

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Úloha L-cysteindesulphhydrasy v rostlinných odpovědích
na biotické stresy

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Daniel Vojtovič
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne.....

„Děkuji doc. Mgr. Marku Petřivalskému, Dr. za odborné vedení mé diplomové práce, poskytnutou literaturu, ochotu, pomoc a trpělivost. Děkuji také kolektivu katedry biochemie za cenné rady a doporučení týkající se práce v laboratoři.“

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Daniel Vojtovič
Název práce	Úloha L-cysteindesulhydrasy v rostlinných odpovědích na biotické stresy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

L-cysteindesulhydrasa (DES1, EC 4.4.1.1), katalyzující přeměnu L-cysteinu na pyruvát, amoniak a sulfan, je klíčovým enzymem regulace hladiny L-cysteinu v cytosolu rostlinných buněk. Významně se podílí na obraně rostlin vůči biotickému i abiotickému stresu. Práce se zabývá významem a regulací L-cysteinu a z něj odvozených metabolitů v rostlinách. Je v ní podrobně popsána role substrátu a produktu DES1, L-cysteinu a sulfanu, v odpovědích rostlin na biotické stresy. Jedna kapitola podává stručný přehled znalostí o DES1 v rostlinách. V experimentální části byla optimalizována metoda stanovení aktivity DES v kultuře tabákových buněk, byl stanovován vliv složení média na aktivitu DES a životnost tabákových buněk. Byly studovány změny aktivity DES, ke kterým docházelo v průběhu působení elicitoru kryptogeinu na kulturu tabákových buněk. Byl pozorován pozitivní vliv L-cysteinu a donorů sulfanu NaHS a Na₂S a negativní vliv lapače sulfanu hypotaurinu na životnost tabákových buněk pod vlivem biotického stresu, rovněž byly stanoveny změny aktivity DES vlivem těchto podmínek. Byly také sledovány změny aktivity DES v listech a kořenech v průběhu vývoje rostlin *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* a *Nicotiana tabacum* pěstovaných v substrátu a na pevném agarovém MS médiu. Výsledky práce ukazují, že DES má úlohu ve vývoji rostlin i v odpovědích rostlin na biotický stres.

Klíčová slova	Biotický stres, L-cysteindesulhydrasa, L-cystein, kryptogein, sulfan
Počet stran	79
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Daniel Vojtovič
Title	The role of L-cysteine desulfhydrase in plant responses to biotic stress
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Year of presentation	2019

Abstract

L-cysteine desulfhydrase (DES1, EC 4.4.1.1), which catalyzes conversion of L-cysteine to pyruvate, ammonia and hydrogen sulfide, is a key enzyme involved in maintaining L-cysteine homeostasis in the cytosol of plant cells. It has an important role in plant defense mechanisms against biotic and abiotic stress. The theoretical part of this work is concerned with importance and regulation of L-cysteine and its metabolites in plants. It includes the role of DES1 substrate and product, L-cysteine and hydrogen sulfide, in plant responses to biotic stress. One chapter is focused to overview of DES1 in plants. In the experimental part, the DES activity measurement in plant cell culture was optimized. Effects of medium composition and of elicitor cryptogein on DES activity and tobacco cell viability was tested. The positive effect of L-cysteine and hydrogen sulfide donors (NaHS and Na₂S) and the negative effect of hydrogen sulfide scavenger (hypotaurin) on plant cell viability and DES activity during stress conditions were confirmed. Changes in DES activity in leaves and roots during development of *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* grown in soil and in agar-supplemented Murashige and Skoog medium were examined. The results indicate that DES1 is involved in plant responses to biotic stress and also in plant development.

Keywords	Plant biotic stress, cryptogein, hydrogen sulfide, L-cysteine, L-cysteine desulfhydrase,
Number of pages	79
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Metabolismus síry v rostlinách.....	2
2.1.1	Cysteinsynthasový komplex.....	3
2.1.2	Genové rodiny klíčových enzymů syntézy cysteinu u rostlin.....	5
2.2	Cystein v rostlinách	7
2.2.1	Cystein v cytosolu	7
2.2.2	Cystein v mitochondriích	8
2.2.3	Cystein v chloroplastech	11
2.3	Přehled znalostí o L-cysteindesulphydrase v rostlinách	12
2.4	L-cysteindesulphydrasa a biotický stres.....	16
2.4.1	Úvod do imunity rostlin	16
2.4.2	Sírou indukovaná rezistence	18
2.4.3	Zkoumání fungicidního působení síry	19
2.4.4	Uvolňování sulfanu z rostlin v průběhu napadení patogenem.....	20
2.4.5	Mechanismy působení sulfanu	22
2.4.6	Studium role cysteindesulphydras v signálních drahách sulfanu ve stresových odpovědích rostlin.....	24
2.4.7	Role cysteinu v imunitě rostlin	25
3	Praktická část	28
3.1	Materiál a přístroje	28
3.1.1	Chemikálie	28
3.1.2	Přístroje a experimentální vybavení.....	28
3.1.3	Programy	28
3.1.4	Roztoky	29
3.1.5	Kultivace tabákových buněk	30
3.1.6	Pěstování rostlin	31
3.1.7	Sterilizace semen.....	31
3.1.8	Kultivace semenáčků <i>Arabidopsis thaliana</i> a <i>Nicotiana tabacum</i> na pevném agarovém MS médiu	31
3.2	Metody.....	32
3.2.1	Stanovení životnosti tabákových buněk pomocí FDA.....	32
3.2.2	Stanovení životnosti tabákových buněk metodou s Evans Blue.....	33
3.2.3	Extrakce proteinů	33
3.2.4	Stanovení aktivity L-cysteindesulphydrasy (DES).....	33
3.2.5	Stanovení proteinů Bradfordovou metodou.....	35

3.2.6	Příprava mrtvých buněk	35
3.2.7	Stanovení vlivu vybraných látek na životnost tabákových buněk a aktivitu DES.....	35
4	Výsledky	37
4.1	Analýza vlastností DES v tabákových buňkách.....	37
4.1.1	Teplotní optimum DES	37
4.1.2	Vliv pyridoxalfosfátu v reakční směsi na aktivitu DES.....	37
4.2	Testování metod stanovení životnosti tabákových buněk.....	38
4.2.1	Metoda stanovení životnosti tabákových buněk s FDA.....	38
4.2.2	Metoda stanovení životnosti tabákových buněk s Evansovou modří	39
4.3	Sledování změn životnosti tabákových buněk a aktivity DES v různých fázích buněčné kultury	40
4.3.1	Změny životnosti tabákových buněk a hustoty buněčné suspenze v různých fázích buněčné kultury	41
4.3.2	Změny aktivity DES tabákových buněk v různých fázích buněčné kultury.....	42
4.4	Studium vztahu metabolismu L-cysteinu a sulfanu k buněčné smrti tabákových buněk vyvolané účinkem elicitoru kryptogeinu.....	43
4.4.1	Vliv kryptogeinu na životnost tabákových buněk a aktivitu DES	43
4.4.2	Vliv přídavku L-cysteinu do média na životnost tabákových buněk a aktivitu DES.....	45
4.4.3	Vliv L-cysteinu na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem.....	46
4.4.4	Vliv preinkubace tabákových buněk s L-cysteinem na životnost buněk a jejich odolnost vůči kryptogeinu.....	47
4.4.5	Vliv hypotaurinu na životnost buněk a aktivitu DES	49
4.4.6	Vliv hypotaurinu na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem.....	51
4.4.7	Vliv hydrogensulfidu sodného na aktivitu DES a životnost tabákových buněk.....	52
4.4.8	Vliv hydrogensulfidu sodného na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem.....	53
4.4.9	Vliv sulfidu sodného na aktivitu DES a životnost tabákových buněk.....	54
4.4.10	Vliv sulfidu sodného na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem.....	55
4.5	Aktivita DES ve vybraných modelových rostlinách	56
4.5.1	Aktivita DES z listů rostlin pěstovaných v pěstebním substrátu	56
4.5.2	Aktivita DES z listů rostlin pěstovaných na agarovém médiu.....	58
4.5.3	Porovnání aktivity DES v listech a kořenech vybraných rostlinných druhů.....	59

5	Diskuze.....	60
5.1	Analýza vlastností DES v tabákových buňkách.....	60
5.1.1	Stanovení teplotního optima DES.....	60
5.1.2	Vliv PLP v reakční směsi na aktivitu DES.....	60
5.2	Testování metod stanovení životnosti tabákových buněk.....	61
5.3	Změny životnosti tabákových buněk a aktivity DES v různých fázích buněčné kultury.....	62
5.3.1	Změny životnosti tabákových buněk a hustoty buněčné suspenze v různých fázích buněčné kultury.....	62
5.3.2	Změny aktivity DES tabákových buněk v různých fázích buněčné kultury.....	64
5.4	Vliv kryptogeinu.....	64
5.5	Vliv L-cysteinu v médiu.....	65
5.6	Vliv hypotaurinu.....	66
5.7	Vliv hydrogensulfidu a sulfidu sodného.....	67
5.8	Aktivita DES vybraných rostlin pěstovaných v substrátu a na agarovém médiu.....	68
6	Závěr.....	71
7	Literatura.....	72
8	Seznam použitých symbolů a zkratek.....	78

Cíle práce

Teoretická část

- vypracovat literární rešerši shrnující význam a regulaci metabolismu L-cysteinu a z něj odvozených metabolitů v rostlinách, se zaměřením na podmínky biotického stresu

Praktická část

- optimalizace metod stanovení životnosti a aktivity L-cysteindesulfhydrasy v buněčné kultuře tabákových buněk
- studium úlohy L-cysteindesulfhydrasy v podmínkách biotického stresu na modelovém systému interakce kultury tabákových buněk s elicitorem kryptoginem
- stanovení změn aktivity L-cysteindesulfhydrasy v průběhu vývoje vybraných rostlin a v různých fázích buněčné kultury

1 Úvod

Cystein jako donorová molekula redukované síry má centrální postavení v metabolismu rostlin. Jsou z něj syntetizovány jak esenciální biomolekuly, tak i různé obranné sloučeniny. Podílí se také na redoxní signalizaci v různých buněčných kompartmentech. Tvoří se inkorporací sulfidu do O-acetylserinu, reakcí katalyzovanou O-acetylserinithiollyasou (OASTL), která představuje poslední krok dráhy asimilační redukce síranu. Rostlinné buňky obsahují různé izoformy OASTL v mitochondriích, chloroplastech i cytosolu (Romero *et al.*, 2014).

V nedávné době došlo k významným pokrokům při studiu specifických rolí izoform OASTL v *Arabidopsis thaliana*. Bylo zjištěno, že rodina proteinů OASTL zahrnuje členy vykazující také například aktivitu L-cysteindesulfhydrasovou (DES) nebo S-sulfocysteinsynthasovou (SCS). Výzkum prokázal, že cytosolární hydrogensulfid a chloroplastový S-sulfocystein vystupují jako signální molekuly regulující autofagii a chránící fotosystémy. Cystein v cytosolu hraje nezbytnou roli v rostlinné imunitě, v mitochondriích se podílí na detoxifikaci kyanidu (Romero *et al.*, 2014).

V *Arabidopsis thaliana* je DES1 jediným dosud identifikovaným cytosolárním enzymem katalyzujícím degradaci L-cysteinu za vzniku sulfanu, pyruvátu a amoniaku a vykazující tedy L-cysteindesulfhydrasovou aktivitu. Detailní charakterizace *des1* mutantů, stejně jako exogenní aplikace donoru sulfanu (NaHS), lapače sulfanu (hypotaurin) a inhibitorů DES1 (hydroxylamin), poskytla informace o signálních funkcích sulfanu v cytosolu uplatňujících se v odpovědích rostliny na biotický i abiotický stres (Alvarez *et al.*, 2012b; Shi *et al.*, 2015). Kromě toho je pro obranu rostliny vůči patogenům zřejmě důležité i toxické působení sulfanu (Calderwood a Kopriva, 2014). Na obraně vůči patogenům se značně podílí i cystein, který může například indukovat produkci fytoalexinů (Zook a Hammerschmidt, 1997). Změny hladiny cysteinu a sulfanu jsou řízeny především změnami množství a aktivit OASTL a DES1, které spolu kooperují (Bloem *et al.*, 2004).

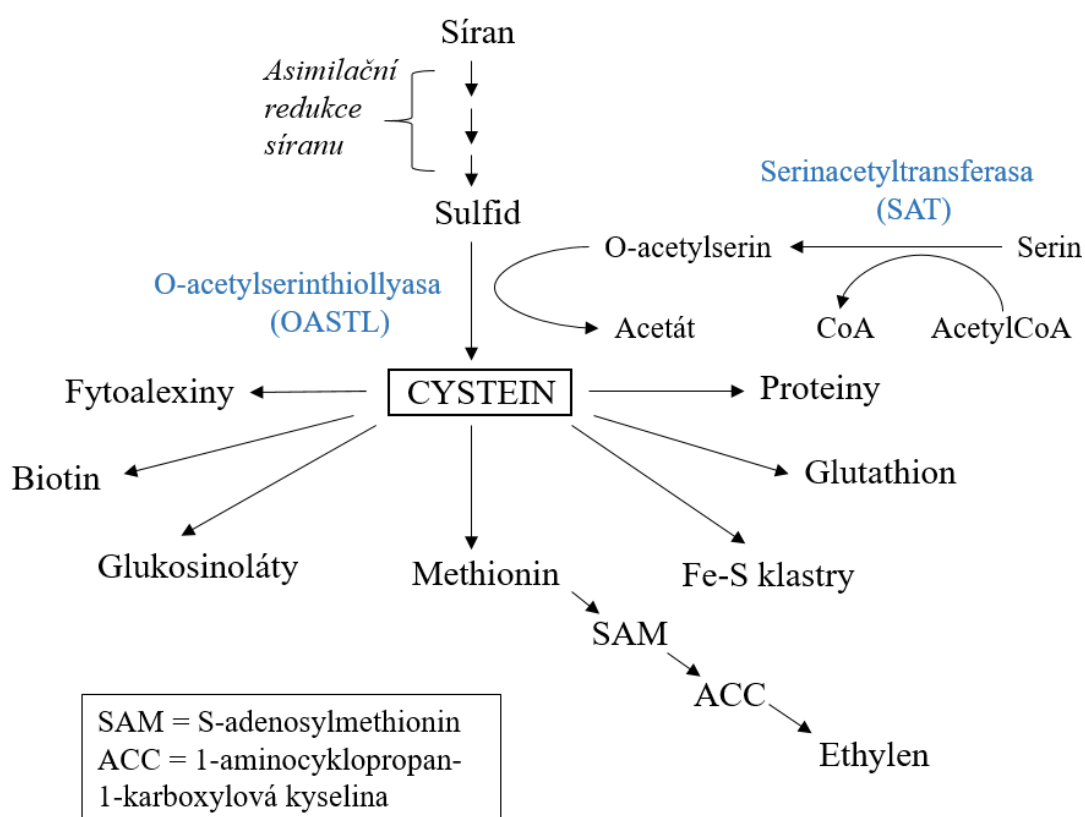
Pochopení dějů probíhajících v rostlinách v důsledku napadení patogenem, prozkoumání mechanismů vedoucích ke zvýšení odolnosti rostlin vůči biotickému stresu a objasnění úlohy sirných sloučenin v těchto mechanismech může usnadnit následné pěstování zemědělských plodin, zvýšit jejich výnos a omezit používání škodlivých pesticidů (Bloem *et al.*, 2015).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Metabolismus síry v rostlinách

Síra je makronutrient nezbytný pro růst a vývoj rostlin, ve kterých tvoří 0,3 – 0,5 % jejich sušiny. Největší množství síry v přírodě se nachází ve formě síranu se sírou v oxidačním stavu VI, který je přijímán rostlinami a následně redukován na oxidační stupeň -II a asimilován do podoby L-cysteinu. Cystein je tak první organickou sloučeninou v rostlinách, která obsahuje redukovanou síru (Takahashi *et al.*, 2011).

Cystein je jednak jednou z 20 proteinogenních aminokyselin, jednak je důležitým prekurzorem pro syntézu mnoha dalších významných biomolekul (Obr. 1).



Obr. 1: Metabolické dráhy cysteinu u rostlin (upraveno dle Romero *et al.*, 2014).

Thiolová skupina cysteinu může být posttranslačně modifikována za účelem ovlivnění funkce proteinu. Snadno podléhá například oxidaci za tvorby disulfidových můstků, jež determinují strukturu a sbalení proteinů, a tím i jejich stabilitu a funkci (Haag *et al.*, 2012). Některé proteiny mohou podstoupit reverzibilní oxidaci či redukci těchto disulfidových můstků v rámci mechanismu redoxní regulace jejich funkce (Buchanan a Balmer, 2005). Thiolová skupina může být rovněž oxidována za vzniku sulfenové (-SOH), sulfinové (-SO₂H) nebo sulfonové skupiny (-SO₃H). Tyto modifikace jsou zprostředkovány peroxidem vodíku. Thiolová skupina může také podlehnout například

S-nitrosylaci působením oxidu dusnatého a sulfhydrylaci působením sulfanu (Couturier *et al.*, 2013).

Thiolové skupiny cysteinů bývají mnohdy lokalizovány v aktivních místech enzymů a podílí se na katalýze biochemických reakcí, například cysteinové proteasy podobné papainu (Richau *et al.*, 2012).

Jako příklady metabolitů vzniklých z cysteinu můžeme uvést další proteinogenní aminokyselinu methionin, S-adenosylmethionin, S-methylcystein, různé fytoalexiny a glukosinoláty. Mezi enzymové kofaktory vyžadující pro svou biosyntézu cystein patří biotin. Svůj původ v cysteinu má rovněž síra v Fe-S klastrech (Lewandowska a Sirko, 2008).

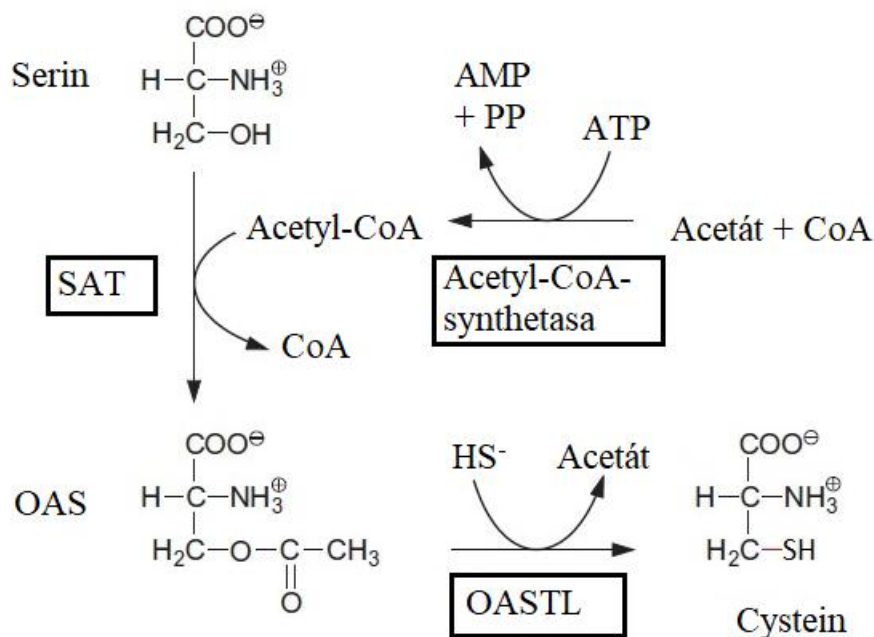
Významnou látkou vznikající z cysteinu je antioxidant glutathion (GSH), chemicky tripeptid γ -glutamylcysteinylglycin, jehož hlavní funkcí je udržování redoxní homeostázy v buňkách, a to právě díky přítomnosti thiolové skupiny cysteinu. Glutathion slouží především jako ochrana vůči oxidačnímu stresu. Z glutathionu vznikají například fytochelatinu umožňující detoxifikaci těžkých kovů, glutathion je rovněž nezbytný pro činnost glutathion-S-transferas, které katalyzují detoxifikaci xenobiotik prostřednictvím jejich konjugace s GSH (Mendoza-Cozatl *et al.*, 2011; Rea, 2012). Glutathion se také účastní obranné odpovědi rostlin při napadení patogeny (Rausch and Wachter, 2005).

Jiný metabolit úzce spojen s metabolismem cysteinu je ethylen, fytohormon zapojený v regulaci fyziologických procesů, jako je klíčení semen, vývoj kořenových vlásků, opad listů a korunních lístků, zrání plodů, senescence a ovlivnění rostlinných odpovědí na biotické i abiotické stresy. Metabolická dráha syntézy ethylenu v cytosolu rostlinných buněk vede přes methionin, S-adenosylmethionin (SAM) a 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC), (Romero *et al.*, 2014).

2.1.1 Cysteinsyntasový komplex

Důležitou anorganickou sloučeninu síry představuje sulfid, produkovaný fotosyntetickými organismy v dráze nazývané asimilační redukce síranu. Pro jeho začlenění do uhlíkového skeletu organických molekul jsou nezbytné enzymy serinacetyltransferasa (SAT; EC 2.3.1.30), katalyzující acetylaci hydroxylové skupiny serinu s využitím acetyl-CoA za vzniku *O*-acetylserinu (OAS), a *O*-acetylserinlyasa (*O*-acetylserin(thiol)lyasa, OASTL; EC 2.5.1.47), která inkorporuje sulfid do OAS za vzniku cysteinu (Obr. 2). Dohromady tyto dva enzymy tvoří heterooligomerní

cysteinsynthasový komplex původně charakterizovaný u bakterií a později popsany také v rostlinách (Droux *et al.*, 1998; Wirtz a Hell, 2006).

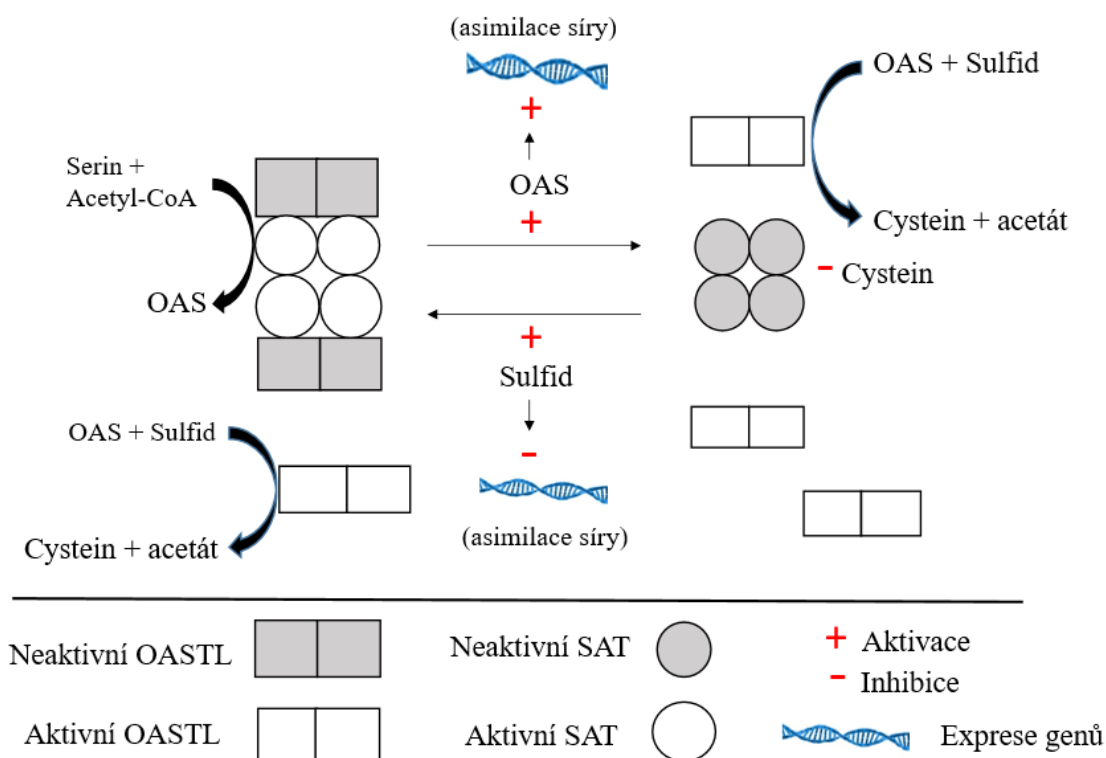


Obr. 2: Biosyntéza cysteinu v rostlinách (upraveno dle Heldt a Piechulla, 2010).

Cysteinsynthasový komplex je tvořen pouze v případě, že se v cytosolu nachází nadbytek molekul OASTL vůči SAT. Substráty OASTL vykazují antagonistický efekt na protein-proteinovou interakci při vzniku aktivního komplexu: sulfid aktivuje vznik komplexu, zatímco OAS způsobuje jeho disociaci. Interakce SAT a OASTL kompletně zablokuje aktivitu OASTL a současně naopak zvýší aktivitu SAT. Aktivita OASTL je zablokována kvůli interakci C-terminálního konce SAT s aktivním místem OASTL, která je podstatou tvorby cysteinsynthasového komplexu, a která znemožňuje přístup substrátů OASTL do aktivního místa. SAT vykazuje v komplexu nejen vyšší aktivitu, ale také nižší citlivost vůči cysteinu, který působí jako jeho inhibitor. Cystein se zřejmě váže poblíž C-konce SAT, který není přístupný, je-li SAT v komplexu s OASTL (Yi *et al.*, 2010).

Je-li síry ve formě sulfidu v těle rostliny dostatek, dochází k asociaci SAT a OASTL do formy cysteinsynthasového komplexu (Obr. 3). Proteinové interakce v rámci tohoto komplexu značně mění kinetické parametry SAT, což umožňuje enzymu tvořit OAS efektivněji. OASTL je naproti tomu aktivnější ve své volné podobě. Především nadbytečná OASTL, která se nenavázala do komplexu se SAT, využívá produkovaný OAS na tvorbu cysteinu. Při nízké koncentraci sulfidu není sulfid dostupný pro OASTL a OAS se hromadí. Zvýšená koncentrace OAS vede k rozpadu cysteinsynthasového komplexu, aktivita SAT je tím snížena, takže již další molekuly OAS nevznikají.

Nevzniká-li nadále ani sulfid asimilační redukcí síranu, koncentrace OAS přetrvávají na vysokých hodnotách delší dobu, což následně vede k aktivaci exprese genů pro enzymy zajišťující redukci síranu na sulfan. Vyšší koncentrace sulfidu naopak vede posléze k represi genů pro tyto enzymy. Cysteinsynthasový komplex je možno tedy pokládat za senzor stavu zásobení rostliny sírou (Yi *et al.*, 2010).



Obr. 3: Regulace cysteinsynthasového komplexu. Pro zjednodušení schématu nereprezentuje zobrazený počet obdélníků a kruhů skutečný počet podjednotek proteinů, které spolu interagují (vytvořeno podle Wirtz a Hell, 2006 a Yi *et al.*, 2010).

2.1.2 Genové rodiny klíčových enzymů syntézy cysteinu u rostlin

Rostlinné buňky obsahují různé formy SAT a OASTL enzymů, které se liší především lokalizací v buňce. Vyskytují se v plastidech, mitochondriích i cytosolu. Jako modelový organismus slouží *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní), v němž bylo identifikováno pět *SAT* genů a devět *OASTL* genů (Howarth *et al.*, 2003; Wirtz *et al.*, 2004). Výzkum *in silico* potvrdil, že v různých organismech se vyskytuje různý počet ortologů *SAT* i *OASTL*. Počet ortologních genů *OASTL* je téměř vždy vyšší, než je tomu v případě *SAT*, a to i u natolik jednoduchých organismů, jako jsou jednobuněčné řasy. Nabízí se otázka, zda jsou produkty všech genů *OASTL* zapojené do tvorby výše zmíněných komplexů se SAT, nebo zda některé *OASTL* mají svou roli v jiných metabolických drahách (Romero *et al.*, 2014).

U *A. thaliana* nejčastěji se vyskytující *OASTL* geny (Tab. 1) detekované na transkripční úrovni kódují cytosolickou OAS-A1 (At4g14880), plastidovou OAS-B (At2g43750) a mitochondriální OAS-C (At3g59760). Všechny tyto izoformy *OASTL* katalyzují syntézu cysteinu z OAS a sulfidu. Charakter enzymu *OASTL* rovněž definuje schopnost vazby na SAT. Rodina *OASTL* navíc obsahuje vysoce exprimovanou mitochondriální izoformu, která funguje jako β -kyanoalaninsynthasa (CAS; EC 4.4.1.9) katalyzující přeměnu cysteinu a kyanidu na sulfan a β -kyanoalanin, a která hraje nezbytnou roli v detoxifikaci kyanidu z mitochondrií, přičemž však zajišťuje hladinu kyanidu nezbytnou pro jeho signální funkce ve specifických rostlinných procesech (Romero *et al.*, 2014).

Tab. 1: Genová rodina *OASTL* v *A. thaliana*. *OASTL* = *O*-acetylserin(thiol)lyasa; CAS = β -kyanoalaninsynthasa; SSCS = *S*-Sulfocysteinsynthasa; DES = L-cysteindesulhydrasa (převzato z Romero *et al.*, 2014).

Gen	Lokus	Buněčná lokalizace proteinu	Enzymová aktivita
<i>OAS-A1</i>	At4g14880	Cytosol	<i>OASTL</i>
<i>OAS-B</i>	At2g43750	Chloroplasty	<i>OASTL</i>
<i>OAS-C</i>	At3g59760	Mitochondrie	<i>OASTL</i>
<i>CYS-D1</i>	At3g04940	Cytosol	<i>OASTL</i>
<i>CYS-D2</i>	At5g28020	Cytosol	<i>OASTL</i>
<i>CAS-C1</i>	At3g61440	Mitochondrie	CAS
<i>SCS</i>	At3g03630	Chloroplasty	SSCS
<i>DES1</i>	At5g28030	Cytosol	DES

V menší míře dochází také k expresi genů pro cytosolové proteiny *CYS-D1* (At3g04940), *CYS-D2* (At5g28020), *DES1* (At5g28030), a pro plastidový protein *SCS* (At3g03630), původně pojmenovaný CS26. Tyto geny byly identifikovány na základě sekvenční homologie v průběhu sekvenování genomu *A. thaliana*. Důležitým enzymem pro udržení homeostázy cysteinu je L-cysteindesulhydrasa (*DES1*; EC 4.4.1.1), která katalyzuje rozklad L-cysteinu na pyruvát, amoniak a sulfan (Alvarez *et al.*, 2010). *SCS* protein projevuje *S*-sulfocysteinsynthasovou aktivitu (SSCS) a katalyzuje inkorporaci thiosulfátu do OAS za vzniku *S*-sulfocysteinu. Tato reakce byla již dříve popsána u bakterií. U rostlin je *SCS* důležitým enzymem pro správný průběh fotosyntézy a je senzorem redoxního stavu chloroplastů (Bermúdez *et al.*, 2010).

U *Solanum lycopersicum* má rodina proteinů *OASTL* 9 členů. Na produkci L-cysteinu se podílí v největší míře proteiny *SIOAS5* a *SIOAS6*, na produkci sulfanu z L-cysteinu hlavně *SIOAS4* a *SIOAS6*. *SIOAS8* funguje jako β -kyanoalaninsynthasa

v mitochondriích. Žádný protein z této rodiny nevykazuje výraznější SSCS aktivitu (Liu *et al.*, 2019).

2.2 Cystein v rostlinách

2.2.1 Cystein v cytosolu

Cytosol je hlavním místem syntézy cysteinu. Jeho koncentrace zde přesahují $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, především díky činnosti cytosolární OASTL izoformy OAS-A1 (Tab. 1), zatímco v ostatních buněčných kompartmentech bývá cysteinu méně než $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Krueger *et al.*, 2009). Cystein ve vyšších koncentracích je kvůli své značné reaktivitě molekulou velmi toxickou. Thioly se snadno oxidují za tvorby sloučenin se sírou ve vyšších oxidačních stavech, které mohou inhibovat mnoho enzymů. Cystein navíc ve velké míře redukuje železitý kation, čímž prostřednictvím Fentonovy reakce způsobuje oxidativní poškození (Jacob *et al.*, 2003). Udržování homeostázy cysteinu v cytosolu pomocí koordinace enzymových aktivit OAS-A1 a DES1 je pro rostlinu životně důležité.

