Coaker G. (2007): Cysteine-Rich Protein Kinase Associates with a Membrane Immune Complex and the Cysteine Residues Are Required for Cell Death. *Plant Physiology* **173**, 771–787.
- Yamamoto Y., Kobayashi Y., Devu S.R., Rikiishi S., Matsumoto H. (2003): Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Roots: The Dynamic Interface between Plants and the Earth*, 239–243.
- Yoda, H., Fujimura, K., Takahashi, H., Munemura I., Uchimiya H., Sano H. (2009): Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Molecular Biology* **70**, 103–112.
- Zega G., Candiani S., Gropelli S., De Bernardi F., Pennati R. (2010): Neurotoxic effect of the herbicide paraquat on ascidian larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **29**, 24–31.
- Zhang J., Kirkham M.B. (1996): Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist* **132**, 361–373.
- Zhang T., Liu Y., Yang T., Zhang L., Xu S., Xue L., An L. (2006): Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**, 274–83.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ADP	Adenozín disfosfát
AO	Alternatívna oxidáza
APX	Askorbát peroxidáza
ASC	Askorbát
ATP	Adenozín trifosfát
BAK1	Bri-1 asociovaná kináza 1
CAT	Kataláza
CDPK	Proteínové kinázy závislé na vápniku
DAB	Diaminobenzidín
DAR	Dehydroaskorbátreduktáza
DTT	Dithiotreitol
ERK	Kinázy regulované extracelulárnym signálom
ETI	Imunita spúšťaná efektorom
FAD	Flavín adenín dinukleotid
FLS2	Flagellin sensing 2
FSD	FeSOD
GFP	Zelený fluorescenčný proteín
GPX	Glutatiónpoxidáza
GPXL	Enzýmy podobné glutatiónpoxidázam
GR	Glutatiónpoxidáza
GSH	Glutatión
GSSG	Glutatióndisulfid
GST	Glutatión-S-transferáza
HPLC	Vysoko tlaková kvapalinová chromatografia
IAA	Iódacetamid
MAMP	Molekulové vzorce asociované s mikróbmi
MAPK	Mitogénom aktivované proteín kinázy
MAPKK	Mitogénom aktivované proteín kinázy kinázy
MAPKKK	Mitogénom aktivované proteín kinázy kinázy kinázy
MDA	Monodehydroaskorbát
MDAR	Monodehydroaskorbát reduktáza

NADP	Nikotínamidadenínukleotid
NBT	Nitroblue tetrazolium
OXI1	Oxidative Signal Inducible 1
PAMP	Molekulové vzorce asociované s patogénmi
PIP	Faktor plazmatickej membrány
POD	Peroxidázy
PRR	Receptory rozpoznávajúce vzorec
PTI	Imunita spúšťaná vzorcom
PVDF	Polyvinilydindifluorid
PRX	Peroxiredoxíny
RBOH	Respiratory burst oxidase homologues
RLCK	Cytoplazmatická kináza podobná receptorom
RNS	Reaktívne druhy dusíka
ROS	Reaktívne druhy kyslíka
RUBISCO	Ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza
SA	Kyselina salicylová
SARE	Salicylic acid responsiveness
SOD	Superoxiddizmutáza
TEMED	Tetrametyléndiamín
TIP	Tonoplast intrinsic protein
TRX	Tioredoxíny

9. PRÍLOHY

9 PRÍLOHY

Tab. 2: Zoznam diferenciálne regulovaných proteínov v mutantnej KO *hvmpk3* línii po ovplyvnení flagelínom 22

Dat. číslo	Mr (kDa)	pl	Popis proteínu	Fold change	p-value
			Transport, targeting, trafficking		
326494930	122,7	5,06	Name:"Similar to SEC31B Protein transport protein SEC31 homolog B (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,21	0,041
326503000	98,7	5,14	Name:"Similar to Os07g0201100 Coatomer subunit gamma-2 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	Unique in A	NA
326504442	11,6	5,14	Name:"Similar to AKR2A Ankyrin repeat domain-containing protein 2A (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	Unique in B	NA
326507126	26	5,68	Name:"Similar to VPS24-1 Vacuolar protein sorting-associated protein 24 homolog 1 (Arabidopsis thaliana	3,01	0,039
			Defense response		
326488925	33	7,93	Name:"Similar to Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GI (Hordeum vulgare OX=4513)"	1,79	0,045
2429087	96,7	6,73	lipoxigenase 2 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	Unique in mo	NA
