

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Lucie Ševčíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Vizualizace elektrických signálů v rostlinách
pomocí transgenní rostliny *Arabidopsis*
***thaliana* s apoaequorinem**

Bakalářská práce

Lucie Ševčíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lucie ŠEVČÍKOVÁ**
Osobní číslo: **R20726**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Vizualizace elektrických signálů v rostlinách pomocí transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* s apoaequorinem**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Měření povrchového elektrického potenciálu, vizualizace luminescence aequorinu a měření esprese jasmonát (JA) responzivních genů u transgenní rostliny huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s apoaequorinem v odpovědi na poranění teplem
3. Interpretace dat a vyhodnocení výsledků
4. Vypracování bakalářské práce a prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Jakšová, J., Rác, M., Bokor, B., Petřík, I., Novák, O., Reichelt, M., Mithöfer, A., & Pavlovič, A. (2021). Anaesthetic diethyl ether impairs long-distance electrical and jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 169, 311-321.
2. Kelz, M. B., & Mashour, G. A. (2019). The Biology of General Anesthesia from Paramedicum to Primate. *Current Biology*, 29, 1199-1210.
3. Kiep, V., Vadassery, J., Lattke, J., Maaß, J.-P., Boland, W., Peiter, E., & Mithöfer, A. (2015). Systemic cytosolic Ca^{2+} elevation is activated upon wounding and herbivory in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 207, 996-1004.
4. Mousavi, S. A. R., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., & Farmer, E. E. (2013). Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature*, 500, 422-426.
5. Pavlovič, A., Libiaková, M., Bokor, B., Jakšová, J., Petřík, I., Novák, O., & Baluška, F. (2020). Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Annals of Botany*, 125, 173-183.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.

Katedra biofyziky

Datum zadání bakalářské práce: 18. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 29. února 2024

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Lucie Ševčíková
Název práce:	Vizualizace elektrických signálů v rostlinách pomocí transgenní rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i> s apoaequorinem
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024
Klíčová slova:	<i>Arabidopsis thaliana</i> , elektrické signály, jasmonáty, ketamin, vápníková signalizace
Počet stran:	53
Počet příloh:	1
Jazyk:	český

SOUHRN:

Rostliny jsou neustále vystavovány environmentálním stresorům, mezi které patří například sucho, patogeny či mechanické poškození. V průběhu evoluce si proto vytvořily obranný mechanismus zprostředkovaný rostlinnými hormony jasmonáty. Ty jsou mimo jiné díky šíření elektrických a Ca^{2+} signálů schopné systémové akumulace v distálních částech rostliny a připravují ji na nadcházející hrozbu. Šíření systémového elektrického signálu v rostlinách je umožněno existencí receptorů podobných glutamátovým receptorům, které vykazují strukturní homologii se savčími glutamátovými receptory. Intravenózní anestetikum ketamin je nekompetitivní antagonistou živočišných ionotropních glutamátových receptorů. Cílem této bakalářské práce bylo vizualizovat šíření elektrických a Ca^{2+} signálů a následně zjistit, zda ketamin ovlivňuje šíření těchto signálů v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*). Byl měřen povrchový elektrický potenciál, pomocí transgenních rostlin byla vizualizována luminiscence aequorinu a byla měřena exprese jasmonát-responzivních genů v odpovědi na tepelné poranění. Výsledky ukázaly, že ketamin neinhibuje systémové šíření elektrických a Ca^{2+} signálů v *Arabidopsis thaliana*, avšak dokáže modifikovat jejich charakteristiku. Naopak, sám působí jako stresor a aktivuje expresi jasmonát-responzivních genů.

Bibliographical identification

Author's name and surname:	Lucie Ševčíková
Title:	Visualization of electrical signals in plants using transgenic plant <i>Arabidopsis thaliana</i> with apoaequorine
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor:	doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
The year of presentation:	2024
Keywords:	<i>Arabidopsis thaliana</i> , electrical signals, ketamine, jasmonates, calcium signaling
Number of pages:	53
Number of appendices:	1
Language:	czech

SUMMARY:

Plants are constantly exposed to environmental stressors that include for example drought, pathogens or mechanical damage. In the course of evolution plants have developed a defence mechanism mediated by the plant hormones jasmonates. Due to electrical and Ca^{2+} signal propagations, jasmonates can accumulate systematically in distal parts of the plant and prepare it for the upcoming threat. Systemic electrical signal propagation in plants is possible due to the existence of glutamate-like receptors, that show structural homology to mammalian ionotropic glutamate receptors. The intravenous anaesthetic ketamine is a non-competitive antagonist of animal glutamate receptors. The aim of this bachelor's thesis was visualization of electrical and Ca^{2+} signal propagation and subsequently find out whether ketamine affects propagation of these signals in the thale-cress plant (*Arabidopsis thaliana*). The surface electric potential was measured, the luminiscence of aequorin in transgenic plants was visualized, and the expression of jasmonate-responsive genes was measured in response to heat wounding. The results showed that ketamine does not inhibit the systemic propagation of electrical and Ca^{2+} signals in *Arabidopsis thaliana* but modified their characteristics. On the other hand, it itself acts as stress factor which triggered expression of jasmonate-responsive genes.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením doc. Mgr. Andreje Pavloviče, Ph.D., za použití citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Lucie Ševčíková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Andreji Pavlovičovi, Ph.D. za skvělé vedení, vstřícnost, ochotu poradit a také za asistenci při měření povrchových elektrických potenciálů. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Marku Rácovi, Ph.D. za pomoc s obsluhou CCD kamery, Mgr. Martinu Hřivňackému za užitečné rady a pomoc s analýzou genové exprese a celému kolektivu katedry biofyziky za vždy příjemnou atmosféru.

OBSAH

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	vii
SEZNAM OBRÁZKŮ	ix
SEZNAM TABULEK	x
1 ÚVOD.....	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Elektrické signály v rostlinách	3
3.1.1 Ca ²⁺ signalizace	5
3.2 Vizualizace Ca ²⁺ signálu v rostlinách	8
3.2.1 Aequorin	9
3.2.2 Další zobrazovací metody	11
3.3 Anestetika	12
3.3.1 Ketamin	13
4 MATERIÁL A METODY	15
4.1 Biologický materiál.....	15
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	15
Použité chemikálie	15
Použité soupravy	15
Použité roztoky a jejich příprava	16
4.3 Použité přístroje a zařízení	16
4.4 Použité metody	16
4.4.1 Měření povrchového elektrického potenciálu	16
4.4.2 Vizualizace luminiscence aequorinu	18
4.4.3 Analýza exprese <i>JAZ8</i> , <i>JAZ10</i> , <i>AOS</i> a <i>OPR3</i>	19
4.4.4 Blast analýza	25

5	VÝSLEDKY	26
5.1	Analýza elektrických signálů pomocí měření povrchového potenciálu	26
5.2	Analýza propagace Ca ²⁺ vln pomocí vizualizace luminiscence aequorinu.....	28
5.3	Analýza exprese jasmonát-responzivních genů <i>JAZ8</i> , <i>JAZ10</i> , <i>AOS</i> a <i>OPR3</i> pomocí qPCR	31
5.4	Porovnání aminokyselinové sekvence rostlinných GLR a živočišných NMDA receptorů	33
6	DISKUSE.....	35
7	ZÁVĚR.....	39
8	LITERATURA.....	40
9	PŘÍLOHY	53
9.1	Seznam příloh	53

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ACAs	autoinhibované Ca^{2+} -ATPázy
AMPA	kyselina α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová
AOS	‘ <i>allene oxide synthase</i> ‘
APs	akční potenciály
ATD	amino-terminální doména
BRET	bioluminiscenční rezonanční přenos energie
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$	koncentrace cytosolického Ca^{2+}
CaM	kalmoduliny
CAXs	$\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -antiportery
CBLs	proteiny podobné kalcineurinu B
CMLs	proteiny podobné kalmodulinu
CNGCs	cyklické nukleotidem ovládané kanály
CTD	karboxyl-terminální doména
ECAs	Ca^{2+} -ATPázy endoplazmatického retikula
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GECIs	geneticky kódované indikátory Ca^{2+}
GFP	zelený fluorescenční protein
GLRs	receptory podobné glutamátovému receptoru
HCN	hyperpolarizací aktivované cyklické nukleotidové kanály
HMA1	‘ <i>heavy metal ATPase 1</i> ‘
iGluRs	ionotropní glutamátové receptory
JA	kyselina jasmonová
JAs	jasmonáty
JAZ8	‘ <i>jasmonate zim-domain 8</i> ‘
JAZ10	‘ <i>jasmonate zim-domain 10</i> ‘
LBD	ligand vázající doména
MCAs	mechanosenzitivní iontové kanály
NMDA	kyselina N-methyl-D-asparagová
OPR3	‘ <i>12-oxophytodienoate reductase 3</i> ‘
OSCs	‘ <i>reduced hyperosmolarity-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increases</i> ‘

ROI	oblast zájmu
ROS	reaktivní formy kyslíku
SPs	systemové potenciály
SWP	potenciál pomalých vln
TF	transkripční faktor
TMD	transmembránová doména
TPCs	‘ <i>two pore</i> ‘ kanály
TPKC	‘ <i>two pore</i> ‘ draselný kanál
<i>UBC21</i>	‘ <i>ubiquitin-conjugating enzyme 21</i> ‘
VPs	variační potenciály
YC	‘ <i>yellow cameleon</i> ‘
YFP	žlutý fluorescenční protein

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Schéma obecné signální dráhy pro vápníkem regulovanou genovou expresi a stresovou odpověď (převzato z Tuteja et Mahajan, 2007)	6
Obr. 2: Historický průřez objevů a úspěchů vedoucích ke zdokonalení <i>in vivo</i> vápníkových zobrazovacích metod u rostlin (převzato z Grenzi <i>et al.</i> , 2021)	9
Obr. 3: Aparatura pro měření povrchových elektrických potenciálů na rostlině <i>A. thaliana</i>	17
Obr. 4: Číslování listů pro experimenty s šířením elektrických signálů a parametry elektrických signálů u <i>A. thaliana</i> (převzato z Jakšová <i>et al.</i> , 2021)	18
Obr. 5: Schéma nanášení vzorků do 96 jamkové PCR destičky pro studium exprese genů <i>JAZ8</i> , <i>JAZ10</i> , <i>AOS</i> a <i>OPR3</i>	25
Obr. 6: Příklady povrchových potenciálů generovaných v lokálních a systémových listech <i>A. thaliana</i> po poranění teplem	27
Obr. 7: Amplitudy a poloviční doby trvání povrchových potenciálů v reakci na tepelné poranění u kontrolních rostlin a rostlin ošetřených ketaminem v lokálních a systémových listech <i>A. thaliana</i>	28
Obr. 8: Lokální a systémové $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ signály v transgenní <i>A. thaliana</i> exprimující apoaequorin v odpovědi na tepelné poranění	29
Obr. 9: Průměrná intenzita luminiscenčního signálu v lokálních a systémových listech transgenní rostliny <i>A. thaliana</i> exprimující apoaequorin v reakci na tepelné poranění	30
Obr. 10: Kvantifikace $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ signálu v transgenní rostlině <i>A. thaliana</i> exprimující apoaequorin	31
Obr. 11: Exprese jasmonát-responzivních genů v <i>A. thaliana</i>	32
Obr. 12: Fenotyp rostlin <i>A. thaliana</i> 24 hodin a 15 dní od aplikace 0,5% ketaminu	33
Obr. 13: Blast analýza lidského glutamátového receptoru NMDA 2A (GluN2A) izoforma 1 (NP_000824.1) a <i>A. thaliana</i> GLR3.3 (NP_001322169.1) a GLR3.6 (NP_001326369.1)	34

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Typy a počty vzorků rostlinného materiálu pro analýzu exprese <i>JAZ8</i> , <i>JAZ10</i> , <i>AOS</i> a <i>OPR3</i>	20
Tab. 2: Lyzační směs pro izolaci RNA.....	20
Tab. 3: Reakční směs pro DNázu I.....	22
Tab. 4: Reakční směs pro syntézu cDNA.....	23
Tab. 5: Teplotní a časový profil termocykléru pro syntézu cDNA.....	23
Tab. 6: Sekvence primerů pro geny <i>JAZ8</i> , <i>JAZ10</i> , <i>AOS</i> , <i>OPR3</i> a <i>UBC21</i>	23
Tab. 7: Reakční směs pro qPCR.....	24
Tab. 8: Teplotní a časový profil kvantitativní PCR pro studium exprese genů <i>JAZ8</i> , <i>JAZ10</i> , <i>AOS</i> a <i>OPR3</i>	24

1 ÚVOD

Rostliny si z nutnosti získat schopnost rapidní odpovědi na působení vnějších podnětů vytvořily cesty pro přenos elektrického signálu, vedoucí k aktivaci různorodých obranných mechanismů. Šíření systémového elektrického signálu v rostlinách závisí na receptorech podobných glutamátovým receptorům. Jedná se o proteiny vykazující strukturní homologii se savčími ionotropními glutamátovými receptory, ligandem řízenými kationtovými kanály zodpovědnými za neurotransmisi v centrálním nervovém systému živočichů.

Elektrické signály doprovází vápníková signalizace ve formě vln. Zvýšením koncentrace cytosolického Ca^{2+} a jeho šířením do vzdálenějších orgánů rostliny dochází k akumulaci obranných fytohormonů jasmonátů nejen v místě poranění rostliny, ale také ve vzdálených podnětem nezasažených tkáních. V poslední době nastal velký rozvoj Ca^{2+} zobrazovacích metod sloužících k vizualizaci elektrických signálů.

Ketamin je celkové anestetikum fungující na principu nekompetitivního a nízkoafinitního antagonismu lidských ionotropních glutamátových receptorů. Cílem této bakalářské práce bylo zkoumat vliv ketaminu na šíření systémového elektrického signálu v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) v odpovědi na poranění teplem a tento signál vizualizovat.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Měření povrchového elektrického potenciálu, vizualizace luminiscence aequorinu a měření exprese jasmonát-responzivních genů u transgenní rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s apoaequorinem v odpovědi na poranění teplem
3. Interpretace dat a vyhodnocení výsledků
4. Vypracování bakalářské práce a prezentace k obhajobě bakalářské práce

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Elektrické signály v rostlinách

Elektrické signály v rostlinách jako první objevil na základě korespondence s Charlesem Darwinem britský fyziolog John Burdon-Sanderson v roce 1873. Konkrétně se jednalo o akční potenciály vyvolané stimulací listu rostliny rodu mucholapka (*Dionaea*). Jejich objevem bylo dokázáno, že elektrická signalizace není fenoménem pouze pro živočišnou říši, ale také pro tu rostlinnou (Fromm *et* Lautner, 2007).

Cesty pro přenos elektrických signálů se u rostlin vyvinuly z toho důvodu, že jsou schopny rapidního přenosu informace na dlouhé vzdálenosti (Fromm *et* Lautner, 2007). Jedná se tedy o okamžitou odpověď na podněty jako osmotický šok, teplotní šok, chlad, dotek (Davies, 1987) nebo poranění (Fromm *et al.*, 1995). Odlišné podněty z prostředí v živých buňkách schopných přenosu elektrického signálu do odpovídajících oblastí vyvolávají specifické reakce (Lautner *et al.*, 2005).

K přenosu elektrického signálu na krátké vzdálenosti rostlinám slouží plazmodezmata (Van Bel *et* Ehlers, 2004), na dlouhé vzdálenosti využívají přenos vodivými elementy floému (Fromm, 2006) nebo xylému (Stankovic *et al.*, 1998; Davies *et* Stankovic, 2006).

Rozlišujeme tři základní typy elektrických signálů v rostlinách: i) akční potenciály (APs), ii) variační potenciály (VPs) a iii) systémové potenciály (SPs). APs jsou dobře prozkoumány u živočichů, jejich iontový mechanismus u rostlin je však odlišný. U živočišných axonů je závislý na influxu sodných (Na^+) a efluxu draselných (K^+) iontů, excitace rostlinných buněk je ovšem dána tokem vápenatých (Ca^{2+}), chloridových (Cl^-) a K^+ iontů. Generování APs je navozeno například dotekem, teplotním šokem (Fromm *et* Lautner, 2007), nebo světlem (Trebacz *et* Zawadzki, 1985). V případě, že působení podnětu dosáhne určité prahové hodnoty, dochází k aktivaci Ca^{2+} -propustných kanálů (Hedrich *et* Becker, 1994), cytoplazma je zaplavena Ca^{2+} ionty, které aktivují eflux Cl^- iontů z buňky a nastává depolarizace plazmatické membrány neboli vznik APs (Lunevsky *et al.*, 1983). Následný eflux K^+ iontů z cytoplazmy způsobí repolarizaci membrány a zpětný tok K^+ iontů opět nastolí klidový potenciál (Yan *et al.*, 2009; Scherzer *et al.*, 2022). Výskyt APs byl zaznamenán například v listech rostliny citlivka stydlivá (*Mimosa pudica*), které se po mechanické stimulaci sklápějí (Sibaoka, 1951; Oda *et* Abe, 1972; Hagihara *et al.*,

2022). Nacházejí se v lalocích pasti masožravé rostliny mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*), vodní masožravé rostliny aldrovandka měchýřkatá (*Aldrovanda vesiculosa*) (Sibaoka, 1980) a v tentakulích masožravých rostlin rodu rosnatka (*Drosera*), kde způsobují jejich makroskopické rapidní pohyby (Williams *et al.*, 1972). Hrají zásadní roli u vyšších rostlin jako je například bob obecný (*Vicia faba* L.) (Dziubinska *et al.*, 2003). Prostřednictvím studia excitability buněk zelené řasy rodu *Chara* byl zaznamenán také jejich vliv na inhibici fotosyntézy (Bulychev *et al.*, 2006).

VPs neboli pomalé vlnové potenciály (Stahlberg *et al.*, 2006) jsou elektrické signály, které se podobně jako APs šíří pomocí přechodné změny membránového potenciálu. Od APs se liší delší a opožděnou repolarizací a velkým rozsahem variace. Signál se mění v závislosti na intenzitě podnětu, jeho amplituda a rychlost klesají s rostoucí vzdáleností od místa poranění a existují hypotézy, že se šíří xylémem buď jako hydraulická tlaková vlna, nebo prostřednictvím chemické látky (Fromm *et al.*, 2007). Na šíření elektrické vlny se podílí specifické receptory podobné glutamátovým receptorům (GLRs), které jsou klíčové pro transdukcii VPů převážně u huseničky rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Mousavi *et al.*, 2013; Toyota *et al.*, 2018). Je schopen projít oblastmi mrtvé tkáně a je závislý na negativním hydrostatickém tlaku v xylému. VPů jsou generovány fyzickým poškozením rostlinného pletiva, nejčastěji mechanickým narušením, popálením nebo odstraněním orgánů (Fromm *et al.*, 2007). Jejich iontový mechanismus se od základního mechanismu APů částečně liší; předpokládá se, že zahrnuje přechodnou inaktivaci H⁺-ATPázy P-typu v plazmatické membráně (Stahlberg *et al.*, 2006). Působení VPů bylo studováno v mnoha běžných rostlinných druzích, například v sazenicích rodu okurka (*Cucumis* spp.) a hrách (*Pisum* spp.) (Stahlberg *et al.*, 1992 *et al.*, 1994), v rajčeti jedlém (*Lycopersicon esculentum*) (Wildon *et al.*, 1992), tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Hlaváčková *et al.*, 2006) nebo v dřevinách rodu topol (*Populus* spp.) (Lautner *et al.*, 2005). Ovlivňují podobně jako APů fotosyntézu a uzavírání průduchů, ovšem na mnohem delší vzdálenosti. Po mechanickém poškození listu *Mimosa pudica* bylo pozorováno šíření VPů celou rostlinou, ovlivňující fotosyntézu a uzavírání stomat také u sousedních listů (Koziolek *et al.*, 2004; Kaiser *et al.*, 2006). Další systémovou odpovědí na šíření VPů je akumulace kyseliny abscisové (ABA), kyseliny jasmonové (JA) a jejích derivátů jasmonátů (JAs) ve vzdálených listech. Tyto fytohormony slouží v rostlinách jako mediátory odpovědi na poranění (Hlaváčková *et al.*, 2006) a zároveň se podílí

na transdukčních drahách vedoucích k uzavření stomat a inhibici fotosyntézy, a to i po odeznění VP's (Herde *et al.*, 1997; Suhita *et al.*, 2004; Hlaváčková *et al.*, 2006).

SPs neboli systémové potenciály jsou nejméně prostudovanou skupinou elektrických signálů. Na rozdíl od předcházejících typů elektrických signálů představují hyperpolarizační vlnu, která se systémově šíří díky aktivaci H⁺-ATPáz. Fyziologické reakce v odpovědi na SPs zatím nebyly popsány (Zimmermann *et al.*, 2009).

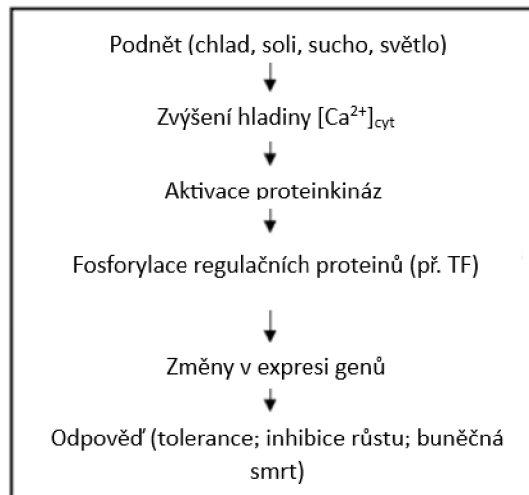
3.1.1 Ca²⁺ signalizace

Vápník je významným prvkem zajišťujícím růst a vývoj rostliny. Jedná se o sekundárního posla, jehož koncentrace v buňce je citlivě vyrovnávána přítomností zásobáren Ca²⁺ iontů jako jsou vakuoly, endoplasmatické retikulum, mitochondrie a buněčná stěna (Mahajan *et Tuteja*, 2005; Mahajan *et al.*, 2006). Rostlinné buňky si podobně jako ty živočišné udržují nízkou koncentraci volného Ca²⁺, která se u vyšších rostlin pohybuje v rozmezí 30–400 nM (Tuteja *et Mahajan*, 2007). Ve výše zmíněných organelách se vápník nachází v milimolárních koncentracích a uvolňuje se do cytosolu kdykoli to buňka vyžaduje. Mnoho extracelulárních signálů a environmentálních podnětů včetně světla, biotických a abiotických stresových faktorů má schopnost vyvolat změny v hladinách [Ca²⁺]_{cyt}, nazývané jako tzv. kalciový podpis (Mahajan *et Tuteja*, 2005).

Ca²⁺ signalizace se spolu s elektrickými signály, hormony, peptidy, těkavými látkami a reaktivními formami kyslíku (ROS) podílí na tvorbě systémové signalizace rostlin. Pomocí systémové odpovědi posílá rostlinný organismus informace o postižení určitého orgánu do vzdálenějších oblastí, které podnětem zasaženy nebyly (Mousavi *et al.*, 2013; Toyota *et al.*, 2018).

Ca²⁺ iont je zapojen do různých signálních drah. Obecně přenos signálu pro vápníkem regulovanou expresi stres-responzivních genů (viz Obr. 1) začíná působením podnětu (světlo, sucho, chlad), na který rostlina reaguje zvýšením hladiny [Ca²⁺]_{cyt}, které je detekováno Ca²⁺senzory nebo Ca²⁺-vazebnými proteiny, aktivujícími Ca²⁺-dependentní proteinkinázy (Mahajan *et Tuteja*, 2005; Mahajan *et al.*, 2006). Známe velké množství Ca²⁺-vazebných proteinů v rostlinách, například u *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno 250 proteinů s jedním či více tzv. EF-Hand Ca²⁺-vazebným motivem (Day *et al.*, 2002). Mezi Ca²⁺ senzory patří kalmoduliny (CaM), proteiny podobné kalmodulinu (CMLs) a proteiny podobné kalcineurinu B (CBLs) (Edel *et Kudla*, 2015). Aktivované proteinkinázy mohou fysoforylovat mnoho regulačních

proteinů včetně transkripčních faktorů (TF), které regulují hladinu genové exprese regulačních proteinů, což vede ke změnám metabolismu následovanému fenotypovou odpovědí. Fenotypovou odpovědí může být tolerance vůči stresu, ale také inhibice růstu nebo buněčná smrt v závislosti na počtu a typu genů, jejichž exprese je zvýšená nebo snižena v reakci na zvýšení hladiny $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Tuteja *et al.*, 2007; Kudla *et al.*, 2018; Toyota *et al.*, 2018).



Obr. 1: Schéma obecné signální dráhy pro vápníkem regulovanou genovou expresi a stresovou odpověď (převzato z Tuteja *et al.*, 2007).