Lopez-Martin (2008) a kolektiv charakterizovali *oas-1* mutanty *A. thaliana*. OAS-A1 je nejabundantnější cytosolická izoforma OASTL. Je zapojená v odpovědích *Arabidopsis* na abiotický stres, především na přítomnost těžkých kovů. Klíčovými sloučeniny jsou fytochelatiny, které těžké kovy chelatují do své struktury, a které vznikají z cysteinu, přičemž meziproduktem je glutathion. U výše zmíněných mutantů hladina cysteinu i glutathionu poklesla a redoxní stav glutathionu byl posunut směrem k oxidované formě. Mutanti dále vykazovali zvýšenou citlivost ke kadmiu. Bylo také zjištěno, že deficiencie OAS-A1 způsobuje u mutantů odchylky v homeostáze peroxidu vodíku. Výsledkem nerovnováhy mezi tvorbou a odbouráním reaktivních forem kyslíku (ROS) byl oxidační stres, a to i v nestresujících podmínkách u těchto mutantů. Vnější projevem byl spontánní vznik lézí na listech v důsledku buněčné smrti. Hladina cysteinu může tedy sloužit jako parametr antioxidační kapacity v cytosolu *Arabidopsis* (Lopez-Martin *et al.*, 2008).

U *oas-1* mutantů došlo k poklesu koncentrace cysteinu o 35 %, naopak u *des1* mutantů, jehož schopnost cystein odbourávat byla snížena, došlo k nárůstu koncentrace cysteinu o 25 %. Maximální odchylky v hladině intracelulárního cysteinu, které ještě nezpůsobují pozorovatelnou toxicitu cysteinu vůči rostlině, jsou tedy 25 – 35 %. Zatímco deficit OAS-A1 vede ke zvýšení hladiny ROS, deficit DES1 vede k jejímu snížení.

U *des1* mutanta došlo navíc ke zvýšení tolerance vůči kadmii, což je efekt opačný k situaci u *oas-1* mutanta (Lopez-Martin *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2014).

Přídavek OAS inhibuje uvolňování plynného sulfanu z rostliny a navyšuje produkci cysteinu (Rennenberg, 1983). Na druhou stranu sloučeniny inhibující tvorbu glutathionu z cysteinu a zbylých dvou aminokyselin podporují uvolňování sulfanu. Dá se tvrdit, že pokud jsou procesy spotřebovávající cystein inhibovány a koncentrace cysteinu roste, sulfid je emitován jako plynný H₂S (Rennenberg a Filner, 1982).

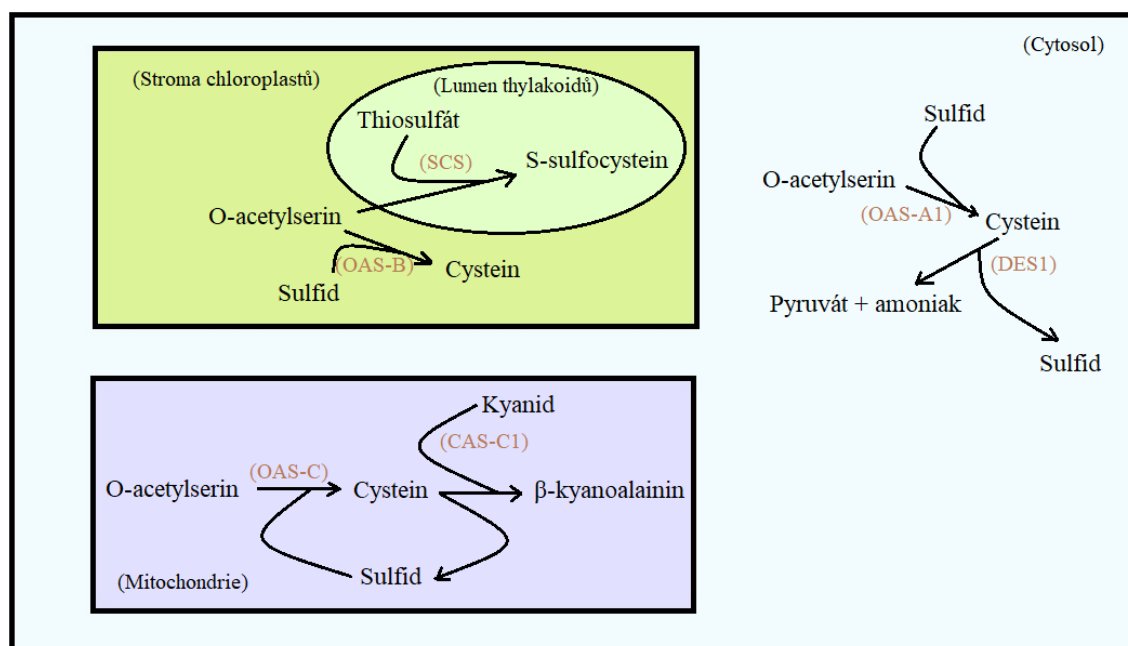
Burandt a kolektiv (2001) jako první popsali korelaci mezi enzymovým uvolňováním sulfanu z cysteinu a celkovým obsahem síry v rostlině. S rostoucím obsahem síry klesá aktivita DES1 a roste aktivita OASTL. Bloem a kolektiv (2004) však o něco později publikovali, že rostliny s deficiencí síry vykazují vyšší aktivitu enzymu produkujícího cystein i enzymu katalyzujícího katabolismus cysteinu, než rostliny s dostatkem síry. V případě DES1 se výsledky u obou skupin vědců shodují. Odpověď na změnu celkového obsahu síry na úrovni OASTL zůstává nejasná.

Vliv na tvorbu L-cysteinu i produkci sulfanu má i příjem dusíku rostlinou. U rostlin s dostatkem dusíku byla zjištěna zvýšená aktivita OASTL i DES1, vyšší obsah organických sloučenin se sírou a nižší obsah síranu. To naznačuje, že dostatečný příjem dusíku, jehož obsah je limitujícím faktorem pro tvorbu proteinů, vede k tomu, že více síry ze síranů je zabudováno do proteinů. Vyšší aktivita DES1 zde může sloužit jako ochrana vůči nadměrnému hromadění cysteinu v rostlině. Byla prokázána i negativní korelace mezi obsahem síry ve formě síranu s aktivitou L-cysteindesulfhydrasy, na druhou stranu vyšší obsah cysteinu a GSH je spojen se zvýšenou aktivitou tohoto enzymu (Bloem *et al.*, 2004).

2.2.2 Cystein v mitochondriích

Pomocí specifické down-regulace mitochondriální SAT působením interferující RNA a pomocí T-DNA inzerčních mutantů bylo ukázáno, že mitochondrie, nikoliv chloroplasty nebo cytosol, jsou hlavním zdrojem OAS *in vivo* pro následnou syntézu cysteinu v cytosolu. Proto byla určitá pozornost věnována také členům OASTL rodiny zodpovědným za syntézu cysteinu v mitochondriích. V *Arabidopsis* existují v mitochondriích dva vysoce exprimované proteiny. Prvním je samotná OASTL, která je zde označována OAS-C, a která katalyzuje inkorporaci sulfidu do OAS, čímž vzniká cystein (Romero *et al.*, 2014). Druhým je β -kyanoalaninsynthasa (CAS-C1), jež

katalyzuje konverzi cysteinu a kyanidu na hydrogensulfid a β -kyanoalanin (Obr. 4). Relativně velké množství transkriptu pro β -kyanoalaninsynthasu bylo zjištěno v listech. U OAS-C bylo větší množství transkriptu naměřeno v kořenech (Wanatabe *et al.*, 2008).



Obr. 4: Vnitrobuněčná lokalizace členů enzymové rodiny OASTL a reakce, které tyto enzymy katalyzují v *A. thaliana* (upraveno dle Romero *et al.*, 2014).

Mitochondriální OAS-C přispívá pouze z 5 % k celkové OASTL aktivitě, zřejmě má však velmi důležitou roli při detoxifikaci sulfidu a kyanidu v mitochondriích (Romero *et al.*, 2014). V tzv. kyanogenních rostlinách je kyanid produkován v důsledku degradace kyanogenních lipidů nebo kyanogenních sacharidů. V nekyanogenních druzích, jako je *A. thaliana*, je hlavní zdroj kyanidu odvozen z biosyntézy fytohormonu ethylenu a fytoalexinu camalexinu. Prvním stupněm syntézy ethylenu je přeměna *S*-adenosylmethioninu na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) působením ACC-synthasy. Ta je pak ACC-oxidase oxidována za vzniku ethylenu a kyanomravenčí kyseliny, která podléhá spontánnímu rozkladu na oxid uhličitý a kyanid (Garcia *et al.*, 2010).

V průběhu biosyntézy camalexinu je indol-3-acetonitril, meziprodukt odvozený od tryptofanu, konjugován s cysteinem, čímž vznikne substrát pro enzym z rodiny cytochromů P450 (enzym CYP71B15), který katalyzuje tvorbu thiazolinového kruhu spojenou s uvolněním kyanidu (Garcia *et al.*, 2013).

Kyanid je potenciálním inhibitorem cytochrom-c-oxidasy, která je složkou dýchacího řetězce. Mitochondriální CAS-C1 detoxifikuje kyanid tím, že z něj vytvoří β -kyanoalanin, avšak jedním z produktů této enzymové aktivity je hydrogensulfid, který

rovněž inhibuje cytochrom-c-oxidasu. Hydrogensulfid je poté detoxifikován OAS-C, což vede k produkci cysteinu. Cystein je následně opět využit enzymem CAS-C1 k detoxifikaci kyanidu, čímž vzniká v mitochondrii cyklická dráha (Obr. 4). OAS-C a CAS-C1 se tedy ve své funkci vzájemně doplňují a hrají důležitou roli v udržení určité hladiny kyanidu v mitochondriích (Garcia *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2014).

Určitá vyšší koncentrace kyanidu, která pro rostliny ještě není toxická a neblokuje kompletně dýchací řetězec, vede k defektu tvorby kořenových vlásků, obdobně jako exogenní přídavek kyanidu do růstového média. Tomuto ději můžeme zabránit přídavkem hydroxokobalaminu, který slouží jako antidotum při akutních otravách kyanidy u lidí. Bylo publikováno, že hydroxokobalamin neobnovuje pouze kořenový fenotyp rostlin mutantů postrádajících funkční CAS-C1, ale také tvorbu ROS, která je pro růst kořenových vlásků od špičky nepostradatelná. Akumulace kyanidu působí jako represivní signál pro několik genů kódujících enzymy, které jsou zapojené do přestavby buněčné stěny a do tvorby špičky kořenového vlásku. Ovlivňuje také geny zahrnuté v metabolismu a signalizaci ethylenu. Správná hladina a funkce enzymů OAS-C a CAS-C1 je tedy nutná pro růst kořenových vlásků (Garcia *et al.*, 2010).

Enzym CAS-C1 ovlivňuje také interakce rostliny s patogenem. Mutantní *cas-c1* rostliny vykazovaly zvýšenou citlivost vůči nekrotrofní houbě *Botrytis cinerea*, ale zvýšenou toleranci vůči biotrofní bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Transkripční regulace genu pro CAS-C1 v průběhu tří různých interakcí rostliny s patogenem způsobila rozdílnou akumulaci kyanidu při každé interakci. CAS-C1 je pravděpodobně zahrnutý v signální dráze vedoucí k rezistenci nebo senzitivitě v závislosti na typu patogenu (Garcia *et al.*, 2013). Kromě toho je akumulace kyanidu a exprese genu pro CAS-C1 negativně korelována s kompatibilními a nekompatibilními interakcemi rostliny s bakteriemi. Mutace v *CAS-C1* genu způsobuje zpomalení respirační rychlosti v listech, akumulaci ROS, indukci alternativní oxidasy a expresi PR1 proteinů. Je možné, že inhibice dýchacího řetězce v místě cytochrom-c-oxidasy kyanidem, který je přechodně akumulován v průběhu avirulentní bakteriální infekce a kontinuálně akumulován v *cas-c1* mutantovi, indukuje aktivitu alternativní oxidasy a akumulaci ROS, což poté vede ke stimulaci signální dráhy rostlinného imunitního systému závisící na salicylové kyselině (Garcia *et al.*, 2013).

2.2.3 Cystein v chloroplastech

Chloroplasty *Arabidopsis* obsahují dvě OASTL izoformy, OAS-B a SCS. První z nich katalyzuje inkorporaci sulfidu do cysteinu, druhá má *S*-sulfocysteinsynthasovou aktivitu a katalyzuje spojení thiosulfátu a OAS, čímž vzniká *S*-sulfocystein (Obr. 3). SCS protein je lokalizován v lumen thylakoidů, zatímco OAS-B se nachází ve stromatu. SCS postrádá *O*-acetylserin(thiol)lyasovou aktivitu, protože mutace v genu pro SCS neměla žádný vliv na celkovou aktivitu OASTL v porovnání s wild-type jedinci. SCS však hraje nezbytnou roli při regulaci redoxního stavu v chloroplastech. Fenotypové odlišnosti způsobené ztrátou funkce SCS závisí na době vystavení světlu (Bermúdez *et al.*, 2010; Bermúdez *et al.*, 2012).

Mutanty s knockoutovaným genem pro SCS vykazovaly při delší fotoperiodě (long-day conditions) bledost a menší velikost, zatímco krátká fotoperioda nezpůsobila pozorovatelné změny fenotypu. U mutantních rostlin poklesl obsah chlorofylu a fotosyntetická aktivita, hladina celkového glutathionu naopak vzrostla. Dále došlo k poklesu rychlosti asimilace oxidu uhličitého, vodivosti mezofylu a intenzity mitochondriální respirace za tmy. Mutanty vyžadovaly větší počet fotonů na udržení toku elektronů a rychlosti asimilace oxidu uhličitého. Nadbytečné elektrony, které nebyly využity ve fotosyntetických reakcích, se mohly podílet na vzniku ROS, jejichž akumulace při dlouhém osvětlení byla rovněž pozorována. Naproti tomu u mutantů s chybějícím enzymem OAS-B nedošlo k žádným změnám ve fenotypových projevech při vystavení rostlin dlouhé fotoperiodě. Zajímavé ale je, že u těchto mutantů byla nalezena vyšší *S*-sulfocysteinsynthasová aktivita. Na závěr můžeme konstatovat, že *S*-sulfocystein a aktivita SCS jsou pravděpodobně nezbytné pro redoxní regulaci v chloroplastech závislejší na světle (Bermúdez *et al.*, 2010; Bermúdez *et al.*, 2012).

Asimilace síranu v chloroplastech závisí na feredoxinu, který slouží jako reduktans pro sulfitreduktasu redukující siřičitan na sulfid v průběhu dráhy asimilační redukce síranu. V podmínkách nadbytečného osvětlení převyší počet fotonů absorbovaných chloroplasty fotosyntetickou kapacitu chloroplastů. Následkem je produkce ROS, které mohou interferovat s redukcí siřičitanu, a které mohou rovněž oxidovat sulfid na thiosulfát (Gotor a Romero, 2013a). Thiosulfát slouží jako substrát enzymu SCS, jehož katalytickým působením vzniká v lumen thylakoidů *S*-sulfocystein působící jako indikátor možného oxidačního stresu. Je možné, že zde působí jako mírný oxidant indukující redoxní změny, jež vedou k aktivaci některých regulačních proteinů. Děje se tak oxidací cysteinových reziduí proteinů, což způsobuje změnu jejich aktivity vedoucí

k ochraně fotosyntetického aparátu před fotooxidačním poškozením. Potenciálním cílem této oxidace jsou violaxanthindeepoxidasy přeměňující v rámci xanthofylového cyklu violaxanthin na antheraxanthin a zeaxanthin, následkem čehož je pak disipace nadbytečné světelné energie do formy tepla. Redukce violaxanthindeepoxidasy snižuje její aktivitu. S-sulfocystein může tedy fungovat jako senzor pro proteiny, které jeho prostřednictvím detekují akumulaci thiosulfátu jako výsledek nedostatečné detoxifikace ROS, a které spouští obranné mechanismy fotosyntetického aparátu vůči nadměrnému ozáření (Gotor a Romero, 2013a).

Navzdory funčním rozdílům využívají OAS-B i SCS společný substrát OAS pro inkorporaci sulfidu nebo thiosulfátu, tím pádem soutěží o tento substrát. Vzhledem k tomu, že OAS-B je podstatně abundantnější než SCS, dostupnost OAS pro syntézu S-sulfocysteinu v lumen je limitována aktivitou OAS-B ve stromatu (Romero *et al.*, 2014).

2.3 Přehled znalostí o L-cysteindesulhydrase v rostlinách

Rostlinná L-cysteindesulhydrasa (DES1) patří do rodiny rostlinných enzymů O-acetylserin(thiol)lyas (OASTL). V rámci této rodiny bylo u *A. thaliana* dosud popsáno osm členů zapojených do metabolismu jednoduchých sirných sloučenin (Tab. 1), (Romero *et al.*, 2014). DES1 byla poprvé identifikována na základě sekvenční homologie s ostatními OASTL enzymy v průběhu kompletního sekvencování genomu *Arabidopsis*. Původním názvem byl CS-LIKE podle „cysteine synthase-like“. Alvarez a kolektiv (2010) jako první exprimovali gen pro tento protein původem z *Arabidopsis* v bakterii *Escherichia coli* a určili některé základní charakteristiky enzymu na základě chování získaného purifikovaného rekombinantního proteinu.

DES1 (EC 4.4.1.1.) je v rostlinách pravděpodobně hlavním enzymem rozkládajícím L-cystein na hydrogensulfid, pyruvát a amoniak ve stechiometrickém poměru 1:1:1. Tuto reakci můžeme nazývat desulfurace cysteinu. DES1 je lokalizována v cytosolu, kde se účastní regulace hladiny L-cysteinu společně s majoritní OASTL formou OAS-A1, která je exprimována v mnohem větším množství a jejíž hlavní funkcí je produkce cysteinu (Alvarez *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2014). Podobně jako zbylé členy OASTL rodiny vyžaduje DES1 jako kofaktor pyridoxalfosfát (PLP). Po purifikaci rekombinantního proteinu DES1 pomocí afinitní chromatografie vzrostla L-cysteindesulhydrasová aktivita 4,5krát a O-acetylserin(thiol)lyasová aktivita klesla 7,3krát. Z toho vyplývá, že

DES1 preferuje katalýzu degradace cysteinu. Purifikovaná DES1 vykazuje také D-cysteindesulhydrasovou aktivitu, která však byla desetkrát nižší než aktivita L-cysteindesulhydrasová (Alvarez *et al.*, 2010).

DES1 se mimo jiné liší od ostatních členů OASTL rodiny v aminokyselinové sekvenci β 8A- β 9A smyčky, která je u ostatních OASTL proteinů vysoce konzervovaná, a která je velmi důležitá pro interakci se serinacetyltransferasou. To je v souladu s předpokladem, že hlavní funkcí DES1 není produkce cysteinu (Alvarez *et al.*, 2010), která je řízená tvorbou a rozpadem cysteinsynthasového komplexu (Wirtz a Hell, 2006). Na druhou stranu všechna rezidua zodpovědná za vazbu PLP jsou konzervovaná i u DES1, což je v souladu se zjištěním, že DES1 vyžaduje PLP jako kofaktor (Alvarez *et al.*, 2010).

Hypotézu, že hlavní funkcí DES1 je degradace cysteinu, a ne jeho tvorba, dále podporuje zjištění, že hodnota Michaelisovy konstanty K_M pro cystein u DES reakce ($0,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) je třináctkrát menší než hodnota K_M pro O-acetylserin u OASTL reakce. DES1 má proto mnohem větší afinitu k cysteinu. Limitní rychlost rozkladu L-cysteinu je však pouze přibližně $0,04 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Alvarez *et al.*, 2010).

Expresí genu pro DES1 je nejvýraznější v listech 14 dní starých semenáčků a 35 dní starých rostlin *Arabidopsis*, u kterých již byl ukončen proces kvetení. Nejnižší expresí byla naměřena u 20 dní starých rostlin, kdy byl již ukončen růst listové růžice a kdy ještě nebyly viditelné pupeny. Na úrovni pletiv byla expresí detekována v buňkách mezofylových i epidermálních, včetně buněk svěracích, v okolí pórů hydatod i uvnitř trichomů. U starších rostlin probíhá expresí nejen v listech, ale dokonce i v květech (Laureano-Marin *et al.*, 2014).

Nedávno byl poprvé izolován a sekvenován také gen pro DES1 z řepky (*Brassica napus*), (Xie *et al.*, 2013). Gen vykazuje homologii s *DES1* z *Arabidopsis*, 85,1 % nukleotidů v sekvenci je shodných. Kóduje polypeptid o velikosti 323 aminokyselin a hmotnosti 34,5 kDa. Autoři protein nazvali BnDES1 pro odlišení od L-cysteindesulhydrasy z *Arabidopsis*, která se nyní někdy označuje jako AtDES1. K nejvýraznější expresí *BnDES1* dochází v květech řepky, míra expresí ve vegetativních orgánech, včetně listů, byla několikrát nižší. Podobně jako v případě AtDES1 je vedlejší reakcí O-acetylserin(thiol)lyasová i u BnDES1. Hlavní reakcí je L-cysteindesulhydrasová, což dokazuje nárůst DES aktivity po purifikaci proteinu BnDES1 získaného expresí v *E. coli*. Zjištěné teplotní optimum bylo 37 °C (Xie *et al.*, 2013).

Nedávno byla popsána OASTL rodina proteinů u *Solanum lycopersicum*. Aktivita DES byla naměřena u 4 proteinů z rodiny OASTL (SIOAS4, SIOAS6, v menší míře SIOAS2 a SIOAS5), (Liu *et al.*, 2019).

pH optimum BnDES1 je 9,0 (Xie *et al.*, 2013), pH optimum DES1 v extraktech z rostlin *Nicotiana tabacum* je 8,0 (Harrington *et al.*, 1980). Nejsou žádné údaje o pH optimu DES1 v listech *A. thaliana*. Burandt a kolektiv (2002) však uvádí, že DES aktivita *Arabidopsis* narůstá s rostoucím pH až do hodnoty 10,0, přičemž pH optimum leží pravděpodobně nad touto hodnotou.

Mutace v *AtDES1* genu vede k předčasné senescenci listů (Obr. 5), která byla potvrzena i zvýšenou expresí genů zahrnutých v procesu stárnutí rostliny i zvýšenou hladinou souvisejících transkripčních faktorů. Absence DES1 vede ke značnému snížení celkové desulfurační aktivity v listech, což je spojené s nárůstem obsahu cysteinu (Alvarez *et al.*, 2010).



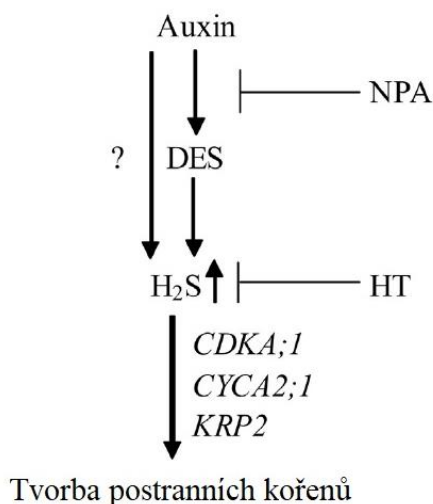
Obr. 5: Senescentní fenotyp u *des1* mutantů *A. thaliana* (ekotyp Columbia-0). Divoký a mutantní typ byly pěstovány vedle sebe v půdě po dobu 4 týdnů za podmínek dostatku živin a s fotoperiodou 16 h světlo/8 h tma (převzato z Romero *et al.*, 2014).

Deficience DES1 v *Arabidopsis* vede k akumulaci izoforem autophagy-related proteinů 8 (ATG8), což je v různých systémech znak aktivace autofágie. Sulfan jako signální molekula pravděpodobně slouží k regulaci autofágie, protože exogenní sulfan brání akumulaci ATG8 proteinů v *des1* mutantních rostlinách (Gotor *et al.*, 2013b).

DES1 je zahrnutá v signální dráze kyseliny abscisové ve svěracích buňkách, kde se podílí na řízení zavírání a otevírání průduchů na listech. Kyselina abscisová stimuluje expresi *DES1*. Vzhledem k tomu, že u *des1* mutantů došlo ke snížení hladiny oxidu

dusnatého řídicího zavírání průduchů, je DES1 pravděpodobně nutná pro jeho tvorbu (Scuffi *et al.*, 2014).

Vzhledem k tomu, že donor sulfanu NaHS podporuje tvorbu laterálních kořenů u semenáčků rajčat s nízkou hladinou auxinu, je možné, že má sulfan produkovaný DES1 úlohu i v signální dráze auxinu vedoucí k tvorbě postranních kořenů (Obr. 6), (Fang *et al.*, 2014).



Obr. 6: Signální dráha zahrnující auxin, DES a sulfan v průběhu tvorby postranních kořenů semenáčků rajčete. Dráha vede k regulaci proteinů účastnících se regulace buněčného cyklu (CDKA;1, CYCA2;1 a KRP2). Otazník naznačuje jiné možné dráhy vedoucí k endogennímu metabolismu sulfanu. HT (hypotaurin) je lapač sulfanu. NPA (N-1-naftylftalamová kyselina) je inhibitor bazipetálního efluxu auxinu (upraveno podle Fang *et al.*, 2014).

Ošetření gibereliny způsobuje pokles aktivity DES1 v aleuronové vrstvě pšenice. Programované buněčné smrti indukované gibereliny bylo zabráněno dodáním exogenního NaHS. Existuje tedy zřejmě souvislost mezi programovanou buněčnou smrtí navozenou fytohormony a metabolismem sulfanu v aleuronové vrstvě pšenice (Xie *et al.*, 2014).

Změny exprese a aktivity DES1, případně změny hladin substrátu a produktu tohoto enzymu, ke kterým dochází v průběhu biotického stresu, jsou předmětem následujících kapitol. DES1 se však účastní i odpovědi na mnoho abiotických stresových faktorů (Romero *et al.*, 2014). Prostřednictvím produkce sulfanu navyšuje toleranci k suchu (Jin *et al.*, 2013), k osmotickému stresu (Khan *et al.*, 2017) a k vysoké teplotě (Li a Gu, 2016). Naopak u *des1* mutantů se projevila vyšší odolnost ke kadmii, a to v důsledku vyššího obsahu cysteinu (Alvarez *et al.*, 2010), z něhož se mohou tvořit fytochelatiny chelatující tento těžký kov (Romero *et al.*, 2014). V některých případech je tedy žádoucí nárůst aktivity DES1, v jiných pokles, neboť v navyšování tolerance může hrát roli sulfan se

svými signálními funkcemi nebo cystein jako prekurzor fytochelatinů a jiných látek podílejících se na vzniku odolnosti k abiotickému stresu. V mnoha procesech sulfan působí společně s dalšími signálními molekulami, jako je oxid dusnatý (Scuffi *et al.*, 2014, Khan *et al.*, 2017), oxid uhelnatý (Li a Gu, 2016) nebo peroxid vodíku (Hancock *et al.*, 2014).

Stojí za zmínku, že D-cysteindesulfhydrasa (EC 4.4.1.15), která specificky využívá D-cystein jako substrát a která katalyzuje vznik stejných produktů jako DES1, je úplně odlišný enzym z hlediska struktury i některých biochemických parametrů. D-cysteindesulfhydrasová aktivita byla objevena v mnoha rostlinných druzích. V *Arabidopsis* byly nalezeny dva geny kódující proteiny vykazující tuto aktivitu, At3g26115 a At1g48420 (Rennenberg *et al.*, 1987; Papenbrock *et al.*, 2007). Funkce D-cysteinu, stejně jako D-enantiomerů většiny ostatních aminokyselin, není dosud známá. Volné D-aminokyseliny v zastoupení 0,5 – 3 % vzhledem k jejich L-formám jsou však přirozenou součástí rostlin. Jednou z funkcí D-cysteindesulfhydrasy může být detoxifikace malforminu, fytotoxického peptidu, který je produkován *Aspergillus niger*, a jehož součástí je právě D-cystein (Riemenschneider *et al.*, 2005).

Tvorbu sulfanu může katalyzovat i cytosolární L-cysteindesulfurasa (EC 2.8.1.7.), pokud využívá L-cystein methylester jako substrát (Heidenreich *et al.*, 2005). Hlavní funkcí L-cysteindesulfuras je katalýza desulfurace L-cysteinu za vzniku alaninu a elementární síry. Proteiny vykazující L-cysteindesulfurasovou aktivitu byly nalezeny v cytosolu, mitochondriích i chloroplastech a jejich hlavní úlohou je zřejmě poskytování elementární síry pro tvorbu biotinu, thiaminu a Fe-S klastrů (Van Hoewyk *et al.*, 2008).

L-cysteindesulfhydrasa nebyla charakterizována u živočišných organismů, kde produkci sulfanu katalyzuje cystathionin- γ -lyasa a cystathionin- β -synthasa (Romero *et al.*, 2013). L-cysteindesulfhydrasa však byla popsána u bakterií, například u *Escherichia coli* (Metaxas a Delwiche, 1955).

2.4 L-cysteindesulfhydrasa a biotický stres

2.4.1 Úvod do imunity rostlin

Rostliny jsou neustále vystavovány útokům velkého množství různých patogenů a herbivorů (býložravců). Pouze malá část patogenů je však schopna proniknout do rostliny a využít ji jako zdroj energie, protože rostliny jsou vůči většině patogenů rezistentní (Alvarez *et al.*, 2012). Objevení mechanismů působení L-cysteinu a sulfanu a následné

objasnění úlohy DES1 v rostlinných odpovědích na biotický stres bude nerozlučně spjata s podrobnějším výzkumem dějů, na kterých je založena rostlinná imunita.

Při obraně rostliny vůči fytopatogenům jsou rostlinou využívány dva typy imunity. Prvním typem je imunita spouštěná molekulárními vzory asociovanými s patogeny (pathogen-associated molecular patterns-triggered immunity, PTI), která je aktivována vazbou určitých vzorových molekul nacházejících se u patogenů (tzv. PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) na tzv. PRR receptory (pattern recognition receptors, „receptory rozpoznávající vzory“), jež se vyskytují na povrchu rostlinných buněk. PAMPs jsou většinou konzervované molekuly mikrobů, jejichž struktura se v průběhu evoluce výrazně nezměnila, například bakteriální flagelin nebo elongační faktor Tu. Většinou se jedná o látky nezbytné pro přežití mikrobů. PTI zahrnuje některé rané odpovědi rostliny na přítomnost patogena, jako je uzavírání stomat, aktivace mitogen-activated proteinkinasové kaskády (MAPK), aktivace exprese genů se vztahem k rezistenci, produkce ROS a ukládání kalosy (Hou *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2017).

PTI mohou díky interakci s PRR indukovat také tzv. DAMPs (damage-associated molecular patterns), což jsou látky původem z hostitele, které vznikají jako produkty rozkladu, jenž nastává v průběhu infekce či zranění rostliny (Miller *et al.*, 2017).

Druhým typem je imunita spouštěná efektor (effector-triggered immunity; ETI), která je iniciována specifickým rozpoznáním patogenních sekretovaných efektorů typu III (T3SEs) rostlinnými intracelulárními rezistenčními proteiny (R-proteiny). Odpověď rostliny uskutečněná v rámci efektoru spuštěné imunity je podstatně účinnější a specifitější než odpověď, která nastává při patogenem spuštěné imunitě. V současné době se předpokládá, že se ETI vyvinula z PTI, přičemž podnětem pro tuto evoluci rostlinné imunity byly molekuly T3SE. Patogeny proliferují v mezibuněčném prostoru rostlin (v apoplastu) a získávají z rostlinných buněk živiny. Přitom uvolňují do rostlinných buněk T3SE, které jsou zodpovědné za patogenezi těchto nežádoucích organismů, neboť narušují normální fyziologické a biochemické procesy u rostlin. Hlavním znakem ETI je hypersenzitivní odpověď spojená s programovanou buněčnou smrtí, která má především zabránit šíření biotrofních patogenů. Hypersenzitivní odpověď je spojená s mnohem výraznější tvorbou ROS, než je tomu v případě PTI (Hou *et al.*, 2011; Alvarez *et al.*, 2012).