326529301	18,7	9,11	Name:"Similar to PRMS Pathogenesis-related protein PRMS (Zea mays OX=4577)"	0,21	0,020
326518626	37,1	8,02	Name:"Similar to PER1 Peroxidase 1 (Zea mays OX=4577)"	0,33	0,030
			Translation		
326510581	45,6	8,62	Name:"Similar to MORF1 Multiple organellar RNA editing factor 1, mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX	4,41	0,044
326503120	75,8	5,11	Name:"Similar to Os04g0620700 Nucleolin 2 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	2,10	0,00
326496098	12,7	10,62	Name:"Similar to RPL35AC 60S ribosomal protein L35a-3 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,89	0,01
326532020	48,3	6,4	Name:"Similar to TUF1 Elongation factor Tu, mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,61	0,031
326527057	17,5	11,12	Name:"Similar to RPL26A 60S ribosomal protein L26-1 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,60	0,043
326510727	27,6	11,14	Name:"Similar to SG12 60S ribosomal protein L10-2 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	2,20	0,024
326488521	29,8	9,79	Name:"Similar to RPS3A 40S ribosomal protein S3a (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,52	0,054
933919530	46,8	6,58	eukaryotic elongation factor 1 gamma [Hordeum vulgare]	1,52	0,024
			Protein folding		
326490563	33,8	4,7	Name:"Similar to HSP70-7 Heat shock 70 kDa protein 7, chloroplastic (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,47	0,00
326522080	21,4	4,78	Name:"Similar to Ppie Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E (Mus musculus OX=10090)"	2,16	0,054
326523037	42,2	9,61	Name:"Similar to Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial (Phaseolus vulgaris OX=3885)"	0,62	0,01
			Aminoacid metabolism		
395759274	55,1	6,52	Chain B, Alanine aminotransferase 2	0,57	0,028
295415542	40,9	6,4	Name:"Similar to Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic (Solanum tuberosum OX=4113)"	1,47	0,051
326488637	35,8	9,39	Name:"Similar to Os01g0760600 Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (Oryza sativa subsp. japonica OX	1,54	0,043
326511579	41,8	5,86	Name:"Similar to IMDH2 3-isopropylmalate dehydrogenase 2, chloroplastic (Arabidopsis thaliana OX=3702	1,60	0,038
326490820	56,3	8,21	Name:"Similar to Threonine synthase, chloroplastic (Solanum tuberosum OX=4113)"	Unique in B	NA
68655446	42,7	5,83	Name:"Similar to SAM3 S-adenosylmethionine synthase 3 (Hordeum vulgare OX=4513)"	0,62	0,052
326525020	60,6	5,95	Name:"Similar to ALAAT2 Alanine aminotransferase 2, mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,76	0,00

			Stress response and signalling		
326526311	19,7	5,76	Name:"Similar to PLAT1 PLAT domain-containing protein 1 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,39	0,053
167036	58,5	7,17	dehydrin DHN5 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	0,65	0,028
326488501	40,3	8,75	Name:"Similar to CPA N-carbamoylputrescine amidase (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,50	0,01
326529087	34,2	5,91	Name:"Similar to PK Pyridoxal kinase (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	Unique in A	NA
			Protein degradation and processing		
326519234	26,3	5,4	Name:"Similar to PBA1 Proteasome subunit beta type-6 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,60	0,031
326503998	11,2	5,55	Name:"Similar to SUMO1 Small ubiquitin-related modifier 1 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	2,60	0,044
300568846	25,9	4,68	Name:"Similar to PAE1 Proteasome subunit alpha type-5 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,66	0,020
257328678	39,1	6,84	Name:"Similar to Thiol protease aleurain (Hordeum vulgare OX=4513)"	0,64	0,01
1706082	55,9	5,64	RecName: Full=Serine carboxypeptidase II-3; AltName: Full=CP-MII.3; Contains: RecName: Full=Serine carboxypeptidase II-3	2,70	0,01
