

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Michaela Rajnohová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv stresu na tvorbu reaktivních forem kyslíku
a dusíku u mikroorganismů**

Bakalářská práce

Michaela Rajnohová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím zdrojů a materiálů uvedených v seznamu citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Michaela Rajnová

Souhrn

Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) u rostlin vznikají i za fyziologických procesů, při vystavení organismu stresovým faktorům pak jejich koncentrace narůstá - podílejí se na signalizaci, obranných reakcích a programované smrti buňky. Tato bakalářská práce se zaměřila na detekci RONS, především singletního kyslíku a oxidu dusnatého, při oxidačním poškození buněk fotosyntetizujících mikroorganismů v důsledku abiotického stresu (působení chladu a těžkého kovu - kadmia). Jednotlivé RONS byly po aplikaci specifických fluorochromů v buňkách lokalizovány laserovou konfokální skenovací mikroskopií, tvorba singletního kyslíku byla kvantifikována elektronovou paramagnetickou rezonanční spektroskopií.

Chlamydomonas reinhardtii patří mezi jednobuněčné zelené řasy s vysokou schopností adaptace. Roste v mnoha různých prostředích na celém světě. Buňky obvykle získávají energii fotosyntézou a uhlík z oxidu uhličitého, avšak mohou využívat i organický zdroj uhlíku, což jim umožňuje růst ve tmě. Přizpůsobivost a rychlá generační doba byly hlavními důvody toho, že se *Ch. reinhardtii* stala důležitým modelovým organismem v biologickém výzkumu. V rámci této práce byly studovány tři kmeny *Ch. reinhardtii* (původní „divoký“ kmen a dva kmeny mutantní). Působení kadmia vyvolalo vyšší produkci reaktivních forem kyslíku a dusíku než působení chladového šoku. Nepatrné rozdíly byly i v produkci reaktivních forem mezi jednotlivými kmeny, přičemž mutantní kmeny vykazovaly vyšší citlivost k daným stresovým faktorům než kmen divoký.

Summary

Reactive oxygen and nitrogen species (RONS) are also produced in physiological processes although their concentration increases when plant is exposed to stress factors. They participate in signaling, defense reactions and in programmed cell death. This thesis deals with the detection of RONS especially with detection of singlet oxygen and nitric oxide in oxidative cell damage of photosynthetic microorganisms due to abiotic stress (exposure to cold and heavy metal-cadmium). The RONS in cells were localized by laser confocal scanning microscopy after application of specific fluorochrome, production of singlet oxygen was quantified by electron paramagnetic resonance spectroscopy.

Chlamydomonas reinhardtii is the unicellular green algae with a high capacity of adaptation. It grows in many different environments throughout the world. The cells usually use energy by photosynthesis and from carbon dioxide but they can also use an organic carbon source which allows them to grow in the dark. Their flexibility and quick generation time were the main reason why *Chlamydomonas reinhardtii* has become an important model organism in biological research. Three strains of *Ch. reinhardtii* (the original wild strain and two mutant strains) were studied in this thesis. The exposure to cadmium led to higher formation of reactive oxygen and nitrogen species than the effect of cold shock. There were slight differences between various types when mutant strains exhibited higher sensitivity to the given stress factors than the wild-type.

Tato bakalářská práce byla řešena na Katedře botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci s podporou interních grantů UP IGA_PrF_2014001 a IGA_PrF_2015-001.

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za její trpělivost, ochotu a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Zejména děkuji za její odbornou pomoc a čas strávený během zpracování experimentální části.

Dále děkuji paní Drahomíře Vondrákové, laborantce Katedry botaniky PřF UP, která mi vždy ochotně pomáhala s autoklávováním kultivačních médií, a kolektivu oddělení algologie za poskytnutí zásobních roztoků k jejich přípravě. Také bych chtěla poděkovat panu doc. RNDr. Pavlu Pospíšilovi, Ph.D. za umožnění použití EPR spektrometru na Katedře biofyziky PřF UP.

V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat své rodině, za jejich psychickou i morální podporu.

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE	7
2	ÚVOD	8
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
3.1	Charakteristika modelových organismů	9
3.1.1	Sinice	9
3.1.2	Zelené řasy	11
3.2	Význam, funkce a metabolismus RONS	14
3.2.1	ROS	14
3.2.2	RNS	16
3.2.3	Oxidační stres	17
3.3	Stresové faktory	19
3.3.1	Abiotický stres	21
3.3.2	Biotický stres	23
3.4	Metody studia RONS	24
3.4.1	Histochemické značení	24
3.4.2	Mikroskopické metody	28
3.4.3	EPR spektroskopie	31
4	MATERIÁL A METODY	33
4.1	Biologický materiál	33
4.2	Kultivace řas a sinic	34
4.3	Aplikace stresu	36
4.4	Histochemická lokalizace RONS konfokální mikroskopií, obrazová analýza	36
4.5	Měření tvorby $^1\text{O}_2$ pomocí EPR	37
5	VÝSLEDKY	38
5.1	Kultivace řas – vyhodnocení dynamiky růstu jednotlivých kmenů	38
5.2	Histochemická detekce RONS konfokální laserovou mikroskopií	38
5.2.1	Detekce NO pomocí DAF-FM DA u kmenů <i>Ch. reinhardtii</i>	38
5.2.2	Detekce ROS pomocí c-H ₂ DCF DA u kmenů <i>Ch. reinhardtii</i>	42
5.2.3	Detekce $^1\text{O}_2$ pomocí SOSG u kmenů <i>Ch. reinhardtii</i>	46
5.3	Kvantifikace tvorby $^1\text{O}_2$ pomocí EPR spektroskopie	50
6	DISKUSE	51
7	ZÁVĚR	54
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
9	SEZNAM ZKRATEK	62
10	PŘÍLOHY	63

1 CÍLE PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce bylo stanovení produkce a lokalizace reaktivních forem kyslíku a dusíku u autotrofních mikroorganismů, konkrétně u vybraných druhů sinic a řas.

V teoretické části bylo mým úkolem zpracovat literární rešerši k dané problematice vlivu stresu na tvorbu reaktivních forem kyslíku a dusíku u mikroorganismů, dále pak zpracovat obecnou charakteristiku modelových řas, sinic a faktorů vyvolávajících u těchto organismů stres s následnou produkcí RONS.

V experimentální části bylo mým úkolem naučit se připravovat kultivační média, kultivovat fotosyntetizující mikroorganismy na tuhém a v tekutém médiu, a následně tyto modelové organismy vybranými faktory stresovat. Hlavním cílem pak bylo RONS, produkované v závislosti na typu stresu, detekovat pomocí histochemické lokalizace za použití konfokální laserové skenovací mikroskopie a intenzitu signálu vyhodnotit obrazovou analýzou. Singletní kyslík u stresovaných buněk byl kvantifikován pomocí EPR spektroskopie.

2 ÚVOD

Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) jsou za běžných podmínek vedlejšími produkty metabolismu buněk. V případě vystavení buňky stresovým podmínkám dochází k porušení rovnováhy mezi tvorbou a odbouráváním RONS, čímž nastává oxidační stres. RONS mohou velmi rychle degradovat pigmenty, proteiny, lipidy a nukleové kyseliny. Inaktivují enzymy, poškozují buněčné organely a narušují membrány, což v konečném důsledku může vést i k buněčné smrti. V nízkých koncentracích RONS slouží jako signální molekuly v klíčových metabolických drahách nebo jako sekundární posli v mezibuněčné komunikaci, především v průběhu stresové reakce.

Mezi nejdůležitější reaktivní formy kyslíku, kromě peroxidu vodíku, patří singletní kyslík, jehož tvorba byla u rostlin dosud spojována především s procesy fotosyntézy. Produkce singletního kyslíku u *Chlamydomonas reinhardtii* byla dosud studována při nadměrném osvětlení. Ve své bakalářské práci jsem se věnovala vlivu dalších abiotických faktorů na buněčné kultury této řasy - chladového šoku a kadmia (těžkého kovu). Působení těžkých kovů na tvorbu RONS byl dosud studován především u vyšších rostlin a jejich protoplastových kultur. Prvotní myšlenkou bylo srovnání stresových reakcí u zelených řas s další skupinou fotosyntetizujících mikroorganismů, a to cyanobakterií. Během mikroskopických experimentů se však živé buňky sinic neosvědčily jako vhodné objekty pro pozorování (malé rozměry a poměrně rychlý pohyb).

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Charakteristika modelových organismů

3.1.1 Sinice

Na celém světě existuje kolem 2 000 druhů sinic. Taxonomicky se sinice řadí do domény Prokaryota, říše Bacteria a oddělení Cyanobacteria (Kalina *et* Váňa, 2005). Jedná se o organismy, které se vyznačují jednobuněčnou a vláknitou stélkou, přičemž neprochází žádnými bičíkatými stádii. Charakteristickým rysem sinic je přítomnost fotosyntetických barviv, a to chlorofylu *a* a přídatných barviv, do kterých patří tzv. fykobiliny, konkrétně se jedná o fykocyanin a fykoerytrin, které u sinic způsobují modrozelené zbarvení.

Na povrchu buněk těchto organismů je plazmatická membrána, čtyřvrstevná buněčná stěna a slizové pouzdro. Zajímavostí je, že sinice jsou vybaveny tzv. aerotopy, které jim umožňují vznášet se ve vodě, vyplouvat na hladinu a zase se ponořovat. Jedná se o plynové váčky, které jsou u sinic jedinou buněčnou strukturou obsahující plyn. Další zajímavou strukturou jsou buňky specializované pro vazbu vzdušného dusíku, tzv. heterocysty, které v anaerobních podmínkách nitrogenasou syntetizují amonné sloučeniny a uvolňují je do okolního prostředí, kde jsou využitelné dalšími organismy. Nitrogenasa je aktivována pouze při nedostatku kyslíku.

Dále je důležité se zmínit o tom, jak se sinice pohybují. U sinic se jedná o tzv. fototaktické pohyby, které jsou závislé na intenzitě světla. Avšak u některých sinic např. u řádu Oscillatoriales existuje pohyb, který je spojen s tvorbou slizu, ale za samotným pohybem stojí shluky kontraktilních filament a tento pohyb může být buď klouzavý či rotační.

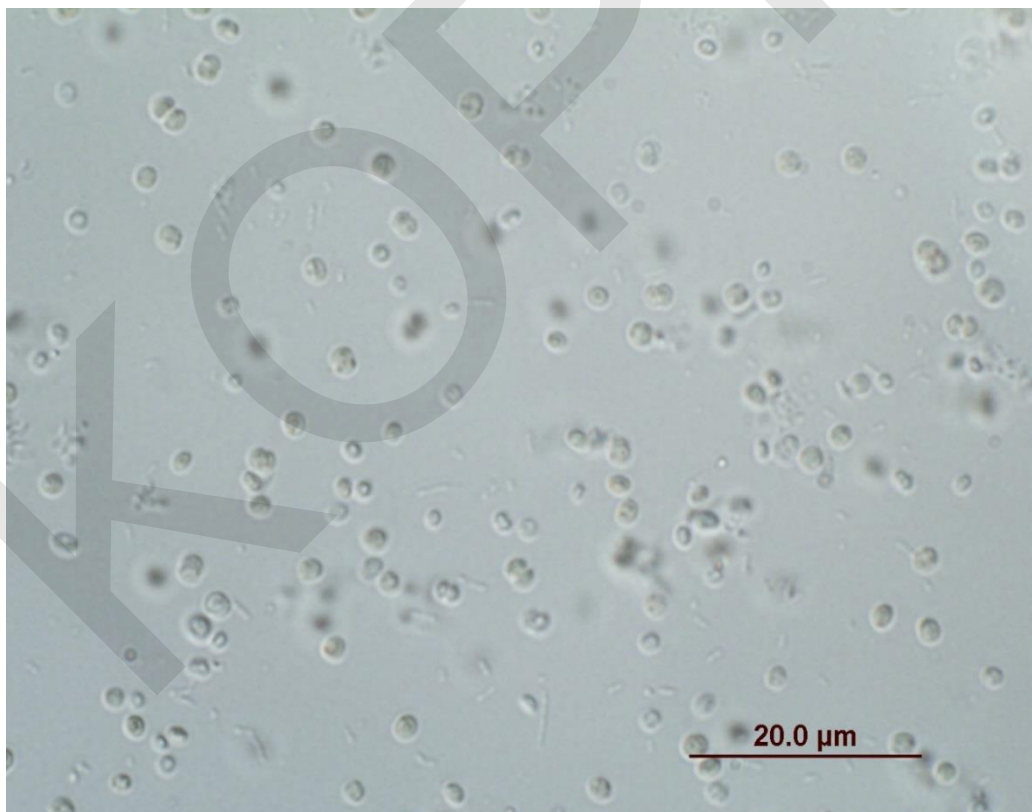
Sinice se rozmnožují zejména nepohlavním buněčným dělením, při kterém se od okrajů ke středu buňky začne vchlipovat plazmatická membrána a nakonec i buněčná stěna. Následně probíhá odškrcování jednotlivých buněk - exocytů, kousků vláken tzv. hormogonií, a v neposlední řadě i odškrcování trvalých buněk neboli akinet. „Pohlavní“ procesy jako je rekombinace a transformace byly prokázány teprve nedávno, zatím pouze u jednobuněčných druhů. Průběh genové rekombinace u sinic je velmi podobný rekombinaci u bakterií. Během transformace je do recipientní buňky inkorporována plazmidová DNA a následně transponována do DNA nukleoidu. Proces transformace byl prokázán v laboratorních podmínkách, ale je zřejmé, že probíhá i v přírodě, což by vysvětlovalo morfologickou a fyziologickou variabilitu sinic.

V přírodě se sinice vyskytují zejména ve vodním prostředí, ve kterém jsou důležitou součástí vodního planktonu. Dále je můžeme nalézt také v půdě, v oblastech s extrémními podmínkami (teplotou, salinitou, pH), a dokonce i v pouštních či polárních oblastech.

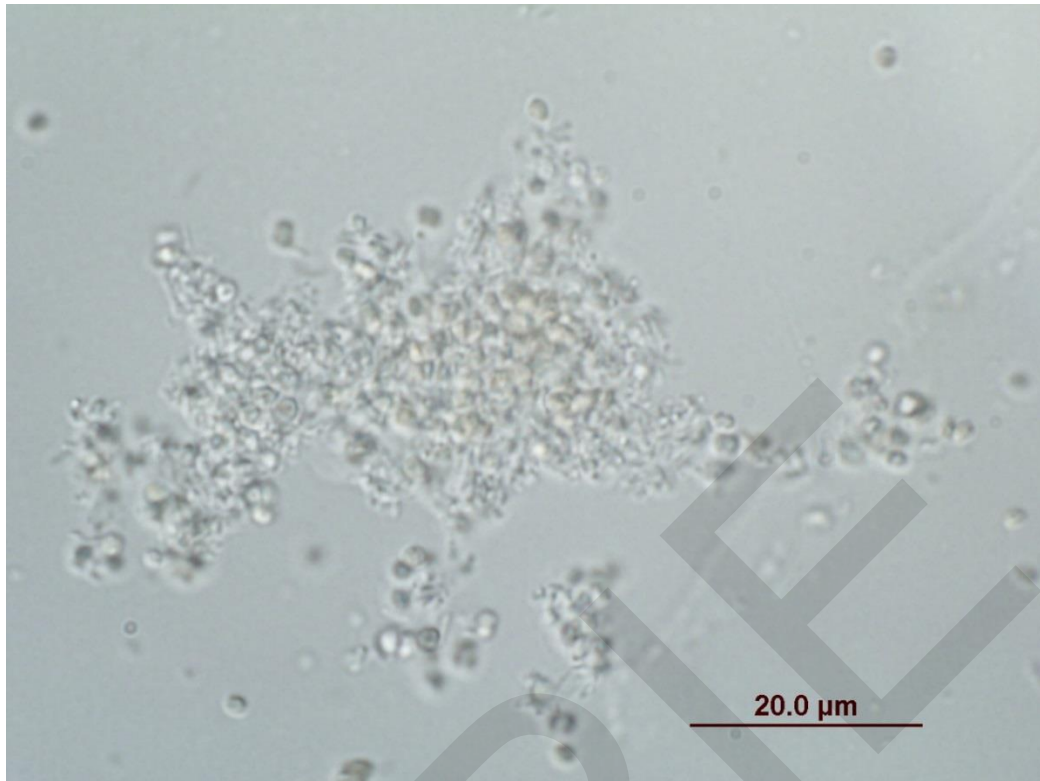
V důsledku eutrofizace vod tvoří sinice v letním období tzv. vodní květ a v případě, že je ve vodě široce rozptýlen, znamená to, že tato voda není vhodná k rekreaci, jelikož sinice při přemnožení uvolňují toxiny a alergeny, které stojí za mnoha zdravotními potížemi. První paleontologické nálezy sinic pochází z doby před 3,2 miliardami let a je důležité zmínit také to, že s vývojem sinic souvisí též vznik kyslíkové atmosféry (Pouličková *et* Jurčák, 2001; Kalina *et* Váňa, 2005).

3.1.1.1 RODY SYNECHOCOCCUS A SYNECHOCYSTIS

Sinice rodů *Synechococcus* a *Synechocystis* jsou řazeny do třídy Cyanophyceae a řádu Chroococcales (Komárek *et* Hauer, 2014). Buňky zástupců rodů *Synechococcus* a *Synechocystis* jsou solitérní, kulovité (viz Obr. 1 a 2) nebo tyčinkovité a bez slizového pouzdra, typického pro ostatní zástupce sinic (Kalina *et* Váňa, 2005).



Obr. 1: Jednotlivé buňky sinic rodu *Synechococcus endogloeicus* (zvětšení 1000x).



Obr. 2: Shluk buněk sinic rodu *Synechocystis* NEXON WT (zvětšení 1000x).

3.1.2 Zelené řasy

Zelené řasy jsou skupinou organismů, které se taxonomicky řadí do domény Eukarya, říše Plantae a oddělení Chlorophyta (Kalina *et* Váňa, 2005). Buňky zelených řas obsahují chloroplasty, které jsou vybaveny sadou biochemicky a funkčně odlišných fotosyntetických pigmentů, z nichž nejdůležitější roli hraje chlorofyl. Chlorofyl je zelené barvivo, které se v tylakoidech chloroplastů řas vyskytuje ve čtyřech formách - chlorofyl *a*, *b*, *c* a *d*. Hlavním fotosyntetickým pigmentem zelenivek a vyšších rostlin je chlorofyl *a*. Dalšími jsou pigmenty červenooranžové nebo žluté barvy, zejména karotenoidy a xantofyly.

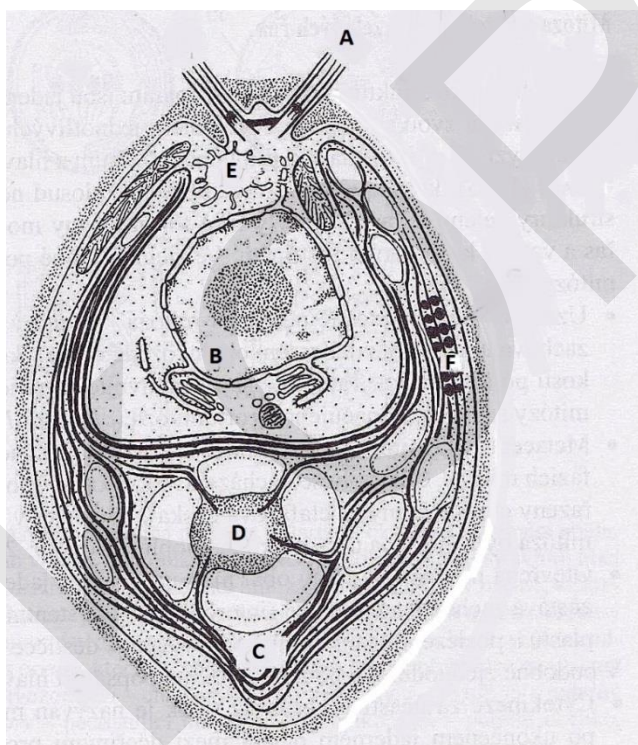
Řasy můžeme nalézt téměř ve všech prostředích, zejména však ve vodním prostředí, ať už v tekoucích či stojatých vodách, v půdě, na kůře stromů, a dokonce i na sněhu či ledu. V přírodě mají důležitý význam jako primární producenti organické hmoty, na jejichž aktivitě závisí řetězce sekundárních producentů, konzumentů i destruentů organické hmoty (Kalina *et* Váňa, 2005).

Řasy je možné využívat jako potravu, krmivo či zdroj agaru. Některé sladkovodní řasy se také využívají k produkci potravin, vitamínových preparátů a potravinových doplňků s minerálními látkami (Pouličková *et* Jurčák, 2001).

3.1.2.1 ROD CHLAMYDOMONAS

Řasy rodu *Chlamydomonas* řadíme do třídy Chlorophyceae (= zelenivky), řádu Chlamydomonadales (Kalina *et* Váňa, 2005). Pro experimentální práci byl vybrán druh *Chlamydomonas reinhardtii*, který popsal v roce 1888 P. A. Dangeard a pojmenoval jej po ukrajinském botanikovi Ludwigu Reinhard(t)ovi (Harris, 2009).

Zástupci rodu *Chlamydomonas* jsou solitérní bičíkovci s obnaženou či oblaněnou buňkou (chlamys). V přední části buňky jsou zakotveny 2 bičíky, vyrůstající z tzv. kinetozomů (bazální tělíska). Tyto bičíky, určené k pohybu buňky, vystupují otvory v buněčné stěně, která se skládá z glykoproteinů obsahujících zejména hydroxyprolin. V případě r. *Chlamydomonas* je buněčná stěna na předním konci zesílená, což tvoří tzv. papilu. Pro jednotlivé druhy je charakteristický tvar buňky - kapkovitý, kulovitý, někdy s hvězdicovitou strukturou v oblasti bičíků. V tomto místě se v případě stresu nebo při rozmnožování bičíky odlomí. Stavba buňky je znázorněna na Obr. 3.