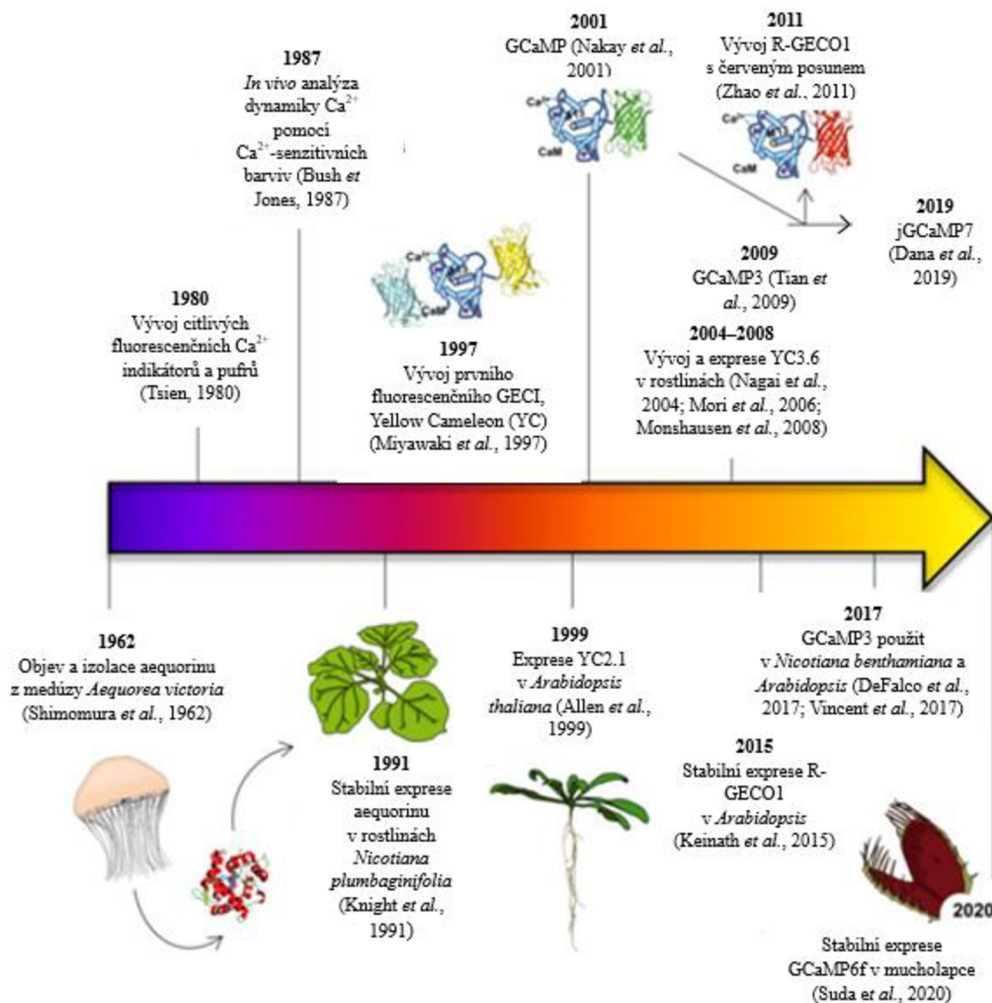
Legenda: ($[Ca^{2+}]_{cyt}$): cytosolický Ca^{2+} , (TF): transkripční faktory

Kalciový podpis je regulován sadou influxních a efluxních proteinů (Berridge *et al.*, 2003). Za influx Ca^{2+} iontů do cytoplazmy při počátku signalizace zodpovídají Ca^{2+} kanály. V rostlinách rodu *Arabidopsis* bylo dodnes identifikováno pět rodin kanálů propustných pro Ca^{2+} , a sice receptory podobné glutamátovému receptoru (GLRs), mechanosenzitivní iontové kanály (MCAs), cyklické nukleotidem ovládané kanály (CNGCs), ‘reduced hyperosmolarity-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increases’ (OSCA) a ‘two pore’ kanály (TPCs) (Lacombe *et al.*, 2001; Zelman *et al.*, 2012; Kurusu *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2014). Eflux Ca^{2+} nastupuje po skončení signalizačního procesu a závisí na Ca^{2+} transportérech, pumpách využívajících ATP či H^+ gradientu jako zdroje aktivní energie. Ca^{2+} transportéry obnovují bazální koncentraci volného Ca^{2+} vytlačením tohoto iontu z cytoplazmy. V *Arabidopsis* se jedná o autoinhibované Ca^{2+} -ATPázy (ACAs), Ca^{2+} -ATPázy endoplazmatického retikula (ECAs), P1-ATPázy (např. *heavy metal ATPase 1*, *HMA1*) a H^+/Ca^{2+} -antiportery (CAXs) (Moreno *et al.*, 2008; Bose *et al.*, 2011; Manohar *et al.*, 2011; Spalding *et al.*, 2011).

Ionotropní glutamátové receptory (iGluRs) jsou glutamátem a glycinem aktivované kationtové kanály zprostředkovávající synaptický přenos a generující Ca^{2+} signály v centrálním nervovém systému živočichů (Madden, 2002). V rostlinách byly i přes absenci nervového systému později identifikovány GLRs, proteiny homologní živočišným iGluRs (Lam *et al.*, 1998), zodpovídající za mnoho fyziologických funkcí včetně elektrické signalizace z listu do listu indukované poraněním (Mousavi *et al.*, 2013). S iGluRs sdílejí některé strukturní a funkční domény, konkrétně extracelulární amino-terminální doménu (ATD), extracelulární ligand vázající doménu (LBD), tři domény (M1, M3, M4) a jednu parciální doménu (M2) transmembránové domény (TMD) a intracelulární karboxyl-terminální doménu (CTD) (Lam *et al.*, 1998; Wudick *et al.*, 2018). Identita zmíněných domén u GLRs *Arabidopsis* a zvířecích iGluRs je 63% až 16%. Podobná identita se nachází mezi subtypy iGluRs, které mají jako agonistu kainát/ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionovou kyselinu (AMPA) spíše než N-methyl-D-asparagovou kyselinu (NMDA) (Lam *et al.*, 1998). Bylo zjištěno, že GLRs mají zásadní vliv na šíření elektrického a Ca^{2+} signálu rostlinou *A. thaliana*, konkrétně proteiny GLR3.3 a GLR3.6 fungují jako spínače pro šíření poraněním indukovaných potenciálů z poraněného listu do sousedních, zatímco protein GLR3.5 zabraňuje jejich šíření do distálních nesousedních listů (Mousavi *et al.*, 2013; Salvador-Recatalà, 2016). GLR 3.3 a GLR 3.6 jsou lokalizovány a exprimovány v pletivech obklopujících cévní svazky, což poukazuje na cévní svazky jakožto na jednu z cest šíření elektrických signálů (Nguyen *et al.*, 2018). Nedávné studie poukázaly na fakt, že u *glr3.3 glr 3.6* dvojitého mutantu *A. thaliana* dochází k inhibici propagace elektrického a Ca^{2+} signálu z poraněného do systémových listů (Mousavi *et al.*, 2013; Toyota *et al.*, 2018). Glutamát je důležitým komponentem iGluRs i GLRs, konkrétně u rostlin jeho uvolnění do apoplastu signalizuje poranění rostlinné tkáně. Glutamát se poté váže na GLRs a aktivuje je (Toyota *et al.*, 2018; Alfieri *et al.*, 2020), což poukazuje na zjištění, že jsou Ca^{2+} vlny zprostředkovány hromadným tokem glutamátu (Bellandi *et al.*, 2022). Exogenní aplikace glutamátu je schopna vyvolat systémové zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ a je jedinou aminokyselinou, která to dokáže (Toyota *et al.*, 2018; Shao *et al.*, 2020).

3.2 Vizualizace Ca²⁺ signálu v rostlinách

Kvantitativní *in vivo* vizualizace kalciového podpisu je založena na použití tzv. vápníkových zobrazovacích metod (viz Obr. 2), které díky neustálému pokroku umožňují studovat dynamiku Ca²⁺ s vysokým rozlišením a citlivostí a minimální invazivitou u různých organismů, včetně rostlin. Důležitým hnacím motorem v oblasti rozvoje vizualizace Ca²⁺ signálu byla neurověda a zjištění, že APs nebo aktivace iGluRs u neuronů způsobují velké a rapidní změny [Ca²⁺]_{cyt} (Tian *et al.*, 2009). Průlomovým se stal vývoj citlivých fluorescenčních Ca²⁺ indikátorů (barviv) a pufrů, například Fura-2 nebo Indo-1 (Tsien, 1980; Bush *et Jones*, 1987). Použití Ca²⁺-senzitivních barviv je výhodné zejména díky možnosti provádět analýzu bez nutnosti vytvářet transgenní rostliny (Fichman *et Mittler*, 2021). Potýká se však zároveň se spoustou nevýhod. Vyžadují manuální vpravení do buněk, mohou kompartmentalizovat či sekvestrovat do vakuol, a vnesení nadměrného množství barviva může ovlivnit dostupnost [Ca²⁺]_{cyt} (Bush *et Jones*, 1990). Během posledních dvaceti let proto byla tato barviva postupně nahrazena tzv. geneticky kódovanými vápníkovými indikátory (GECIs) (Perez Koldenkova *et Nagai*, 2013).



Obr. 2: Historický průřez objevů a úspěchů vedoucích ke zdokonalení *in vivo* vápníkových zobrazovacích metod u rostlin (převzato z Grenzi *et al.*, 2021).

Legenda: (GECI): geneticky kódované vápníkové indikátory, (YC): yellow cameleon, (YC2.1): yellow cameleon 2.1, (GCaMP): geneticky kódovaný vápníkový indikátor GCaMP, (YC3.6): yellow cameleon 3.6, (GCaMP3): geneticky kódovaný vápníkový indikátor GCaMP 3, (R-GECO1): red fluorescent genetically-encoded Ca^{2+} indicator for optical imaging 1, (jGCaMP7): geneticky kódovaný vápníkový indikátor jGCaMP7, (GCaMP6f): geneticky kódovaný vápníkový indikátor GCaMP6f

3.2.1 Aequorin

Aequorin je bioluminiscenční protein, který byl objeven a izolován z medúzy *Aequorea victoria* Osamu Shimomurou v roce 1962 (Shimomura *et al.*, 1962). Tento holoprotein o velikosti 22 kDa obsahuje navázaný kyslík, prostetickou skupinu, koelenterazin a tři vazebná místa pro Ca^{2+} . Jedná se o nejstarší GECI (Shimomura, 1995).

Real-time detekce koncentrace Ca^{2+} je umožněna schopností aequorinu vázat Ca^{2+} ionty. Po jejich navázání podstoupí aequorin konformační změnu a přemění se na luciferázu, která katalyzuje luminiscenci koelenterazinu. K luminiscenci dochází oxidací koelenterazinu na koelenteramid za emise oxidu uhličitého a modrého světla (465 nm), která nastává relaxací koelenteramidu do základního stavu (Ohmiya *et Hirano*, 1996).

Moderní éru vizualizace Ca^{2+} v rostlinách odstartoval v roce 1991 Knight *et al.* prvním transgenním mnohobuněčným organismem, *Nicotiana plumbaginifolia*, stabilně exprimujícím aequorin. Autoři uvádí, že u rostlin v reakci na dotek, chlad a elicitory dochází ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, a to spouští emisi fotonů (Knight *et al.*, 1991). Aequorin se využívá při kvantifikaci odpovědi rostlin. Pro každý jednotlivý experiment lze množství světla vyjádřené jako relativní světelné jednotky (RLU) převést na absolutní $[\text{Ca}^{2+}]$ pomocí kalibrační křivky, která bere v úvahu celkový počet molekul aequorinu přítomný ve vzorku. To se provádí uvolněním rekonstituovaného aequorinu roztokem obsahujícím Ca^{2+} a ethanol (100 mM CaCl_2 , 10% ethanol (v/v)) (Allen *et al.*, 1977; Mithöfer *et Mazars*, 2002).

Každou metodu doprovází její výhody a nevýhody, a jinak tomu není ani u analýzy Ca^{2+} pomocí aequorinu. Výhodou aequorinu je to, že nevyžaduje excitaci fluorescenčním zářením, což je užitečné zejména při měření hladiny Ca^{2+} vyžadující dlouhé časové intervaly (Sai *et Johnson*, 2002; Love *et al.*, 2004; Martí *et al.*, 2013; Martí Ruiz *et al.*, 2020). Mezi jeho nevýhody patří i) nízká hodnota kvantového výtěžku (Mithöfer *et Mazars*, 2002), ii) nutnost exogenního dodání koelenterazinu s předpokladem několikahodinové inkubace rostlinného materiálu s prostetickou skupinou před zahájením experimentu (Knight *et al.*, 1991) a iii) nelinearita rychlosti emise světla jako funkce koncentrace Ca^{2+} (Robert *et al.*, 2000).

Aequorin funguje v organismu *Aequorea victoria* na principu emise fotonů a následné excitace zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) (Prasher *et al.*, 1992). Při laboratorních pokusech tato vlastnost posloužila k vytvoření GFP-aequorinového reportéru (např. G5A) na bázi bioluminiscenčního rezonančního přenosu energie (BRET). Tento senzor dokázal obejít nízké množství vyzařovaného světla aequorinem a umožnil tak snazší detekci kolísání koncentrace Ca^{2+} s možností použití kamery s kratší dobou expozice v porovnání s vizualizací pomocí aequorinu. Nutnost exogenní aplikace koelenterazinu mu však zůstala. (Baubet *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2005). Velkým úspěchem byla exprese G5A senzoru v *A. thaliana*, která umožnila vůbec první

vizualizaci systémové Ca^{2+} vlny šířící se z kořenů do prýtu po zasolení (Xiong *et al.*, 2014).

3.2.2 Další zobrazovací metody

Vědci koncem 90. let začali pracovat na vývoji nové generace GECIs, využívající fluorescenční proteiny (tj. GFP) a jeho spektrální varianty. Jednalo se o senzory na bázi Försterova rezonančního přenosu energie (FRET), tzv. radiometrické senzory umožňující detekci excitace a duální emise elektromagnetického záření. Prvním fluorescenčním GECI byl ‘yellow cameleon’ (YC) (Miyawaki *et al.*, 1997) a brzy na to byly vyvinuty YC1.2 (Miyawaki *et al.*, 1999), YC3.6 (Nagai *et al.*, 2002) a série jejich variant s vyšší afinitou k Ca^{2+} , tzv. YC-Nano (např. YC-Nano 65) (Horikawa *et al.*, 2010). Tyto senzory jsou založeny na Ca^{2+} -indukované protein-protein interakci mezi CaM a CaM vazebným peptidem M13 (Miyawaki *et al.*, 1997). Kromě senzorů CAMELEON a jeho variant byly v rostlinách úspěšně použity například senzory CerTN-L15 (Heim *et al.*, 2007; Denninger *et al.*, 2014) nebo Twitch 2B a Twitch 3 (Thestrup *et al.*, 2014; Waadt *et al.*, 2017), alternativní FRET Ca^{2+} senzory, které místo CaM domény používají k detekci a vazbě Ca^{2+} troponin C (Palmer *et al.*, 2006).

Další možností vizualizace Ca^{2+} iontů jsou GECIs založeny na jednom fluoroforu. Jedná se o intenziometrické senzory založené na cirkulárně permutovaném fluorescenčním proteinu (např. GFP, YFP, mApple), fúzovaném na svém C- a N-konci s CaM doménou a M13 peptidem. V přítomnosti Ca^{2+} dochází k zesílení interakce mezi C- a N-koncem fluoroforu a nárůstu emise světla, což tyto GECIs činí vhodnými pro real-time indikaci hladin Ca^{2+} (Baird *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2001). Mezi intenziometrické GECIs patří například GCaMP a jeho varianty GCaMP3 a jGCaMP7 (Nakai *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2009; Dana *et al.*, 2019). Prvním intenziometrickým GECI exprimovaným v rostlinných buňkách byl Case12 (Zhu *et al.*, 2013) a hned nato R-GECO1, červený fluorescenční GECI odvozený od GCaMP3 (Ngo *et al.*, 2013; Keinath *et al.*, 2015). V nedávné době se podařilo GCaMP3 senzory transformovat množství rekalcitrantních seismonastických rostlin jako mucholapka (*D. muscipula*), rosnatka (*D. spatulata*) anebo citlivka (*M. pudica*) (Suda *et al.*, 2020; Procko *et al.*, 2022; Hagihara *et al.*, 2022).

3.3 Anestetika

K prvnímu použití anestetik pro medicínské účely došlo v roce 1846, kdy chirurg John Collins Warren odstranil pacientu po inhalaci diethyletheru nádor krku (Rinaldi, 2014). Od té doby byla objevena spousta chemikálií indukujících anestezii. Jedná se například o chloroform, halothan, isofluran a xenon (Miller, 1847; Cullen *et* Gross, 1951; Raventós *et* Goodall, 1956; Nunn, 1985). Dosud však nebyl navržen obecný mechanismus celkové anestezie, který by popisoval, jak může široká škála inhalovaných nebo injikovaných sloučenin v nervovém systému živočichů reverzibilně vyvolávat stav bezvědomí, amnézii, analgezií a vymizení spontánních pohybů, to vše při zachování stabilního fyziologického systému (Rinaldi, 2014). Anestetika jsou totiž odlišné sloučeniny bez strukturních podobností. Zahrnují dokonce chemicky inertní prvky jako výše zmíněný vzácný plyn xenon (Cullen *et* Gross, 1951). V rané fázi výzkumu anestezie byla navržena teorie Meyerovy-Overtonovy korelace popisující korelaci mezi silou anestetika a rozpustností v tucích, takzvaná membránová teorie účinku anestetik (Meyer, 1899; Overton, 1901). Od této teorie však bylo upuštěno po objevení účinku anestetik na solubilizovaný protein luciferázu (takzvaná proteinová teorie účinku anestetik, Franks *et* Lieb, 1984) a současný výzkum se zaměřuje na identifikaci specifických receptorů v neuronech interagujícími s anestetiky. Jako molekulární cíle mnoha lokálních a intravenózních celkových anestetik byly označeny například GABA receptory, NMDA receptory, sodíkové kanály a ‘two pore’ draselné kanály (TPKC) (Franks, 2008), i když se stále objevují práce, které poukazují na interakci anestetik s membránami (Pavel *et al.*, 2020).

Anestetika jsou úzce spjatá také s rostlinami. Francouzský vědec Claude Bernard vyzoroval, že senzitivní rostlina *Mimosa pudica* pod vlivem diethyletheru po dotyku neskládá své listy. Byl prvním, kdo dospěl k závěru, že rostliny a živočichové sdílejí společnou biologickou podstatu, kterou anestetika svým působením narušují (Bernard, 1878; Perouansky, 2012). Později bylo zjištěno, že rostliny mají glutamátovou a GABA signalizaci a receptory (Forde, 2014; Žárský, 2015). V nervové soustavě živočichů jsou verze těchto receptorů cílem anestetik, zejména na synapsích dvou neuronů, kde glutamát a GABA působí jako neurotransmitery (Kelz *et* Mashour, 2019). Nezůstalo pouze u diethyletheru, rostlinní fyziologové vyzorovali podobný efekt po aplikaci anestetik jako je chloroform, ketamin, lidokain a další (Bünning, 1934; De Luccia, 2012). Mezi jejich reverzibilní účinky u rostlin patří ztráta citlivosti

na vnější podnět, zastavení fototaktických pohybů a pohybů rostlinných orgánů, inhibice klíčení semen a akumulace chlorofylu, změna homeostázy ROS, narušení jasmonátové signalizace, blokování APs a inhibice vezikulárního transportu (Yokawa *et al.*, 2018; Pavlovič *et al.*, 2020). Rostliny navíc mají schopnost vytvářet si vlastní endogenní anestetika, a to zejména při působení stresu. Roku 1982 bylo zjištěno, že stresované sazenice borovice, břízy a dalších rostlin uvolňují ethan, ethylen, ethanol a acetaldehyd (Kimmerer *et Kozlowski*, 1982). Dnes víme, že se jedná o desítky anestetik a sloučenin souvisejících s anestetiky, včetně esenciálních olejů, terpenoidů, flavonoidů a alkaloidů (Tsuchiya, 2017).

3.3.1 Ketamin

Ketamin je derivát fenylcyklohexylaminu. Jedná se o racemickou směs obsahující stejný podíl (R)- a (S)-ketaminu, přičemž (S)-enantiomer vykazuje větší afinitu k NMDA receptoru (Adams *et al.*, 1978; Ebert *et al.*, 1997). Komerčně dostupným v oblasti humánní medicíny se stal v roce 1970 jako rychle působící intravenózní disociativní anestetikum (Dundee *et al.*, 1970). Mimo jeho anestetické účinky působí také analgeticky (Weisman, 1971), protizánětlivě (Roytblat *et al.*, 1998) a vykazuje antidepresivní aktivitu. Jediná subanestetická dávka ketaminu vyvolá rapidní a dlouhotrvající antidepresivní účinky u pacientů, kteří jsou rezistentní vůči jiným antidepresivům (Berman *et al.*, 2000; Fava *et al.*, 2020).

Ketamin je lidem podáván více cestami, a to intravenózně, intramuskulárně, orálně, intranazálně a intrarektálně (Malinovsky *et al.*, 1996; Andrade, 2017). Disociativní anestezie nenavozuje úplné bezvědomí, ale je charakterizována katatonii, katalepsií a amnézií. U lidí se disociativní anestezie dosahuje při dávkách ketaminu v rozmezí 1–2 mg·kg⁻¹ podaného intravenózně nebo v rozmezí 4–11 mg·kg⁻¹ podaných intramuskulárně (Sage *et Laird*, 1972; Dachs *et Innes*, 1997; Green *et al.*, 2011). Historicky je jako první receptorový cíl ketaminu uznáván živočišný NMDA receptor, ve kterém ketamin působí jako nekompetitivní blokátor otevřeného kanálu (Lodge *et al.*, 1982). Ketamin se váže na alosterické fencyklidové místo, které se nachází v póru NMDA kanálu, a tím nekompetitivně blokuje receptor (Kohrs *et Durieux*, 1998). Předpokládá se, že právě blokace NMDA receptorů stojí za disociativním anestetickým, analgetickým, antidepresivním a amnestickým účinkem ketaminu (Oye *et al.*, 1992; Autry *et al.*, 2011). Ketamin blokuje také hyperpolarizací aktivované cyklické nukleotidové kanály (HCN), konkrétně heteromery HCN1-HCN2. Chen a kolektiv přišli

na to, že u HCN knockoutovaných myší byla významně potlačena ketaminem indukovaná anestezie (Chen *et al.*, 2009). Ketamin se váže a působí na spoustu dalších typů receptorů, za zmínku stojí například GABA receptory (Scholfield, 1980), cholinergní receptory, sigma receptory (Hustveit *et al.*, 1995) a opioidní receptory (Hirota *et al.*, 1999).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro účely měření povrchového elektrického potenciálu, luminiscence aequorinu a exprese genů byly použity šestitýdenní rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.), ekotyp Columbia (Col-0, divoký typ) a transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.), ekotyp Columbia (Col-0, exprimující apoaequorin pod kontrolou promotoru 35S CaMV).