			Mitochondrial electron transport		
326490357	20	4,21	Name:"Similar to MIA40 Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40 (Kluyveromyces fragilis OX=3702)"	1,59	0,041
			Cytoskeleton		
326495636	41,6	5,49	Name:"Similar to ACT2 Actin-2 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	1,49	0,023
469614658	15,9	4,55	actin depolymerization factor-like protein [Hordeum vulgare subsp. spontaneum]	2,37	0,016
326498957	112,3	7,96	Name:"Similar to VLN3 Villin-3 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	Unique in B	NA
			Chromatine organisation and nucleotide/nucleoside biosynthesis		
326493412	37,9	4,97	Name:"Similar to Os12g0183300 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,53	0,018
326497985	37	5	Name:"Similar to RBSK Ribokinase (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,49	0,016
326520894	23,6	10,74	Name:"Similar to Histone H1 (Triticum aestivum OX=4565)"	1,75	0,01
			Metabolism		
326500628	57,3	6,47	Name:"Similar to ALDH6B2 Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,03	0,017
326533328	61,7	5,47	Name:"Similar to RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic (Pisum sativum OX=3702)"	0,66	0,00
326498661	70,2	6,38	Name:"Similar to PAP1 Probable inactive purple acid phosphatase 1 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	Unique in B	NA
326496543	44,3	8,94	Name:"Similar to LOC109345795 Gamma conglutin 1 (Lupinus angustifolius OX=3871)"	0,44	0,037
326523379	11,8	9,5	Name:"Similar to DIR1 Putative lipid-transfer protein DIR1 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,45	0,035
2204226	22	6,92	alpha-galactosidase, partial [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	0,39	0,00
326528269	40,3	5,48	Name:"Similar to Os09g0509200 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-2, mitochondrial (Oryza sativa subsp. japonica OX=3702)"	0,50	0,028
1540331562	65,6	8,07	chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase 3 [Hordeum vulgare]	0,25	0,018
			Nitrogen assimilation		
326491991	21,9	9,33	Name:"Similar to GLB Nitrogen regulatory protein P-II homolog (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,37	0,027
			Unknown function		
326527177	36	7,9	Name:"Similar to ptges2 Prostaglandin E synthase 2 (Danio rerio OX=7955)"	0,42	0,00
326513512	20	5,48	Name:"Similar to lsm12a Protein LSM12 homolog A (Danio rerio OX=7955)"	0,56	0,030
326531266	73,5	4,75	Name:"Similar to PATL5 Patellin-5 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,49	0,022
326494708	60,6	6,55	Name:"Similar to Ncln Nicalin (Mus musculus OX=10090)"	Unique in B	NA
326504618	49,4	5,8	Name:"Similar to Acy1 Aminoacylase-1 (Mus musculus OX=10090)"	Unique in B	NA
326499686	33,8	5,57	Name:"Similar to Dml 2,3-dimethylmalate lyase (Eubacterium barkeri OX=1528)"	3,29	0,00
326519400	39,3	5,85	Name:"Similar to RGG B RGG repeats nuclear RNA binding protein B (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	3,98	0,00

Tab. 3 Zoznam diferenciálne regulovaných proteínov v divom type jačmeňa po ovplyvnení flagelínom 22

Dat. číslo	Mr (kDa)	pl	Popis proteínu	Fold change	p-value
Metabolism					
326512666	15.4	5.3	Name:"Similar to Os05g0108800 Cytochrome b5 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	1,86	0,004
326496747	37.2	5.6	Name:"Similar to AKR1 Probable aldo-keto reductase 1 (Glycine max OX=3847)"	3,54	0,008
326510533	54.3	6.07	Name:"Similar to Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1 (Malus domestica OX=3750)"	2,33	0,036
326533446	32.4	7.77	Name:"Similar to GLY3 Persulfide dioxygenase ETHE1 homolog, mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,49	0,040
21396683	31.3	5.01	3-phosphoglycerate kinase, partial [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	2,95	0,031