- A. bičík
- B. jádro
- C. chloroplast
- D. pyrenoid
- E. pulzující vakuola
- F. stigma

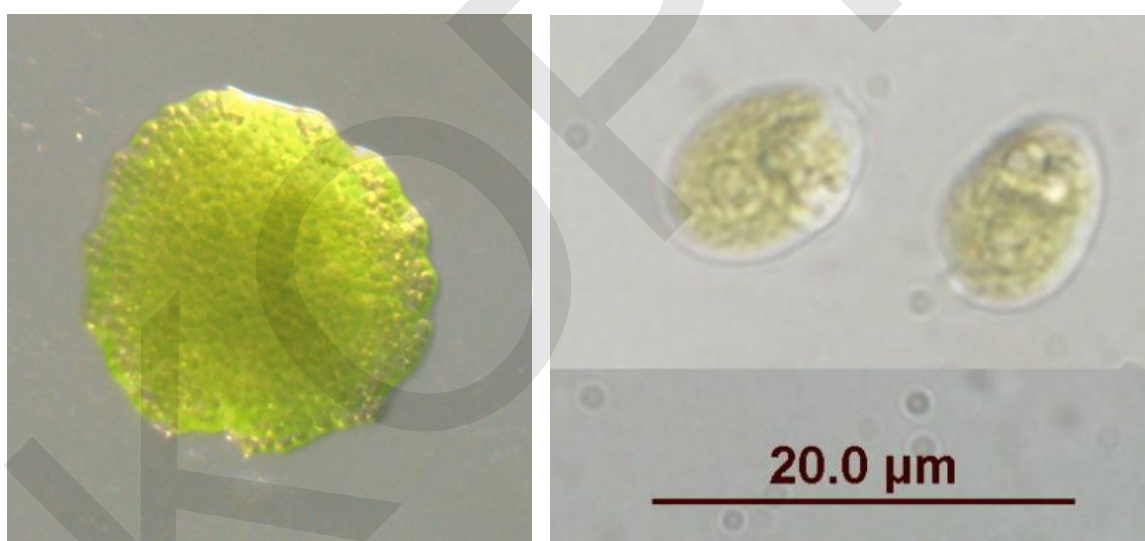
Obr. 3: Submikroskopická stavba buňky *Chlamydomonas* (Kalina *et* Váňa, 2005).

Buňky r. *Chlamydomonas* jsou vybaveny dvěma pulzujícími vakuolami, které se opakovaně naplňují a uvolňují, čímž regulují osmotický tlak uvnitř buňky v hypotonickém vodním prostředí. Většinu obsahu buňky vyplňuje velký chloroplast, jehož součástí je stigma a pyrenoid, na jehož povrchu jsou škrobová zrna.

Jádro zelených řas (zelenivek) je kulovitěho tvaru, s jadérkem a je obklopeno několika diktyozomy a mitochondriemi. V jádře probíhá tzv. uzavřená mitóza a ve fázi cytokineze vzniká fykoplást a septum, díky kterému se separují dceřiné protoplasty. Ve většině případů mají zelenivky stélku buněčnou nebo vláknitou a tvoří tzv. cenobia (několikabuněčný celek, tvořený haploidními buňkami jedné generace). V buněčné stěně mají zabudovaný odolný sporopolenin, který zvyšuje odolnost proti chemickému i mechanickému stresu, a především chrání buňky proti UV záření (Kalina *et* Váňa, 2005).

Řasy rodu *Chlamydomonas* (viz Obr. 4) se nejčastěji rozmnožují nepohlavně - neoblaněné druhy se dělí podélně tzv. schizotomií, zatímco u oblaněných druhů probíhá dělení buněk uvnitř buněčné stěny tzv. schizogonií. Po každém nepohlavním dělení je pomocí enzymů zvaných autolyziny odbourána buněčná stěna, čímž se dceřiné buňky rozdělí.

Pohlavní proces (izogamie, anizogamie či oogamie) probíhá u chlamydomonád pouze vzácně za vhodných podmínek (Kalina *et* Váňa, 2005).



Obr. 4: Kolonie buněk *Chlamydomonas reinhardtii* na agaru (vlevo) a detail buněk (vpravo).

Řasy mohou využívat zdroj uhlíku třemi způsoby. Fototrofní nebo fotoautotrofní růst řas zahrnuje asimilaci CO₂ při fotosyntéze, který je zde hlavním zdrojem uhlíku. Dále pak se může jednat o růst heterotrofní, kdy řasy (i *Chlamydomonas*) využívají jako zdroj uhlíku acetát. Třetím případem je růst mixotrofní, přičemž kultury rostou za světelných podmínek, probíhá tedy fotosyntéza a využívají CO₂, ale zároveň využívají také acetát obsažený v médiu.

V laboratorních podmínkách můžeme *Chlamydomonas* kultivovat v tekutém médiu nebo na agaru s obsahem minerálních solí. Nejpoužívanějším anorganickým médiem je tzv. BBM médium, z organických je to TAP médium (Harris, 2009).

3.2 Význam, funkce a metabolismus RONS

3.2.1 ROS

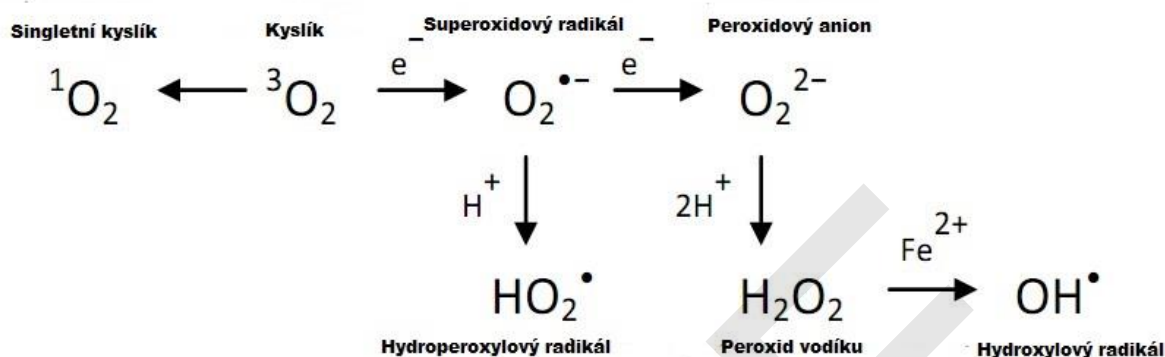
Reaktivní formy kyslíku („reactive oxygen species“, ROS) jsou v rostlinách tvořeny kontinuálně jako vedlejší produkty aerobního metabolismu. Některé molekuly řazené mezi ROS mohou být vysoce toxické, i když jsou rychle detoxikovány mnoha buněčnými enzymovými a neenzymovými mechanismy.

V případě nadměrného osvětlení využije rostlina pouze část světelné energie potřebné k pokrytí metabolických procesů. Nevyužitá energie je spotřebována při redukci fotosyntetických elektron-transportních molekul, konkrétně kyslík je fotoredukován přes fotosystém I a fotosystém II, čímž dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku (Asada, 1999). Fotosystém I je ovlivňován produkcí ROS a nemůže dostatečně rozptýlit přijatou přebytečnou energii, což vede k tvorbě tripletních stavů ve fotosystému II, vedoucích k tvorbě singletního kyslíku, který poškozuje reakční centra tohoto fotosystému (Hideg *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2012).

V malých koncentracích se ROS podílejí na signalizaci v rámci buňky/mezi sousedními buňkami, v nadbytku jsou však toxické. Díky ROS jsou rostliny schopny ovládat různé procesy související s ontogenezí (klíčení, růst, kvetení, tvorba plodů, pohyby průduchů) a stresem (biotického i abiotického původu) (Apel *et Hirt*, 2004). Na druhé straně většina makromolekul (nukleové kyseliny, proteiny, lipidy, pigmenty) bývá reakcemi s ROS oxidačně poškozeno, což zpravidla vede k buněčné smrti (Asada, 2006). K ochraně proti toxickým ROS si rostliny vytvořily spektrum obranných systémů, zahrnující enzymy a molekuly antioxidantů (Asada, 1999).

Jak bylo zmíněno, vznik ROS u sinic, řas, rostlin, ale i živočichů je spojen s různými výkyvy biotických a abiotických faktorů prostředí.

Extrémně reaktivní formy kyslíku, konkrétně superoxidový anionový radikál ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál ($HO\cdot$) a singletní kyslík (1O_2), byly detekovány v podmínkách *in vivo* i *in vitro*. Přehled ROS je zobrazen na Obr. 5.



Obr. 5: Přehled a přeměna jednotlivých reaktivních forem kyslíku (Gill *et Tuteja*, 2010).

Peroxid vodíku a superoxid byly v posledních letech nejvíce studovány a byly považovány za hlavní ROS v biologii, avšak v buňce je superoxid velmi rychle přeměněn na peroxid vodíku, který je nejstabilnější reaktivní formou kyslíku v buňce. H_2O_2 byl poprvé izolován v roce 1818 Thénardem a velmi rychle se zjistilo, že vysoká koncentrace H_2O_2 v buňce má za následek poškození klíčových molekul jako je DNA a lipidy (Plaine, 1955).

Donedávna byl peroxid vodíku považován za toxický buněčný metabolit, ale dnes je zřejmé, že má ještě důležitější funkci jako signální molekula, která zprostředkovává odpovědi na různé podněty v rostlinných i živočišných buňkách a komunikaci mezi nimi (Neill *et al.*, 2002). Peroxid vodíku interaguje s proteiny obsahující $-SH$ skupinu a aktivují odlišné signální dráhy, stejně jako je tomu u transkripčních faktorů, které regulují expresi genů a buněčný cyklus (Slesak *et al.*, 2007). Peroxid vodíku je relativně trvanlivá molekula, jejíž poločas rozpadu je 1 ms. Jelikož se jedná o elektricky neutrální molekulu, může volně difundovat přes membrány do míst vzdálených od místa jeho vzniku. Může tak inaktivovat enzymy oxidací jejich thiolové skupiny, například enzymy Calvinova cyklu či superoxidodismutasy (Charles *et Halliwell*, 1980; Bowler *et al.*, 1994).

Velmi reaktivní formou je také singletní kyslík, který může být produkován reakcí kyslíku s fotonem excitovaným chlorofylem. Nedostatečný odvod přebytečné energie, která se vytvořila během fotosyntézy, může vést k tvorbě chlorofylu v tripletním stavu. Tento stav je velice reaktivní a takto excitovaný chlorofyl může reagovat s 3O_2 za vzniku 1O_2 (Buchert *et Forreiter*, 2010). Tvorba 1O_2 má negativní dopad na fotosystém I, fotosystém II

a další části fotosyntetického aparátu (Hatz *et al.*, 2007). Experimenty dokázaly, že $^1\text{O}_2$ může v organismu difundovat až několik stovek nm, reagovat s nukleovými kyselinami, proteiny, lipidy i pigmenty (Krieger-Liszkay *et al.*, 2008; Prasad *et Pospíšil*, 2013).

Singletní kyslík, který je v buňkách produkován jako odpověď na fotooxidační stres či poranění, je možné detekovat pomocí SOSG („singlet oxygen sensor green“). Tento fluorochrom je využíván v mnoha biologických systémech (Flors *et al.*, 2006; Rác *et al.*, 2015; Sinha *et al.*, 2012). V *Chlamydomonas reinhardtii* je singletní kyslík hlavní formou ROS produkovanou při fotooxidačním stresu z nadměrné intenzity osvětlení (Triantaphylidès *et al.*, 2008; Triantaphylidès *et Havaux*, 2009). Navíc singletní kyslík produkovaný v reakčním centru fotosystému II je schopen stimulovat transkripci genu, který kóduje glutathionperoxidasu (GPXH) - enzym, obsahující selen a významně se podílející na obraně proti oxidačnímu stresu, jehož hlavní funkcí je katalýza degradace H_2O_2 (Fisher *et al.*, 2006; Ledford *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2007).

Singletní kyslík rychle oxiduje molekuly obsahující dvojně vazby mezi uhlíky za vzniku hydroperoxidů nebo endoperoxidů. V proteinech $^1\text{O}_2$ specificky oxiduje aminokyseliny jako je cystein, histidin, methionin, tryptofanové deriváty a vyvolává peroxidaci membránových lipidů (Halliwell *et Gutteridge*, 1999).

3.2.2 RNS

Mezi reaktivní formy dusíku patří zejména oxid dusnatý a jeho vyšší oxidy, které hrají důležitou roli při signalizaci v mnoha životních procesech (Ignarro, 2000). Původně bylo velmi složité objasnit, které funkce jednotlivé RNS vykonávají, jelikož nebylo možné je spolehlivě detekovat za biologických podmínek. Nyní však jsou k dispozici fluorescenční sondy, které jsou specifické k daným dusíkatým molekulám (deriváty fluoresceinu, komplexy s kovy).

Reaktivní formy dusíku jsou odvozeny od základního oxidu dusnatého. Může se jednat o oxidy jako NO_2 a N_2O_3 a mezi RNS patří také peroxydusitan a jeho deriváty. Peroxydusitan je produktem velmi rychlé reakce mezi NO a superoxidovým O_2^- radikálem, který funguje jako oxidační a nitrační činidlo schopné procházet biologickými membránami. Cílovým místem peroxydusitanu jsou cysteinové thiolové skupiny v proteinech, tudíž inhibují například thiol obsahující tyrosinové fosfatasy, antioxidační enzymy a cysteinové proteasy. Avšak peroxydusitan také modifikuje proteiny nitrací některých aminokyselin

(Alvarez *et Radi*, 2003). Mezi deriváty NO patří také malá molekula tzv. *S*-nitrosoglutathion. Primárním procesem tvorby RNS je produkce NO. NO je volný radikál, který má velmi krátký poločas rozpadu a hraje důležitou roli při růstu, vývoji a abiotickém či biotickém stresu. V rostlinách existuje minimálně sedm signálních oxidačně redukčních drah zodpovědných za produkci NO (Gupta *et Igamberdiev*, 2011).

Nitrátreduktasa je hlavním enzymem schopným produkovat cytosolický NO. Přítomnost NADH, jakožto elektronového donoru, zajišťuje redukci dusičnanu na dusitan, avšak může dojít i k redukci dusitanů na NO (Dean *et Harper*, 1988; Yamasaki *et Sakima*, 2000).

Oxid dusnatý má v organismech velmi důležitou úlohu. Je velmi rozšířeným intracelulárním a mezibuněčným poslem s mnoha regulačními funkcemi ovlivňujícími fyziologii a patologii těchto organismů. Nejdříve byla role NO detailně popsána u savců, u kterých NO hraje důležitou roli ve vasorelaxaci, přenosu nervového signálu či v regulaci imunitního systému (Ignarro *et al.*, 1986). Až později bylo zjištěno, že NO má důležitou signální funkci v obranných mechanismech rostlin při stresových podmínkách (Delledonne *et al.*, 1998; Dürner *et Klessig.*, 1999).

3.2.3 Oxidační stres

Odstranění ROS je klíčovým procesem pro přežití živých organismů. Proto si tyto organismy vyvinuly řadu obranných mechanismů k zajištění rovnováhy mezi tvorbou a odstraňováním ROS, a právě nerovnováha mezi těmito procesy se značí jako oxidační stres (Sies, 1985).

Řasy využívají pro udržení rovnováhy dva typy látek, a to nízkomolekulární látky a látky vysokomolekulární. Mezi nízkomolekulární obranné látky patří zejména karotenoidy, které jsou nejdůležitějšími antioxidačními látkami v buňce (Britton *et al.*, 1995). Zatímco neméně důležitými buněčnými antioxidanty jsou enzymy, katalyzující degradaci ROS. Patří sem například superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa, askorbátperoxidasa, thioredoxin a glutathionreduktasa (Gill *et Tuteja*, 2010).

Jak je již zmíněno výše, v rostlinném metabolismu hrají důležitou roli karotenoidní lipofilní látky, které mají mnoho funkcí, včetně role doplňujících pigmentů při pohlcování

světla, zhášení a role antioxidantů proti oxidačnímu poškození. V případě antioxidační funkce těchto látek se jedná zejména o ochranu fotosystémů interakcí s produkty lipidové peroxidace, což vede k ukončení řetězové reakce, odstranění singletního kyslíku a využití energie ve formě tepla. Pomocí excitovaného chlorofylu či excitovaných chlorofylových molekul pak dochází k prevenci tvorby singletního kyslíku nebo k odstranění přebytečné excitační energie přes xantofylový cyklus, ve kterém probíhá konverze violaxanthinu na antheroxanthin a zeaxanthin (Müller *et al.*, 2001). Karotenoidy jsou lokalizovány poblíž chlorofylu ve světlosběrném komplexu a jsou kompetitivními inhibitory při tvorbě singletního kyslíku. Tato s karotenoidy spojená ochrana je důležitá zejména při intenzitě světla vyšší, než je saturační úroveň chlorofylů (Collins, 2001).

Lipidová peroxidace je považována za hlavní molekulární mechanismus oxidačního poškození buněčných struktur a buněčné smrti. Původně byla lipidová peroxidace studována v potravinářském průmyslu (mechanismus poškození potravinářských olejů a tuků), nicméně závažnější je v biologických systémech, kde tvorba reaktivních molekul způsobuje narušení intracelulárních membrán (Dianzani *et Barrera*, 2008). Lipidová peroxidace snižuje tekutost membrán, čímž dochází k omezení jejich bariérových funkcí. Mnoho produktů peroxidace lipidů jako jsou hydroperoxydy nebo jejich aldehydové deriváty inhibují syntézu bílkovin a modifikují chemotaktické signály a aktivitu enzymů (Fridovich *et Porter*, 1981).

Peroxidace lipidů je řetězová reakce, která je zahájena odštěpením vodíku nebo vazbou kyslíkového radikálu, kdy výsledkem je právě oxidační poškození nenasycených mastných kyselin. Lipidová peroxidace, nebo také reakce kyslíku s nenasycenými mastnými kyselinami, ovlivňuje produkci velkého množství oxidačních produktů. Hlavním primárním produktem peroxidace lipidů jsou lipidové hydroperoxydy (LOOH). Mimo jiné mohou vznikat i mnohé aldehydy, jakožto sekundární produkty peroxidace, do kterých patří malondialdehyd (MDA), propanal, hexanal a 4-hydroxynonenal (4-HNE), které byly intenzivně studovány již v 80. letech (Esterbauer, 1982). MDA je považován za nejvíce mutagenní produkt lipidové peroxidace, zatímco 4-HNE je nejvíce toxickou látkou (Esterbauer *et al.*, 1990).

Malondialdehyd je široce užívaný biomarker peroxidace omega-3 a omega-6 mastných kyselin, protože je schopen reagovat s thiobarbiturovou kyselinou (TBA). TBA test je založen na reakci TBA s MDA za vzniku intenzivně zbarvené fluorescenční červené molekuly TBA-MDA. Tento test byl poprvé aplikován k vyhodnocení autooxidační degradace tuků a olejů (Sinnhuber *et al.*, 1958).

Nicméně reakční látky kyseliny thiobarbiturové (TBARS) jsou nespecifické, tudíž se vyskytují spory o jeho využití při kvantifikaci MDA ve vzorcích *in vivo*. Proto existují metody pro stanovení volného a celkového MDA jako je plynová chromatografie, kapalinová chromatografie a několik podobných metod (Giera *et al.*, 2012).

4-HNE byl studován již v 60. letech (Schauenstein, 1967). Později pak v 80. letech byl 4-HNE považován za cytotoxický produkt peroxidace mikrozomálních lipidů (Benedetti *et al.*, 2008). 4-hydroxyalkeny jsou také významnými produkty peroxidace, jelikož jsou produkovány v relativně velkém množství a fungují jako sekundární přenašeče volných radikálů (Esterbauer *et al.*, 1991).

Lipidová peroxidace může nastat dvěma způsoby, a to buď autooxidací způsobenou ROS nebo regulovaným procesem za účasti enzymu lipoxygenasy (Farmer *et al.*, 2003). Biosyntéza kyseliny jasmonové bývá u rostlin aktivována v určitých obdobích vývoje (klíčení, stárnutí) nebo při vystavení organismu mechanickému poškození či patogenezí nekrotrofů, v menší míře i při dalších stresových reakcích (Creelman *et Mullet*, 1997). Okamžitou reakcí na stresový podnět je zvýšení koncentrace Ca^{2+} v buňce, snížení pH vnitřního prostředí buňky, fosforylace proteinů, oxidační vzplanutí a dochází také k aktivaci lipas a lipoxygenas, které inkorporují molekulární kyslík do polynenasycených mastných kyselin v membránách (Mueller, 1997; Creelman *et Mullet*, 1997).

3.3 Stresové faktory

Stresové faktory vyvolávají produkci RONS a rozdělují se do dvou základních skupin; mezi stresory abiotické patří vlivy vnějšího prostředí (extrémy v zásobování vodou, v teplotě, záření, salinita, těžké kovy, chemikálie) či mechanické poškození; mezi stresory biotické pak patří především infekce patogeny (Procházka *et al.*, 1998).

Před samotnou stresovou reakcí dochází na začátku k působení stresoru a následnému poškození funkcí buněk i jejich dílčích struktur, tato fáze je tzv. poplachová. Jestliže intenzita působení stresového faktoru nezpůsobí ihned smrt buňky, tak v buňce dochází k aktivaci mechanismů (tzv. restituční fáze), díky kterým následně dochází k nárůstu rezistence rostliny vůči daným stresorům, odtud fáze rezistenční. Pokud však je intenzita působení stresoru vysoká a dlouhodobá, nastává fáze vyčerpání (průběh stresové reakce viz Obr. 6) (Piterková *et al.*, 2005).