Všechny rostliny byly pěstovány v půdním substrátu Potgrond H (Klasmann-Deilmann GmbH) v růstové komoře AR75L (Percival-Scientific) na Katedře biofyziky UP v Olomouci s denním cyklem 8 h světlo/16 h tma za daných podmínek: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ FAR, 21 °C : 21 °C den : noc, 60% relativní vlhkost vzduchu. Tři hodiny před měřením byly rostliny postříkány 0,5% (18mM) roztokem ketaminu (Lipomed AG, kat.č. C2944, KET-663-HC) v 0,01% Tween 20 (Sigma Aldrich, kat.č. 93773). Kontrolní rostliny byly postříkány destilovanou vodou v 0,01% Tween 20.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- DNase/RNase-free destilovaná voda (Thermo Fisher Scientific, kat.č. 10977015)
- Destilovaná voda
- Ethanol – 96% roztok (Lachner, kat.č. 20025-AP0)
- Ethanol – 99,8% roztok pro UV spektroskopii (Lachner, kat.č. 20025-U99)
- Chlorid vápenatý bezvodý granulovaný (Lachner, kat.č. 30096-AP4-G1000-1)
- Ketamin – (Lipomed AG, kat.č. C2944)
- Koelenterazin (Invitrogen, kat.č. C2944)
- Tekutý dusík (Linde)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, kat.č. 93773)
- Vodivý gel (Hellada)

Použité soupravy

- Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, kat.č. STRN50)
- RNA Clean & Concentrator -5 kit (Zymoresearch, kat.č. R1013)
- iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, kat.č. 1708890)

- Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, kat.č. K0221)

Použité roztoky a jejich příprava

- **0,5% Ketamin v 0,01% Tween 20:** 50 mg ketaminu doplnit dH₂O s 0,01% Tween 20 (1 μl) do objemu 10 ml
- **10μM koelenterazin v 0,01% Tween 20:** 13 μl 2,3mM koelenterazinu doplnit dH₂O s 0,01% Tween 20 (300 nl) do objemu 3 ml
- **Roztok pro vysvícení (tzv. „discharge“):** 1,1 g CaCl₂ doplnit dH₂O s 10% ethanolem (1 ml) do objemu 10 ml

4.3 Použité přístroje a zařízení

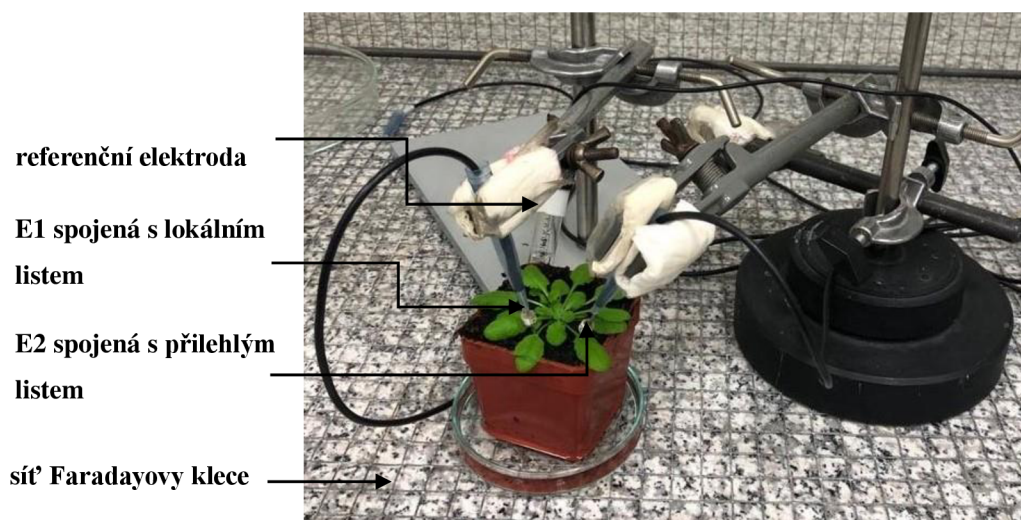
- CCD kamera VersArray:1300B (Princeton Instruments)
- Centrifuga Centrifuge 5430 R s rotory FA-45-16-17 a A-2-MTP (Eppendorf)
- Hlubokomrazicí box CryoCube F440n (Eppendorf)
- Laminární box M 1800 (MERCİ)
- Mikrocentrifuga MiniStar silverline (WWR)
- Objektiv Nikkor Z 50mm f/1,2 S (Nikon)
- Povrchové nepolarizovatelné elektrody Ag/AgCl (Scanlab Systems)
- qPCR termocyklér QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Růstová komora AR75L (Percival-Scientific)
- Spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Termoblok Bio TDB-100 (Biosan)
- Termocyklér 5341 Mastercycler epGradient s ovládacím panelem 5340 (Eppendorf)
- Třepačka VORTEX 4 basic (IKA)
- Zesilovač (Katedra biofyziky Univerzity Palackého)

4.4 Použité metody

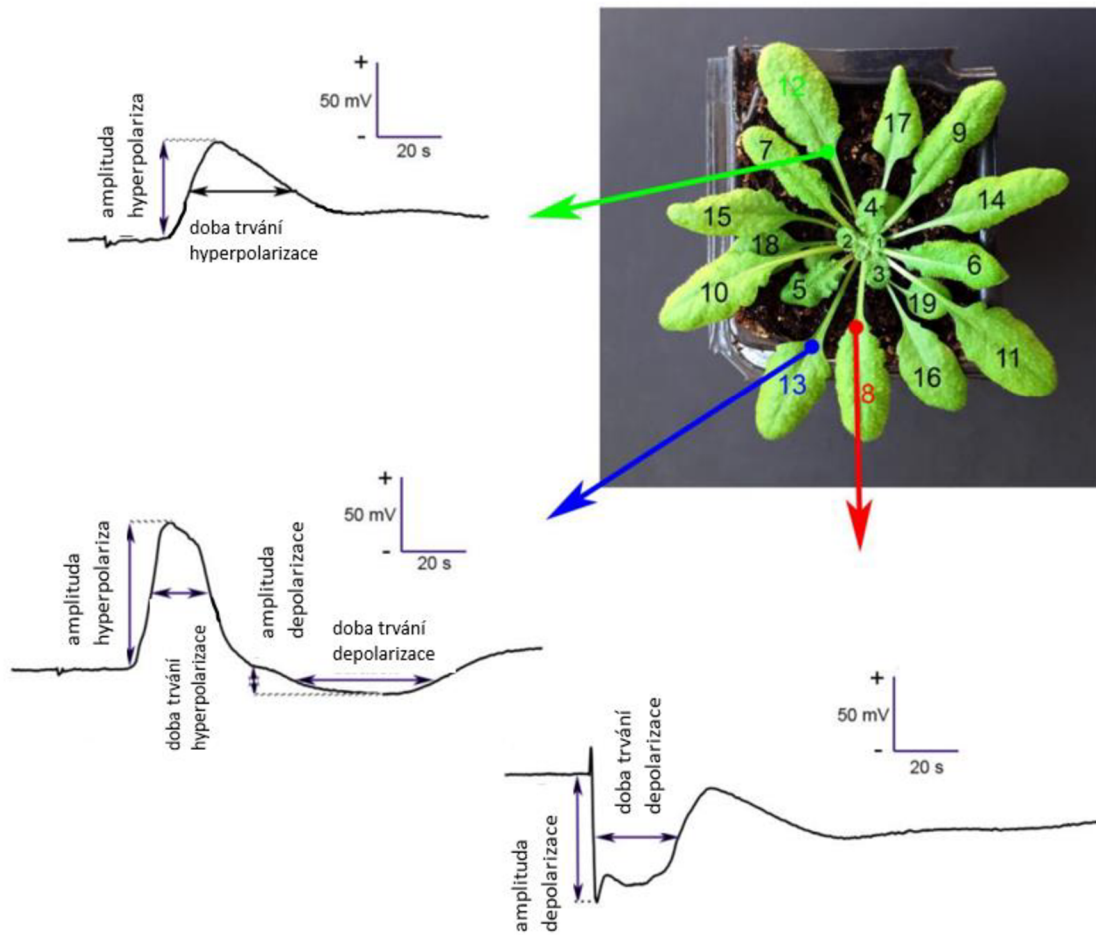
4.4.1 Měření povrchového elektrického potenciálu

Pro měření povrchového elektrického potenciálu bylo použito 12 kontrolních rostlin *A. thaliana* (L.), ekotyp Columbia divokého typu a 12 rostlin *A. thaliana* (L.), ekotyp Columbia divokého typu, postříkaných 0,5% roztokem ketaminu

v 0,01% Tween 20. Byla použita aparatura pro detekci elektrických signálů obsahující povrchové nepolarizovatelné elektrody Ag/AgCl umístěné ve Faradayově kleci (Ilík *et al.*, 2010). Povrchové elektrody (E1, E2) byly spojeny s bází listové čepele lokálního a přilehlého listu pomocí vodivého gelu (Hellada). Referenční elektroda byla ponořena do misky s vodou, která byla umístěna pod květináčem s testovanou rostlinou. Aparatura viz Obr. 3. Elektrody byly připojeny k zesilovači s následujícími parametry: vstupní citlivost: 1–1000, šum: 2–3 mV, frekvenční rozsah (–3 dB): 10^5 Hz, doba odezvy: 10 μ s, vstupní impedance: 10^{12} Ω , a po ustálení signálu bylo zahájeno měření. Povrchové potenciály byly měřeny po poranění apikální části lokálního listu a přetětí střední žíly rozžhavenou pinzetou. Data byla sbírána každých 30 ms. Amplituda a poločas depolarizace a hyperpolarizace byly vypočteny podle Jakšová *et al.* (2021) (Obr. 4). Z naměřených dat byl pomocí programu Excel (Microsoft Corporation) proveden dvouvýběrový Welchův t-test s nerovností rozptylů a následně byly sestrojeny grafy typu box-plot (Origin 8.5.1, OriginLab).



Obr. 3: Aparatura pro měření povrchových elektrických potenciálů na rostlině *A. thaliana*.



Obr. 4: Číslování listů pro experimenty s šířením elektrických signálů a parametry elektrických signálů u *A. thaliana* (převzato z Jakšová *et al.*, 2021). Analýza byla provedena na lokálním listu č. 8 a sousedním systémovém listu č. 13. Parametry kvantifikace elektrických signálů (amplituda a poločas doby trvání, $t_{1/2}$) jsou znázorněny. Použitá terminologie (depolarizace, repolarizace) je míněna z intracelulárního hlediska.

4.4.2 Vizualizace luminiscence aequorinu

Pro vizualizaci luminiscence aequorinu bylo použito 18 kontrolních transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* (L.), ekotyp Columbia, exprimující apoaequorin pod kontrolou promotoru 35S CaMV a 18 transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* (L.), ekotyp Columbia, exprimující apoaequorin pod kontrolou promotoru 35S CaMV postříkaných 0,5% roztokem ketaminu v 0,01% Tween 20. Den před vykonáním experimentu byly pro účely rekonstituce aequorinu testované rostliny postříkány roztokem 10 μ M koelenterazinu v 0,01% Tween 20 a následně inkubovány přes noc ve tmě z důvodu citlivosti koelenterazinu na světlo. Na druhý den byla monitorována $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ v rostlinách s využitím vysoce citlivé CCD kamery (Kiep *et al.*, 2015) obsahující objektiv s ohniskovou vzdáleností 50 mm a clonovým číslem f/1,2

pro zvýšení účinnosti sběru světla. Kamera byla ochlazena na $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomocí chladicího systému využívajícího tekutý dusík z důvodu snížení šumu. Spektrální citlivost kamery byla v rozsahu vlnových délek $\lambda = 200\text{--}1000\text{ nm}$ s téměř 90% kvantovou účinností ve viditelné oblasti spektra. Spektrální citlivost byla skleněnými čočkami omezena na rozsah vlnových délek $\lambda = 350\text{--}1000\text{ nm}$. Na kameře byla nastavena snímková frekvence 100 kHz a vstupní citlivost 2. Akvizice signálu byla prováděna pomocí softwaru Win View (Princeton Instruments). Režim počítání fotonů zachytil fotony s akviziční dobou 10 s. Kamera byla umístěna v temné komoře o rozměrech $3 \times 1,5 \times 2,5\text{ m}$. Dveře od temné komory byly chráněny černým závěsem před veškerým světlem.

Nejprve byl pořízen viditelný snímek rostliny, po kterém následovalo poranění apikální části označeného lokálního listu a přetětí střední žíly rozžhavenou pinzetou v prostředí absolutní tmy a snímání šířícího se Ca^{2+} signálu. Po dokončení snímání byl zbývající aequorin vysvícen postřikem listové růžice roztokem pro vysvícení („discharge“, 1 M CaCl_2 v 10% ethanolu), reprezentující pozitivní kontrolu, při zobrazování luminiscence aequorinu s akviziční dobou 1 min. Data byla zpracována pomocí programu ImageJ (NIH) a po určení průměrné intenzity signálu v oblasti zájmu (ROI) v daném čase byly výsledné hodnoty převedeny do grafické podoby pomocí programu Excel (Microsoft Corporation).

4.4.3 Analýza exprese *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS* a *OPR3*

4.4.3.1 Odběr a homogenizace vzorků

Pro analýzu exprese *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS* a *OPR3* bylo použito 8 kontrolních rostlin *Arabidopsis thaliana* (L.), ekotyp Columbia divokého typu postříkaných dH_2O s 0,01% Tween 20 a 8 rostlin *Arabidopsis thaliana* (L.), ekotyp Columbia divokého typu postříkaných 0,5% roztokem ketaminu v 0,01% Tween 20. Polovina kontrolních a polovina testovaných rostlin byla poraněna rozžhavenou pinzetou v apikální části označeného lokálního listu. Označené lokální a systémové listy všech rostlin byly po 1 h od poranění sklizeny a přeneseny do sterilních 2ml mikrozkušavek (pro lepší orientaci viz Tab. 1). Rostlinný materiál v mikrozkušavkách byl ihned poté zmrazen tekutým dusíkem a uložen do hlubokomrazicího boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 1: Typy a počty vzorků rostlinného materiálu pro analýzu exprese *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS* a *OPR3*.

zkratka vzorku	typ vzorku	počet
CL	kontrola lokální list	1, 2, 3, 4
CS	kontrola systémový list	1, 2, 3, 4
AL	ketamin lokální list	1, 2, 3, 4
AS	ketamin systémový list	1, 2, 3, 4
CWL	kontrola poraněný lokální list	1, 2, 3, 4
CWS	kontrola poraněný systémový list	1, 2, 3, 4
AWL	ketamin poraněný lokální list	1, 2, 3, 4
AWS	ketamin poraněný systémový list	1, 2, 3, 4

Pro analýzu exprese genů byly použity 4 biologické a 3 technické replikáty. Postup práce popsany na následujících stranách byl vždy prováděn s osmi vzorky, každý s jedním biologickým replikátem. Rostlinná pletiva byla pomocí tekutého dusíku při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ homogenizována na jemný prášek ve sterilní třecí misce. Vzniklý prášek byl špachtlí přenesen do sterilních 2ml mikrozkušavek a mikrozkušavky s rostlinným materiálem byly zmrazeny v tekutém dusíku.

4.4.3.2 Izolace a extrakce RNA

Celková RNA byla izolována ze vzorků pomocí Spectrum Plant Total RNA Kit. Homogenizované vzorky v mikrozkušavkách byly umístěny do stojánku na ledu. Stojánek se vzorky byl poté přesunut do digestoře. Do každé mikrozkušavky s homogenizovaným vzorkem bylo napipetováno 505 μl lyzační směsi připravené smícháním lyzačního roztoku (Lysis Solution) a 2 merkaptoethanolu, obě látky byly součástí zmíněného kitu (viz Tab. 2).

Tab. 2: Lyzační směs pro izolaci RNA.

látka	objem pro 1 vzorek [μl]
lyzační roztok (Lysis Solution)	500
2-merkaptoethanol	5
celkem	505

Vzorky byly promíchány opakovaným překlápěním a poté důkladně promíchány pomocí vortexu po dobu 30 s. Zvortexované vzorky byly ponechány k inkubaci v termobloku po dobu 5 min při teplotě $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně centrifugovány 5 min při $16\ 000\times g$ a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (teplota a otáčky zůstaly během celé této části postupu stejné).

Supernatant byl přepipetován na filtrační kolony se sběrnými zkumavkami (Filtration Columns) z kitu a takto centrifugován 1,5 min. Ze sběrných zkumavek byla odstraněna filtrační kolona a do lyzátu bylo napipetováno 500 μ l vazebného roztoku (Binding Solution), který byl součástí kitu. Poté bylo 700 μ l této směsi přepipetováno na binding kolony se sběrnými zkumavkami (Binding Columns) z kitu a centrifugováno 1,5 min. Obsah sběrných zkumavek byl následně vylit do odpadu a kolony byly vráceny do prázdných sběrných zkumavek. Na kolony bylo napipetováno zbylých 300 μ l směsi lyzátu a vazebného roztoku. Opět byla provedena centrifugace po dobu 1,5 min a obsah sběrných zkumavek byl znovu vylit do odpadu a kolony vráceny do prázdných sběrných zkumavek.

Další práce probíhala mimo digestoř. Na kolony bylo napipetováno 500 μ l promývacího roztoku 1 (Wash Solution 1) z kitu a následně byly centrifugovány 1 min. Obsah sběrných zkumavek byl znovu vylit do odpadu a kolony vráceny do prázdných sběrných zkumavek. Poté bylo na kolony napipetováno 500 μ l promývacího roztoku 2 (Wash Solution 2), který byl také součástí kitu, obsah byl opět centrifugován 1 min, obsah sběrných zkumavek vylit do odpadu a kolony vráceny zpět do prázdných sběrných zkumavek. Třetí promytí kolon proběhlo identicky s předchozím. Následně byly kolony vysušeny centrifugováním po dobu 1 min. Vysušené kolony byly přemístěny do nové sběrné zkumavky. Na membránu kolon bylo napipetováno 50 μ l elučního roztoku (Elution Solution) z kitu. Vzorky byly nejprve inkubovány 1 min při pokojové teplotě a poté byly centrifugovány 1 min. Kolony byly odstraněny a vzorky ze sběrných zkumavek byly přepipetovány do sterilních mikrozkušavek. Takto bylo získáno 50 μ l celkové RNA z každého vzorku.

4.4.3.3 Purifikace RNA

Získaná celková RNA byla purifikována pomocí RNA Clean & Concentrator -5 kitu. Do každého vzorku bylo napipetováno 100 μ l RNA vazebného pufru (RNA Binding Buffer) z kitu a poté 150 μ l 96% ethanolu. Vzorky byly přepipetovány na Zymo-Spin IC kolony (Zymo-Spin IC Columns) umístěné ve sběrných zkumavkách a centrifugovány 1 min při 16 000 \times g a 15 °C (teplota a otáčky zůstaly během celé této části postupu stejné). Obsah sběrných zkumavek byl vylit do odpadu a kolony vráceny do prázdných sběrných zkumavek. Poté bylo na membrány kolon napipetováno po 40 μ l reakční směsi pro DNázu I smícháním DNázy I (DNase I) a DNA Digestion Buffer z kitu (Tab. 3) pro odstranění případné kontaminace genomickou DNA. Stojánek se

vzorky byl sundán z ledu a vzorky byly inkubovány 20 min při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo na kolony napipetováno 400 μ l RNA Prep Buffer z použitého kitu a proběhla centrifugace po dobu 30 s. Proteklá tekutina byla vylita do odpadu a stojan se vzorky byl vrácen zpět na led. Na kolony bylo napipetováno 700 μ l RNA promývacího pufru (RNA Wash Buffer) z kitu a opět proběhla centrifugace po dobu 30 s. Proteklá tekutina byla opět vylita do odpadu. Následně bylo na kolony napipetováno zbylých 400 μ l RNA promývacího pufru a vzorky byly centrifugovány 1 min. Po vylití proteklé tekutiny do odpadu následovala další centrifugace po dobu 2 min pro kompletní odstranění RNA promývacího pufru. Kolony byly přeneseny do RNase-free mikrozkušavek. Na membrány kolon bylo napipetováno 25 μ l DNase/RNase-free H₂O, která byla součástí kitu, a centrifugováno 30 s. Na závěr byla pomocí UV-VIS spektrofotometru NanoDrop při vlnových délkách 260 a 280 nm naměřena koncentrace a čistota získané RNA a vzorky byly uchovány v hlubokomrazicím boxu při -80°C .

Tab. 3: Reakční směs pro DNázu I.

látka	objem pro 1 vzorek [μl]
DNase I	5
DNA Digestion Buffer	35
celkem	40

4.4.3.4 Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA ze získané RNA byl použit iScript cDNA Synthesis Kit. Podle zjištěné koncentrace RNA ve vzorcích byl spočten objem RNA a nuclease-free H₂O potřebný pro syntézu cDNA. Stojan se vzorky a reagensy byl postaven na led. Do sterilní 0,2ml mikrozkušavky byla připravena reakční směs pro syntézu cDNA smícháním 5x iScript Reaction Mix a iScript Reverse Transcriptase, obojí ze zmíněného kitu (viz Tab. 4). Do 16 sterilních 0,1ml mikrozkušavek byly napipetovány vypočtené objemy nuclease-free H₂O, poté bylo připipetováno po 5 μ l reakční směsi a vypočtené objemy RNA tak, aby v každé mikrozkušavce bylo celkem 20 μ l reakčního mixu. Obsah zkumavek byl stočen v mikrocentrifuze a následně byla tato hotová reakční směs inkubována 26 min v termocykléru s daným programem (Tab. 5). Z každého vzorku RNA tak byly vytvořeny 2 vzorky cDNA, jejichž koncentrace a čistota byla naměřena pomocí UV-VIS spektrofotometru NanoDrop.

Tab. 4: Reakční směs pro syntézu cDNA.

látka	objem pro 1 vzorek [μl]
5x iScript Reaction Mix	4
iScript Reverse Transcriptase	1
celkem	5

Tab. 5: Teplotní a časový profil termocykléru pro syntézu cDNA.

krok	teplota [°C]	doba trvání [min]
priming	25,0	5
reverzní transkripce	46,0	20
inaktivace reverzní transkriptázy	95,0	1

4.4.3.5 Analýza exprese *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS* a *OPR3* pomocí qPCR

Primery pro amplifikaci sekvence tzv. housekeeping genu ‘ubiquitin-conjugating enzyme’ (*UBC21*) a sekvence genů zájmu (‘jasmonate zim-domain 8’, *JAZ8*; ‘jasmonate zim-domain 10’, *JAZ10*; ‘12-oxophytodienoate reductase 3’, *OPR3*; ‘allene oxide synthase’, *AOS*) byly použity podle Mousavi *et al.*, 2013 a Chini *et al.*, 2018 (Tab. 6).

Tab. 6: Sekvence primerů pro geny *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS*, *OPR3* a *UBC21*.

gen	primer	sekvence 5’-3’
<i>JAZ8</i>	forward	TGTGTTTTTCTTCAGATGTTACCC
	reverse	TCTCTGCTTGCGATCGATATT
<i>JAZ10</i>	forward	ATCCCGATTTCTCCGGTCCA
	reverse	ACTTTCTCCTTGCGATGGGAAGA
<i>AOS</i>	forward	GCGACGAGAGATCCGAAGA
	reverse	CTCGCCACCAAAACAACAAA
<i>OPR3</i>	forward	GCATGGAAGCAAGTTGTGGAAGCA
	reverse	CATGCGCCCCGTGGATCTCAAT
<i>UBC21</i>	forward	CAGTCTGTGTGTAGAGCTATCATAGCAT
	reverse	AGAAGATTCCCTGAGTCGCAGTT

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce byla provedena s využitím Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) kitu. Celý postup přípravy vzorků probíhal na ledu. Po roztání byly veškeré vzorky a roztoky zvortexovány a následně krátce zcentrifugovány na mikrocentrifuze. Do sterilních 1,5ml mikrokumavek byly připraveny reakční směsi pro geny *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS*, *OPR3* a *UBC21* sestávající z nuclease-free H₂O z kitu, příslušných forward a reverse primerů a fluorescenčního barviva SYBR Green z kitu (Tab. 7). Reakční směsi byly řádně promíchány

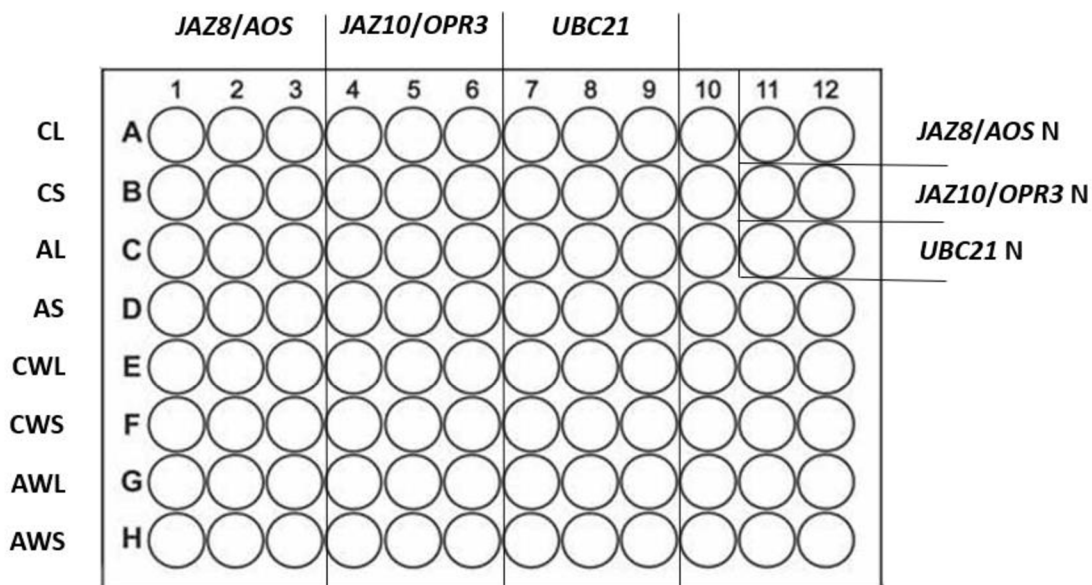
propipetováním a stočením na mikrocentrifuze. Ze získaných koncentrací cDNA byl vypočten objem cDNA a nuclease-free H₂O a vzorky cDNA byly následně 10x zředěny. Do každé z jamek 96 jamkové PCR destičky bylo napipetováno 9 µl reakční směsi a poté byly připipetovány 3 µl zředěných vzorků cDNA nebo 3 µl nuclease-free H₂O pro účel negativní kontroly podle schématu (Obr. 5). Celkový objem v jedné jamce činil tedy 12 µl. Vzorky byly nanášeny v triplicátech a odchylka Ct hodnot v triplicátu nesměla překročit 0,5. PCR destička byla zalepena pomocí adhesivní optické PCR fólie a následně zcentrifugována na centrifuze s destičkovým rotorem. Bublíny v jednotlivých jamkách byly odstraněny klepáním. Destička byla vložena do termocykléru pro qPCR se zvoleným programem (Tab. 8).

Tab. 7: Reakční směs pro qPCR.

látka	objem na 1 jamku [µl]
SYBR Green	6,25
forward primer (<i>JAZ8</i> , <i>JAZ10</i> , <i>AOS</i> , <i>OPR3</i>)	0,375
reverse primer (<i>JAZ8</i> , <i>JAZ10</i> , <i>AOS</i> , <i>OPR3</i>)	0,375
nuclease-free H ₂ O	2
celkem	9

Tab. 8: Teplotní a časový profil kvantitativní PCR pro studium exprese genů *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS* a *OPR3*.

krok	teplota [°C]	doba trvání	počet cyklů
úvodní denaturace	95,0	10 min	1
denaturace	95,0	15 s	
annealing	60,0	30 s	40
elongace	72,0	30 s	
finální denaturace	95,0	2 s	1



Obr. 5: Schéma nanášení vzorků do 96 jamkové PCR destičky pro studium exprese genů *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS* a *OPR3*. Z kapacitních důvodů byly vždy spolu testovány geny *JAZ8*, *JAZ10* a *UBC21* a geny *AOS*, *OPR3* a *UBC21*.