400177396	68.7	5.44	sucrose:fructan 6-fructosyltransferase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	0,64	0,006
326513012	46.3	6.3	Name:"Similar to tal1 Transaldolase 1 (Streptomyces avermitilis)	0,60	0,036
326502492	112.8	6.3	Name:"Similar to At3g26720 Alpha-mannosidase At3g26720 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,82	0,036
326531082	55.6	8.68	Name:"Sii 89.10891089108911	0,15	0,009
Protein degradation and processing					
1706082	55.9	5.64	RecName: F RecName: Full=Serine carboxypeptidase II-3 chain	2,18	0,041
300568842	31.2	5.31	Name:"Similar to PAF1 Proteasome subunit alpha type-1 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	2,76	0,020
326512622	88.2	6.01	Name:"Similar to OOP Organellar oligopeptidase A, chloroplastic/mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,44	0,039
326527513	45.7	6.07	Name:"Sii 95.1219512195122	0,22	0,029
Abiotic stress response					
296510307	28.6	7.96	Name:"Similar to Pyrroline-5-carboxylate reductase (Glycine max OX=3847)"	2,27	0,031
326498675	27.3	5.12	Name:"Sii 76.0	0,28	0,054
326530940	28.1	5.85	Name:"Sii 98.79518072289157	0,44	0,040
115334277	30.4	7.83	aquaporin [Hordeum vulgare]	0,32	0,034
Transport, targeting					
326491175	77.6	7.11	Name:"Similar to ABCF4 ABC transporter F family member 4 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,47	0,028
23304413	20.7	6.95	ADP-ribosylation factor 1-like protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	0,45	0,047
326494030	28.7	9.8	Name:"Sii 87.07224334600761	0,33	0,024
Translation					
326498985	16.8	10.67	Name:"Sii 97.31543624161074	Unique in mo	NA
326493824	31.9	4.64	Name:"Similar to CP31A 31 kDa ribonucleoprotein, chloroplastic (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,75	0,043
326531610	57.6	8.56	Name:"Similar to EIF4B Eukaryotic translation initiation factor 4B1 (Triticum aestivum OX=4565)"	Unique in A	NA
326533694	41.4	8.5	Name:"Similar to EFTS Elongation factor Ts, mitochondrial (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	2,50	0,031
227304506	29.9	10.15	Name:"Similar to RPS4 40S ribosomal protein S4 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,65	0,023
326514788	31.3	7.03	Name:"Similar to eif3g Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G (Danio rerio OX=7955)"	2,35	0,020
326516494	23.5	10.39	Name:"Sii 92.23300970873787	0,40	0,026
Protein folding					
326526175	26	6.61	Name:"Similar to CPN20 20 kDa chaperonin, chloroplastic (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,49	0,009
326518362	61.4	6.74	Name:"Sii 86.83729433272394	0,41	0,009

			Defense response		
326506982	91.7	6.48	Name:"Sir 92.79711884753901	0,43	0,046
326491407	36	7.8	Name:"Similar to PER72 Peroxidase 72 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,51	0,009
326501536	24	8.35	Name:"Similar to PER15 Peroxidase 15 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,62	0,036
194352756	51.1	5.36	papain-like cysteine proteinase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	1,52	0,013
326527541	90.1	5.29	Name:"Similar to CDC48 Cell division cycle protein 48 homolog (Glycine max OX=3847)"	1,61	0,021
326491679	83.5	5.96	Name:"Similar to BXL6 Probable beta-D-xylosidase 6 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,76	0,030
326508800	32	5.48	Name:"Similar to Chitinase 2 (Tulipa saxatilis subsp. bakeri OX=110455)"	1,88	0,024
326527975	23.1	8.65	Name:"Similar to 23 kDa jasmonate-induced protein (Hordeum vulgare OX=4513)"	2,33	0,018
14164981	23.6	7.34	thaumatin-like protein TLP7 [Hordeum vulgare]	2,43	0,019
2344818	25.2	6.83	basic pathogenesis-related protein PR5 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	2,83	0,011