Odpovědi na různé stresové faktory byly podrobně prostudovány u vyšších rostlin, ale i u řas jsou velmi podobné. Řasy jsou v přírodě vystaveny především abiotickým stresům (Mendez-Alvarez *et al.*, 1999). U *Chlamydomonas reinhardtii* byl studován vztah mezi odpovědí na fyzikální stres (intenzivní osvětlení) a na stres chemický (kontaminace vodního prostředí fosfáty). Zjistilo se, že během stresové odpovědi došlo ke změně toku energií v buňce. Především se jednalo o změny v příjmu a uvolnění vápníku z mitochondrií a v pohybu vezikulů obsahujících vápník. Detekce těchto změn byla provedena pomocí mikroskopie (Stephens *et Allan*, 2003). Zjistilo se tak, že v mitochondriích docházelo k produkci peroxidu a superoxidu, jakožto ROS, a také docházelo ke změnám v produkci ATP (Brickley, 2003).



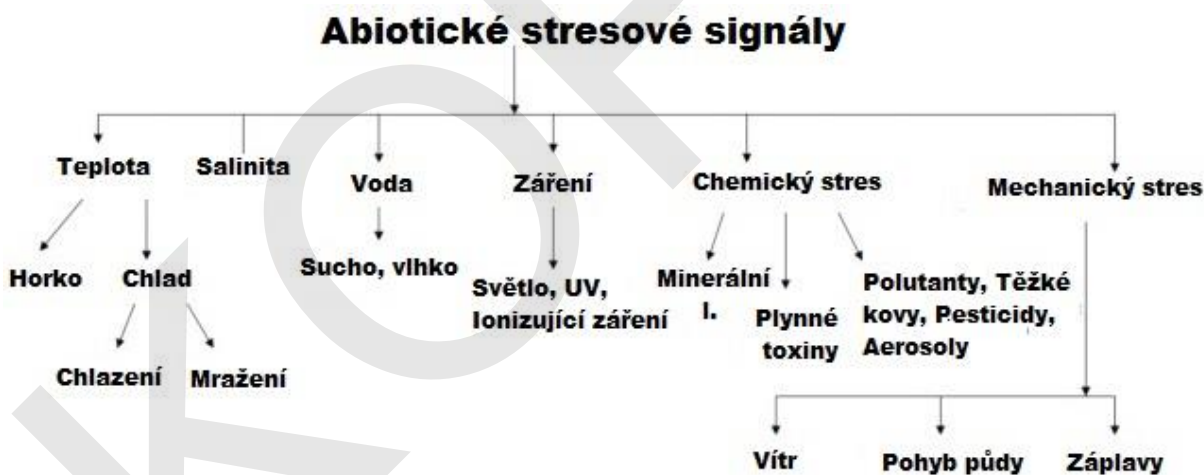
Obr. 6: Průběh stresové reakce (Larcher, 1995).

Odpověď na daný stresový faktor je spouštěna až tehdy, kdy rostlina tento stresový signál rozpozná na buněčné úrovni. Následně pak dochází k přeprogramování metabolismu. V krátkém čase se do obrany zapojují molekuly, které jsou v buňce již přítomny; v delším časovém horizontu dojde změnou transkripce genů k syntéze enzymů a sekundárních metabolitů, které se účastní obranné reakce proti abiotickému či biotickému stresu (Edreva *et al.*, 2000). Ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů (např. pro zvýšení odolnosti rostlin proti určitým patogenům) a k syntéze těchto látek *de novo* v *in vitro* podmínkách se užívá tzv. elicítace (Dicosmo *et Misawa*, 1985). Proces elicítace je založen na elicitoru neboli signálu, který je po rozpoznání receptory buňky schopen vyvolat expresi genů, díky které dochází k postupnému zvyšování syntézy sekundárních metabolitů v rostlině nebo *in vitro* kulturách (Slobodianová, 2014).

3.3.1 Abiotický stres

Rostliny jsou často vystaveny abiotickým stresovým faktorům, jako je například sucho, nadměrné množství vody, nadměrné světlo, extrémní teploty (tj. chlad, mráz, teplo), salinita, nedostatek minerálních látek či působení toxických látek (viz Obr. 7).

Negativním účinkem abiotického stresu jsou zejména změny v rostlinném metabolismu, růstu, vývoji a v extrémních případech může nastat i jejich smrt. Ke změnám v metabolismu však dochází proto, aby byla zachována rovnováha mezi tvorbou a spotřebou energie. Tato bilance závisí na jemné signalizační síti, která právě koordinuje nejdůležitější procesy v životním cyklu rostlin, mezi které patří zejména fotosyntéza, Calvinův cyklus, fotorespirace a procesy spojené s přenosem elektronů, substrátů, reduktantů a energie (Noctor *et al.*, 2007; Foyer *et al.*, 2009; Foyer *et al.*, 2009; Pfannschmidt *et al.*, 2009). Působením abiotického stresu dochází ke zřetelnému omezení produkce rostlin a následně pak k ekonomickým ztrátám (Sha Valli Khan *et al.*, 2014).



Obr. 7: Přehled abiotických stresových signálů (Mahajan *et Tuteja*, 2005).

3.3.1.1 CHLADOVÝ STRES

Nízká teplota je jedním z nejškodlivějších abiotických stresů, který ovlivňuje zejména rostliny mírného pásu. Tyto druhy jsou adaptovány ke změnám teplot úpravou jejich metabolismu během podzimu, zejména však zvýšením produkce ochranných sloučenin, díky kterým jsou schopny maximalizovat chladovou toleranci.

V průběhu zimy je metabolismus takových rostlin přeměřován k syntéze ochranných molekul, mezi které patří cukerné alkoholy (sorbitol, ribitol, inositol), rozpustné cukry (sacharóza, rafinóza, stachyóza, trehalóza) a nízkomolekulární dusíkaté sloučeniny jako je prolin nebo glycin betain, který se vyskytuje jak u jednoděložných, tak i dvouděložných rostlin a jedná se o derivát glycinu (Jánská *et al.*, 2010). Chladový stres zvyšuje v rostlinách produkci fenolových látek a jejich následné inkorporování do buněčné stěny jako suberin či lignin (Griffith *et Yaish*, 2004).

Některé druhy rostlin stresuje až náhlý pokles teploty o několik desítek °C, ale u jiných dochází ke stresové reakci již při mírnějším poklesu teploty pod 10 °C. Je-li rostlina vystavena klimatu s nízkými teplotami, začne v ní docházet k akumulaci osmoaktivních látek, s následnou produkcí stresových proteinů neboli chladem indukovaných proteinů a následnou změnou struktur v membránách. Podobně je tomu právě také u řas (Procházka *et al.*, 1998).

3.3.1.2 TEPLOTNÍ STRES

Je-li rostlina vystavena zvýšené teplotě, dochází k jejímu přehřátí a stresové reakci. Vlivem tepla může dojít k rozpadu cytoskeletu a zastavení pohybu cytoplazmy. Teplem jsou rychle zasaženy lipidy membránových struktur buňky, které se tímto stresem stávají superfluidní a ztrácí tak schopnost plnit svou funkci. Nejdříve je poškozena tylakoidní membrána chloroplastů, a tím i funkce fotosystému II, kterou můžeme pomocí citlivých kamer detekovat na základě změn fluorescence chlorofylu *in vivo*. Při zpětném poklesu teploty jsou změny fluidity membrán reverzibilní. Teplo negativně ovlivňuje také proteiny v těchto membránách, které denaturují a mění svou konformaci, čímž ztrácí svou úlohu. První reakcí na zvýšenou teplotu je syntéza chaperonů, tzv. heat-shock proteinů, které napomáhají správné konformaci bílkovin, a tak zvyšují termostabilitu organismů (Procházka *et al.*, 1998).

3.3.1.3 STRES VYVOLANÝ PŮSOBENÍM TĚŽKÝCH KOVŮ

Kadmium patří mezi těžké kovy známé především svými fyto toxickými účinky. Na molekulární úrovni je kadmium schopné nahradit vápník v molekule kalmodulinu a následně ovlivňovat buněčné signální kaskády (Rivetta *et al.*, 1997).

Toxické kovy jsou schopny procházet membránami několika různými mechanismy transportu (Van Ho *et al.*, 2002; Zalups *et Ahmad*, 2003). Jeden z těchto mechanismů se označuje pojmem molekulární mimikry, ve kterém se jedná buď o kompetici ve vazbě na multivalentní iontové nosiče (např. Ca²⁺ kanálů) nebo kompetici ve vazbě

na nízkomolekulární thioly (jako je cystein). Tyto kovy však mohou být transportovány i pomocí aktivního transportu za pomoci aminokyselinových transportérů. Další možností transportu těchto kovů je i poněkud odlišný mechanismus, v jehož případě jsou kovy vázány na chelatační proteiny (např. metalothioneiny) nebo endocytózou.

Působením těžkých kovů dochází k depolarizaci a snížení pH cytoplazmy, což následně vede k porušení homeostázy buňky (Cumming *et* Gregory, 1990; Cardozo *et al.*, 2002; Conner *et* Schmid, 2003).

Stejně jako je tomu u jiných abiotických stresorů, dochází v buňce vlivem působení těžkých kovů k oxidačnímu stresu a produkci ROS. Proto modulace antioxidační kapacity představuje důležitou adaptivní reakci vůči různým typům stresu (Pedrajas *et al.*, 1993; Dat *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999).

Co se týče působení těžkých kovů, konkrétně přechodné kovy mohou být součástí Haber-Weissova cyklu, jehož výchozími látkami je $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 a produktem pak OH^{\cdot} (Halliwell, 1982). Kovy bez redoxního potenciálu (Cd^+ , Pb^+ a Hg^+) mohou zvyšovat preoxidační stav redukcí glutathionu (GSH), aktivující systémy závislé na vápníku a ovlivňující železem zprostředkované procesy. Tyto těžké kovy mohou také narušit fotosyntetický řetězec, čímž dochází k produkci $O_2^{\cdot-}$ a O_2 (Asada *et* Takahashi, 1987).

Aktuálně byl studován vliv vysoké koncentrace Cd na rostlinné protoplasty, ve kterých došlo k nárůstu hladin NO a RONS celkově. Po dvou až čtyřech hodinách byla odezva na působení Cd nejvyšší, došlo k výraznému zvýšení produkce NO a RONS, zatímco po dlouhodobém působení Cd, konkrétně po 24-168 hod bylo pozorováno opětovné snížení hladin těchto látek. Studie potvrdila již dříve zveřejněné negativní účinky Cd^{2+} iontů na životaschopnost buněk, avšak snížená životaschopnost může být způsobena nejen vlivem toxických ROS, ale také i schopností Cd^{2+} iontů nahradit potřebné kationty v proteinech, což může vést k inhibici enzymatické aktivity. U kadmia podobně jako u rtuti bylo prokázáno, že dokáže měnit redoxní homeostázu prostřednictvím snížení endogenní hladiny redukovaného GSH, jakožto klíčové složky intracelulární redoxní kontroly (Piterková *et al.*, 2015).

3.3.2 Biotický stres

Biotický stres způsobuje poškození rostlin působením živých organismů: fytoplazmami, bakteriemi, houbami, hmyzem, přežvýkavci či jinými rostlinami. Fyziologii rostlin významně

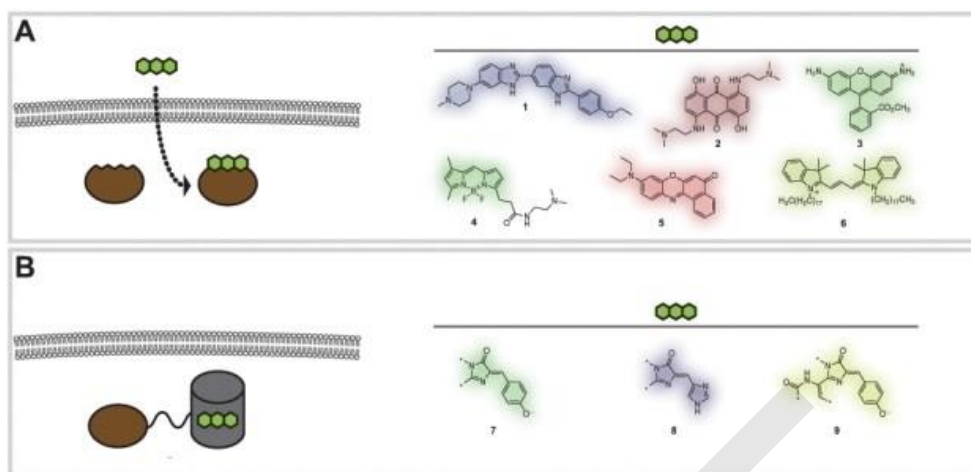
narušují obligátní parazité ze skupin virů a viroidů, i když se jedná o nebuněčné organismy. Symptomy biotického stresu jsou kromě změn vzhledu rostliny tvořeny i strukturami samotného patogena, např. mycelium a sporulace hub, bakteriální sliz, tvorba cyst či přítomnost roztočů a hmyzu (Flynn, 2003). Zatímco abiotické faktory jsou poměrně dobře identifikovatelné, symptomy biotického stresu jsou vysoce variabilní (postupný vývoj patogena nebo škůdce, vliv vnějších podmínek a fitness rostliny atd.) a mohou interagovat i s jinými abiotickými faktory.

Vliv biotického stresu byl dosud více prostudován u vyšších rostlin než u řas, přestože jsou i řasy hostiteli řady patogenů (např. virů nebo chytridiomycet). Patří sem například zástupci rodu *Chlorovirus*, kteří infikují převážně sladkovodní řasy. Takové typy virů jsou schopny připojit se na vnější povrch buněčné stěny, poté začnou uvolňovat specifické enzymy, které buněčnou stěnu rozruší a následně dochází k fúzi virální DNA s DNA hostitele. V průběhu času replikace virální DNA pokračuje tak dlouho, dokud nedojde ke kompletnímu rozpadu buňky (Yamada *et al.*, 2006; Meints *et al.*, 1984).

3.4 Metody studia RONS

3.4.1 Histochemické značení

Histochemicky je možné lokalizovat vybrané molekuly ve vzorku na základě chemické reakce. K označení daných struktur se využívají nízkomolekulární značky, fluorescenční proteiny, kvantové tečky (viz Obr. 8), aj. Dalším způsobem značení těchto molekul je imunohistochemické značení pomocí protilátek s navázanými fluorochromy, nebo značení na základě enzymové reakce, případně pomocí vnesení fúzních proteinů do organismu.



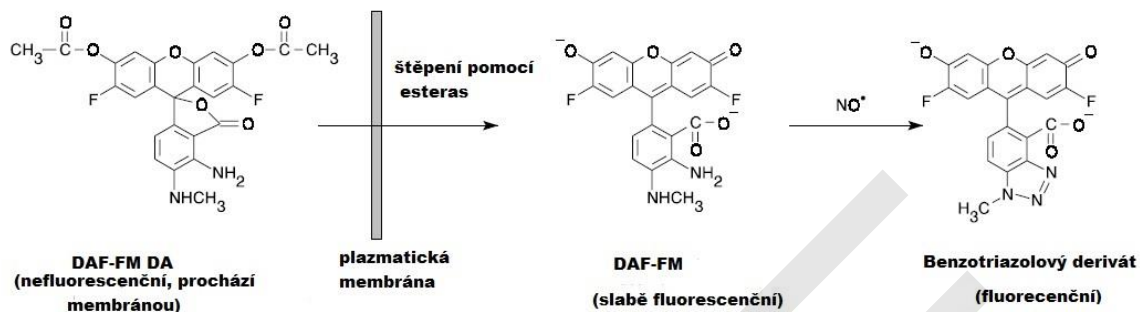
Obr. 8: Princip histochemie A) použití fluorescenční molekuly a B) fluorescenčního proteinu (Lavis, 2011).

V dalším textu jsou zmíněny tři fluorochromy pro určité molekuly RONS, které byly použity v experimentální části. Každá fluorescenční molekula má specifickou afinitu pro určité cílové molekuly (Kiernan, 2008).

DAF-FM

Ke značení NO se využívá řady diaminů, někdy v komplexu s mědí. Prvními značkami používanými k fluorescenční detekci NO byly naftalen-2,3-diamin (DAN) či 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), které v přítomnosti kyslíku reagují s NO za vzniku triazolů. Metoda nebyla však selektivní pro NO, neboť reagují i dusitany. Schopnost DAF-2 detekovat NO je vyšší v přítomnosti dvojmocných kationtů (Kupková *et* Beneš, 2004). Dalším derivátem testovaným k detekci extracelulárního NO byl 4-amino-5-(N-metylamino)-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM). Původně se tvrdilo, že DAF-FM je nefluorescenční, avšak pouze do doby, kdy nechali reagovat DAF-FM s NO a vytvořili tak fluorescenční benzotriazol (Kojima *et al.*, 1999). Pro přenos fluorochromu do buňky byly na jeho molekulu navázány zbytky kyseliny octové. Po proniknutí DAF-FM DA (4-amino-5-(N-metylamino)-2',7'-difluorofluorescein diacetátu) do nitra buněk dochází přirozeně k deacetylaci barviva vnitrobuněčnými esterasami. Tím vzniká DAF-FM, který vykazuje velmi nízkou fluorescenci, ale po reakci s NO tvoří benzotriazolový derivát, který je silně fluorescenční (viz Obr. 9). Jedná se o fluorochrom s excitací 495 nm a emisí 515 nm. Tento derivát může být detekován metodami založenými na fluorescenci, např. mikroskopii, průtokovou cytometrií,

spektrofotometrií (fluorescenčními readery) či fluorometrií (Thermo Fisher Scientific Inc., 2015).



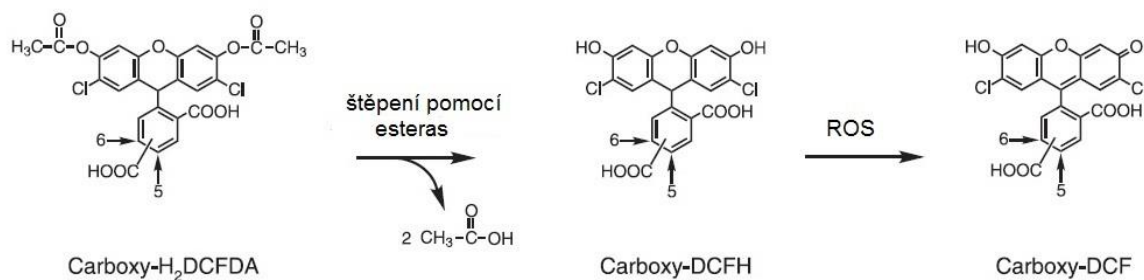
Obr. 9: Přeměna nefluorescenčního DAF-FM DA na fluorescenční benzotriazolový derivát (Thermo Fisher Scientific Inc., 2015).

Za fluorochrom s nejvyšší specificitou pro NO je v současnosti považován Fluorescent Nitric Oxide Chelotropic Trap (FNOCT), v jehož případě se jedná o pyren na bázi o-cyklického quinodimetanu (Vandana *et al.*, 2012), který však není dostupný komerčně ani od jeho autorů, proto není možné tyto informace ověřit.

c-H₂DCF DA

Ke značení ROS, produkovaných vlivem oxidačního stresu, se používá derivátů fluoresceinu. V experimentální části byl použit konkrétně derivát carboxy-H₂DCF DA, neboli 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát s excitací 495 nm a emisí 529 nm.

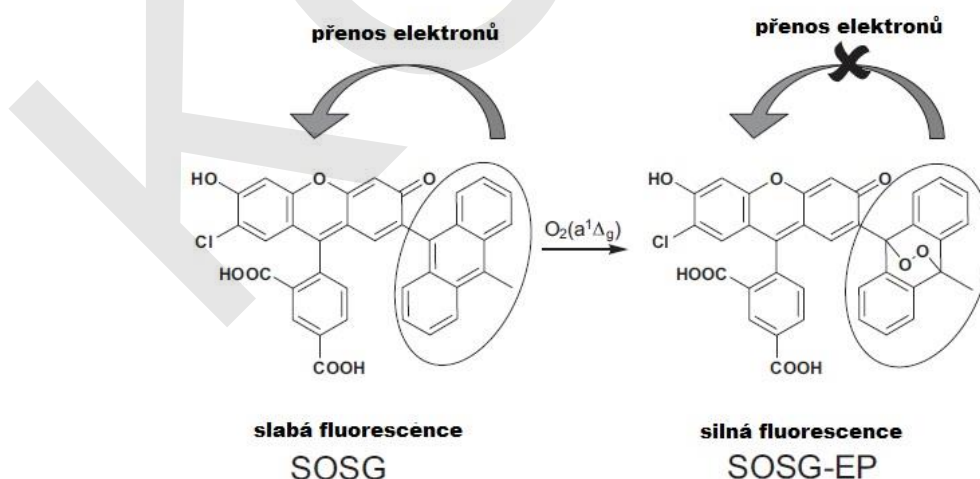
Nefluorescenční c-H₂DCF DA prochází přes plazmatickou membránu do nitra živých buněk, kde je deacetylován intracelulárními esterasami. V přítomnosti ROS produkovaných vlivem oxidačního stresu je redukovaná molekula c-DCFH oxidována na c-DCF, který již vykazuje silnou fluorescenci, reakce viz Obr. 10 (Thermo Fisher Scientific Inc., 2015).



Obr. 10: Přeměna nefluorescenčního c-H₂DCFDA na fluorescenční c-DCF (Thermo Fisher Scientific Inc., 2015).