Legenda: C – kontrolní rostliny, A – (anestetikem) ketaminem ošetřené rostliny, W – teplem poraněné rostliny, L – lokální list, S – systémový list, N – negativní kontrola

Po skončení programu byly pomocí softwaru Design & Analysis (QuantStudio) získány výsledky Ct hodnot a křivek tání analyzovaných genů. Relativní změny v genové expresi byly stanoveny podle Pfaffl, 2001. Výsledné hodnoty byly pomocí programu Origin 8.5.1 (OriginLab) převedeny do grafické podoby.

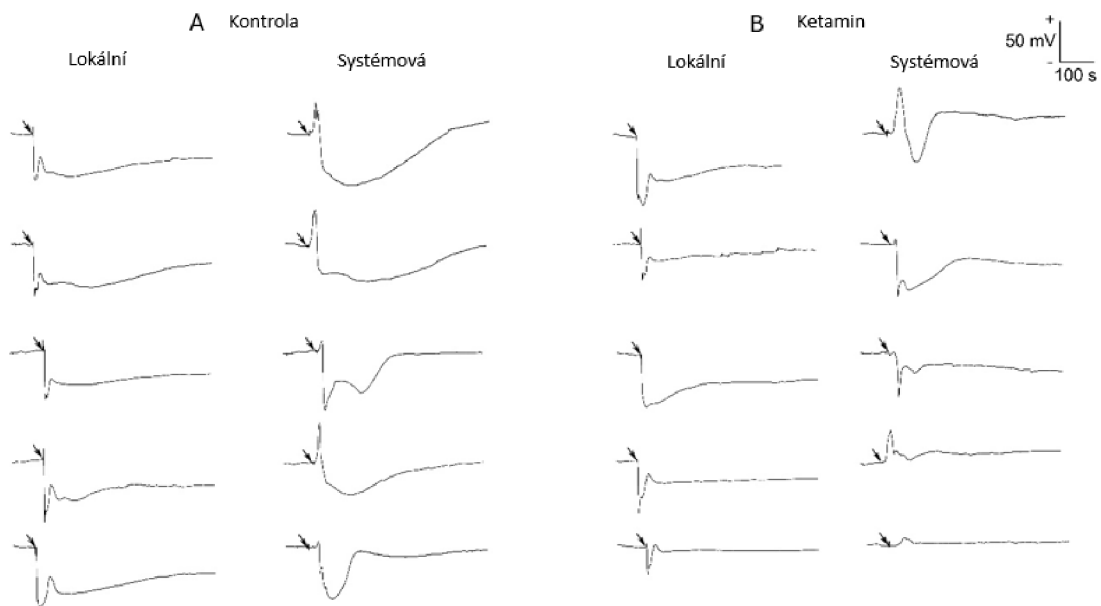
4.4.4 Blast analýza

Pomocí programu BLAST (NCBI) byla porovnána aminokyselinová sekvence lidských NMDA receptorů (NMDA 2A izoforma, NP_000824.1) se sekvencí GLR receptorů v *A. thaliana* AtGLR3.3 (NP_001322169.1) a AtGLR3.6 (NP_001326369.1).

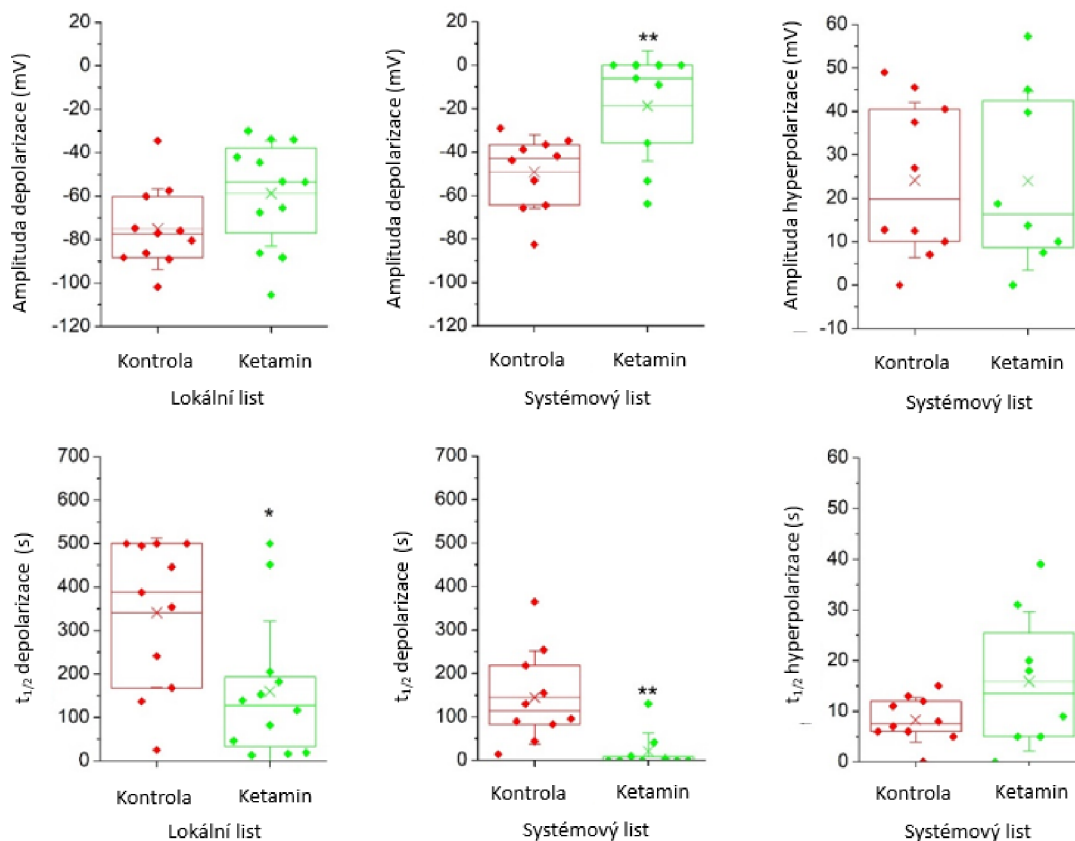
5 VÝSLEDKY

5.1 Analýza elektrických signálů pomocí měření povrchového potenciálu

K detekci elektrických signálů v *A. thaliana* byla použita metoda měření povrchového potenciálu. Poranění lokálního listu teplem u kontrolních rostlin indukovalo hyperpolarizaci membránového potenciálu (extracelulárně zaznamenaný negativní posun napětí, představující intracelulární depolarizaci), reprezentující tzv. potenciál pomalých vln (SWP). Elektrický signál byl během několika sekund po popálení přenesen do systémových listů. Některé systémové listy vyvolaly před přechodnou hyperpolarizací (představující intracelulární depolarizaci) přechodnou depolarizaci (představující intracelulární hyperpolarizaci) membránového potenciálu. Změny tvaru a intenzity elektrického signálu jsou znázorněny na Obr. 6 níže. Poranění lokálního listu teplem u rostlin ovlivněných ketaminem v něm indukovalo elektrické signály se stejnou amplitudou jako u kontrolních rostlin, avšak se zkráceným poločasem $t_{1/2}$. Do systémových listů se signál rozšířil během několika desítek sekund s výrazně redukovanou amplitudou i $t_{1/2}$. V některých případech se projevila úplná absence hyperpolarizace (představující intracelulární depolarizaci) a byla zaznamenána pouze přechodná depolarizace (představující intracelulární hyperpolarizaci), viz Obr. 7.



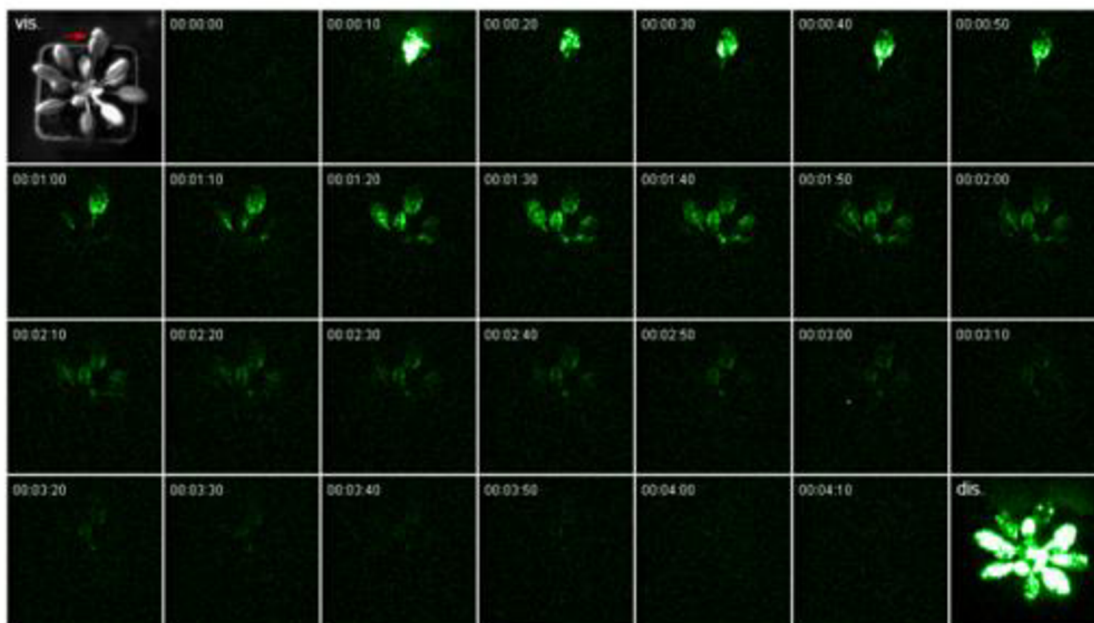
Obr. 6: Příklady povrchových potenciálů generovaných v lokálních a systémových listech *A. thaliana* po poranění teplem. (A) Kontrolní rostliny. (B) Rostliny ošetřené ketaminem. Čas, kdy byl lokální list tepelně poraněn, je znázorněn šipkami. Použitá terminologie (depolarizace, repolarizace) je míněna z intracelulárního hlediska.



Obr. 7: Amplitudy a poloviční doby trvání povrchových potenciálů v reakci na tepelné poranění u kontrolních rostlin a rostlin ošetřených ketaminem v lokálních a systémových listech *A. thaliana*. \diamond = naměřené hodnoty, Boxplot znázorňuje 25. percentil, medián, 75. percentil datových bodů, \times = průměr naměřených hodnot, chybové úsečky \pm 1 SD, $n = 8-12$, statistická analýza provedena pomocí dvouvýběrového Welchova t-testu s nerovností rozptylu, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$. Pojmy depolarizace a hyperpolarizace jsou míněny z intracelulárního hlediska.

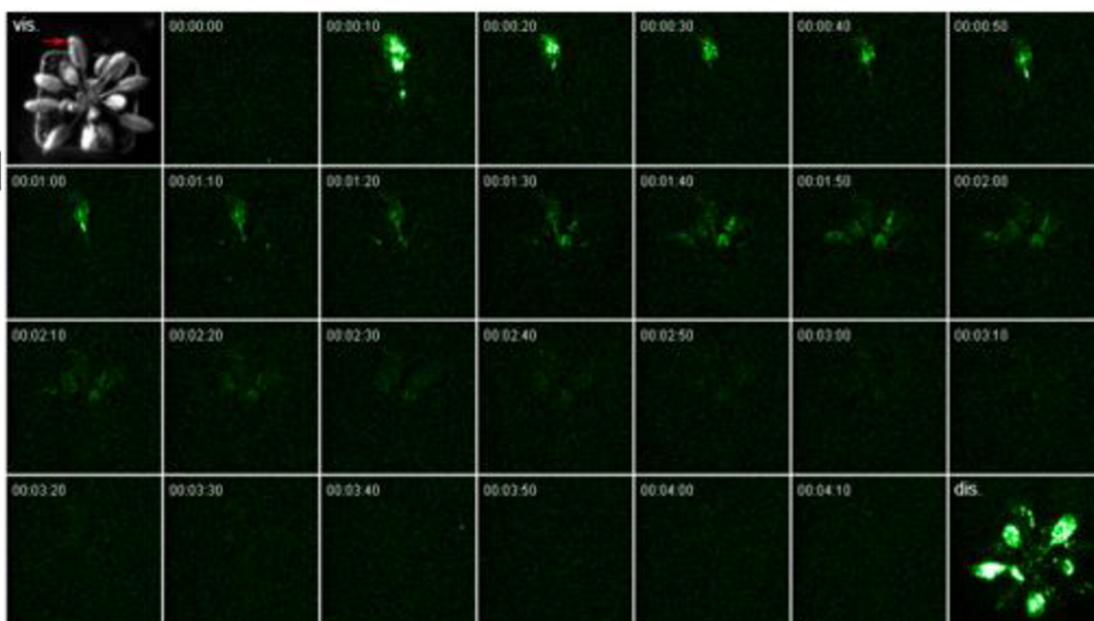
5.2 Analýza propagace Ca^{2+} vln pomocí vizualizace luminiscence aequorinu


Elektrické a Ca^{2+} signály jsou spolu úzce spjaty, a proto byl dalším experimentem monitoring hladin $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Toho bylo docíleno využitím transgenní rostliny *A. thaliana* exprimující protein apoaequorin z medúzy *A. victoria*. Tepelné poranění zřetelně indukovalo Ca^{2+} vlnu, která se z lokálního listu systémově šířila do sousedních listů jak v kontrolních rostlinách (Obr. 8A), tak i v rostlinách ovlivněných ketaminem (Obr. 8B).





 nízký $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ vysoký

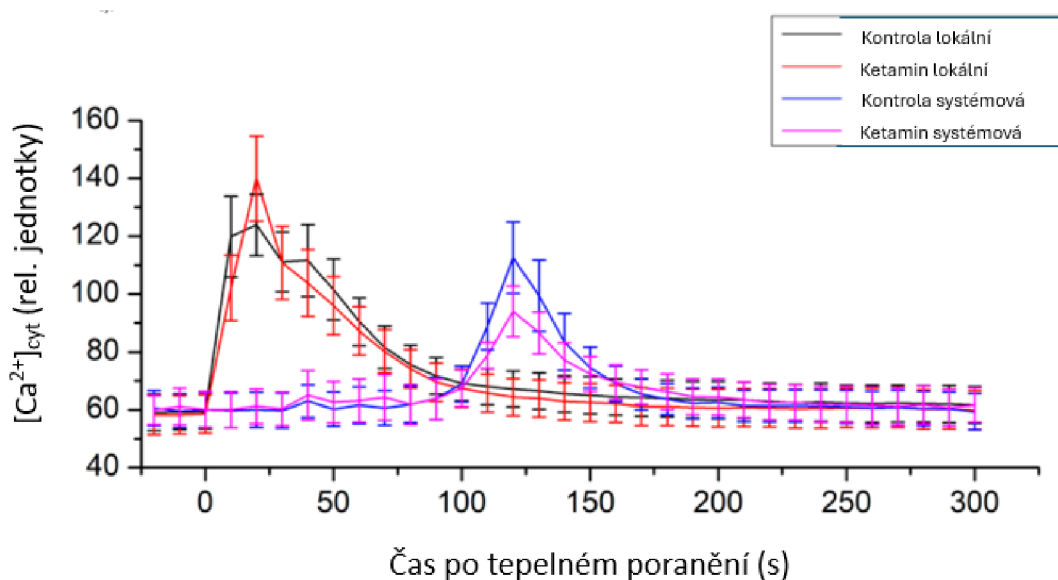




 nízký $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ vysoký

Obr. 8: Lokální a systémové $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ signály v transgenní *A. thaliana* exprimující apoaequorin v odpovědi na tepelné poranění. (A) Kontrolní rostliny. (B) Ketaminem ošetřené rostliny. První obrázek sekvence je fotografie růžice ve viditelném světle (vis.), místo tepelného poranění vedeného přes střední žílu je znázorněno červenou šipkou. Časový průběh (00:00:00–00:04:10, h:min:s) akumulace $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ znázorněn v levém horním rohu každé fotografie sekvence. Tepelné poranění lokálního listu v rozsahu 0–10 s, doba expozice 10 s. Poslední obrázek sekvence je kumulativní fotografie $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -dependentního počtu fotonů po vybití celé růžice (dis.), doba expozice 1 min.

Průměrná intenzita luminiscence lokálních listů kontrolních rostlin a ketaminem ovlivněných rostlin dosahovala nejvyšších hodnot v čase 25 s a následně pozvolně klesala, zatímco u systémových listů dosahovala nejvyšších hodnot v čase 125 s s následným pozvolným klesáním. Mezi kontrolními a ketaminem ošetřenými rostlinami nebyl pozorován signifikantní rozdíl v závislosti průměrné intenzity luminiscence na čase (Obr. 9).

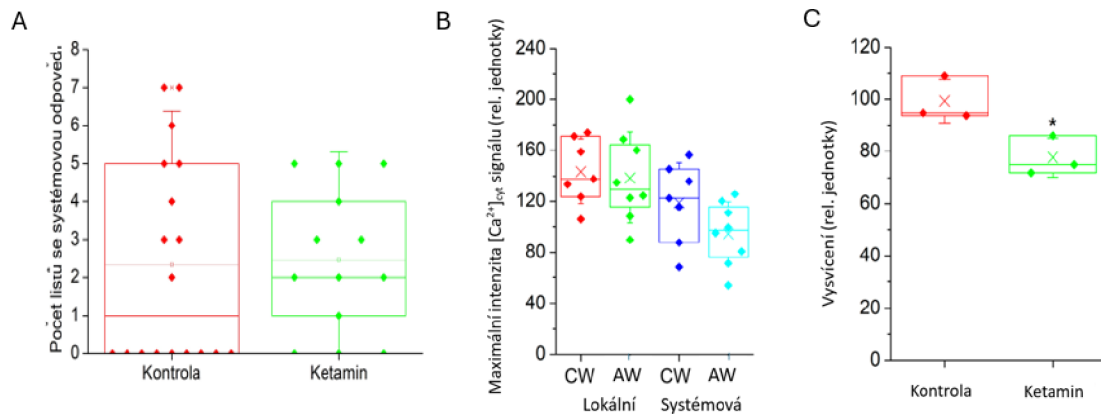


Obr. 9: Průměrná intenzita luminiscenčního signálu v lokálních a systémových listech transgení rostliny *A. thaliana* exprimující apoaequorin v reakci na tepelné poranění. Průměr ± SE, n = 7–9, statistická analýza provedena pomocí Welchova t-testu. Rostliny, u kterých nebyla detekována systémová odpověď, nebyly zapojeny do průměrování.

Počet systémových listů, které přijaly elektrické signály z poraněného lokálního listu, se mezi kontrolními a ketaminem ovlivněnými rostlinami signifikantně nelišil a u kontrolních vzorků byly pozorovány odlehlejší hodnoty. Lokální odpověď byla zaznamenána vždy, nicméně systémová odpověď nikoliv (Obr. 10A).

Maximální intenzita [Ca²⁺]_{cyt} signálu v lokálních listech obou skupin byla srovnatelná, avšak téměř signifikantně snižena (P = 0,06) v systémových listech rostlin ošetřených ketaminem oproti kontrolním rostlinám (Obr. 10B).

Hodnota intenzity poklesu signálu činila 20 %, což je srovnatelné s hodnotou intenzity poklesu signálu po vysvícení rostlin ovlivněných ketaminem, která činila 22 % (Obr. 10C), z čehož vyplývá, že i samotný zobrazovací systém je ovlivněn ketaminem.



Obr. 10: Kvantifikace $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signálu v transgenní rostlině *A. thaliana* exprimující apoaequorin. (A) Počet listů se systémovou odpovědí, $n = 13-18$. (B) Maximální intenzita luminiscenčního signálu v lokálních a systémových listech. Průměr \pm SE, $n = 7-8$. C – kontrolní rostliny, A – (anestetikem) ketaminem ošetřené rostliny, W – teplem poraněné rostliny. Rostliny, u kterých nebyla detekována systémová odpověď, nebyly zapojeny do průměrování. (C) Intenzita vysvícení pomocí 1 M $CaCl_2$ v 10% ethanolu, $n = 3$. \diamond = naměřené hodnoty, Boxplot znázorňuje 25. percentil, medián, 75. percentil datových bodů, \times = průměr naměřených hodnot, chybové úsečky ± 1 SD. Signifikantní rozdíly mezi kontrolními a ketaminem ovlivněnými rostlinami byly posouzeny pomocí Welchova t-testu, kdy * = $p < 0,05$.

5.3 Analýza exprese jasmonát-responzivních genů *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS* a *OPR3* pomocí qPCR

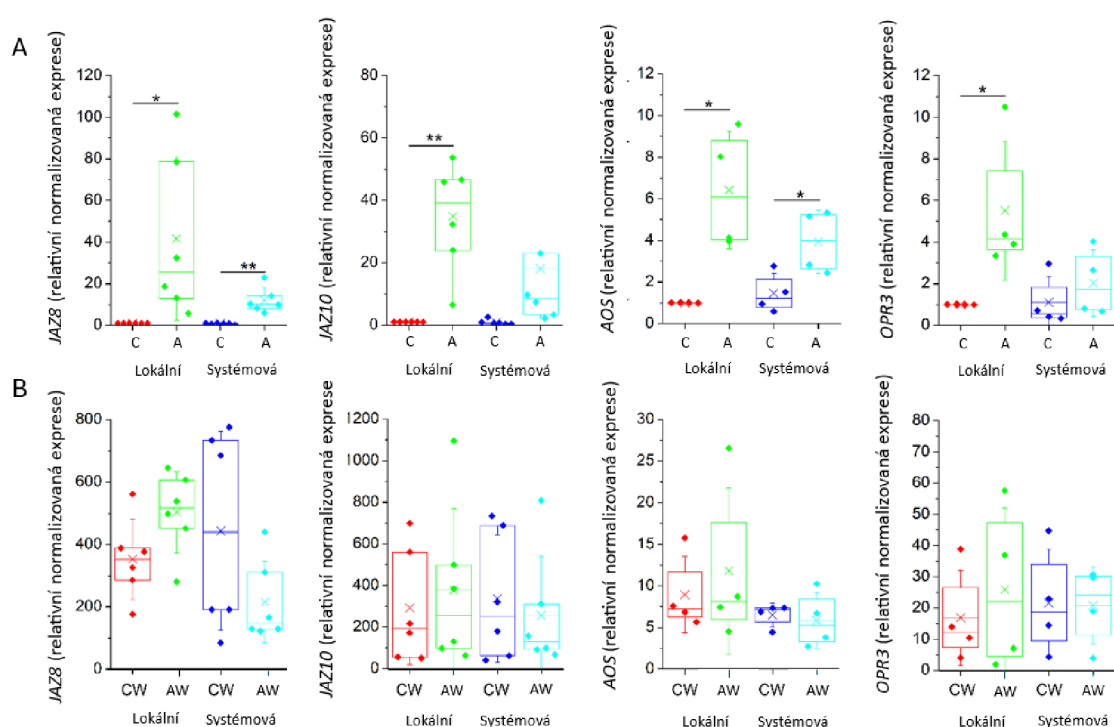
Pomocí kvantitativní PCR byla provedena analýza exprese genů účastnících se biosyntézy JA ('*allene oxide synthase*', *AOS*; '*12-oxophytodienoate reductase 3*', *OPR3*) a JA signalizace ('*jasmonate zim-domain 8*', *JAZ8*; '*jasmonate zim-domain 10*', *JAZ10*) v lokálních a systémových listech *A. thaliana*. Polovina testovaných rostlin byla 1 h před zahájením experimentu poraněna teplem.

Aplikace ketaminu vyvolala v rostlinách signifikantně větší expresi všech čtyř testovaných jasmonát-responzivních genů než jaká byla pozorována u kontrolních rostlin postříkaných dH_2O s 0,01% Tween 20, které vůbec neexprimovaly geny *JAZ8* a *JAZ10* a geny *AOS* a *OPR3* byly exprimovány pouze minimálně (Obr. 11A).

Teplé poranění dle očekávání vyvolalo ve všech testovaných rostlinách expresi všech čtyř jasmonát-responzivních genů, a to v daleko větším rozsahu než aplikace ketaminu. Míra exprese genů v ketaminem ošetřených rostlinách byla téměř srovnatelná s mírou exprese v kontrolních poraněných rostlinách postříkaných dH_2O

s 0,01% Tween 20 (Obr. 11B). Jako příklad lze uvést gen *JAZ8*, jehož hodnota exprese v ketaminem ošetřených rostlinách byla v lokálních listech sice přibližně 1,4× vyšší, ale mezi systémovými listy vykazovaly vyšší hodnotu exprese *JAZ8* kontrolní poraněné rostliny, konkrétně 3× vyšší. Podobné trendy vykazovaly také geny *JAZ10* a *AOS*, pouze hodnota exprese *OPR3* v ketaminem ošetřených rostlinách byla v obou případech lehce vyšší než u kontrolních rostlin.

Přestože nebyl prokázán signifikantní účinek ketaminu na lokální a systémovou expresi jasmonát-responzivních genů, vykazovaly rostliny po patnáctém dni od aplikace ketaminu v porovnání s kontrolními rostlinami známky nedostatečného růstu a opožděného vývoje (Obr. 12).



Obr. 11: Expresa jasmonát-responzivních genů v *A. thaliana*. (A) Genová exprese v lokálních a systémových listech ketaminem ošetřených rostlin. (B) Genová exprese v lokálních a systémových listech ketaminem ošetřených rostlin v odpovědi na tepelné poranění. Data o expresi normalizována proti *ubiquitin-conjugating enzyme 21 (UBC21)*, $n = 4-6$. \diamond = naměřené hodnoty, Boxplot zobrazuje 25. percentil, medián, 75. percentil datových bodů, \times = průměr naměřených hodnot, chybové úsečky ± 1 SD. C – kontrolní rostliny, A – (anestetikem) ketaminem ošetřené rostliny, W – teplem poraněné rostliny. Signifikantní rozdíly mezi kontrolními a ketaminem ovlivněnými rostlinami byly posouzeny pomocí Welchova t-testu, kdy ** = $p < 0,01$ a * = $p < 0,05$.