ETI nastává poté, co produkty patogenních genů avirulence (Avr geny) suprimují PTI signální odpovědi a vyvolají efektoru spuštěnou susceptibilitu neboli náchylnost (ETS;

effector-triggered susceptibility). Jakmile dojde k aktivaci R-proteinů těmito molekulami (konkrétně T3SE), může dojít k iniciaci ETI (Miller *et al.*, 2017).

2.4.2 Sírou indukovaná rezistence

Až do 70. let 20. století byla síra v atmosféře vnímána téměř výhradně jako polutant a hlavní příčina kyselých dešťů způsobujících úhyn mnoha stromů a následné zničení lesů. Jakmile na počátku 80. let vstoupily v platnost zákony o čistotě ovzduší (Clean Air Acts), kontaminace ovzduší oxidem siřičitým začala být průběžně odstraňována. Síra se postupně měnila z nechtěného polutantu na chybějící nutrient rostlin v zemědělství, protože pole přestala být nepřímo hnojena prostřednictvím průmyslového znečištění (Bloem *et al.*, 2015; McGrath *et al.*, 1996). Deficit síry byl poprvé pozorován u brukvovitých plodin (*Brassicaceae*), které požadují velké množství síry pro tvorbu různých sekundárních metabolitů obsahujících síru, jako jsou glukosinoláty (Bloem *et al.*, 2015). Ve Skotsku obsah síry klesal ještě rychleji než v kontinentální Evropě. Došlo zde na počátku 90. let ke značnému nárůstu četnosti napadení řepky olejky houbovým patogenem *Pyrenopeziza brassicae* a koncept sírou indukované rezistence (SIR) byl navržen po odhalení vztahu mezi obsahem síry a výskytem onemocnění (Schnug *et al.*, 1995).

Za podmínek terénního výzkumu je velmi obtížné odlišit SIR od ostatních obranných mechanismů, které jsou aktivovány po fungálním napadení. Stejně tak je obtížné zjistit, jestli SIR vznikla následkem napadení houbou nebo v důsledku působení jiných stresových faktorů. Nicméně pochopení mechanismů, jež SIR způsobují, je nezbytné k tomu, aby bylo možno tyto mechanismy indukovat v přirozeném prostředí těchto rostlin, a tím pádem navýšit odolnost rostliny a omezit používání škodlivých pesticidů v zemědělství (Bloem *et al.*, 2007).

Mezi sirné sloučeniny, které se účastní odpovědi na fungální infekci nebo které se podílí na vzniku rezistence vůči stresu, patří kromě cysteinu (Alvarez *et al.*, 2012) i mnoho dalších sloučenin obsahujících síru. Během houbové infekce vzrůstá uvolňování sulfanu a sulfidu karbonylu do okolního prostředí v plynné podobě (Bloem *et al.*, 2007). Po napadení houbovým patogenem rapidně vzrůstá hladina glutathionu, který slouží především jako antioxidační ochrana (Leustek *et al.*, 2000; Bloem *et al.*, 2015). Proteiny bohaté na síru (například thioniny) narušují strukturu buněčné stěny patogena a tvoří iontové kanály v jejich membráně (Hughes *et al.*, 2000). Po napadení patogeny jsou *de novo* syntetizovány také fytoalexiny (Kuc, 1994). Isothiokyanáty, degradační produkty

glukosinolátů, vykazují toxický a repelentní účinek (Wallsgrove *et al.*, 1999). Síra v oxidačním stavu 0 je během fungální infekce hromaděna ve vaskulárních pletivech a způsobuje oxidaci sulfhydrylových skupin a narušuje respirační řetězec (Williams *et al.*, 2002; Bloem *et al.*, 2015).

Můžeme předpokládat, že cystein a glutathion jsou nejdůležitějšími prekurzory pro všechny sloučeniny obsahující síru (Bloem *et al.*, 2007). Navíc se mnohdy podílí i na regulaci jejich hladiny nebo aktivity. Například syntéza některých fytoalexinů je za určitých podmínek indukována cysteinem, který slouží jako prekurzor kamalexinu v *A. thaliana* (Zook a Hammerschmidt, 1997). Stejně významnou roli v SIR hraje i sulfan, který vedle svého toxického působení slouží i jako signální molekula (Calderwood a Kopriva, 2014). Změny hladiny cysteinu a sulfanu jsou řízeny především změnami množství a aktivit OASTL a DES1, které spolu kooperují (Bloem *et al.*, 2004).

2.4.3 Zkoumání fungicidního působení síry

Různé výzkumy prokázaly, že hnojení sírou může zvýšit rezistenci zemědělských plodin k houbovým patogenům. Navzdory dlouhodobému používání elementární síry jako fungicidu přesný mechanismus toxického působení není znám.

Jeden z navrhovaných mechanismů předpokládal vstup elementární síry jakožto lipofilní látky přes buněčné stěny do buněk hub, kde je síra redukována na sulfan narušující redoxní reakce zahrnuté v metabolismu patogena. Předpokládá se, že redukcí způsobují sulfhydrylové skupiny přítomných proteinů zapojených do buněčného metabolismu patogenů (Beffa, 1993). Síra by mohla rovněž sloužit jako akceptor elektronů v dýchacím řetězci (Tweedy *et al.*, 1981). Vzhledem k tomu, že zvyšující se koncentrace elementární síry dodávané sporám *Plasmopara viticola* vedla k dramatickému nárůstu oxidovaného glutathionu, je fungicidní působení elementární síry pravděpodobně vztaženo spíše k oxidaci důležitých sulfhydrylových skupin než ke kompetici síry s kyslíkem na úrovni respiračního řetězce (Beffa, 1993; Bloem *et al.*, 2007).

Na počátku 21. století bylo provedeno mnoho experimentů za účelem prověření vztahu celkového obsahu síry v různých rostlinách k rezistenci vůči různým, především houbovým patogenům. Wang a kolektiv (2003) například testovali odolnost pšenice k houbám rodu *Rhizoctonia*, řepky olejky (*Brassica napus*) ke *Sclerotinia sclerotiorum*, kukuřice k *Bipolaris maydis* a bavlny k *Verticillium dahliae*. Ve všech těchto případech rezistence s rostoucím obsahem síry v rostlině rostla. V některých případech byl stanoven

obsah síry v půdě, kterému odpovídala maximální odolnost rostliny proti daným patogenům. Například pro kukuřici ve vztahu k *Bipolaris maydis* je to 30 mg síry na 1 kg půdy, v jiných případech to bylo až čtyřikrát více (Wang *et al.*, 2003).

Podle Salaca a kolektivu (2005) nemá dodávání síry žádný vliv na incidenci a závažnost onemocnění řepky olejky v důsledku napadení *P. brassicae*. To může indikovat časový nesoulad mezi hnojením sírou a jejím vstřebáním rostlinou. Pro získání požadovaného efektu bylo doporučeno provádět pravidelnou fertilizaci v průběhu celého období růstu rostlin. Autoři však potvrdili větší nárůst obsahu cysteinu i glutathionu u infikovaných listových disků v porovnání s neinfikovanými.

Mají-li infikované rostliny celkový obsah síry nižší, než je optimální, je více síry vázáno v cysteinu a v GSH v neinfikovaných pletivech. Předpokládá se, že v infikovaných pletivech jsou tyto metabolity využity na tvorbu látek za účelem obrany vůči patogenům, proto je jejich obsah v těchto místech nižší. Druhým možným vysvětlením je, že již byla pletiva následkem infekce zničena, což způsobilo posun od dějů anabolických ke katabolickým (Salac *et al.*, 2005).

2.4.4 Uvolňování sulfanu z rostlin v průběhu napadení patogenem

Sulfan, produkt reakce katalyzované DES1, hraje pravděpodobně během ochrany rostlin proti patogenům důležitou roli, protože byly již mnohokrát pozorovány změny v jeho produkovaném množství v průběhu infekce. Infekce řepky olejky houbovým patogenem *Pyrenopeziza brassicae* navýšila obsah cysteinu a glutathionu, především v listech patogenem nejvíce poškozených, stejně tak navýšila i aktivitu DES1, a to až o 50 % oproti neinfikovaným rostlinám. U řepky došlo také díky hnojení sirnými sloučeninami k navýšení celkového obsahu síry, síranu, L-cysteinu, glutathionu a dalších organických sloučenin s obsahem síry, došlo však ke snížení aktivity DES1. Vyšší příjem síry rostlinou rozhodně nemusí vždy vyvolávat zvýšené uvolňování sulfanu (Bloem *et al.*, 2004).

Zemědělské plodiny jsou tedy schopné reagovat na houbovou infekci zvýšením potenciálu na uvolňování sulfanu, což se projevuje vzrůstem aktivity DES1, a to až na 150 % normální hodnoty. Dochází i k mírnému navýšení aktivity OASTL. Předpokládalo se, že toto navýšení nepředstavuje odpověď enzymu na přítomnost patogenu, ale o odpověď na zvýšené odbourávání cysteinu pomocí DES1, neboť cystein je produkt katalytické činnosti OASTL (Bloem *et al.*, 2004). Novější výzkumy naznačují, že i změny aktivity OASTL mohou být vyvolány přímo napadením rostliny patogenem (Alvarez *et al.*, 2012).

Jestliže mají být aktivity OASTL i DES1 vyšší v rostlinách, které síru postrádají, můžeme konstatovat, že za podmínek deficiencie síry je aktivován metabolismus síry a zúčastněné enzymy jsou upregulovány. Jsou dvě možná vysvětlení. Prvním je, že deficientní rostliny jsou citlivější vůči houbovým onemocněním, takže aktivují metabolické dráhy zapojené v ochraně rostlin. Druhou možností je, že deficientní rostliny již jsou napadené houbami a mechanismy sírou indukované rezistence už byly aktivovány. Uvolňování sulfanu může být proto prevencí vůči fungální infekci, odpovědí na fungální infekci nebo obojím současně (Bloem *et al.*, 2004).

Množství uvolňovaného sulfanu během fungální infekce bylo zjišťováno u révy vinné (*Vitis vinifera*) infikované padlím révovým (*Uncinula necator*). K vyšším emisím došlo v průběhu prvního stádia infekce, kdy ještě žádné symptomy nebyly pozorovatelné, emise drasticky poklesly po 10 dnech od začátku infekce. Aplikace síry nevedla ke zvýšení množství uvolněného sulfanu v první fázi infekce, avšak způsobila celkově vyšší potenciál rostliny k uvolňování sulfanu v průběhu celé periody sledování (Bloem *et al.*, 2007). Kruse a kolektiv (2007) uvádí, že v průběhu počáteční fáze patogeneze dochází k nárůstu nejen hladiny sulfanu, ale také cysteinu, glutathionu a fytoalexinů.

Kassemeyer (2003) pozoroval, že aplikace elementární síry byla proti patogenu *Uncinula necator* nejefektivnější, pokud proběhla ve velmi raných stádiích infekce, a to před penetrací fungálního apresoria. Uvolnění sulfanu v těchto časných fázích infekce může přispět k zabránění jejímu rozšíření.

Rostliny s nedostatkem síry jsou schopné přijímat z okolního prostředí i plynný sulfan, kdežto k uvolňování sulfanu dochází, jsou-li hnojeny sirnými sloučeninami. Rostliny také přijímají plynný sulfid karbonylu (COS) z atmosféry, kde je obvykle přítomen v koncentraci přibližně 500 ppm. Po napadení patogenem (např. *S. sclerotiorum*) je COS rostlinami naopak uvolňován. Čím silnější je napadení rostliny, tím více COS se uvolní. Zajímavé je, že infekce *S. sclerotiorum* vedla k poklesu celkového obsahu síry v období prodlužování stonku, kdy ke zvýšení koncentrace došlo pouze u GSH (Bloem *et al.*, 2012).

V období kvetení byly reakce rostliny na infekci pomalejší, déle trvalo, než se projeví makroskopické symptomy a závažnost onemocnění byla podstatně menší. Emise sulfanu a sulfidu karbonylu byla nižší a k maximu jejich uvolňování došlo později. Celkový obsah síry vzrostl. Dá se tedy shrnout, že v průběhu vegetativní fáze růstu je emise sulfanu a COS vztažena k metabolismu síry v listech a zvýšené uvolňování plynných sloučenin se sírou způsobuje pokles obsahu síry v rostlině, zatímco

v generativní fázi aktivace metabolismu síry vede k akumulaci síry v rostlině (Bloem *et al.*, 2012).

Ačkoli celkové množství detekovaného sulfanu uvolňovaného z napadené rostliny neodpovídá množství, které by bylo schopno zahubit daného patogena, je pravděpodobné, že na místech, kde patogen přímo působí, je koncentrováno větší množství uvolňovaného sulfanu, které již dostačující je. Kromě toho smyslem uvolňování sulfanu z rostlinných buněk není pouze toxické působení na patogeny, protože sulfan rovněž slouží jako signální molekula přenášející sousedícím rostlinám informaci o napadení. Tato představa koresponduje se zjištěním, že v neinfikovaných rostlinách rostoucích v blízkosti rostlin infikovaných došlo k výrazným změnám v obsahu thiolových sloučenin v porovnání s kontrolními rostlinami, které byly pěstovány odděleně (Bloem *et al.*, 2012).

2.4.5 Mechanismy působení sulfanu

Aktivní forma sulfanu v biologických systémech doposud nebyla specifikována, proto se sulfanem myslí jak nedisociovaný plynný sulfan (H_2S), tak i hydrogensulfidový anion (HS^-). Pro anion můžeme používat i název hydrogensulfid (Scuffi *et al.*, 2014).

Množství sulfanu produkované rostlinami, které použijeme přímo na hubení patogenních hub, obvykle zdaleka není dostačující (Bloem *et al.*, 2007). Fumigační experimenty prokázaly, že i poměrně vysoké koncentrace sulfanu ($20 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$) zredukovaly rychlost růstu bakterie *Rhizoctonia solani* pouze o 17 %, dokonce v případě delšího trvání fumigace byl růst bakteriálních kolonií naopak podpořen (Yang *et al.*, 2006). Nicméně jiné výsledky ukazují, že rostliny jsou schopné zpomalit růst hub produkováním většího množství sulfanu na povrchu listů nebo přímo v místě infekce. Například u *A. thaliana* byly v mezofylu listů naměřeny koncentrace sulfanu v rozmezí $4\text{-}10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Riemenschneider, 2006). Zatím však není jistě prokázáno, zda dochází k uvolňování sulfanu za účelem hubení patogenů nebo zda má sulfan primárně jinou úlohu a jeho případné toxické působení na houby je jen vedlejším jevem.

Jedna z nevyřešených otázek souvisí se schopností sulfanu pronikat do buněk patogenů. Směr transportu může být dán různými hodnotami pH v různých buněčných kompartmentech. Volné difúze přes membrány je schopen pouze sulfan v podobě nedisociované molekuly H_2S . Při pH 7, které panuje v mitochondriích, je 50 % sulfidu přítomno jako H_2S , zbytek jako HS^- (Papenbrock *et al.*, 2007). Naproti tomu v chloroplastech při pH 8,4 je pouze 5 % sulfidu ve formě H_2S , zbytek ve formě HS^- , který membránou neprochází. Z chloroplastů do cytosolu však může být sulfan přenášen

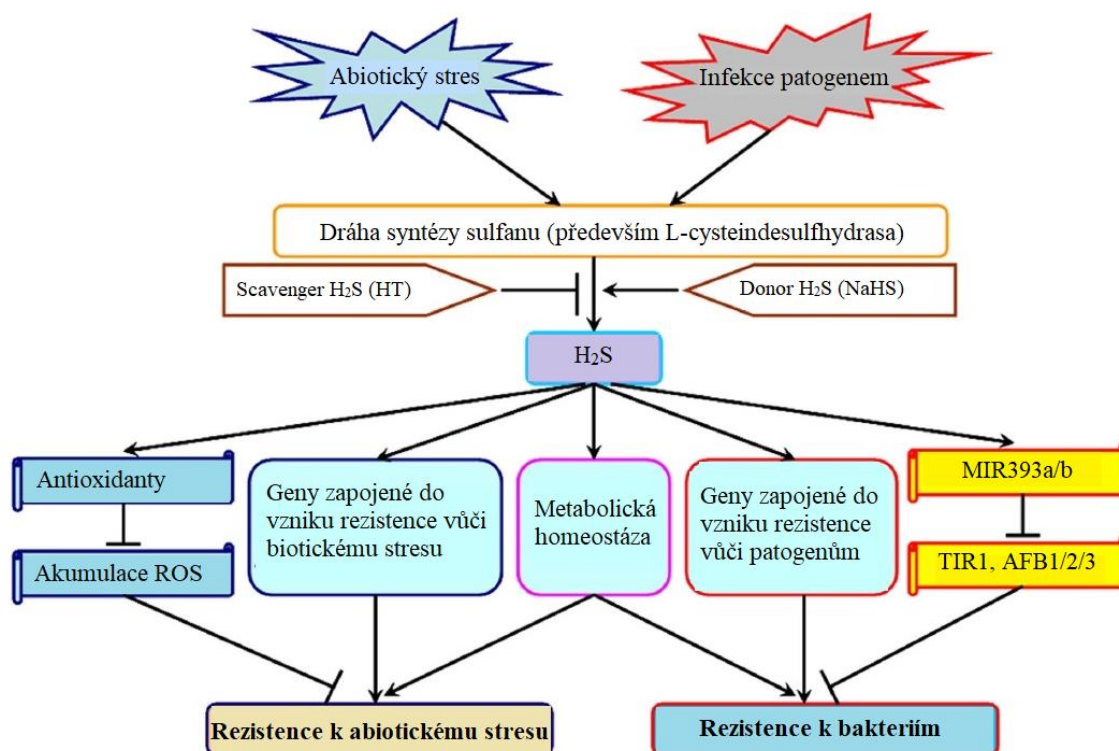
řízeným transportem s využitím transportérů. V cytosolu při pH 7,4 je 75 % sulfidu ve formě aniontu HS^- , který může být s využitím transportérů transportován do apoplastu (Papenbrock *et al.*, 2007). Transportéry HS^- v rostlinných membránách dosud nebyly charakterizovány (Calderwood a Kopriva, 2014). Bylo publikováno, že pH apoplastu v průběhu interakcí rostliny s patogenem roste (Geilfus *et al.*, 2017). Rovnováha sulfidu v apoplastu by tak měla být posunována na stranu k HS^- , který již zpátky do cytosolu buněk rostlin přes membránu nepronikne. Otázkou je, jak se dostane do buněk patogenů, popřípadě jaký jiný mechanismus toxického působení sulfanu na patogeny zde může probíhat.

Již delší dobu se předpokládá, že vyšší koncentrace sulfanu mohou vznikat pouze lokálně v místě ataku bakteriálního či houbového patogena (Papenbrock *et al.*, 2007). V tomto místě může uvolňování sulfanu zabraňovat klíčení spor nebo zastavovat růst houbových hyf. Prostřednictvím vysokého redukčního potenciálu může sulfan například indukovat tvorbu ROS, jež by vykazovaly přímý toxický účinek na růst fytopatogenních mikroorganismů. Díky schopnosti prostupovat membránami může sulfan fungovat jako signální molekula spouštějící kaskády obranných mechanismů. Je také možné, že je sulfan produkovaný cysteindesulfhydrasami přímo oxidován v přítomnosti akceptoru elektronů nebo za katalytického působení superoxididismutasy na síru, která působí toxicky již v nižších množstvích než samotný sulfan (Papenbrock *et al.*, 2007; Bloem *et al.*, 2015).

Jedna z možných signálních drah sulfanu zapojených v odpovědi rostlin na biotický stres je tvorba persulfidovaných proteinů. Jedná se o proces posttranslační modifikace proteinů, tzv. persulfidace (neboli *S*-sulfhydratace), který spočívá v modifikaci thiolových skupin proteinových cysteinů sulfanem za tvorby skupiny -SSH. V důsledku persulfidace dochází ke změnám aktivity modifikovaných proteinů (Aroca *et al.*, 2017). Mezi proteiny, jejichž persulfidační úroveň byla pozměněna v *des1* mutantních rostlinách, patří proteiny zahrnuté v intracelulárních signálních procesech, například SNF1-related protein kinase 2.2, jež hraje nezbytnou roli v procesu uzavírání průduchů regulovaného kyselinou abscisovou. Kromě toho byla detekována i persulfidace receptorů pro kyselinu abscisovou (Aroca *et al.*, 2017). Účast sulfanu v signálních drahách regulujících uzavírání stomat je již zkoumána delší dobu (Garcia-Mata a Lamattina, 2010). Kyselina abscisová neindukuje uzavírání průduchů v izolovaných epidermálních stripech *des1* mutantů, avšak tento děj může být obnoven aplikací exogenního sulfanu (Aroca *et al.*, 2017).

2.4.6 Studium role cysteindesulhydras v signálních drahách sulfanu ve stresových odpovědích rostlin

Pro zjištění, jak sulfan reguluje rezistenci vůči biotickému stresu i toleranci ke stresu abiotickému (Obr. 7), byly použity transgenní rostliny *A. thaliana* s modulovanou expresí dvou genů cysteindesulhydras (Shi *et al.*, 2015).



Obr. 7: Úloha H₂S v odpovědích na biotický a abiotický stres u *A. thaliana*. MIR393a/b je microRNA regulující receptory auxinu. TIR1 (transport inhibitor response 1) a AFB1/2/3 (auxin signaling F-box proteiny) jsou proteiny zapojené v signální dráze auxinu (upraveno podle Shi *et al.*, 2015).

Bylo zjištěno, že hladina transkriptu pro DES1 i pro D-cysteindesulhydrasu (EC 4.4.1.15), která je schopna analogickým způsobem odbourávat D-cystein, vzrůstá v buňkách *Arabidopsis* po aplikaci mnoha různých stresujících činitelů. Testován byl účinek chladu, dehydratace, vysoké koncentrace soli (v podobě NaCl), peroxidu vodíku, bakteriálních patogenů a kyseliny abscisové. Pouze kyselina abscisová neměla žádný efekt na množství transkriptu pro D-cysteindesulhydrasu. V případě abiotických stresujících činitelů vzrůstá koncentrace mRNA pro oba tyto enzymy i po třetí hodině působení, v případě infekce patogenem se hladina mRNA pro DES1 zvyšuje mezi první a třetí hodinou, mezi třetí a šestou hodinou opět klesá. Nejvyšší naměřené množství transkriptu však bylo podstatně vyšší než při působení abiotických stresových činitelů. Ve většině případů vzrostly i aktivity obou enzymů (Shi *et al.*, 2015).

Prostřednictvím kvantifikace množství bakterií *Pseudomonas syringae* pv. tomatu DC3000 (*Pst* DC3000) v listech *Arabidopsis* infikovaných tímto patogenem bylo zjištěno, že rostliny nadexprimující cysteindesulhydrasy obsahují nižší počet bakterií než divoký typ, zatímco u jedinců, v nichž byla exprese genů pro tyto enzymy snížena (tzv. knockdown jedinci), došlo k opačnému jevu. U rostlin ošetřených hydrogensulfidem sodným (NaHS), který slouží jako donor sulfanu, navíc došlo k posílení obranných mechanismů, zatímco u rostlin ošetřených lapačem sulfanu hypotaurinem, došlo k oslabení obranných mechanismů. Hladina transkriptů pro několik různých PR proteinů (pathogenesis-related proteinů) byla vyšší u rostlin nadexprimujících desulhydrasy a rostlin ošetřených NaHS, ale byla nižší u knockdown jedinců a rostlin ošetřených hypotaurinem. Tyto výsledky naznačují, že exprese cysteindesulhydras a tvorba sulfanu reguluje mechanismy vzniku rezistence vůči *Pseudomonas*. Děje se tak zřejmě prostřednictvím kyseliny salicylové, signální molekuly, která spouští expresi klíčových genů zahrnutých v imunitě rostlin (Shi *et al.*, 2015).

2.4.7 Role cysteinu v imunitě rostlin

Alvarez a kolektiv (2012) zjistili, že *des1* mutanty *Arabidopsis* jsou více rezistentní k biotrofním i nekrotrofním patogenům, zatímco *oas-1* mutanty jsou k patogenům naopak citlivější. Zvýšený obsah cysteinu v cytosolu je spojen se zvýšenou rezistencí rostliny vůči patogenům, zatímco snížený obsah cysteinu v tomto oddíle je spojen se sníženou rezistencí. U *des1* mutantů byla zjištěná zvýšená hladina kyseliny salicylové, která slouží jako signální látka přenášející signál o napadení rostliny patogenem z infikovaných pletiv do dosud nenapadených částí rostlin. Transkriptomická analýza navíc u *des1* mutantů prokázala indukci čtyř PR proteinů, například defensinů PDF1-2a a PDF1-2b ((Alvarez *et al.*, 2012; Lopez-Martin *et al.*, 2008).

U *des1* mutantů došlo také ke zvýšení transkripce proteinu WRKY54, který slouží jako transkripční faktor ovlivňující expresi genů pro PR proteiny. U *oas-1* mutantů byla hladina kyseliny salicylové i míra transkripce genů pro uvedené PR proteiny podobná jako u wild-type rostlin, avšak transkripce WRKY54, stejně jako jiných členů rodiny transkripčních faktorů WRKY, byla snížena (Alvarez *et al.*, 2012; Lopez-Martin *et al.*, 2008).

Protože *oas-1* mutanti vykazují sníženou hladinu cysteinu i glutathionu, bylo souběžně analyzováno chování *cad2-1* mutantů, pro něž je typické 70% snížení hladiny glutathionu a současně nezměněná hladina cysteinu. Vzhledem k tomu, že WRKY54

u těchto mutantů reprimován nebyl, je pravděpodobné, že inhibice tvorby tohoto transkripčního faktoru, a tím pádem i inhibice exprese uvedených PR proteinů, je způsobená poklesem obsahu cytosolického cysteinu (Alvarez *et al.*, 2012).

Zatímco stupeň oxidace glutathionu byl u *des1* mutantů mírně nižší, výrazně vyšší byl u *oas-1* mutantů. Vzhledem k tomu, že snížený redoxní potenciál buněk odpovídá vyšší odolnosti rostlin vůči patogenům, podporují výsledky těchto měření hypotézu, že vyšší hladina cysteinu v buňkách zvyšuje jejich odolnost vůči biotickému stresu (Lopez-Martin *et al.*, 2008).

Oas-1 mutant postrádá projevy hypersenzitivní odpovědi asociované s ETI, což značí, že je cytosolární cystein vyžadován pro hypersenzitivní odpověď při inkompatibilní interakci. Příklad cysteinu vede ke zvýšení iontového toku u wild-type i *oas-1* jedinců, zatímco přídavek glutathionu tok iontů neovlivnil (Alvarez *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2014).

Bylo identifikováno již velké množství genů pro WRKY proteiny, jejichž míra exprese je změněna po infekci patogenem i po ošetření kyselinou salicylovou (Dong *et al.*, 2003). Stojí za zmínku, že do rodiny transkripčních faktorů WRKY patří i proteiny vázající se na promotory cysteindesulfhydras a ovlivňující tak jejich expresi (Liu *et al.*, 2015).

Ošetření semenáčků kukuřice kyselinou salicylovou zvyšuje aktivitu DES1, což následně vede k akumulaci sulfanu, který zvyšuje toleranci k vysokým teplotám (Li, 2015). Donor sulfanu NaHS rovněž navyšuje toleranci indukovanou kyselinou salicylovou, ačkoliv nemá vliv na akumulaci kyseliny salicylové ani na enzymy, které katalyzují její syntézu (Li, 2015).

Výše uvedené poznatky naznačují pravděpodobné funkční začlenění DES1 do signálních drah vedoucích od kyseliny salicylové, která je významným fytohormonem nejen z hlediska odpovědi rostlin na stres, ale také z hlediska normálního růstu a vývoje rostlin (Dong *et al.*, 2003).

Tahir a kolektiv (2013) potvrdili existenci interakce mezi OAS-A1 a složkami rostlinné imunity, která zdůrazňuje roli metabolismu cysteinu v imunitě rostlin. Byla zkoumána souvislost mezi jednonukleotidovou substitucí v genu pro OAS-A1, která způsobuje předčasnou senescenci rostlin *A. thaliana* v podobě žloutnutí listů, a změnami odolnosti rostlin k infekci patogeny. Například kamalexin, který patří do skupiny fytoalexinů a který je u *A. thaliana* syntetizován *de novo* obzvláště při infekci patogenem, byl u *oas-1* mutantů akumulován i v nepřítomnosti infekce. Souběžně došlo ke vzrůstu hladiny kyseliny salicylové. Tyto projevy naznačují vztah OAS-A1 k imunitě rostlin.

Pro ověření hypotézy byly mutantní rostliny vystaveny bakteriálnímu patogenu *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst* DC3000), který způsobuje ETS tím, že uvolňuje efektorové molekuly tlumící PTI. Rostliny *Arabidopsis* navíc nejsou schopny iniciovat ETI proti tomuto patogenu, takže se tento patogen chová jako virulentní. Mutanty postrádající funkční OAS-A1 protein vykazovali větší náchylnost k infekci tímto patogenem než wild-type rostliny (Tahir *et al.*, 2013). Výsledky jsou v souladu se zjištěním, že *oas-1* mutant, který je funkčně identický s mutantem použitým v tomto výzkumu, projevuje náchylnost k onemocněním a také narušenou ETI odpověď (Alvarez *et al.*, 2012).

V polních a terénních podmínkách ovlivňuje rostliny mnoho biotických i abiotických faktorů, takže efekt jakéhokoliv způsobu ošetření rostliny sírou může být překrytý těmito faktory. Kromě toho i načasování odběru vzorků ve vztahu k fungálnímu napadení je zcela klíčové pro jakékoliv analýzy (Bloem *et al.*, 2007). Williams a kolektiv (2002) pozorovali vzrůst obsahu glutathionu v různých pletivech rajčat do čtrnáctého dne po inokulaci patogenem *Verticilium dahliae*, poté došlo k poklesu obsahu. Naproti tomu Kuzniak a Sklodowska (2005) pozorovali výrazný pokles obsahu glutathionu v rajčatech infikovaných *Botrytis cinerea* hned první den po infekci. Hladina GSH v rostlinách je velmi dynamická a závisí na mnoha okolnostech, jako je teplota a obsah síry, což činí interpretaci změn obsahu GSH v zemědělských plodinách ve vztahu k infekci patogenem velmi složitou. Totéž platí pro cystein a otázkou zatím zůstává, zda je cystein sám o sobě složkou zapojenou v rezistenci vůči stresu nebo zda-li jeho význam v těchto ohledech je dána pouze tím, že je prekurzorem pro GSH a další látky (Bloem *et al.*, 2007).

Závěrem je nutné podotknout, že precizní regulace homeostázy cysteinu v cytosolu činností enzymů OAS-A1 a DES1 je nezbytná pro metabolismus rostlin a odpovědi na stres. Kromě toho vnitřní faktory, jako je vývojové stadium rostliny, a environmentální faktory, jako je biotický a abiotický stres, ovlivňují poměr cysteinu k hydrogensulfidu prostřednictvím modulací aktivit těchto dvou enzymů (Romero *et al.*, 2014).

