Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

KOPIE

Olomouc 2017 **Bc. Michaela Rajnohová**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky

Vliv kadmia na produkci reaktivních forem kyslíku u *Chlamydomonas reinhardtii*

Diplomová práce

Bc. Michaela Rajnohová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

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

Konzultant: Mgr. Marek Rác, Ph.D.

Olomouc 2017

Práce byla podpořena interními granty Univerzity Palackého v Olomouci IGA_PrF_2016_001 a IGA_PrF_2017_001.

KOPIE

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím literárních zdrojů a materiálů uvedených v seznamu citované literatury.

V Olomouci, dne ....

Bc. Michaela Rajnohová

SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá vlivem abiotického stresu na řasy *Chlamydomonas reinhardtii* s využitím kmene CC002 (wild type, WT) a dvou odvozených mutantních kmenů (bez buněčné stěny a bez lipoxygenázové aktivity). Byly studovány krátkodobé a dlouhodobé účinky expozice řas kadmiu ve formě chloridu kademnatého. Krátkodobé působení (do 2 h) vyvolalo tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), které ve vysokých koncentracích narušují strukturu a funkci proteinů, lipidů a DNA. Vybrané ROS byly histochemickým barvením a konfokální mikroskopií lokalizovány, intenzita signálu fluorochromů byla vyhodnocena obrazovou analýzou. Koncentrace 100 mg/l $CdCl_2$ vyvolala vyšší tvorbu ROS, především při expozici 2 h, zatímco koncentrace 400 mg/l $CdCl_2$ indukovala již ultrastrukturální změny buněk (změna velikosti buněk, morfologie chloroplastu, vakuolizace až lyze buněk). Produkce singletního kyslíku byla nejvyšší u koncentrace 400 mg/l po 2 h. Fluorescenční signál odpovídající produkci superoxidových radikálů byl slabý a mezi variantami nebyly patrné rozdíly. Produkce singletního kyslíku byla potvrzena elektronovou paramagnetickou rezonanční spektroskopií, superoxidový radikál byl opět detekován v minimální míře. Narušení lipidů v membránách buněk vlivem hydroperoxidových radikálů vznikajících při stresu bylo stanoveno spektrofotometricky. Lipidová peroxidace byla nejvyšší u mutantního kmene bez buněčné stěny, který byl nejcitlivější k působení kadmia. Dlouhodobý účinek na růst a množení buněk studovaných kmenů byl studován v průběhu 6 dnů kultivace v tekutém médiu s kadmiem. Ovlivnění růstové křivky bylo patrné u všech kmenů, přičemž nízké koncentrace kadmia podpořily dělení buněk, zatímco vysoké koncentrace byly pro buňky letální. Schopnost regenerace stresovaných kultur byla následně ověřena kultivací v médiu bez kadmia.

SUMMARY

This thesis deals with the influence of abiotic stress on *Chlamydomonas reinhardtii* algae using CC002 strain (wild type, WT) and two derived mutant strains (without cell wall and without lipoxygenase activity). Short-term and long-term effects of exposure to cadmium in the form of cadmium chloride were studied. Short-term exposure (up to 2h) has led to the formation of reactive oxygen species (ROS) which, in high concentrations, disrupt the structure and function of proteins, lipids and DNA. Selected ROS were localized by histochemical staining and confocal microscopy, the fluorescence signal intensity then assessed by image analysis. Concentration of 100 mg/l of $CdCl_2$ induced higher ROS formation, especially after 2h, while 400 mg/l $CdCl_2$ induced changes in cell ultrastructure (change in cell size, chloroplast morphology, vacuolization up to lysis of cells). Singlet oxygen production was the highest at 400 mg/l after 2 h. The fluorescence signal corresponding to the production of superoxide radical was weak and no variation was apparent in between the variants. Singlet oxygen production was confirmed by electron paramagnetic resonance spectroscopy, and the superoxide radical was again detected in minimal amounts. Disruption of lipids in cell membranes due to hydroperoxide radicals formation resulting from stress was determined spectrophotometrically. Lipid peroxidation was the highest in the mutant strain which lacks the cell wall and thus is the most sensitive to cadmium exposure. The long-term effect on cell growth and multiplication of the studied strains was studied during 6 days of culturing in the liquid medium with cadmium. Influence of the growth curve was evident in all strains, with low cadmium concentrations encouraging cell division, whereas high concentrations were lethal for the cells. The ability to regenerate stressed cultures was subsequently verified by culturing in a cadmium-free environment.

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat své vedoucí doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za její obětavost, trpělivost, cenné rady a zejména za psychickou podporu, kterou mi poskytovala během zpracování mé diplomové práce. Také ji děkuji za její odbornou pomoc a čas strávený během mé experimentální části.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Markovi Rácovi, Ph.D., z Katedry Biofyziky PřF UP, který mi svými konzultacemi pomáhal při řešení mnoha problémů, které se v průběhu zpracování práce vyskytly. Děkuji mu za přátelský přístup a čas v laboratoři, který mi obětoval během několika víkendů. Děkuji však celému zastoupení Katedry Biofyziky PřF UP, za možnost pracovat v jejich laboratořích a využívat jejich materiály a přístroje, potřebné k dokončení výsledků mé práce.

Mé velké díky patří hlavně mé milované rodině, která mě vždy podporovala z psychické, morální, ale i z finanční stránky a umožnila mi tak dokončit magisterské studium. Závěrem bych chtěla poděkovat mému příteli, který mi byl vždy po boku a udržoval ve mně vždy optimistické myšlení a motivaci k dosažení mého vytouženého cíle.

KOPIE

OBSAH

1 CÍLE PRÁCE 8
2 ÚVOD 9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED 10
3.1 *Chlamydomonas reinhardtii* 10
3.1.1 Obecná charakteristika 10
3.1.2 Buněčná stavba 10
3.1.3 Rozmnožování 11
3.1.4 Růstová křivka 12
3.1.5 Význam 13
3.2 Genetická transformace zelených řas 14
3.2.1 Transformace buněk pomocí elektroporátoru NEPA21 15
3.2.2 Transformace buněk pomocí *Agrobacterium tumefaciens* 15
3.3 Abiotický stres 16
3.3.1 Těžké kovy 17
3.3.1.1 Význam těžkých kovů v buňce 18
3.3.1.2 Toxicita těžkých kovů 18
3.3.2 Mechanismus toxicity těžkých kovů na buněčné úrovni 18
3.3.3 Mechanismus toxicity těžkých kovů na molekulární úrovni 19
3.3.4 Tolerance a detoxikace těžkých kovů u řas 19
3.3.4.1 Produkce extracelulárních vazebných polypeptidů 19
3.3.4.2 Metalothioneiny 19
3.3.4.3 Vyloučení kovu z buňky 20
3.3.4.4 Vnitřní detoxikace 21
3.3.4.5 Transformace kovu 21
3.4 Kadmium 22
3.4.1 Krátkodobý stres kadmiem 22
3.4.2 Dlouhodobý stres kadmiem 22
3.5 Reaktivní formy kyslíku 22
3.5.1 Charakteristika ROS 22
3.5.2 Produkce a metabolismus ROS 23
3.5.3 Biologické cíle a důsledky působení ROS 26
3.5.3.1 Lipidová peroxidace 27
3.5.3.1.1 Lipidová peroxidace indukovaná působením enzymů 27
3.5.3.1.2 Lipidová peroxidace indukovaná působením ROS 28
3.5.3.1.3 Metody stanovení úrovně lipidové peroxidace 29

3.5.4 Odbourávání ROS 30
3.5.4.1 Antioxidační systémy 30
3.5.5 Metody studia ROS 31
4 MATERIÁL A METODY 33
4.1 Biologický materiál 33
4.1.1 Příprava LOX mutanta 34
4.2 Přístroje 35
4.3 Kultivace a inokulace *C. reinhardtii* 36
4.4 Aplikace stresu kadmiem 37
4.5 Stanovení koncentrace buněk 38
4.5.1 Stanovení koncentrace buněk pomocí Bürkerovy komůrky 38
4.5.2 Spektrofotometrické stanovení optické hustoty buněk 38
4.5.3 TC20^{TM} Automatický počítač buněk 39
4.6 Konfokální mikroskopie a analýza obrazu 40
4.7 Elektronová paramagnetická rezonance 42
4.7.1 Stanovení produkce organických hydroperoxidů 43
4.7.1.1 Extrakce lipidů (Folchova extrakce) 43
4.7.1.2 FOX assay 44
5 VÝSLEDKY 45
5.1 Vyhodnocení růstu jednotlivých kmenů řas 45
5.2 Ověření knockoutu genu pro enzym lipoxygenázu u LOX kmene 46
5.3 Srovnání metod stanovení hustoty buněk 46
5.4 Vyhodnocení krátkodobého účinku kadmia na řasy 48
5.4.1 Detekce produkce ROS konfokální mikroskopií 48
5.4.2 Detekce produkce singletního kyslíku konfokální mikroskopií 54
5.4.3 Detekce produkce superoxidového radikálu konfokální mikroskopií 58
5.4.4 Ověření produkce singletního kyslíku pomocí EPR 63
5.4.5 Ověření produkce superoxidového radikálu pomocí EPR 66
5.4.6 Stanovení úrovně lipidové peroxidace 68
5.5 Vyhodnocení dlouhodobého účinku kadmia na řasy 70
6 DISKUSE 76
7 ZÁVĚR 82
8 SEZNAM LITERATURY 83
9 PŘEHLED ZKRATEK 93
10 PŘÍLOHY 95

1 CÍLE PRÁCE

Náplní mé diplomové práce bylo studium dlouhodobého a krátkodobého účinku kadmia, tj. důležitého těžkého kovu, na produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) u řas, konkrétně modelového druhu *Chlamydomonas reinhardtii.*

Prvním cílem bylo zpracování literárního přehledu k problematice metabolismu reaktivních forem kyslíku u řas, roli ROS ve stresové fyziologii rostlin a zejména mechanismům působení a toxicity těžkých kovů u řas.

Cíle praktické části lze shrnout následovně:

- vyhodnotit dynamiku růstu *C. reinhardtii*, tj. srovnat růstové křivky wild-typu a mutantních kmenů CC406 (bez buněčné stěny) a LOX mutanta (knockoutovaný gen kódující enzym lipoxygenázu) v tekutém médiu;
- testovat vliv kadmia (koncentrace, doby působení) na životnost a růst řas;
- při krátkodobém působení studovat produkci a lokalizaci ROS (pomocí elektronové paramagnetické rezonance, resp. konfokální laserové skenovací mikroskopie), při dlouhodobém působení ověřit možnosti regenerace řas;
- stanovit úroveň lipidové peroxidace u řas pomocí spektrofotometrie

KOPIE

2 ÚVOD

V přírodě jsou zelené řasy často vystaveny mnoha stresorům ať už abiotické či biotické povahy. V závislosti na intenzitě či době působení daného stresoru dochází v buňce k mnoha jevům, které buď dostávají buňku do stresu, nebo ji poškozují natolik, že dojde přímo k narušení struktur buňky a následně také k buněčné smrti.

Vzhledem k tomu, že jsou řasy součástí vodních ekosystémů, které jsou často znečištěny těžkými kovy, je důležité nejen chemicky stanovit míru znečištění, ale také studovat toxické účinky těžkých kovů na buněčné i molekulární úrovni. Proto má diplomová práce pojednává o vlivu těžkého kovu, konkrétně kadmia, na růst a fyziologii modelové řasy rodu *Chlamydomonas reinhardtii*. Tato práce se však zaměřuje zejména na účinky, které lze pozorovat v brzké fázi působení daného stresoru jako je produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou svou přítomností v buňce vyvolat stresovou reakci nebo dokonce narušovat buněčné struktury jako jsou lipidy, proteiny a DNA.

Nejvíce zastoupenými reaktivními formami kyslíku jsou singletní kyslík, peroxid vodíku, superoxidový a hydroxylový radikál. U řas *C. reinhardtii* byla produkce singletního kyslíku na katedře Biofyziky Přf UP již studována, avšak pouze po vystavení buněk nadměrnému osvětlení, vysoké teplotě a chladového šoku. V publikovaných studiích byl již sledován účinek několika těžkých kovů jako je rtuť, kadmium, měď a zinek, avšak většina z těchto prací se nezaměřovala na určitý typ kovu a jeho účinky poškození, ale jednalo se o působení více těžkých kovů a studium jejich účinků jako je změna pH buňky, aktivity antioxidačních enzymů, množství chlorofylu či ovlivnění fotosystémů v procesu fotosyntézy. Obecně jsou vlivy a účinky kadmia více prostudovány u vyšších rostlin než u řas.