Obr. 12: Fenotyp rostlin *A. thaliana* 24 hodin (A) a 15 dní (B) od aplikace 0,5% ketaminu.

5.4 Porovnání aminokyselinové sekvence rostlinných GLR a živočišných NMDA receptorů

Pomocí programu BLAST (NCBI) byla porovnána aminokyselinová sekvence živočišných NMDA receptorů (NMDA 2A izoforma, NP_000824.1) se sekvencemi GLRs v *A. thaliana* AtGLR3.3 (NP_001322169.1) a AtGLR3.6 (NP_001326369.1). Konkrétně byla studována přítomnost L642 a N616, které se nacházejí v NMDA receptorech a jsou pro vazbu s ketaminem kritické (Zhang *et al.*, 2021). V GLR3.3 a 3.6 se ovšem na pozici N616 nachází mezera, a L642 je nahrazen N (Obr. 13). Slabý inhibiční účinek ketaminu na systémové šíření elektrického a Ca^{2+} signálu v *A. thaliana* byl pravděpodobně způsoben právě absencí těchto klíčových aminokyselinových reziduí v GLRs.

glutamate receptor 3.3 [Arabidopsis thaliana]

Sequence ID: [NP_001322169.1](#) Length: 933 Number of Matches: 2

[See 7 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 491 to 847 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
84.3 bits(207)	2e-20	Compositional matrix adjust.	84/385(22%)	165/385(42%)	34/385(8%)
Query 457	KGFCIDILKLSRTVKFTYDLYLVLTNGKHGKVNWVWNGMIGEVVYQRAVMAVGSLLINE				516
Sbjct 491	KGFCIDVFTAAVNLLPYAVPVKFIPIYG-NGKE-NPSYTHMVMITTNFDFGVGDVAIVT				548
Query 517	ERSEVDFSVFPFVETGISVMVSRNGTVSPSAFLPFASASVWMMFVMLLIVSAIAVVFV				576
Sbjct 549	NRTKIVDFTPQYAAASGLVAVPFKLLNSGAWAFLRPNRLMVAWTGCCFLFV-GIVVWIL				607
Query 577	EYFSPVGYNRNLAKGKAPHGSPFTIGKAIWLLWGLVFNNSVPVQNPKGTTSKIMVSVNAF				636
Sbjct 608	EH-----RTNDEFRGP--PKRQCVTILWFSFSTMH--FAHRENTVSTLGRVLIIWLF				656
Query 637	FAVIFLASYTANLAAFMIQEEFVDQVTGLSDKKFQRPDYSPPFRFGTVPNGSTERNIRN				696
Sbjct 657	VLLIINSSYTASLTSILTVQQLSSPIKGIES---LRERDDPIGYQVGSF---AESYLRN				709
Query 697	NYPYMHQYMTKFNQKGVEDALV-SLKTGKLDAFIYDAAVLNKAGRD---EGCKLVTIG				751
Sbjct 710	E---LNISESRLVPLGTPEAYAKALKDGPSKGGV--AAIVDERPYVELFSSNCAIRIVG				764
Query 752	SGYIFATTGYGIALQKGSPPKQRIDLALLQFVGDGEMEELETLWLT-GICHNEKNEVMSS				810
Sbjct 765	QE--FTKSGWGFAPRDSPLAIDLSTAILELAENGLQRIDHDKWLMKNACTLENAELES				822
Query 811	QLDIDNMAGVFYMLAAAMALSLITF		835		
Sbjct 823	RLHLKSFWGLFLICGVAALLALFLY		847		

glutamate receptor 3.6 [Arabidopsis thaliana]

Sequence ID: [NP_001326369.1](#) Length: 903 Number of Matches: 1

[See 5 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 458 to 837 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
94.4 bits(233)	2e-23	Compositional matrix adjust.	100/420(24%)	186/420(44%)	54/420(12%)
Query 430	VRNTVPCR-KFVKINNSTNEGMNVKCKCGFCIDILKLSRTVKFTYDLYLVLTNGK-HGK				487
Sbjct 458	LRIGVPNRYRFEVSVKSNM-----ITGFCVDVFIAAINLLPYAVPFELVAFNGHND				512
Query 488	KVNNVWNGMIGEVVYQRAVMAVGSLLINEERSEVDFSVFPFVETGISVMVSRNGTVSPS				547
Sbjct 513	PSNSELVRLITTVYD---AGVGDITIIITERTKMAFDTQPYVESGLVAVPRKLGSSAM				569
Query 548	AFLEPFASASVWMMFVMLLIVSAIAVVFVYFSPVGYNRNLAKGKAPHGSPFTIGKAIWL				607
Sbjct 570	AFLRPFTPQMWLIAAASFLIVGAV-IWCLEH-----KHNDEFRGP--PRRQVITTFWF				619
Query 608	LWGLVFNNSVPVQNPKGTTSS---KIMVSVNAF FAVIFLASYTANLAAFMIQEEFVDQVTG				664
Sbjct 620	SFSTLF-----FSHRETTTSLNLRIVLIIWLFVLLIINSSYTASLTSILTVHQLSSPIKG				674
Query 665	LSDKKFQRPDYSPPFRFGTVPNGSTERNIRNYPYMHQYMTKFNQ---KGVEDALVSL				720
Sbjct 675	I--ETLQTNHD---PIGY---PQGSFVRDY-----LIHELNIHVSRLVPLRSPEEYDKAL				721
Query 721	KTGKLDAFIYDAAVLNKAGRD---EGCKLVTIGSGYIFATTGYGIALQKGSPPKQRID				776
Sbjct 722	RDGPGKGGV--AAVDERAYIELFLSNRCEFGIVGQE--FTKNGWGFAPRNSPLAVDVS				777
Query 777	LALLQFVGDGEMEELETLWLT-GICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVFYMLAAAMALSLITF				835
Sbjct 778	AAILQLSENGDMQRIIRDKWLRLKACSLQGAIEVDRLKLSFVGLFVVCVACVLALAVY				837

Obr. 13: Blast analýza lidského glutamátového receptoru NMDA 2A (GluN2A) izoforma 1 (NP_000824.1) a *A. thaliana* GLR3.3 (NP_001322169.1) a GLR3.6 (NP_001326369.1). Klíčová rezidua podílející se na vazbě ketaminu (L642, N614) jsou znázorněna červenými obdélníky.

6 DISKUSE

Jak již bylo zmíněno, elektrická signalizace v rostlinách hraje klíčovou roli v mnoha fyziologických a obranných procesech a o její důležitosti tedy není pochyb. Studie týkající se rostlinných elektrických signálů se v posledních době zaměřují na vliv anestetik, převážně diethyletheru, v souvislosti s propagací elektrických signálů a dalšími fyziologickými funkcemi (Yokawa *et al.*, 2018; Pavlovič *et al.*, 2020; Jakšová *et al.*, 2021).

V rámci této bakalářské práce byl sledován vliv celkového anestetika ketaminu na elektrickou signalizaci a expresi jasmonát-responzivních genů v *Arabidopsis thaliana*. Pro měření povrchových potenciálů a exprese genů byly použity šestitýdenní rostliny *A. thaliana*, ekotyp Columbia divokého typu, a pro vizualizaci luminiscence aequorinu byly použity šestitýdenní rostliny *A. thaliana*, ekotyp Columbia exprimující apoaequorin pod kontrolou promotoru 35S CaMV. Rostliny byly tři hodiny před měřením ošetřeny postřikem 0,5% ketaminu v 0,01% Tween 20 a poté na nich byly provedeny experimenty zahrnující tepelné poranění.

Pomocí měření povrchových elektrických potenciálů povrchovými Ag/AgCl elektrodami byl studován vliv ketaminu na generování a šíření elektrických signálů v *A. thaliana* po tepelném poranění rostliny. Z naměřených výsledků vyplývá, že ketamin sice modifikuje elektrické signály, a to zejména v systémových listech, není však schopen propagaci zcela blokovat. Elektrické signály indukované v lokálních listech rostlin ošetřených ketaminem měly podobnou amplitudu a zkrácený poločas $t_{1/2}$ než u kontrolních rostlin a jejich šířením do systémových listů se poločas a amplituda zmenšovaly (Obr. 6, Obr. 7). Tyto výsledky se odlišují od výsledků publikovaných v práci Jakšová *et al.* (2021), kteří prováděli totožné měření po aplikaci plynného anestetika diethyletheru. Uvádějí, že signál v lokálních listech rostlin, které byly po 2,5 hodiny vystaveny působení diethyletheru, buďto nebyl detekován vůbec, nebo byla naměřena pouze malá depolarizace (intracelulární hyperpolarizace) a systémové šíření nebylo detekováno ani v jednom případě. Naměřená amplituda a poločasu kontrolních rostlin Jakšové *et al.* (2021) vykazovaly srovnatelné hodnoty s hodnotami publikovanými v této bakalářské práci (viz Obr. 6, Obr. 7).

Druhou použitou metodou byla vizualizace luminiscence aequorinu, pomocí níž byla monitorována koncentrace cytoplazmatického Ca^{2+} a zkoumán účinek ketaminu na propagaci Ca^{2+} vln v *A. thaliana* po tepelném poranění rostlin. Tepelné poranění

v lokálních listech kontrolních i ketaminem ošetřených rostlinách indukovalo Ca^{2+} signál a následně byla detekována propagace Ca^{2+} vlny do systémových listů obou skupin rostlin (Obr. 8A, Obr. 8B), která ovšem nebyla detekována ve všech případech (Obr. 10A). Rozdíly průměrné intenzity luminiscence $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ signálu v závislosti na čase v lokálních a systémových listech mezi kontrolními a ketaminem ošetřenými rostlinami (Obr. 9) nebyly signifikantní. Maximální intenzita tohoto signálu v systémových listech ketaminem ošetřených rostlin nicméně vykazovala 20% pokles v porovnání s maximální intenzitou v systémových listech rostlin kontrolních (Obr. 10B), což je přibližně srovnatelné s 22% poklesem intenzity signálu po vybití rostlin ošetřených ketaminem oproti kontrolním rostlinám (Obr. 10C). Podobnou inhibici luciferázového systému všeobecnými anestetiky detekovali ve své přelomové studii také Franks *et Lieb* (1984). Tyto výsledky poukazují na fakt, že ketamin neblokuje systémovou propagaci Ca^{2+} vlny. Nedávno publikovaná práce studující efekt diethyletheru odhalila, že tepelné poranění diethyletherem ošetřených rostlin indukuje Ca^{2+} signál v lokálních listech, ale nedochází k propagaci vlny do listů systémových s výjimkou detekce krátkého bazopetálního přenosu u některých lokálních listů. Autoři publikace tímto demonstrovali, že anestetikum diethylether není schopno zcela blokovat zvýšení koncentrace cytoplazmatického Ca^{2+} v lokálních poškozených listech, ale zato zcela blokuje systémovou propagaci, v čemž se liší od ketaminu (Jakšová *et al.*, 2021).

V rámci třetí metody byla pomocí kvantitativní PCR měřena exprese jasmonát-responzivních genů *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS* a *OPR3* v lokálních a systémových listech kontrolních a ketaminem ošetřených rostlin *A. thaliana*, přičemž byla polovina rostlin 1 hodinu před analýzou poraněna teplem. Dle očekávání v obou lokálních a systémových listech kontrolních neporaněných rostlin došlo k minimální expresi genů *AOS* a *OPR3* a geny *JAZ8* a *JAZ10* nebyly exprimovány vůbec. O to překvapivější byla míra exprese těchto genů jak v lokálních, tak v systémových listech ketaminem ošetřených neporaněných rostlin (Obr. 11A). Teplem poraněné rostliny obou skupin (Obr. 11B) vykazovaly expresi všech čtyř genů ve větším rozsahu než ketaminem ovlivněné neporaněné rostliny, což vypovídá o neschopnosti ketaminu inhibovat expresi jasmonát-responzivních genů. V roce 2019 vědci zjistili, že doba trvání depolarizace ovlivňuje sílu jasmonátové odpovědi (Kumari *et al.*, 2019), což ovšem nekoreluje s naměřenými výsledky v této práci, jelikož jasmonátová odpověď nebyla redukována, avšak může být kompenzována její aktivací samotným ketaminem. Již zmíněná práce zabývající se účinkem diethyletheru na *A. thaliana* zkoumala mimo jiné jeho vliv

na expresi genů *JAZ10*, *AOS* a *OPR3* (Jakšová *et al.*, 2021). Uvádí, že míra exprese genu *JAZ10* v lokálních a přilehlých systémových listech rostlin poraněných teplem je signifikantně vyšší, než je tomu u poraněných rostlin ošetřených diethyletherem. Diethylether potlačuje expresi *JAZ10* v lokálních listech, která je však stále 260× vyšší než u kontrolních neporaněných rostlin. Podobné trendy vykazují také geny *AOS* a *OPR3*. V porovnání s ketaminem lze proto diethyletheru přisoudit schopnost potlačit jasmonátovou systémovou signalizaci (Jakšová *et al.*, 2021).

U celkového inhalačního anestetika diethyletheru dosud není znám žádný jeho specifický molekulární cíl a platí, že může ovlivňovat funkci kanálu svou rozpustností v lipidové dvojvrstvě (Pavel *et al.*, 2020) a nebo se nespecificky vázat na hydrofobní kapsu spousty proteinů (Franks *et Lieb*, 1984; Kelz *et Mashour*, 2019). Oproti tomu celkové intravenózní anestetikum ketamin je antagonistou savčích NMDA receptorů, homologních s rostlinnými GLRs. Právě díky homologii těchto dvou receptorů byl očekáván inhibiční efekt ketaminu na systémovou odpověď *A. thaliana* podobný tomu vyvolanému diethyletherem. Opak byl pravdou a z výsledků publikovaných v této bakalářské práci a výsledků experimentu Jakšové *et al.*, 2021 je zřejmé, že diethylether v systémových listech *A. thaliana* zcela potlačuje elektrickou a Ca^{2+} signalizaci včetně exprese jasmonát-responzivních genů, zatímco ketamin není schopen zabránit systémové propagaci signálů, pouze lehce snižuje jejich amplitudu a dobu trvání, a neredukuje jasmonátovou odpověď. V průběhu práce na experimentu s ketaminem byla publikována práce Zhang *et al.*, 2021, kteří pomocí kryo-elektronového mikroskopu vyřešili strukturu komplexu lidského NMDA receptoru s ketaminem. Ketamin se váže v TMD receptoru v centrálním vestibulu mezi bránou kanálu a selektivním filtrem. Klíčovými byly označeny aminokyseliny Leu642 na GluN2A a Asn616 na GluN1, rezidua tvořící s ketaminem hydrofobní a vodíkové vazby (Zhang *et al.*, 2021). Porovnání aminokyselinové sekvence s rostlinnými GLR3.3 a GLR3.6 odhalilo, že na pozici Asn616 se nachází mezera a Leu642 je nahrazen Asn (viz Obr. 13). Mutovaný GluN2A s Asn namísto Leu vykazoval 226× sníženou potenci inhibice ketaminem (Franks, 2008). Absence klíčových reziduí pro vazbu ketaminu v rostlinných GLRs nejspíš stojí za slabým účinkem ketaminu při blokaci systémového šíření elektrického signálu v *A. thaliana* v porovnání s diethyletherem, a to i navzdory aplikování vysoké koncentrace 18 mM. Při aplikování 1% (36mM) roztoku ketaminu rostliny vykazovaly známky poškození listů. Ketamin se již v minulosti prokázal jako neefektivní v rámci inhibice zavírání pasti u *D. muscipula* (de Luccia, 2012),

zatímco diethylether v lalocích pasti *D. muscipula* zcela inhibuje generování APs a jasmonátovou signalizaci v reakci na dotek či poranění (Yokawa *et al.*, 2018; Pavlovič *et al.*, 2020). Podle nedávných studií je šíření elektrického signálu ze smyslových buněk trichomu do laloku pasti *D. muscipula* analogní se systémovou signalizací v listech *A. thaliana*, a to nejspíše díky přítomnosti GLR3.6 a glutamátu (Iosip *et al.*, 2020; Scherzer *et al.*, 2022), což by vysvětlovalo podobné účinky dvou odlišných anestetik na dvě naprosto odlišné rostlinné druhy.

Předkládané výsledky nabízejí vhled do problematiky dosud zcela neobjasněného mechanismu účinku celkového intravenózního anestetika ketaminu na rostliny a jejich elektrickou signalizaci. V oblasti mechanismu účinku ketaminu je přesto stále spousta neznámých a další výzkum by se mohl ubírat směrem jeho přímého vlivu na GLR kanály heterologně exprimované v buněčných liniích HEK293 (Shao *et al.*, 2020).

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce si kladla za cíl vizualizovat Ca^{2+} signalizaci pomocí transgenních rostlin *A. thaliana* a využít ji při studiu vlivu celkového intravenózního anestetika ketaminu na šíření systémového elektrického a s ním úzce spjatého Ca^{2+} signálu v odpovědi na tepelné poranění.

Z výsledků měření povrchového elektrického potenciálu vyplývá, že ketamin modifikuje elektrické signály, a to převážně v systémových listech. Poranění lokálních listů *A. thaliana* ošetřených ketaminem v nich indukovalo elektrické signály se stejnou amplitudou a zkráceným poločasem oproti kontrolním rostlinám. Signál se během desítek sekund rozšířil do systémových listů, kde byla naměřena výrazně redukovaná amplituda a poločas.

Monitoring hladin $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ v transgenní *A. thaliana* exprimující apoaequorin ukázal, že ketamin neblokuje propagaci Ca^{2+} vlny a mírně inhibuje aequorinový systém. Indukce a následná propagace Ca^{2+} vlny do systémových listů po tepelném poranění byla pozorována jak v kontrolních, tak ketaminem ovlivněných rostlinách. Rozdíl v počtu systémových listů, do kterých se šířily elektrické signály z lokálních listů ketaminem ošetřených rostlin nebyl signifikantně odlišný od kontrolních rostlin. U systémových listů ketaminem ošetřených rostlin byl však pozorován 20% pokles maximální intenzity $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ signálu, což téměř odpovídá 22% poklesu u CaCl_2 vysvícených rostlin ošetřených ketaminem.

Analýza exprese jasmonát-responzivních genů *JAZ8*, *JAZ10*, *AOS* a *OPR3* ukázala, že ketamin neblokuje jejich expresi. V ketaminem ošetřených rostlinách byly exprimovány všechny testované geny, což se nedá říct o expresi genů v kontrolních rostlinách, kde se neexprimovaly vůbec (*JAZ8*, *JAZ10*) či minimálně (*AOS*, *OPR3*). V tepelně poraněných rostlinách ošetřených ketaminem byla jejich exprese pozorována ještě ve větším rozsahu než v rostlinách ošetřených ketaminem bez tepelného poranění a míra exprese byla obdobná jako míra exprese u kontrolních poraněných rostlin.

Ze získaných výsledků je zřejmé, že ketamin nejspíš není schopen účinně inhibovat rostlinné receptory podobné glutamátovým receptorům pravděpodobně z důvodu absence konzervovaných aminokyselinových reziduí potřebných pro vazbu s ketaminem.

8 LITERATURA

- Adams J.D., Castagnoli N., Trevor A.J. (1978): Quantitative analysis of ketamine enantiomers. *Proceedings of Western Pharmacology Society* 21: 471–472.
- Alfieri A., Doccula F.G., Pederzoli R., Grenzi M., Bonza M.C., Luoni L., Candeco A., Romano Armada N., Barbiroli A., Valentini G., Schneider T.R., Bassi A., Bolognesi M., Nardini M., Costa A. (2020): The structural bases for agonist diversity in an *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor-like channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 117: 752–760.
- Allen D.G., Blinks J.R., Prendergast F.G. (1977): Aequorin luminescence: Relation of light emission to calcium concentration – a calcium-independent component. *Science* 195: 996–998.
- Andrade C. (2017): Ketamine for depression, 4: in what dose, at what rate, by what route, for how long, and at what frequency? *Journal of Clinical Psychiatry* 78: e852–e857.
- Autry E.A., Adachi M., Nosyreva E., Na E.S., Los M.F., Cheng P., Kavalali E.T., Monteggia L.M. (2011): NMDA receptor blockage at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 475: 91–95.
- Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. (1999): Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 96: 11241–11246.
- Baubet V., Le Mouellic H., Campbell A.K., Lucas-Meunier E., Fossier P., Brulet P. (2000): Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca^{2+} reporters at the single-cell level. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 97: 7260–7265.
- Bellandi A., Papp D., Breakspear A., Joyce J., Johnston M.G., de Keijzer J., Raven E.C., Ohtsu M., Vincent T.R., Miller A.J., Sanders D., Hogenhout S.A., Morris R.J., Faulkner C. (2022): Diffusion and bulk flow of amino acids mediate calcium waves in plants. *Science Advances* 8: eabo6693.
- Berman R.M., Cappiello A., Anand A., Oren D.A., Heninger G.R., Charney D.S., Krystal J.H. (2000): Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biological Psychiatry* 47: 351–354.
- Bernard C. (1878): *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*. J.-B. Baillière et Fils, Paris, France.

- Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (7): 517–529.
- Bose J., Pottosin I.I., Shabala S.S., Palmgren M.G., Shabala S. (2011): Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. *Frontiers in Plant Science* 2: 85.
- Bulychev A.A., Kamzolkin N.A. (2006): Differential effects of plasma membrane electric excitation on H⁺ fluxes and photosynthesis in characean cells. *Bioelectrochemistry* 69 (2): 209–15.
- Bünning E. (1934): Refraktärstadium, Ermüdung und Narkose bei der Seismonastie. *Zeitschrift Für Wissenschaftliche Biologie Abteilung E Planta* 21: 324–352.
- Bush D.S., Jones R.L. (1987): Measurement of cytoplasmic calcium in aleurone protoplasts using indo-1 and fura-2. *Cell Calcium* 8 (6): 455–472.
- Bush D.S., Jones R.L. (1990): Measuring intracellular Ca levels in plant cell using the fluorescent probes, indo-1 and fura-2: Progress and prospects. *Plant Physiology* 93: 841–845.
- Cullen S.C., Gross E.G. (1951): The anesthetic properties of xenon in animals and human beings with additional observations on krypton. *Science* 133: 580–582.
- Dachs R.J., Innes G.M. (1997): Intravenous ketamine sedation of pediatric patients in the emergency department. *Annals of Emergency Medicine* 29: 146–150.
- Dana H., Sun Y., Hulse B.K., Kerlin A.M., Hasseman J.P., Tsegaye G., Tsang A., Wong A., Patel R., Macklin J.J., Chen Y., Konnerth A., Jayaraman V., Looger L.L., Schreier E.R., Svoboda K., Kim D.S. (2019): High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. *Nature Methods* 16: 649–657.
- Davies E. (1987): Action-potentials as multifunctional signals in plants – a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. *Plant Cell and Environment* 10: 623–631.
- Davies E., Stankovic B. (2006): Electrical signals, the cytoskeleton, and gene expression: a hypothesis on the coherence of the cellular responses to environmental insult. In: Baluska F., Mancuso S., Volkmann D. (ed.): *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life*, pp. 309–320, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany.

- Day I.S., Reddy V.S., Shad Ali G., Reddy ASN (2002): Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biology* 3: research0056.1–research0056.24..
- De Luccia T.P. (2012): *Mimosa pudica*, *Dionaea muscipula* and anesthetics. *Plant Signaling and Behavior* 7: 1163–1167.
- Denninger P., Bleckmann A., Lausser A., Vogler F., Ott T., Ehrhardt D.W., Frommer W.B., Sprunck S., Dresselhaus T., Grossmann G. (2014): Male-female communication triggers calcium signatures during fertilization in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 5: 4645.
- Dundee J.W., Knox J.W., Black G.W., Moore J., Pandit S.K., Bovill J., Clarke R.S., Love S.H., Elliott J., Coopel D.L. (1970): Ketamine as an induction agent in anaesthetics. *The Lancet* 1: 1370–1371.
- Dziubinska H., Filck M., Koscielniak J., Trebacz K. (2003): Variation and action potentials evoked by thermal stimuli accompany enhancement of ethylene emission in distant non-stimulated leaves of *Vicia faba* minor seedlings. *Journal of Plant Physiology* 160 (10): 1203–1210.
- Ebert B., Mikkelsen S., Thorkildsen C., Borgbjerg F.M. (1997): Norketamine, the main metabolite of ketamine, is a non-competitive NMDA receptor antagonist in the rat cortex and spinal cord. *European Journal of Pharmacology* 333: 99–104.
- Edel K.H., Kudla J. (2015): Increasing complexity and versatility: how the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization. *Cell Calcium* 57 (3): 231–246.
- Fava M., Freeman M.P. Flynn M., Judge H., Hoepfner B.B., Cusin C., Ionescu D.F., Mathew S.J., Chang L.C., Iosifescu D.V., Murrugh J., Debattista C., Schatzberg A.F., Trivedi M.H., Jha M.K., Sanacora G., Wilkinson S.T., Papakostas G.I. (2020): Double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial of intravenous ketamine as adjunctive therapy in treatment-resistant depression (TRD). *Molecular Psychiatry* 25: 1592–1603.
- Fichman Y, Mittler R (2021): Integration of electric, calcium, reactive oxygen species and hydraulic signals during rapid systemic signaling in plants. *The Plant Journal* 107 (1): 7–20.
- Forde B.G. (2014): Glutamate signalling in roots. *Journal of Experimental Botany* 65 (3): 779–787.
- Franks N.P. (2008): General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nature Reviews Neuroscience* 9: 370–386.