3 Praktická část

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Acros Organics (Belgie): chlorid železitý hexahydrát

Applichem (Česká republika): dodecylsírán sodný (SDS)

Duchefa Biochemie (Nizozemí): dithiothreitol (DTT); Murashige and Skoog medium (including vitamins)

Fluka Chemika (Švýcarsko): Evansova modř

Lachema (Česká republika): glycin

Lach-Ner (Česká republika): kyselina chlorovodíková

Serva (Německo): fluorescein diacetát; Triton X-100

Sigma-Aldrich (Německo): 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D); aceton; biotin; bovinní sérový albumin; Coomassie Blue G250; hydrogensulfid sodný; kinetin; kyselina folová; L-cystein hydrochlorid; MES hydrát; N,N-dimethyl-p-fenylendiamin dihydrochlorid; pantothenát vápenatý; pyridoxal-5'-fosfát monohydrát; tris(hydroxymethyl)methylamin

3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy Denver Summit (Denver Instrument, USA); analytické váhy 440-35N (Kern, Německo); analytické váhy (Radwag, Česká republika); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); centrifuga 5415-R (Eppendorf, Německo); inkubátor: Incubator-Shaker Series (Innova 42, USA); inkubátor: Orbital Shaker – Incubator ES-20 (Biosan, Litva); laminární box Biohazard Bioban 48 (Vetrotecnica, Itálie); magnetická míchačka s ohřevem Intelli-Stirrer MSH-300i (Biosan, Litva); mikrodestičky černé 96F (Eppendorf, Německo); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový reader Synergy H1 (BioTech, Česká republika); mikrodestičkový reader Synergy HT (BioTech, Česká republika); termostat CH-100 (Biosan, Litva); třepačka: Multifunctional-orbital shaker PSU-20i (Biosan, Litva); pH metr 50+ DHS (Verkon, Česká republika); vakuová vývěva D-lab (Edwards, USA); vortex V-1 plus (Biosan, Litva);

3.1.3 Programy

Gen5 Data Analysis Software; BioTek

3.1.4 Roztoky

Bradfordovo činidlo pro stanovení celkových proteinů

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomassie Blue G250 ve 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Byl doplněn deionizovanou vodou na 100 ml. Výsledný roztok byl uskladněn ve tmě při 4 °C. Pracovní roztok Bradfordova činidla byl před vlastním měřením připravován naředěním zásobního roztoku Coomassie Blue deionizovanou vodou v poměru 1:4.

Kultivační médium pro tabákové buňky

V destilované vodě bylo rozpuštěno 4,4 g Murashige and Skoog media (Duchefa Biochemie), 30 g sacharosy a 200 mg glutaminu. Po rozpuštění bylo do roztoku napipetováno 10 ml zásobního roztoku vitamínů, 1 ml zásobního roztoku kinetinu ($0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a 0,8 ml zásobního roztoku 2,4-D ($0,22 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). pH bylo upraveno pomocí KOH na hodnotu 5,5 – 5,7 a destilovanou vodou byl roztok doplněn do objemu 1 l. Roztok byl rozlit po 100 ml do Erlenmayerových baněk nebo jiných potřebných lahví a sterilizován v autoklávu.

Zásobní roztok vitamínů byl připraven rozpuštěním 30 mg pantothenátu, 20 mg glycinu, 5 mg kyseliny listové (folové) a 0,5 mg biotinu v destilované vodě.

Celkové složení kultivačního média udává tabulka 2.

Tab. 2: Složení kultivačního média pro tabákové buňky.

Složka	Výsledná koncentrace (mg/l)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
EDTA-Fe	37,2
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
KI	0,83

Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
Kyselina nikotinová	5
Pantothenát Ca	3
Glycin	2
Thiamin	0,5
Kyselina folová (listová)	0,5
Pyridoxin	0,5
Biotin	0,05
Kinetin	0,1
Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová	0,175
Myo-inositol	100
Glutamin	200
Sacharosa	30 000

Pevné agarové MS médium

2,3 g MS soli, 0,5 g MES a 10 g sacharosy bylo rozpuštěno ve vodě. Pomocí KOH bylo upraveno pH na hodnotu 5,9. Následně byl objem doplněn na 1 l. Nakonec bylo přidáno 8 g agaru. Roztok byl sterilizován v autoklávu.

Roztok fluoresceindiacetátu

Zásobní roztok fluoresceindiacetátu (FDA) byl připraven rozpuštěním 5 mg FDA v 1 ml vychlazeného acetonu a ihned umístěn do tmy na ledovou lázeň. Pracovní roztok FDA byl připravován vždy před vlastním měřením naředěním zásobního roztoku FDA destilovanou vodou v poměru 1:49. Během měření byl pracovní roztok FDA uchováván na ledové lázni a ve tmě.

3.1.5 Kultivace tabákových buněk

Byla používána suspenzní kultura tabákových buněk (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 25 °C, při 160 rpm a s fotoperiodou 24/0h v kultivačním médiu, jehož složení udává tabulka 2. Buněčná suspenze byla za sterilních podmínek pasážována jednou za 7 dní tak, že 12 ml buněčné suspenze staré 7 dní bylo napipetováno do 100 ml čistého kultivačního média.

Pro experimenty byly obvykle používány čtyřdenní tabákové buňky nacházející se v exponenciální fázi růstu.

3.1.6 Pěstování rostlin

Semena *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *Nicotiana tabacum* cv. Maryland a *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom byla zaseta do květináčů se zahradnickým substrátem a byla umístěna do fytotronu s fotoperiodou 12/12 h, kde byly rostliny pěstovány při 25 °C (Obr. 8).



Obr. 8: Rostliny pěstované v substrátu. A) 7 týdnů stará rostlina *Solanum lycopersicum*; B) 7 týdnů stará rostlina *Nicotiana tabacum* cv. Samsun.

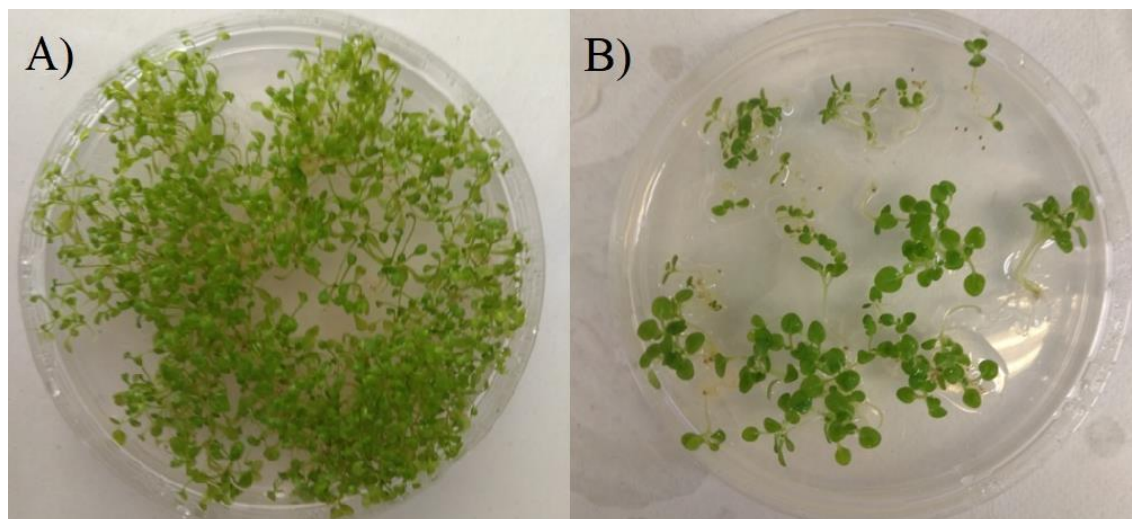
3.1.7 Sterilizace semen

Semena *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia a *Nicotiana tabacum* cv. Samsun byla sterilizována 70% etanolem po dobu 2 minut. Po odsátí ethanolu byla semena dvakrát propláchnuta sterilní deionizovanou vodou. Poté byla semena sterilizována roztokem Sava (ředěného vodou 1:1) po dobu 20 minut. Nakonec byla semena sedmkrát propláchnuta sterilní deionizovanou vodou. Takto sterilizovaná semena byla následně pěstována na pevném agarovém MS médiu.

3.1.8 Kultivace semenáčků *Arabidopsis thaliana* a *Nicotiana tabacum* na pevném agarovém MS médiu

Sterilní agarové MS médium bylo za sterilních podmínek rozlito do Petriho misek tak, aby pokrylo jejich dno a vytvořilo vrstvu silnou cca 7 mm. Po ztuhnutí byla na misky pipetována sterilizovaná semena *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia a *Nicotiana tabacum*

cv. Samsun ve sterilní deionizované vodě tak, aby vzdálenosti mezi jednotlivými semeny byly přibližně 5 mm. Misky byly obaleny parafilmem a přeneseny do ledničky na 2 dny za účelem synchronizace klíčení. Poté byly Petriho misky přeneseny do fytotronu. Po 7, 14 a 21 dnech byly rostliny využity na extrakci proteinů z listů nebo kořínků (Obr. 9).

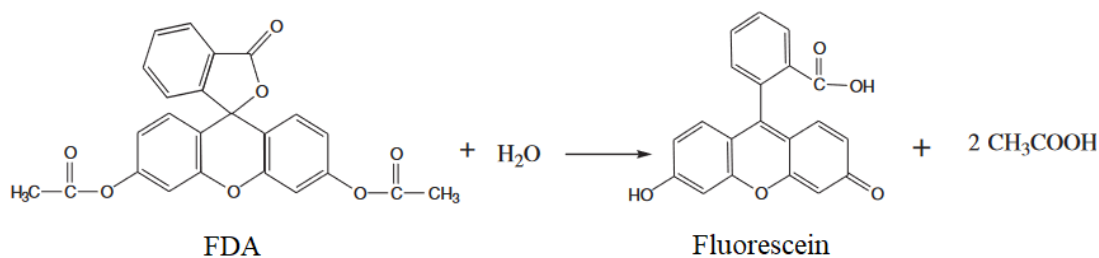


Obr. 9: Rostliny pěstované na pevném agarovém MS médiu. A) 14 dní starý *Arabidopsis thaliana*; B) 14 dní starý *Nicotiana tabacum* cv. Samsun.

3.2 Metody

3.2.1 Stanovení životnosti tabákových buněk pomocí FDA

Princip metody spočívá v tom, že esterasy v živých buňkách odštěpí acetátové skupiny z fluoresceindiacetátu (FDA), přičemž dochází k uvolnění fluoreskujícího fluoresceinu (Obr. 10), (Amano *et al*, 2003).



Obr. 10: Reakce rozkladu FDA vlivem katalytického působení esterasy v živých buňkách. (upraveno dle Green *et al.*, 2006).

Měření se provádí v černých mikrotitračních destičkách pro fluorescenci, optimálně s dnem U profilu pro efektivní promíchávání buněčné suspenze. Do jamky bylo pipetováno 170 µl média pro kultivaci buněk, poté 20 µl buněčné suspenze. Reakce byla startována přidávkem 10 µl pracovního roztoku FDA (0,01 %; finální koncentrace 12

$\mu\text{mol/l}$). Po promíchání byly měřeny změny intenzity fluorescence (excitace 493 nm, emise 515 nm) po dobu 120 sekund v intervalech po 10 sekundách. Pro vyhodnocení byla použita průměrná rychlost změny intenzity fluorescence.

Při každém měření byl použit blank, v němž chyběl FDA, a druhý blank, v němž chyběl vzorek buněk.

3.2.2 Stanovení životnosti tabákových buněk metodou s Evans Blue

Princip metody spočívá v tom, že Evans Blue prochází membránou mrtvých buněk a způsobuje jejich modré zbarvení (Amano *et al.*, 2003).

Byla připravena kolonka z injekční stříkačky o objemu 10 ml bez pístu, do které byla na dno vložena tenká vrstva vaty. Po jemném promíchání bylo odebráno 500 μl suspenze buněk a přeneseno do stříkačky. Buňky byly promyty 10 ml destilované vody, poté byly opatrně odstraněny kapky zbývající vody ve stříkačce. K buňkám ve stříkačce bylo přidáno 500 μl roztoku Evans Blue. Směs byla inkubována 5 minut. Buňky byly promyty 50 ml destilované vody. K buňkám ve stříkačce bylo napipetováno 500 μl extrakčního činidla 0,5% SDS. Stříkačky byly inkubovány 3 minuty na vroucí vodní lázni. K buňkám bylo napipetováno 1,5 ml destilované vody a roztok ze stříkačky byl kompletně vytlačen do 2ml zkumavky. 200 μl roztoku bylo přepipetováno do jamky na destičce, absorbance byla měřena při 600 nm.

3.2.3 Extrakce proteinů

Kultivační médium tabákových buněk bylo odsáto na Büchnerově nálevce a buňky byly zváženy. K 1 g buněk byly přidány 2 ml extrakčního pufru Tris-HCl ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 8). Následovala homogenizace v chlazené třecí misce se špetkou mořského písku a centrifugace (10 minut, 12000 RCF, 4 °C). Supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkušavky a uschován při 4 °C před stanovením aktivity DES.

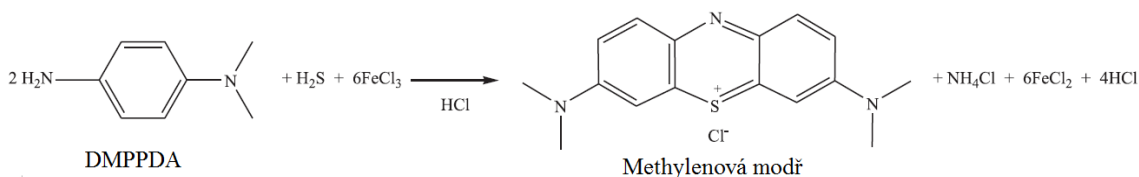
Listy nebo kořeny rostlin pěstovaných v substrátu nebo na agarovém médiu byly nastříhány a zváženy. K 1 g listů nebo kořenů byly přidány 2 ml extrakčního pufru Tris-HCl ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 8). Následující postup byl stejný jako při extrakci proteinů z tabákových buněk.

Pokud byly extrakty zamrazeny, byly po rozmrazení před stanovením aktivity opět centrifugovány (10 minut, 12000 RCF, 4 °C).

3.2.4 Stanovení aktivity L-cysteindesulhydrasy (DES)

Metoda je založena na reakci hydrogensulfidu s N,N-dimethyl-p-fenylendiaminem (DMPPDA), vedoucí za katalýzy FeCl_3 ke vzniku methylenové modři (Obr. 11). Intenzita

zbarvení reakčního produktu je měřena spektrofotometricky při 670 nm (Siegel, 1965; Scuffi *et al.*, 2014).



Obr. 11: Reakce DMPPDA s H_2S za vzniku methylenové modři. (Upraveno dle: Nagy *et al.*, 2014).

Kalibrace byla provedena pomocí sady roztoků NaHS v rozsahu koncentrací 1 – 5000 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do malé zkumavky bylo napipetováno 700 μl reakčního pufru a 100 μl roztoku NaHS. Ve slepém vzorku bylo místo NaHS pouze 100 μl vody. Poté bylo napipetováno 100 μl roztoku chloridu železitého (30 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v HCl (1,2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a nakonec 100 μl DMPPDA (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v HCl (7,2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Intenzita zbarvení vzniklé methylenové modři byla měřena spektrofotometricky při 670 nm.

Pro měření aktivity DES byl do malé zkumavky pipetován postupně pufr Tris-HCl (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 8), 40 μl DTT (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 100 μl extraktu s enzymem. V případě stanovení aktivity DES z listů nebo kořenů rostlin pěstovaných v substrátu nebo na pevném agarovém MS médiu byl do reakční směsi přidáván pyridoxalfosfát (PLP) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Směs o výsledném objemu 750 μl byla promíchána na vortexu. Reakce byla startována přidávkem 50 μl substrátu L-cysteinu (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Směs byla opět promíchána a následně inkubována, a to 15 minut při 47 °C v případě měření aktivity DES z buněčné kultury tabákových buněk a 45 minut při 37 °C v případě měření aktivity DES z rostlin pěstovaných v substrátu nebo na agarovém médiu, není-li u výsledků uvedeno jinak. Reakce byla ukončena přidávkem 100 μl roztoku chloridu železitého (30 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v HCl (1,2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Zbarvení bylo vyvoláno 100 μl roztoku DMPPDA (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v HCl (7,2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), jeho intenzita odpovídající množství produkovaného sulfanu byla po krátké centrifugaci vzorku vyhodnocována spektrofotometricky při 670 nm. Množství komponent bylo vždy voleno tak, aby výsledný objem reakční směsi byl 1 ml. Při každém měření byl použit blank, v němž chyběl substrát, a druhý blank, v němž chyběl enzym, a to z důvodu zjištění, zda jiné složky extraktu neovlivňují výslednou hodnotu absorbance.

3.2.5 Stanovení proteinů Bradfordovou metodou

Jako standardy byly použity roztoky hovězího sérového albuminu o koncentraci 0,2 – 1,4 mg·ml⁻¹. Měření bylo prováděno na mikrotitračních destičkách. Do jamky bylo pipetováno postupně 45 µl vody, 5 µl standardu nebo vzorku proteinu a 200 µl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Destička byla jemně protřepána, po 5 minutách vyvíjení zbarvení byla proměřena absorbance při 595 nm.

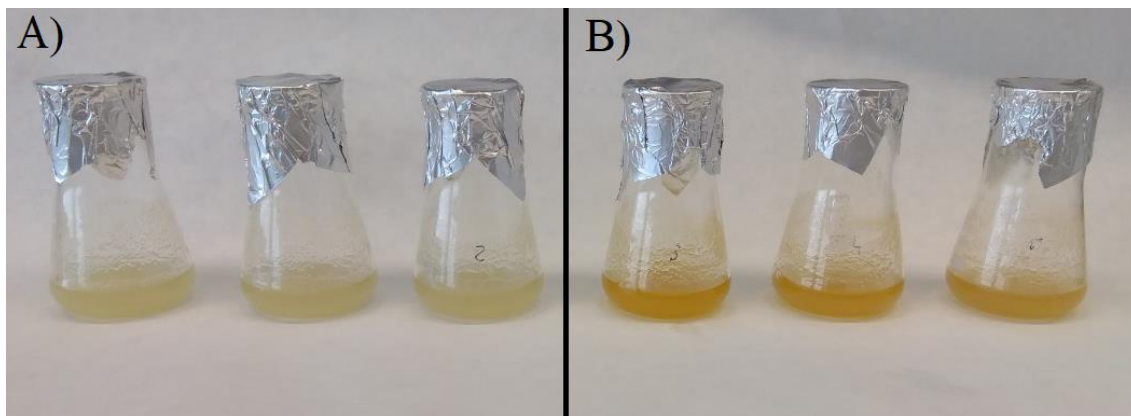
3.2.6 Příprava mrtvých buněk

První způsob umrtvení buněk spočívá v opakovaném zamrazování a rozmrazování. Buněčnou suspenzi v plastové nádobce zamrazíme na dobu dostatečně dlouhou na to, aby byla celá směs v pevném skupenství (v případě objemu 15 ml cca 45 minut). Poté rozmrazujeme tak dlouho, aby byla celá směs opět zkapalněna. Postup je vhodné opakovat alespoň třikrát.

Buňky je možno umrtvit působením detergentu Tritonu X-100. Ke vzorku 1950 µl buněčné suspenze přidáme 50 µl 20% Tritonu a buňky intenzivně protřepeme.

3.2.7 Stanovení vlivu vybraných látek na životnost tabákových buněk a aktivitu DES

Byl stanovován vliv L-cysteinu, kryptogeinu (Obr. 12), hypotaurinu, NaHS a Na₂S na životnost tabákových buněk a aktivitu DES.



Obr. 12: Vliv elicitoru kryptogeinu (50 nmol·l⁻¹) v médiu na zbarvení buněčné suspenze po 24 hodinách jeho působení. A) kontrolní vzorky buněk; B) vzorky buněk s kryptogeinem.

Pro každý experiment byla použita buněčná kultura stará 4 dny. Pro každé měření byla buněčná suspenze pocházející z jedné zásobní baňky rozdělena do několika menších baněk pracovních, poté následovala ekvilibrace trvající 1 hodinu. Ekvilibrace byla prováděna za účelem adaptace tabákových buněk na menší objem kultury, v níž byly buňky v průběhu experimentu inkubovány. Následně (tzn. v čase 0 h) byla v každé

pracovní baňce s využitím FDA proměřena životnost za účelem eliminace případných větších rozdílů mezi vzorky buněk. Ihned poté byla přidána chemikálie, jejíž vliv měl být sledován. Po posledním proměření životnosti (obvykle 24 hodin po přidavku dané látky) byla zbývající část buněčné suspenze v každé pracovní baňce využita na extrakci proteinů za účelem stanovení aktivity DES.

V případě stanovení vlivu preinkubace L-cysteinu s tabákovými buňkami na následnou odolnost buněk vůči kryptogeinu byl L-cystein sterilně přidán do sterilního kultivačního média těsně před pasážováním buněk.

Aktivita DES i životnost tabákových buněk byla u každého vzorku proměřena v 6 opakováních (technický hexaplikát). Za jeden vzorek je přitom brána buněčná suspenze v jedné pracovní baňce, do níž byla přidána jedna určitá látka nebo jedna kombinace látek. U každého biologického opakování pokusu byla pro danou látku nebo kombinaci látek použita jedna pracovní baňka, není-li u výsledků uvedeno jinak. Experiment byl obvykle proveden dvakrát nebo třikrát v různé týdny s různými buňkami (biologický duplikát nebo triplikát). Výsledky v grafech jsou uváděny jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou.

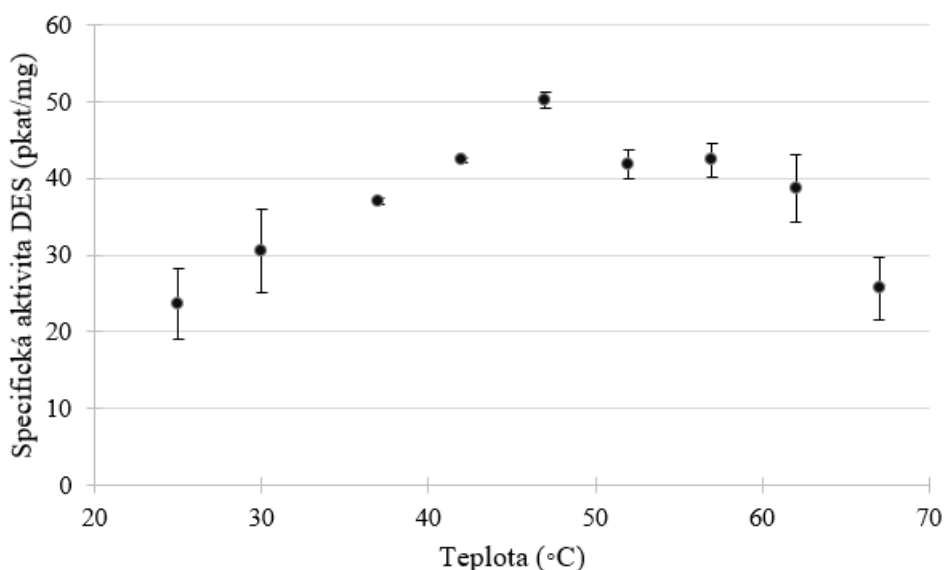
4 Výsledky

4.1 Analýza vlastností DES v tabákových buňkách

Vzhledem k tomu, že je velká část diplomové práce věnována sledování vlivu různých látek na aktivitu DES v tabákových buňkách, byla nejdříve provedena analýza některých vlastností DES tabákových buněk za účelem zvolení vhodných podmínek měření.

4.1.1 Teplotní optimum DES

Za účelem stanovení teplotního optima enzymu DES1 byla reakční směs inkubována 15 minut při teplotách 25 °C, 30 °C, 37 °C, 42 °C, 47 °C, 52 °C, 57 °C, 62 °C a 67 °C. Experiment byl proveden dvakrát v různé týdny s různými extrakty tabákových buněk. Oba extrakty byly připraveny ze dvou buněčných kultur (ze dvou zásobních baněk). Obrázek 13 uvádí závislost naměřené specifické aktivity DES na teplotě.



Obr. 13: Teplotní optimum enzymu DES1 tabákových buněk. Doba inkubace reakční směsi byla 15 minut. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému duplikátu.

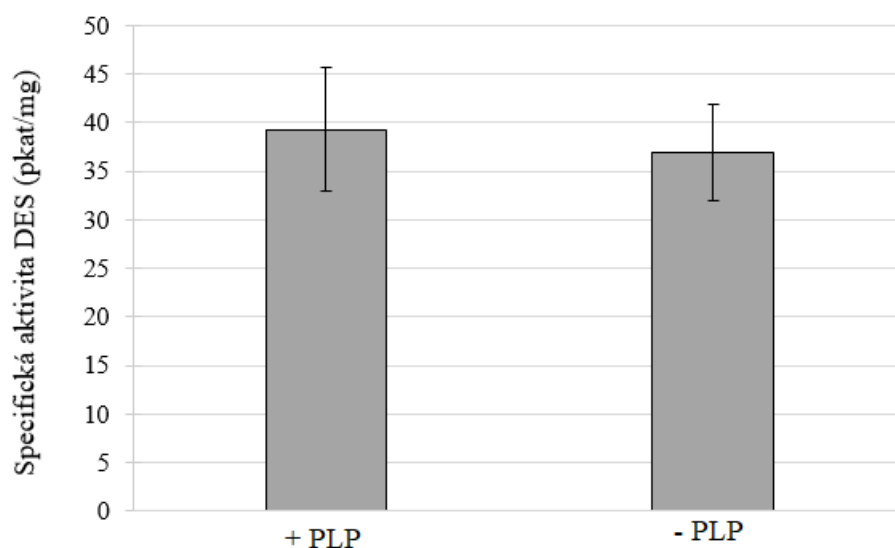
Nejvyšší průměrná aktivita DES pro 15 minut inkubace reakční směsi byla zjištěna při teplotě 47 °C.

4.1.2 Vliv pyridoxalfosfátu v reakční směsi na aktivitu DES

Pyridoxalfosfát (PLP) působí jako kofaktor L-cysteindesulfhydrasy (Alvarez *et al.*, 2010).

PLP byl do reakční směsi přidán tak, aby jeho výsledná koncentrace byla $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledná aktivita byla porovnána s aktivitou DES naměřenou v případě, že PLP do reakční směsi přidán nebyl (Obr. 14). Experiment byl proveden třikrát v různé týdny

s různými extrakty tabákových buněk. Každý extrakt byl připraven ze dvou buněčných kultur (ze dvou zásobních baněk).



Obr. 14: Vliv PLP v reakční směsi na aktivitu DES. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému triplikátu.

Aktivita DES se po přidavku PLP do reakční směsi zvýšila v průměru pouze o 5 %. V dalších experimentech s tabákovými buňkami již PLP do reakční směsi přidáván nebyl.

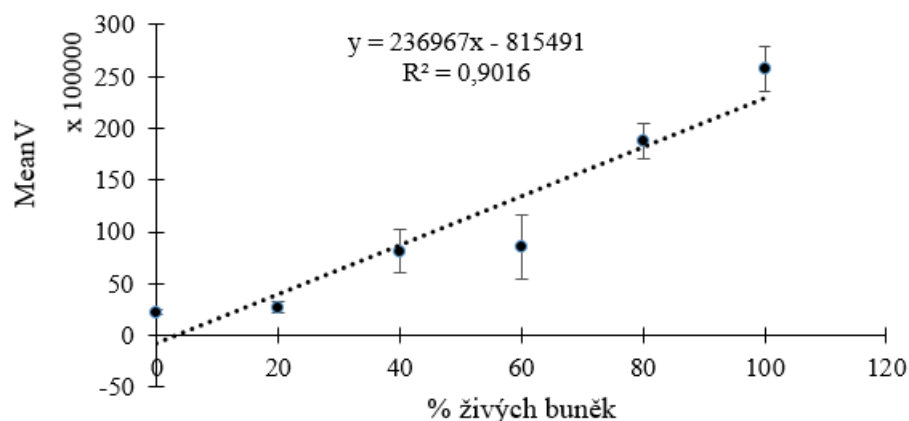
4.2 Testování metod stanovení životnosti tabákových buněk

Pro stanovení životnosti tabákových buněk nemohly být použity mikroskopické metody, protože tabákové buňky kultivaru Xanthi tvoří shluky, v nichž se počet buněk nedá mikroskopicky kvantifikovat. Bylo nutné využít metod založených na fluorescenčním nebo spektrofotometrickém stanovení. Byla vybrána metoda využívající FDA a metoda využívající Evansovu modř, u nichž byla pozorována lineární závislost signálu na počtu živých buněk (Amano *et al.*, 2003).

4.2.1 Metoda stanovení životnosti tabákových buněk s FDA

Tabákové buňky byly umrtveny zamražením a rozmražením buněčné suspenze provedeným třikrát po sobě. Získaná směs byla brána jako vzorek obsahující 0 % živých buněk, zatímco nezamražená suspenze pocházející ze stejné zásobní baňky představovala vzorek se 100 % živých buněk. Kalibrační sada buněk byla následně připravena smícháním příslušných objemů suspenzí buněk mrtvých a živých tak, aby procentuální zastoupení živých buněk ve vzorcích bylo 0, 20, 40, 60, 80 a 100 %. U těchto vzorků byla metodou s FDA následně proměřena průměrná rychlost změny intenzity fluorescence. Každý vzorek byl měřen v 6 opakováních (technický hexaplikát). Experiment byl proveden třikrát v různé týdny s různými buněčnými suspenzemi. Průměrná rychlost

změny intenzity fluorescence se však i u nezamražovaných buněk (u vzorku se 100 % živých buněk) mezi jednotlivými týdny značně lišila. Důvodem je biologická variabilita vedoucí k rozdílné délce fází buněčné kultury po pasážování a tím i k rozdílné hustotě buněčné suspenze, kterou máme při daném biologickém opakování k dispozici. Pro vyhodnocení kalibrace byl proto vybrán výsledek pouze jednoho biologického opakování experimentu (Obr. 15).



Obr. 15: Kalibrace metody stanovení životnosti tabákových buněk metodou s FDA. Směrodatné odchylky odpovídají technickému hexaplikátu. MeanV = průměrná rychlost změny intenzity fluorescence v průběhu 120 s po přidavku FDA.

S rostoucím procentuálním zastoupením živých buněk v buněčné suspenzi roste hodnota naměřené rychlosti změny intenzity fluorescence. Poměrně velké rozptyly hodnot technických replikátů jsou způsobeny značnou heterogenitou buněčné suspenze, jež neumožňuje vytvořit směs se zcela určitým počtem živých a mrtvých buněk. K heterogenitě pipetované směsi přispívá časté shlukování buněk vedoucí k rozdílnému počtu buněk, které jsou v daném objemu nasáty do špičky pipety.

4.2.2 Metoda stanovení životnosti tabákových buněk s Evansovou modří

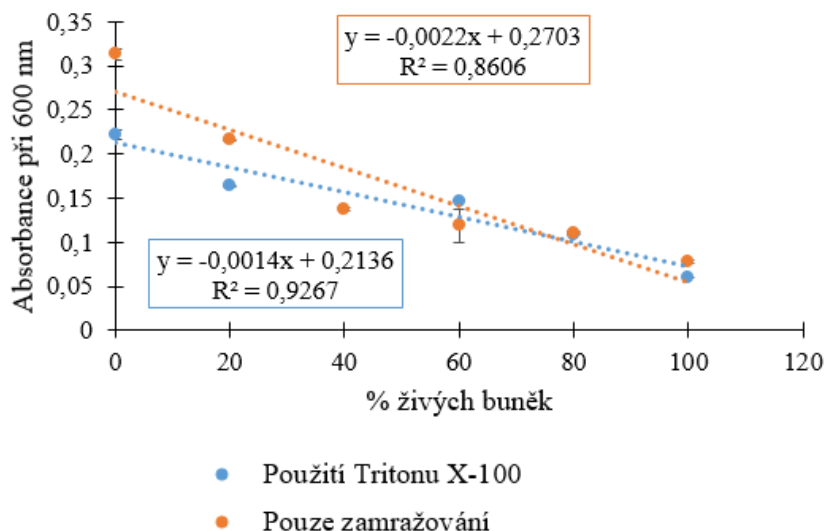
Narozdíl od předchozí metody stanovení životnosti, která slouží k určení počtu živých buněk na základě aktivity esteras rozkládajících FDA, metoda využívající Evansovu modř umožňuje stanovení počtu mrtvých buněk na základě intenzity zbarvení, které způsobuje barvivo pronikající pouze do mrtvých buněk. S rostoucím počtem mrtvých buněk v suspenzi tedy roste hodnota absorbance.