SOSG

Ke specifické detekci vznikajícího singletního kyslíku v buňkách se užívá fluorochrom Singlet Oxygen Sensor Green® (SOSG). Tento fluorochrom je excitován zářením o vlnové délce 504 nm, následně pak dochází k emisi o vlnové délce 525 nm. Výrobce uvádí, že SOSG je vysoce selektivní pro O₂ a nevykazuje žádné znatelné odpovědi k hydroxylovým ani superoxidovým radikálům. Původně byl dodáván pro extracelulární detekci, ale zjistilo se, že prochází do nitra buněk. Po interakci SOSG se singletním kyslíkem dochází k přerušení přenosu elektronů a tvorbě endoperoxidu, vykazujícího fluorescenci, reakce viz Obr. 11 (Thermo Fisher Scientific Inc., 2015). Vlivem světla může docházet k autooxidaci SOSG, proto je nutné v experimentech případně odečítat pozadí.



Obr. 11: Přeměna slabě fluorescenčního SOSG na SOSG-EP (endoperoxid) (Gollmer *et al.*, 2010).

Nedávno byla pro detekci singletního kyslíku dánskými vědci syntetizována nová sloučenina, která se označuje ASG neboli Aarhus Sensor Green, která má údajně nesporné výhody v použití pro detekci singletního kyslíku díky vyšší specifitě. ASG překonává řadu omezení, která jsou spojená s používáním komerčně dostupného SOSG. Funkčně se obě sloučeniny chovají stejně, v přítomnosti singletního kyslíku dochází k nevratné přeměně slabě fluorescenční molekuly na vysoce fluorescenční endoperoxid. Hlavní výhodou ASG a ASG-EP je to, že při fyziologických hodnotách pH samy o sobě nevyvolávají produkci singletního kyslíku a ASG snadno vstupuje do protoplastu buněk. ASG je chemicky modifikovaný fluorescein odvozený od SOSG. Jedná se o fluorovaný derivát, konkrétně o tetrafluor-substituovaný derivát fluoresceinu, který je kovalentně navázán na 9,10-difenylantracénové části. Tato sloučenina by měla specifitější pro detekci singletního kyslíku, avšak není komerčně dostupná (Pedersen *et al.*, 2014). Počáteční slibná komunikace s autory článku v posledním roce dosud nevedla k získání fluorochromu ani postupu pro jeho syntézu, což činí využití ASG pro specifickou detekci singletního kyslíku diskutabilním.

3.4.2 Mikroskopické metody

3.4.2.1 HISTORIE MIKROSKOPU

Kořeny mikroskopie sahají do prvního století, kdy Římané pozorovali objekty přes skličko, díky němuž byly pozorované objekty větší. Postupem času vznikaly jednoduché čočky, jejich kombinací pak složitější přístroje. Za vynálezce prvního „mikroskopu“ se zvětšením 9x z r. 1590 jsou označováni Hans a Zacharias Jansenovi. Průkopníkem mikroskopie na konci 17. století byl angličan Robert Hooke, jehož mikroskop zdokonalil jeho současník holanďan Anton van Leeuwenhoek (History of Microscope, 2010).

3.4.2.2 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Fluorescenční mikroskop je typem světelného mikroskopu, umožňující detekci látek schopných fluorescence, která vzniká při ozáření vzorku obsahujícího fluorochromy. Jedná se o molekuly, jejichž elektrony jsou ozáření světlem o určité vlnové délce excitovány na vyšší energetickou hladinu a při návratu na hladinu původní emitují záření o vlnové délce vyšší.

Zdroj světla u fluorescenčního mikroskopu je rtuťová výbojka či xenonová oblouková lampa, důležitými částmi jsou excitační a emisní filtry, které umožňují propouštět paprsky

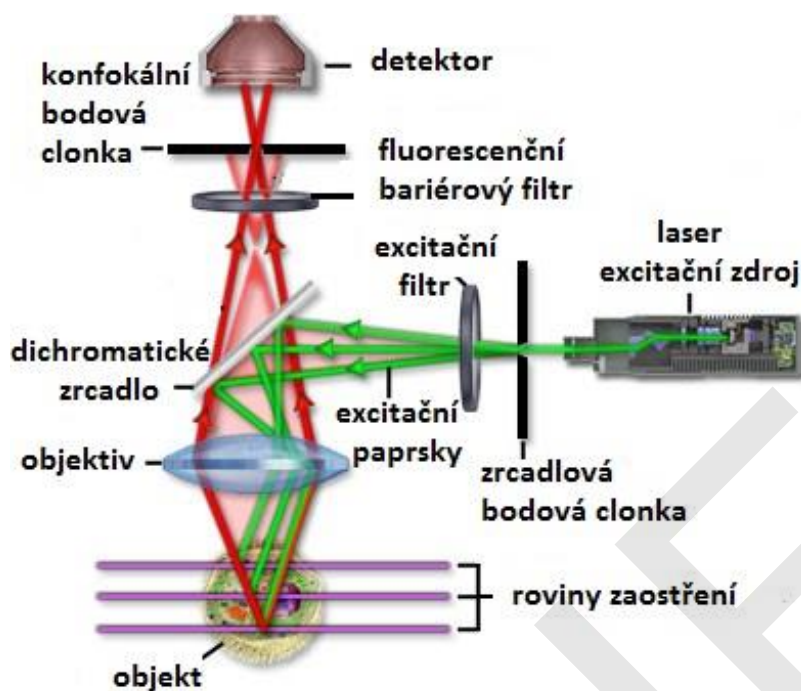
o určité vlnové délce. Filtry se pro pozorování vzorku vybírají podle spektrálních vlastností daného fluorochromu. Důležitou komponentou je také tzv. dichroické zrcadlo neboli dělič paprsků, který eliminuje nežádoucí paprsky. Tyto mikroskopy se staly důležitou součástí biologických studií (Bradbury *et* Evennett, 1996).

3.4.2.3 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Konfokální mikroskop má rozlišovací schopnost zhruba 1,6x vyšší než fluorescenční, což je dáno detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Idea konfokálního mikroskopu přišla od Marvina Minského, který ji roku 1957 patentoval, ale praktickému využití tohoto objevu bránil nedostatečně intenzivní zdroj světla. V roce 1966 Mojmir Petráň ve spolupráci s kolegou Milanem Hadravským patentovali princip konfokálního mikroskopu s dvojitým řádkováním, který fungoval na principu Nipkowova kotouče (Egger *et* Petráň, 1967; Pawley, 2005).

Zdrojem intenzivního světla je většinou laser, další důležitou součástí je dichroické zrcadlo, konfokální clony a fotonásobič. Průchod paprsků konfokálním mikroskopem je znázorněn na Obr. 12. Výsledná data, ve kterých jsou obsaženy i informace o souřadnicích X a Y daného bodu ve vzorku jsou přeneseny do skenovací techniky, která je schopná z těchto souřadnic vytvořit kompletní obraz (Plášek, 1995). Velkou výhodou moderního konfokálního mikroskopu je i to, že pořízením jednotlivých ostrých optických řezů lze softwarově rekonstruovat 3D obraz vzorku (Porter *et al.*, 1984).

Konfokální mikroskopie se využívá pro studium dynamiky v živých buňkách. Příprava takových vzorků je náročná, stejně jako je tomu u pozorování živých buněk konvenční mikroskopii. Dále musí být vzato v úvahu i poškození vzorků způsobené cíleným vysoce intenzivním excitačním světlem. Fluorescence také představuje problém v ovlivňování chování buněk fluorochromem. Molekuly kyslíku reagují s molekulami fluorochromu za vzniku tripletních excitovaných stavů a mohou tak tvořit volné radikály, které následně mohou poškozovat buňky (Terraski *et* Dailey, 1995).



Obr. 12: Průchod světla konfokálním mikroskopem (Olympus America Inc., 2015).

3.4.2.4 OBRAZOVÁ ANALÝZA

Součástí systému potřebného pro analýzu obrazu je počítač se speciálním softwarem a digitalizační zařízení. K digitalizaci slouží speciální skener nebo mikroskop, který je propojen s digitální kamerou a výsledný obraz je pak uložen v počítači a může být dále hodnocen a upravován.

Důležitou součástí analýzy obrazu je segmentace, při které se označí v obraze konkrétní oblasti, které jsou následně hodnoceny a mohou být měřeny nebo umožňují stanovovat požadované morfometrické a denzitometrické vlastnosti objektů. Může být také kvantifikována intenzita fluorescenčního signálu (Plachý, 2004).

Obrazy vzniklé konfokální mikroskopií jsou definovány v číselné (digitální) formě, proto je snadné je následně počítačově zpracovávat. Například ze sady optických řezů můžeme vytvořit prostorové objekty, které nám následně umožňují sledovat např. lokalizaci fluorochromu v jednotlivých organelách eukaryotních buněk (Plášek, 1995).

3.4.3 EPR spektroskopie

EPR neboli elektronová paramagnetická rezonance (označována také jako „elektronová spinová rezonance, ESP) je spektroskopická technika, jejíž princip je velmi podobný principu NMR, nukleární magnetické rezonance. Obě tyto techniky jsou založeny na interakcích mezi magnetickými momenty a elektromagnetickým zářením - u EPR jsou původem těchto momentů elektrony, zatímco u NMR jádra (Weil *et Bolton*, 2007).

EPR je velmi citlivá technika sloužící k detekci a identifikaci volných radikálů jako ROS a NO (Gibella *et al.*, 2000). Obecně je metoda založena na přechodech mezi energetickými hladinami, které vznikají působením magnetického pole na nepárový elektron (Wertz *et Bolton*, 1972). Po vložení radikálu (látky s nepárovým elektronem) do vnějšího magnetického pole dojde k orientaci magnetického momentu elektronu do dvou povolených orientací, které jsou energeticky různé. Po ozáření vhodnou energií měříme hodnotu rozdílu mezi oběma spinovými stavy elektronu. Záznamem tohoto měření je pak spektrum EPR.

Například NO obsahuje v molekule 11 valenčních elektronů, ale EPR spektrum vzniká u volné molekuly NO pouze za situace, je-li v excitovaném stavu. Pro stanovení NO se využívá metody záchytu spinu, kdy reaguje radikál s diamagnetickou látkou náchylnou k vytvoření komplexu, tak vznikne radikál mající delší biologický poločas a lepší detekovatelnost. NO vytváří tyto komplexy například s přechodnými kovy, thioly nebo s reaktivními formami kyslíku (Kupková *et al.*, 2004).

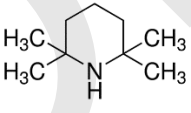
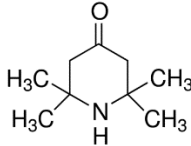
Termínem singletní kyslík $^1\text{O}_2$ je označována molekula kyslíku v energeticky excitovaném stavu, v němž jsou všechny elektrony spárovány, tudíž multiplicita spinu je 1 (singlet). V základním energeticky nejnižším stavu má molekula kyslíku v nejvyšším orbitalu dva nepárové elektrony s paralelními spiny a multiplicitu spinu 3 (triplet). Oproti tomu naprostá většina látek má v základním stavu všechny elektrony spárované, jsou tedy v singletním stavu. Pro jejich reakce s tripletními molekulami kyslíku tak platí pravidla zachování spinu, tzv. spinový zákaz, avšak termodynamicky jsou tyto reakce možné. V případě, že by neexistoval spinový zákaz, byla by veškerá organická hmota v přítomnosti vzdušného kyslíku oxidována na oxid uhličitý a vodu (Lang *et al.*, 2005).

Podobně jak je tomu u NO, tak i u singletního kyslíku se jedná též o metodu spinového záchytu, který je založen na reakci $^1\text{O}_2$ s neradikálovou sloučeninou za vzniku stabilního

radikálového produktu. Ke stanovení $^1\text{O}_2$ se používá 2,2,6,6-tetramethylpiperidin a jeho deriváty. Vznikající nitroxidový radikál následně vykazuje EPR spektrum se třemi liniemi, jejichž výška je přímo úměrná koncentraci $^1\text{O}_2$ v roztoku (Lang *et al.*, 2005).

2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMP) a 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinone (TEMPD) se používají ke kvantifikaci tvorby singletního kyslíku z rostlinného materiálu (Hakala-Yatkin *et Tyystjärvi*, 2011). V případě TEMPD se jedná o hydrofilní spin-trap, zatímco TEMP je lipofilní povahy. Obě tyto látky sloužící ke spinovému záchytu, jsou specifické k detekci singletního kyslíku (Lion *et al.*, 1980; Moan *et Wold*, 1979). Srovnání hydrofilního a lipofilního spin-trapu je popsáno v Tab. I (Sigma Aldrich Co. LLC, 2015).

Tab. I: Rozdíly mezi TEMP A TEMPD.

	TEMP	TEMPD
Charakter	lipofilní	hydrofilní
Ředění s	etanol	destilovaná voda
Empirický vzorec	$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}$	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}$
Molekulová hmotnost [g/mol]	141,25	155,24
Čistota [%]	≥ 99	95
Strukturní vzorec		

Bylo také zjištěno, že tyto látky vyvolávají závažné vedlejší účinky ve fotosystému II, který je hlavním místem tvorby singletního kyslíku (Hakala-Yatkin *et Tyystjärvi*, 2011). Obě sloučeniny, TEMP i TEMPD, vycytávají singletní kyslík a následně tvoří nitroxidy, které již mohou být měřeny pomocí elektronové paramagnetické rezonance. Specifita obou látek k singletnímu kyslíku se odvíjí od použitého biologického materiálu. TEMPO, jakožto nitroxidový produkt TEMP a různé jeho deriváty jsou široce používány v organické i anorganické chemii, jako radikálové trapy v oblasti biologických věd (Vogler *et Studer*, 2008; Wilcox, 2010).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

K experimentům byly použity kultury tří kmenů řasy *Chlamydomonas reinhardtii*, konkrétně divoký kmen CC002-WT a dva mutantní kmeny typu CC125 a typ CC2929. Také byly pozorovány kultury sinic, kmen *Synechococcus endogloebicus*, který ze sbírky mikroorganismů UPOC poskytl doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D. z Katedry botaniky, PřF UP v Olomouci, a *Synechocystis* NEXON- WT, který byl získán ze sbírky AV ČR v Českých Budějovicích.

V případě *Ch. reinhardtii* CC002 se jedná o „wild-type“, který charakterizuje u druhu fenotyp vyskytující se v přírodě. Původně byl wild type považován za produkt standardní alely na daném lokusu, zatímco mutantní druhy za produkty alely nestandardní neboli mutantní. Veškeré genové lokusy se však vyskytují v několika alelických formách, které se liší frekvencí zastoupení v populacích druhu v jednotlivých areálech a neexistuje tak jednotný wild-type daného druhu. Převládající alela genu je považována za alelu „standardní“. Co se týče mutantní alely, může se měnit a má i možnost se stát opět divokým typem, pokud dojde k její selekci v dané populaci (Chari *et* Dworkin, 2013; Jones *et* Hartl, 1997).

Druhým použitým kmenem *Ch. reinhardtii* byl kmen CC125, s mutací mt+ [137c], který byl popsán v Boynton-Gilhamově laboratoři, Duke University (Durham, USA). Genovým pozadím pro kmen CC125 byl původně „wild type“ 137c izolovaný G. M. Smithem roku 1945 poblíž Amherstu v Massachusetts, USA (ve sbírce r. *Chlamydomonas* je pravděpodobně identický s kmenem 11/32c). Tento kmen byl v roce 1968 přenesen do Dukovy laboratoře, kde byly provedeny mutace v genu nit1 a nit2, které kódují enzym nitrát reduktasu podílející se na asimilaci dusičnanů, tudíž nemůže růst v přítomnosti dusičnanu jako jediného zdroje dusíku (UniProt, 2015). Také nese alelu AGG1 (agg1) zodpovědnou za fototaktickou agregaci. CC125 je kmen, který byl využit ke studiu řady dalších mutací, vznikl tak například kmen CC503 cw92 mt+, který byl zdrojem DNA pro sekvenování genomu (Matt Laudon, *Chlamydomonas Resource Center*).

Třetím použitým kmenem *Ch. reinhardtii* byl mutant CC2929, který byl popsán v roce 1993 P. A. Lefebvrem z University v Minnesotě. Tento kmen je rezistentní vůči streptomycinu a vyžaduje pro svůj růst acetát. Jedná se o kmen A54-e18 s *nit1-e18* mutací, konkrétně delecí na 5' konci NIT1 nebo NIA1 genu pro nitrát reduktasu.

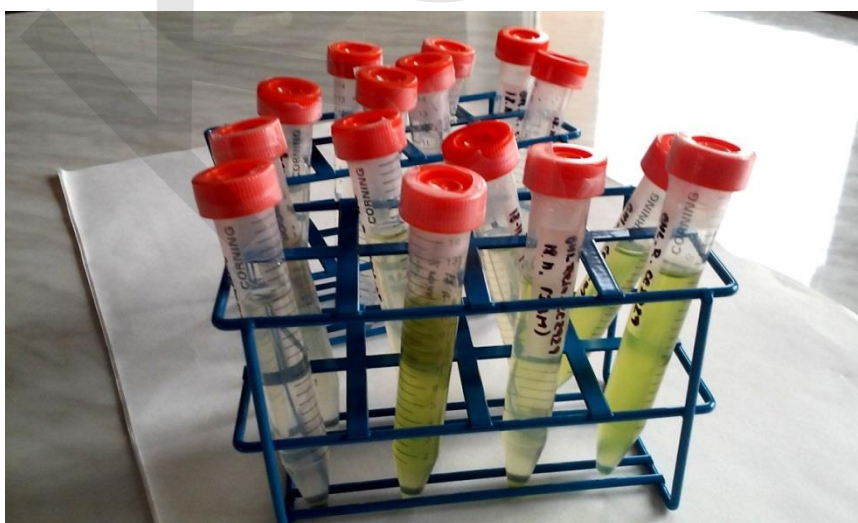
4.2 Kultivace řas a sinic

Buňky *Ch. reinhardtii* nejsou kultivačně náročné. Pro experimenty byly řasy kultivovány v tekutých médiích, které slouží k jejich pomnožení (Obr. 13). Dlouhodobější kultivace se provádí na 1,5% agaru, a to buď na Petriho miskách (Obr. 14) či ve zkumavkách (šikmý agar).

Řasy rodu *Chlamydomonas* patří mezi fotosyntetické organismy, tudíž mohou v procesu fotosyntézy využívat jako zdroj uhlíku CO₂. Na druhou stranu mohou *Chlamydomonas* růst i za nepřístupu světla, a to za předpokladu, že je přítomný acetát neboli sůl kyseliny octové, která je zde hlavním zdrojem uhlíku pro chemosyntézu.

Pokud chceme skladovat kultury řas dlouhodobě, je zapotřebí utěsnit kultivační zkumavku či Petriho misku parafilmem a skladovat při teplotě 10-15 °C (Adams, 2015).

Při výběru vhodného média pro kultivaci řas je důležité se rozhodnout pro takové médium, na kterém by byla nízká bakteriální kontaminace. Taková média jsou všeobecně vybírána, jelikož řasám poskytují prostředí velmi podobné tomu, v němž se v přírodě vyskytují. Proto je nejužívanějším kultivačním médiem tzv. Bold-Basal médium (BBM), které je mísitelné s vodou a obsahuje pouze minerální soli potřebné pro optimální růst. Méně vhodné, ale používané je organické kultivační médium Tris-acetate-phosphate (TAP) médium, které umožňuje řasám využívat acetát, avšak tento zdroj uhlíku je dostupný i pro bakterie a jiné kontaminanty. Na druhou stranu na TAP médiu rostou buňky řas mnohem rychleji a v mnohem vyšší hustotě než na médiu anorganickém (Barsanti *et* Gualtieri, 2014). Složení BBM média je popsáno v Příloze viz Tab. III a složení TAP média viz Tab. IV.



Obr. 13: Kultury řas v tekutém médiu BBM ve zkumavkách.



Obr. 14: Kultury jednotlivých kmenů *Chlamydomonas reinhardtii* v/na BBM médiu.

4.3 Aplikace stresu

Aplikace stresu na kultury buněk řas spočívá ve vystavení kultury danému stresovému faktoru. V následujících experimentech byly kultury (suspenze buněk v mikrozkumavce) vystaveny abiotickým stresorům - chladovému šoku (1 hod při 4 °C) a působení těžkého kovu (2 hod 0,5 mM CdCl₂). Po uplynutí působení jednotlivých stresorů následovalo ihned histochemické barvení stresované buněčné suspenze a po inkubaci mikroskopie.

4.4 Histochemická lokalizace RONS konfokální mikroskopií, obrazová analýza

K detekci a lokalizaci RONS vznikajících v buňkách byly použity specifické fluorochromy, emise jejichž záření (fluorescence v rozmezí 505-525 nm) byla studována konfokální laserovou skenovací mikroskopií (CLSM). Excitačním zdrojem byl argonový laser, konkrétně vlnová délka 488 nm, s celkovým výkonem 30 mW. Pro zobrazení viditelného kanálu byl použit diodový laser 405 nm s celkovým výkonem 20 mW. Snímky pořízené invertovaným fluorescenčním mikroskopem Olympus IX 81 s konfokální jednotkou Fluoview 1 000 byly dále upraveny a integrální rozložení intenzit signálu v nich bylo vyhodnoceno obrazovou analýzou v softwaru FV10-ASW Viewer (stupně jasu v rozmezí 0-4095; jednalo se tedy o bezrozměrnou veličinu). Série optických řezy vzorkem byly skládány do 3D objektů softwarem LSC Imaris 7. 3. (Večeřová, 2013).

Oxid dusnatý byl detekován pomocí 20 μM DAF-FM DA (viz kapitola 3.4.1), který má maxima excitace při 495 nm a emise při 515 nm (Thermo Fisher Scientific Inc., 2015). K detekci ROS byl aplikován 50 μM c-H₂DCF DA (viz kapitola 3.4.1) s maximem excitace při 495 nm a emise při vlnové délce 529 nm (Thermo Fisher Scientific Inc., 2015). Singletní kyslík byl detekován pomocí 50 μM SOSG (viz kapitola 3.4.1), jehož molekuly jsou maximálně excitovány vlnovou délkou 504 nm a maximálně emitují světlo o vlnové délce 525 nm. Vlastnosti použitých fluorochromů jsou shrnuty v Tab. II.