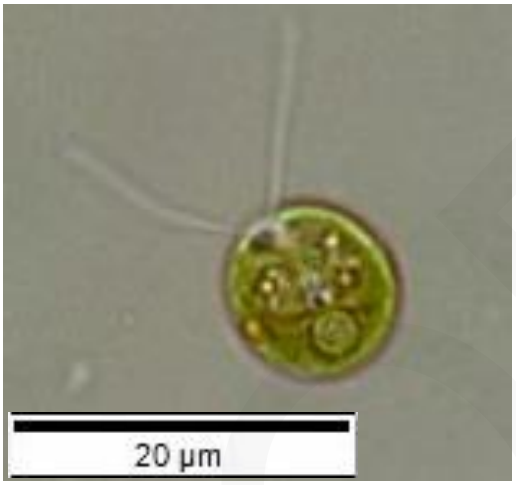
V této práci bylo studováno krátkodobé a dlouhodobé působení kadmia ve formě chloridu kademnatého o různé koncentraci na buňky řas tří kmenů *C. renhardtii*. Při krátkodobé inkubaci buněk s kadmiem byla sledována zejména produkce reaktivních forem kyslíku, peroxidace lipidů a při dlouhodobé kultivaci byl sledován zejména účinek na růst, životnost a regeneraci řas.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

3.1.1 Obecná charakteristika

Chlamydomonas reinhardtii patří mezi zelené řasy (Obr. 1), které se řadí do říše *Plantae* a její název byl popsán v roce 1888 P. A. Dangeardem, který jej pojmenoval po ukrajinském botanikovi Ludwigu Reinhard(t)ovi (Harris, 2009). Tyto jednobuněčné fototrofní řasy žijí jak ve sladkých, tak i ve slaných vodách a v přírodě hrají důležitou roli v primární produkci organické hmoty. Řasy jsou rozmanitou skupinou organismů s různými typy stélek (Kalina *et* Váňa, 2005).



Doména:	Eukarya
Říše:	Plantae
Oddělení:	Chlorophyta
Třída:	Chlorophyceae
Řád:	Volvocales
Pořád:	Chlamydomonadineae
Čeleď:	Chlamydomonadaceae
Rod:	Chlamydomonas

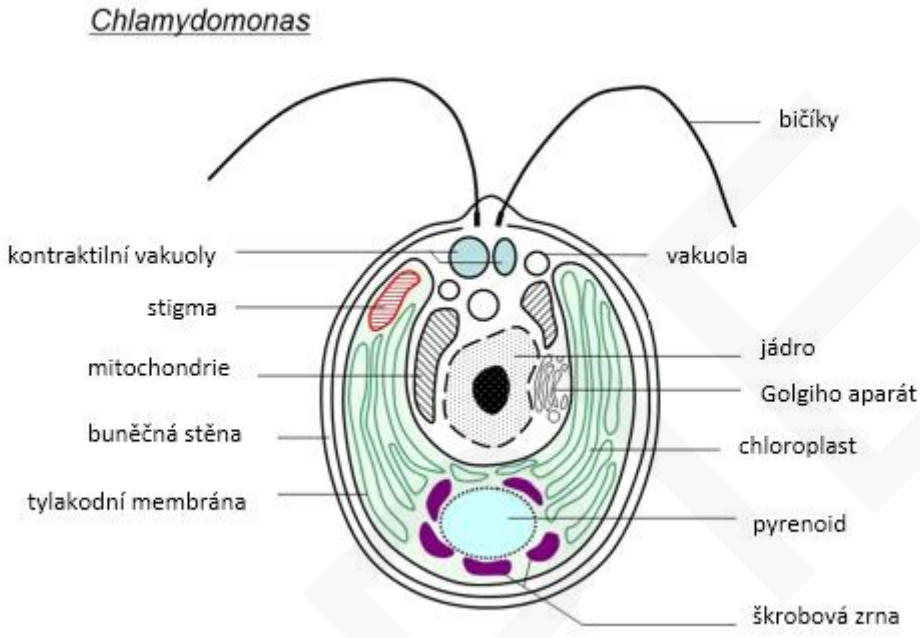
Obr. 1: Detail buňky *C. reinhardtii* a systematické zařazení druhu.

3.1.2 Buněčná stavba

Buňka *Chlamydomonas* ve vegetativní fázi má v průměru asi 10 µm a může být sférická, hruškovitá, elipsoidní či sub-válcovitá. V přední části je buňka více zašpičatělá a prodloužená, jelikož zde dochází k tvorbě apikálních papil. U některých druhů r. *Chlamydomonas* se na povrchu buněčné stěny vytváří slizový obal.

V cytosolu buňky jsou přítomny organely (Obr. 2) jako je jádro, kontraktilní vakuoly s respirační a osmoregulační funkcí, či chloroplast, který zabírá největší část buňky. Chloroplast obsahuje fotosyntetická barviva (chlorofyl a, b) a je schopen měnit svůj tvar dle intenzity světla. Součástí chloroplastu je také červená světločivná skvrna „stigma“, která obsahuje karotenoidy, oranžovo-červené pigmenty citlivé na světlo, umožňující pohyb za světlem, tj. fototaxi. Součástí chloroplastu je také pyrenoid, což je oválné nebo kulovité bílkovinné tělísko obalené škrobovými zrny, obsahující enzymy jako např. RUBISCO, který

hraje důležitou roli v temnostní fázi fotosyntézy, kdy se syntetizují polysacharidy. V apikální části buňky jsou taktéž ukotveny dva bičíky, které umožňují buňkám pohyb a reprodukci (Harris, 2009).



Obr. 2: Stavba buňky řasy rodu *Chlamydomonas.* (Převzato z: <http://cronodon.com>).

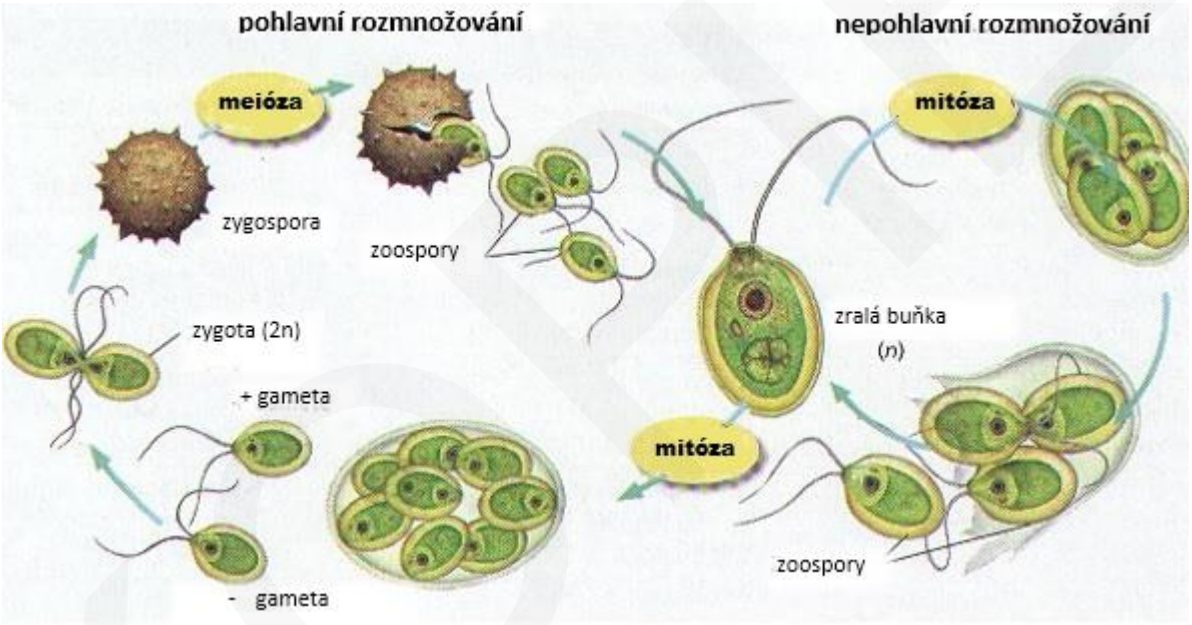
3.1.3 Rozmnožování

Buňky zástupců r. *Chlamydomonas* se mohou rozmnožovat sexuálně i asexuálně. V prostředí s dostatkem živin dochází k nepohlavnímu rozmnožování. Naopak v prostředí s deficitem živin zahajují pohlavní rozmnožování (Kalina *et* Váňa, 2005).

V *in vitro* podmínkách se buňky řas rozmnožují zejména nepohlavně (Obr. 3). Nepohlavní rozmnožování je zahájeno v příznivých podmínkách s dostatkem živin a začíná vznikem zoospor. Během tvorby zoospory se buňka stává nepohyblivou, přičemž jsou bičíky zataženy nebo přímo zlikvidovány. Kontraktilní vakuoly se přestanou stahovat a celý protoplast se začne podélně dělit na dvě části. Současně také dochází k rozdělení každého dceřiného protoplastu. Každému rozdělení protoplastu předchází rozdělení jádra na mnoho částí. Tímto způsobem jedna buňka vyprodukuje 2-16 nových dceřiných buněk, kolem kterých se následně začne zakládat nová buněčná stěna a dva bičíky. Později se začnou objevovat také kontraktilní vakuoly a stigma. Tento proces dělení se opakuje každých 12-24 h, jedná se o tzv. „doubling time“, což je doba, za kterou se počet buněk zdvojnásobí.

Pohlavní rozmnožování *Chlamydomonas* probíhá pouze vzácně (za vhodných podmínek) a zahrnuje tři fáze, a to gametogenezi, syngamii a vznik zygospory (Obr. 3).

V procesu gametogeneze dochází k opakovanému rozdělení protoplastu, za vzniku 16-32 pohyblivých gamet z jediné buňky. Ty jsou následně uvolněny do prostředí, kde dochází k syngamii, při které probíhá fúze gamet za vzniku zygoty. Na základě podmínek a způsobu fúze se rozeznává několik druhů syngamie. A to izogamie, anizogamie a oogamie. Z gamety následně vznikají zygospory, neboli výtrusy, které se vyznačují silnou stěnou, která je chrání před extrémními podmínkami a za příznivých okolností začínají zygospory zrát. Diploidní jádro se meioticky dělí za vzniku čtyř haploidních dceřiných jader, ze kterých vznikají dceřiné buňky, u kterých dochází k obnově buněčné stěny a bičíků (Kalina *et* Váňa, 2005).



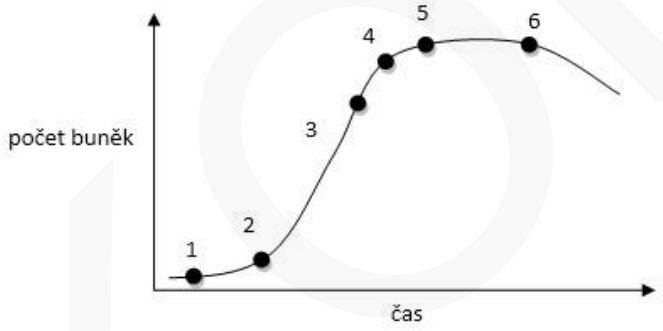
Obr. 3: Rozmnožování řas rodu *Chlamydomonas.* (Převzato z / upraveno podle Goodenough, 1978).