První kalibrační sada buněk byla připravena stejným způsobem jako v předchozím případě, tj. mícháním buněk živých s mrtvými připravenými opakovaným zamražením a

rozmražením tak, aby procentuální zastoupení živých buněk ve vzorcích bylo 0, 20, 40, 60, 80 a 100 %.

V případě druhé kalibrační sady buněk byl vzorek obsahující 0 % živých buněk připraven umrtvením buněk působením detergentu Tritonu X-100. Ostatní vzorky této sady byly připraveny stejným způsobem jako vzorky první kalibrační sady.

Jednotlivé kalibrační sady byly připraveny v různé týdny s různými buňkami. Výsledek ukazují následující grafy (Obr. 16).



Obr. 16: Kalibrace metody stanovení životnosti tabákových buněk metodou s Evansovou modří. Směrodatné odchylky odpovídají technickému hexaplikátu.

Buňky byly pravděpodobně lépe umrtvené zamražením než Tritonem, protože poměr nejvyšší a nejnižší absorbance (odpovídající vzorku s 0 % a se 100 % živých buněk) byl u první kalibrační sady vyšší (4,0) než u druhé (3,7).

Protože metoda využívající FDA je rychlejší a jednodušší, byla použita k měření životnosti u všech dalších experimentů.

4.3 Sledování změn životnosti tabákových buněk a aktivity DES v různých fázích buněčné kultury

Změny životnosti buněk a aktivity DES byly stanovovány v časech 48, 72, 96, 120, 144, 168 a 192 hodin po pasážování. Jednalo se tedy o druhý až osmý den po pasážování.

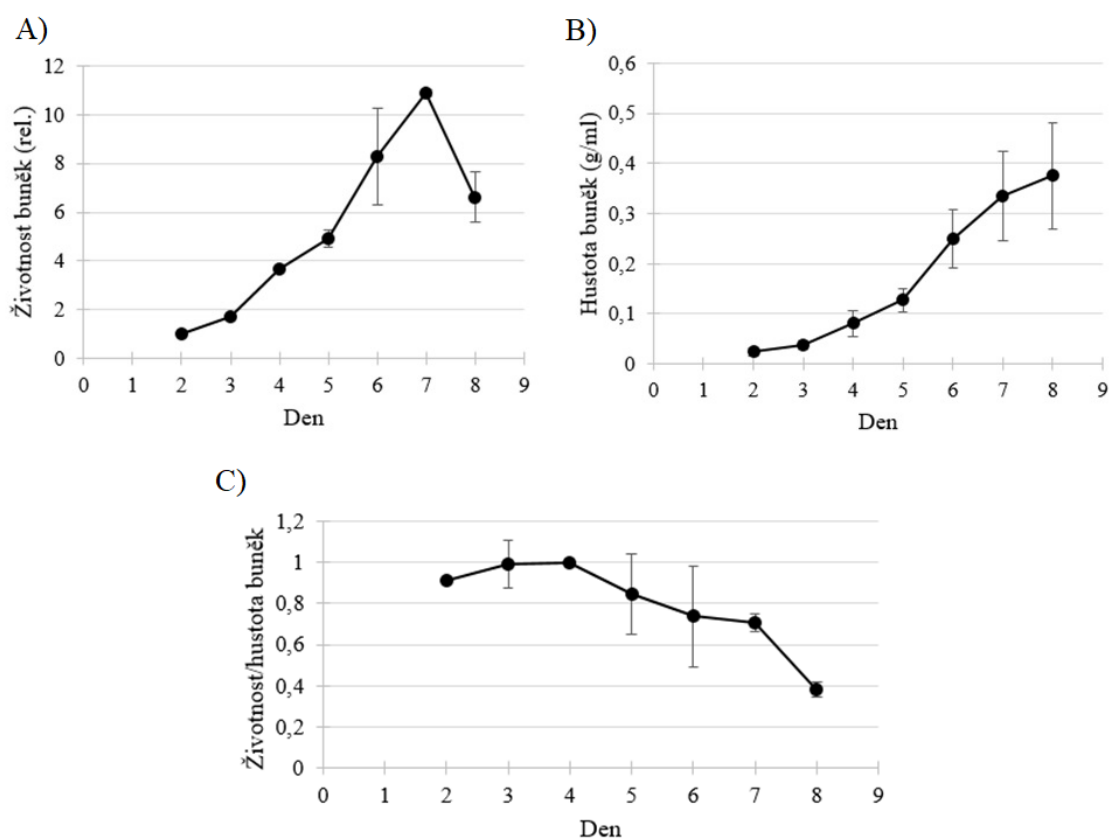
Měření bylo provedeno dvakrát v různé týdny s různými buněčnými kulturami.

4.3.1 Změny životnosti tabákových buněk a hustoty buněčné suspenze v různých fázích buněčné kultury

Životnost byla stanovena metodou využívající FDA. Změny životnosti v tomto případě odpovídají změnám počtu živých buněk, nikoliv změnám procentuálního zastoupení živých buněk v suspenzi, neboť se během fází kultury buňky množí a narůstá tak hustota suspenze. Naměřené hodnoty životnosti byly vztaženy k životnosti v čase 48 h (tj. den 2), které byla při obou opakováních přiřazena hodnota 1 (Obr. 17A).

Hustota buněčné suspenze byla stanovena na základě hmotnosti odsátých buněk a objemu suspenze, ze které byly buňky získány (Obr. 17B).

Vztáhneme-li životnost tabákových buněk k hustotě buněčné suspenze, získáme životnost buněk o jednotkové hustotě, na jejímž základě můžeme sledovat změny podílu (resp. procentuálního zastoupení) živých buněk v suspenzi v různých fázích buněčné kultury. Hodnoty byly vztaženy k nejvyšší hodnotě životnosti buněk o jednotkové hustotě, která byla naměřena 4. den (Obr. 17C).



Obr. 17: Změny životnosti tabákových buněk a hustoty suspenze v různých fázích buněčné kultury. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému duplikátu. A) životnost; B) hustota; C) životnost vztažená k hustotě (její změny odpovídají změnám podílu živých buněk v suspenzi).

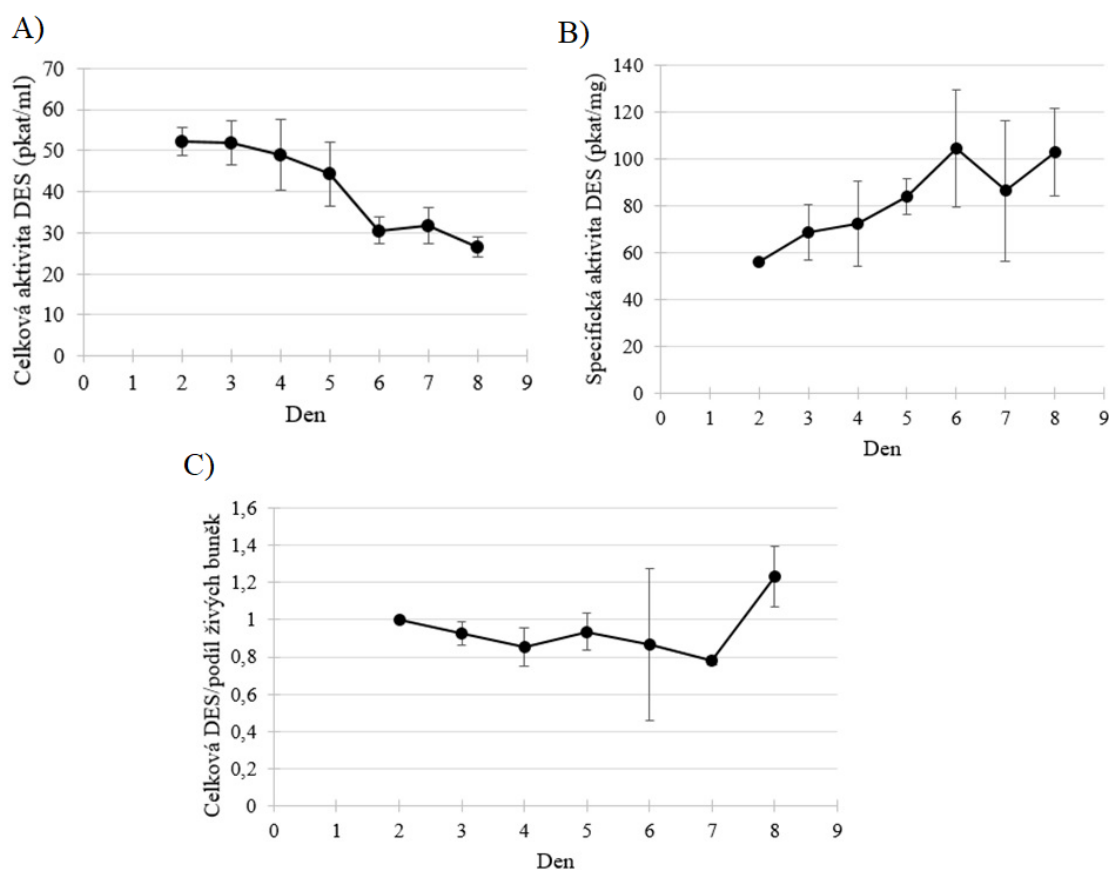
V průběhu 2. až 7. dne po pasážování životnost narůstala, mezi 7. a 8. dnem již došlo k poklesu.

Hustota buněčné suspenze narůstala od 2. až po 8. den i přesto, že životnost po 7. dni již začala klesat. Největší nárůst biomasy byl pozorován mezi 5. a 7. dnem. Poměr hustoty mezi 8. a 2. dnem byl přibližně 19.

Životnost buněk o jednotkové hustotě mírně narůstala do 4. dne, poté docházelo k poklesu. Výrazný pokles podílu živých buněk mezi 7. a 8. dnem byl způsoben vyčerpáním živin v médiu, které vedlo k buněčné smrti. Velké rozptyly hodnot získaných 5. a 6. den jsou pravděpodobně dány tím, že buňky jedné kultury přešly do další fáze později než druhé.

4.3.2 Změny aktivity DES tabákových buněk v různých fázích buněčné kultury

V buněčné kultuře tabáku byly sledovány změny celkové aktivity DES (aktivity vztažené na objem extraktu), změny specifické aktivity DES (aktivity vztažené na množství proteinů) a změny celkové aktivity vztažené k životnosti buněk o jednotkové hustotě (resp. k podílu živých buněk), (Obr. 18).



Obr. 18: Změny celkové a specifické aktivity DES v různých fázích buněčné kultury. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému duplikátu. A) celková aktivita; B) specifická aktivita; C) celková aktivita vztažená k podílu živých buněk (hodnoty byly určeny relativně vzhledem k takto stanovené celkové aktivitě DES v den 2).

Celková aktivita DES a koncentrace proteinů v buňkách měla v průběhu vývoje buněčné kultury klesající tendenci. Pokles koncentrace proteinů může souviset s klesajícím podílem živých buněk v suspenzi. Specifická aktivita DES v průběhu vývoje spíše narůstala.

Vztáhneme-li celkovou aktivitu k podílu živých buněk v suspenzi, můžeme porovnávat aktivitu DES jedné živé buňky v různých fázích kultury. Takto vztažená aktivita DES zůstala až do 7. dne přibližně stejná, poté byl pozorován nárůst.

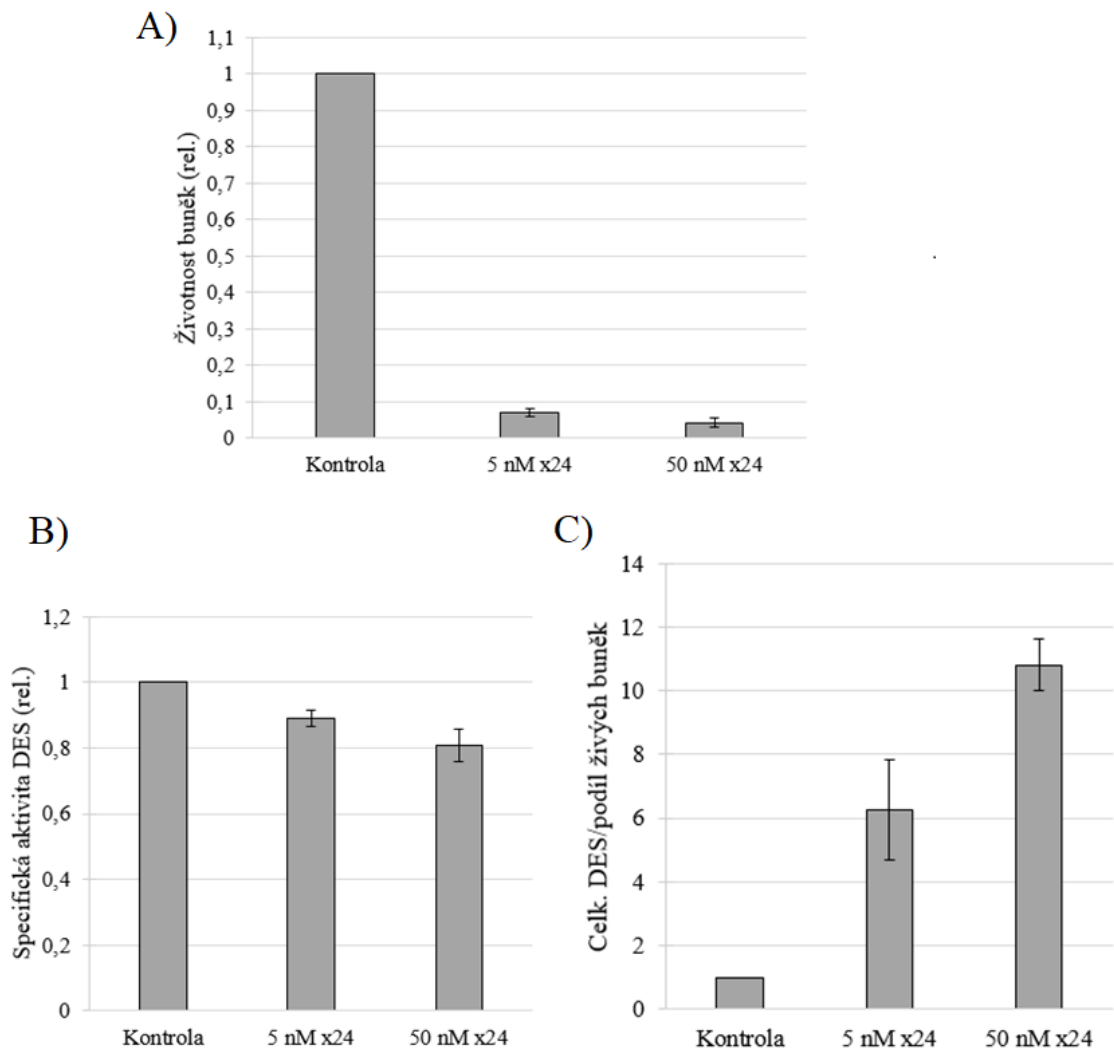
4.4 Studium vztahu metabolismu L-cysteinu a sulfanu k buněčné smrti tabákových buněk vyvolané účinkem elicitoru kryptogeinu

Za účelem snadnějšího porovnání výsledků byly hodnoty životnosti a aktivity vždy určeny relativně (rel.) vzhledem ke kontrolnímu nebo jinému vhodnému vzorku, kterému byla při všech biologických opakováních pokusu přiřazena hodnota 1. Aktivita DES je většinou uváděna jednak jako specifická aktivita, jednak jako celková aktivita vztažená k podílu živých buněk v suspenzi, který byl určen na základě měření životnosti buněk a hustoty buněčné suspenze. Životnost byla obvykle měřena v čase 0 h, 3 h a 24 h po přidavku příslušné chemikálie, v grafech jsou však obvykle pro přehlednost uváděny pouze hodnoty získané po 24 h inkubace, neboť po 3 hodinách většinou nedocházelo k žádným měřitelným změnám.

4.4.1 Vliv kryptogeinu na životnost tabákových buněk a aktivitu DES

Kryptogein je elicitor způsobující buněčnou smrt. Slouží jako látka simulující podmínky biotického stresu (Binet *et al.*, 2001).

Vliv kryptogeinu (x24) o koncentracích $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na životnost tabákových buněk a aktivitu DES byl stanovován po 24 h působení (Obr. 19).

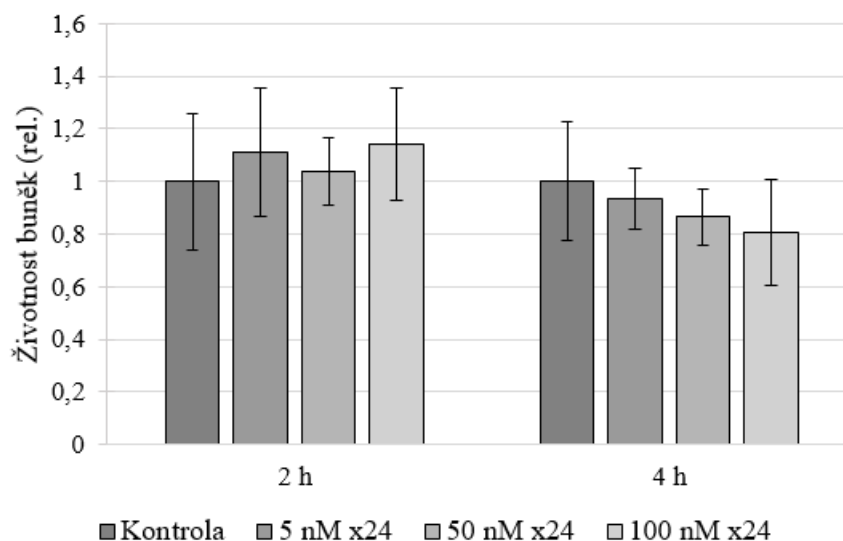


Obr. 19: Vliv kryptogeinu x24 na životnost tabákových buněk a aktivitu DES po 24 h. Hodnoty byly určeny relativně vzhledem ke kontrole. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému triplikátu. A) životnost buněk, B) specifická aktivita DES, C) celková aktivita DES vztažená k podílu živých buněk.

Kryptogein v obou uvedených koncentracích způsobil výrazný pokles životnosti buněk, mírný pokles specifické aktivity DES a značný nárůst celkové aktivity vztažené k podílu živých buněk v kultuře. U buněk stresovaných kryptogeinem byl zjištěn jen velmi malý pokles koncentrace proteinů v porovnání s kontrolním vzorkem, a to i přes značné snížení celkové aktivity esteras, na jejichž základě měříme životnost metodou s FDA.

Bylo provedeno také několik dalších měření s kryptogeinem o koncentraci 0,1, 0,5 a 1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ale žádný významný vliv na životnost pozorován nebyl. V dalších pokusech byla tedy obvykle používána koncentrace 50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Vliv kryptogeinu o koncentracích 5, 50 a 100 nmol·l⁻¹ na životnost tabákových buněk po 2 h a po 4 h působení uvádí obrázek 20.



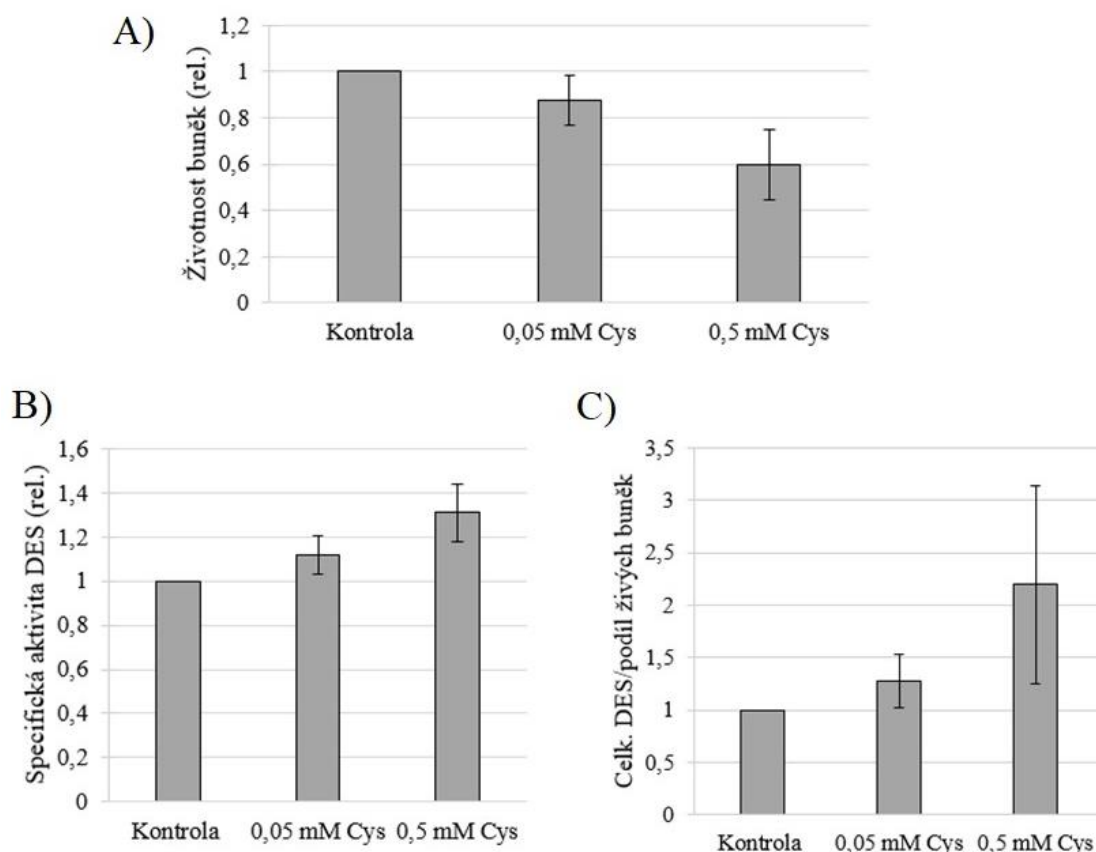
Obr. 20: Vliv kryptogeinu x24 na životnost tabákových buněk po 2 h a po 4 h působení. Hodnoty byly určeny relativně vzhledem ke kontrole. Směrodatné odchylky odpovídají technickému hexaplikátu.

Přestože kryptogein o koncentraci 50 nmol·l⁻¹ způsobil po 24 hodinách snížení životnosti tabákových buněk na méně než 5 %, v průběhu prvních 4 hodinách došlo vlivem kryptogeinu o koncentraci 100 nmol·l⁻¹ k poklesu pouze na přibližně 81 % vzhledem ke kontrolnímu vzorku.

U specifické aktivity DES i celkové aktivity DES vztažené na podíl živých buněk nedošlo v průběhu prvních 4 hodin působení kryptogeinu k žádné změně.

4.4.2 Vliv přídavku L-cysteinu do média na životnost tabákových buněk a aktivitu DES

L-cystein byl přidán do buněčné kultury tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,05 a 0,5 mmol·l⁻¹. Vliv L-cysteinu na životnost a aktivitu DES byl stanovován po 24 h působení (Obr. 21).



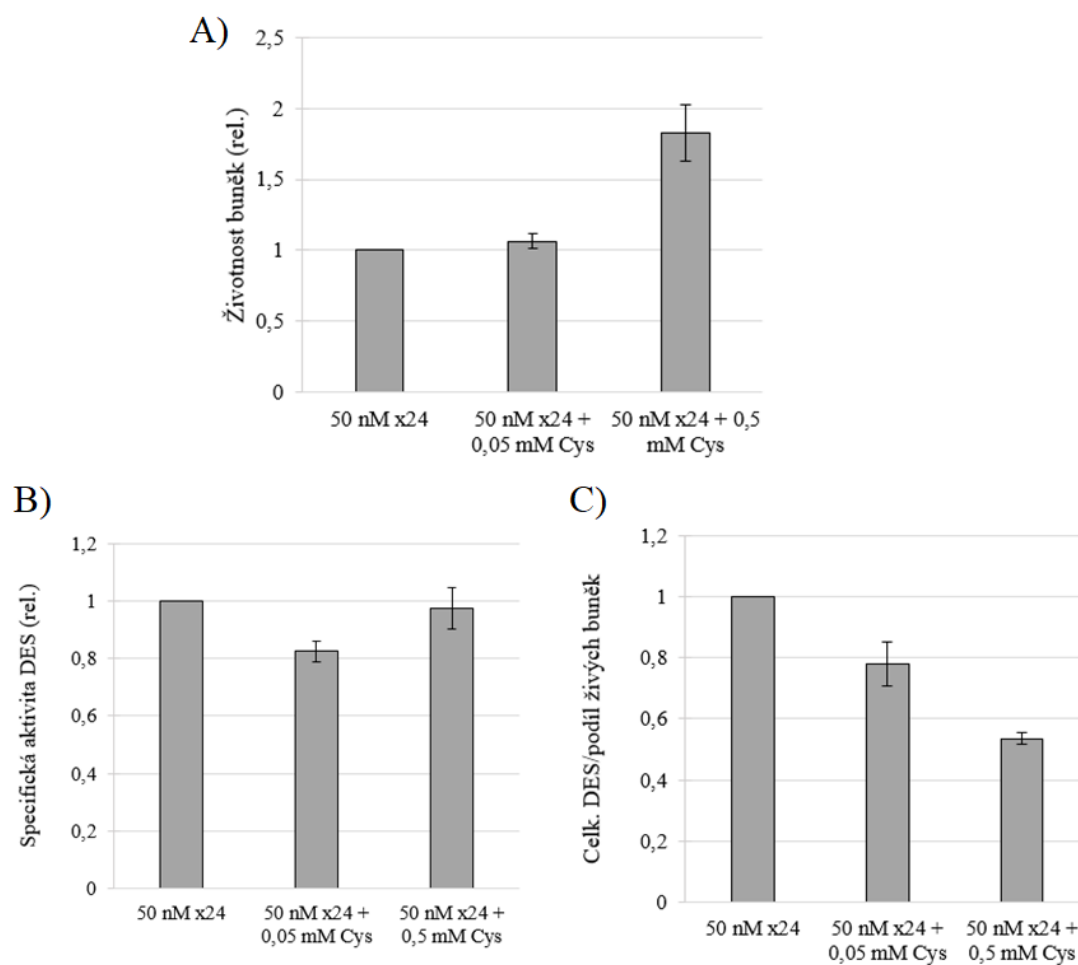
Obr. 21: Vliv L-cysteinu na životnost tabákových buněk a aktivitu DES po 24 h působení. Hodnoty byly určeny relativně vzhledem ke kontrole. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému triplikátu. A) životnost buněk, B) specifická aktivita DES, C) celková aktivita DES vztahovaná k podílu živých buněk.

Životnost buněk vlivem L-cysteinu v médiu v průběhu 24 h klesala, aktivita DES narůstala.

Bylo provedeno rovněž měření vlivu L-cysteinu o koncentraci $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Životnost v průběhu 24 hodin po přidavku klesla na méně než 1 % v porovnání s kontrolním vzorkem, aktivita DES nebyla měřitelná vůbec. L-cystein o této koncentraci je tedy již vysoce toxický, jeho vliv na životnost buněk v průběhu uvedené doby trvání je dokonce výraznější než trojnásobné zamražení a rozmražení.

4.4.3 Vliv L-cysteinu na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem

Byl studován vliv L-cysteinu přidaného do média souběžně s kryptogeinem x24 na životnost buněk a aktivitu DES po 24 hodinách (Obr. 22). Použitá výsledná koncentrace kryptogeinu v médiu byla $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, koncentrace L-cysteinu 0,5 a 0,05 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.



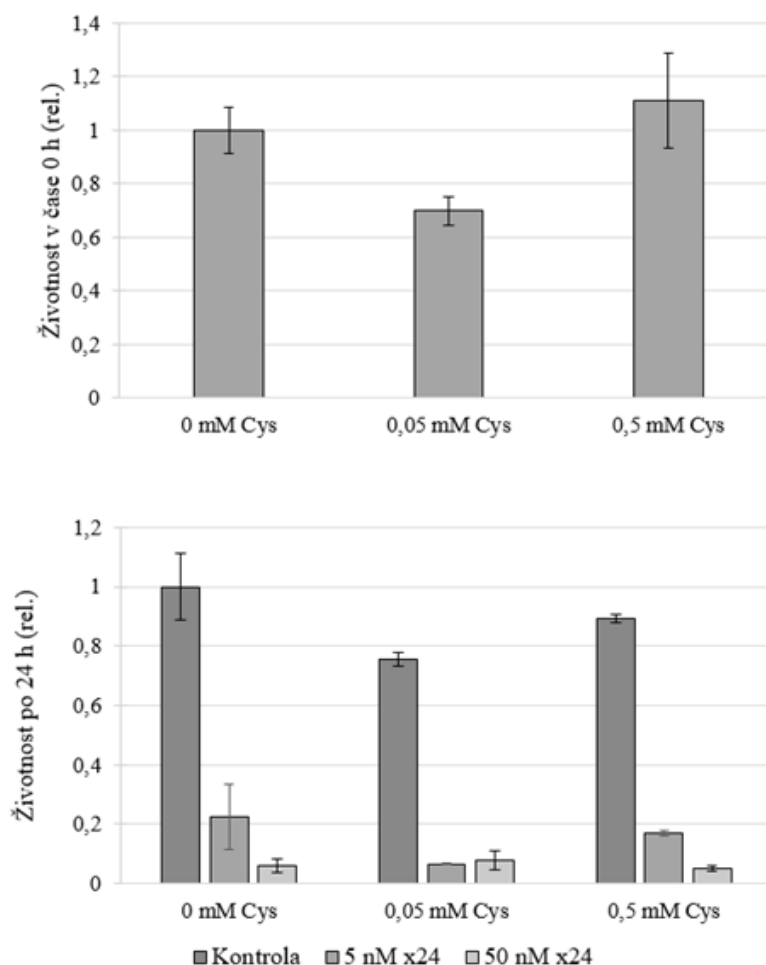
Obr. 22: Vliv L-cysteinu na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem x24 (po 24 h). Hodnoty byly určeny relativně vzhledem ke vzorku buněk, v němž byl pouze kryptogein. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému duplikátu. A) životnost, B) specifická aktivita DES, C) celková aktivita DES vztahovaná k podílu živých buněk.

L-cystein o koncentraci $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ navýšil životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem téměř o 80 %. Aktivita DES vlivem L-cysteinu spíše klesala.

4.4.4 Vliv preinkubace tabákových buněk s L-cysteinem na životnost buněk a jejich odolnost vůči kryptogeinu

V tomto případě byl L-cystein sterilně přidán do sterilního kultivačního média těsně před pasážováním buněk. Výsledné koncentrace L-cysteinu byly opět $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následovala čtyřdenní kultivace buněk s L-cysteinem, po které byla proměřena životnost buněk a aktivita DES. Poté byl k části buněk z každé kultury přidán kryptogein a následovalo stanovení odolnosti buněk vůči kryptogeinu po 24 h jeho působení.

Výsledky stanovení životnosti v době před přidavkem kryptogeinu a po 24 h jeho působení udává následující graf (Obr. 23).