Tab. II: Charakteristiky použitých fluorochromů.

Fluorochrom	Detekuje molekuly	Výsledná koncentrace [μM]	Maximum excitace/ emise [nm]
DAF-FM DA 4-amino-5-(N-metylamino)-2', 7'-difluorofluorescein diaacetate	NO	20	495/515
c-H₂DCF DA 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate	ROS (H ₂ O ₂ , HO [•] , ROO [•] , NO a NOO [•])	50	495/529
SOSG Singlet Oxygen Sensor Green®	¹ O ₂	50	504/525

4.5 Měření tvorby ¹O₂ pomocí EPR

K posouzení oxidačního poškození tvorbou singletního kyslíku byla použita metoda EPR spinového záchytu. Pro detekci byl použit EPR spektrometr značky MiniScope MS400. Jako spin-trap byla zde použita lipofilní látka TEMP a hydrofilní TEMPD.

Nejdříve bylo zapotřebí narostlé buňky, kultivované v TAP médiu, o koncentraci $2 \cdot 10^6$ buněk/ml zakonzentrovat na výslednou koncentraci $2 \cdot 10^7$ buněk/ml. K zakonzentrování bylo zapotřebí původní zkumavky zcentrifugovat pomocí centrifugy Sigma 3-30K, Sartorius, při 1000 g, 10 min a 22 °C, následně byl odebrán patřičný objem, aby výsledná koncentrace buněk byla u všech kmenů stejná.

Do jednotlivých mikrozkušavek bylo napipetováno 13,5 μl buněčné suspenze o koncentraci $2 \cdot 10^7$ buněk/ml (měřeno pomocí Automated Cell Counter, BIO-RAD TC20), ke které se následně napipetovalo 13,5 μl 1mM CdCl₂. Poté byly přidány 3 μl lipofilního 50mM spin-trapu TEMP, který byl ředěn v 50% etanolu. Spin-trap byl tedy přidán ihned na začátku inkubace buněk s CdCl₂. Celkový objem tj. 30 μl byl následně nasát skleněnou kapilárou, která byla utěsněna pomocí speciální hmoty. Po uplynutí 120 min inkubace buněk s kadmíem, byla kapilára vložena do spektrometru, ve kterém probíhalo měření singletního kyslíku. Stejný postup byl proveden při použití hydrofilního spin-trapu.

5 VÝSLEDKY

5.1 Kultivace řas – vyhodnocení dynamiky růstu jednotlivých kmenů

Řasy *Ch. reinhardtii* byly kultivovány na anorganickém BBM médiu, kmeny CC002-WT a CC2929 rostly mnohem rychleji a jejich buňky obsahovaly více chlorofylu než buňky kmene CC125 (Obr. 14). Při kultivaci buněk v TAP médiu byla rychlost i intenzita růstu všech kmenů řas strovnatelná, ale z důvodu vysokého stupně kontaminace dalšími mikroorganismy toto médium nebylo vhodné. Sinice na agarovém médiu rostly mnohem pomaleji než řasy, proto byla jejich kultivace prováděna přímo v tekutém médiu.

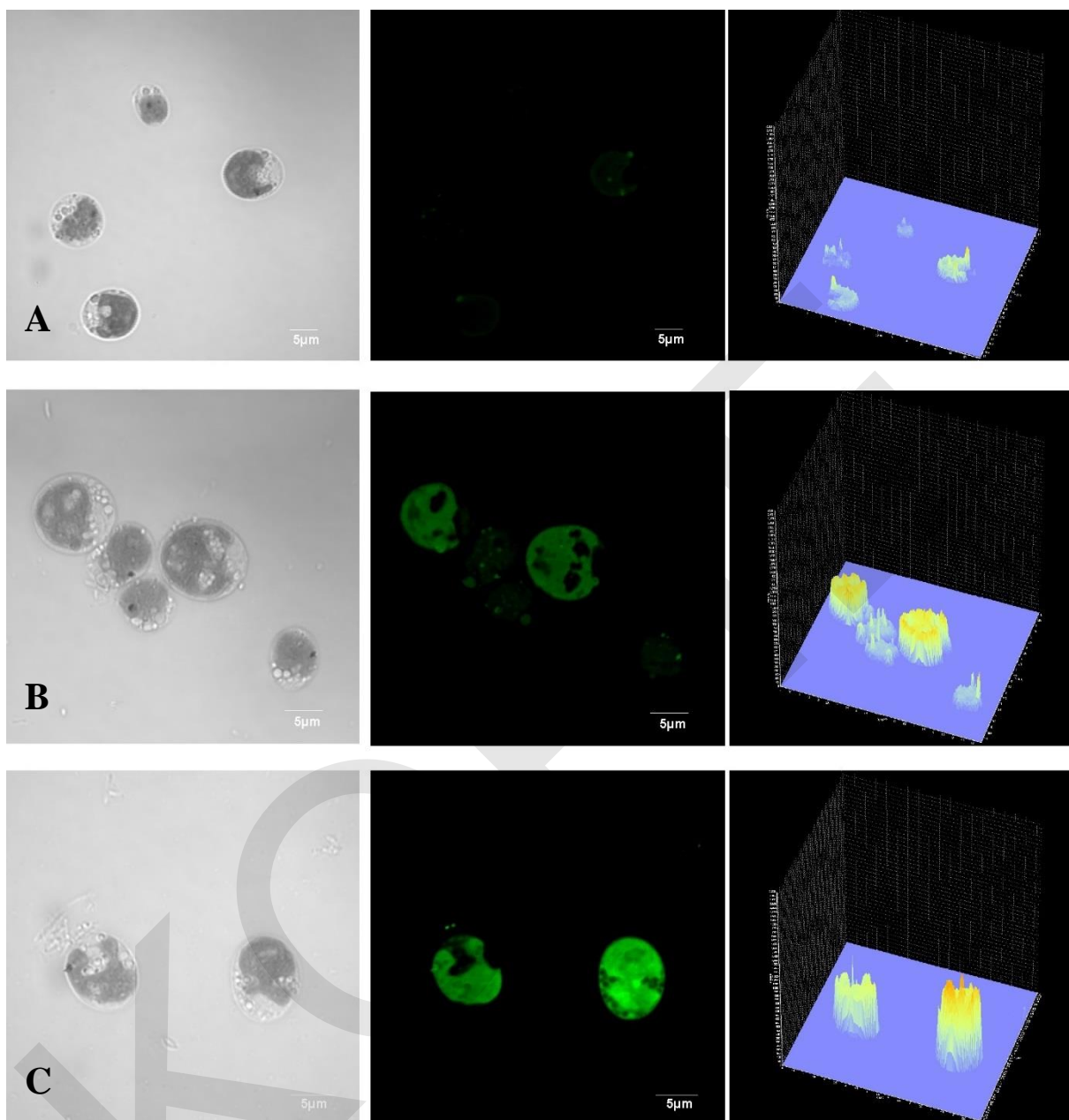
5.2 Histochemická detekce RONS konfokální laserovou mikroskopií

K histochemickému barvení a následné detekci RONS byly použity hlavně kultury *Chlamydomonas reinhardtii*, konkrétně se jednalo o „divoký“ kmen CC002 a dva mutantní kmeny CC125 a CC2929. Buňky byly před histochemickým barvením stresovány chladovým šokem a působením 0,5mM CdCl₂. Následně bylo provedeno histochemické barvení *in vivo*, tři různé fluorochromy sloužily postupně k detekci jednotlivých RONS. Kvantifikace byla provedena na základě vyhodnocení intenzity fluorescenčního signálu v mikrofotografiích obrazovou analýzou.

5.2.1 Detekce NO pomocí DAF-FM DA u kmenů *Ch. reinhardtii*

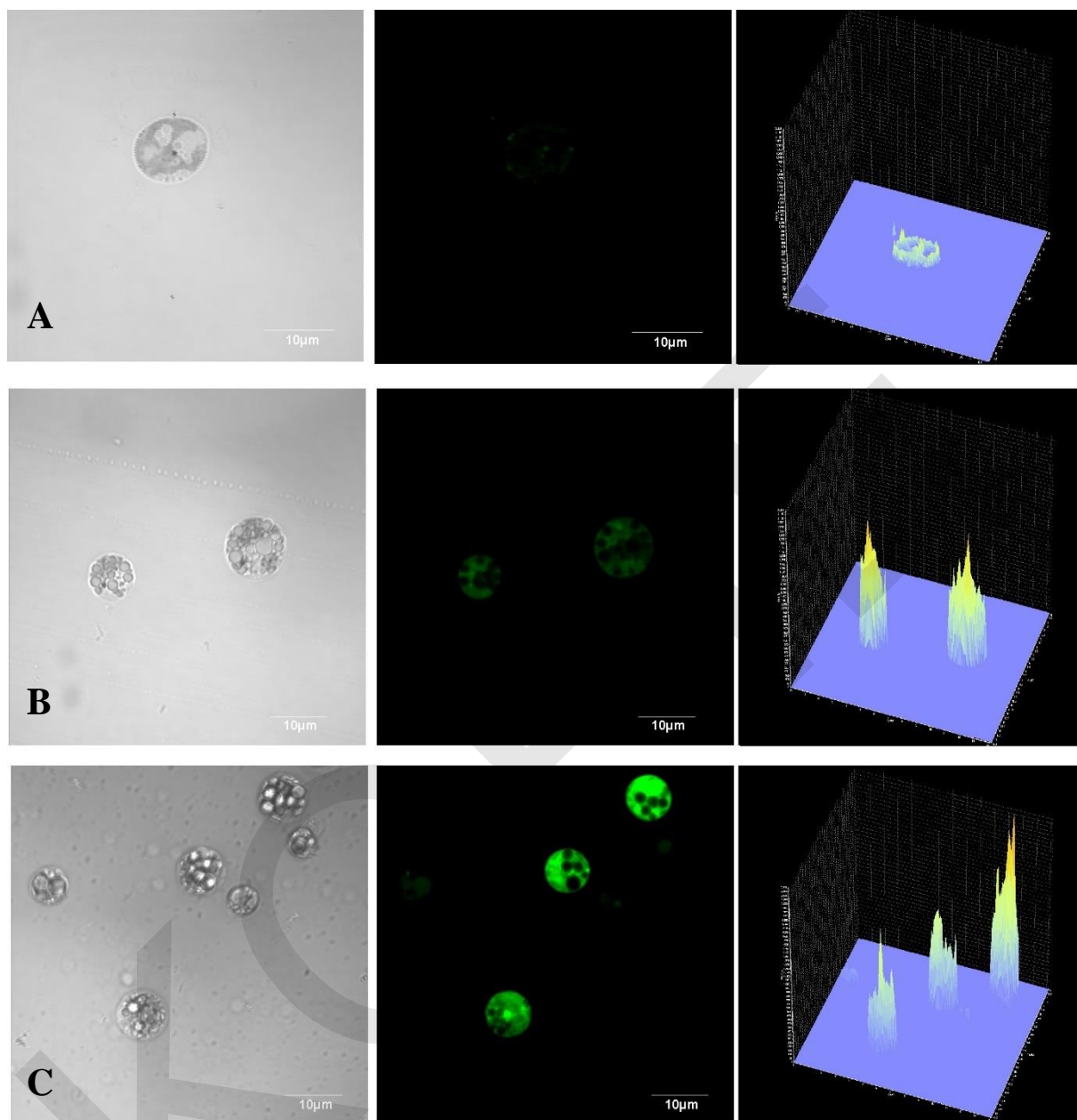
Produkcí oxidu dusnatého buňkami řas kmene CC002-WT demonstruje Obr. 15, který shrnuje rozdíly u neošetřených buněk (kontrola), buněk stresovaných chladovým šokem a CdCl₂. V kontrolních buňkách nebyl detekován téměř žádný signál, po hodinové aplikaci chladového šoku se produkce NO v buňkách zvýšila a nejvyšší byla v důsledku stresu Cd²⁺ ionty. Intenzita signálu ve všech případech detekce NO byla v rozmezí 0-2 200 jednotek jasů. V případě chladového šoku byl signál lokalizován převážně v chloroplastech a při působení kadmia byl tento signál detekovatelný v celé buňce (kromě vakuol). U mutantního kmene CC2929 (Obr. 17) byla situace obdobná jako u CC002-WT, signál byl v průměru o něco slabší. V buňkách kmene CC125 (Obr. 16) byl signál nejsilnější, lokalizovaný převážně v cytoplazmě. V tomto případě byla jeho lokalizace problematictější, protože buňky byly vakuolizovány a obsahovaly řadu škrobových zrn (z důvodu pomalého růstu musela být použita starší kultura z agaru).

5.2.1.1 DETEKCE NO U KMENE CC002-WT



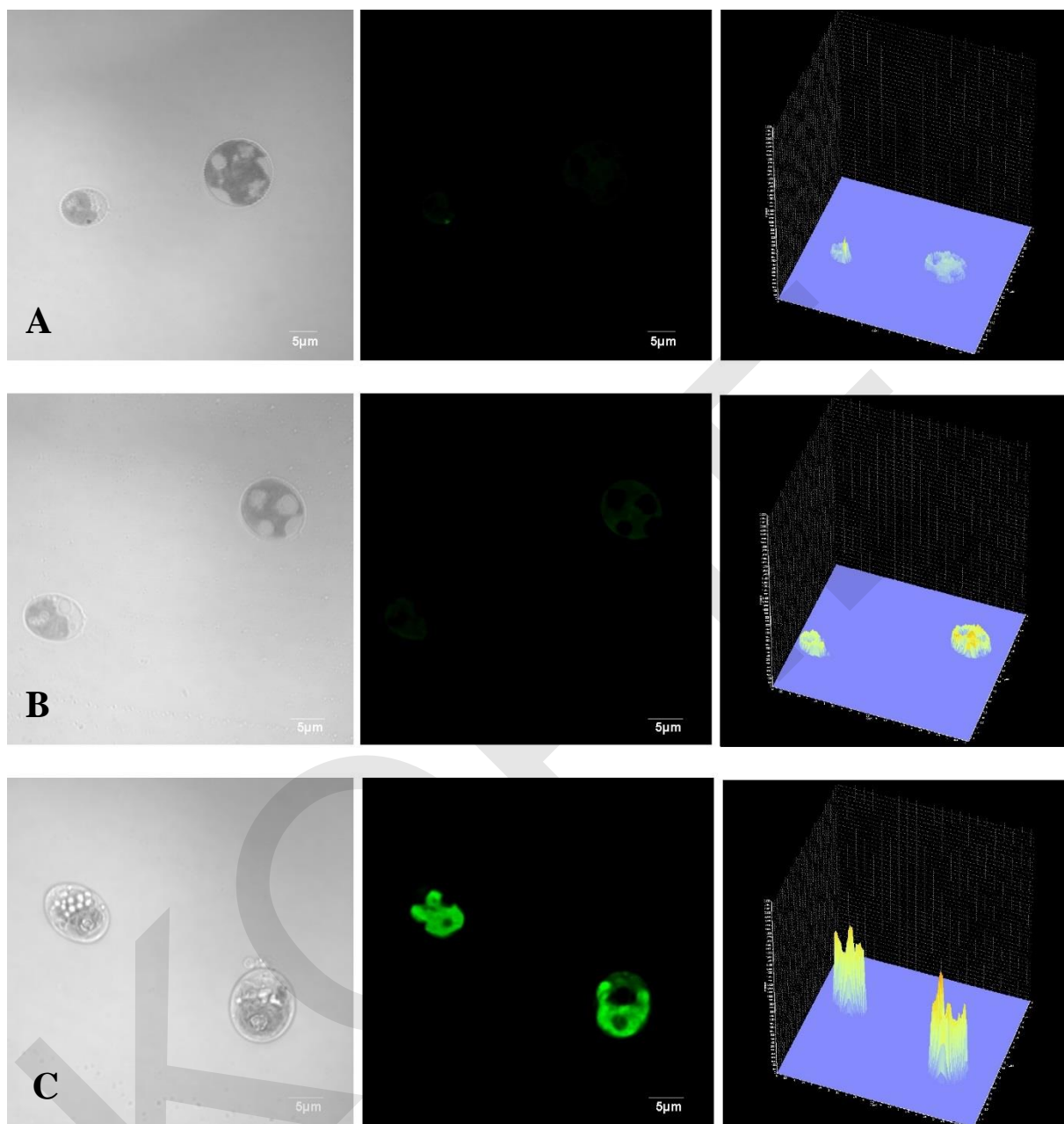
Obr. 15: Lokalizace signálu NO u kmene CC002-WT v kontrolních buňkách (A), v buňkách ovlivněných chladovým šokem (B) a CdCl₂ (C). Vlevo kanál Nomarského DIC, uprostřed fluorescenční kanál (DAF-FM DA) a vpravo integrální rozložení intenzit signálu z prostředního fluorescenčního kanálu. Rozmezí intenzit signálů je 0-2200 jednotek jasu.

5.2.1.2 DETEKCE NO U MUTANTNÍHO KMENE CC125



Obr. 16: Lokalizace signálu NO u kmene CC125 v kontrolních buňkách (A), v buňkách ovlivněných chladovým šokem (B) a CdCl₂ (C). Vlevo kanál Nomarského DIC, uprostřed fluorescenční kanál (DAF-FM DA) a vpravo integrální rozložení intenzit signálu z prostředního fluorescenčního kanálu. Rozmezí intenzit signálů je 0-2200 jednotek jasu.

5.2.1.3 DETEKCE NO U MUTANTNÍHO KMENE CC2929

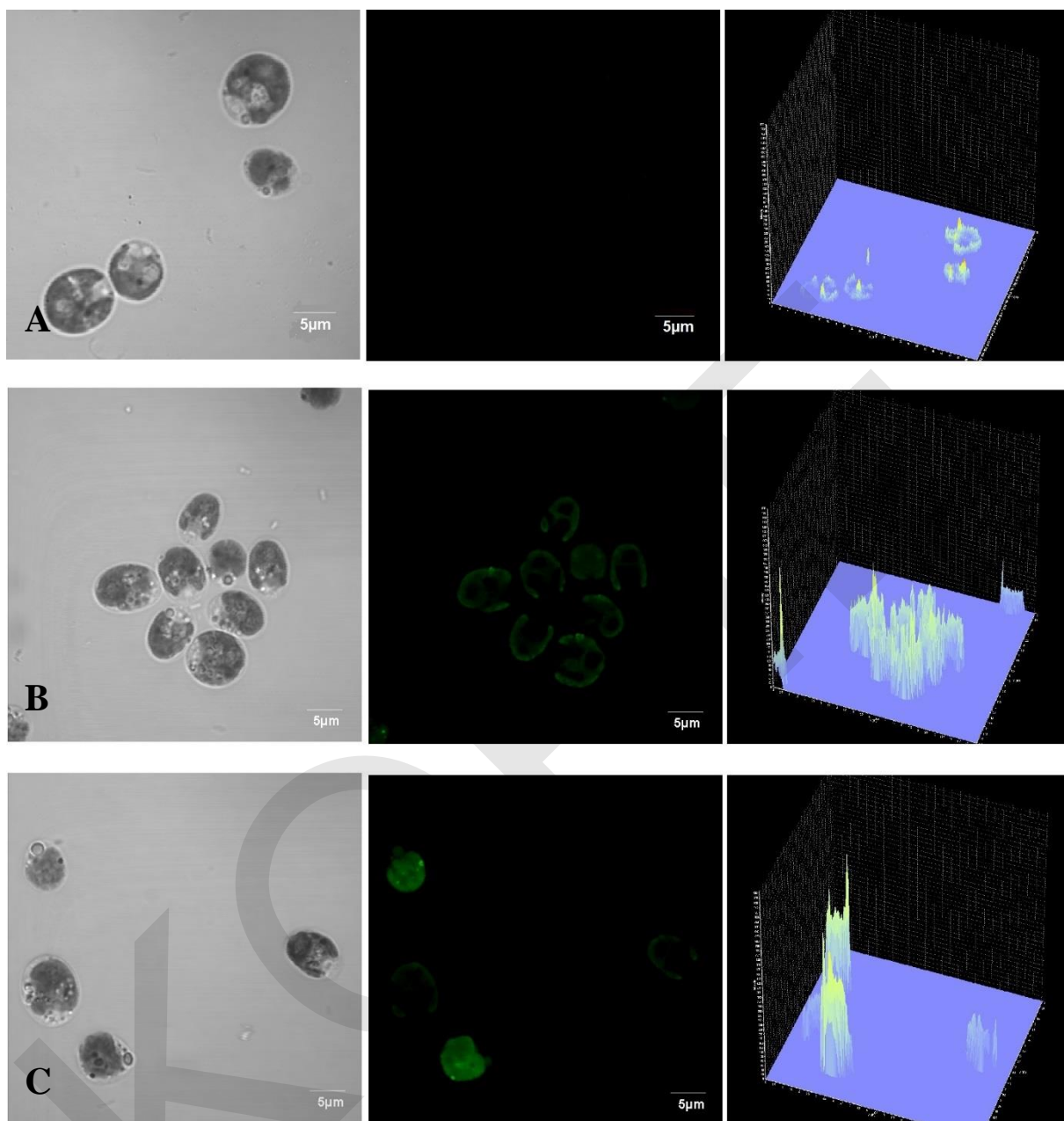


Obr. 17: Lokalizace signálu NO u kmene CC2929 v kontrolních buňkách (A), v buňkách ovlivněných chladovým šokem (B) a CdCl₂ (C). Vlevo kanál Nomarského DIC, uprostřed fluorescenční kanál (DAF-FM DA) a vpravo integrální rozložení intenzit signálu z prostředního fluorescenčního kanálu. Rozmezí intenzit signálů je 0-2200 jednotek jasů.