3.1.4 Růstová křivka

Dynamiku množení a úhynu buněk v tekutém médiu při statické kultivaci lze vyjádřit tzv. růstovou křivkou, která vyjadřuje závislost množství živých buněk v médiu na čase (Obr. 4). Po naočkování řas do čerstvého tekutého média se buňky adaptují na nové prostředí, syntetizují buněčné složky, ale nedělí se (lag fáze). Délka této fáze závisí na mnoha faktorech, jako je objem média, počáteční koncentrace buněk, ale také fáze buněčného cyklu, ve které se inokulované buňky nacházejí. Následuje fáze zrychleného růstu, kdy se intenzita metabolismu již přizpůsobených buněk zvyšuje, a začínají se dělit. Tuto fázi ovlivňují faktory jako je pH, intenzita světla, teplota či přítomnost živin. Následně buňky přecházejí do exponenciální fáze,

intenzivně se dělí, jejichž počet narůstá geometrickou řadou. Dělení probíhá konstantní rychlostí a úbytek buněk odumíráním je v poměru k přírůstku minimální. V této fázi jsou živiny rychle spotřebovávány a hustota buněk se rychle zvyšuje, což výrazně ovlivňuje dostupnost světla. Změny prostředí způsobí přechod buněk do fáze zpomaleného růstu, kdy rychlost dělení klesá a počet odumírajících buněk narůstá vlivem vyčerpání živin a hromadění metabolitů. V další tzv. stacionární fázi kultura dosahuje maximálního počtu vitálních buněk, rychlost dělení je nulová a počet odumírajících buněk odpovídá přírůstku nových buněk. Tempo odumírání buněk se zvyšuje v tzv. fázi poklesu či zrychleného odumírání, kdy převažuje úbytek buněk nad jejich přírůstkem (Willey *et al.*, 2008).

Dynamika růstu tedy závisí především na kultivačních podmínkách. Je zřejmé, že se charakteristika růstové křivky může lišit i podle použitého kmene daného druhu, např. v pomalejší/rychlejší adaptaci buněk, nástupu exponenciální fáze, maximální hustotě buněk ve stacionární fázi. Proto je nutné pro každý kmen za daných kultivačních podmínek růstovou křivku stanovit. Pro studium negativního účinku různých faktorů (fyzikálních, chemických) je optimální použít buňky v exponenciální fázi, na kterých je působení těchto faktorů nejlépe patrné (Lavens *et* Sorgeloos, 1996).



1. Lag fáze
2. Fáze zrychleného růstu
3. Fáze exponenciální
4. Fáze zpomaleného růstu
5. Fáze stacionární
6. Fáze zrychleného umírání

Obr. 4: Příklad růstové křivky řas r. *Chlamydomonas.* (Převzato z: Lavens *et* Sorgeloos, 1996).

3.1.5 Význam

Zelené řasy jsou důležitou součástí biosféry, vyskytují se téměř ve všech biotopech, od extrémně chladných až po extrémně teplé oblasti Země (Gaur *et* Rai, 1994). Řasy rodu *Chlamydomonas* jsou často využívány jako modelové organismy, jejich genom je relativně snadno transformovatelný, čímž poskytuje možnost studovat různé metabolické dráhy. Výzkum na řasách zahrnuje studium základních biologických procesů, fotosyntézy, regulace

buněčného cyklu, buněčné motility, a také využití jejich metabolických procesů k výrobě biopaliv (Merchant *et al*., 2007).

Buňky řas jsou vybaveny tenkou buněčnou stěnou, proto slouží k indikaci znečištění povrchových vod. Kromě indikace zvýšení trofie vod se zelené řasy využívají také v procesech souvisejících s odstraňováním těžkých kovů z odpadních vod. Jejich studiem můžeme získat důležité informace o toxických účincích polutantů, např. jak organismy ve vodním ekosystému reagují na kontaminaci vod těžkými kovy (Awad *et* Chu, 2005). Organické a anorganické sorbenty těžkých kovů (Loy *et al*., 2004) byly nahrazeny biodegradačními procesy, při kterých se využívá schopnosti mikrobiální biomasy z vodních ekosystémů těžké kovy eliminovat, ať už jsou to právě řasy (Perales-Vela *et al*., 2006), houby (Bang *et al*., 2000) či bakterie (Loy et *al*., 2004). Řasy mají schopnost akumulovat těžké kovy díky metabolicky nebo fyzikálně-chemicky zprostředkovanému příjmu a vazbě kovu. Jedná se o tzv. proces biosorpce, který je využíván např. při čištění odpadních vod (Vieira *et* Volesky, 2000).

3.2 Genetická transformace zelených řas

Zelené řasy jsou důležitým modelovým organismem pro studium mnoha biologických procesů zejména na molekulární úrovni (Den *et al*., 2001; Harris, 2001; Rochaix, 1995). Řasy rodu *Chlamydomonas* jsou lehce transformovatelné, tudíž existuje již sbírka různě geneticky upravených kultur odvozených od wild-typu (WT) této řasy, které vznikly různými DNA transformačními technikami (Chlamydomonas Resource Center, 2017).

Největším problémem při genetické transformaci mikroskopických řas je přítomnost buněčné stěny. U některých kmenů je možné buněčnou stěnu enzymaticky odstranit, avšak díky variabilitě jejího složení je nutné protokoly pro tvorbu životaschopných protoplastů optimalizovat pro jednotlivé kmeny řas.

Vývoj transformačních technik pro *C. reinhardtii* byl usnadněn zejména dostupností mutantního kmene cw-15 (cell wall), který postrádá buněčnou stěnu. Studie Kindle *et al.* (1990) ukázala, že je možná genetická transformace cw-mutantů, a to mícháním buněk se skleněnými kuličkami s exogenní DNA v přítomnosti polyethylenglykolu. Srovnatelné výtěžnosti (1-10 transformantů z 10^6 buněk) bylo dosaženo i další metodou transformace *C. reinhardtii* plazmidovou DNA s využitím tzv. „silicon carbid (SiC) whiskers“, jehliček karbidu křemíku (Dunahay, 1993). V případě použití silikonu byla však životnost buněk vyšší, ca 80 % při míchání 10 min. Vyzkoušenou biolistickou metodou transformace je využití mikroprojektilů, u které dochází k injikaci wolframových či zlatých

kuliček obalených DNA dovnitř buňky (Blowers *et al*., 1989; Boynton *et al*., 1998). U těchto metod je nutné využívat mutanty bez buněčné stěny nebo ji enzymaticky odstranit, např. pomocí metalo-proteázy gametolysinu (Kinoshita *et al*., 1992; Kubo *et al*., 2001). Avšak tyto přístupy jsou spojeny s problémy jako je křehkost cw mutantů, což je například pro měření fotosyntetické aktivity řas nežádoucí, či časová náročnost přípravy gametolysinu a následného odstranění buněčné stěny. Alternativní transformační metody zahrnují transformace řas bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* a speciální transformace elektroporací tzv. NEPA21, která nevyžaduje proces odstranění buněčné stěny a je poněkud jednodušší.

3.2.1 Transformace buněk pomocí elektroporátoru NEPA21

Pro transformaci pomocí klasické elektroporace je zapotřebí použít cw mutantní typ nebo odstranit buněčnou stěnu. Existuje však metoda transformace divokého typu, bez nutnosti odstranění buněčné stěny, a to elektroporace generující čtvercový elektrický puls tzv. NEPA21 (Obr. 5). Ačkoliv se NEPA21 široce využívá k transformaci zvířecích buněk *in vivo* i *in vitro* (Kusuzawa *et al.*, 2012, Miyata *et al.*, 2012), není tento elektroporátor tolik využívaný pro transformaci jiných typů buněk jako jsou buňky rostlin, hub či řas. Zjistilo se však, že po optimalizaci podmínek lze tuto metodu pro transformaci řas uplatnit, a to upravením a optimalizací elektrických podmínek. Použitím této metody u řas lze získat až 3880 transformantů na µg DNA (Yamano *et al*., 2012).

Obr. 5: Elektroporátor NEPA21 (Nepa Gene Co., Ltd., 2017).

3.2.2 Transformace buněk pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

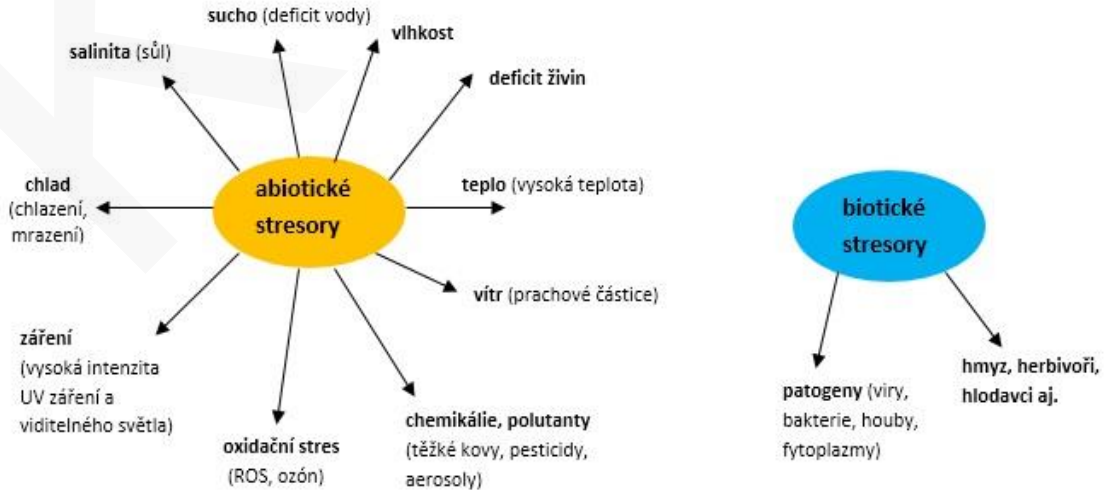
A. tumefaciens je gramnegativní půdní bakterie, původce nádorů (na různých orgánech) rostlin. Transformace buněk cílového organismu probíhá přenosem T-DNA bakterie, která je součástí tzv. *Ti* plazmidu, do hostitelského genomu.

Genový přenos je iniciován aktivitou *Ti* plazmidu, který exprimuje geny virulence (*vir*), jako odpovědi na přítomnost nízkomolekulárních fenolových sloučenin, jako je například acetosyringon (AS) (Gelvin, 2000). Jedná se o přenos relativně velkého segmentu DNA (až 150 kb), při kterém dochází k preferenční inzerci T-DNA do potencionálně transkribovaných oblastí a integraci jedné kopie transgenu do rostlinných chromozomů (Hamilton *et al*., 1996; Hiei *et al*., 1994; Kumria *et al*., 2001). Tato metoda byla hlavním způsobem přenosu genů u mnoha dvouděložných i jednoděložných rostlin, včetně obilovin. V dnešní době se přenos genů tímto způsobem uplatňuje také u hub (Bundock *et al.*, 1995; Groot *et al*, 1998), HeLa buněk (Hamilton *et al*., 1996; Hiei *et al*., 1994; Kumria *et al*., 2001) a řas. U řas byl popsán přenos T-DNA z *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí geny kódující β-glukuronidázu (GUS), zelený fluorescenční protein (GFP) a hygromycin fosfotransferázu (HPT), do jaderného genomu *Chlamydomonas* (Kumar *et al*., 2004).

3.3 Abiotický stres

V reakci na abiotický stres vyvolaný chemickými a fyzikálními faktory (Obr. 6.) dochází stejně jako při biotickém stresu (interakce s živými, většinou patogenními organismy) k mnoha změnám, které inhibují metabolismus biologického systému (Jones *et* Jones, 1989).

Prostředí bohaté na kyslík vzniklo díky fotosyntéze rostlin a je důležité pro dýchání organismů. Řada vznikajících reaktivních meziproduktů kyslíku však může být pro buňku smrtelná, především dojde-li k narušení rovnováhy mezi absorpcí světla a využitím světelné energie (u fotosyntetizujících buněk). Změny v životním prostředí mohou rovnováhu mezi tvorbou a odbouráváním radikálů narušit, což může vést k nadprodukci reaktivních forem kyslíku, tzv. ROS (Asada, 1996).



Obr. 6: Rozdělení stresových faktorů. (Převzato z: Mahajan *et* Tuteja, 2005).

Všechny organismy, tedy i řasy jsou často vystaveny stresu vlivem měnících se podmínek životního prostředí. Mezi obranné mechanismy patří zejména aktivita antioxidačních enzymů, které jsou důležité k eliminaci reaktivních forem. Přestože vysoká hladina ROS při oxidačním stresu je pro buňku smrtelná, v nízkých koncentracích slouží jako důležité signální molekuly (Ikner *et* Shiozaki, 2005).