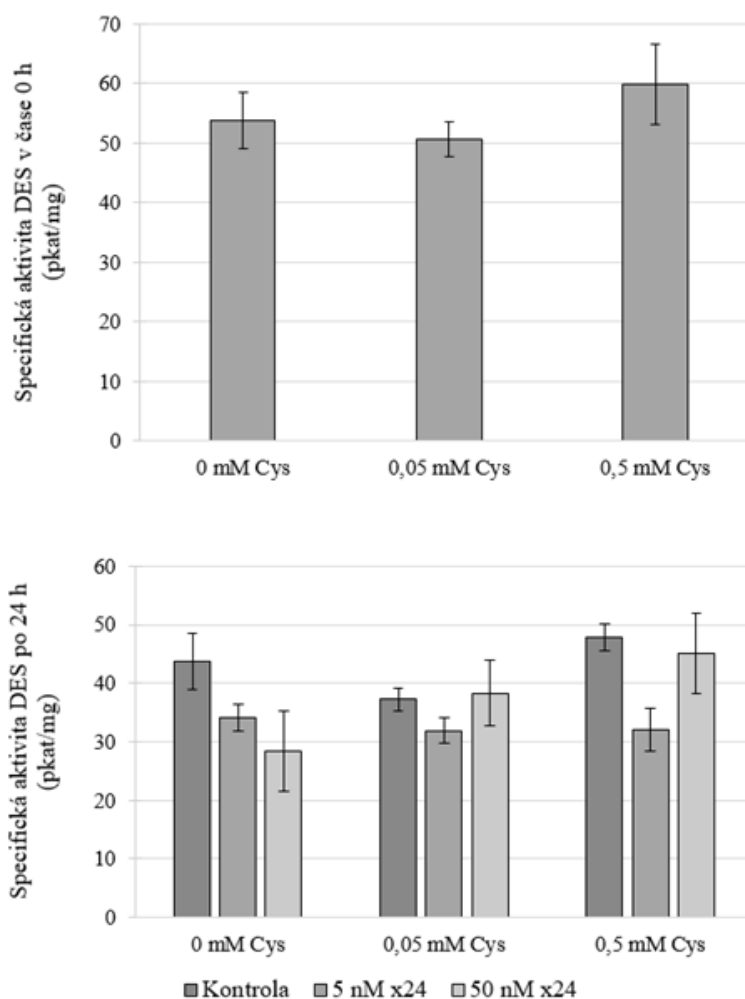


Obr. 23: Vliv preinkubace tabákových buněk s L-cysteinem na životnost buněk a jejich odolnost vůči kryptogeynu x24. Hodnoty byly určeny relativně vzhledem ke kontrolnímu vzorku buněk, který neobsahoval L-cystein ani kryptogeyn. Směrodatné odchylky odpovídají technickému hexaplikátu.

Vliv L-cysteinu na životnost buněk je v tomto případě nejasný, neboť při koncentraci $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo pozorováno snížení životnosti, zatímco při koncentraci $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo ke zvýšení životnosti. Tyto rozdíly životnosti buněk v různých kulturách v době před přidáním kryptogeynu pravděpodobně nejsou způsobené přítomností L-cysteinu v médiu, ale biologickou variabilitou vedoucí k mírně rozdílnému vývoji buněk v průběhu prvních 4 dní po pasážování.

Odolnost buněk vůči kryptogeynu o koncentraci $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byla nejvyšší u buněk, jež měly ve svém okolí L-cystein v koncentraci $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, odolnost vůči kryptogeynu o koncentraci $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byla nejvyšší u buněk, které L-cystein ve svém okolí neměly. Je zřejmé, že L-cystein způsobuje zvýšení odolnosti buněk ke kryptogeynu jen v případě, že je L-cystein přidán společně s kryptogeynem poté, co byly buňky 4 dny kultivovány v médiu bez L-cysteinu.

Významné rozdíly nebyly nalezeny ani u specifické aktivity DES (Obr. 24).

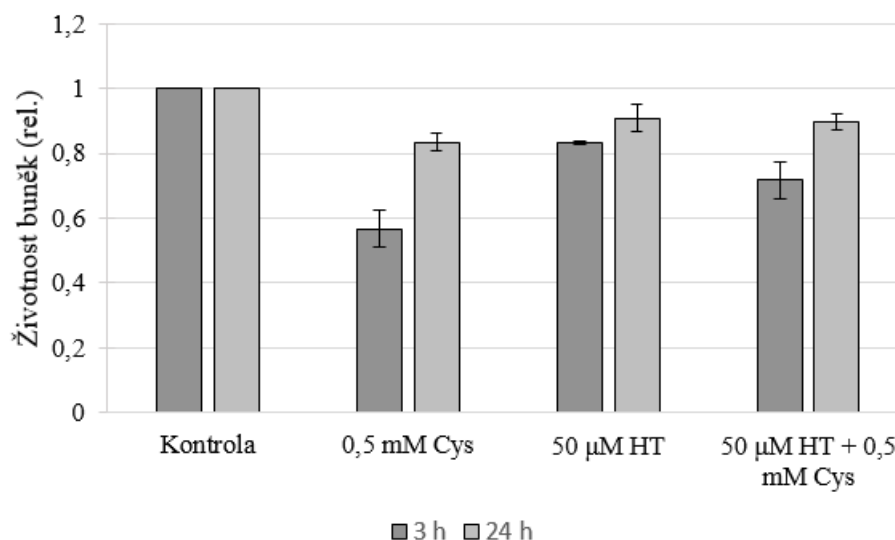


Obr. 24: Vliv preinkubace tabákových buněk s L-cysteinem na specifickou aktivitu DES a její změny po přidavku kryptogeinu x24. Směrodatné odchylky odpovídají technickému hexaplikátu.

4.4.5 Vliv hypotaurinu na životnost buněk a aktivitu DES

Hypotaurin (HT) působí jako lapač sulfanu (Shi *et al.*, 2015).

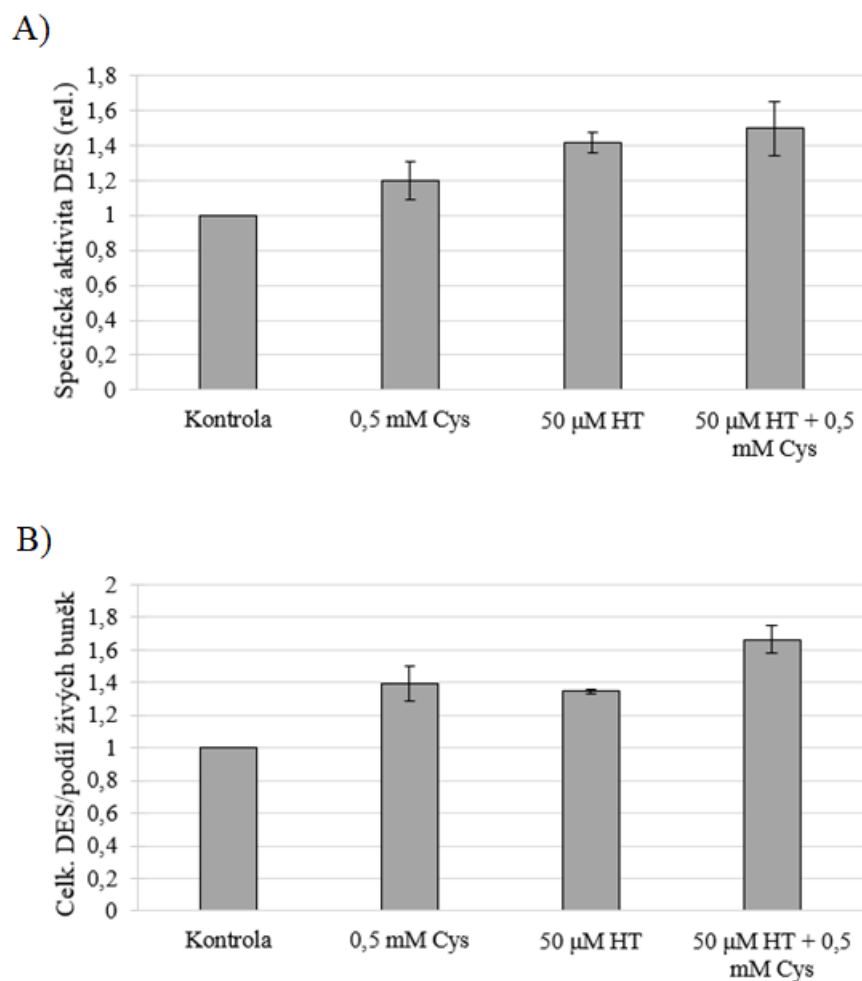
Vliv hypotaurinu, L-cysteinu a jejich kombinace na životnost tabákových buněk byl stanovován po 3 h a po 24 h působení (Obr. 25).



Obr. 25: Vliv hypotaurinu, L-cysteinu a jejich kombinace na životnost tabákových buněk po 3 h a po 24 h působení. Hodnoty byly v obou časech určeny relativně vzhledem ke kontrolnímu vzorku. Směrodatná odchylka odpovídá biologickému duplikátu.

Vliv L-cysteinu i hypotaurinu vedl ke snížení životnosti buněk vůči kontrole, které bylo výraznější po 3 hodinách působení. Tento pokles životnosti však nebyl zdaleka tak velký, aby mohl být hypotaurin o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ považován za látku pro buňky toxickou. Dokonce i vliv L-cysteinu byl výraznější. Pokles životnosti byl zřejmě pouze projevem adaptace buněk na přítomnost nové látky v médiu.

Po 24 hodinách působení byla u těchto vzorků rovněž proměřena aktivita DES (Obr. 26).

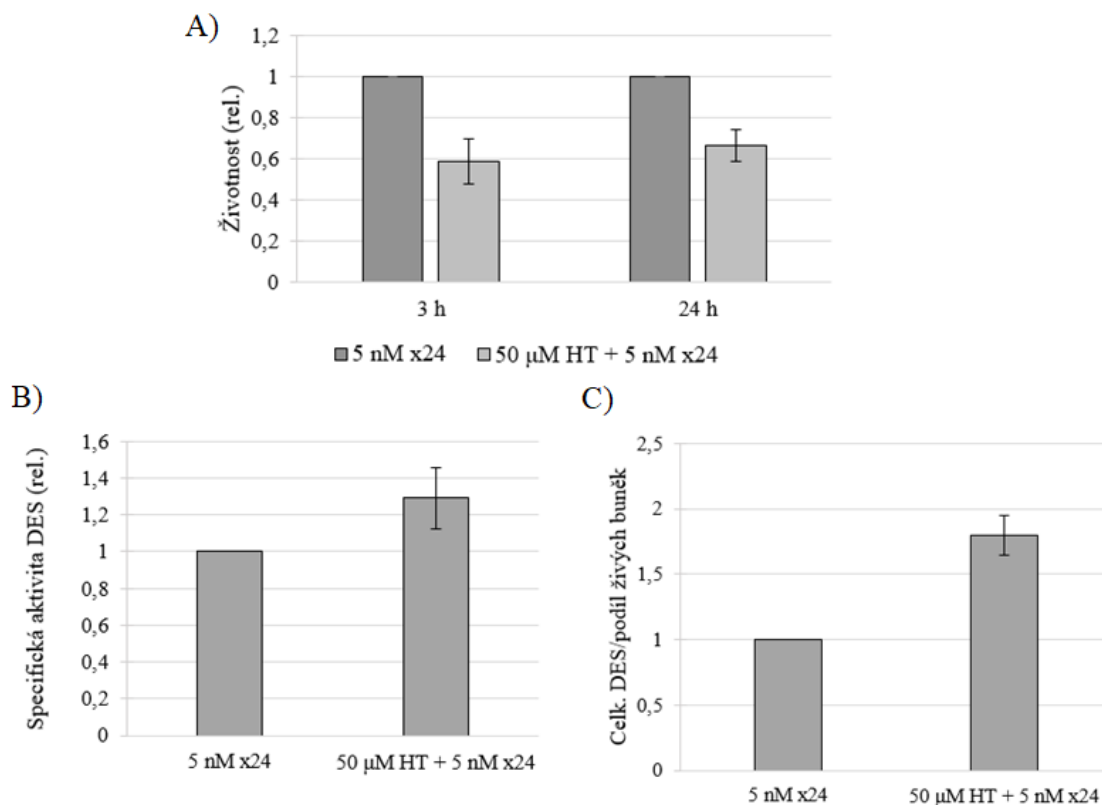


Obr. 26: Vliv hypotaurinu, L-cysteinu a jejich kombinace na aktivitu DES po 24 h působení. Hodnoty byly určeny relativně vzhledem ke kontrolnímu vzorku. Směrodatná odchylka odpovídá biologickému duplikátu.

Specifická aktivita DES i celková aktivita vztažená na podíl živých buněk vlivem působení hypotaurinu vzrostla, přičemž v obou případech byla nejvyšší, pokud byl hypotaurin v médiu společně s L-cysteinem. Zjednodušeně se dá říct, že chybí-li buňkám sulfan a je-li současně v médiu přítomen L-cystein, je enzym DES1 aktivován nejvýrazněji, aby byl co nejrychleji nahrazen deficit sulfanu.

4.4.6 Vliv hypotaurinu na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogéinem

V navazujících experimentech byl studován vliv hypotaurinu o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na životnost tabákových buněk stresovaných kryptogéinem o koncentraci $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 3 h a po 24 h působení a vliv na aktivitu DES po 24 h (Obr. 27).



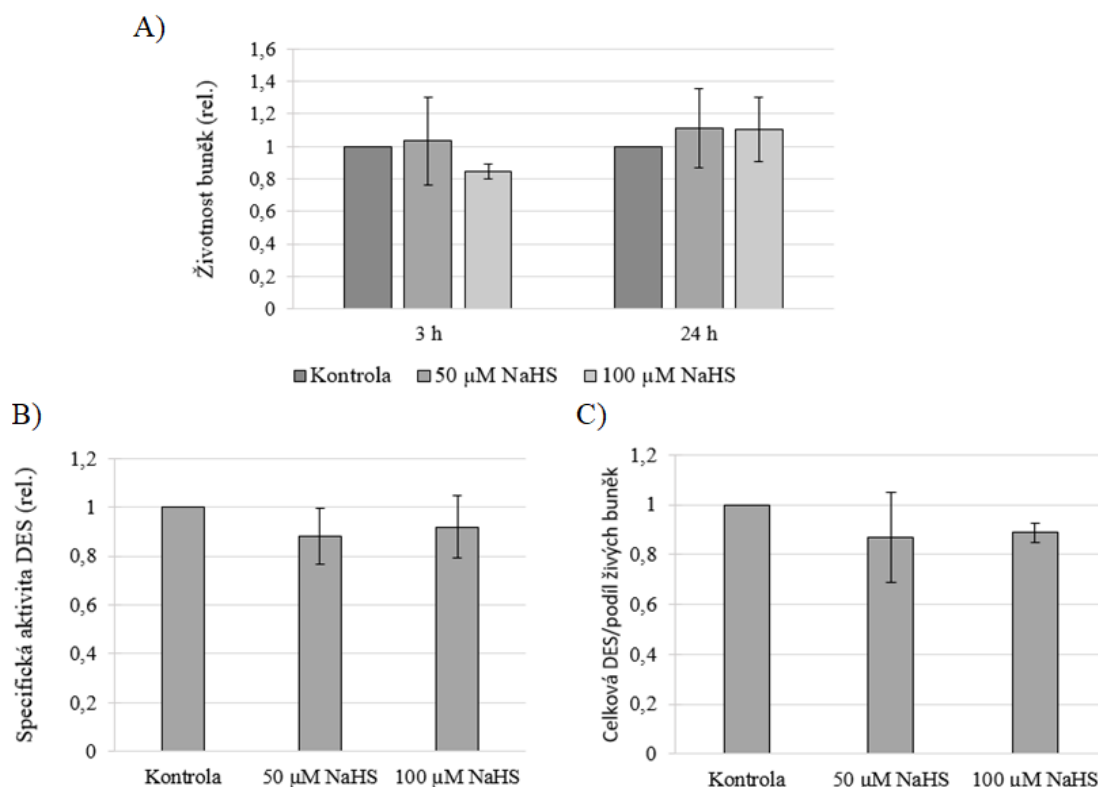
Obr. 27: Vliv hypotaurinu na životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem a na aktivitu DES za těchto podmínek. Hodnoty určeny relativně vzhledem ke vzorku buněk, ve kterém byl pouze kryptogeiin. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému duplikátu. A) životnost po 3 a 24 h, B) specifická aktivita po 24 h, C) celková aktivita vztahovaná na podíl živých buněk po 24 h.

Hypotaurin způsobuje snížení životnosti buněk stresovaných kryptogeinem, a to už po 3 h působení (Obr. 27 A), ačkoliv vliv samotného kryptogeiinu o této koncentraci na životnost bývá po tak krátké době zanedbatelný (Obr. 20). U aktivity DES byl naopak zaznamenán nárůst (Obr. 27 B, C).

4.4.7 Vliv hydrogensulfidu sodného na aktivitu DES a životnost tabákových buněk

Hydrogensulfid sodný (NaHS) slouží jako donor sulfanu (Shi *et al.*, 2015).

Vliv NaHS o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na životnost tabákových buněk byl stanoven po 3 h a po 24 h působení, vliv na aktivitu DES byl stanoven po 24 h (Obr. 28).

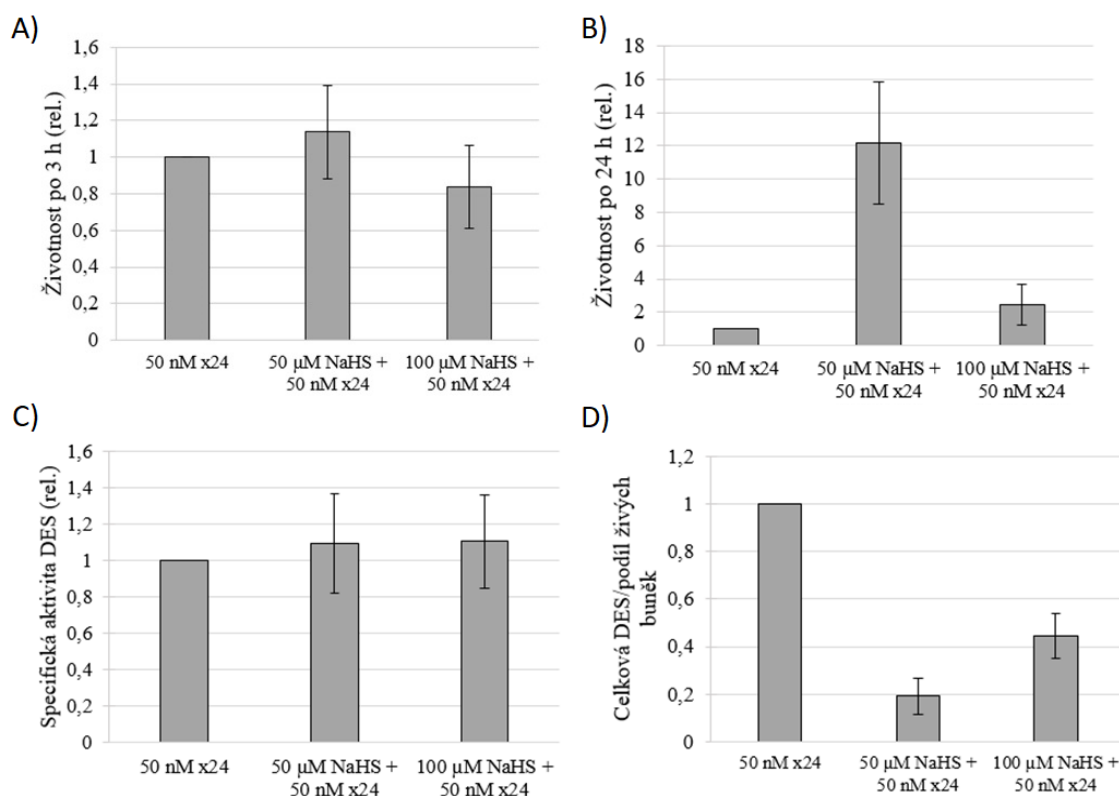


Obr. 28: Vliv NaHS na životnost tabákových buněk a aktivitu DES. Hodnoty byly určeny relativně vzhledem ke kontrole. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému triplikátu. A) vliv na životnost, B) vliv na specifickou aktivitu (po 24 h), C) vliv na celkovou aktivitu vztaženou k podílu živých buněk (po 24 h).

Samotný NaHS v uvedených koncentracích neprojevoval toxické působení, neboť nezpůsobil významné změny v životnosti ani v aktivitě DES. Došlo pouze k mírnému poklesu životnosti buněk vlivem NaHS o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 3 h, pravděpodobně v důsledku adaptace buněk na přítomnost nové látky v médiu. Obě tyto koncentrace bylo možno použít na stanovení vlivu NaHS na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptoginem.

4.4.8 Vliv hydrogensulfidu sodného na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptoginem

Vliv NaHS o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na životnost tabákových buněk stresovaných kryptoginem o koncentraci $50 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl analyzován po 3 h a po 24 h působení, vliv na aktivitu DES po 24 h (Obr. 29).



Obr. 29: Vliv NaHS na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem x24. Hodnoty určeny relativně vzhledem ke vzorku buněk, ve kterém byl pouze kryptogein. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému duplikátu. A) životnost po 3 h, B) životnost po 24 h, C) specifická aktivita DES po 24 h, D) celková aktivita DES vztahovaná na podíl živých buněk po 24 h.

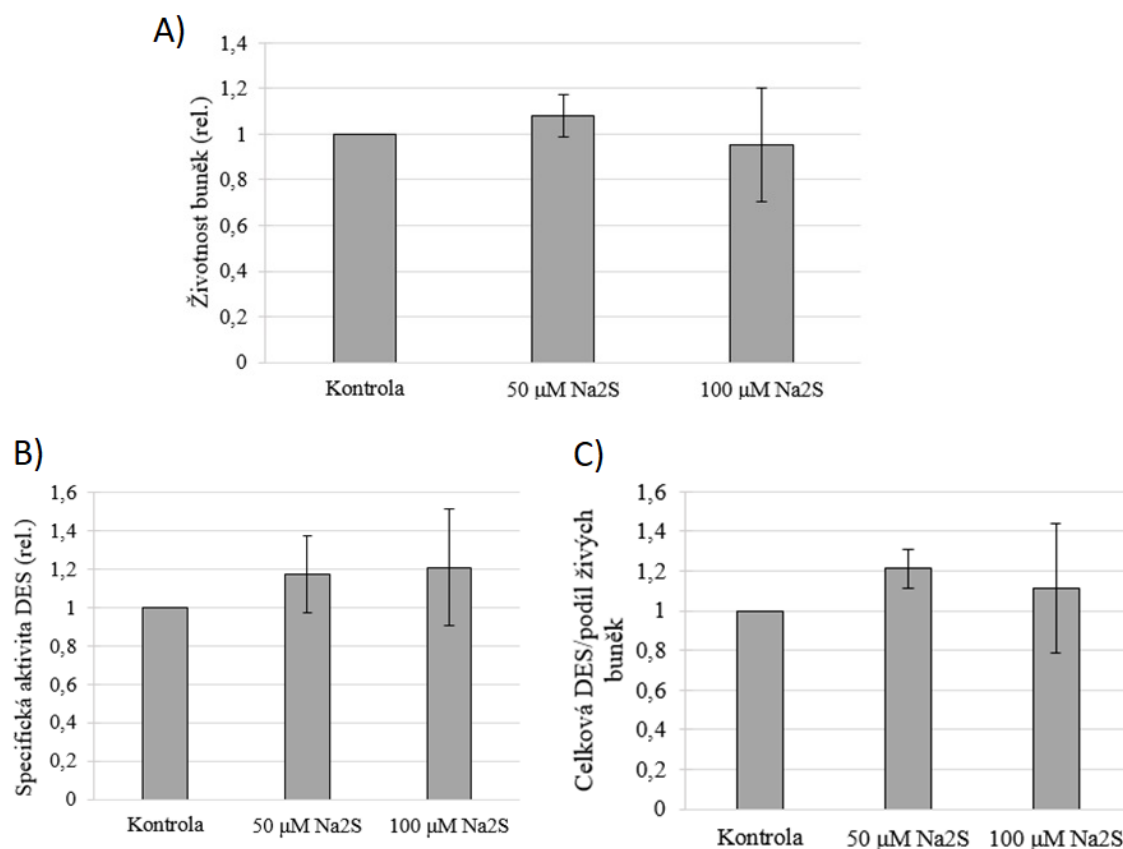
V průběhu prvních 3 hodin byly pozorovány jen velmi malé změny v životnosti buněk. Po 24 hodinách však NaHS o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ výrazně zvýšil životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem. Zvýšení je patrné i v případě použití dvojnásobné koncentrace NaHS.

NaHS způsobil rovněž značné snížení celkové aktivity DES vztahované k podílu živých buněk stresovaných kryptogeinem, zatímco specifická aktivita zůstala na přibližně stejné úrovni.

4.4.9 Vliv sulfidu sodného na aktivitu DES a životnost tabákových buněk

Sulfid sodný slouží také jako donor sulfanu. Může sloužit jako alternativa k NaHS, který je méně stabilní (Alvarez *et al.*, 2012b).

Vliv sulfidu sodného o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na životnost tabákových buněk a aktivitu DES byl stanovován po 24 h působení (Obr. 30).

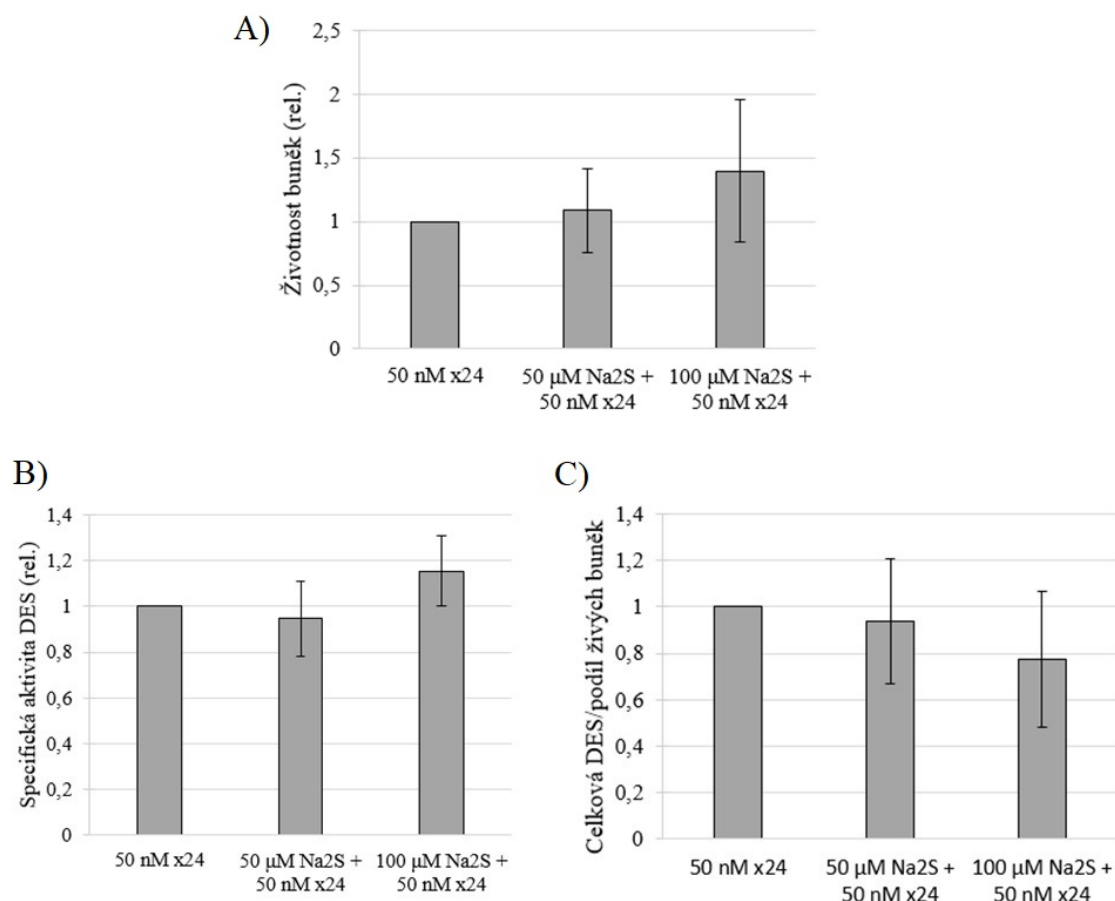


Obr. 30: Vliv Na₂S na aktivitu DES a životnost tabákových buněk po 24 h působení. Hodnoty určeny relativně vzhledem ke kontrole. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému triplikátu. A) životnost, B) specifická aktivita DES, C) celková aktivita DES vztažená na podíl živých buněk.

Podobně jako tomu bylo v případě NaHS, samotný sulfid sodný v uvedených koncentracích neprojevoval toxické působení, neboť nezpůsobil významné změny v aktivitě DES ani v životnosti. Obě tyto koncentrace byly použity na stanovení vlivu Na₂S na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem.

4.4.10 Vliv sulfidu sodného na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem

Vliv sulfidu sodného o koncentraci 50 μmol·l⁻¹ a 100 μmol·l⁻¹ na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem o koncentraci 50 nmol·l⁻¹ byl stanovován po 24 h působení (Obr. 31).



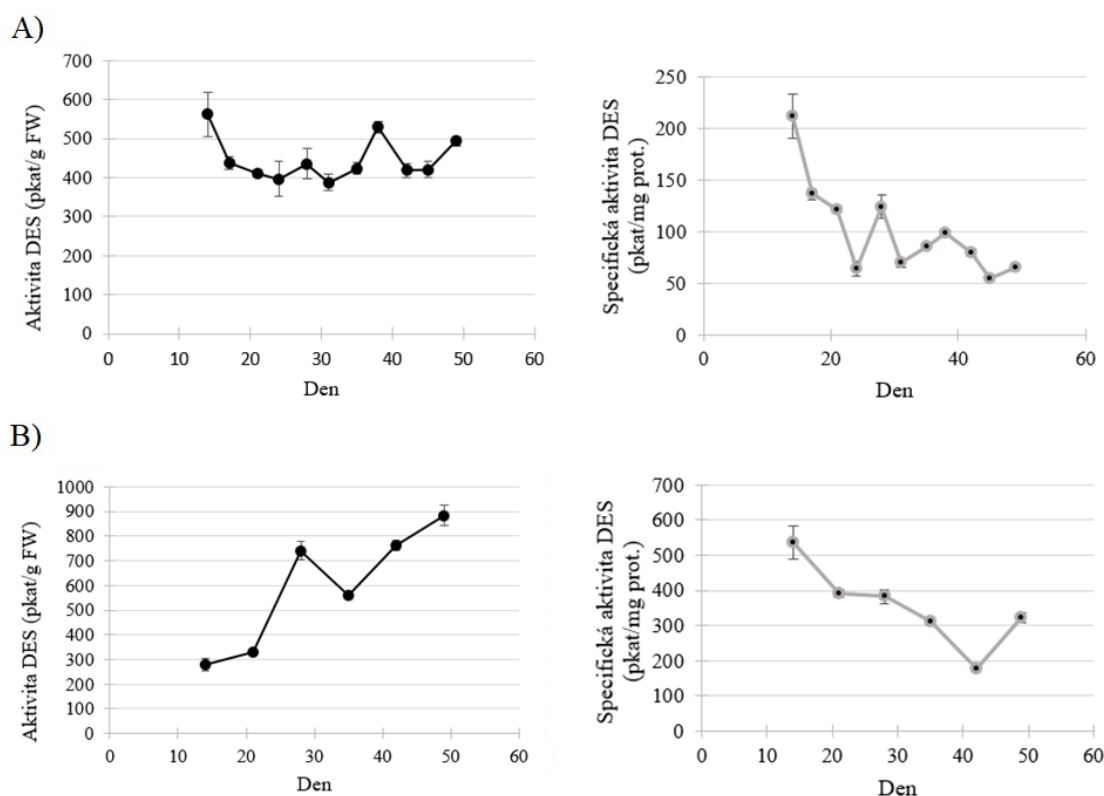
Obr. 31: Vliv Na₂S na aktivitu DES a životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem x24 po 24 h působení. Hodnoty určeny relativně vzhledem ke vzorku buněk, ve kterém byl pouze kryptogeiin. Směrodatné odchylky odpovídají biologickému triplikátu. A) životnost, B) specifická aktivita DES, C) celková aktivita DES vztahovaná na podíl živých buněk.

Sulfid sodný, narozdíl od NaHS, navýšil životnost buněk stresovaných kryptogeinem pouze při koncentraci 100 μmol·l⁻¹ a ani v tomto případě nebylo zvýšení životnosti nijak výrazné. Na₂S způsobil rovněž mírné snížení celkové aktivity DES vztahované k podílu živých buněk stresovaných kryptogeinem. Účinek Na₂S je tedy podobný jako účinek NaHS, ale mnohem méně výrazný.