5.2.2 Detekce ROS pomocí c-H₂DCF DA u kmenů *Ch. reinhardtii*

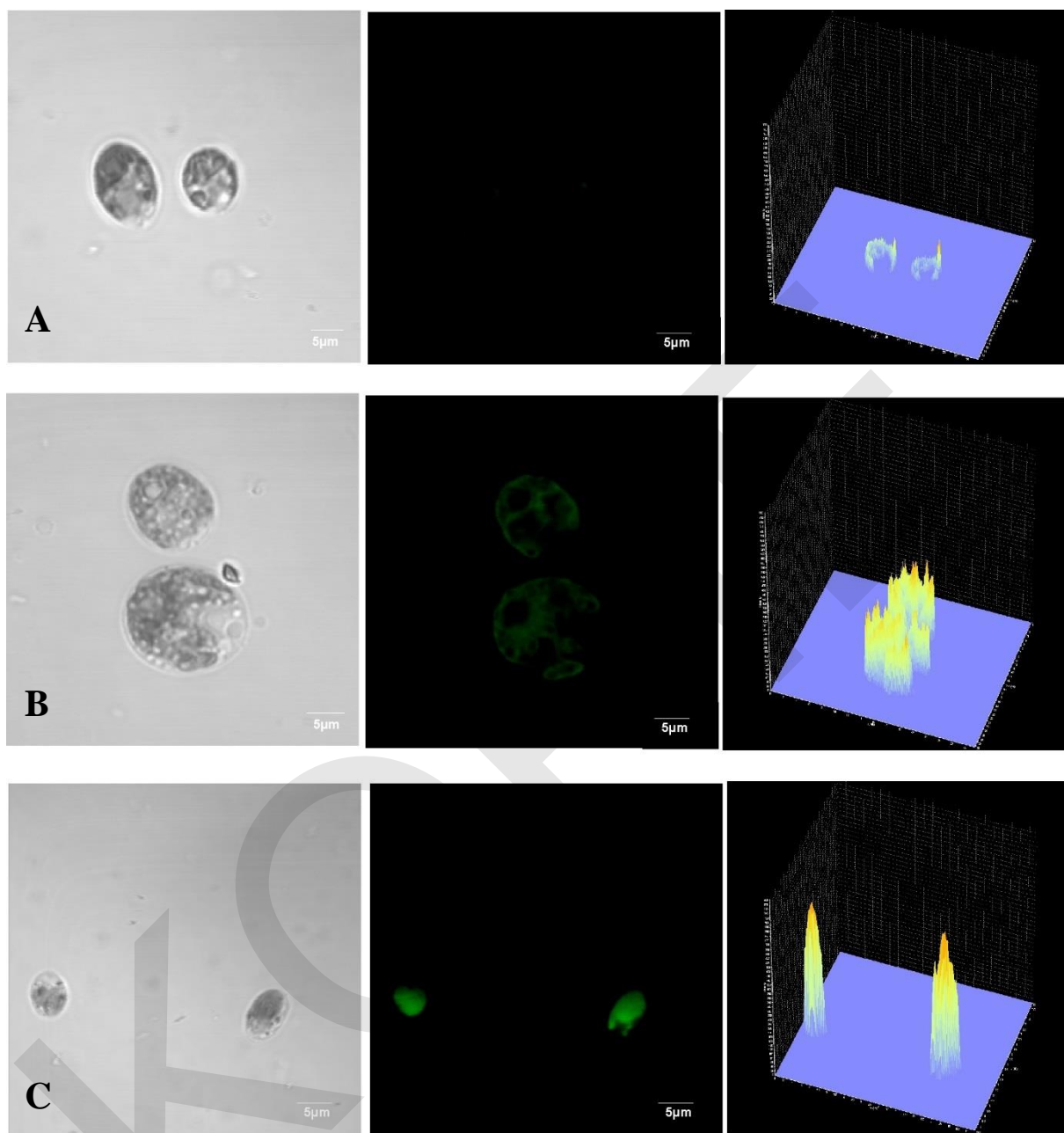
Podobný trend jako u tvorby oxidu dusnatého byl sledován u stresovaných buněk řas také při tvorbě peroxidu vodíku a dalších ROS detekovaných pomocí c-H₂DCF DA. Lokalizace a kvantifikace signálu pro ROS v kontrolních a stresovaných buňkách je zobrazena na Obr. 18 pro kmen CC002-WT, na Obr. 19 pro CC125 a na Obr. 20 pro kmen CC2929. Kontrolní buňky byly opět téměř bez signálu, intenzita signálu se zvyšovala v důsledku chladového šoku a nejvíce vlivem oxidačního stresu po aplikaci CdCl₂. Signál byl u buněk všech kmenů lokalizován převážně v chloroplastech, někdy pouze v okolí membrán (Obr. 18B). Rozmezí intenzit signálu použité pro srovnání jednotlivých kmenů bylo v tomto případě 0-800 jednotek jasů. Nejvyšší signál byl zaznamenán u kmene CC2929 stresovaného kadmíem (Obr. 20).

5.2.2.1 DETEKCE ROS U KMENE CC002-WT



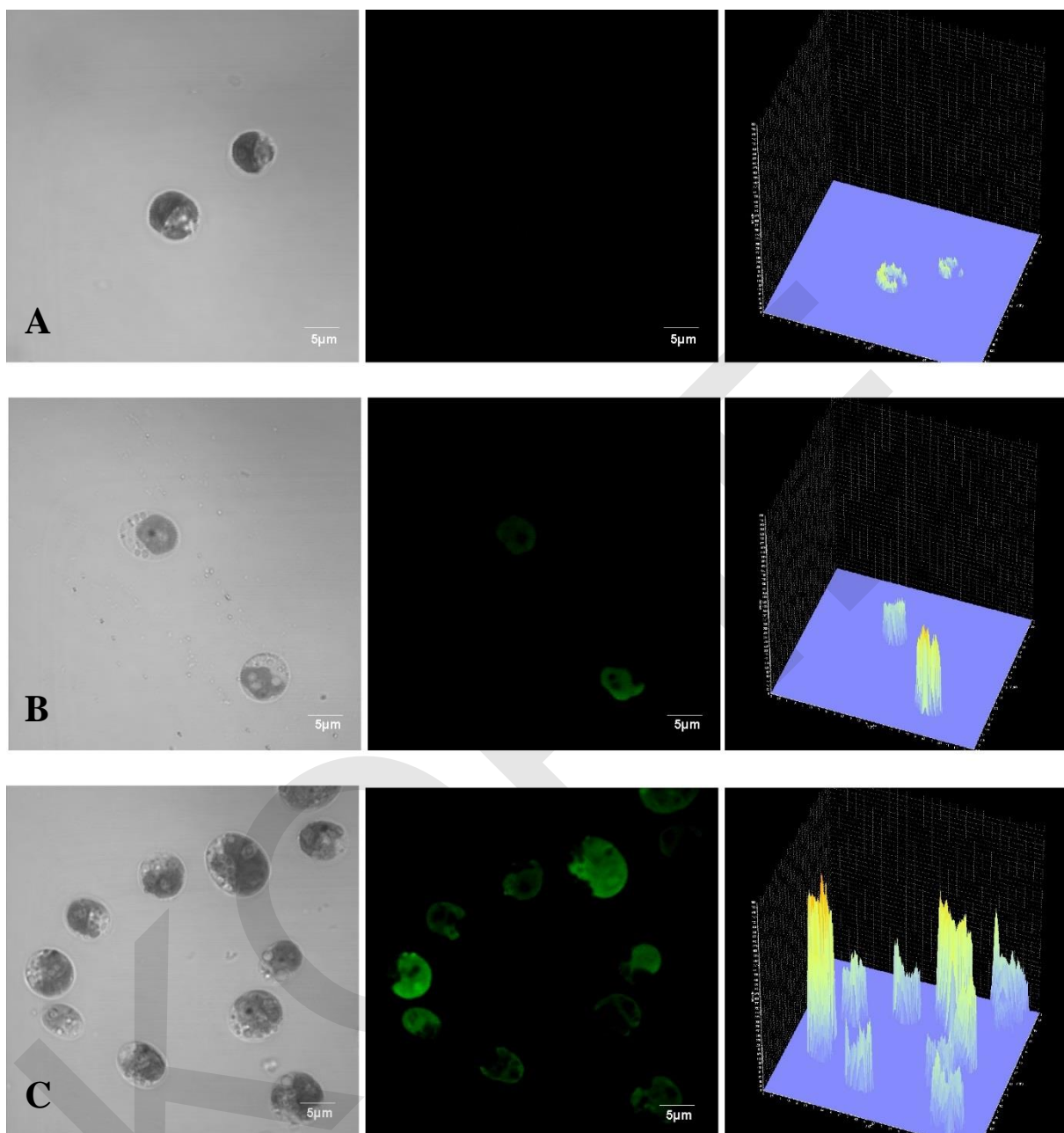
Obr. 18: Lokalizace signálu ROS u kmene CC002-WT v kontrolních buňkách (A), v buňkách ovlivněných chladovým šokem (B) a CdCl₂ (C). Vlevo kanál Nomarského DIC, uprostřed fluorescenční kanál (c-H₂DCF DA) a vpravo integrální rozložení intenzit signálu z prostředního fluorescenčního kanálu. Rozmezí intenzit signálů je 0-800 jednotek jasů.

5.2.2.2 DETEKCE ROS U MUTANTNÍHO KMENE CC125



Obr. 19: Lokalizace signálu ROS u kmene CC125 v kontrolních buňkách (A), v buňkách ovlivněných chladovým šokem (B) a CdCl_2 (C). Vlevo kanál Nomarského DIC, uprostřed fluorescenční kanál (c- $\text{H}_2\text{DCF DA}$) a vpravo integrální rozložení intenzit signálu z prostředního fluorescenčního kanálu. Rozmezí intenzit signálů je 0–800 jednotek jasů.

5.2.2.3 DETEKCE ROS U MUTANTNÍHO KMENE CC2929

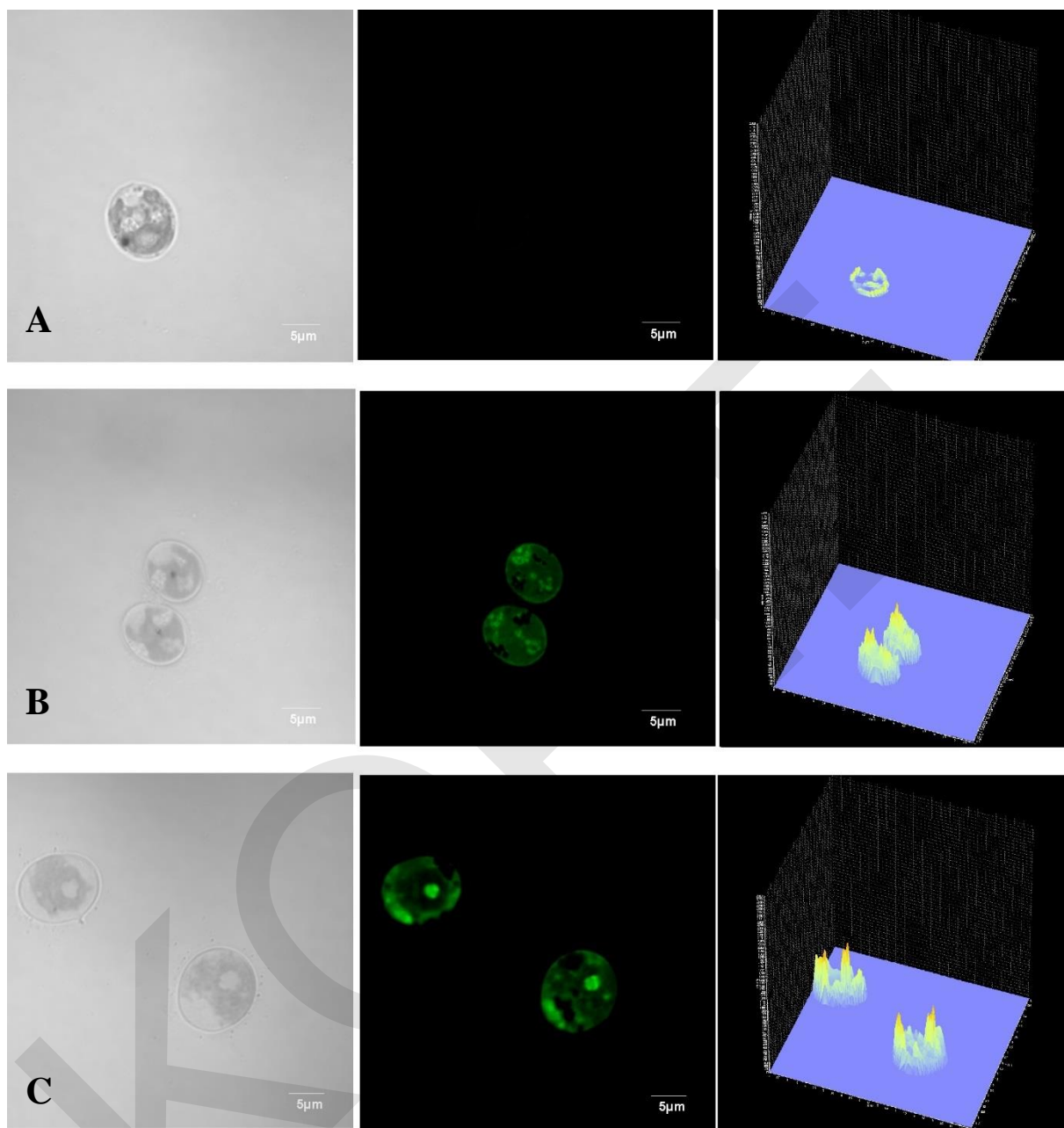


Obr. 20: Lokalizace signálu ROS u kmene CC2929 v kontrolních buňkách (A), v buňkách ovlivněných chladovým šokem (B) a CdCl₂ (C). Vlevo kanál Nomarského DIC, uprostřed fluorescenční kanál (c-H₂DCF DA) a vpravo integrální rozložení intenzit signálu z prostředního fluorescenčního kanálu. Rozmezí intenzit signálů je 0–800 jednotek jasů.

5.2.3 Detekce $^1\text{O}_2$ pomocí SOSG u kmenů *Ch. reinhardtii*

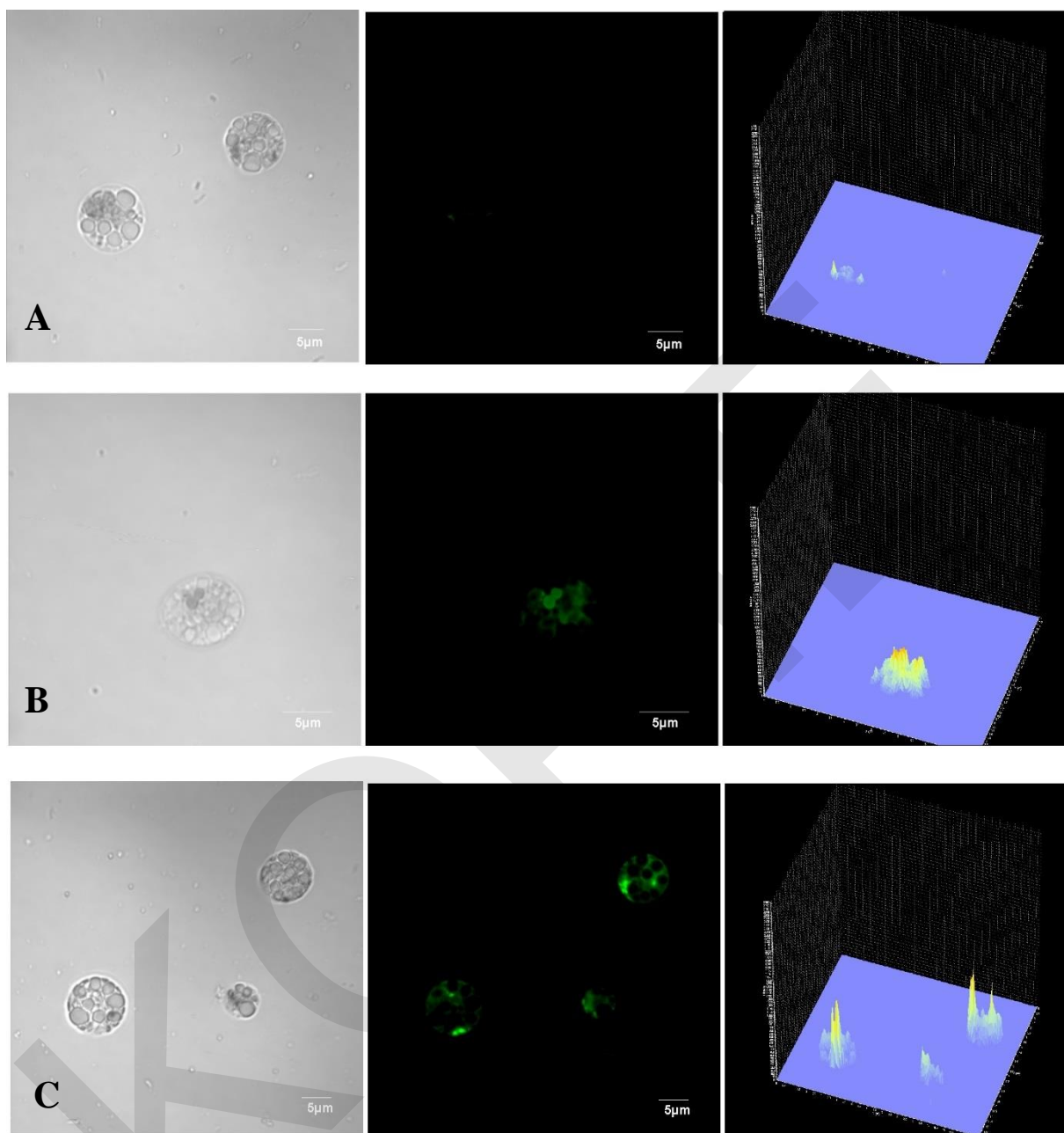
Abiotický stres spouští i tvorbu singletního kyslíku. Po chladovém šoku a aplikaci SOSG byl detekován signál, který měl nižší intenzitu než signál pozorovaný u buněk stresovaných Cd^{2+} . Tento trend byl opět pozorován u všech kmenů (viz Obr. 21-23), ale výrazně nejvyšší tvorba singletního kyslíku byla zaznamenána u kmene CC2929 v důsledku oxidačního poškození buněk ionty kadmia. Použitá intenzita signálu pro srovnání jednotlivých kmenů dosahovala 0-2800 jednotek jasů. Lokalizace signálu v buňkách kmene CC125 byla díky přítomnosti škrobových zrn opět náročnější, ale podobná jako u kmenů CC002-WT a CC2929. Signál se vyskytoval v cytoplazmě i v chloroplastu.

5.2.3.1 DETEKCE $^1\text{O}_2$ U KMENE CC002-WT



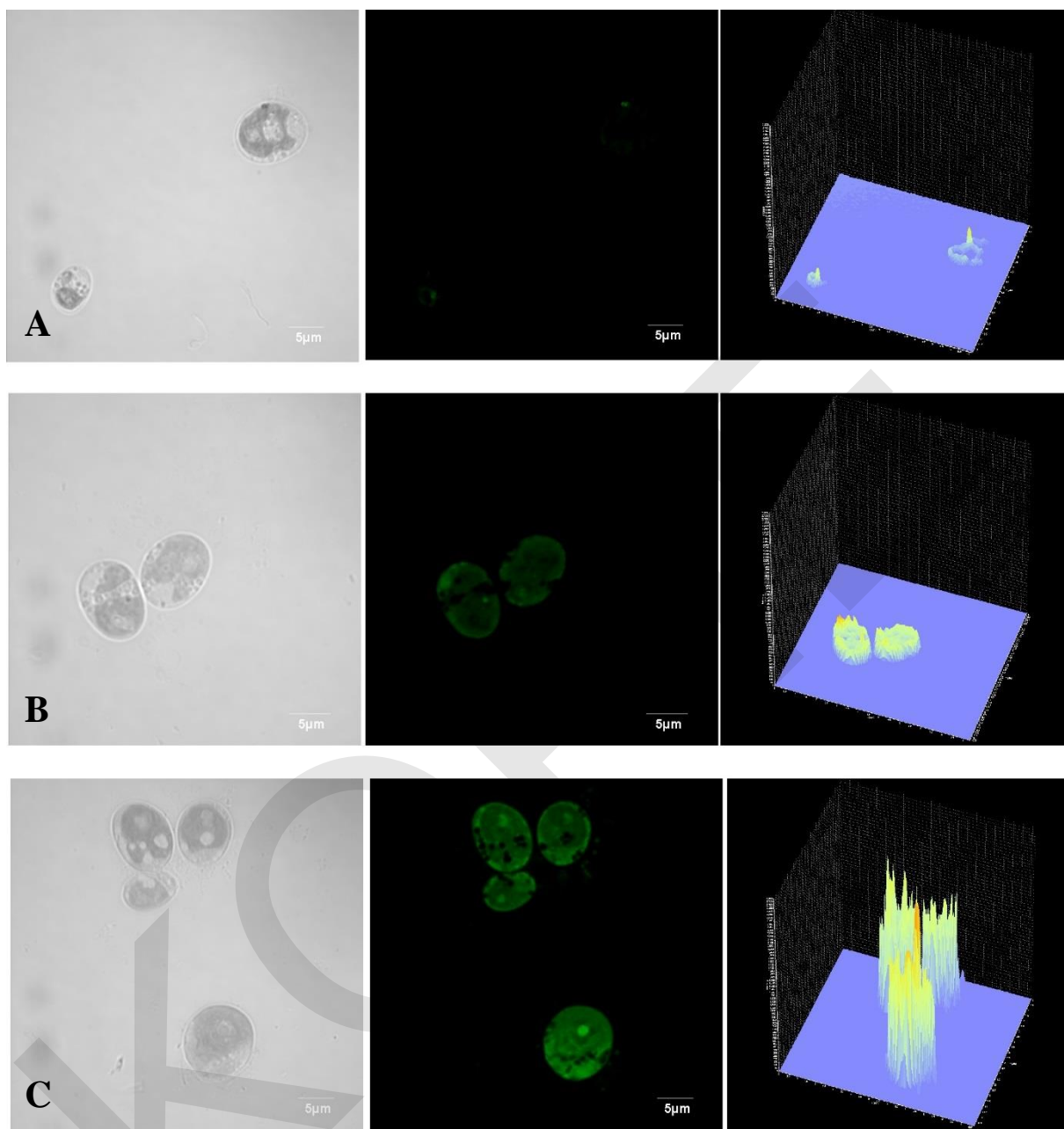
Obr. 21: Lokalizace signálu $^1\text{O}_2$ u kmene CC002-WT v kontrolních buňkách (A), v buňkách ovlivněných chladovým šokem (B) a CdCl₂ (C). Vlevo kanál Nomarského DIC, uprostřed fluorescenční kanál (SOSG) a vpravo integrální rozložení intenzit signálu z prostředního fluorescenčního kanálu. Rozmezí intenzit signálů je 0-2800 jednotek jasů.