3.3.1 Těžké kovy

Stres vyvolaný těžkými kovy se řadí pod abiotický stres vyvolaný působením chemických faktorů. Těžké kovy patří mezi významné environmentální polutanty a jsou definovány jako chemické elementy, jejichž hustota je nejméně 5x vyšší než je hustota vody. Patří sem prvky jako je Ag, As, Au, Bi, Cd, Ce, Cr, Co, Cu, Fe, Ga, Hg, Mn, Ni, Pb, Pt, Te, Th, Sb, Sn, U, V a Zn) (Kvesitadze *et al*., 2006). Základním faktem je, že tyto ionty kovů zastupují důležitou funkci pro stavební prvky v proteinech a můžou být také důležitými regulátory biologických procesů, zejména v enzymových reakcích (Nordberg *et al*., 2005).

Většina těchto kovů je v nízkých koncentracích pro organismy nepostradatelných, ale ve zvýšeném množství může docházet k akutní či chronické otravě organismu. Jejich toxicita je velkým problémem zejména z hlediska znečištění životního prostředí a kontaminace vod (Jaishankar *et al.*, 2014, Nagajyoti *et al.*, 2010). Mezi nejčastěji vyskytující se těžké kovy v odpadních vodách patří zejména arsen, kadmium, chrom, měď, nikl, zinek a olovo, přičemž všechny tyto kovy nepříznivě působí na životní prostředí a všechny organismy, včetně člověka (Lambert *et al*., 2000). Tyto kovy se do okolí dostávají přirozenou cestou (eroze půdy, přírodní zvětrávání zemské kůry) a prostřednictvím lidské činnosti (hornictví, průmyslové odpadní vody, vypouštění splašků) (Morais *et al*., 2012).

Mezi nejnebezpečnější sloučeniny kovů patří komplexy rtuťnatých, kademnatých a stříbrných iontů, které vykazují toxické účinky již v nízkých koncentracích, čímž narušují přirozenou fyziologii buňky. Tyto ionty se vážou přes sulfhydrylovou skupinu proteinů, čímž inhibují či inaktivují jejich funkci (Nies, 1999). Co se týče komplexů s ostatními ionty kovů jako je Zn^{2+}, Ni^{+2}, Co^{2+} či Cu^{2+}, ty působí toxicky pouze ve vysokých koncentracích, přičemž při fyziologickém množství plní v organismu nepostradatelnou funkci. Mezi prvky s velmi nízkou toxicitou patří ionty železa, molybdenu a manganu, které se v organismech vyskytují ve stopovém množství. Avšak kterýkoli těžký kov, který se při vysoké koncentraci váže na povrch mikroorganismů, způsobuje zpomalení růstu buněk a narušuje tak i jejich dělení (Nies, 1999).

3.3.1.1 Význam těžkých kovů v buňce

Kovy mají důležitou biologickou funkci v téměř všech organismech, někdy mohou svým chemickým uspořádáním a oxidačně-redukčními vlastnostmi získat výhodu v tom, že uniknou kontrolním mechanismům, do kterých se řadí například homeostáze, transport, kompartmentace a vazba na specifické buněčné složky. V nedávných studiích bylo také zjištěno, že většina oxidačního poškození biologických makromolekul je způsobeno v důsledku vazby těžkých kovů do jaderných proteinů a DNA (Flora *et al*., 2008).

3.3.1.2 Toxicita těžkých kovů

Většina těžkých kovů je charakterizována volnými d-orbitaly, díky kterým mohou tyto kovy při vysokých koncentracích reagovat s různými ligandy za vzniku komplexních sloučenin s centrálním atomem těžkého kovu (Nies, 2003). Tyto komplexy se považují za tzv. enzymatické jedy, protože se vážou na -SH, -COOH a $-NH_2$ skupiny v proteinech, čímž narušují jejich funkci i strukturu. Komplexy s těžkými kovy mohou také fungovat jako katalyzátory mnoha reakcí, při kterých vznikají ROS, které v buňce vyvolají oxidační stres a následné oxidační poškození (Bencko *et al*., 1995).

Toxicita těžkých kovů je spojena i se specifickou vazbou na proteiny zvané metalothioneiny, obsahující ve své struktuře aminokyselinu cystein. Kovový iont se tak váže k organickým molekulám v buněčné stěně přes síru či dusík, čímž inaktivuje mnoho proteinů (Okamura *et* Aoyama, 1994). Příjem těžkých kovů buňkou zahrnuje dvě fáze. První fáze tzv. rapidní, při níž dochází k vazbě těžkého kovu k buněčné stěně. Druhou fází je tzv. fáze pomalá, ve které je kov absorbován dovnitř do cytoplazmy (Friis *et* Myers-Keith, 1986).

3.3.2 Mechanismus toxicity těžkých kovů na buněčné úrovni

U řas se toxický účinek těžkého kovu projevuje nevratným narušením semipermeability plazmatické membrány, u fotosyntézy redukcí elektronového transportu a narušením fixace uhlíku, inhibicí dýchacího řetězce, enzymů, ovlivněním proteosyntézy, narušením procesů spojených s příjmem živin, vedoucích k abnormální morfologii, ultrastruktuře a ztrátě bičíků (Peña-Salamanca *et al.*, 2011). Mechanismus toxicity přímo souvisí s typem kovu. Navíc biomolekuly schopné vázat kovové ionty mají specifické chemické vlastnosti: oblast s vysokou koncentrací kyslíkových, dusíkových či sirných atomů; dostatečné množství donorových atomů ke stabilizaci kovového iontu; dostatečný prostor k tvorbě trojrozměrných struktur s daným kovovým iontem (Gaur *et* Rai, 2001).

3.3.3 Mechanismus toxicity těžkých kovů na molekulární úrovni

Škodlivé účinky kovových iontů mohou být různé, ale toxicita těžkých kovů na molekulární úrovni spočívá v pěti základních mechanismech: 1/ náhrada esenciálního kovového iontu v biomolekulách a ostatních funkčních jednotkách; 2/ blokace funkčních skupin (-SH, -COOH, $-NH_2$ aj.) v biomolekulách; 3/ modifikace aktivního místa biomolekul; 4/ přímé narušení integrity biomolekul či 5/ modifikace jiných biologicky aktivních látek (Kvesitadze *et al*., 2006).

V případě, že dojde k nerovnováze mezi produkcí a eliminací ROS, dochází následně k oxidačnímu poškození buňky volnými radikály, které narušují proteiny, lipidy, nukleové kyseliny, způsobují změny v buněčných strukturách, vyvolávají mutagenezi či buněčnou smrt.

3.3.4 Tolerance a detoxikace těžkých kovů u řas

Eukaryotické řasy jsou v dnešní době schopny přežívat v prostředí, které je znečištěné těžkými kovy, jelikož jsou schopny genetické adaptace k dlouhodobému působení daného kovu. Vlivem expozice těžkého kovu dochází u řas k mnoha mutacím a ke genetickým i fyziologickým změnám (Peña-Salamanca *et al.,* 2005; Robinson, 1989). Na základě lokalizace těžkého kovů rozdělujeme několik základních procesů, které umožňují buňce tyto kovové ionty eliminovat.

3.3.4.1 Produkce extracelulárních vazebných polypeptidů

Prvním z mechanismů souvisejících s tolerancí a detoxikací těžkých kovů je proces produkce peptidů schopných vázat kovové ionty (Nies, 1999). Po vazbě těžkých kovů jsou tyto molekuly převedeny do vakuol, kde dochází k jejich degradaci a dochází tak ke kontrole koncentrace iontů těžkých kovů v buňce (Cobbett *et* Goldsbrough, 2002). Takové extracelulární peptidy patří mezi specifické iontové chelatory, tzv. siderofory. Komplexní kapacita těchto ligandů byla popsána zejména u sinic a sladkovodních řas (Butler *et al*., 1980). Tyto organismy jsou schopné tvořit velké mimobuněčné agregáty s aniontovými vlastnostmi, které umožňují vazbu kovového iontu.

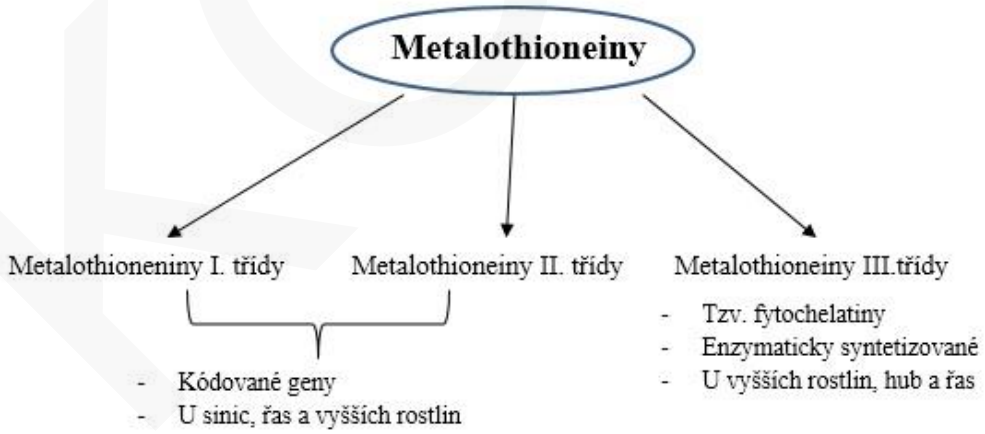
3.3.4.2 Metalothioneiny

Metalothioneniny, ve zkratce MT, patří do rodiny nízkomolekulárních proteinů s molekulovou hmotností 6-10 kDa, které obsahují vysoký podíl aminokyseliny cysteinu. Strukturálně mohou být tyto polypeptidy velmi různorodé. Některé jsou genovými produkty, zatímco jiné fungují jako sekundární metabolity. U řas jsou genovými produkty

tzv. metalothioneiny I. a II. třídy, zatímco metalothioneiny III. třídy působí jako sekundární metabolity. Metalothioneiny fungují jako chelatační činidla, která vychytávají kovy jako je kadmium, čímž dochází ke snížení cytotoxicity volných kovových iontů (Robinson, 1989).

Metalothioneiny jsou látky patřící do skupiny extracelulárních vazebných polypeptidů, kterou můžeme rozdělit do dvou typů (Obr. 7). Prvním typem jsou specifické proteiny z I. (nalezeny u sinic, řas a vyšších rostlin) a II. třídy MT, které jsou kódované strukturními geny. Konkrétně u řas jsou polypeptidy z II. třídy MT, bohaté jak na sulfhydrylové, tak i na karboxylové skupiny, tudíž vykazují vysokou afinitu k mnoha kovovým iontům (Cobbett *et* Goldsbrough, 2002; Rauser, 1990). Biosyntéza metalothioneninů I. a II. třídy může být indukována přítomností kovových iontů jako je Cd^{2+}, Ag^{+}, Bi^{3+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} a Hg^{2+}.

Druhým typem jsou polypeptidy s krátkým řetězcem tzv. fytochelatiny (PCS), které se řadí do III. třídy metalothioneinů (MT) a byly popsány jak ve vyšších rostlinách, tak i u řas a některých hub (Nicholas *et al*, 2003). Fytochelatiny vznikají z glutathionu za katalýzy fytochelatin syntázy. U těchto fytochelatinů se zjistilo, že cystein, který je součástí chelatačního jádra MT II. třídy, je hlavním aktivátorem jejich genové exprese (Perales-Vela *et al.*, 2006). Samotná syntéza PCS probíhá v cytosolu, odkud jsou tyto polypeptidy transportovány do chloroplastů a mitochondrií (poprvé objeveno u krásnooček r. *Euglena*, kde tyto organely obsahovaly téměř 60 % akumulovaných Cd^{2+} iontů, v chloroplastech se jednalo o komplexy v podobě Cd-MT III) (Schmitt *et al.*, 2001; Soldo *et al.*, 2005).



Obr. 7: Rozdělení metalothioneinů do tříd a jejich výskyt.