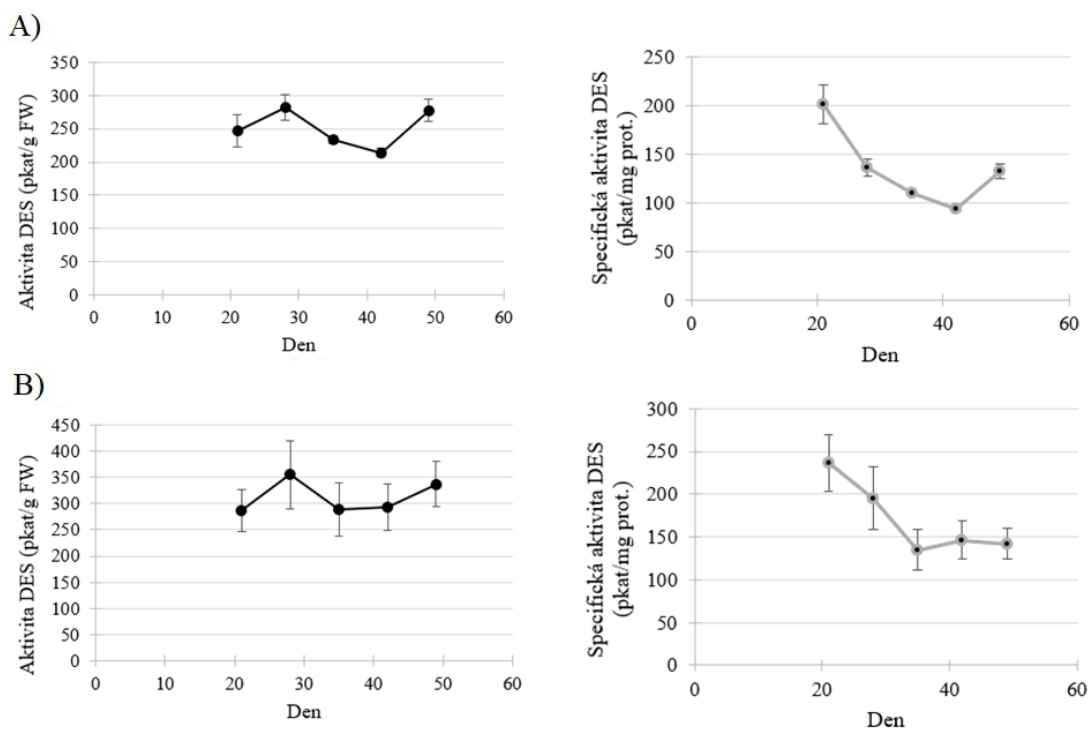
4.5 Aktivita DES ve vybraných modelových rostlinách

4.5.1 Aktivita DES z listů rostlin pěstovaných v pěstebním substrátu

Byly stanovovány změny aktivity DES z listů rostlin *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia, *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun a *Nicotiana tabacum* cv. Maryland pěstovaných v zahradnickém substrátu, ke kterým došlo v průběhu jejich vývoje (Obr. 32; Obr. 33). Aktivita byla vztahována jednak k hmotnosti rostlinného materiálu („fresh weight“, FW), jednak ke koncentraci proteinů stanovené Bradfordovou metodou. Pro každé měření bylo využito v průměru 5 až 10 rostlinných jedinců.



Obr. 32: Změny aktivity DES vztažené na gram čerstvé váhy (FW) a specifické aktivity DES z listů rostlin pěstovaných v substrátu v průběhu vývoje. Směrodatné odchylky odpovídají technickému hexaplikátu. A) *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, B) *A. thaliana* cv. Columbia.



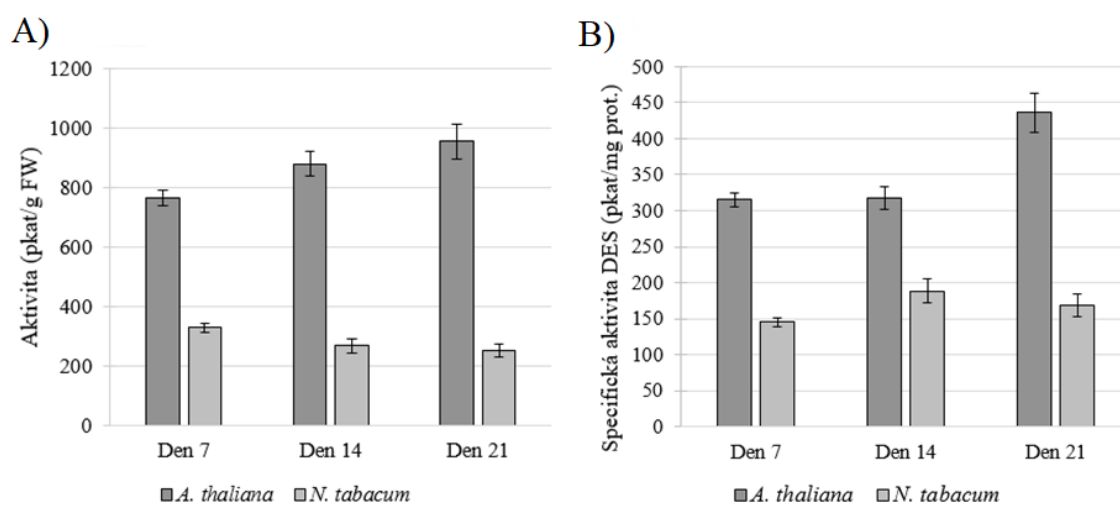
Obr. 33: Změny aktivity DES vztažené na gram čerstvé váhy (FW) a specifické aktivity DES z listů rostlin pěstovaných v substrátu v průběhu vývoje. Směrodatné odchylky odpovídají technickému hexaplikátu. A) *N. tabacum* cv. Samsun, B) *N. tabacum* cv. Maryland.

U všech použitých rostlinných druhů byla pozorována tendence k poklesu specifické aktivity DES v průběhu vývoje rostlin. Tento pokles koreloval s narůstajícím obsahem proteinů v listech. Nejvyšší specifická aktivita byla naměřena u 14 dní starých semenáčků *A. thaliana* ($537 \text{ pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$), nejnižší u 45 dní starých rostlin *S. lycopersicum* ($55 \text{ pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$).

Aktivita DES vztažená na gram čerstvé váhy poměrně výrazně narůstala u *A. thaliana*, kde v průběhu 5 týdnů vzrostla přibližně na trojnásobek. Ve zbývajících případech byly pozorovány mnohem menší změny, přičemž celkově neměl průběh křivky závislosti aktivity DES na čase vzrůstající ani klesající charakter. Nejvyšší aktivita byla naměřena u 7 týdnů starých rostlin *A. thaliana* ($884 \text{ pkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$), nejnižší u 6 týdnů starých rostlin *N. tabacum* cv. Samsun ($214 \text{ pkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$).

4.5.2 Aktivita DES z listů rostlin pěstovaných na agarovém médiu

Byly stanovovány také změny specifické aktivity DES z listů *A. thaliana* cv. Columbia a *N. tabacum* cv. Samsun pěstovaných na pevném agarovém médiu (Obr. 34). Pro každé měření bylo použito alespoň 10 rostlinných jedinců.

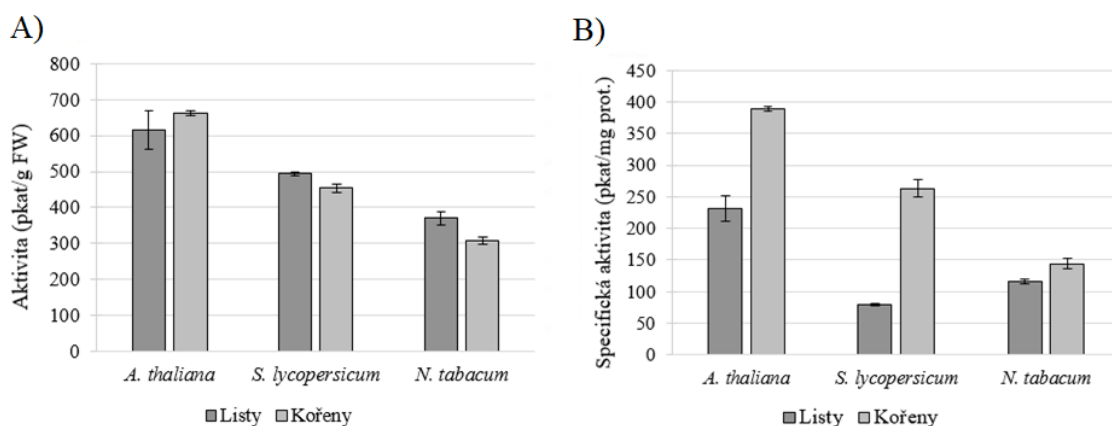


Obr. 34: Změny aktivity DES vztažené na gram čerstvé váhy (A) a specifické aktivity DES (B) z listů rostlin *A. thaliana* cv. Columbia a *N. tabacum* cv. Samsun pěstovaných na agarovém médiu v průběhu vývoje. Směrodatné odchylky odpovídají technickému hexaplikátu.

U tabáku nebyly zjištěny významné změny ve specifické aktivitě DES, u *A. thaliana* došlo k nárůstu mezi 14. a 21. dnem. Aktivita vztažená na gram čerstvé váhy u *A. thaliana* mírně narůstala, u *N. tabacum* mírně klesala. Hodnoty aktivity DES jsou v dobré shodě s hodnotami získanými měřeními aktivity DES z listů rostlin pěstovaných v substrátu. U obou těchto druhů pěstovaných na agarovém médiu byly hodnoty aktivit DES nejbližší hodnotám zjištěným u 4 týdnů starých jedinců pěstovaných v substrátu.

4.5.3 Porovnání aktivity DES v listech a kořenech vybraných rostlinných druhů

Bylo také zjišťováno, zda je aktivita DES měřitelná i v kořenech rostlin, a jak se liší od aktivity DES v listech (Obr. 35). Pro extrakci proteinů z kořenů a listů a následné stanovení aktivity DES byly vybrány 2 týdny staré rostliny *A. thaliana* pěstované na agarovém médiu a 7 týdnů staré rostliny *S. lycopersicum* a *N. tabacum* cv. Maryland pěstované v substrátu. Rostliny *S. lycopersicum* a *N. tabacum* použité pro toto stanovení pocházely z odlišné setby než rostliny použité pro stanovení změn aktivity DES z listů v průběhu vývoje rostlin. Pro každé měření bylo použito alespoň 5 rostlinných jedinců.



Obr. 35: Porovnání aktivity DES vztažené na gram čerstvé váhy (A) a specifické aktivity DES v listech a kořenech *A. thaliana* cv. Columbia, *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a *N. tabacum* cv. Maryland. Směrodatné odchylky odpovídají technickému hexaplikátu.

Rozdíly v aktivitě DES vztažené na gram FW mezi kořeny a listy byly u všech rostlinných druhů minimální. Byly však pozorovány značné rozdíly ve specifické aktivitě DES, především u rajčete, a to z důvodu podstatně většího obsahu proteinů v listech.

5 Diskuze

5.1 Analýza vlastností DES v tabákových buňkách

Pro snadnější studium vlivu různých látek na aktivitu DES tabákových buněk bylo v rámci diplomové práce zjišťováno, za jakých reakčních podmínek metoda stanovení aktivity DES využívající reakci sulfanu s methylenovou modří poskytuje nejvyšší signál absorbance.

Hodnota pH optima DES z *N. tabacum* byla již stanovena na 8,0 (Harrington *et al.*, 1980) a odpovídá hodnotě pH, při které se obvykle provádí měření aktivity DES i z *A. thaliana* (Alvarez *et al.*, 2010), přestože u tohoto rostlinného druhu je pH optimum DES pravděpodobně mnohem vyšší (Burandt *et al.*, 2002).

Mezi možnosti, jak získat vyšší signál při měření aktivity DES tabákových buněk, patří prodloužení reakční doby, změna teploty a přidavek kofaktoru pyridoxalfosfátu. V případě získání vyšších hodnot aktivity DES při vyšší teplotě, než jaká byla dosud používána (37 °C), však obvykle není vhodné současně prodlužovat reakční dobu, protože při vyšší teplotě enzym DES1 rychleji denaturuje a prodloužení reakční doby při vyšší teplotě by vedlo k mnohem menšímu zvýšení absorbance, než by tomu bylo při nižší teplotě.

5.1.1 Stanovení teplotního optima DES

Dosud nebylo v literatuře publikováno, jaké teplotní optimum má enzym DES1 získaný z buněčné suspenze tabákových buněk. Teplotní optimum DES1 z listů *Brassica napus* je 37 °C (Xie *et al.*, 2013). Obvykle se také používá teplota 37 °C i pro měření aktivity DES z *A. thaliana* (Alvarez *et al.*, 2010).

V praktické části diplomové práce bylo ověřováno, zda zvýšení teploty reakční směsi ovlivňuje měřenou aktivitu DES. Nejvyšší hodnota byla získána při 47 °C, a proto veškerá další měření aktivity DES probíhala s použitím této teploty reakční směsi.

5.1.2 Vliv PLP v reakční směsi na aktivitu DES

Pyridoxalfosfát (PLP) působí jako kofaktor L-cysteindesulfhydrasy (Alvarez *et al.*, 2010). Aktivita DES byla podle údajů v literatuře dosud stanovována, aniž by byl PLP přidáván do reakční směsi (Riemenschneider *et al.*, 2005b). Přidavek PLP může vést k získání vyššího signálu při klasickém stanovení aktivity DES pomocí methylenové modří, pokud enzym v daném rostlinném materiálu není kofaktorem nasycen. Pozitivní vliv přídatku PLP na aktivitu DES byl již ověřen v rámci bakalářské práce (Vojtovič,

2016), kdy u některých rostlinných druhů pěstovaných v zahradnickém substrátu (*A. thaliana*, *N. tabacum*, *Cucumis melo*) došlo ke zvýšení aktivity DES.

V praktické části diplomové práce byl zjištěn velmi malý nárůst aktivity DES tabákových buněk po přidavku PLP. Příčinou může být přítomnost pyridoxinu v kultivačním médiu pro tabákové buňky. Pyridoxin je prekurzor pyridoxalfosfátu. V průběhu extrakce proteinů z buněčné suspenze zůstává kovalentně navázán na enzym DES1. Jeho přidavek do reakční směsi proto již nemůže vést k výraznějšímu nárůstu aktivity.

5.2 Testování metod stanovení životnosti tabákových buněk

Životnost byla v praktické části diplomové práce stanovována metodou využívající FDA a metodou využívající Evansovu modř. U první metody bylo zjištěno, že s rostoucím procentuálním zastoupením mrtvých buněk v buněčné suspenzi klesá hodnota naměřené průměrné rychlosti změny intenzity fluorescence. U druhé metody s rostoucím procentuálním zastoupením mrtvých buněk roste hodnota naměřené absorbance.

Amano a kolektiv (2003), kteří ve svých experimentech používali buněčnou kulturu *N. tabacum* cv. Bright Yellow, dospěli k přesnějším výsledkům kalibrací obou metod, ačkoliv zamrazení a rozmrazení suspenze buněk za účelem jejich umrtvení provedli pouze jednou (v praktické části diplomové práce bylo provedeno třikrát). Při stanovení životnosti metodou využívající Evansovu modř naměřili větší rozdíl hodnot absorbance mezi vzorkem s nejvyšším % mrtvých buněk a vzorkem s nejnižším % mrtvých buněk. Příčinou může být lepší umrtvení buněk nebo také použití buněčné kultury o vyšší hustotě buněk. Čím je větší hustota použité buněčné suspenze, tím více buněk je následně zamražením umrtveno, tím více barviva se zadrží, a tím vyšší absorbanci naměříme.

Nevýhodou metody využívající Evansovu modř je především složité technické provedení a časová náročnost. Často během experimentu například dochází k odchlípnutí vaty od dna stříkačky, což vede k úniku buněk a tím i ke znehodnocení vzorku, který pak poskytuje falešně zvýšenou absorbanci.

Během měření životnosti s využitím FDA je nutné dbát na to, aby byl pracovní roztok FDA udržován v chladu a ve tmě. S ohledem na poměrně krátký časový interval, v průběhu kterého se měří nárůst intenzity fluorescence, je vhodné proměřit vždy každý vzorek zvlášť (alespoň po 6 opakováních), neboť s prodlužující se dobou, po kterou je FDA pipetován ke vzorkům buněk do jamek mikrotitrační destičky, roste pravděpodobnost částečného znehodnocení pracovního roztoku FDA na světle v těchto

jamkách před začátkem samotného měření, což může vést k velkým nepřesnostem měření.

Dále je nutné udržovat buňky v pohybu až do doby, kdy je nanášíme do jamek mikrotitrační destičky. Po delší době stání dochází k poklesu životnosti.

Přes výše uvedené nedostatky se metoda stanovení životnosti pomocí FDA jeví rychlejší a jednodušší. Bylo jí proto využito při všech dalších experimentech.

5.3 Změny životnosti tabákových buněk a aktivity DES v různých fázích buněčné kultury

Vývoj suspenzní kultury rostlinných buněk se obvykle dělí do 6 fází: lag fáze, akcelerační fáze, logaritmická (log) nebo exponenciální fáze, fáze zpomalení (decelerační fáze), stacionární fáze a fáze odumírání (Glick *et al.*, 2010). Obvykle nebývá pozorován žádný nárůst počtu buněk ihned poté, co jsou přeneseny do čerstvého média. Lag fáze představuje období po pasážování, v průběhu kterého se buňky adaptují na nové prostředí, ve kterém je podstatně odlišné složení, než bylo ve starém médiu, ze kterého byly buňky odebírány, neboť zde chybí odpadní produkty metabolismu a naopak jsou zde živiny, vitamíny, růstové faktory a další látky v podstatně vyšší koncentraci, než byly ve starém médiu po týdenní kultivaci. Buňkám určitou dobu trvá, než dojde ke znovunastartování jejich metabolismu. K tomu dojde v akcelerační fázi, kdy obvykle poprvé začneme pozorovat nárůst počtu buněk. Následuje exponenciální fáze, v průběhu které se počet buněk rapidně zvyšuje. Poté dochází ke zpomalení nárůstu (decelerace) a buňky vstoupí do stacionární fáze, ve které je většina živin média vyčerpána. V průběhu této fáze zůstává množství biomasy na přibližně stejné úrovni, avšak dochází opět k výrazným změnám v buněčném metabolismu, které vedou k dočasné adaptaci na prostředí s nedostatkem živin. V poslední fázi jsou již vyčerpány i energetické zásoby buňky, jejich metabolická aktivita klesá, následuje buněčná smrt a počet buněk se snižuje (Glick *et al.*, 2010).

5.3.1 Změny životnosti tabákových buněk a hustoty buněčné suspenze v různých fázích buněčné kultury

V praktické části diplomové práce byl pozorován nárůst životnosti tabákových buněk až do 7. dne po pasážování a poté pokles, zatímco hustota buněčné suspenze narůstala až do 8. dne. Dá se předpokládat, že období po 7. dni představuje stacionární fázi, během které dochází v buňkách k výše uvedeným výrazným změnám metabolismu (Glick *et al.*, 2010), které mohou být spojené s výrazným poklesem odbourávání FDA v živých

buňkách. Fáze odumírání je definována poklesem počtu buněk (Glick *et al.*, 2010), který se pravděpodobně nedá odvodit ze změn hustoty stanovené na základě měření objemu a hmotnosti, neboť ani při samotné buněčné smrti se buňky nemusí ihned kompletně rozložit, ale mohou po určitou dobu zůstat v suspenzi přítomné v podobě určitých menších útvarů, jež přispívají k hmotnosti, kterou po odstranění kultivačního média navážíme. Výsledky diplomové práce (Obr. 17) odpovídají zřejmě změnám příslušných parametrů v průběhu fáze exponenciální, fáze zpomalení a stacionární fáze. Přesné určování fází buněčné kultury vyžaduje přímé měření změn počtu buněk v suspenzi, které v rámci diplomové práce nebylo prováděno, protože tabákové buňky kultivaru Xanthi tvoří shluky, v nichž se počet buněk nedá mikroskopicky kvantifikovat.

Harrington a kolektiv (1980) uvádí nejvýraznější nárůst hmotnosti buněčné kultury *N. tabacum* cv. Xanthi mezi 8. a 14. dnem kultivace, přičemž jako střed exponenciální fáze označili 8. den, takže vývoj buněčné kultury byl v jejich případě přibližně dvakrát pomalejší. Hustota buněk od 2. do 18. dne kultivace narostla přibližně devětkrát. Buňky však kultivovali ve tmě v kapalném B5 médiu. Důvodem delšího období života jejich kultury tabákových buněk mohou tedy být odlišné podmínky kultivace a jiný typ kultivačního média. Na rychlost vývoje má také vliv objem pasážovaných buněk, který se mohl značně lišit.

Nagata a kolektiv (1992) uvádí, že za vhodných kultivačních podmínek může dojít v průběhu 7 dní po pasážování (tj. mezi 0. a 7. dnem) k nárůstu počtu buněk v kultuře až na stonásobek. Autoři při experimentu pasážovali 1-1,25 ml buněčné kultury staré 7 dní do 95 ml čerstvého média Linsmaiera a Skooga, kultivace potom probíhala při 130 rpm a při 27 °C ve tmě.

Chandler a kolektiv (1972) provedli měření změn hmotnosti buněk kultivovaných za autotrofních podmínek, tzn. v médiu, jehož složení uvádí tabulka (Tab. 2), s tím rozdílem, že toto médium neobsahovalo sacharosu. Hustota buněk v jejich případě narostla pouze na pětinasobek v průběhu 2 týdnů kultivace. Je zřejmé, že fotosyntetický růst buněčné kultury, při kterém rostliny jako zdroj uhlíku využívají CO₂ namísto cukrů, je značně pomalejší než růst heterotrofní.

Životnost buněk se často uvádí jako procentuální zastoupení živých nebo mrtvých buněk v kultuře, ale v těchto případech bývá její stanovení založeno na metodách, které umožňují určit podíl mrtvých nebo živých buněk přímým způsobem. Například Kobylinska (2017) použila na určení počtu buněk Fuchs-Rosenthalův haemocytometr pod světelným mikroskopem; počet mrtvých buněk byl určen s využitím selektivního

značení mrtvých buněk methylenovou modří. Mrtvých buněk v kultuře začalo výrazněji přibývat až po 6. dni od pasážování, 8. den bylo zastoupení mrtvých buněk v kultuře na přibližně 30 %, což je podstatně méně než v mém případě. Rozdíl je v tomto případě může být způsoben odlišným kultivarem *N. tabacum* (cv. Bright Yellow 2), odlišnými kultivačními podmínkami (Linsmaier-Skoog médium, 100 rpm, 24 °C, tma), popřípadě jiným objemem pasážovaných buněk (v článku nebyl uveden).

5.3.2 Změny aktivity DES tabákových buněk v různých fázích buněčné kultury

V praktické části diplomové práce bylo zjišťováno, zda nedochází k výraznějším změnám aktivity DES v různých fázích buněčné kultury, které by mohly být důsledkem změn složení média, jež jsou způsobené metabolismem kultivovaných buněk. Specifická aktivita DES v průběhu vývoje kultury narůstala, zatímco celková aktivita vztažená k podílu živých buněk zůstávala až do 7. dne přibližně stejná. Její nárůst po 7. dni kultivace může souviset se změnami metabolismu buněk, které vyvolává nedostatek živin v kultivačním médiu ve stacionární fázi buněčné kultury (Glick *et al.*, 2010).

Harrington a kolektiv (1980) naměřili poměrně výrazný nárůst specifické aktivity DES v exponenciální fázi růstu, konkrétně mezi 8. a 12. dnem po pasážování. U kultury tabákových buněk používaných v diplomové práci tato fáze přibližně odpovídá dnům 4 až 6, kdy došlo k nárůstu specifické aktivity o 44 %.

5.4 Vliv kryptogeinu

Kryptogein je protein sekretovaný fytopatogenní houbou *Phytophthora cryptogea*. Jedná se o hydrofilní protein s molární hmotností $10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ s jednou hydrofobní kapsou a třemi disulfidovými můstky. Je schopen vázat a přenášet steroly, čímž interferuje s metabolismem rostlinných buněk. Negativní účinek tohoto elicitoru se ve vyšších koncentracích projevuje zejména nekrózou rostlinných buněk (Mikes *et al.*, 1997).

Kryptogein indukuje fosforylaci mnoha proteinů, depolarizaci buněčné membrány spojené s influxem Ca^{2+} do cytosolu a efluxem K^+ a Cl^- , alkalizaci extracelulárního média a aktivaci membránově vázané NADPH-oxidasy (EC 1.6.3.1). Indukuje rovněž expresi genů zodpovědných za obranu rostlin vůči patogenům (Binet *et al.*, 2001).

V praktické části diplomové práce byl pozorován výrazný pokles životnosti tabákových buněk stresovaných kryptogeinem o koncentraci 5 a 50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 24 hodinách působení, zatímco při koncentracích 1 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a nižších nebyly detekovány žádné změny.

Binet a kolektiv (2001) pozorovali negativní vliv kryptogeinu po 24 hodinách ještě i při koncentraci $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, kdy pod mikroskopem napočítali přibližně 20 % mrtvých buněk. Pro stanovení buněčné smrti použili neutrální červen vstupující do lysosomů živých buněk. Buňky, jež ztratily membránovou integritu a tím i zbarvení, byly považovány za odumírající.

Mikroskopické stanovování počtu živých a mrtvých buněk nebylo v rámci diplomové práce prováděno z důvodu značného shlukování buněk, které neumožňuje rozlišit jednotlivé buňky pod mikroskopem.

Amano a kolektiv (2003), kteří stanovovali životnost buněk metodou s FDA, pozorovali v průběhu prvních 4 hodin pokles životnosti tabákových buněk stresovaných kryptogeinem o koncentraci $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ přibližně na 60 % vzhledem ke kontrolnímu vzorku, zatímco v mém případě to bylo 81 %.

Vzhledem k tomu, že není známo, do jaké míry jsou proteiny v odumírajících buňkách denaturovány a v jakém funkčním stavu v nich přetrvávají, může mít celková aktivita DES vztažená k podílu živých buněk větší vypovídací hodnotu než aktivita vztažená na množství proteinů (tj. specifická aktivita). Na základě zjištěného vlivu kryptogeinu na celkovou aktivitu vztaženou k podílu živých buněk můžeme konstatovat, že živé buňky reagují na stres nadprodukcí sulfanu.

Shi a kolektiv (2015) naměřili nárůst aktivity DES na přibližně šestinásobek vlivem působení patogenního mikroorganismu *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 na *A. thaliana* po 3 hodinách působení. Hladina mRNA pro DES vzrostla dokonce 25krát. V praktické části diplomové práce byl pozorován výrazný nárůst celkové aktivity vztažené k podílu živých buněk vlivem biotického stresu (na jedenáctinásobek) až po 24 hodinách (v intervalu mezi 4. a 24. hodinou od přídatku elicitoru však aktivita měřená nebyla). Výsledky získané měřením změn aktivity DES v *A. thaliana* napadené bakteriálním patogenem se však od výsledků získaných měřením změn aktivity DES v buněčné kultuře *N. tabacum* ošetřené elicitorem mohou značně lišit.

5.5 Vliv L-cysteinu v médiu

Ačkoliv L-cystein může sloužit jako živina, kterou mohou buňky využít pro svůj metabolismus, v praktické části byl ve srovnání s kontrolou pozorován pokles životnosti tabákových buněk po přídatku L-cysteinu do média. L-cystein se i při poměrně nízké koncentraci ($0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) jevil spíše jako nežádoucí látka, která mohla negativně

ovlivňovat aktivitu proteinů například v důsledku modifikace aminokyselinových zbytků (Romero *et al.*, 2014).

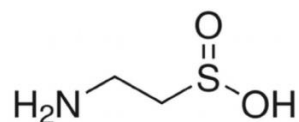
Dosud nebylo publikováno, při jakých koncentracích způsobuje L-cystein buněčnou smrt u rostlin. V praktické části diplomové práce bylo pozorováno prakticky úplně odumření buněčné kultury tabákových buněk vlivem L-cysteinu o koncentraci $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v průběhu 24 hodin. Pro srovnání uvádím toxický vliv L-cysteinu v médiu na houbu *Neurospora crassa*, u které byl vlivem L-cysteinu o koncentraci $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v průběhu 72 hodin zaznamenán pokles růstu na 19 až 20 % v porovnání s nestresovanou houbou (Adigo *et al.*, 1962).

Aktivita DES vlivem L-cysteinu v médiu oproti kontrole narůstala pravděpodobně za účelem adaptace na vyšší obsah L-cysteinu, který je obvykle vhodné odbourat, aby se v buňkách nehromadil do toxických koncentrací. L-cystein o koncentraci $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ způsobil přibližně 30% nárůst specifické aktivity DES. Harrington a kolektiv (1980) naměřili po 24 h působení L-cysteinu o této koncentraci dokonce více než dvojnásobnou hodnotu specifické aktivity DES v porovnání se vzorkem obsahujícím místo L-cysteinu serin, který vykazuje strukturní homologii s cysteinem, ale neobsahuje síru.

Ačkoliv je L-cystein v koncentracích $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a vyšších pro eukaryotické buňky látkou značně toxickou, při koncentraci $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl zjištěn pozitivní vliv L-cysteinu na tabákové buňky stresované kryptogeinem (životnost narůstala). Současně byl naměřen pokles aktivity DES, takže se dá předpokládat, že u stresovaných buněk je omezena degradace exogenního L-cysteinu, aby mohl být využit při obraně rostlin vůči stresu, například navýšením antioxidační kapacity (Lopez-Martin *et al.*, 2008) nebo indukci tvorby fytoalexinů (Zook a Hammerschmidt, 1997). Aktivita DES vedoucí k produkci sulfanu, jehož signální funkce se rovněž uplatní během odpovědi rostliny na stres (Shi *et al.*, 2015), však mohla být zvýšená v intervalu mezi 4. a 24. hodinou, kdy měření z časových důvodů neprobíhalo. Výsledky získané po 24 hodinách jsou v souladu se závěrem Alvaréze a kolektivu (2012), že zvýšený obsah cysteinu v cytosolu je spojen se zvýšenou rezistencí rostliny vůči patogenům, i s jejich výsledky naznačujícími, že *des1* mutanty *A. thaliana* jsou více rezistentní k patogenům.

5.6 Vliv hypotaurinu

Hypotaurin (HT; Obr. 36) v buňkách reaguje se sulfanem za vzniku thiotaurinu (Ortega *et al.*, 2008), čímž snižuje množství využitelného sulfanu v buňkách.



Obr. 36: Hypotaurin (převzato z Terriente-Palacios *et al.*, 2019).

V praktické části diplomové práce byl pozorován pokles životnosti tabákových buněk stresovaných kryptogeinem vlivem HT, ačkoliv životnost nestresovaných tabákových buněk nebyla vlivem HT snížena prakticky vůbec. U rostlin napadených houbovým patogenem může vychytání sulfanu HT znemožnit rostlinám bránit se vůči patogenům toxickým působením sulfanu. Avšak vzhledem k tomu, že použité rostlinné buňky v kultuře nebyly napadené houbovým patogenem, pouze ošetřené elicitorem kryptogeinem, naznačuje tento vliv HT, že má sulfan uplatnění i v signálních drahách, které se podílí na vzniku rezistence vůči biotickému stresu.

Výsledky jsou v souladu s výsledky Shi a kolektivu (2015), kteří po ošetření rostlin *A. thaliana* HT naměřili nižší hladinu endogenního sulfanu a pozorovali pokles rezistence rostlin vůči biotickému i abiotickému stresu.

Specifická aktivita DES i celková aktivita DES vztažená k podílu živých buněk vlivem HT narůstala u buněk stresovaných i nestresovaných, aby byl doplněn deficit sulfanu vzniklý přítomností hypotaurinu. Nárůst aktivity DES vlivem HT u nestresovaných buněk naznačuje, že sulfan má v rostlinách i jiné biologické funkce, než je obrana vůči stresu. Například Fang a kolektiv (2014) uvádí, že má roli i v signální dráze auxinu vedoucí k tvorbě postranních kořenů u rostlin. Do jaké míry a při jakých dějích se uplatňuje v buněčných kulturách však zůstává neobjasněno.