15797690	25.9	8.82	Name:"Sir 85.47717842323651;	Unique Mock	NA
326528939	38.1	6.39	Name:"Similar to BTR1 Protein BTR1 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,76	0,046
			Aminoacid biosynthesis		
295415546	34.1	5.77	Name:"Similar to CYS1 Cysteine synthase (Triticum aestivum OX=4565)"	0,67	0,007
326505500	55.3	7.33	Name:"Similar to ILL1 3-isopropylmalate dehydratase large subunit, chloroplastic (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,77	0,012
326495884	49.9	8.18	Name:"Similar to AGD2 Probable LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic (Oryza sativa subsp. japonica)	0,45	0,028
			electron transport in mitochondria		
326502384	30.1	7.64	Name:"Similar to At4g02580 NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,53	0,022
326505250	33.8	9.72	Name:"Similar to ABT ADP,ATP carrier protein (Chlamydomonas reinhardtii OX=3055)"	0,64	0,028
			Chromatine organisation		
326503908	39	5.78	Name:"Similar to HIT4 Protein HEAT INTOLERANT 4 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,83	0,031
			Cytoskeleton		
326489759	66	6.55	Name:"Sir 81.44499178981937	Unique Mock	NA
			Unknown		
326508720	35.6	5.38	Name:"Similar to TCEA1 Tuliposide A-converting enzyme 1, chloroplastic (Tulipa gesneriana OX=13306)"	1,93	0,043
326491625	47.9	6.32	Name:"Similar to OST48 Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit (Oryza sativa OX=3702)"	4,14	0,005
326519400	39.3	5.85	Name:"Sir 56.25	Unique Mock	NA
326513512	20	5.48	Name:"Sir 50.609756097560975	Unique Mock	NA
257669940	18.5	7.25	Name:"Similar to BTF3 Basic transcription factor 3 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	Unique Mock	NA

Tab. 4: Zoznam diferenciálne regulovaných proteínov v koreňoch mutantnej KO *hvmpk3* línie

Dat. Číslo	Mr (kDa)	pl	Popis proteínu	Fold change	P-value
			Chromatine organisation		
326520894	23.6	10.74	Name:"Similar to Histone H1 (Triticum aestivum OX=4565)"	0,26	0,05
326517613	14	10.23	Name:"Similar to Os07g0545400 Probable histone H2A.2 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	Unique in KO	NA
326503006	42	4.46	Name:"Similar to NAP1;2 Nucleosome assembly protein 1;2 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	3,41	0,02
326514920	27.4	10.74	Name:"Similar to Histone H1 (Solanum pennellii OX=28526)"	0,50	0,00
326496411	57.5	6.95	Name:"Similar to Os11g0148500 Pyruvate kinase 1, cytosolic (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	2,84	0,00
326493278	17.1	7.34	Name:"Similar to UBC36 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 36 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,91	0,00
326525751	45.1	5.29	Name:"Similar to AT9 Acyl transferase 9 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	3,09	0,00
			Stress related		
326532030	24.9	6.21	Name:"Similar to GSTF1 Probable glutathione S-transferase GSTF1 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,61	0,03
326489251	39.9	9.14	Name:"Similar to ANN4 Annexin D4 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	Unique in KO	NA
326491825	22.6	7.91	Name:"Similar to GER4 Germin-like protein 1-1 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,29	0,01
326498153	38.6	7.34	Name:"Similar to ANN3 Annexin D3 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,40	0,01
257286412	27.6	5.25	Name:"Similar to APX2 L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,65	0,01
326533446	32.4	7.77	Name:"Similar to GLY3 Persulfide dioxygenase THE1 homolog, mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,00	0,04
15147873	54.5	6.13	betaine aldehyde dehydrogenase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	1,81	0,04
157362219	53	6.47	cytosolic glutathione reductase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	0,47	0,04