3.3.4.3 Vyloučení kovu z buňky

Tento mechanismus se vyskytuje zejména u řas, které jsou tolerantní vůči těžkým kovům. Jedná se o proces, při kterém je snížena vnitřní akumulační kapacita daného kovu

(Whitton, 1984) a dochází zde k antagonistickému působení kovových iontů. Antagonistické působení vykazují zejména železnaté a kademnaté ionty, kdy dochází k zablokování vazby jednoho z iontů, a tím i k blokaci jeho transportní dráhy (Stauber *et* Florence, 1987). V tomto případě může vylučovací mechanismus aktivovat transportní systém kadmia a inhibovat tak vazbu železnatých iontů. Snížení vnitřní akumulace kadmia se následně jeví jako tolerance vůči danému kovu (Peña-Salamanca *et al.*, 2004).

3.3.4.4 Vnitřní detoxikace

Řasy jsou organismy schopné aktivovat různé biochemické a fyziologické procesy, které jim umožnují rezistenci vůči toxickým účinkům, způsobených environmentálními kontaminanty (Gaur *et* Rai, 2001), a navíc se u nich vyvinuly detoxikační mechanismy, které jim umožňují odolávat přítomnosti kovových iontů uvnitř buněk a udržovat homeostázi iontů uvnitř buněk.

Detoxikace může probíhat mnoha způsoby. Jedná se o procesy konjugace těžkých kovů s intracelulárními složkami, které mohou být doprovázeny také kompartmentací, při které dochází k eliminaci volně se vyskytujících iontů v cytosolu, které jsou nahromaděny do omezeného prostoru. Dále se může jednat o procesy degradace společných buněčných metabolitů, například v podobě oxidu uhličitého. Tyto procesy mohou být regulovány mnoha environmentálními faktory, jako například pH, teplotou nebo salinitou (Ospina-Alvarez *et al.*, 2006).

3.3.4.5 Transformace kovu

Dalším procesem, který jsou řasy schopny aktivovat, je proces transformace těžkého kovu pomocí oxidace, redukce, methylace a demethylace. Tyto procesy spočívají v degradaci méně toxických modifikovaných sloučenin (Toumi *et al.*, 2000). Například arsen přijatý mořskými řasami je uvnitř buňky přeměněn na organické sloučeniny arsenu, které jsou z buňky snáze vyloučeny, což je podstatou této detoxikační strategie (Schiewer *et* Wong, 2000).

3.4 Kadmium

Kadmium je široce rozšířený těžký kov, který se dostává do životního prostředí z mnoha zdrojů, do kterých se řadí například elektrárny, topné systémy, strojírenský průmysl, spalovny odpadů, městská doprava, a vzniká také jako vedlejší produkt z fosfátových hnojiv. Jedná se o kov, který má schopnost akumulace v půdě, přičemž se tak stává nebezpečným pro všechny druhy organismů. Kadmium bylo dle Duxbury (1985) klasifikováno jako kov se střední toxicitou, avšak při vysoké koncentraci byl prokázán karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinek.

Kadmium se váže na organické molekuly prostřednictvím síry a dusíku, čímž inaktivuje řadu proteinů a patří mezi kontaminující látky, které představují největší hrozbu pro životní prostředí. Ačkoliv mohou být koncentrace kadmia v půdě a vodě chemicky stanoveny, neposkytují informace o toxických účincích na růst a metabolismus daných organismů (Awad *et* Chu, 2005).

3.4.1 Krátkodobý stres kadmiem

Je patrné, že kadmium, jakožto těžký kov, působí na buňku nepříznivě. Jelikož působením abiotického stresu těžkými kovy dochází v buňce k narušení mnoha proteinů, které hrají důležitou roli v eliminaci vzniklých reaktivních forem kyslíku. Mezi takové proteiny se řadí především enzymy a molekuly, které jsou součástí antioxidačních systémů. Tudíž produkce reaktivních radikálů v buňce narůstá. V případě působení subletální či letální dávky kadmia dochází také k poklesu životnosti buněk nebo k jejich autolýze (Pinto *et al.*, 2003).

3.4.2 Dlouhodobý stres kadmiem

Kadmium může z dlouhodobého hlediska působit pro buňky velmi toxicky, záleží však na koncentraci, které jsou buňky vystaveny. Avšak z několika studií je zřejmé, že dochází k narušení procesu fotosyntézy, k postupné změně životnosti buněk a pH, čímž je ovlivněn jejich růst (Awad *et* Chu, 2005).

3.5 Reaktivní formy kyslíku

3.5.1 Charakteristika ROS

Aerobní organismy, včetně zelených řas, mají významnou energetickou výhodu ve využití molekulárního kyslíku jako oxidačního činidla v procesu dýchání. Kyslík hraje také důležitou roli v procesech fotosyntézy či fotorespirace. Nicméně přítomnost kyslíku uvnitř

buněk představuje stálou oxidační hrozbu pro všechny buněčné struktury a procesy (Alscher *et al.*, 1997). Ačkoli je kyslík celkem neškodná molekula, má silný potenciál být částečně redukován a tvořit tak reaktivní formy kyslíku. Všechny tyto radikály mají toxické účinky, mohou reagovat s biomolekulami a inaktivovat tak biochemické procesy v buňce. K produkci ROS dochází zejména působením abiotické či biotického stresu (Finkel *et* Holbrook, 2000).

ROS však hrají důležitou roli i za fyziologických podmínek. Zejména u rostlin působí jako sekundární poslové v buněčné signalizaci, konkrétně jsou důležité pro expresi několika transkripčních faktorů a jiných transdukčních molekul, jako je například „heat-shock" faktor (HSF), který reguluje genovou expresi heat-shock proteinů a nukleární faktor, které se uplatňují v regulaci adheze buněk, v zesílení imunitní odpovědi a ve spuštění programované buněčné smrti (Winterbourn, 2008).

Mezi hlavní reaktivní formy kyslíku, které vznikají při neúplné redukci molekulárního kyslíku a jsou zodpovědné za oxidační poškození buňky, patří superoxidový radikál, perhydroxylový radikál, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, alkoxylový radikál, peroxylový radikál, organický hydroperoxid a singletní kyslík. Během redukce kyslíku na vodu může vznikat zejména singletní kyslík, superoxidový radikál, peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Singletní kyslík vzniká excitací kyslíku a je pro buňku velmi toxický (Halliwell *et* Gutteridge, 1999). Přehled jednotlivých reaktivních forem kyslíku a jejich vlastností viz Tab. I.

Tab. I: Přehled reaktivních forem kyslíku a jejich vlastností. (Kompilováno z publikací: Dat *et al.*, 2000; Foyer *et* Harbinson, 1994; Halliwell *et* Gutteridge, 1999; Imlay *et al.*, 2008; Møller *et al.*, 2007; Varnova *et al.*, 2002).

			Reakce s		
ROS	**Poločas rozpadu**	**Migrační kapacita**	**DNA**	**proteiny**	**lipidy**
Superoxidový radikál $\mathbf{O_2^{\bullet-}}$	1-4 μs	30 nm	ne	ano (Fe-S centra)	obtížně
Peroxid vodíku $\mathbf{H_2O_2}$	1 ms	1 μm	ne	ano (cystein)	ano
Hydroxylový radikál $\mathbf{HO^{\bullet}}$	1 μs	1 nm	ano	ano	ano
Singletní kyslík $\mathbf{^1O_2}$	1 μs	30 nm	ano (guanin)	Ano (Trp, His, Tyr, Met, Cys)	PUFA

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

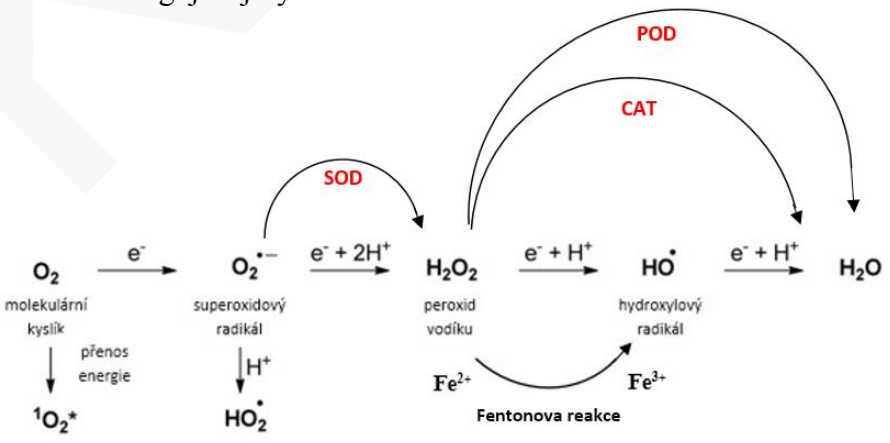
3.5.2 Produkce a metabolismus ROS

Reaktivní formy kyslíku jsou v buňce tvořeny za fyziologických podmínek, v průběhu řady metabolických procesů, především fotosyntézy a dýchaní (Alscher *et* Hess, 1993;

Hammond-Kosack *et* Jones, 2000). Odhaduje se, že 1 % z přijatého kyslíku je převedeno právě na ROS (Dutta Gupta, 2010). Avšak hladina reaktivních forem je vyrovnávána působením antioxidačních ochranných systémů. Vystavením buňky oxidačnímu stresu však dochází k přenesení rovnováhy ve prospěch ROS (Asada *et* Takahashi, 1987), které vznikají při mnoha enzymových a neenzymových antioxidačních systémech (Finkel *et* Holbrook, 2000).

ROS mohou vznikat buď endogenně, exogenně nebo při antioxidační obraně. Endogenně ROS vznikají zejména v mitochondriích, chloroplastech, peroxisomech, působením lipoxygenázy, NADPH oxidázy a cytochromu P450 (Finkel *et* Holbrook, 2000). ROS v buňce nevznikají najednou, ale jedná se o postupné přeměny jedné formy v druhou. K tomu, aby se vytvořily dvě molekuly vody, musí molekulární kyslík přijmout 4 elektrony. Avšak kyslík může přijmout elektrony pouze dva, nikoliv čtyři elektrony najednou. Proto přijímá elektron jeden po druhém. Tímto způsobem dochází k postupné redukci molekulárního kyslíku, za vzniku stabilních reaktivních meziproduktů (Obr. 8).

Po přijetí jednoho elektronu kyslíkem dojde ke vzniku singletního kyslíku, následně také k superoxidovému radikálu. Tato reakce je termodynamicky nevýhodná a zodpovídá tak za nízkou reaktivitu samotného kyslíku. Superoxidový radikál je jedinou aktivní formou kyslíku, jelikož je termodynamicky schopný fungovat jako oxidační i jako redukční činidlo. Superoxidový radikál dále přijímá elektron a dva protony za vzniku peroxidu vodíku. Ten na rozdíl od jiných kyslíkových radikálů je schopen přecházet přes biologické membrány. V důsledku toho může peroxid vodíku způsobovat oxidační poškození daleko od místa vzniku. Po přijetí elektronu a protonu dojde k tvorbě molekuly vody a hydroxylového radikálu, který je nejvíce reaktivní kyslíkovou formou. Funguje jako extrémně silné oxidační činidlo a snadno reaguje s jinými biomolekulami.



Obr. 8: Produkce a přeměna ROS z O_2 (SOD – superoxid dismutáza, CAT – kataláza, POD – peroxidáza). (Převzato z: Imlay, 2003).

KOPIE

3.5.3 Biologické cíle a důsledky působení ROS

ROS reagují se specifickými molekulami, avšak vzhledem k jejich různě vysoké reaktivitě, můžou ROS reagovat i nespecificky. V případě málo reaktivních forem s delším poločasem rozpadu, jako je H_2O_2 nebo $O_2^{\cdot -}$, dochází k reakci s pouze několika atomovými elementy uvnitř cílové molekuly, což vede ke kovalentní modifikaci proteinu (D'Autre´aux *et* Toledano, 2007). Naopak formy s vysokou reaktivitou a krátkým poločasem rozpadu jako je $HO^{\cdot}$, jsou méně selektivní. V důsledku toho se rozlišují tzv. atomové a molekulární cíle.

Cílovými atomy ROS jsou často atomy síry v aminokyselinách jako je methionin a cystein (Nathan *et* Cunningham-Bussel, 2013). Dalším atomem, s kterým ROS reagují, je atom uhlíku v nukleosidech, polynenasycených mastných kyselinách nebo v aminokyselinách jako je arginin, lysin, prolin a threonin (Nathan *et* Ding, 2010). Místem působení ROS může být tak atom železa, přičemž reaktivní formy kyslíku reagují s Fe-S klastry nebo s ionty železa v molekule hemu, čímž narušují jejich funkce (Imlay, 2003).