5.7 Vliv hydrogensulfidu a sulfidu sodného

Hydrogensulfid a sulfid sodný působí jako donory sulfanu (Shi *et al.*, 2015; Alvarez *et al.*, 2012b).

V praktické části diplomové práce byl zaznamenán výrazný nárůst životnosti tabákových buněk stresovaných kryptogeinem po přidávku NaHS, ačkoliv samotný NaHS vliv na životnost neměl. Závěr, že dodání sulfanu navyžuje rezistenci vůči biotickému stresu, je v souladu s dříve publikovanými výsledky (Shi *et al.*, 2015), že u rostlin *A. thaliana* ošetřených NaHS došlo k posílení obranných mechanismů vůči *P. syringae* pv. tomato DC3000.

Vliv NaHS na aktivitu DES nedávno zkoumali Khan a kolektiv (2018) při studiu úlohy L-cysteindesulfhydrasy v navození tolerance rostlin roketu seté (*Eruca sativa*)

vůči dehydrataci. Ačkoliv vlivem NaHS o koncentraci $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ narostl obsah hydrogensulfidu v rostlině o více než 40 %, ke změně aktivity DES nedošlo. V rámci diplomové práce bylo potvrzeno, že aktivita DES u nestresovaných buněk zůstává vlivem NaHS přibližně neměnná, přídavek NaHS však vedl ke značnému snížení celkové aktivity DES vztažené k podílu živých buněk stresovaných kryptogeinem. Je možné, že přítomnost hydrogensulfidu v médiu za podmínek biotického stresu vede po 24 hodinách k inhibici DES a umožní tabákovým buňkám využít L-cystein jiným způsobem při obraně buněk vůči biotickému stresu. Khan a kolektiv (2018) však pozorovali zvýšení aktivity DES u rostlin *Eruca sativa* stresovaných suchem vlivem NaHS. Jedná se však o odlišný druh rostliny, o odlišný typ stresu, proto porovnávání výsledků nemá příliš význam.

Účinek Na_2S byl podobný jako účinek NaHS, ale mnohem méně výrazný. Na_2S použili jako donor sulfanu Alvarez a kolektiv (2012b) při studiu úlohy DES1 v procesu autofagie a zjistili, že ošetření *des1* mutantů *Arabidopsis* Na_2S potlačuje autofagii způsobenou deficitem enzymu DES1 a eliminuje fenotypové defekty tohoto mutantu.

5.8 Aktivita DES vybraných rostlin pěstovaných v substrátu a na agarovém médiu

Míra exprese DES se mění v průběhu vývoje rostliny podle toho, k jakým fyziologickým procesům v rostlině v dané fázi vývoje dochází (Laureano-Marin *et al.*, 2014). K nejvyšší expresi *DES1* u *A. thaliana* dochází v počátečních a konečných stádiích vývoje rostlin. Předpokládá se tedy určitá role DES1 v těchto vývojových stádiích. Při použití *des1* mutantů jsou pozorovány fenotypové odlišnosti v těchto vývojových stádiích. Je nutné podotknout, že autoři použili na stanovení míry exprese *DES1* u 14 dní starých semenáčků rostliny pěstované na pevném MS médiu, zatímco ve zbývajících stádiích byla měřena aktivita DES z rostlin pěstovaných v substrátu.

Pokles úrovně transkripce genu *DES1* u *A. thaliana* v průběhu prvních fází vývoje rostlin, který pozorovali Laureano-Marin a kolektiv (2014), nekorresponduje s výsledky této diplomové práce, kde byl zjištěn nárůst aktivity DES vztažené na gram FW. Klesala pouze hodnota specifické aktivity DES. Nesoulad může být způsoben například odlišnou intenzitou translace mRNA kódující protein DES1 nebo posttranslačními modifikacemi proteinu DES1 vedoucími k inhibici aktivity DES. Vliv mohou mít i podmínky použitého fytotronu, v němž z neznámých důvodů roste *A. thaliana* velmi pomalu.

Rozdíl mezi aktivitou DES/FW ze 14 dní starých semenáčků *A. thaliana* pěstovaných na agarovém MS médiu a aktivitou DES/FW ze stejně starých semenáčků pěstovaných

v substrátu byl podobný jako rozdíl v míře genové exprese *DES1* u takto starých rostlin *A. thaliana* pěstovaných těmito způsoby (Laureano-Marin *et al.*, 2014), a to i přesto, že autoři použili MS médium prosté sacharosy.

Alvarez a kolektiv (2010) uvádí specifickou aktivitu DES z listů 5 týdnů starého *A. thaliana* 206,7 pkat·mg⁻¹ proteinu. V rámci diplomové práce byla u takto starých rostlin naměřena specifická aktivita 310,9 pkat·mg⁻¹, u 6 týdnů starých rostlin 177,9 pkat·mg⁻¹, což jsou hodnoty poměrně blízké hodnotám uváděným v literatuře. V případě *A. thaliana* pěstovaných na agarovém MS médiu však byla naměřená specifická aktivita téměř třikrát vyšší než uvádí literatura (Alvarez *et al.*, 2010).

Riemenschneider a kolektiv (2005b) uvádí specifickou aktivitu DES z listů 4 týdnů starého *A. thaliana* (ekotyp C24) 1667 pkat·mg⁻¹ proteinu, což je více než čtyřikrát více, než bylo naměřeno v rámci diplomové práce (383,4 pkat·mg⁻¹) u takto starých rostlin *A. thaliana* ekotypu Columbia. Autoři však použili vyšší hodnotu pH pufru Tris (9,0), v němž probíhala enzymová reakce (v diplomové práci byl použit pufr Tris s pH 8,0). Rozdíl ve výsledcích je v souladu s údaji v článku Burandta a kolektivu (2002), který uvádí, že aktivita DES z *A. thaliana* s rostoucím pH narůstá až do hodnoty 10,0.

U rostlin *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, *N. tabacum* cv. Samsun a *N. tabacum* cv. Maryland byly pozorovány odlišné změny aktivity DES vztažené na gram FW v porovnání s *A. thaliana* a ačkoliv specifická aktivita DES podobně jako u *A. thaliana* v průběhu vývoje klesala, byla výrazně nižší než u *A. thaliana*. Důvodem může být vzájemná nepřibuznost těchto druhů rostlin. Tabák virginský (*Nicotiana tabacum*) a rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*) patří do čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), zatímco huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) patří do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), (Rosypal, 2003).

Rostliny z čeledi brukvovitých se vyznačují schopností syntetizovat značné množství sekundárních metabolitů obsahujících síru, například glukosinolátů a fytoalexinů (Bednarek, 2012). Právě u brukvovitých plodin, jako je řepka olejka (*Brassica napus*), byla také poprvé popsána souvislost mezi náchylností rostlin k napadení patogenními houbami a nízkým obsahem síry v půdě navozeným v průběhu 80. let lidskou činností (Schnug *et al.*, 1995; Bloem *et al.*, 2015). Vysoká aktivita DES v listech *A. thaliana* zřejmě přímo souvisí s intenzivním metabolismem síry, který je pro tyto druhy rostlin typický.

Na produkci sulfanu z L-cysteinu u *S. lycopersicum* se podílí minimálně 4 proteiny (SIOAS4, SIOAS6, v menší míře SIOAS2 a SIOAS5). *SIOAS4* gen vykazuje silnou expresi v nezralých zelených plodech, zatímco *SIOAS6* gen je exprimován převážně ve vegetativních orgánech a v květech (Liu *et al.*, 2019).

Laureano-Marin a kolektiv (2014) pozorovali expresi *DES1* genu v kořenech 14 dní starých semenáčků *A. thaliana* pěstovaných na agarovém médiu, zatímco u 35 dní starých jedinců pěstovaných v substrátu nebyla exprese měřitelná. Exprese genů *SIOAS5* a *SIOAS6*, jejichž produkty vykazují DES aktivitu v *S. lycopersicum*, byla v kořenech detekována Liu a kolektivem (2019). Detekce aktivity DES v kořenech může podpořit hypotézu, že sulfan produkovaný DES1 má roli v signální dráze auxinu, která stimuluje tvorbu postranních kořenů (Fang *et al.*, 2014). V diplomové práci byla ověřena přítomnost aktivity DES v kořenech *A. thaliana* pěstovaných na agarovém médiu a v kořenech *N. tabacum* a *S. lycopersicum* pěstovaných v substrátu.

6 Závěr

V teoretické části diplomové práce jsou popsány:

- význam a regulace L-cysteinu a z něj odvozených metabolitů v rostlinách
- role sulfanu a L-cysteinu v odpovědích rostlin na biotické stresy
- přehled znalostí o enzymu DES1 v rostlinách

Výsledky experimentální části diplomové práce se dají shrnout následovně:

- V průběhu vývoje buněčné kultury tabákových buněk narůstala specifická aktivita DES, celková aktivita DES vztažená k podílu živých buněk zůstávala přibližně stejná do 7. dne, poté rovněž rostla. Podíl živých buněk v průběhu vývoje klesal, celková hustota buněk narůstala.
- Životnost tabákových buněk vlivem elicitoru kryptogeinu klesala, aktivita DES vztažená k podílu živých buněk narůstala.
- Vlivem L-cysteinu došlo k poklesu životnosti tabákových buněk a k nárůstu aktivity DES.
- L-cystein a donory sulfanu, NaHS a Na₂S, navýšily životnost tabákových buněk stresovaných kryptogeinem, jejich vlivem byl u těchto buněk zaznamenán pokles celkové aktivity DES vztažené k podílu živých buněk.
- Lapač sulfanu hypotaurin způsobil snížení životnosti tabákových buněk stresovaných kryptogeinem a zvýšení aktivity DES u těchto buněk.
- Specifická aktivita DES klesala v průběhu vývoje rostlin (*A. thaliana*, *S. lycopersicum* a *N. tabacum*) pěstovaných v substrátu, aktivita vztažená na gram čerstvé váhy narůstala u *A. thaliana*, u zbylých druhů zůstávala přibližně stejná
- Aktivita DES byla detekována i v kořenech *A. thaliana*, *S. lycopersicum* a *N. tabacum*

Do budoucna se nabízí studium vlivu patogenních organismů na aktivitu DES rostlin pěstovaných v substrátu. Rovněž by bylo vhodné zavést jiné metody detekce sulfanu v buňkách a v listech, například konfokální mikroskopii využívající specifických fluorescenčních sond pro sulfan.

7 Literatura

- Adigo P. R., Sastry K. S. a Sarma P. S. (1962): Amino Acid Interrelationships in Cysteine Toxicity in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology* **29**, 149 – 155.
- Alvarez C., Calo L., Romero L. C., García I., Gotor C. (2010): An O-Acetylserine(thiol)lyase Homolog with L-Cysteine Desulfhydrase Activity Regulates Cysteine Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **152**, 656 – 669.
- Alvarez C., Bermúdez M. A., Romero L. C., Gotor C., García I. (2012): Cysteine homeostasis plays an essential role in plant immunity. *New Phytologist* **193**, 165 – 177.
- Alvarez C., García I, Moreno I., Pérez-Pérez M. E., Crespo J. L., Romero L. C. a Gotor C. (2012b): Cysteine-Generated Sulfide in the Cytosol Negatively Regulates Autophagy and Modulates the Transcriptional Profile in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**, 4621 – 4634.
- Amano T., Hirasawa K., O'Donohue M. J., Pernolle J. C. a Shioi Y. (2003): A versatile assay for the accurate, time-resolved determination of cellular viability. *Analytical Biochemistry* **314**, 1 – 7.
- Aroca A., Benito J. M., Gotor C. a Romero L. C. (2017): Persulfidation proteome reveals the regulation of protein function by hydrogen sulfide in diverse biological processes in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **68**, 4915 – 4927.
- Bednarek P. (2012): Sulfur-Containing Secondary Metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other *Brassicaceae* with Function in Plant Immunity. *ChemBioChem* **13**, 1846 – 1859.
- Beffa T. (1993): Inhibitory-action of elemental sulphur on fungal spores. *Canadian Journal of Microbiology* **39**, 731 – 735.
- Bermúdez M. A., Páez-Ochoa M. A., Gotor C. a Romero L. C. (2010): *Arabidopsis* S-sulfocysteine synthase activity is essential for chloroplast function and long-day light-dependent redox control. *The Plant Cell* **22**, 403 – 416.
- Bermúdez M. A., Galméz J., Moreno I., Mullineaux P. M., Gotor C. a Romero L. C. (2012): Photosynthetic adaptation to length of day is dependent on S-sulfocysteine synthase activity in the thylakoid lumen. *Plant Physiology* **160**, 274 – 288.
- Binet M. N., Humbert C., Lecourieux D., Vantard M. a Pugin A. (2001): Disruption of Microtubular Cytoskeleton Induced by Cryptogein, an Elicitor of Hypersensitive Response in Tobacco Cells. *Plant Physiology* **125**, 564 – 572.
- Bloem E., Riemenschneider A., Volker J., Papenbrock J., Schmidt A., Salac I., Haneklaus S. a Schnug E. (2004): Sulphur supply and infection with *Pyrenopeziza brassicae* influence L-cysteine desulphydrase activity in *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2305 – 2312.
- Bloem E., Haneklaus S., Salac I., Wickenhauser P. a Schnug E. (2007): Facts and fiction about sulfur metabolism in relation to plant-pathogen interactions. *Plant Biology* **9**, 596 – 607.
- Bloem E., Haneklaus S., Kesselmeier J. a Schnug E. (2012): Sulfur Fertilization and Fungal Infections Affect the Exchange of H₂S and COS from Agricultural Crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 7588 – 7596.
- Bloem E., Haneklaus S. a Schnug E. (2015): Milestones in plant sulfur research on sulfur-induced-resistance (SIR) in Europe. *Frontiers in Plant Science* **5**, Article 779, 1 – 12.
- Buchanan B.B. a Balmer Y. (2005): Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 187–220.
- Burandt P., Papenbrock J., Schmidt A., Bloem E., Haneklaus S. a Schnug E. (2001): Genotypical differences in total sulfur contents and cysteine desulfhydrase activities in *Brassica napus* L. *Phyton* **41**, 75 – 86.
- Burandt P., Schmidt A. a Papenbrock J. (2002): Three O-acetyl-L-serine(thiol)lyase isoenzymes from *Arabidopsis* catalyse cysteine synthesis and cysteine desulfuration at different pH values. *Journal of Plant Physiology* **159**, 111 – 119.
- Calderwood A. a Kopriva S. (2014): Hydrogen sulfide in plants: From dissipation of excess sulfur to signaling molecule. *Nitric Oxide* **41**, 72 – 78.

- Chandler M. T., Marsac N. T. a Kouchkovsky Y. (1972): Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Canadian Journal of Botany* **50**, 2265 – 2270.
- Couturier J., Chibani K., Jacquot J. P. a Rouhier N. (2013): Cysteine-based redox regulation and signaling in plants. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1 – 7.
- Dong J., Chen C. a Chen Z. (2003): Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* **51**, 21 – 37.
- Droux M., Ruffet M. L., Douce R. a Job D. (1998): Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants – structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *European Journal of Biochemistry* **255**, 235 – 245.
- Fang T., Cao Z., Li J., Shen W. a Huang L. (2014): Auxin-induced hydrogen sulfide generation is involved in lateral root formation in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* **76**, 44 – 51.
- Garcia I., Castellano J. M., Vioque B., Solano R., Gotor C. a Romero L. C. (2010): Mitochondrial β -Cyanoalanine Synthase Is Essential for Root Hair Formation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **22**, 3268 – 3279.
- Garcia I., Rosas T., Bejarano E. R., Gotor C. a Romero L. C. (2013): Transient Transcriptional Regulation of the CYS-C1 Gene and Cyanide Accumulation upon Pathogen Infection in the Plant Immune Response. *Plant Physiology* **162**, 2015 – 2027.
- Garcia-Mata C a Lamattina L. (2010): Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytologist* **188**, 977–984.
- Geilfus C. M. (2017): The pH of the Apoplast: Dynamic Factor with Functional Impact Under Stress. *Molecular Plant* **10**, 1371 – 1386.
- Glick B. R., Pasternak J. J. a Patten Ch. L. (2010): Large-Scale Production of Proteins in Recombinant Microorganisms. In: *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* 4. ASM press, Washington, D. C., USA, 685 – 722.
- Gotor C. a Romero L. C. (2013a): S-sulfocysteine synthase function in sensing chloroplast redox status. *Plant Signaling and Behavior* **8**, e23313.
- Gotor C., Garcia I., Crespo J. L. a Romero L. C. (2013b): Sulfide as a signaling molecule in autophagy. *Autophagy* **9**, 609 – 611.
- Green V. S., Stott D. E. a Diack M. (2006): Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 693 – 701.
- Haag A. F., Kerscher B., Dall Angelo S., Sani M., Longhi R., Baloban M., Wilson H. M., Mergaert P., Zanda M. a Ferguson G. P. (2012): Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodule-specific, cysteine-rich peptide. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 10791 – 10798.
- Hancock J. T., Whiteman M. (2014): Hydrogen sulfide and cell signalling: team player or referee? *Plant Physiology and Biochemistry* **78**, 37 – 42.
- Harrington H. M. a Smith I. K. (1980): Cysteine Metabolism in Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiology* **65**, 151 – 155.
- Heidenreich T., Wollers S., Mendel R. R. a Bittner F. (2005): Characterization of the NifS-like Domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* Provides Insight into the Mechanism of Molybdenum Cofactor Sulfuration. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 4213 – 4218.
- Heldt H. W. a Piechulla B. (2010): Sulfate assimilation enables the synthesis of sulfur containing compounds. In: *Plant Biochemistry*. Vydání 4, Academic Press, USA, 324 – 336.
- Hou S., Yang Y., Wu D. a Zhang Ch. (2011): Plant immunity: evolutionary insights from PBS1, Pto, and RIN4. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 794 – 799.
- Howarth J. R., Dominguez-Solis J. R., Gutierrez-Alcala G., Wray J. L., Romero L. C. a Gotor C. (2003): The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. *Plant Molecular Biology* **51**, 589–598.
- Hughes P., Dennis E., Whitecross M., Llewellyn D. a Gage P. (2000): The cytotoxic plant protein, beta-purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 823 – 827.
- Jacob C., Giles G. I., Giles N. M. a Sies H. (2003): Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angewandte Chemie International Ed. in English* **42**, 4742–4758.

- Jin Z., Xue S., Luo Y., Tian B., Fang H., Li H. a Pei Y. (2013): Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **62**, 41 – 46.
- Kassemeyer H. H. (2003): Untersuchungen zur Entwicklung des Myzels und der Konidien von *Uncinula necator* und deren Einfluß auf die Epidemiologie. <http://www.infodienst.bwl.de/mlr/Forschung/2000/Pflanzenschutz>.
- Khan M. N., Mobin M., Abbas Z. K. a Siddiqui M. H. (2017): Nitric oxide-induced synthesis of hydrogen sulfide alleviates osmotic stress in wheat seedlings through sustaining antioxidant enzymes, osmolyte accumulation and cysteine homeostasis. *Nitric Oxide* **68**, 91 – 102.
- Khan M. N., AlZuaibr F. M., Al-Huqail A. A., Siddiqui M. H., Ali H. M., Al-Muwayhi M. A. a Al-Haque H. N. (2018): Hydrogen Sulfide-Mediated Activation of O-Acetylserine (Thiol) Lyase and L/D-Cysteine Desulfhydrase Enhance Dehydration Tolerance in *Eruca sativa* Mill. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 1 – 18.
- Kobylinska A. (2017): Exogenous quercetin as a proliferation stimulator in tobacco BY-2 cells. *Journal of Elementology* **22**, 245 – 258.
- Krueger S., Niehl A., Lopez-Martin M. C., Steinhauser D., Donath A., Hildebrandt T., Romero L. C., Hoefgen R., Gotor C. a Hesse H. (2009): Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* **32**, 349–367.
- Kruse C., Jost R., Lipschis M., Kopp B., Hartmann M. a Hell R. (2007): Sulfur-enhanced defence: effects of sulfur metabolism, nitrogen supply, and pathogen lifestyle. *Plant Biology* **9**, 608 – 619.
- Kuc J. (1994): Relevance of Phytoalexins – A Critical Review. *Acta Horticulturae* **381**, 526 – 539.
- Kuzniak E. a Sklodowska M. (2005): Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* **222**, 192–200.
- Laureano-Marin A. M., Garcia I., Romero L. C. a Gotor C. (2014): Assessing the transcriptional regulation of L-cysteine desulfhydrase 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **5**, 683.
- Leustek T., Martin M. N., Bick J. A. a Davies J. P. (2000): Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 141 – 165.
- Lewandowska M. a Sirko A. (2008): Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochimica Polonica* **55**, 457 – 471.
- Li Z. G. (2015): Synergistic effect of antioxidant system and osmolyte in hydrogen sulfide and salicylic acid crosstalk-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Signaling and Behavior* **10**, e1051278.
- Li Z. G. a Gu S. P. (2016): Hydrogen sulfide as a signal molecule in hematin-induced heat tolerance of tobacco cell suspension. *Biologia Plantarum* **60**, 595 – 600.
- Liu Z., Fang H., Pei Y., Jin Z., Zhang L. a Liu D. (2015): WRKY transcription factors down-regulate the expression of H₂S-generating genes, LCD and DES in *Arabidopsis thaliana*. *Science Bulletin* **60**, 995 – 1001.
- Liu D., Lu J., Li H., Wang J. a Pei Y. (2019): Characterization of the O-acetylserine(thiol)lyase gene family in *Solanum lycopersicum* L. *Plant Molecular Biology* **99**, 123 – 134.
- Lopez-Martin M.C.; Becana M.; Romero L. C. a Gotor C (2008): Knocking Out Cytosolic Cysteine Synthesis Compromises the Antioxidant Capacity of the Cytosol to Maintain Discrete Concentrations of Hydrogen Peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**, 562 – 572.
- McGrath S. P., Zhao F. J. a Withers P. J. A. (1996): Development of sulphur deficiency in crops and its treatment. *Proceedings of the Fertiliser Society* **379**, 1 – 47.
- Mendoza-Cozatl D. G., Jobe T. O., Hauser F, a Schroeder J. I. (2011): Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 554 – 562.

- Metaxas M. A. a Delwiche E. A. (1955): The L-cystein desulphhydrase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **70**, 735 – 737.
- Mikes V., Milat M. L., Ponchet M., Ricci P. a Blein J. P. (1997): The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS letters* **416**, 190 – 192.
- Miller R. N. G., Costa Alves G. S. a Van Sluys M. A. (2017): Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany* **119**, 681 – 687.
- Nagata T., Nemoto Y. a Hasezawa S. (1992): Tobacco BY-2 Cell Line as the „HeLa“ Cell in the Cell Biology of Higher Plants. *International Review of Cytology* **132**, 1 – 30.
- Nagy P., Pálincás Z., Nagy A., Budai B., Tóth I., Vasas A. (2014): Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochimica et Biophysica Acta* **1840**, 876 – 891.
- Ortega J. A., Ortega J. M. a Julian D. (2008): Hypotaurine and sulfhydryl-containing antioxidants reduce H₂S toxicity in erythrocytes from a marine invertebrate. *Journal of Experimental Biology* **211**, 3816 – 3825.
- Papenbrock J., Riemenschneider A., Kamp A., Schulz-Vogt H. N. a Schmidt A. (2007): Characterization of Cysteine-Degrading and H₂S-Releasing Enzymes of Higher Plants – From the Field to the Test Tube and Back. *Plant Biology* **9**, 582 – 588.
- Rausch T. a Wachter A. (2005): Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science* **10**, 503–509.
- Rea P. A. (2012): Phytochelatin synthase: of a protease a peptide polymerase made. *Physiologia Plantarum* **145**, 154–164.
- Rennenberg H. a Filner P. (1982): Stimulation of H₂S emission from pumpkin leaves by inhibition of glutathione synthesis. *Plant Physiology* **69**, 766 – 770.
- Rennenberg H. (1983): Role of O-acetylserine in hydrogen sulfide emissions from pumpkin leaves in response to sulfate. *Plant Physiology* **73**, 560–565.
- Rennenberg H., Arabatzis N. a Grundel I. (1987): Cysteine desulphhydrase activity in higher plants: Evidence for the action of L- and D-cysteine specific enzymes. *Phytochemistry* **26**, 1583 – 1589.
- Riemenschneider A., Wegele R., Schmidt A. a Papenbrock J. (2005): Isolation and characterization of a D-cysteine desulphhydrase protein from *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS Journal* **272**, 1291 – 1304.
- Riemenschneider A., Nikiforova V., Hoefgen R., De Kok L. J. a Papenbrock J. (2005b): Impact of elevated H₂S on metabolite levels, activity of enzymes and expression of genes involved in cysteine metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 473 – 483.
- Riemenschneider A. (2006): *Isolation and characterization of cysteine- degrading and H₂S-releasing proteins in higher plants*. Disertační práce, Univerzita Hannover, Německo.
- Richau K. H., Kaschani F., Verdoes M., Pansuriya T. C., Niessen S., Stuber K., Colby T., Overkleeft H. S., Bogyo M. a Van der Hoorn R. A. (2012): Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiology* **158**, 1583 – 1599.
- Romero L., García I. a Gotor C. (2013): L-Cysteine Desulphhydrase 1 modulates the generation of the signaling molecule sulfide in plant cytosol. *Plant Signaling and Behavior*, e24007-1 – e24007-2.
- Romero L. C., Aroca M. A., Laureano-Marin A. M., Morena I., García I. a Gotor C. (2014): Cysteine and Cysteine-Related Signaling Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **7**, 264 – 276.
- Rosypal S. (2003): Systém rostlin. In: *Nový přehled biologie*. Scientia, pedagogické nakladatelství, Praha, 262 – 298.
- Salac I., Bloem E., Sutherland K. G., Schnug E., Haneklaus S., Booth E. J. a Walker K. C. (2005): Sulfur Nutrition and Its Significance for Crop Resistance – a Case Study from Scotland. *Landbauforschung Volkenrode Sonderheft* **283**, 110 – 119.
- Scuffi D., Alvarez C., Laspina N., Gotor C., Lamattina L. a Garcia-Mata C. (2014): Hydrogen Sulfide Generated by L-Cysteine Desulphhydrase Acts Upstream of Nitric Oxide to Modulate Abscisic Acid-Dependent Stomatal Closure. *Plant Physiology* **166**, 2065 – 2076.

- Shi H., Ye T., Han N., Bian H., Liu X. a Chan Z. (2015): Hydrogen sulfide regulates abiotic stress tolerance and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* **57**, 628 – 640.
- Schnug E., Booth E., Haneklaus S. a Walker K. C. (1995): Sulphur Supply and Stress Resistance in Oilseed Rape. *Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress*, 229 – 231.
- Siegel L. M. (1965): A direct microdetermination for sulfide. *Analytical Biochemistry* **11**, 126 – 132.
- Tahir J., Wanatabe M., Jing H. C., Hunter D. A., Tohge T., Nunes-Nesi A., Brotman Y., Fernie A. R., Hoefgen R. a Dijkwel P. P. (2013): Activation of R-mediated innate immunity and disease susceptibility is affected by mutations in a cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **73**, 118 – 130.
- Takahashi H., Kopriva S., Giordano M., Saito K. a Hell R. (2011): Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 157 – 184.
- Terriente-Palacios C., Diaz I. a Castellari M. (2019): A validated ultra-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry method to simultaneously quantify taurine, homotaurine, hypotaurine and amino acids in macro- and microalgae. *Journal of Chromatography A* **1589**; 83 – 92.
- Tweedy B. G. (1981): Inorganic sulfur as fungicide. *Residue Reviews* **78**, 43–68.
- Van Hoewyk D., Pilon M. Pilon-Smits E. H. H. (2008): The functions of NifS-like proteins in plant sulfur and selenium metabolism. *Plant Science* **174**, 117 – 123.
- Vojtovič D. (2016): *Biologické funkce sulfanu*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Wallsgrave R., Bennett R., Kiddle G., Bartlet E. a Ludwig-Mueller J. (1999): Glucosinolate Biosynthesis and Pest Disease Interactions. Canbarra, CBR: Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress.
- Wanatabe M., Kusano M., Oikawa A., Fukushima A., Noji M. a Saito K. (2008): Physiological roles of the beta-substituted alanine synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**, 310 – 320.
- Wang J., Zhang J., Ma Y., Wang L., Yang L., Shi S a Liu L. (2003): Crop Resistance to Diseases as Influenced by Sulphur Application Rates. *Proceedings of the 12th World Fertilizer Congress*, August 3–9, 2001, Beijing, China, 1285–1296.
- Williams J. S., Hall S. A., Hawkesford M. J., Beale M. H. a Cooper R. M. (2002): Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiology* **128**, 150 – 159.
- Wirtz M., Droux M., and Hell R. (2004). O-acetylserine (thiol) lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1785–1798.
- Wirtz M. a Hell R. (2006): Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology* **163**, 273 – 296.
- Xie Y., Lai D., Mao Y., Zhang W., Shen W. a Guan R. (2013): Molecular Cloning, Characterization, and Expression Analysis of a Novel Gene Encoding L-Cysteine Desulfhydrase from *Brassica napus*. *Molecular Biotechnology* **54**, 737 – 746.
- Xie Y., Zhang Ch., Lai D., Sun Y., Samma M. K., Zhang J. a Shen W. (2014): Hydrogen sulfide delays GA-triggered programmed cell death in wheat aleurone layers by the modulation of glutathione homeostasis and heme oxygenase-1 expression. *Journal of Plant Physiology* **171**, 53 – 62.
- Yang Z., Haneklaus S., De Kok L. J., Schnug E. a Singh B. R. (2006): *Phyton-Annales Rei Botanicae* **46**, 55 – 70.
- Yi H., Galant A., Ravilious G. E., Preuss M.L., a Jez J.M. (2010): Sensing sulfur conditions: simple to complex protein regulatory mechanisms in plant thiol metabolism. *Molecular Plant* **3**, 269–279.

Zook M. and Hammerschmidt R. (1997): Origin of the thiazole ring of camalexin, a phytoalexin from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **113**, 463–468.

8 Seznam použitých symbolů a zkratek

2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
ATG8	Autophagy-related protein 8 (protein 8 vztažený k autofágii)
CAS-C1	β -kyanoalaninsynthasa
CoA	Koenzym A
COS	Sulfid karbonylu
DES	L-cysteindesulfhydrasová aktivita
DES1	L-cysteindesulfhydrasa (protein)
DMPPDA	N,N-dimethyl-p-fenylendiamin
DTT	Dithiothreitol
ETI	Effector-triggered immunity (imunita spuštěná efektoem)
ETS	Effector-triggered susceptibility (náchylnost spuštěná efektoem)
FDA	Fluoresceindiacetát
FW	Fresh weight (čerstvá váha)
GSH	Glutathion (redukovaný)
HT	Hypotaurin
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkinasová kaskáda
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MS	Murashige and Skoog
OAS	O-acetylserin
OAS-A1	Cytosolární izoforma OASTL
OAS-B	Chloroplastová izoforma OASTL
OAS-C	Mitochondriální izoforma OASTL
OASTL	O-acetylserinlyasa
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (molekulární vzory patogenů)
PLP	Pyridoxalfosfát
PR	Pathogenesis related (vztažené k patogenezi)
PRR	Pattern recognition receptors (receptory rozpoznávající vzory)
<i>Pst</i> DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000
PTI	Pathogen-associate molecular patterns-triggered immunity (imunita spuštěná molekulárními vzory patogenů)
ROS	Reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
SAM	S-adenosylmethionin

SAT	Serinacetyltransferasa
SCS	<i>S</i> -sulfocysteinsynthasa
SDS	Dodecylsíran sodný
SIR	Sírou indukovaná rezistence
SSCS	<i>S</i> -sulfocysteinsynthasová reakce nebo aktivita
T3SE	Type III secreted effectors (sekretované efekторы typu 3)