5.2.3.2 DETEKCE $^1\text{O}_2$ U MUTANTNÍHO KMENE CC125



Obr. 22: Lokalizace signálu $^1\text{O}_2$ u kmene CC125 v kontrolních buňkách (A), v buňkách ovlivněných chladovým šokem (B) a CdCl_2 (C). Vlevo kanál Nomarského DIC, uprostřed fluorescenční kanál (SOSG) a vpravo integrální rozložení intenzit signálu z prostředního fluorescenčního kanálu. Rozmezí intenzit signálů je 0-2800 jednotek jasů.

5.2.3.3 DETEKCE $^1\text{O}_2$ U MUTANTNÍHO KMENE CC2929

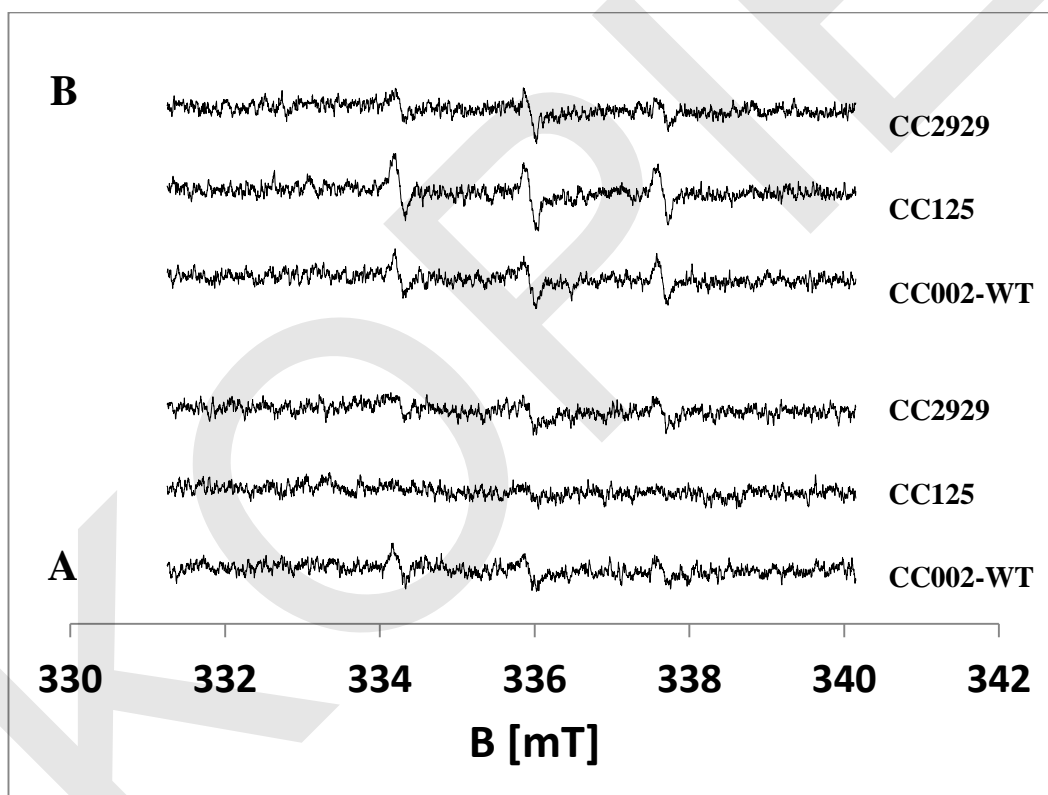


Obr. 23: Lokalizace signálu $^1\text{O}_2$ u kmene CC2929 v kontrolních buňkách (A), v buňkách ovlivněných chladovým šokem (B) a CdCl_2 (C). Vlevo kanál Nomarského DIC, uprostřed fluorescenční kanál (SOSG) a vpravo integrální rozložení intenzit signálu z prostředního fluorescenčního kanálu. Rozmezí intenzit signálů je 0-2800 jednotek jasu.

5.3 Kvantifikace tvorby $^1\text{O}_2$ pomocí EPR spektroskopie

Měřením vzorků jednotlivých kmenů řasy *Chlamydomonas* pomocí EPR spektroskopie bylo provedeno s použitím hydrofilního TEMPD a lipofilního TEMP spin-trapu.

V případě užití hydrofilního spin-trapu nebyl detekován žádný signál. Zatímco při užití lipofilního spin-trapu byl signál již detekovatelný. Dle EPR spekter se v kontrole (Obr. 24A) jednalo pouze o signály nespecifického pozadí, zatímco po dvouhodinové inkubaci buněk s kadmíem se jednalo již o signály vykazující produkci singletního kyslíku (Obr. 24B). Nejnižší koncentrace singletního kyslíku byla zaznamenána u buněk kmene CC002-WT, nejvyšší u kmene CC125. Pozadí bylo však stále dost vysoké a je potřeba tuto metodu optimalizovat.



Obr. 24: Ukázka EPR spektra při měření tvorby singletního kyslíku pomocí TEMP v čase 120 min u kontrolních buněk *Ch. reinhardtii* (A) a buněk stresovaných 0,5mM CdCl_2 (B). Parametry na ose x znázorňují sílu magnetického pole.

6 DISKUSE

V této práci byla studována tvorba RONS, a to především singletního kyslíku, všeobecně reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého. Lokalizace a kvantifikace RONS byla provedena u třech kmenů zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii*, pěstovaných v BBM médiu. Působením abiotického stresu na jednotlivé buněčné suspenze byla vyvolána tvorba RONS, které byly následně histochemicky barveny v živých buňkách a detekovány pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie. Navíc ve vzorcích se vyskytovaly nejen reprezentativní buňky se signálem, ale v menší míře i buňky neobarvené (převážně již mrtvé). Tudiž hodnoty intenzit signálu ilustrované jejich integrálním rozložením v Obr. 15-23 neudávají absolutní množství jednotlivých molekul RONS ve vzorku. Z metodických důvodů však není vhodná současná aplikace CdCl_2 s fluorochromy; při sledování časových změn (studium vlivu doby působení stresoru) je nezbytné zpracování jednotlivých vzorků pro různé časy a dodržovat fixní dobu inkubace vzorku s fluorochromem, aby byly výsledky srovnatelné. U fluorescenčních prób je také nutné dodržovat inkubaci ve tmě, vhodném pH a teplotě, jinak může docházet k autooxidaci a k nespecifickým reakcím s ostatními molekulami (Wardman, 2007).

Co se týče měření singletního kyslíku pomocí EPR spektroskopie, zde je možné signály zaznamenávat postupně již od začátku působení stresoru a výsledné kumulativní hodnoty množství dané molekuly pocházejí z celé populace buněk ve vzorku. Na pracovištích PřF UP byla produkce singletního kyslíku u řasy *Chlamydomonas reinhardtii* CC002-WT nedávno studována v souvislosti s působením vysoké teploty a spektrálních změn světla (Prasad, Sedlářová a Pospíšil, dosud nepublikované údaje). Tvorba singletního kyslíku byla detekována pomocí EPR s použitím lipofilního TEMP spin-trapu (Prasad, dosud nepublikované údaje), který byl použit i v této práci. Příčinou vysokého pozadí a malého množství detekovaného singletního kyslíku v této bakalářské práci mohla být vysoká citlivost spin-trapu na světlo, jeho stárí či jeho omezené pronikání do nitra buněk.

Na začátku experimentů bylo snahou použít stejné metody i u buněk sinic rodů *Synechococcus* a *Synechocystis*, a tak srovnat stejné parametry tvorby RONS u prokaryotických a eukaryotických buněk fotosyntetizujících mikroorganismů. Bohužel však z důvodu vysoké pohyblivosti buněk, jejich shlukování, tvorby slizu a vysoké kontaminace

nebylo možné vhodně dokumentovat signály pomocí konfokální mikroskopie (viz Příloha, Obr. 25 a 26). Proto byly v rámci BP provedeny experimenty pouze na kulturách řas.

V této bakalářské práci je stres buněk *Ch. reinhardtii* vyvolán působením těžkého kovu (kadmia) a působením chladového šoku, který ještě u této řasy nebyl v souvislosti s produkcí RONS studován. Působení kadmia na vznik RONS však u rostlin bylo popsáno, např. na protoplastech okurky, kde 4 h po aplikaci CdCl_2 dochází k oxidačnímu stresu, který korespondoval s nárůstem NO, zatímco po 24-168 hod docházelo k rapidnímu snížení signálu, a také ke snížení množství NO (Piterková *et al.*, 2015). Proto je důležité sledovat působení těžkých kovů především v řadech desítek minut až několika hodin. Zvýšená produkce peroxidu vodíku a superoxidového radikálu vlivem působení kadmia byla zaznamenána také v kořenech vojtěšky (Ortega-Villasante *et al.*, 2005 a 2007), v buňkách sóji (Kopyra *et al.*, 2006), v kořenech a listech hrachu (Romero-Puertas *et al.*, 1999; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006) a v listech rýže (Hsu *et Kao*, 2004).

Působení Cd^{2+} iontu společně s Co^{2+} , Cu^{2+} a Ni^{2+} ionty bylo zatím studováno u dvou mutantních kmenů *Chlamydomonas reinhardtii*, zatím však pouze působení těžkých kovů v závislosti na pH a přítomnosti buněčné stěny. Také u řas, podobně jako u rostlin, toxicita iontů kovů byla nižší u buněk s buněčnou stěnou (kmen. UTCC 11) než buněk mutantního kmene bez buněčné stěny (kmen UTCC). Všechny testované kovy byly pro buňky *Ch. reinhardtii* podstatně méně toxické při pH 5,0, než tomu bylo při pH 6,8 (Macfie *et al.*, 1994).

Mnohé studie prokázaly, že zvýšení toxicity kovů zvýšením pH je výsledkem snížení kompetice mezi kovovým iontem a H^+ iontem na buněčném povrchu (Franklin *et al.*, 2000; De Schamphelaere *et al.*, 2003). Morlon *et al.* (2005) uvedl, že toxicita kovů údajně primárně souvisí s intracelulární akumulací kovů, zatímco Wilde *et al.* (2006) tvrdil, že například zinkem indukovaná inhibice růstu nesouvisí s intracelulární koncentrací zinku, ale s jeho koncentrací extracelulární.

Z praktického hlediska je zajímavé zjištění, že imobilizované buňky *Ch. reinhardtii* v Ca-alginátových kuličkách tvoří velmi účinný biosorbent k odstranění Hg^{2+} , Cd^{2+} a Pb^{2+} z vodného prostředí (Bayramoğlu *et al.*, 2006).

Většina rostlin a řas reaguje na stres vyvolaný těžkým kovem zvýšením množství aminokyseliny prolinu, avšak Siripornadulsil *et al.* (2002) uvedl, že v případě

Chlamydomonas nedochází k akumulaci prolinu v závislosti na expozici kadmia. Jejich výsledky jsou v souladu s dřívějšími výzkumy na buňkách wild-type *Chlamydomonas*, ve kterých téměř polovina všech vazebných míst pro kadmium byla tvořena karboxylovými skupinami (Adhiya *et al.*, 2002).

Kromě studia vlivu Cd^{2+} iontů byly provedeny i studie vlivu jiných kovů například Cu^{2+} , Pb^{2+} a Zn^{2+} iontů, při kterých se zjistilo, že oproti Cd^{2+} mají tyto ionty poněkud odlišné biologické účinky, konkrétně bylo prokázáno, že přímo interagují s tylakoidní membránou chloroplastu, zatímco Cd^{2+} a Ni^{2+} ovlivňují jiné metabolické procesy rostlin (Szalontai *et al.*, 1999).

Vzhledem k tomu, že Cu^{2+} primárně vyvolávají oxidační stres v chloroplastech, zvýšení množství chloroplastové APX a SOD je pravděpodobně účinným způsobem, jak se vyhnout škodlivým účinkům tohoto kovu. Zvýšení aktivity těchto antioxidantních enzymů umožňuje snížení koncentrace $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 v chloroplastech, čímž se snižuje i riziko vzniku $\text{OH}\cdot$ přechodem mezi Cu^+ a Cu^{2+} . Celkově je zvýšení aktivity peroxidasy považováno za indikátor stresu vyvolaný fyto toxicitou těžkých kovů, přičemž dochází k narušení plazmatické membrány lipidovou peroxidací a vlivem akumulace těžkých kovů dochází k produkci ROS (Macfarlane *et Burchett*, 2001).

V rámci této bakalářské práce bylo zjištěno, že působením abiotického stresu, a to chladového šoku i působením kadmiových iontů dochází k nárůstu tvorby reaktivních forem kyslíku a dusíku. Mikroskopicky zaznamenaný nárůst signálu pro singletní kyslík, NO a ROS všeobecně vykazoval u všech testovaných kmenů stejný trend, přičemž signál byl slabší v případě působení chladového šoku než při působení CdCl_2 . V malém množství dochází k tvorbě RONS i za fyziologických podmínek, jak bylo pozorováno u kontrolních buněk. Mutantní kmeny CC125 a CC2929 jeví vyšší citlivost k daným stresorům. Produkce singletního kyslíku v závislosti na stres vyvolaný kadmíem, byla u všech testovaných kmenů *Chlamydomonas* také potvrzena metodou elektronové paramagnetické rezonance.

7 ZÁVĚR

Z výsledků vyplývá, že buňky *Chlamydomonas reinhardtii* jsou mnohem více stresovány působením kadmia než snížením teploty, kterému jsou řasy vystaveny v přírodě a vůči kterému měly jejich buňky možnost si během fylogeneze vytvořit obranné mechanismy. Přítomnost Cd^{2+} vede k oxidačnímu stresu, který byl histochemicky lokalizován v buňkách i po odstranění stresoru. Lokalizace signálu NO u testovaných kmenů CC002-WT a CC2929 byla v případě chladového šoku sledována především v chloroplastech a při působení kadmia částečně i v cytoplazmě, zatímco tvorba singletního kyslíku byla lokalizována v celé buňce (kromě vakuol) a ROS byly detekovány převážně v chloroplastech. Lokalizace signálu RONS u kmene CC125 byla poněkud obtížná, jelikož byly použity buňky kultivované na pevném médiu, což zapříčinilo tvorbu zásobních škrobových granulí a vakuolizaci. Produkce singletního kyslíku v důsledku aplikace kadmia byla také potvrzena pomocí EPR spektroskopie, ikdyž hladiny byly nízké a je potřeba metodu dále optimalizovat.

V dalších experimentech by bylo vhodné podrobněji studovat mechanismy oxidačního poškození u řas vlivem stresu způsobeného působením kadmia (lipidová peroxidace, studium tvorby dalších RONS a enzymů zapojených do jejich metabolismu). V budoucnosti bude také důležité stanovit mechanismus vzniku singletního kyslíku a oxidu dusnatého, které jsou spolu s peroxidem vodíku důležitými signálními molekulami nejen u rostlin. Při studiu těchto signálních drah bude díky poměrně široké sbírce mutantů modelové zelené řasy *Ch. reinhardtii* možné využít další specifické mutanty a zapojením různých biofyzikálních, biochemických a molekulárních metod rozšířit naše poznání o nízkomolekulárních signálních molekulách.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adhiya, J., Cai, X. H., Sayre, R. T., Traina, S. (2002): Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 210: 1-11.
- Alvarez, B., Radi, R. (2003): Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino acids*, 25: 295-311.
- Apel, K., Hirt, H. (2004): Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399.
- Asada, K. (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Plant Molecular Biology*, 50: 601-639.
- Asada, K. (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141: 391-396.
- Asada, K., Takahashi, M. (1987): Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D. J. Osmond, C. B., Arntzen, C. J. (eds.): *Photoinhibition*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 227-287.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. (2014): *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, pp. 141-172. ISBN: 978-1-4398-6732-7.
- Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M., Arica, M. Y. (2006): Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *International Journal of Mineral Processing*, 81: 35-43.
- Benedetti, A., Comporti, M., Esterbauer, H. (1980): Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 620: 281-296.
- Bischoff, H. W., Bold, H. C. (1963): Phycological Studies IV. Some Soil Algae From Enchanted Rock and Related Algal Species. *The University of Texas Publications*, 6318: 1-95.
- Bold, H. C. (1949): The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. *Bull. Torrey Botanical Club*, 76: 101-108.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D. (1994): Superoxide dismutase in plants. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, 13:199-218.
- Bradbury, S., Evennett, P. J. (1996): *Contrast Techniques in Light Microscopy. Fluorescence microscopy*. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 118. ISBN: 978-1859960851.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (1995): Introduction. In: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (Eds.). *Carotenoids Isolation and Analysis*. Birkhäuser, Basel, pp. 13-17.
- Buchert, F., Forreiter, Ch. (2010): Singlet oxygen inhibits ATPase and proton translocation activity of the thylakoid ATP synthase CF1CFo, *FEBS Letters*, 584: 147-152.
- Cardozo, K. H. M., Oliviera, M. A. L., Tavares, M. F. M., Colepicolo, P., Pinto, E. (2002): Daily oscillation of fatty acids and malon-dialdehyde in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Biological. Rhythm Research*, 33: 371-382.
- Collins, A. (2001): Carotenoids and genomic stability. *Mutation Research*, 475: 1-28.
- Conner, S. D., Shimid, S. L. (2003): Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422: 37-44.
- Creelman, R. A., Mullet, J. E. (1997): Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 355-381.
- Cumming, J. R., Taylor, G. J. (1990): Mechanisms of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm. In: Alscher, R. G. et Cumming, J. R. (eds.): *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimatation Mechanisms*. Wiley-Liss, New York, pp. 329-356.
- Dat, J. F., Foyer, C. H., Scott, I. (1998): Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 118: 1455-1461.

- De Schamphelaere, K. A. C., Vasconcelos, F. M., Heijerick, D. G., Tack, F. M. G., Delbeke, K., Allen, H. E. *et al.* 2003: Development and field validation of a predictive copper toxicity model for the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 2454-2465.
- Dean, J. V., Harper, J. E. (1988): The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiology*, 88: 389-395.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., Lamb, C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394 : 585-588.
- Dianzani, M., Barrera, G. (2008): Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. In: Álvarez, S.; Evelson, P. (ed.), *Free Radical Pathophysiology*, pp. 19-38, Transworld Research Network: Kerala, India, ISBN: 978-81-7895-311-3.
- Dicosmo, F., Misawa, M. (1985): Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. *Trends in Biotechnology*, 3: 318-322.
- Dürner, J., Klessig, D. F. (1999): Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 369-374.
- Edreva, A. M., Velikova, V., Tsonev, T. (2000): Phenylamides in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54: 287-301.
- Egger, M. D., Petran, M. (1967): New Reflected-Light Microscope for Viewing Unstained Brain and Ganglion Cells, *Science*, 157: 305-307.
- Esterbauer, H., Eckl, P., Ortner, A. (1990): Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation Research*, 238: 223-233.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Dianzani, M. U. (1982): Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochemical Journal*, 208:129-140.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H. (1991): Chemistry and Biochemistry of 4-droxyononol, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11: 81-128.
- Farmer, E. E., Almeras, E., Krishnamurthy, V. (2003): Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 372-378.
- Fisher, B. B., Dayer, R., Wiesendanger, M., Eggen, R. I. L. (2007): Independent regulation of the GPXH gene expression by primary and secondary effects of high light stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum*, 130: 195-206.
- Fisher, B. B., Eggen, R. I. L., Trebst, A., Krieger-Liszky, A. (2006): The glutathione peroxidase homologous gene Gpxh in *Chlamydomonas reinhardtii* is upregulated by singlet oxygen produced in photosystem II. *Planta*, 223: 583-590.
- Flors, C., Fryer, M. J., Waring, J., Reeder, B., Bechtold, U., Mullineaux, PM., Nonell, S., Wilson, MT., Baker, NR. (2006): Imaging the production of singlet oxygen *in vivo* using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1725-1734.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2009): Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11: 861-905.
- Foyer, C. H., Bloom A. J., Queval G., Noctor, G. (2009): Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 455-484.
- Franklin, N. M., Adams, M. S., Stauber, J. L., Lim, R. P. (2000): Development of a rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flowcytometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40: 469-480.
- Fridovich, S., Porter, N. (1981): Oxidation of arachidonic acid in micelles by superoxide and hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 256: 260-265, ISSN:0021-9258.
- Gibella, M., Crucqa, A-S., Tilquina, B., Stockerb, P., Lesgardsb, G., Rac, J. (2000): Electron spin resonance studies of some irradiated pharmaceuticals. *Radiation Physics and Chemistry*, 58: 69-76.