Působení ROS může probíhat také na molekulární úrovni, a to prostřednictvím proteinů, DNA a lipidů. ROS působí na proteiny změnou konformace, díky které narušuje aktivitu daného proteinu. Tímto mechanismem mohou být narušeny například fosfatázy, které mají ve své struktuře Cys zbytky, které působí jako redoxní přepínače a dochází tak k narušení fosforylace enzymu, která je důležitou reakcí v celkové regulaci aktivity proteinů. Působením oxidačního stresu na proteiny dochází také ke vzniku karbonylových derivátů, které se používají jako markery oxidačního stresu (Finkel *et* Holbrook, 2000; Stadtman, 2006).

Vzhledem k tomu, že jsou mitochondrie jedním z hlavních zdrojů ROS v buňce, dochází v nich nadprodukcí ROS také k poškození mitochondriální DNA, což vede k narušení jejich funkce. S jadernou DNA reagují ROS zřídka, avšak tato reakce může podporovat proces transkripce (Nathan *et* Cunningham-Bussel, 2013). I když je reakce s jadernou DNA zanedbatelná, má dalekosáhlé dopady (Winterbourn, 2008). Přímé poškození DNA reaktivními formami kyslíku může mít za následek modifikaci bází v DNA struktuře (např. 8-hydroxy-2´-deoxyguanosin), DNA zlomy, ať už jednořetězové či dvouřetězové, a navíc může docházet k interakcím mezi dvěma řetězci DNA nebo DNA s proteiny. ROS mohou kromě lipidové peroxidace způsobovat také vznik reaktivních aldehydů, které následně tvoří adukty s DNA, čímž narušují její strukturu (Robert Li, 2012). Poškození jaderné DNA je často pozorováno zejména při stárnutí buněk, ve kterých je detekována

zvýšená hladina ROS-poškozené jaderné DNA (Finkel *et* Holbrook, 2000).

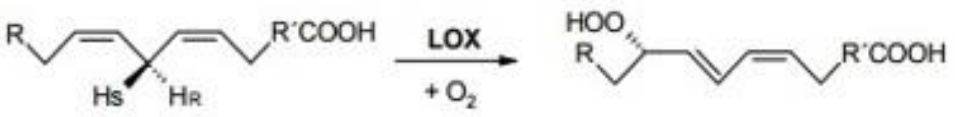
3.5.3.1 Lipidová peroxidace

Oxidace polynenasycených mastných kyselin („polyunsaturated fatty acids“, PUFA) může být zahájena ROS radikály (hydroxylovými a perhydroxylovými radikály), neradikálovými ROS (singletní kyslík, peroxid vodíku) nebo enzymatickou reakční dráhou (lipoxygenázy) (Brash, 1999; Halliwell *et* Gutteridge, 2007; Maccarrone *et al.*, 2001).

Výsledkem neenzymatické peroxidace (prostřednictvím ROS) či enzymatické lipidové peroxidace (lipoxygenáza) je vznik lipidového alkyl radikálu, z kterého následně vzniká lipidový peroxylový radikál, a to interakcí s molekulárním kyslíkem. Reaguje-li lipidový peroxylový radikál s jinými polynenasycenými mastnými kyselinami, dochází tak k tvorbě primárních produktů lipidové peroxidace tzv. lipidových hydroperoxidů (Girotti, 1998; Halliwell *et* Gutteridge, 2007; Niki, 2009; Porter *et al.*, 1995). Kromě hydroperoxidů vznikají také různé radikálové formy PUFA, které se buď samovolně, nebo enzymatickou reakcí přeměňují na sekundární produkty. Obecně se takové látky nazývají oxylipiny. Patří sem důležité látky se signální a obrannou funkcí jako je kyselina jasmonová, aldehydy a oxokyseliny. Zvláště radikály a aldehydy jako je malondialdehyd, působí v buňce destruktivně tím, že poškozují fosfolipidovou membránu, čímž mění její permeabilitu a zvyšují tak propustnost pro různé ionty. Těmito aldehydy mohou být obsazeny také volné aminoskupiny ve struktuře proteinů, což způsobuje zvýšení citlivosti proteinu k proteolýze. Tudíž se tyto aldehydy z velké části podílejí na usmrcení buňky (Yamauchi *et al.*, 2008).

3.5.3.1.1 Lipidová peroxidace indukovaná působením enzymů

Klíčovým enzymem v enzymatické lipidové peroxidaci je lipoxygenáza (LOX), monomerní protein ze skupiny oxidoreduktáz (EC 1.12.11.12) o velikosti 94-104 KDa (Porta *et* Rocha-Sosa, 2002), který obsahuje ve své struktuře atom železa v nehemové formě. Lipoxygenáza se může v buňkách vyskytovat v několika izoformách s různou funkcí, které jsou lokalizovány ve většině organel. Jejich aktivita se mění během ontogeneze a vlivem stresu. Lipoxygenázy jsou důležitými enzymy, které zprostředkovávají vznik hydroperoxidových derivátů z polynenasycených mastných kyselin (Holková *et al.*, 2009) viz Obr. 9.



1,4-dien mastné kyseliny 1-hydroperoxy-2,4-dien mastné kyseliny

Obr. 9: Reakce katalyzovaná lipoxygenázou.

U rostlin hrají lipoxygenázy důležitou roli v metabolické dráze, označované jako lipoxygenázová (oktadekanová) cesta, jejíž produkty fungují jako regulátory růstu, mají antimikrobiální vlastnosti a slouží také jako signální molekuly. Na základě funkce těchto produktů a na základě korelace mezi zvýšením exprese lipoxygenázy a počátkem specifických obranných procesů je zřejmé, že enzym LOX hraje důležitou roli v odpovědi rostlin na stres. Lipoxygenázy jsou klíčovými enzymy v mnoha metabolických drahách jak u živočichů, tak i u rostlin, tvoří produkty s různými biologickými funkcemi. LOX enzymy jsou zapojené především do procesů souvisejících s transdukcí signálu a do procesů spojených s buněčnou regulací (Holková *et al.,* 2009).

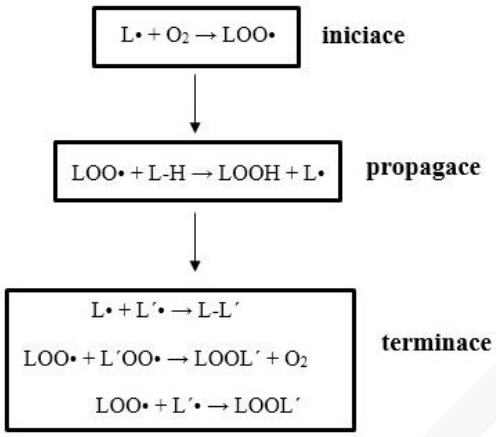
3.5.3.1.2 Lipidová peroxidace indukovaná působením ROS

Neenzymová lipidové peroxidace, která je vyvolána působením ROS, se dělí do 3 fází, a to na iniciaci, propagaci a terminaci (Obr. 10).

Na začátku je molekula mastné kyseliny napadena danou reaktivní formou kyslíku, nejčastěji hydroxylovým radikálem, který je vzhledem k jeho vysoké reaktivitě a krátkému poločasu rozpadu těžko odbouratelný v biologických systémech. Podíl na neenzymové lipidové peroxidaci má však i superoxidový radikál a jeho protonovaný derivát perhydroxylový radikál, avšak u těchto forem je vliv na PUFA omezen, jelikož se tyto formy vyskytují v nízkých koncentracích a jsou účinně odbourávány.

Samotný proces neenzymové lipidové peroxidace je zahájen odebráním atomu vodíku s jedním vazebným elektronem z $-CH_2-$ skupiny v molekule PUFA. Tato $-CH_2-$ skupina je z obou stran obklopena dvojnými vazbami, které tento děj umocňují stabilizací vzniklého radikálu $L^{\bullet}$. Následně dochází k přeskupení dvojné vazby a vzniká tak konjugovaný dien, který samovolně reaguje s další molekulou kyslíku za vzniku lipoperoxylového radikálu $LOO^{\bullet}$, který je počátečním produktem další fáze.

Propagace spočívá v řetězové reakci $LOO^{\bullet}$ s jinými molekulami PUFA, při které vznikají stále nové radikály a sám je přeměněn na lipidový hydroperoxid LOOH. Tato reakce probíhá neustále, až do chvíle, kdy dojde ke styku dvou radikálů nebo radikálu s nějakou antioxidační sloučeninou, čímž je radikál eliminován. Tento proces je hlavní reakcí probíhající ve fázi terminace (Gill *et* Tuteja, 2010; Marnett, 1999).



Obr. 10: Průběh lipidové peroxidace vyvolané ROS.

Při neenzymové lipidové peroxidaci dochází ke vzniku primárních produktů, lipidových hydroperoxidů LOOH, které vykazují nízkou stabilitu, tudíž podléhají dalším reakcím,
při kterých jsou produkovány další radikály s destrukční funkcí. Mimo jiné jsou výsledkem těchto reakcí také sloučeniny jako jsou epoxidy, alkoholy a hydroxylkyseliny. Pro studium úrovně lipidové peroxidace se však využívá malondialdehyd (MDA), který je sekundárním produktem lipidové peroxidace, je toxický a slouží jako marker oxidačního stresu (Gill *et* Tuteja, 2010; Marnett, 1999). Při lipidové peroxidaci vzniká v nejvyšší míře právě malondialdehyd (MDA), derivát kyseliny malonové, který se v buňce vyskytuje v enol formě (Yamauchi *et al.,* 2008). Fyziologicky se MDA v buňce vyskytuje pouze v malém množství, přičemž při stresu dochází k mnohonásobnému zvýšení jeho koncentrace a předpokládá se jeho signální funkce.

Proces neenzymové lipidové peroxidace je však pro buňku nevýhodný, jelikož tímto procesem dochází k rozpadu buněčných membrán a k narušení struktur proteinů a DNA. Proto buňka aktivuje antioxidační systémy, které eliminují a zastavují další distribuci reaktivních radikálů a zajišťují tak, že je tato lipidová peroxidace potlačena na co nejnižší úroveň (Gill *et* Tuteja, 2010).

3.5.3.1.3 Metody stanovení úrovně lipidové peroxidace

Jednou z nejužívanějších metod stanovení lipidového peroxidace je stanovení malondialdehydu, který je sekundárním produktem lipidové peroxidace a je lehce detekovatelný. Většinou se jedná o jeho detekci pomocí HPLC (vysokotlaká kapalinová chromatografie).

Avšak kromě malodialdehydu lze úroveň lipidové peroxidace zjistit také stanovením organických hydroperoxidů vznikající taktéž při procesu lipidové peroxidace. Jednou z těchto metod je tzv. FOX test (assay), ve kterém dochází k oxidaci iontů železa v přítomnosti xylenové oranže. Nejdříve byl tento test aplikován pro detekci peroxidu vodíku ve vodných roztocích
a v poslední době se využívá právě k detekci lipidových hydroperoxidů (Miyamoto *et al.*, 2007). Vznikem hydroperoxidů ve vzorku dochází k oxidaci železnatých iontů na ionty železité. K této reakci může docházet právě i v přítomnosti peroxidu vodíku. Produkované železité ionty následně reagují s xylenovou oranží (XO) za vzniku specifického zbarvení závislého na koncentraci peroxidu vodíku či hydroperoxidů ve vzorku. V přítomnosti malého množství vzniká světlý oranžový barevný produkt, a naopak při vyšších koncentracích dochází k barevné změně produktu od hnědé až po fialovou barvu. Následně se spektrofotometricky změří absorbance při 560 nm (DeLong *et al.*, 2002).

3.5.4 Odbourávání ROS

Odstranění a zastavení šíření vzniku reaktivních forem kyslíku je důležité zejména k zabránění peroxidace lipidů v membránách, jejichž funkčnost je nezbytná pro přežití.