- Franks N.P., Lieb W.R. (1984): Do general anesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 310: 599–601.
- Fromm J. (2006): Long-distance electrical signalling and its physiological functions in higher plants. In: Volkov A.G. (ed.): *Plant Electrophysiology*, pp. 269–285, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany.
- Fromm J., Hajirezaei M., Wilke I. (1995): The biochemical response of electrical signaling in the reproductive system of Hibiscus plants. *Plant Physiology* 109: 375–384.
- Fromm J., Lautner S. (2007): Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, Cell and Environment* 30: 249–257.
- Green S.M., Roback M.G., Kennedy R.M., Krauss B. (2011): Clinical practice guideline for emergency department ketamine dissociative sedation: 2011 update. *Annals of Emergency Medicine* 57: 449–461.
- Hagihara T., Mano H., Miura T., Hasebe M., Toyota M. (2022): Calcium-mediated rapid movements defend against herbivorous insects in *Mimosa pudica*. *Nature Communications* 13: 6412.
- Hedrich R., Becker D. (1994): Green circuits – the potential of plant specific ion channels. *Plant Molecular Biology* 26: 1637–1650.
- Heim N., Garaschuk O., Friedrich M.W., Mank M., Milos R.I., Kovalchuk Y., Konnerth A., Griesbeck O. (2007): Improved calcium imaging in transgenic mice expressing a troponin C-based biosensor. *Nature Methods* 4: 127–129.
- Herde O., Peña-Cortés H., Willmitzer L., Fisahn J. (1997): Stomatal responses to jasmonic acid, linolenic acid and abscisic acid in wild-type and ABA-deficient tomato plants. *Plant, Cell & Environment* 20: 136–141.
- Hirota K., Okawa H., Appadu B.L., Grandy D.K., Devi L.A., Lambert D.G. (1999): Stereoselective interactions of ketamine with recombinant mu, kappa, and delta opioid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Anesthesiology* 90: 174–182.
- Hlaváčková V., Krchňák P., Nauš J., Novák O., Špundová M., Strnad M. (2006): Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta* 225 (1): 235–244.
- Horikawa K., Yamada Y., Matsuda T., Kobayashi K., Hashimoto M., Matsu-ura T., Miyawaki A., Michikawa T., Mikoshiba K., Nagai T. (2010): Spontaneous network

- activity visualized by ultrasensitive Ca^{2+} indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nature Methods* 7: 729–732.
- Hustveit O., Maurset A., Oye I. (1995): Interaction of the chiral forms of ketamine with opioid, phencyclidine, sigma and muscarinic receptors. *Pharmacology & Toxicology* 77: 355–359.
- Chen X., Shu S., bayliss D.A. (2009): HCN1 channel subunits are a molecular substrate for hypnotic actions of ketamine. *Journal of Neuroscience* 29: 600–609.
- Chini A., Monte I., Zamarreño A.M., Hamberg M., Lassuer S., Reymond P., Weiss S., Stintzi A., Schaller A., Porzel A., García-Mina J.M., Solano R. (2018): An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nature Chemical Biology* 14: 171-178.
- Ilík P., Hlaváčková V., Krchňák P., Nauš J. (2010): A low-noise multi-channel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum* 54: 185–190.
- Jakšová J., Rác M., Bokor B., Petřík I., Novák O., Reichelt M., Mithöfer A., Pavlovič A. (2021): Anaesthetic diethyl ether impairs long-distance electrical and jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 169: 311–321.
- Kaiser H., Grams T.E.E. (2006): Rapid hydropassive opening and subsequent active stomatal closure follow heat-induced electrical signals in *Mimosa pudica*. *Journal of Experimental Botany* 57 (9): 2087–2092.
- Keinath N.F., Waadt R., Brugman R., Schroeder J.I., Grossmann G., Schumacher K., Krebs M. (2015): Live cell imaging with R-GECO1 sheds light on flg22- and chitin-induced transient $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ patterns in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 8: 1188–1200.
- Kelz M.B., Mashour G.A. (2019): The biology of general anesthesia from Paramecium to Primate. *Current Biology* 29 (22): R1199-R1210.
- Kiep V., Vadassery J., Lattke J., Maaß J.-P., Boland W., Peiter E., Mithöfer A. (2015): Systemic cytosolic Ca^{2+} elevation is activated upon wounding and herbivory in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 207: 996-1004.
- Kimmerer T.W., Kozlowski T.T. (1982): Ethylene, ethane, acetaldehyde, and ethanol production by plants under stress. *Plant Physiology* 69: 840–847.

- Knight M.R., Campbell A.K., Smith S.M., Trewavas A.J. (1991): Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352: 524–526.
- Kohrs R., Durieux M.E. (1998): Ketamine: teaching an old drug new tricks. *Anesthesia & Analgesia* 87: 1186–1193.
- Koziolok C., Grams T.E.E., Schreiber U., Matyssek R., Fromm J. (2004): Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytologist* 161: 715–722.
- Kudla J., Becker D., Grill E., Hedrich R., Hippler M., Kummer U., Parniske M., Romeis T., Schumacher K. (2018): Advances and current challenges in calcium signaling. *New Phytologist* 218 (2): 414–431.
- Kumari A., Chételat A., Nguyen C.T., Farmer E.E. (2019): Arabidopsis H⁺-ATPase AHA1 controls slow wave potential duration and wound-response jasmonate pathway activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 116: 20226–20231.
- Kurusu T., Kuchitsu K., Nakano M., Nakayama Y., Iida H. (2013): Plant mechanosensing and Ca²⁺ transport. *Trends in Plant Science* 18: 227–233.
- Lacombe B., Becker D., Hedrich R., DeSalle R., Hollmann M., Kwak J.M., Schroeder J.I., Le Novère N., Nam H.G., Spalding E.P., Tester M., Turano F.J., Chiu J., Coruzzi G. (2001): The identity of plant glutamate receptors. *Science* 292: 1486–1487.
- Lam H.M., Chiu J., Hsieh M.H., Meisel L., Oliveira I.C., Shin M., Coruzzi G. (1998): Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396: 125–126.
- Lautner S., Grams T.E.E., Matyssek R., Fromm J. (2005): Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology* 138: 2200–2209.
- Lodge D., Anis N.A., burton N.R. (1982): Effects of optical isomers of ketamine on excitation of cat and rat spinal neurones by amino acids and acetylcholine. *Neuroscience Letters* 29: 281–286.
- Love J., Dodd A.N., Webb A.A. (2004): Circadian and diurnal calcium oscillations encode photoperiodic information in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16: 956–966.
- Lunevsky V.Z., Zherelova O.M., Vostrikov I.Y., Berestovsky G.N. (1983). Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *Journal of Membrane Biology* 72: 43–58.

- Madden D.R. (2002): The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nature Reviews Neuroscience* 3: 91–101.
- Mahajan S., Sopoy S.K., Tuteja N. (2006): CBL-CIPK paradigm: role in calcium and stress signaling in plants. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 72: 63–78.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139–158.
- Malinovsky J.M., Servin F., Cozian A., Lepage J.Y., Pinaud M. (1996): Ketamine and norketamine plasma concentrations after i.v., nasal and rectal administration in children. *British Journal of Anaesthesia* 77: 203–207.
- Manohar M., Shigaki T., Hirschi K.D. (2011): Plant cation/H⁺ exchangers (CAXs): biological functions and genetic manipulations. *Plant Biology* 13: 561–569.
- Martí M.C., Stancombe M.A., Webb A.A. (2013): Cell- and stimulus type-specific intracellular free Ca²⁺ signals in Arabidopsis. *Plant Physiology* 163: 625–634.
- Martí Ruiz M.C., Jung H.J., Webb A.A.R. (2020): Circadian gating of dark-induced increases in chloroplast- and cytosolic-free calcium in Arabidopsis. *New Phytologist* 225: 1993–2005.
- Meyer H. (1899): Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 42: 109–118.
- Miller J. (1947): The fourth of November, 1847: James Young Simpson and chloroform anaesthesia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 54: 729–732.
- Mithöfer A., Mazars C. (2002): Aequorin-based measurements of intracellular Ca²⁺-signatures in plant cells. *Biological Procedures Online* 4: 105–118.
- Miyawaki A., Griesbeck O., Heim R., Tsien R.Y. (1999): Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved Cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 96: 2135–2140.
- Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J.M., Adams J.A., Ikura M., Tsien R.Y. (1997): Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388: 882–887.
- Moreno I., Norambuena L., Maturana D., Toro M., Vergara C., Orellana A., Zurita-Silva A., Ordenes V.R. (2008): AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca²⁺/heavy metal pump. *Journal of Biological Chemistry* 283: 9633–9641.

- Morgan A.J., Galione A. (2014): Two-pore channels (TPCs): current controversies. *BioEssays* 36: 173–183.
- Mousavi S.A.R., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E.E. (2013): Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500: 422–426.
- Nagai T., Ibata K., Park E.S., Kubota M., Mikoshiba K., Miyawaki A. (2002): A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology* 20: 87–90.
- Nakai J., Ohkura M., Imoto K. (2001): A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 19: 137–141.
- Ngo Q.A., Vogler H., Lituiev D.S., Nestorova A., Grossniklaus U. (2014): A calcium dialog mediated by the FERONIA signal transduction pathway controls plant sperm delivery. *Developmental Cell* 29: 491–500.
- Nguyen C.T., Kurenda A., Stolz S., Chételat A., Farmer E.E. (2018): Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 115: 10178–10183.
- Nunn J.F. (1985): Isoflurane as a routine anaesthetic in general surgical practice. *British Journal of Anaesthesia* 57: 461–475.
- Oda K., Abe T. (1972): Action potential and rapid movement in the main pulvinus of *Mimosa pudica*. *The Botanical Magazine Tokyo* 85: 135–145.
- Ohmiya Y., Hirano T. (1996): Shining the light: The mechanism of the bioluminescence reaction of calcium-binding photoproteins. *Chemistry & Biology* 3: 337–347.
- Overton C.E. (1901): Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur Allgemeinen Pharmakologie. Gustav Fischer, Jena, Germany.
- Oye I., Paulsen O., Maurset A. (1992): Effects of ketamine on sensory perception: evidence for a role on N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 260: 1209–1213.
- Palmer A.E., Giacomello M., Kortemme T., Hires S.A., Lev-Ram V., Baker D., Tsien R.Y. (2006): Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chemistry & Biology* 13: 521–530.
- Pavel M.A., Petersen N., Wang H., Lerner R.A., Hansen S.B. (2020): Studies on the mechanism of general anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 117: 13757–13766.

- Pavlovič A., Libiaková M., Bokor B., Jakšová J., Petřík I., Novák O., Baluška F. (2020): Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Annals of Botany* 125: 173–183.
- Perez Koldenkova V., Nagai T. (2013): Genetically encoded Ca²⁺ indicators: properties and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833: 1787–1797.
- Perouansky M. (2012): The quest for a unified model of anaesthetic action: a century in Claude Bernard's shadow. *Anesthesiology* 117: 465–474.
- Pfaffl M.V. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45.
- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229–233.
- Procko C., Lee T., Borsuk A., Bargmann B.O.R., Dabi T., Nery J.R., Estelle M., Baird L., O'Connor C., Brodersen C., Ecker J.R., Chory J. (2022): Leaf cell-specific and single-cell transcriptional profiling reveals a role for the palisade layer in UV light protection. *The Plant Cell* 34 (9): 3261–3279.
- Raventós J., Goodall R.R. (1956): The action of Fluothane — A new non-inflammable volatile anaesthetic. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 11: 394–410.
- Rinaldi A. (2014): Reawakening anaesthesia research. *EMBO Reports* 15: 1113–1118.
- Robert V., Pinton P., Tosello V., Rizzuto R., Pozzan T. (2000): Recombinant aequorin as tool for monitoring calcium concentration in subcellular compartments. *Methods in Enzymology* 327: 440–456.
- Rogers K.L., Stinnakre J., Agulhon C., Jublot D., Shorte S.L., Kremer E.J., Brulet P. (2005): Visualization of local Ca²⁺ dynamics with genetically encoded bioluminescent reporters. *European Journal of Neuroscience* 21: 597–610.
- Roytblat L., Talmor D., Rachinsky M., Greemberg L., Pekar A., Appelbaum A., Gurman G.M., Shapira Y., Duvdenani A. (1998): Ketamine attenuates the interleukin-6 response after cardiopulmonary bypass. *Anesthesia & Analgesia* 87: 266–271.
- Sage M., Laird S.M. (1972): Ketamine anaesthesia for burns surgery. *Postgraduate Medical Journal* 48: 156–161.

- Sai J., Johnson C.H. (2002): Dark-stimulated calcium ion fluxes in the chloroplast stroma and cytosol. *The Plant Cell* 14: 1279–1291.
- Salvador-Recatalà V. (2016): New roles for the glutamate receptor-like 3.3, 3.5 and 3.6 genes as on/off switches of wound-induced systemic electrical signals. *Plant Signaling & Behavior* 11 (4): e1161879.
- Shao Q., Gao Q., Lhamo D., Zhang H., Luan S. (2020): Two glutamate- and pH-regulated Ca²⁺ channels are required for systemic wound signaling in Arabidopsis. *Science Signaling* 13: eaba1453.
- Shimomura O. (1995): A short story of aequorin. *Biology Bulletin* 189: 1–5.
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusas, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59: 223–239.
- Scherzer S., Böhm J., Huang S., Iosip A.L., Kreuzer I., Becker D., Heckmann M., Al-Rasheid K.A.S., Dreyer I., Hedrich R. (2022): A unique inventory of ion transporters poises the Venus flytrap to fast-propagating action potentials and calcium waves. *Current Biology* 32: 4255–4263.
- Scholfield C.N. (1980): Potentiation of inhibition by general anaesthetics in neurones of the olfactory cortex in vitro. *Pflügers Archiv* 383: 249–255.
- Sibaoka T. (1951): Electrical potential changes in the main pulvinus and leaf movement of *Mimosa pudica*. *Science Reports of Tohoku University (Biology)* 19: 133–139.
- Sibaoka T. (1969): Physiology of rapid movements in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 20: 165–184.
- Sibaoka T. (1980): Action potentials and rapid plant movements. In: Skoog F. (ed.): *Plant Growth Substances 1979*, pp. 462–469, Springer-Verlag, Berlin and Heidenberg, Germany.
- Spalding E.P., Harper J.F. (2011): The ins and outs of cellular Ca²⁺ transport. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 715–720.
- Stahlberg R., Cleland R.E., Van Volkenburgh E. (2006): Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants. In: Baluska F., Mancuso S., Volkmann D. (ed.): *Communication in Plants – Neuronal Aspects of Plant Life*, pp. 291–308, Springer-Verlag, Berlin and Heidenberg, Germany.
- Stahlberg R., Cosgrove D.J. (1992): Rapid alteration in growth rate and electric potentials upon stem excision in pea seedlings. *Planta* 187: 523–531.

- Stahlberg R., Cosgrove D.J. (1994): Comparison of electric and growth responses to excision in cucumber and pea seedlings. I. Short-distance effects are due to wounding. *Plant, Cell & Environment* 18: 33–41.
- Stankovic B., Witters D.L., Zawadzki T., Davies E. (1998): Action potentials and variation potentials in sunflower: an analysis of their relationship and distinguishing characteristics. *Physiologia Plantarum* 103: 51–58.
- Suda H., Mano H., Toyota M., Fukushima K., Mimura T., Tsutsui I., Hedrich R., Tamada Y., Hasebe M (2020). Calcium dynamics during trap closure visualized in transgenic Venus flytrap. *Nature Plants* 6: 1219–1224.
- Suhita D., Raghavendra A.S., Kwak J.M., Vavasseur A. (2004): Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology* 134: 1536–1545.
- Thestrup T., Litzlbauer J., Bartholomus I., Mues M., Russo L., Dana H., Kovalchuk Y., Liang Y., Kalamakis G., Laukat Y., Becker S., Witte G., Geiger A., Allen T., Rome L.C., Chen T.W., Kim D.S., Garaschuk O., Griesinger C., Griesbeck O. (2014): Optimized radiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nature Methods* 11: 175–182.
- Tian L., Hires S.A., Mao T., Huber D., Chiappe M.E., Chalasani S.H., Petreanu L., Akerboom J., McKinney S.A., Schreiter E.R., Bargmann C.I., Jayaraman V., Svoboda K., Looger L.L. (2009): Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods* 6: 875–881.
- Toyota M., Spencer D., Sawai-Toyota S., Jiaqi W., Zhang T., Koo A.J., Howe G.A., Gilroy S. (2018): Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* 361 (6407): 1112–1115.
- Trebacz K., Zawadzki T. (1985): Light-triggered action potentials in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiologia Plantarum* 64: 482–486.
- Tsien R.Y. (1980): New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 27: 2396–2404.
- Tsuchiya H. (2017): Anesthetic agents of plant origin: a review of phytochemicals with anesthetic activity. *Molecules* 22: E1369.
- Tuteja N., Mahajan S. (2007): Calcium signaling network in plants. *Plant Signaling & Behavior* 2 (2): 79–85.

- Van Bel A.J.E., Ehlers K. (2004): Electrical signalling via plasmodesmata. In: Oparka K.J. (ed.): *Plasmodesmata*, pp. 263–278, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Waadt R., Krebs M., Kudla J., Schumacher K. (2017): Multiparameter imaging of calcium and abscisic acid and high-resolution quantitative calcium measurements using R-GECO1-mTurquoise in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 216: 303–320.
- Weisman H. (1971): Anesthesia for pediatric ophthalmology. *Annals of Ophthalmology* 3: 229–232.
- Wildon D.C., Thain J.F., Minchin P.E.H., Gubb I.R., Reilly A.J., Skipper Y.D., Doherty H.M., O'Donnell P.J., Bowles D.J. (1992): Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360: 62–65.
- Williams S.E., Pickard B.G. (1972): Receptor potentials and action potentials in *Drosera* tentacles. *Planta* 103: 193–221.
- Wudick M.M., Michard E., Oliveira Nunes C., Feijó J.A. (2018): Comparing plant and animal glutamate receptors: common traits but different fates? *Journal of Experimental Botany* 69: 4151–4163.
- Xiong T.C., Ronzier E., Sanchez F., Corratge-Faillie C., Mazars C., Thibaud J.B. (2014): Imaging long distance propagating calcium signals in intact plant leaves with the BRET-based GFP-aequorin reporter. *Frontiers in Plant Science* 5: 43.
- Yan X., Wang Z., Huang L., Wang C., Hou R., Xu Z., Qiao X. (2009): Research progress on electrical signals in higher plants. *Progress in Natural Science* 19: 531–541.
- Yokawa K., Kagenishi T., Pavlovič A., Gall S., Weiland M., Mancuso S., Baluška F. (2018): Anaesthetics stop diverse plant organ movements, affect endocytic vesicle recycling and ROS homeostasis, and block action potentials in Venus flytraps. *Annals of Botany* 122: 747–756.
- Yuan F., Yang H., Xue Y., Kong D., Ye R., Li C., Zhang J., Theprungsirikul L., Shrift T., Krichilsky B., Johnson D.M., Swift G.B., He Y., Siedow J.N., Pei Z.M. (2014): OSCA1 mediated osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature* 514: 367–371.
- Zelman A.K., Dawe A., Gehring C., Berkowitz G.A. (2012): Evolutionary and structural perspective of plant cyclic nucleotide-gated cation channels. *Frontiers in Plant Science* 3: 95.

- Zimmermann M.R., Maischak H., Mithöfer A., Boland W., Felle H.H. (2009): System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiology* 149 (3): 1593–1600.
- Zhang Y., Ye F., Zhang T., Lv S., Zhou L., Du D., Lin H., Guo F., Luo C., Zhu S. (2021): Structural basis of ketamine action on human NMDA receptors. *Nature* 596: 301–305.
- Žárský V. (2015): Signal transduction: GABA receptor found in plants. *Nature Plants* 1 (8): 1–2.

9 PŘÍLOHY

9.1 Seznam příloh

Příloha 1: Publikovaný článek Effect of the General Anaesthetic Ketamine on Electrical and Ca²⁺ Signal Propagation in *Arabidopsis thaliana*.

Příloha 1: Publikovaný článek Effect of the General Anaesthetic Ketamine on Electrical and Ca²⁺ Signal Propagation in *Arabidopsis thaliana*.



Article

Effect of the General Anaesthetic Ketamine on Electrical and Ca²⁺ Signal Propagation in *Arabidopsis thaliana*

Andrej Pavlovič * , Lucie Ševčíková, Martin Hřivňácký and Marek Rác

Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic; lucie.sevcikova01@upol.cz (L.Š.); martin.hrivnacky@upol.cz (M.H.); marek.rac@upol.cz (M.R.)

* Correspondence: andrej.pavlovic@upol.cz; Tel.: +420-585-634-831

Abstract: The systemic electrical signal propagation in plants (i.e., from leaf to leaf) is dependent on GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE proteins (GLRs). The GLR receptors are the homologous proteins to the animal ionotropic glutamate receptors (iGluRs) which are ligand-gated non-selective cation channels that mediate neurotransmission in the animal's nervous system. In this study, we investigated the effect of the general anaesthetic ketamine, a well-known non-competitive channel blocker of human iGluRs, on systemic electrical signal propagation in *Arabidopsis thaliana*. We monitored the electrical signal propagation, intracellular calcium level [Ca²⁺]_{cyt} and expression of jasmonate (JA)-responsive genes in response to heat wounding. Although ketamine affected the shape and the parameters of the electrical signals (amplitude and half-time, t_{1/2}) mainly in systemic leaves, it was not able to block a systemic response. Increased [Ca²⁺]_{cyt} and the expression of jasmonate-responsive genes were detected in local as well as in systemic leaves in response to heat wounding in ketamine-treated plants. This is in contrast with the effect of the volatile general anaesthetic diethyl ether which completely blocked the systemic response. This low potency of ketamine in plants is probably caused by the fact that the critical amino acid residues needed for ketamine binding in human iGluRs are not conserved in plants' GLRs.

Keywords: *Arabidopsis*; anaesthetic; calcium; diethyl ether; jasmonates; ketamine; systemic response



Citation: Pavlovič, A.; Ševčíková, L.; Hřivňácký, M.; Rác, M. Effect of the General Anaesthetic Ketamine on Electrical and Ca²⁺ Signal Propagation in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* **2024**, *13*, 894. <https://doi.org/10.3390/plants13060894>

Academic Editor: Zhenfei Guo

Received: 6 February 2024

Revised: 12 March 2024

Accepted: 15 March 2024

Published: 20 March 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Plants are sessile organisms constantly exposed to environmental perturbation. Mechanical injury or wounding is one of the severest environmental stresses to which plants are subjected in nature. Plants have evolved mechanisms to withstand such stress by activating a defence response mediated by the plant hormones, jasmonates [1,2]. The response is not limited to the organs that initially sense the stress but quickly spreads from damaged tissue to distal parts of the plant that have not yet directly experienced the stimuli during the process termed systemic response. The meaning of systemic signalling is to prepare a multicellular organism for an upcoming challenge that is initially sensed by a single organ or only a small group of cells. These signals include hormones, peptides, volatile compounds, reactive oxygen species (ROS), electrical and Ca²⁺ signals and they often co-propagate together [3–8]. Systemic electrical signals have attracted the attention of scientists since their initial discovery [9] and rapid progress has been made in understanding their molecular mechanisms during recent years [4,7].

It was quite a big surprise when glutamate receptor-like proteins (GLRs) were discovered in plants [10]. The GLRs are the homologous proteins to animal ionotropic glutamate receptors (iGluRs) which are ligand-gated non-selective cation channels that mediate neurotransmission in the animal nervous system. They share a similar architecture with the extracellular amino-terminal domain (ATD), a ligand-binding domain (LBD), three transmembrane helices (M1, M3, M4) plus a partial one (M2), and a cytoplasmic terminal domain

(CTD) [10–12]. The degree of identity between *Arabidopsis thaliana* GLRs and animal iGluRs within these domains is 63% to 16% and is similar to that between animal iGluR subtypes that have kainate/AMPA rather than NMDA as agonists, suggesting a divergence of the iGluRs/GLRs prior to their subtype differentiation [10]. Recent studies showed that GLRs play an indispensable role in systemic electrical and Ca^{2+} signal propagation in the plant *A. thaliana*. In particular, the double mutants *glr3.3* and *glr3.6* were not able to propagate electrical and Ca^{2+} signals from local damage to systemic leaves [4,7]. The GLR3.3 and GLR3.6 are expressed and localised in vascular tissue (sieve elements and xylem contact cells, respectively) supporting the role of vasculature in electrical signal propagation in plants [13]. In the glutamatergic synapse of the animal neuron, glutamate is released from the presynaptic neuron, binds to iGluRs on the postsynaptic neurons and activates them, allowing the passage of Na^+ and Ca^{2+} ions. A simple analogy exists in plants; wounding releases glutamate in the apoplast that binds and activates GLRs [7,14–19]. Then, the Ca^{2+} wave is likely driven by the bulk flow of a glutamate or glutamate is released in the systemic leaves by an unidentified mechanism [19,20]. This analogy is further supported by the fact that the exogenous application of glutamate, but not other amino acids, triggers systemic cytosolic calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) increase [7,15]. However, the crystal structure of the ligand-binding domain (LBD) of AtGLR3.3 reveals the accommodation of a wider range of amino acids [14].