326525859	66.5	9.2	Name:"Similar to CBF5 H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,93	0,01
			Defense response		
326494252	35.1	8.78	Name:"Similar to Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GIII (Hordeum vulgare OX=4513)"	0,55	0,04
326495784	35.5	7.9	Name:"Similar to PER12 Peroxidase 12 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,59	0,04
326502418	43.1	5.66	Name:"Similar to OLE9 Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (Olea europaea OX=4146)"	Unique in KO	NA
326496709	36.7	8.06	Name:"Similar to PER12 Peroxidase 12 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,28	0,02
14164981	23.6	7.34	thaumatin-like protein TLP7 [Hordeum vulgare]	0,55	0,02
14164983	24.3	7.56	thaumatin-like protein TLP8 [Hordeum vulgare]	Unique in WT	NA
326494042	47.9	9.11	Name:"Similar to UXS4 UDP-glucuronic acid decarboxylase 4 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,32	0,02
326506728	14.5	5.81	Name:"Similar to THI2 Thionin (Brassica rapa subsp. pekinensis OX=51351)"	Unique in WT	NA
916339672	41.7	6.19	UDP-arabinose mutase 1 [Hordeum vulgare]	1,76	0,05
326529001	38.6	6.32	Name:"Similar to Sb03g046810 Cationic peroxidase SPC4 (Sorghum bicolor OX=4558)"	2,94	0,01
			Transport		
326494930	122.7	5.06	Name:"Similar to SEC31B Protein transport protein SEC31 homolog B (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,37	0,04
326507174	99.2	5.1	Name:"Similar to BETAC-AD Beta-adaptin-like protein C (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,17	0,01
326498549	45.6	5.77	Name:"Similar to TBL32 Protein trichome birefringence-like 32 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,63	0,01
			Cytoskeleton		
326495436	87.6	4.97	Name:"Similar to At5g16730 WEB family protein At5g16730, chloroplastic (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,39	0,01
			Translation		
326511136	47.3	6.46	Name:"Similar to ychF Ribosome-binding ATPase YchF (Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308)"	Unique in KO	NA
326523135	24.7	10.21	Name:"Similar to RPL6 60S ribosomal protein L6 (Mesembryanthemum crystallinum OX=3544)"	Unique in KO	NA
326497903	44.6	10.02	Name:"Similar to RPL3 60S ribosomal protein L3 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	4,12	0,05
326510499	48.8	5.39	Name:"Similar to EIF5 Eukaryotic translation initiation factor 5 (Zea mays OX=4577)"	Unique in KO	NA
1710521	18.4	10.64	RecName: Full=60S ribosomal protein L24	2,37	0,02
326526261	19	10.26	Name:"Similar to HMGY2 HMG-Y-related protein A (Zea mays OX=4577)"	0,49	0,04

			Protein folding		
326499406	71.2	5.21	Name:"Similar to HSP70 Heat shock cognate 70 kDa protein (Petunia hybrida OX=4102)"	0,51	0,03
326523461	22.8	5.27	Name:"Similar to AHS2 Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 2 (Bos taurus OX=9913)"	Unique in KO	NA
			Protein degradation		
326528657	44.8	5.29	Name:"Similar to Os01g0377700 NPL4-like protein (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	Unique in KO	NA
			Aminoacid biosynthesis		
			metabolism		
326506682	49	7.49	Name:"Similar to At5g10770 Aspartyl protease family protein At5g10770 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,60	0,00
506383	49.5	6.86	glutamate 1-semialdehyde aminotransferase [Hordeum vulgare]	0,23	0,00
296520443	33.2	9.1	Name:"Similar to gbkr1 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase 1, chloroplastic (Brassica napus OX=3708)"	0,41	0,00
326506572	39.7	7.2	Name:"Similar to IDH5 Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5, mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,91	0,01
326519012	42.6	7.03	Name:"Similar to GDPD6 Glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPD6 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,89	0,01