3.5.4.1 Antioxidační systémy

K regulaci koncentrace ROS v buňkách využívají buňky enzymatické a neenzymatické antioxidační systémy. Mezi enzymatické systémy se řadí zejména působení enzymů superoxiddismutázy (SOD), peroxidázy (POD), katalázy (CAT) a glutathionreduktázy (GR). Superoxiddismutáza je enzym, který přeměňuje superoxidový radikál na méně toxický peroxid vodíku. Peroxidázy jsou enzymy ze skupiny oxidoreduktáz, které katalyzují oxidaci různých látek za přítomností peroxidu vodíku, který působí jako zdroj kyslíku, a mění danou molekulu na vodu. K přeměně samotného peroxidu vodíku slouží enzym kataláza, který katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Chelikani *et al.*, 2004). Glutathionreduktáza neboli glutathion-disulfid reduktáza je enzym, který katalyzuje redukci glutathion disulfidu (GSSG) na sulfhydrylovou formu glatathionu (GSH), který je důležitý při obraně buněk vůči oxidačnímu stresu. Naopak mezi systémy, ve kterých nehrají roli enzymy, patří působení antioxidantů jako je redukovaný glutathion, vitamín C, tokoferoly, karotenoidy, flavonoidy, hydrochinony, fykokyany, a jiné (McCord *et al.*, 1971). Rychlost detoxikace a úroveň toxicity závisí na konkrétním typu ROS.

Je-li buňka vystavena stresovému faktoru a dojde k narušení rovnováhy mezi tvorbou a odbouráváním reaktivních forem, dochází k nahromadění toxických metabolitů uvnitř buňky, které následně poškozují buněčné struktury a biomolekuly, čímž může docházet až k buněčné smrti. Tímto způsobem reaguje například MDA, který není pomocí antioxidantů efektivně eliminován, tudíž se hromadí uvnitř buňky a působí toxicky zejména poškozením buněčných organel a následně indukuje buněčnou smrt (Yamauchi *et al.*, 2008).

3.5.5 Metody studia ROS

Studium produkce a vývoje ROS zahrnuje zejména metody HPLC, hmotnostní spektrometrie, EPR (elektronová paramagnetická rezonance) a další analytické metody, které poskytují informace o produkci ROS a detekují produkty generované oxidací proteinů, DNA a lipidů (Cadet *et al.*, 2002; Leichert *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2011).

EPR je metoda umožňující detekovat volné radikály jako jsou ROS (Gibella *et al.*, 2000). Princip metody je založen na přechodech mezi energetickými hladinami, které jsou výsledkem působení magnetického pole na nepárový elektron (Wertz *et* Bolton, 1972). Jakmile je vložen vzorek obsahující radikál do vnějšího magnetického pole, dochází ke změně orientace magnetického momentu elektronu do dvou možných orientací, které jsou však vzhledem k jejich energii různé. Po ozáření definovanou energií se následně měří rozdíl hodnot mezi dvěma spinovými stavy elektronu. Výsledkem měření je EPR spektrum. Jedná se však
o destruktivní metodu s nižší citlivostí.

Pokroky ve fluorescenční mikroskopii umožnily využití neinvazivní metody studia ROS, které umožňují vysokou specifitu k dané reaktivní formě, a které jsou vysoce citlivé v kombinaci s prostorovým a časovým rozlišením. Jedná se o užití fluorescenčních sond, které umožňují sledovat ROS v biologických systémech (Prime *et al.*, 2012; Umezawa *et al.*, 1999). Ideální sonda pro určitý typ ROS by měla být reaktivní při nízké koncentraci, netoxická, snadno prostupná do buněk a organel, neměla by vykazovat žádné ztráty ani nežádoucí distribuci (Wardman, 2007).

Princip užití těchto fluorescenčních sond je založen na metodě histochemického barvení. Většina fluorescenčních sond je detekována po aktivaci v přítomnosti sledovaného analytu. Výsledek aktivace následně vede ke zvýšení fluorescence nebo k posunu emisní vlnové délky. Většina komerčně dostupných sond je dodávána ve formě pre-fluorescenčních aromatických molekul, které v přítomnosti dané reaktivní formy podléhají oxidaci za vzniku fluorescenčního produktu.

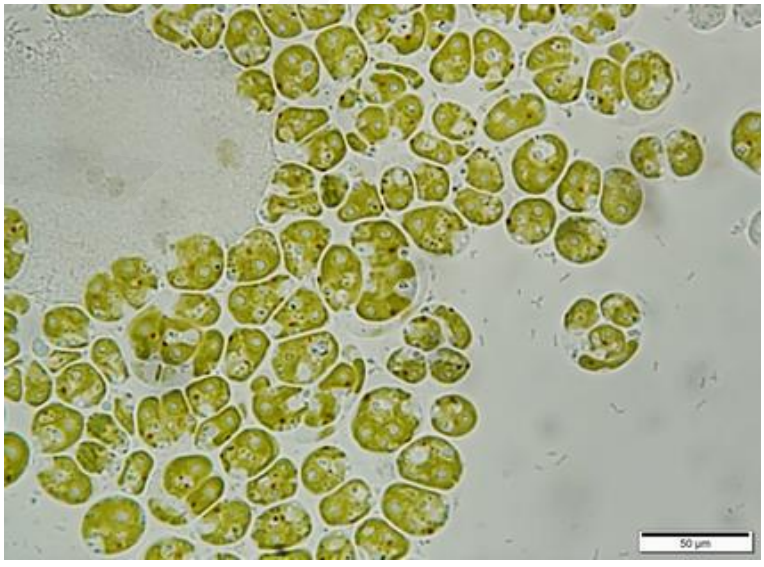
KOPIE

4 MATERIÁL A METODY

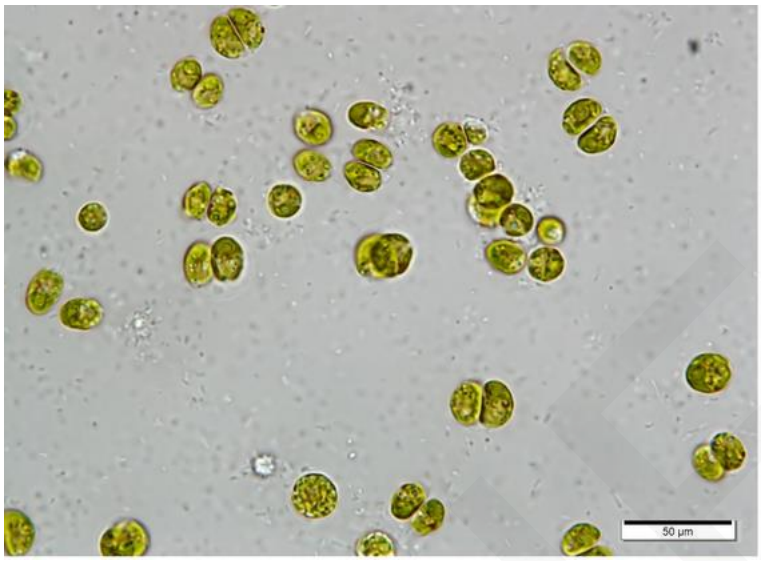
4.1 Biologický materiál

V této práci byly studovány tři kmeny řasy rodu *C. reinhardtii*, jednalo se o kmen CC002 WT (wild type) (Obr. 11), mutantní kmen CC406 (Obr. 12) a LOX mutanta (Obr. 13). CC406 mutantní kmen je charakterizován absencí buněčné stěny, proto se také značí jako cw-mutant a vykazuje různou morfologii jednotlivých protoplastů (Obr. 12). LOX mutant byl vytvořen kolegy z Polska (dr. R. Sinha, Fakulta biologie, Univerzita Katowice) koncem r. 2016, v jehož genové sekvenci byl knockoutován gen kódující enzym lipoxygenázu.

Obr. 11: Detail buněk kmene CC002, označován v textu jako WT (zvětšení 1000x).



Obr. 12: Detail buněk kmene CC406 (zvětšení 1000x).



Obr. 13: Detail buněk LOX mutanta (zvětšení 1000x).

4.1.1 Příprava LOX mutanta

Jelikož není v genové databázi dostupný osekvenovaný genom kmene CC002 WT, vycházelo se z genové sekvence již osekvenovaného kmene CC503 cw92 mt+. Z genové databáze byla vybrána genová sekvence odpovídající *lox* genu, ze které se také vycházelo při transformaci.

LOX mutant byl připraven místně specifickým knockoutem genu pomocí CRISPR/CAS9 (dle Shin *et al*., 2016). *CAS9* gen, původem ze *Streptococcus pyogenes,* je řízen duálním promotorem 35S a zakončen terminálním regionem s genovou sekvencí pro nopalin syntetázu (*Tnos*) (Xie *et* Yang, 2013). sg RNA (single guide) byla specificky cílena ke genu kódujícího enzym lipoxygenázu (GenBank: XM_001690353.1, genová sekvence *lox* genu viz Příloha), která byla řízena snoRNA *U3* gene promotorem. K selekci transformovaných buněk *C. reinhardtii* byl vybrán selekční gen rezistence vůči hygromycinu (*hpt*), který byl řízen stejným promotorem 35S jako *CAS9* gen. Proces transformace byl proveden s využitím speciálního transformačního kitu MAX Efficiency® Transformation Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016).

1 ml čerstvě narostlých buněk bylo přeneseno do 100 ml TAP (Tric Acetate Phosphate) média, ve kterém kultura rostla za standartních podmínek po dobu 24 h. Následně byly buňky centrifugovány při 2500 rpm po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a následovalo dvojité promytí peletu GeneArt® MAX Efficiency® Transformation Reagent centrifugací opět při 2500 rpm, 5 min. Nakonec byly buňky resuspendovány

v GeneArt® MAX Efficiency® Transformation Reagent do finální koncentrace $2x10^8$ buněk/ml a inkubovány na ledu 5 min v přítomnosti 3 µg linearizované DNA na 250 µl buněčné suspenze. Transformace buněk probíhala metodou elektroporace v 0,1cm kyvetě pomocí Biorad Gene Pulser Biorad Gene Pulser® (Bio-Rad Laboratories, USA). Transformační proces byl zahájen aplikací jednoho pulsu o 500 V s 4 ms pulsní délkou. Po elektroporaci byla buněčné suspenze z kyvety přenesena do 30 ml tekutého TAP média s přídavkem 40 mM sacharózy. Následně byly buňky inkubovány na světle za mírného třepání po dobu 24 h. Po ukončení inkubace byly kultury centrifugovány při 2500 rpm, 5 min a naneseny na pevné TAP médium, obsahující 10 µg/ml hygromycinu B a 100 µg/ml cefotaximu. Po ukončení inkubace buněk za standartních podmínek, byla mutace genu pro lipoxygenázu ověřena pomocí PCR (dr. R. Sinha, Fakulta biologie, Univerzita Katowice).