Recently, we showed that the volatile general anaesthetic (GVA) diethyl ether completely inhibited electrical and Ca^{2+} signal propagation from damaged to neighbouring systemic leaves in response to heat wounding in *A. thaliana*. The same inhibition was also found in response to exogenous glutamate application, indicating that GLR channels are among the possible targets of diethyl ether anaesthesia. As a consequence, the anaesthetised plant was not able to activate defence response mediated by jasmonates in systemic leaves [21]. The inhibitory effect of the GVA diethyl ether on electrical (action potentials), Ca^{2+} signal propagation, and downstream responses was also documented in the carnivorous plant, Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). This plant captures insects using modified leaves in the traps. Sensitive trichomes (trigger hairs) on the upper trap epidermis function as mechanosensors and when the trigger hairs are stimulated by touch, an action potential (AP) is generated which propagates across the trap lobes. Two touches and the generation of two APs are necessary for rapid trap closure. However, under diethyl ether anaesthesia, the propagation of APs across the lobes is completely blocked [22,23]. Using the transgenic *D. muscipula* expressing calcium sensor GCaMP6f, it was documented that the calcium signal was generated in the trigger hair but could not propagate to the trap lobe under anaesthesia [24]. This resembles the effect of GVA on mammalian neurons, i.e., complete inhibition of AP propagation [25]. Thus, plants under anaesthesia are not able to sense and/or react to certain external stimuli.

Despite the fact that GVAs are used on a daily basis in thousands of hospitals, scientists and the doctors who administer these compounds still lack a molecular understanding of their action. It is still not entirely clear if lipophilic GVAs work nonspecifically by dissolving in the lipid bi-layer (lipid theory of general anaesthesia, [26–28]), indirectly affecting ion-channel activity, and/or by binding to the non-specific hydrophobic cavities of many proteins (protein theory of anaesthesia; [29–32]). On the other hand, the molecular targets of many local and intravenous general anaesthetics are more specific and well-known including GABA, NMDA, sodium and two-pore potassium channels [33]. The intravenous general anaesthetic ketamine is a highly lipophilic compound that easily crosses the membranes and results in the rapid onset of anaesthesia. It is well-known as a non-competitive channel blocker of animal glutamate-gated calcium-permeable NMDA receptors [34]. Due to the sequence homology, the identical structural and functional domains with plant GLRs [10,12], and the indispensability of GLRs in systemic response [4,7], we decided to investigate the effect of ketamine on electrical and Ca^{2+} signal propagation in *A. thaliana* in response to heat wounding. Our study showed that ketamine, in contrast to GVA, was

not able to block electrical and Ca²⁺ signal propagation and only slightly modified the characteristics of electrical signals.

2. Results

2.1. Anaesthetic Ketamine Modified Electrical Signals Mainly in Systemic Leaves

We used surface potential measurements for the detection of electrical signals in *A. thaliana*. One electrode was attached on a local leaf and the second one on an adjacent systemic leaf. Heat wounding was applied to the local leaf through a central vein using hot tweezers and the response was recorded. Heat wounding in the local leaf induced the hyperpolarisation of the membrane potential (a negative voltage shift recorded extracellularly, representing intracellular depolarisation), representing slow wave potential (SWP). Within several seconds after heat wounding, the electrical signal was transmitted to the systemic leaves. Before transient hyperpolarisation (representing intracellular depolarisation), some systemic leaves induced transient depolarisation (representing intracellular hyperpolarisation) of the membrane potential. The variations in electrical signal shape and intensity are shown in Figure 1A. After ketamine application, heat wounding induced a similar electrical signal in the local leaf with the same amplitude, but with slightly reduced half-time ($t_{1/2}$). The systemic leaves received the electrical signals within a few tens of seconds with significantly reduced amplitude and $t_{1/2}$ (Figure 1B). Sometimes, the hyperpolarisation (intracellular depolarisation) was absent and only the transient depolarisation (representing intracellular hyperpolarisation) was recorded.

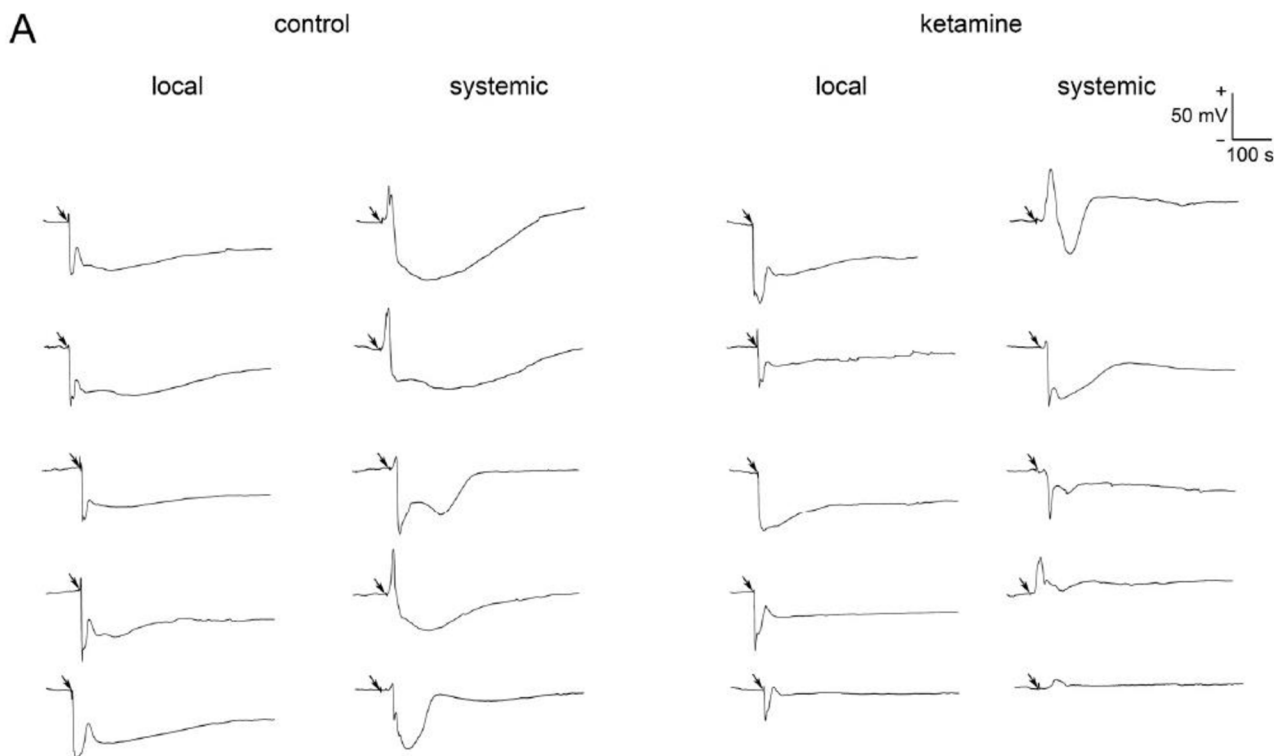


Figure 1. Cont.

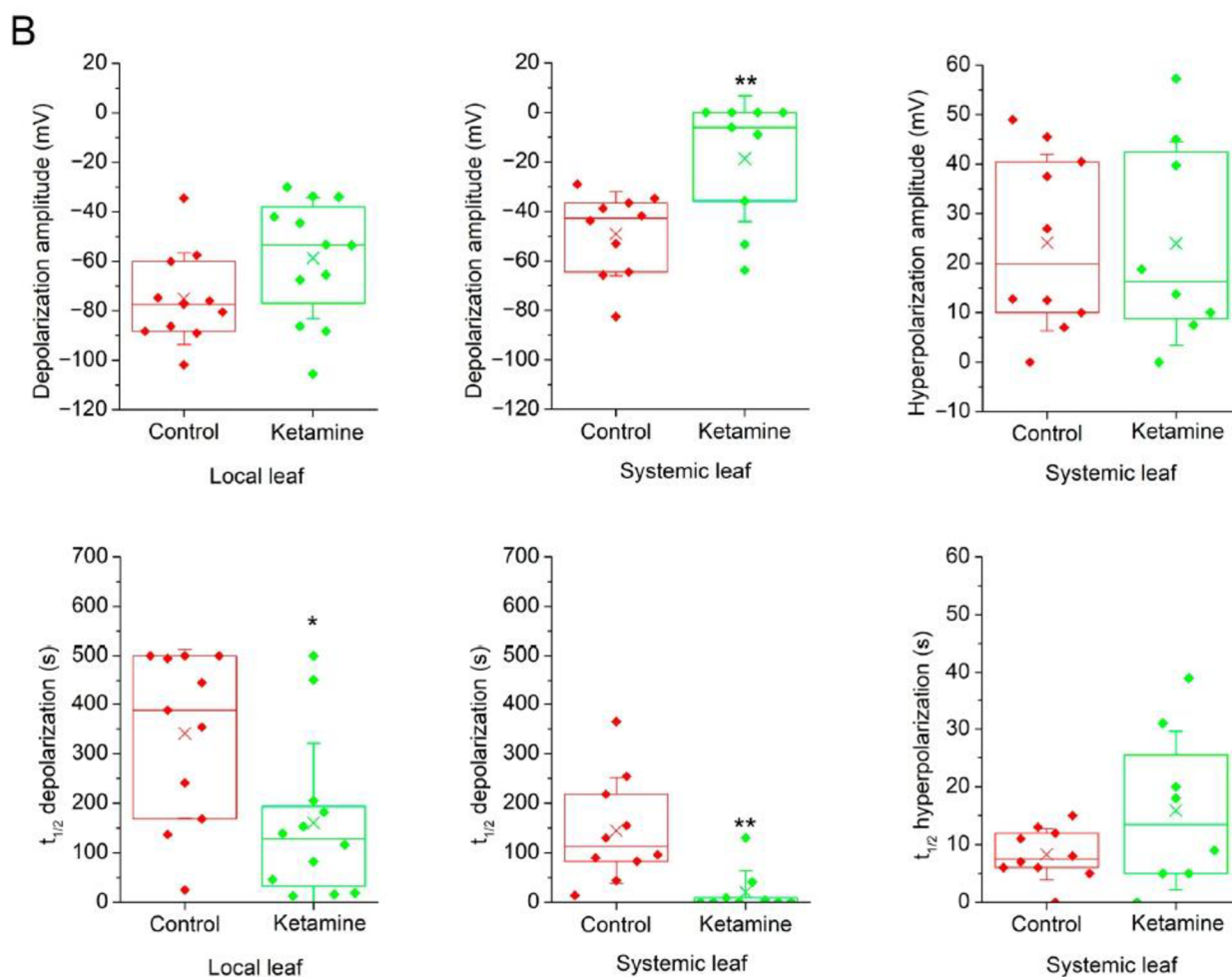


Figure 1. Surface potentials generated in local and systemic leaves after heat wounding in control and ketamine-treated *Arabidopsis thaliana* plants. (A) Example of electrical signals recorded. Time when the local leaf was heat wounded is depicted by arrows. (B) Amplitude and half-width duration of surface potentials in response to heat wounding in control and ketamine-treated plants in local and systemic leaves of *Arabidopsis thaliana*. Boxplots represent the 25th percentile, median, 75th percentile of the data points (diamonds). The crosses represent means, whiskers ± 1 S.D., $n = 8$ –12. The asterisks indicate significant differences at $p < 0.01$ (**) and $p < 0.05$ (*), Welch's-test. The terminology used (depolarisation/hyperpolarisation) is from intracellular point of view.

2.2. Anaesthetic Ketamine Did Not Block Ca^{2+} Wave Propagation

Because electrical and Ca^{2+} signals are tightly coupled, we further monitored $[Ca^{2+}]_{cyt}$. For this type of experiment, we used transgenic *A. thaliana* plants expressing apoaequorin from jellyfish *Aequorea victoria*. Heat wounding clearly induced a Ca^{2+} wave in the control as well as in the ketamine-treated plants (Figure 2A–C, Supplementary Materials, Videos S1 and S2). The number of systemic leaves which received electrical signals from the local wounded leaf was not significantly different between both groups of plants (Figure 3A). The maximum $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal intensity was comparable in local leaves but almost significantly diminished ($p = 0.06$) in the systemic leaves of ketamine-treated plants relative to the control plants (Figure 3B). But the intensity of the signal drop (20%) is comparable to the intensity of the signal drop after discharge in ketamine-treated plants (22%, Figure 3C), indicating that the Ca^{2+} wave is not significantly affected in the local or in the systemic leaves and ketamine slightly inhibited the aequorin system.

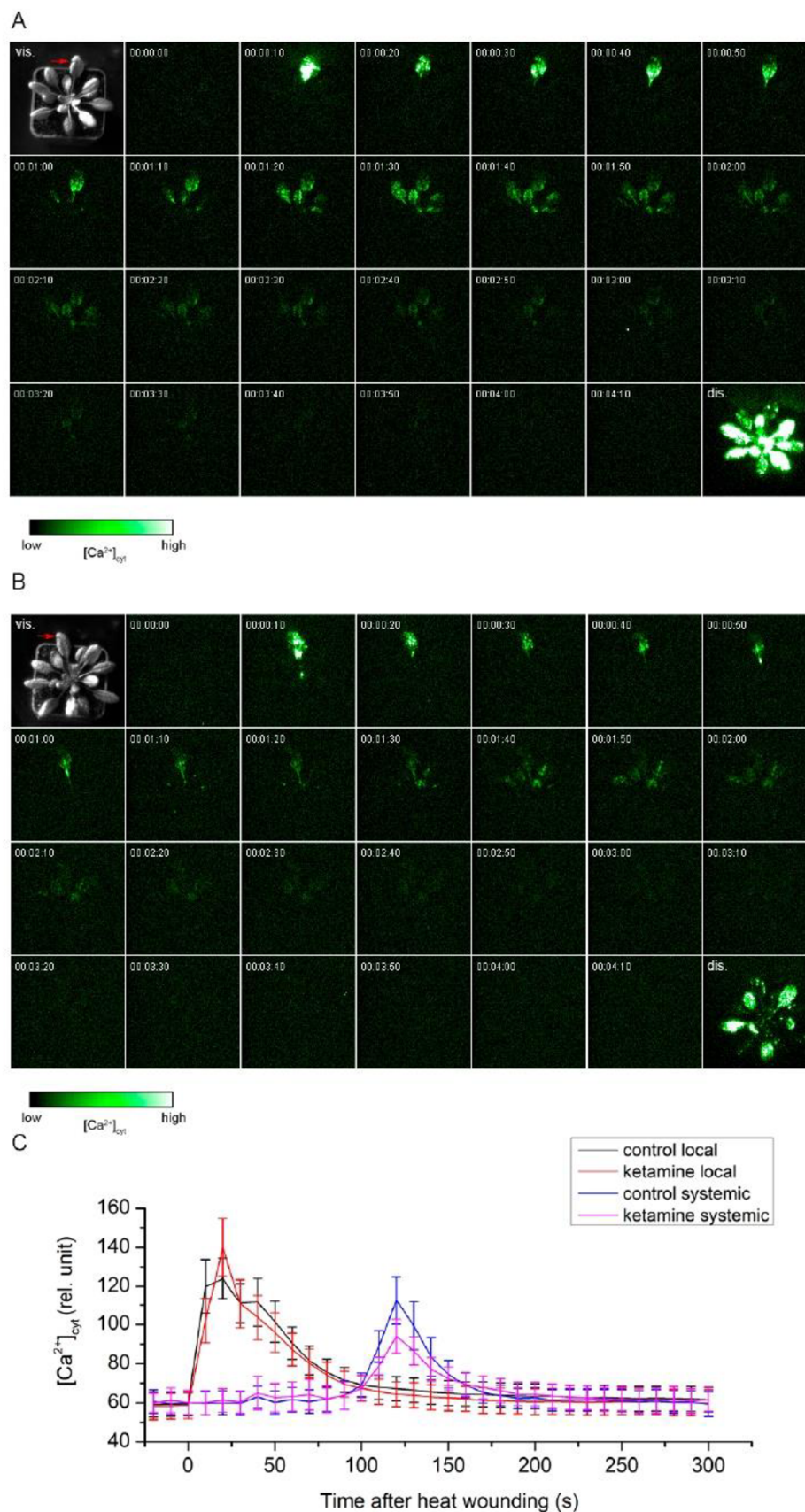


Figure 2. Local and systemic $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing apoaequorin in response to heat wounding. (A) Control plants, (B) Ketamine-treated plants. First image in the sequence is the photograph of rosette in visible light (vis.) and the site of heat wounding across a midrib

of local leaf is marked with a red arrow. Time course (00:00:00–00:04:10, h:min:s) of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ accumulation in response to heat wounding in local and distal leaves. Heat wounding was performed in the range of 0–10 s on local leaf (frame exposure time is 10 s). Cumulative image of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -dependent photon counts after discharge of the whole rosette (dis., frame exposure time is 1 min). Representative images from 7 to 9 independent measurements where systemic response was detected. Movies are available as Supplementary Materials, Videos S1 and S2. (C) Average luminescence signal intensity in local and systemic leaves (the plants where the systemic response was not detected were not involved in averaging), means \pm S.E., $n = 7$ –9. Significant differences at the same time points between control and ketamine-treated plants were not found (Welch's t -test).

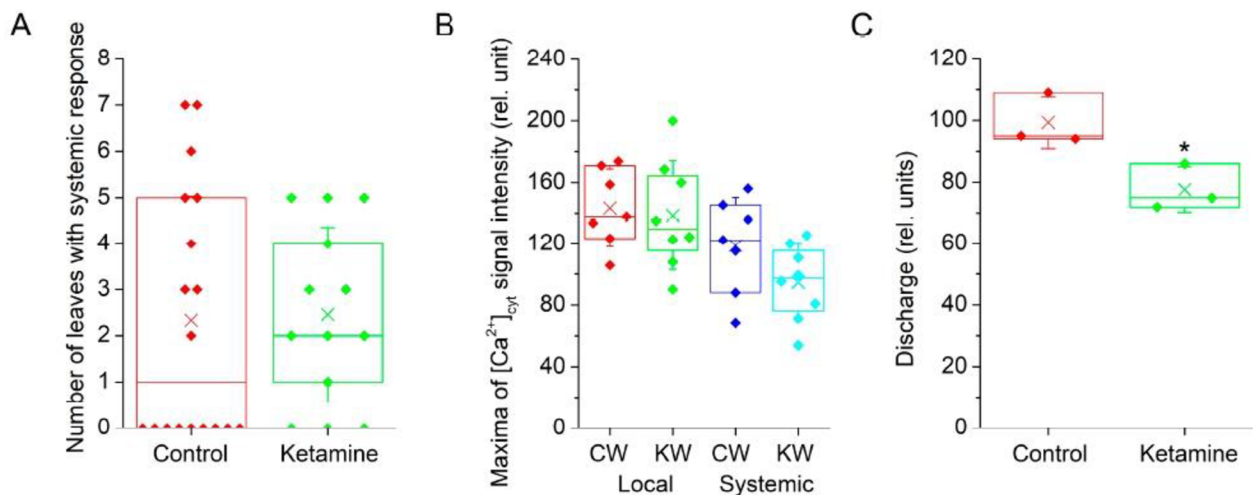


Figure 3. Quantification of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal in transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing apoaequorin. (A) Number of leaves with systemic response. Although local response was detected every time, the systemic response was not (in this case, number of systemic leaves is equal to 0), $n = 13$ –18. (B) Maximum luminescence signal intensity in local and systemic leaves (the plants where the systemic response was not detected were not involved in averaging), means \pm S.E., $n = 7$ –8. (C) Intensity of discharge with 1 M $CaCl_2$ in 10% ethanol, $n = 3$. Boxplots represent the 25th percentile, median, 75th percentile of the data points (diamonds). The crosses represent means, whiskers \pm 1 S.D. C—control plants, K—ketamine-treated plants, W—heat-wounded plants. Significant differences between control and ketamine-treated plants were evaluated by Welch's t -test at $p < 0.05$ (*).

2.3. Ketamine Did Not Block Expression of Jasmonate Responsive Genes

Further, we monitored the expression of marker genes involved in JA biosynthesis (*ALLENE OXIDE SYNTHASE*, *AOS*; *OPDA REDUCTASE 3*, *OPR3*) and JA signalling (*JASMONATE-ZIM DOMAIN 8* and *10*, *JAZ8*, *JAZ10*) in local and systemic leaves 1 h after heat wounding. Surprisingly, the application of ketamine in non-wounded plants induced the expression of all tested JA-responsive genes in comparison to control water sprayed plants (Figure 4A). As expected, wounding also increased the expression of all JA-responsive genes overall with much higher magnitude than in response to ketamine application. Ketamine-treated wounded plants exhibited comparable expression to control wounded plants indicating that ketamine had no significant effect on local and systemic JA-responsive gene expression (Figure 4B). However, on the 15th day after ketamine application, the plants exhibited stunted growth and delayed development in comparison to control plants (Figure S1). The stunted growth and dwarf phenotype was documented in the *glr3.4* mutant plant of rice [35].

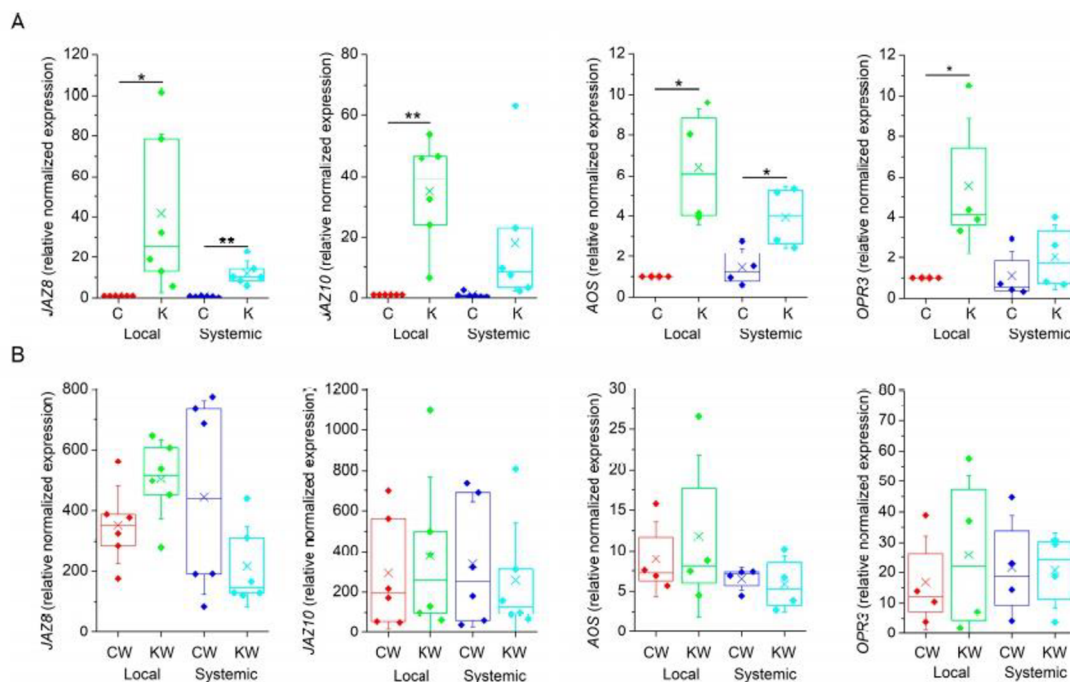


Figure 4. Expression of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **(A)** Gene expression in local and systemic leaves in response to ketamine application. **(B)** Gene expression in response to heat wounding. Expression data are normalised to UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME (*UBC21*) $n = 4-6$. Boxplots represent the 25th percentile, median, 75th percentile of the data points (diamonds). The crosses represent means, whiskers ± 1 S.D. C—control plants, K—ketamine-treated plants, W—heat-wounded plants. Significant differences between control and ketamine-treated plants were evaluated by Welch’s-test at $p < 0.01$ (**) and $p < 0.05$ (*).