326525020	60.6	5.95	Name:"Similar to ALAAT2 Alanine aminotransferase 2, mitochondrial (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,39	0,01
417356961	38.8	6.06	glutamine synthetase isoform GS1_2 [Hordeum vulgare]	0,56	0,05
326534286	86.6	9.07	Name:"Similar to ACX1 Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	Unique in WT	NA
326506738	30.7	7.53	Name:"Similar to FOLD2 Bifunctional protein FOLD 2 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	6,20	0,00
14522834	23.4	5.39	IDI1 [Hordeum vulgare]	0,29	0,01
326520716	42.7	7.74	Name:"Similar to GAPCP2 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPCP2, chloroplastic (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,57	0,01
326502492	112.8	6.3	Name:"Similar to AT3g26720 Alpha-mannosidase At3g26720 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	1,69	0,05
326508098	27	5.12	Name:"Similar to IP11 Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase I (Camptotheca acuminata OX=16922)"	0,57	0,05
326511281	53.8	6.18	Name:"Similar to ALDH2C4 Aldehyde dehydrogenase family 2 member C4 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	4,67	0,04
326494248	42.8	5.49	Name:"Similar to tal Transaldolase (Haemophilus somnus (strain 129Pt) OX=205914)"	1,88	0,04
326487968	40.8	6.61	Name:"Similar to NCS1 S-norcochlorine synthase 1 (Coptis japonica OX=3442)"	0,56	0,04
543200379	93.9	7.58	cytosolic phosphorylase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	1,85	0,02
326516846	44.5	6.71	Name:"Similar to GDH2 Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,55	0,03
326533014	54.2	7.2	Name:"Similar to DAHPS2 Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 2, chloroplastic (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,63	0,03
326513012	46.3	6.3	Name:"Similar to tal1 Transaldolase 1 (Streptomyces avermitilis (strain ATCC 31267 / DSM 46492 / JCM 5070 / FERM 5407) OX=10090)"	0,49	0,03
326500906	58.6	8.7	Name:"Similar to 4CLL4 4-coumarate--CoA ligase-like 4 (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	2,39	0,03
400177396	68.7	5.44	sucrose:fructan 6-fructosyltransferase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	1,52	0,03
326523589	107.3	7.24	Name:"Similar to Os08g0191100 Putative aconitate hydratase, cytoplasmic (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,58	0,03
18978	36.5	7.18	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Hordeum vulgare]	1,74	0,03
326492251	39.1	5.48	Name:"Similar to Glutamine synthetase (Hordeum vulgare OX=4513)"	1,73	0,02
326511126	47.9	7.96	Name:"Similar to PED1 3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	0,66	0,02
326490133	22	6.05	Name:"Similar to CARB Carbamoyl-phosphate synthase large chain, chloroplastic (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,34	0,02
326514326	41.3	9.07	Name:"Similar to PAT1 Anthranilate phosphoribosyltransferase, chloroplastic (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,10	0,02
326496663	33.5	8.7	Name:"Similar to ywbO Uncharacterized protein YwbO (Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308)"	2,03	0,02
209405432	63	5.83	NADP-dependent malic enzyme [Hordeum vulgare]	0,50	0,02
326504620	21.9	9.45	Name:"Similar to DUT Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (Oryza sativa subsp. japonica OX=39947)"	0,35	0,01
			Unknown		
326517577	15.3	5.12	Name:"Similar to At5g01610 Uncharacterized protein At5g01610 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	Unique in WT	NA
218401700	42.9	6.8	Name:"Similar to Myg1 UPF0160 protein MYG1, mitochondrial (Mus musculus OX=10090)"	Unique in KO	NA
326492075	14.6	5.06	Name:"Similar to At2g34160 Uncharacterized protein At2g34160 (Arabidopsis thaliana OX=3702)"	2,72	0,01