- Giera, M., Lingeman, H., Niessen, W. M. A. (2012): Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde(MDA): a brief overview. *Chromatographia*, 75: 433–440.
- 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.
- Gollmer, A., Arnbjerg, J., Blaikie, F. H., Pedersen, B. W., Breitenbach, T., Daasbjerg, K., Glasius, M., Ogilby, P. R. (2011): Singlet Oxygen Sensor Green®: Photochemical Behavior in Solution and in a Mammalian Cell. *Photochemistry and Photobiology*, 87: 671-679.
- Griffith, M., Yaish, M. W. (2004): Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science*, 9: 399-405.
- Gupta, K. J., Igamberdiev, A. U. (2011): The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. *Mitochondrion*, 11: 537-543.
- Hakala-Yatkin, M., Tyystjärvi, E. (2011): Inhibition of photosystem II by the singlet oxygen sensor compounds TEMP and TEMPD. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*, 1807: 243-250.
- Halliwell, B. (1982): Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxyl radicals *in vivo*. *Biochemical Journal*, 205: 461-463.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999): Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. Oxford University Press, New York, pp. 936. ISBN: 0198500440.
- Harris, E. H. (2009): The *Chlamydomonas* Sourcebook: Introduction to *Chlamydomonas* and Its Laboratory Use. Volume I. Academic press, San Diego, pp. 480. ISBN: 978-0-12-370874-8.
- Hatz, S., Lambert, J. D., Ogilby, P. R. (2007): Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6: 1106-1116.
- Hideg, E., Barta, C., Kalai, T., Vass, I., Hideg, K., Asada, K. (2002): Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant and Cell Physiology*, 43: 1154-1164.
- Hsu, Y. T., Kao, C. H. (2004): Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 42: 227-238.
- Chari, S., Dworkin, I. (2013): The Conditional Nature of Genetic Interactions: The Consequences of Wild-Type Backgrounds on Mutational Interactions in a Genome-Wide Modifier Screen. *PLOS Genetics*, 9: e1003661.
- Charles, S. A., Halliwell, B. (1980): Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biphosphatase. *Biochemical Journal*, 189: 373-376.
- Ignarro, L. J. (2000): Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, 2nd ed. Academic Press, San Diego, pp. 1017. ISBN: 0-12-370420-0.
- Ignarro, L. J., Harbison, R. G., Wood, K. S., Kadowitz, P. J. (1986): Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 237: 893-900.
- Jánská, A., Maršík, P., Zelenková, S., Ovesná, J. (2010): Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology*, 12: 395-405.
- Jones, W. E., Hartl, D. L. (1997): Genetics: Principles and Analysis. 4th ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, pp. 840. ISBN: 978-0763704896.
- Kalina, T., Váňa, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. 1. vyd. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, Praha, pp. 606. ISBN: 80-246-1036-1.
- Kiernan, J. A. (2008): Histological and histochemical methods: theory and practice. 4th ed. Department of Anatomy and Cell Biology, The University of Western. Scion Publishing, Oxford, 606 pp. ISBN: 978-1904842422.
- Kojima, H., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, t., Hirata, Y., Nagano, T. (1999). Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angewandte Chemie International Edition*. 38: 3209-3212.

- Kopyra, M., Stachon-Wilk, M., Gwózdź, E. A. (2006): Effects of endogenous nitric oxide on the antioxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28: 525-536.
- Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C., Trebst, A. (2008): Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, 98: 551-564.
- Kupková, Z., Beneš, L. (2004): Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chemické listy*, 98: 116-122. ISSN: 0009-2770.
- Lang, K., Mosinger, J., Wagnerová, D. M. (2005): Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku. *Chemické listy*, 99: 211-221. ISSN: 0009-2770.
- Larcher, W. (1995): Physiological plant ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. 4th ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 513. ISBN: 978-3540435167.
- Lavis, L. D. (2011): Histochemistry. Live and in color. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 59: 139-145.
- Ledford, H. K., Chin, B. L., Niyogi, K. K. (2007): Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 6: 919-930.
- Lion, Y., Gandin, E., Van de Vorst, A. (1980): On the production of nitroxide radicals by singlet oxygen reaction: an EPR study. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 31: 305-309.
- Macfarlane, G. R. & Burchett, M. D. 2001. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 233-40.
- Macfie, S. M., Tarmohamed, Y., Welbourn, P. M. (1994): Effects of Cadmium, Cobalt, Copper, and Nickel on Growth of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The Influences of the Cell Wall and pH. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27: 454-458.
- Mahajan, S., Tuteja, N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158.
- Meints, R., Lee, K., Burbank, D., Van Etten, J. (1984): Infection of a *Chlorella*-like alga with the virus, PBCV-1: Ultrastructural studies. *Virology*, 138: 341-346.
- Mendez-Alvarez, S., Leisinger, U., Eggen, R. I. (1999): Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Microbiology*, 2 : 15-22.
- Moan, J., Wold, E. (1979): Detection of singlet oxygen by ESR. *Nature*, 279: 450-451.
- Morlon, H., Fortin, C., Adam, C., Garnier-Laplace, J. (2005): Cellular quotas and induced toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Radioprotection*, 40: 101-106.
- Mueller, M. J. (1997): Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 100: 653-663.
- Müller, P., Li, X-P., Niyogi, K. K. (2001): Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125: 1558-1566.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., Hancock, J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1237-1247.
- Noctor, G., De Paepe, R., Foyer C. H. (2007): Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, 12: 125-134.
- Ortega-Villasante, C., Hernández, L.E., Rellán-Alvarez, R., Del Campo, F. F., Carpena-Ruiz, R. O. (2007): Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New Phytologist*, 176: 96-107.
- Ortega-Villasante, C., Rellán-Alvarez, R., Del Campo, F. F., Carpena-Ruiz, R. O., Hernández, L. E. (2005): Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *The Journal of Experimental Botany*, 56: 2239-2251.
- Pawley, J. B. (2005): Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd ed. Springer Science and Business Media LLC, New York, pp. 985. ISBN: 978-0-387-45524-2.

- Pedersen, S. K., Holmehave, J., Blaikie, F. H., Gollmer, A., Breitenbach, T., Jensen, H. H., Ogilby, P. R. (2014): Aarhus sensor green: a fluorescent probe for singlet oxygen. *The Journal of Organic Chemistry*, 79: 3079-3087.
- Pedrajas, R. J., Peinado, J., López-Barea, J. (1993): Purification of Cu-Zn-superoxide dismutase isoenzymes from fish liver: appearance of new isoforms as a consequence of pollution: *Free Radical Research Communications*, 19: 29-41.
- Pfannschmidt, T., Brautigam, K., Wagner, R., Dietzel, L., Schroter, Y., Steiner, S., Nykytenko A. (2009): Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding. *Annals of Botany*, 103: 599-607.
- Piterková, J., Luhová, L., Navrátilová, B., Sedlářová, M., Petřivalský, M. (2015): Early and long-term responses of cucumber cells to high cadmium concentration are modulated by nitric oxide and reactive oxygen species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37: pp. 19.
- Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P. (2005): Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslík a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy*, 99: 455-466. ISSN: 0009-2770.
- Plaine, H. L. (1955): The effect of oxygen and hydrogen peroxide on the action of a specific gene and on tumour induction in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 40: 268-280.
- Plášek, J. (1995): Konfokální mikroskop - renesance experimentálních metod. *Vesmír*, 74: 508-510.
- Porter, T., Duff, T. (1984): Compositing digital images. *Computer Graphics*, 18: 253-259.
- Pouličková, A., Jurčák, J. (2001): Malý obrazový atlas našich sinic a řas. 1. vyd. Univerzita Palackého v Olomouci, Polygrafické středisko VUP, Olomouc, pp. 81. ISBN 80-244-0242-4.
- Prasad, A., Pospíšil, P. (2013): Towards the two-dimensional imaging of spontaneous ultra-weak photon emission from microbial, plant and animal cells. *Scientific Reports*, 3: 1211, pp. 8.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. (1998): Fyziologie rostlin. Nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha, pp. 484. ISBN 80-200-0586-2.
- Rác, M., Sedlářová, M., Pospíšil, P. (2015): The formation of electronically excited species in the human multiple myeloma cell suspension. *Scientific Reports*, 5:8882, pp. 8.
- Rivetta, A., Negrini, N., Cocucci, M. (1997): Involvement of Ca²⁺ calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant, Cell and Environment*, 20: 600-608.
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Zabalza, A., Corpas, F. J., Gómez, M., Del Río, L. A., Sandalio, L. M. (2006): Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1532-1544.
- Romero-Puertas, M. C., McCarthy, T., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Corpas, F. J., Gómez, M., Del Río, L. A. (1999): Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Radical Research*, 31: 25-31.
- Sha Valli Khan, P. S., Nagamallaiah, G. V., Dhanunjay Rao, M., Sergeant, K., Hausman, J. F. (2014): Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance. Chapter 2: Abiotic stress tolerance in plants Insights from proteomics. Volume II. Parvaiz Ahmad and Saiema Rasool (eds.). Academic Press, San Diego, pp. 23-68. ISBN: 978-0-12-800875-1.
- Schaunstein, E. (1967): Autoxidation of polyunsaturated esters in water: chemical structure and biological activity of the products. *Journal of Lipid Research*, 8: 417-428.
- Sies, H. (1985): Oxidative stress. Academic Press, London, pp. 507. ISBN: 0-12-642760-7.
- Sinha, R. K., Komenda, J., Knoppová, J., Sedlářová, M., Pospíšil, P. (2012): Small CAB-like proteins prevent formation of singlet oxygen in the damaged Photosystem II complex of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant, Cell & Environment*, 35: 806-818.
- Sinnhuber, R. O., Yu, T. C., Yu, T. C. (1958): Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Journal of Food Science*, 23: 626-634.

- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, S. D., Sayre, R. T. (2002): Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *The Plant Cell*, 14: 2837-2847.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z. (2007): The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica*, 54: 39-50.
- Slobodianová, L. (2014): Studium vlivu oomycet a elicitorů na obrannou reakci rostlin. Bakalářská práce. Depon. In: Katedra botaniky. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Stephens, D. J., Allan, V. J. (2003): Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science*, 300: 82-86.
- Szalontai, B., Horvath, L. I., Debreczeny, M., Droppa, M., Horvath, G. (1999): Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (eSR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 61: 241-252.
- Terraski, M., Dailey, M. E. (1995): Confocal microscopy of live cells. Chapter 19. Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd ed., Pawley J. (eds.) 2006. Springer Science and Business Media, LLC, New York, pp. 327-346. ISBN: 978-0-387-45524-2.
- Thomas, D. J., Thomas, J. B., Prier, S. D., Nasso, N. E., Herbert, S. K. (1999): Iron superoxide dismutase protects against chilling damage in the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942. *Plant Physiology*, 120: 275-282.
- Triantaphylidès, C., Havaux, M. (2009): Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 14: 219-228.
- Triantaphylidès, C., Krischke, M., Hoerberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M. (2008): Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology*, 148: 960-968.
- Van Ho, A., Ward, D. M., Kaplan, J. (2002): Transition metal transport in yeast. *Annual Review of Microbiology*, 56: 237-261.
- Vandana, S., Sustmann, R., Rauen, U., Stöhr, Ch. (2012): FNOCT as a fluorescent probe for *in vivo* localization of nitric oxide distribution in tobacco roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59: 80-89.
- Večeřová, V. (2013): Reaktivní formy kyslíku a dusíku při stresu rostlin. Bakalářská práce. Depon. In: Katedra botaniky. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Vogler, T., Studer, A. (2008): Applications of TEMPO in synthesis. *Synthesis*, 13: 1979-1993.
- Wardman, P. (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology and Medicine*, 43: 995-1022.
- Weil, J. A., Bolton, J. R. (2007): Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications. Canada, pp. 688. ISBN 978-0471-75496-1.
- Wertz, J. E., Bolton, J. R. (1972): Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications. McGraw-Hill, New York, pp. 496. ISBN 07-069454-0.
- Wilcox, C. S. (2010): Effects of Tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacology and Therapeutics*, 126: 119-145.
- Wilde, K. L., Stauber, J. L., Markich, S. J., Franklin, N. M., Brown, P. L. (2006): The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51: 174-185.
- Yamada, T., Onimatsu, H., Van Etten, J. (2006): *Chlorella* Viruses. *Advances in Virus Research*, 66, 293-336.
- Yamasaki, H., Sakima, Y. (2000): Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters*, 468: 89-92.
- Zalups, R. K., Ahmad, S. (2003): Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 186: 163-188.

Internetové zdroje

- Adams, M.: *Chlamydomonas* teaching centre. Growth and Mating. Biology Dept. Eastern Connecticut State University [online] [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: <http://nutmeg.easternct.edu/~adams/ChlamyTeach/>
- Brickley, M. (2003): Algae under stress: Characterisation and comparison of bioenergetics and intracellular signalling during stress in two model algal systems. Harper Adams University [online] [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: <http://www.harper-adams.ac.uk/search/>
- Flynn, P. (2003): Biotic vs. Abiotic-Distinguishing Disease Problems from Environmental Stresses. Department of Plant Pathology. Iowa State University [online] [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/hortnews/2003/9-12-2003/stresses.html>
- History of microscope (2010) [online] [cit. 2015-03-14]. Dostupné z: <http://www.history-of-the-microscope.org/anton-van-leeuwenhoek-microscope-history.php>
- Laudon, M. *Chlamydomonas* Resource Center. Strains. University of Minnesota. Biological Science Center [online] [cit. 2015-03-14]. Dostupné z: <http://chlamycollection.org/strain/cc-2929-sr1-ac17-nit1-e18-mt-lefebvre-a54-e18/>
- Life Technologies (2015) [online] [cit. 2015-03-12]. Dostupné z: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D23844?ICID=search-product>, <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C400>, <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/S36002>
- Olympus America (2012): Confocal Microcopy. Introduction to Confocal Microscopy [online] [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>
- Plachý, R. (2004): Metody mikroskopie. Obrazová analýza. Ústav lékařské biologie. Lékařská fakulta Univerzity Palackého [online] [cit. 2015-03-14]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/mikroskopie/>
- Sigma Aldrich Co. LLC (2015) [online] [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/115754?lang=en®ion=CZ>, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/459119?lang=en®ion=CZ>
- UniProt Consortium (2015) [online] [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/A8J4P9>

9 SEZNAM ZKRATEK

$^1\text{O}_2$	Singletní kyslík
3D	Trojrozměrný
$^3\text{O}_2$	Kyslík
4-HNE	4-hydroxynonenal
APX	Askorbát peroxidasa
ASG	„Aarhus Sensor Green“
ASG-EP	Endoperoxid ASG
BBM	„Bold Basal“ médium
c-DCF	5-(a-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein
c-H ₂ DCF DA	5-(a-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
CO ₂	Oxid uhličitý
DAF-2	4,5-diaminofluorescein
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetát
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein
DAN	Naftalen-2,3-diamin
DIC	Diferenciální interferenční kontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EPR	Elektronová paramagnetická rezonance
FNOCT	„Fluorescent Nitric Oxide Cheletropic Trap“
GPXH	Glutathion peroxidasa
GSH	Glutathion
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HO·	Hydroxylový radikál
HO ₂ ·	Hydroperoxylový radikál
K/P	Draselnó-fosfátový
LOOH	Lipidový hydroperoxid
MDA	Malondialdehyd
N ₂ O ₃	Oxid dusitý
NADH	Nikotinamidadeninukleotid - redukováná forma
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NO	Oxid dusnatý
NO ₂	Oxid dusičitý
O ₂ ^{·-}	Superoxidový radikál
O ₂ ²⁻	Peroxidový anion
RNS	Reaktivní formy dusíku
RONs	Reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxid dismutasa
SOSG	„Singlet Oxygen Sensor Green“
SOSG-EP	Endoperoxid SOSG
TAP	Tris-acetát-fosfát
TBA	Thiobarbiturová kyselina
TBARS	Reaktivní formy kyseliny thiobarbiturové
TEMP	2,2,6,6-tetramethylpiperidine
TEMPD	2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinone
UV	Ultrafialové

10 PŘÍLOHY

Příprava kultivačních médií:

- **BBM médium:**

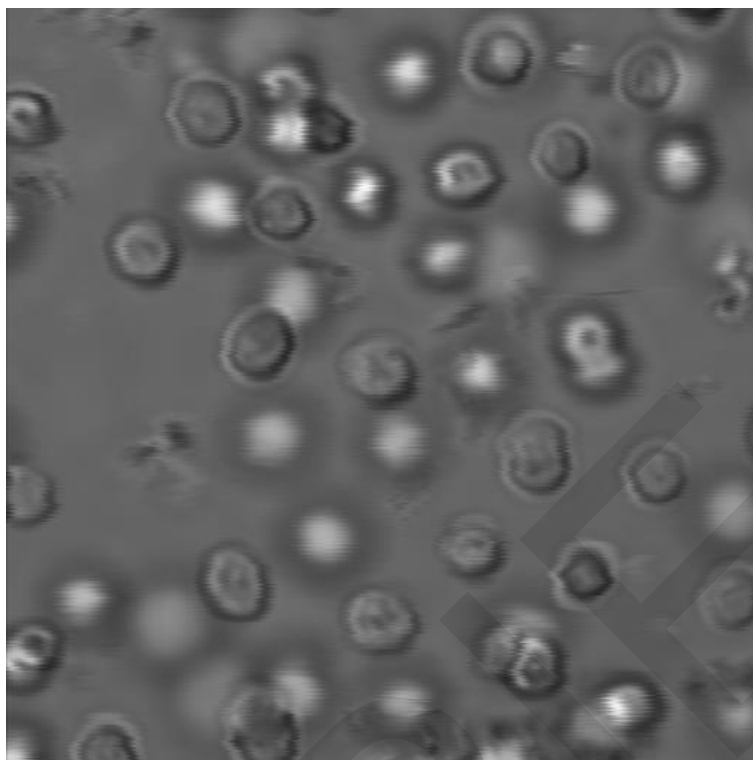
Tab. III: Složení BBM média (Bold, 1949; Bischoff *et* Bold, 1963).

Složka	Koncentrace [g/100 ml dH ₂ O]	Množství zásobního roztoku roztoku na přípravu 1 l média [ml]
NaNO ₃	2,5	1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,25	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,75	1
K ₂ HPO ₄	0,75	1
KH ₂ PO ₄	1,75	1
NaCl	0,25	1
Roztok EDTA		1
EDTA	5	
KOH	3,1	
Kyselý roztok železa		1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,498	
H ₂ SO ₄ (96%)	0,1 [ml]	
H ₃ BO ₃	1,142	1
Roztok stopových prvků		1
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,882	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,144	
MoO ₃	0,071	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,157	
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,049	

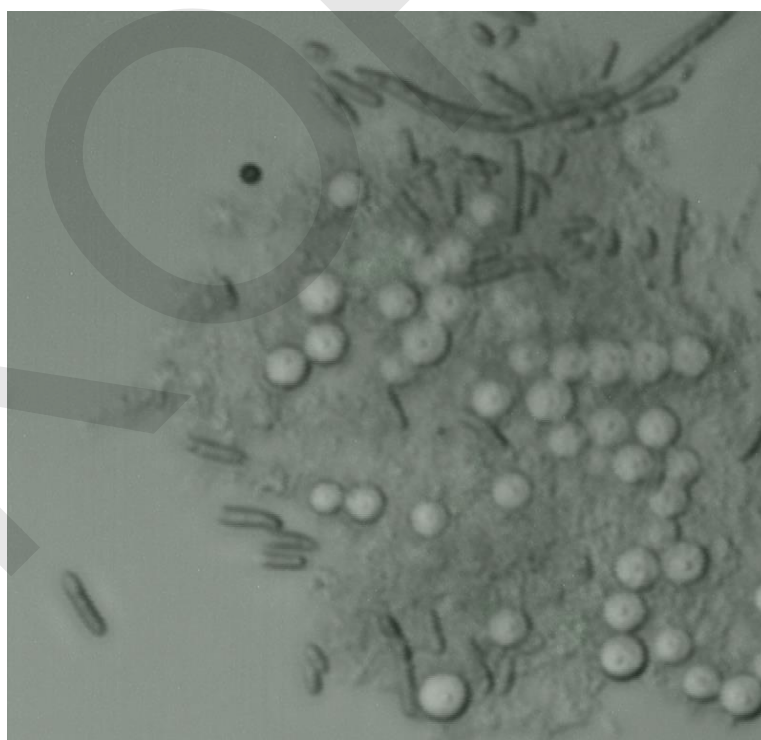
- **TAP médium**

Tab. IV: Složení TAP média (modifikované Durnford Lab).

Příprava 1 l TAP média		
1	2X Filner's Beijernicks Solution	25 ml
2	1M Potassium Phosphate	1 ml
3	Trace mineral solution or	5 ml
4	Tris-Base	2,42 g
5	Glacial Acetic Acid (17,4 mM acetate) pH 7,2	1 ml
Ad 1. 2X Filner's Beijernicks Solution		
	NH ₄ Cl	8 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g
Poté doplnit do objemu 500 ml deionizovanou nebo destilovanou vodou, autoklávovat.		
Ad 2. 1M Potassium Phosphate Stock		
	1M roztok KH ₂ PO ₄ (6,8 g/50 ml)	20 ml
	1M roztok K ₂ HPO ₄ (8,7 g/50 ml)	30 ml
pH 7,2 RT		
Ad 3. Trace Mineral Solution		
A	Rozpustit 5 g EDTA ve 400 ml destilované či deionizované vody	
B	Neutralizovat pH 6,5 s 5M NaOH	
C	Přidávat jednotlivé složky přesně dle pořadí, po přidání jednotlivých složek vždy důkladně rozpustit před přidáním složky další.	
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,2 g
	H ₃ BO ₃	1,14 g
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,51 g
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,016 g
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,073 g
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,016 g
Poté doplnit deionizovanou či destilovanou vodou na objem 500 ml, autoklávovat.		



Obr. 25: Detekce RONS pomocí konfokální mikroskopie u sinice *Synechocystis NEXON-WT* (pohyb buněk, malé rozměry, a tudíž rozmístění v různých vrstvách vzorku).



Obr. 26: Detekce RONS pomocí konfokální mikroskopie u sinice *Synechococcus endogloebicus* (kontaminace, sliz).