3. Discussion

Here, we investigated the effect of the anaesthetic ketamine on electrical signal propagation in experimental model plant *A. thaliana*. These experiments were motivated by our previous research, where we found that the GVA diethyl ether completely blocked electrical and Ca^{2+} signal propagation from local to systemic leaves, induced by heat wounding or glutamate in *A. thaliana*. In response to attenuated electrical signalling, systemic leaves were not able to activate the expression of JA-responsive genes [21]. Based on these experiments, and similar experiments on Venus flytrap (*D. muscipula*) [24], the GLRs were suspected to be among the targets of diethyl ether-induced inhibition of electrical signal propagation in plants. Despite the attenuation of the Ca^{2+} wave by the GVA diethyl ether [21], the application of diethyl ether itself may induce increased cytoplasmic Ca^{2+} concentration with different spatio-temporal pattern. This affected the expression of thousands of genes indicating that the GVA diethyl ether significantly modified the calcium signature [36]. The specific molecular target of diethyl ether is not known and this anaesthetic is considered promiscuous in anaesthetic binding and may bind non-specifically to the hydrophobic pocket of many proteins [29,37] or affect channel function through its solubility in the lipid bilayer [28]. This is evidenced by its inhibition of firefly luciferase or aequorin [21,29]. In contrast, the intravenous general anaesthetic ketamine is a well-known antagonist of NMDA receptors, which are homologous to plant GLRs. However, in this case, ketamine was not able to abolish electrical and Ca^{2+} wave propagation from damaged to systemic leaves but only slightly modified their characteristics (reduced amplitude and duration, Figure 1). This modification was not sufficient to block the systemic response and systemic leaves activated the expression of JA-responsive genes (Figure 4B). Recently, it was documented that the duration of depolarisation determined the strength of jasmonate response [38]. However, in our case, the jasmonate response was not reduced and may be

compensated by its activation by the ketamine itself (Figure 4A). During our experimental investigation, the cryo-electron microscope structures of human NMDA receptors in complex with ketamine were resolved. Ketamine binds in TMD in the central vestibule between the channel gate and selectivity filter. Two amino acids Leu642 on GluN2A and Asn616 on GluN1 were identified as key residues that form hydrophobic and hydrogen-bound interactions with ketamine [34]. By comparing the amino acid sequence with plant GLR3.3 and GLR3.6, it was revealed that in the position of Asn616 there is a gap and Leu642 is replaced by Asp (Figure S2). Mutated GluN2A when the Leu was substituted with Asp displayed a 226-fold reduced potency of inhibition by ketamine (IC_{50} 1.33 vs. 354.2 μ M, [33]). This may indicate that if ketamine binds to the plant GLRs, it has probably reduced potency in comparison to animal neurons. On the other hand, in contrast to GVAs, ketamine is often not able to block the generation of APs in different types of animal neurons completely but only modify their characteristics (amplitude, duration, frequency, etc., [39–41]). All these facts may explain the weak effect of ketamine on the inhibition of electrical and Ca^{2+} signal propagation in *A. thaliana* in contrast to diethyl ether, despite the high 18 mM concentration applied. The application of a higher concentration (1%, 36 mM) exhibited leaf damage on the plants. In addition to its action on NMDA receptors, alternative targets for ketamine probably also exist and must be considered [42,43]. With its lipophilic characteristic, it may affect nonspecifically many cellular processes, like the lipophilic GVA diethyl ether [36]. Evidence of this comes from its inhibition of luminescence (Figure 3C) and the activation of JA response (Figure 4A).

Ketamine was also not effective in the inhibition of trap closure in the Venus flytrap (*D. muscipula*) [44]. We also tried to apply ketamine through the cut petiole or trap lobe, and the amplitude of AP was also not affected by 0.5% ketamine in Venus flytrap (unpublished results). In contrast, the GVA diethyl ether was able to completely abolish AP generation in the trap lobe in response to touch or wounding [22–24,45]. Recent studies suggested that electrical and Ca^{2+} signal propagation from the sensory cells in the sensitive trichome to the trap lobe in the Venus flytrap is probably also mediated by GLR3.6 channels and glutamate [24,46], and the electrical signal propagation from the trigger hairs to the trap lobe is analogous to the systemic signalling in the leaves of *A. thaliana* plants. The same mechanism for electrical and Ca^{2+} signal propagation may explain the similar effect of different types of anaesthetics (complete inhibition by the GVA diethyl ether, and no blockage by ketamine) on these two very different plants. The inhibition of electrical and Ca^{2+} signalling by the GVA diethyl ether in these plants may explain the blocked expression of JA-responsive genes [21,23], what was not the case in this study with ketamine. Surprisingly, ketamine, in contrast to diethyl ether, itself slightly induced the expression of JA-responsive genes (Figure 4A).

Another type of anaesthetic with a well-known molecular target is lidocaine. The mechanism of action of lidocaine as a local anaesthetic is through a blockade of voltage-gated sodium channels (VGSCs) leading to a reversible block of action potential propagation [47]. Despite the fact that plants do not have voltage-gated Na^{+} channels [48], the seismonastic plant (*Mimosa pudica*) is sensitive to the local anaesthetic lidocaine applied through the roots. Leaves of *M. pudica* fold in response to touch and other stimuli; however, this response is lost under lidocaine anaesthesia [22,49]. However, it is still not clear if lidocaine inhibited AP propagation or only the leaf-folding response, because measurement of electrical signals has not been performed. In addition to electrical signals, recent success in the transformation of *M. pudica* plants with the calcium reporter system GCaMP6f could be very helpful in this investigation [50]. Surprisingly, the Venus flytrap is not sensitive to lidocaine treatment [44]. These studies indicate that even anaesthetics with well-known defined targets probably have an off-target effect. In the case of lidocaine, such targets involve potassium and calcium channels and even NMDA receptors but usually in above clinically relevant plasma concentrations [47]. At high concentrations with their lipophilic character, they may also interact with plasma membranes (lipid theory of general anaesthesia, [26–28]).

The effect of GVA and local anaesthetics on plants is not only confined to the attenuation of electrical and Ca^{2+} signal propagation. They inhibit germination, chlorophyll biosynthesis, circumnutation movement of climbing plants, affect ROS homeostasis and vesicle trafficking [22]. Recently, we have shown that the GVA diethyl ether inhibited de-etiolation and the response to light stimulus in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. Seedlings exposed to the GVA diethyl ether had significantly decreased chlorophyll concentration and a hampered light signalling cascade, as they were not able to activate the expression of many nuclear-encoded light-responsive genes [51]. Interestingly, the application of an antagonist of animal kainate/AMPA iGluRs 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) also impaired the light-signal transduction and phenocopy in *Arabidopsis* long-hypocotyl (*hy*) mutants [10]. From this point of view, it would be interesting to investigate the effect of ketamine on light-induced signalling pathways.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material and Experimental Setup

Six-week-old *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Columbia-0 wild-type and transgenic *A. thaliana* (L.) Heynh. Columbia-0, expressing the apoequorin gene from jellyfish *Aequorea victoria* under control of the CaMV 35S promoter, were grown on a soil substrate (Potgrond H; Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Germany) in a growth chamber (AR75L; Percival Scientific; Perry, IA, USA) set to an 8 h: 16 h photoperiod at $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, 21 °C:21 °C, day/night, and 60% relative air humidity in plastic pots. Three hours before analysis, the entire plant rosettes were sprayed with 0.5% (18 mM) ketamine (racemic mixture, Lipomed AG, Arleshem, Switzerland, Catalog No. C2944, KET-663-HC) in 0.01% Tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, Catalog No. 93773). Control plants were sprayed with distilled water with 0.01% Tween 20.

4.2. Extracellular Measurements of Electrical Signals

Surface potential was measured using a non-invasive non-polarizable Ag–AgCl electrodes (Scanlab systems, Prague, Czech Republic) and moistened with a drop of conductive EV gel (Hellada, Prague, Czech Republic) commonly used in electrocardiography inside a Faraday cage under standard laboratory conditions [52]. Measuring electrodes were placed at the base of the leaf blade in local and adjacent systemic leaves. The reference electrode was immersed into a basin with water, which was placed below the pot containing the measured plant. The apical part of the local leaf was wounded with hot tweezers and surface potentials were measured. The electrodes were connected to an amplifier (gain: 1–1000, noise: 2–3 mV, bandwidth (–3 dB): 10^5 Hz, response time: 10 μs , input impedance: $10^{12} \Omega$) and the data were collected every 30 ms. For experimental setup and calculation of depolarisation and hyperpolarisation amplitude and half-time ($t_{1/2}$), see our previous publication Jakšová et al. [21].

4.3. Aequorin Luminescence Imaging

Transgenic *A. thaliana* (L.) Heynh. Col-0 wild-type expressing the apoequorin gene under control of the CaMV 35S promoter, was used for monitoring cytosolic free calcium $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ [53]. Aequorin was reconstituted by spraying plants with 10 μM coelenterazine (Invitrogen, Eugene, OR, USA, Catalog No. C2944) in 0.01% Tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, Catalog No. 93773) and subsequent incubation overnight in the dark. Aequorin luminescence imaging was performed using a highly sensitive CCD camera VersArray 1300B (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA). To reduce the dark current, CCD camera was cooled down to -100 °C using a liquid-nitrogen cooling system. The CCD camera was equipped with a 50 mm focal distance lens with an f-number of 1.2 (Nikon, Tokyo, Japan) to enhance the light collecting efficiency. Spectral sensitivity of CCD camera was within the range of $\lambda = 200$ – 1000 nm with almost 90% quantum efficiency in the visible range of the spectrum. The spectral sensitivity was limited to $\lambda = 350$ – 1000 nm by the lenses. CCD camera parameters were as follows: scan rate, 100 kHz; gain, 2. Photons

were captured in photon-counting mode with a 10 s acquisition time. Signal acquisition and processing were performed with WinView (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA) and ImageJ 1.49 (NIH, Bethesda, MD, USA), respectively. After each treatment, the remaining aequorin was discharged by spraying the rosette with discharge solution (1 M CaCl₂ in 10% ethanol) while imaging aequorin luminescence with 1 min acquisition time. The CCD camera was situated in the experimental dark room (3 × 1.5 × 2.5 m) painted in black. The door in the experimental dark room was protected completely with a black curtain to restrict any external light. All experiments were repeated several times to ensure reproducibility.

4.4. qPCR

Control and ketamine-treated non-wounded plants, as well as heat-wounded plants were used in the experiment. Local and adjacent systemic leaves were harvested 1 h after heat wounding simultaneously with leaves from control and ketamine-treated non-wounded plants, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C before gene expression analyses. This time point was chosen based on our previous analyses [21]. RNA was extracted using Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA, Catalog No. STRN50) and DNase I treated and purified by RNA Clean & Concentrator Kit (Zymoresearch, Irvine, CA, USA, Catalog No. R1013) according to manufacturer's instructions. The concentration and sample purity were measured by NanoReady (LifeReal, Hangzhou, China). The synthesis of first strand of cDNA was performed by iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO–RAD, Hercules, CA, USA, Catalog No. 1708890) using manufacturer's protocol. cDNA samples were 10-times diluted prior to qPCR run. For real-time PCR, specific gene sequences were amplified by Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Haltman, MA, USA, Catalog No. K0221). Primers for amplification of housekeeping gene sequence (*UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME—UBC21*) and sequence for gene of interest (*JASMONATE-ZIM DOMAIN 8, JAZ8; JASMONATE-ZIM DOMAIN 10, JAZ10; OPDA REDUCTASE 3, OPR3; ALLENE OXIDE SYNTHASE, AOS*) were used according to [4,54] (Table S1). Real-time PCR reactions were performed in 96-well plates in triplicate on a QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Haltman, MA, USA) device and the relative changes in gene expression were estimated according to Pfaffl [55]. Melt curve analysis of qPCR products was included at the end of each qPCR run to verify product specificity. All samples for PCR experiments were analysed in four to six biological and three technical replicates.

4.5. Statistical Analysis

All data are from biological replicates. Data are shown as means ± S.D. or box plots. Before statistical analyses, the data were tested for homogeneity of variance (Brown–Forsythe test). If the homogeneity was fulfilled, Student's *t*-test was used (Origin 8.5.1, Northampton, MA, USA). If homogeneity was not present, Welch's test was used (Microsoft Excel 2016).

5. Conclusions

This study showed that the general anaesthetic ketamine did not inhibit the systemic response in *A. thaliana* in comparison to the effect of the GVA diethyl ether [21]. Diethyl ether is promiscuous in anaesthetic binding and may affect membrane fluidity, different proteins, cytoskeleton, etc., [37]. On the other hand, ketamine, considered as an anaesthetic with a well-known binding site for NMDA receptors, is probably not able to sufficiently inhibit the plant's GLR due to the absence of the conserved amino acid residues necessary for ketamine binding. From our study, it is not clear if the modification of electrical signals and stunted growth in response to ketamine application is specific to GLR action or some pleiotropic effect caused by its lipophilic characteristic. Indeed, alternative targets probably exist and must be considered besides its action on NMDA receptors [43]. Therefore, we must be very careful in interpreting GLR function based on comparison with its animal

counterparts, as has been suggested by Wudick et al. [12]. The use of well-known agonists and antagonists of animal iGluR [10] must be performed with caution in plant models.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants13060894/s1>, Figure S1: The plants of *Arabidopsis thaliana* 24 h (A) and 15 days (B) after experiments with ketamine application; Figure S2: Amino acid alignment of human glutamate receptor NMDA 2A isoform 1 (NP_000824.1) and *Arabidopsis thaliana* GLR3.3 (NP_001322169.1) and GLR 3.6 (NP_001326369.1); Table S1: Primers sequences used in qPCR; Video S1: The $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing apoaequorin in response to heat wounding in control plants; Video S2: The $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing apoaequorin in response to heat wounding in ketamine-treated plants.

Author Contributions: Conceptualisation, A.P.; methodology, A.P. and M.R.; software, A.P. and M.R.; validation, A.P., L.Š., M.H. and M.R.; formal analysis, A.P., L.Š., M.H. and M.R.; investigation, A.P., L.Š., M.H. and M.R.; resources, A.P.; data curation, A.P.; writing—original draft preparation, A.P.; writing—review and editing, A.P.; visualisation, A.P.; supervision, A.P.; project administration, A.P.; funding acquisition, A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Grant Agency of the Czech Republic (GAČR), grant number 21-03593S.

Data Availability Statement: Upon request, the data will be provided by the corresponding author.

Acknowledgments: We thank Axel Mithöfer (Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena, Germany) for providing transgenic *A. thaliana* plants expressing APOAEQUORIN.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Koo, A.J.K.; Howe, G.A. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1571–1580. [CrossRef]
- Wasternack, C.; Hause, B. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* **2013**, *111*, 1021–1058. [CrossRef] [PubMed]
- Schilmüller, A.L.; Howe, G.A. Systemic signaling in the wound response. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005**, *8*, 369–377. [CrossRef] [PubMed]
- Mousavi, S.A.R.; Chauvin, A.; Pascaud, F.; Kellenberger, S.; Farmer, E.E. GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **2013**, *500*, 422–426. [CrossRef]
- Gilroy, S.; Suzuki, N.; Miller, G.; Choi, W.-G.; Toyota, M.; Devireddy, A.R.; Mittler, R. A tidal wave of signals: Calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends Plant Sci.* **2014**, *19*, 623–630. [CrossRef] [PubMed]
- Gilroy, S.; Bialasek, M.; Suzuki, N.; Górecka, M.; Devireddy, A.R.; Karpinski, S.; Mittler, R. ROS, calcium, and electric signals: Key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiol.* **2016**, *171*, 1606–1615. [CrossRef] [PubMed]
- Toyota, M.; Spencer, D.; Sawai-Toyota, S.; Jiaqi, W.; Zhang, T. Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* **2018**, *361*, 1112–1115. [CrossRef]
- Suda, H.; Toyota, M. Integration of long-range signals in plants: A model for wound-induced Ca^{2+} , electrical, ROS, and glutamate waves. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2022**, *69*, 102270. [CrossRef]
- Wildon, D.C.; Thain, J.F.; Minchin, P.E.H.; Gubb, I.R.; Reilly, A.J.; Skipper, Y.D.; Doherty, H.M.; O'Donnell, P.J.; Bowles, D.J. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* **1992**, *360*, 62–65. [CrossRef]
- Lam, H.M.; Chiu, J.; Hsieh, M.H.; Meisel, L.; Oliveira, I.C.; Shin, M.; Coruzzi, G. Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* **1998**, *396*, 125–126. [CrossRef]
- Price, M.B.; Jelesko, J.; Okumoto, S. Glutamate receptor homologs in plants: Functions and evolutionary origins. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 235. [CrossRef] [PubMed]
- Wudick, M.M.; Michard, E.; Nunes, C.O.; Feijó, J.A. Comparing plant and animal glutamate receptors: Common traits but different fates? *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 4151–4163. [CrossRef] [PubMed]
- Nguyen, C.T.; Kurenda, A.; Stolz, S.; Chételat, A.; Farmer, E.E. Identification of cell populations necessary for leaf-to leaf electrical signaling in a wounded plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 10178–10183. [CrossRef] [PubMed]
- Alfieri, A.; Doccula, F.G.; Pederzoli, R.; Grenzi, M.; Bonza, M.C.; Luoni, L.; Candeo, A.; Armada, N.R.; Barbiroli, A.; Valentini, G.; et al. The structural bases for agonist diversity in an *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor-like channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 752–760. [CrossRef] [PubMed]
- Shao, Q.; Gao, Q.; Lhamo, D.; Zhang, H.; Luan, S. Two glutamate- and pH-regulated Ca^{2+} channels are required for systemic wound signaling in *Arabidopsis*. *Sci. Signal.* **2020**, *13*, eaba1453. [CrossRef] [PubMed]
- Grenzi, M.; Bonza, M.C.; Alfieri, A.; Costa, A. Structural insights into long-distance signal transduction pathways mediated by plant glutamate receptor-like channels. *New Phytol.* **2021**, *229*, 1261–1267. [CrossRef] [PubMed]

17. Grenzi, M.; Bonza, M.C.; Costa, A. Signaling by plant glutamate receptor-like channels: What else! *Curr. Opin. Plant Biol.* **2022**, *68*, 102253. [[CrossRef](#)]
18. Moe-Lange, J.; Gappel, N.M.; Machado, M.; Wudick, M.M.; Sies, C.S.; Schott-Verdugo, S.N.; Bonus, M.; Mishra, S.; Hartwig, T.; Bezruczyk, M.; et al. Interdependence of a mechanosensitive anion channel and glutamate receptors in distal wound signaling. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabg4298. [[CrossRef](#)]
19. Bellandi, A.; Papp, D.; Breakspear, A.; Joyce, J.; Johnston, M.G.; de Keijzer, J.; Raven, E.C.; Ohtsu, M.; Vincent, T.R.; Miller, A.J.; et al. Diffusion and bulk flow of amino acids mediate calcium waves in plants. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabo6693. [[CrossRef](#)]
20. Grenzi, M.; Buratti, S.; Parmagnani, A.S.; Aziz, I.A.; Bernacka-Wojcik, I.; Resentini, F.; Šimura, J.; Doccula, F.G.; Alfieri, A.; Luoni, L.; et al. Long-distance turgor pressure changes induce local activation of plant glutamate receptor-like channels. *Curr. Biol.* **2023**, *33*, 1019–1035. [[CrossRef](#)]
21. Jakšová, J.; Rác, M.; Bokor, B.; Petřík, I.; Novák, O.; Reichelt, M.; Mithöfer, A.; Pavlovič, A. Anaesthetic diethyl ether impairs long-distance electrical and jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* **2021**, *169*, 311–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yokawa, K.; Kagenishi, T.; Pavlovič, A.; Gall, S.; Weiland, M.; Mancuso, S.; Baluška, F. Anaesthetics stop diverse plant organ movements, affect endocytic vesicle recycling and ROS homeostasis, and block action potentials in Venus flytraps. *Ann. Bot.* **2018**, *122*, 747–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pavlovič, A.; Libiaková, M.; Bokor, B.; Jakšová, J.; Petřík, I.; Novák, O.; Baluška, F. Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Ann. Bot.* **2020**, *125*, 173–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Scherzer, S.; Huang, S.; Iosip, A.; Kreuzer, I.; Yokawa, K.; Al-Rasheid, K.A.S.; Heckmann, M.; Hedrich, R. Ether anesthetics prevents touch-induced trigger hair calcium-electrical signals excite the Venus flytrap. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 2851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. MacIver, B.M.; Tanelian, D.L. Volatile anesthetics excite mammalian nociceptor afferents recorded in vitro. *Anesthesiology* **1990**, *72*, 1022–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Meyer, H. Zur theorie der Alkoholnarkose. *Arch. Exp. Pathol. Phar.* **1899**, *42*, 109–118. [[CrossRef](#)]
27. Overton, C.E. *Studien über die Narkose Zugleich ein Beitrag zur Allgemeinen Pharmakologie*; Fischer Verlag: Berlin, Germany, 1901.
28. Pavel, M.A.; Petersen, N.; Wang, H.; Lerner, R.A.; Hansen, S.B. Studies on the mechanism of general anesthesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 13757–13766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Franks, N.P.; Lieb, W.R. Do general anesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* **1984**, *310*, 599–601. [[CrossRef](#)]
30. Franks, N.P. Molecular targets underlying general anesthesia. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, S72–S81. [[CrossRef](#)]
31. Crowder, C.M. Does natural selection explain the universal response of metazoans to volatile anesthetics? *Anesth. Analg.* **2008**, *107*, 862–863. [[CrossRef](#)]
32. Eckenhoff, R.G. Why can all of biology be anesthetized? *Anesth. Analg.* **2008**, *107*, 859–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Franks, N.P. General anaesthesia: From molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, *9*, 370–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhang, Y.; Ye, F.; Zhang, T.; Lv, S.; Zhou, L.; Du, D.; Lin, H.; Guo, F.; Luo, C.; Zhu, S. Structural basis of ketamine action on human NMDA receptors. *Nature* **2021**, *596*, 301–305. [[CrossRef](#)]
35. Yu, B.; Wu, Q.; Li, X.; Zeng, R.; Min, Q.; Huang, J. GLUTAMATE RECEPTOR-like gene OsGLR3.4 is required for plant growth and systemic wound signaling in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.* **2022**, *233*, 1238–1256. [[CrossRef](#)]
36. Pavlovič, A.; Jakšová, J.; Kučerová, Z.; Špundová, M.; Rác, M.; Roudnický, P.; Mithöfer, A. Diethyl ether anesthesia induces transient cytosolic $[Ca^{2+}]$ increase, heat shock proteins, and heat stress tolerance of photosystem II in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 995001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kelz, M.B.; Mashour, G.A. The biology of general anesthesia from paramecium to primate. *Curr. Biol.* **2019**, *29*, R1199–R1210. [[CrossRef](#)]
38. Kumari, A.; Chételat, A.; Nguyen, C.T.; Farmer, E.E. *Arabidopsis* H⁺-ATPase AHA1 controls slow wave potential duration and wound-response jasmonate pathway activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 20226–20231. [[CrossRef](#)]
39. Marwaha, J. Some mechanisms underlying actions of ketamine on electromechanical coupling in skeletal muscle. *J. Neurosci. Res.* **1980**, *5*, 43–50. [[CrossRef](#)]
40. MacDonalds, J.F.; Bartlett, M.C.; Mody, I.; Pahapill, P.; Reynolds, J.N.; Salter, M.W.; Schneiderman, J.H.; Pennefather, P.S. Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. *J. Physiol.* **1991**, *432*, 483–508. [[CrossRef](#)]
41. Hatakeyama, N.; Yamazaki, M.; Shibuya, N.; Yamamura, S.; Momose, Y. Effects of ketamine on voltage-dependent calcium currents and membrane potentials in single bullfrog atrial cells. *J. Anesth.* **2001**, *15*, 149–153. [[CrossRef](#)]
42. Yin, J.; Fu, B.; Wang, Y.; Yu, T. Effects of ketamine on voltage-gated sodium channels in the barrel cortex and the ventral posteromedial nucleus slices of rats. *Neuroreport* **2019**, *30*, 1197–1204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zorumski, C.F.; Izumi, Y.; Mennerick, S. Ketamine: NMDA receptors and beyond. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 11158–11164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. De Luccia, T.P. *Mimosa pudica*, *Dionaea muscipula* and anesthetics. *Plant Signal. Behav.* **2012**, *7*, 1163–1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Böhm, J.; Scherzer, S. Signaling and transport processes related to the carnivorous lifestyle of plants living on nutrient-poor soil. *Plant Physiol.* **2021**, *187*, 2017–2031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Iosip, A.L.; Böhm, J.; Scherzer, S.; Al-Rasheid, K.A.S.; Dreyer, I.; Schultz, J.; Becker, D.; Kreuzer, I.; Hedrich, R. The Venus flytrap trigger hair-specific potassium channel KDM1 can reestablish the K⁺ gradient required for haptic-electric signaling. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000964. [[CrossRef](#)]
47. Hermanns, H.; Hollmann, M.W.; Stevens, M.F.; Lirk, P.; Brandenburger, T.; Piegeler, T.; Werdehausen, R. Molecular mechanisms of action of systemic lidocaine in acute and chronic pain: A narrative review. *Brit. J. Anaesth.* **2019**, *123*, 335–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hedrich, R. Ion channels in plants. *Physiol Rev.* **2012**, *92*, 1777–1811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Milne, A.; Beamish, T. Inhalational and local anesthetics reduce tactile and thermal responses in *Mimosa pudica*. *Can. J. Anaesth.* **1999**, *46*, 287–289. [[CrossRef](#)]
50. Hagihara, T.; Mano, H.; Miura, T.; Hasebe, M.; Toyota, M. Calcium-mediated rapid movements defend against herbivorous insects in *Mimosa pudica*. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 6412. [[CrossRef](#)]
51. Pavlovič, A.; Kopečná, M.; Hloušková, L.; Koller, J.; Hřivňáček, M.; Ilík, P.; Bartoš, J. Diethyl ether anaesthesia inhibits de-etiolation of barley seedlings by locking them in intermediate skoto-photomorphogenetic state. *Physiol. Plantarum* **2024**, *176*, e14144. [[CrossRef](#)]
52. Ilík, P.; Hlaváčková, V.; Krchňák, P.; Nauš, J. A low-noise multi-channel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biol. Plantarum* **2010**, *54*, 185–190. [[CrossRef](#)]
53. Kiep, V.; Vadassery, J.; Lattke, J.; Maaß, J.-P.; Boland, W.; Peiter, E.; Mithöfer, A. Systemic cytosolic Ca²⁺ elevation is activated upon wounding and herbivory in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **2015**, *207*, 996–1004. [[CrossRef](#)]
54. Chini, A.; Monte, I.; Zamarreño, A.M.; Hamberg, M.; Lassuer, S.; Reymond, P.; Weiss, S.; Stintzi, A.; Schaller, A.; Porzel, A.; et al. An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 171–178. [[CrossRef](#)]
55. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2003–2007. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.