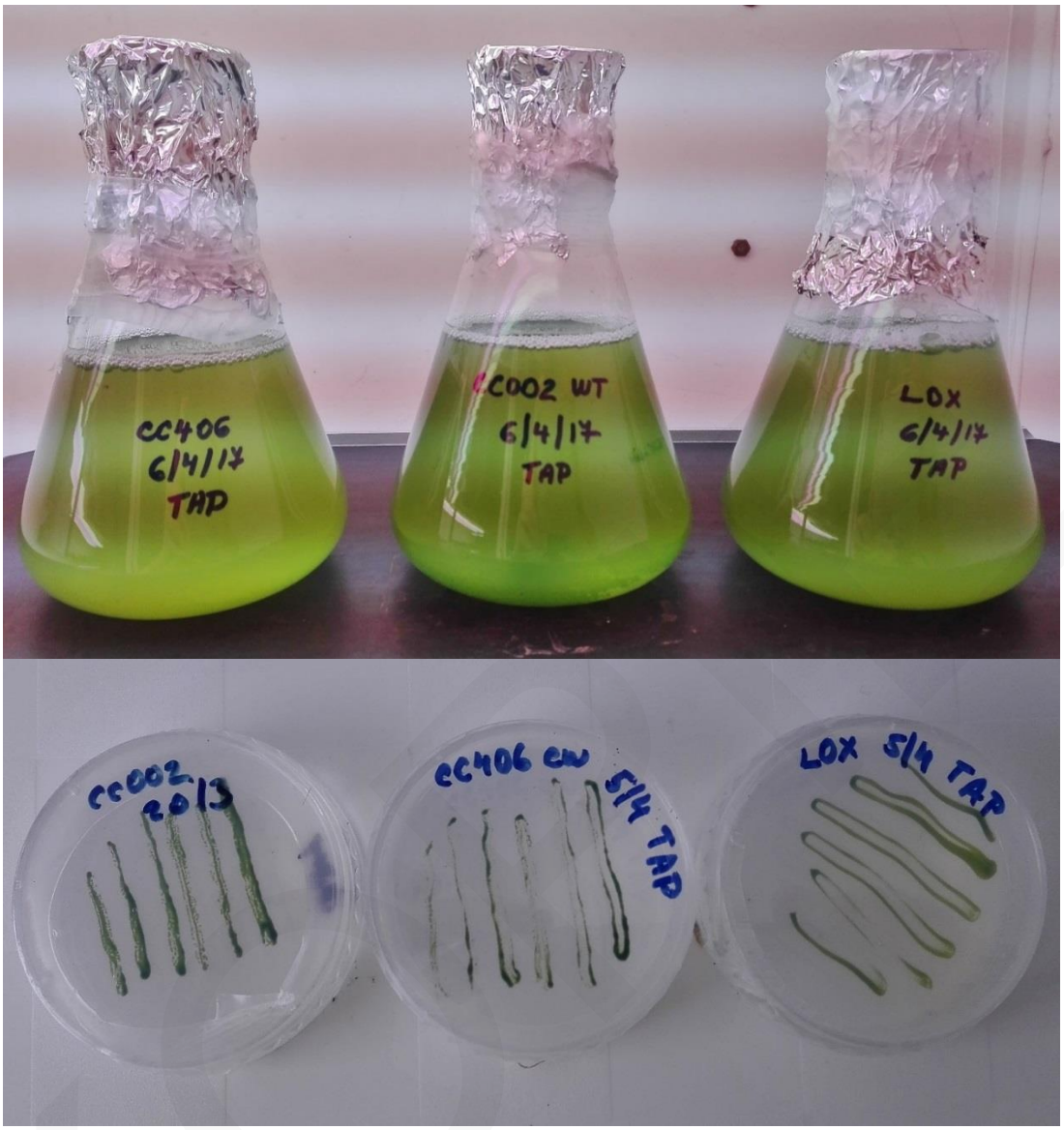
4.2 Přístroje

- Laminární flowbox TUV GS STERIL-VBH
- Centrifuga 3-30K Sartorius (Sigma)
- Automated Cell counter TC20 (BIORAD)
- Spektrofotometr UV-500 (Thermospectronic)
- Spektrofotometr SpeCORD 250 PLUS
- Konfokální laserový skenovací mikroskop Fluoview 1000 (Olympus)
- Fluorescenční mikroskop BX60 (Olympus)
- EPR spektrometr Miniscope MS400 (Magnettech)
- Vortex IKA-MS 3 basic (IKA)
- Sonikátor UP50H
- Třepačka VIBRAX VXR basic (IKA)
- Analytické váhy KERN ABT 220-5DM
- Sušička Memmert UNE 400
- Autokláv Systec VX-55
- pH metr inoLab pH7110
- Concentrator plus Eppendorf
- Autokláv TuttNauer 2340M

4.3 Kultivace a inokulace *C. reinhardtii*

Ke kultivaci řas se využívají různé typy živného média, které jsou specifické svým složením a odpovídají tak nárokům konkrétních druhů řas. Je proto důležité, aby byly v *in vitro* podmínkách zajištěny vhodné podmínky pro jejich optimální růst. Obecně se udává, že optimální růst buněk řas nastává při teplotě 16-27 °C, při fotoperiodě (střídání dne a noci) 16:8 h a při hodnotě pH 7-9 (Samek, 2013). Řasy se mohou pěstovat buď na pevném či tekutém médiu. Na agaru se řasy pěstují zejména pro dlouhodobé kultivace, a to na 1,5-2% agaru v Petriho miskách utěsněných parafilmem ideálně při 10-15°C. V případě, že chceme kulturu dlouhodobě uchovávat v tekutém médiu, je vhodné udržovat buňky v kultuře v exponenciální fázi růstu, a to pomocí častějšího přeočkování kultur do čerstvého média (Křísa *et* Prášil, 1989). Nejčastěji se řasy kultivují na třepačce v Erlenmayerových baňkách, které jsou zakryté alobalovým víčkem a utěsněné parafilmem.

Mezi tekutá média vhodná pro kultivaci *Chlamydomonas* patří BBM (Bold Basal Medium) a TAP (Tris Acetate Phosphate medium). BBM je základním anorganickým médiem pro kultivaci terestrických řas a sinic. Pro kultivaci řas je žádoucí, aby nebyla kultura řas kontaminována jinými organismy (plísně, bakterie). Tuto podmínku splňuje právě BBM médium, které je složeno z velké části z vody a obsahuje pouze minerální soli potřebné pro růst řas. Nevýhodou však je, že v tomto médiu rostou kultury řas pomaleji. Proto se využívá organické TAP médium, které obsahuje acetát, díky kterému mohou řasy růst i za nepřístupu světla, proto na TAP médiu rostou řasy rychleji a ve vyšší hustotě než v anorganickém médiu (Barsanti *et* Gualtieri, 2014). Avšak přítomnost organických látek v TAP médiu způsobuje, že je zde vyšší pravděpodobnost kontaminace kultury bakteriemi či plísněmi. Proto je zapotřebí zvážit, které médium je pro dané účely vhodné. Zde byly řasy kultivovány v Erlenmayerových baňkách v TAP médiu, za stálého třepání (90 otáček/min) při 25 °C (Obr. 14). Protokoly k přípravě médií viz Příloha.



Obr. 14: Kultury řas v tekutém médiu (nahoře) a na agaru (dole).

4.4 Aplikace stresu kadmiem

Studované kmeny *C. reinhardtii* byly podrobeny abiotickému stresu působením těžkého kovu ve formě chloridu kademnatého. Účinek kadmia byl sledován z hlediska krátkodobého i dlouhodobého, v několika různých koncentracích.

Pro krátkodobý stres kadmiem, který probíhal po dobu 2 h, byly vybrány pouze nejvyšší testované koncentrace (100 a 400 mg $CdCl_2$/l), jelikož nízké koncentrace by byly během tak krátké inkubace neúčinné. Po uplynutí dvouhodinové inkubace buněk s kadmiem ihned následovalo jejich histochemické barvení, a poté také mikroskopické pozorování stresovaných kultur.

Na základě experimentů provedených ve studii Awad *et* Chu (2005), ve které byl sledován dlouhodobý vliv kadmia na růst buněk, byly vybrány koncentrace chloridu kademnatého, a to v řadě 25, 50, 100 a 400 mg $CdCl_2$/l. Jednalo se o koncentrace, které nevyvolají okamžitou smrt buňky, avšak jsou pro buňku stresující a vyvolávají v ní stresové reakce. Kultury jednotlivých kmenů byly s kadmiem inkubovány po dobu 6 dnů.

4.5 Stanovení koncentrace buněk

Všechny experimenty byly vždy prováděny s kulturami řas o stejné koncentraci buněk tj. $1{,}5 \times 10^6$ buněk/ml, což je hodnota buněk odpovídající exponenciální fázi růstu. Tudíž bylo zapotřebí vždy zjistit, kolik buněk se ve vzorku nachází a popřípadě provést patřičné ředění či zakoncentrování testovaných kultur. Pro stanovení cytotoxického účinku kadmia na buňky řas je toto stanovení počtu buněk ve vzorku nezbytné, tudíž existuje několik přístupů ke zjištění koncentrace buněk v suspenzi. Koncentrace buněk zde byla zjišťována pomocí Bürkerovy komůrky, spektrofotometrie a pomocí automatizovaného počítání pomocí specializovaného přístroje (TC20 Automated Cell Counter). Nejdříve byly jednotlivé metody srovnávány
a následně se ke stanovení koncentrace buněk využívalo pouze automatizované počítání.

4.5.1 Stanovení koncentrace buněk pomocí Bürkerovy komůrky

Na silné podložní sklo Bürkerovy komůrky se dvěma vyrytými sítěmi s přesně definovanou plochou byla pipetována suspenze buněk. Koncentrace buněk v 1 ml byla stanovena na základě výpočtu:

$$\mathbf{C} = \frac{\textbf{počet částic x 1 000}}{\textbf{počítaná plocha (mm2) x hloubka komůrky (mm) x ředění}}$$

Také byla ověřena vitalita buněk barvením trypanou modří, která prochází pouze přes porušené membrány mrtvých buněk, zatímco živé buňky zůstávají neobarvené.

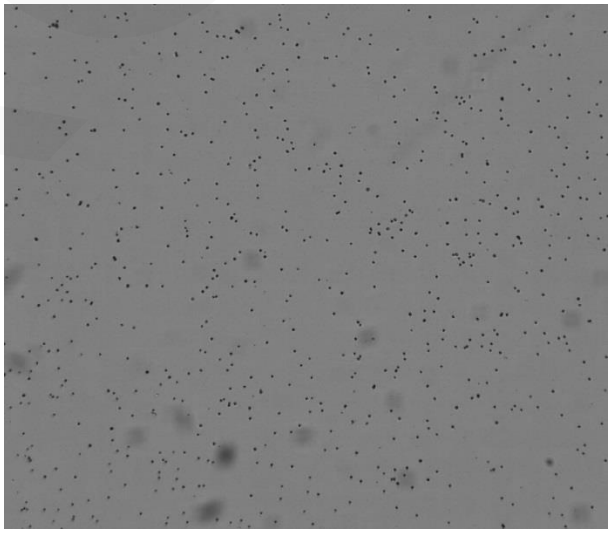
4.5.2 Spektrofotometrické stanovení optické hustoty buněk

Optická denzita (OD) neboli hustota buněk byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm. Tato metoda byla použita pro srovnání korelace mezi koncentracemi buněk stanovených automatickým počítačem TC20 a mikroskopicky v Bükerově komůrce.

4.5.3 TC20^{TM} Automatický počítač buněk

Princip metody počítání buněk pomocí TC20 automatického počítače buněk (Obr. 15) spočívá ve využití mikroskopie s možností automatického zaostření, se schopností analyzovat několik ohniskových rovin a určit tak nejvhodnější rovinu pro počítání buněk. Výhodou této metody je automatické zaostřování, které zvyšuje reprodukovatelnost této metody ve srovnání s počítáním pomocí Bürkerovy komůrky. Po spočítání buněk byla k dispozici také obrazová vizualizace dané roviny (Obr. 16). Postup počítání buněk viz Obr. 15.

Obr. 15: TC20 Automatický počítač buněk a postup měření (BIO-RAD).

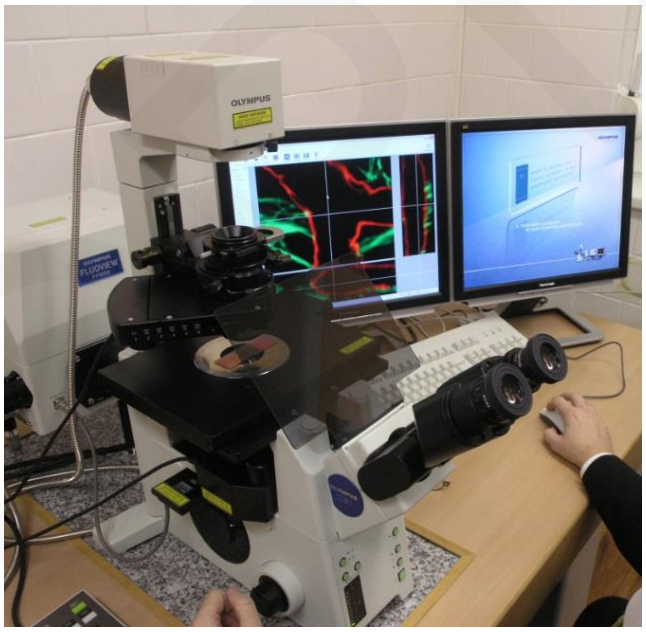


Obr. 16: Vizualizace analyzované roviny.

4.6 Konfokální mikroskopie a analýza obrazu

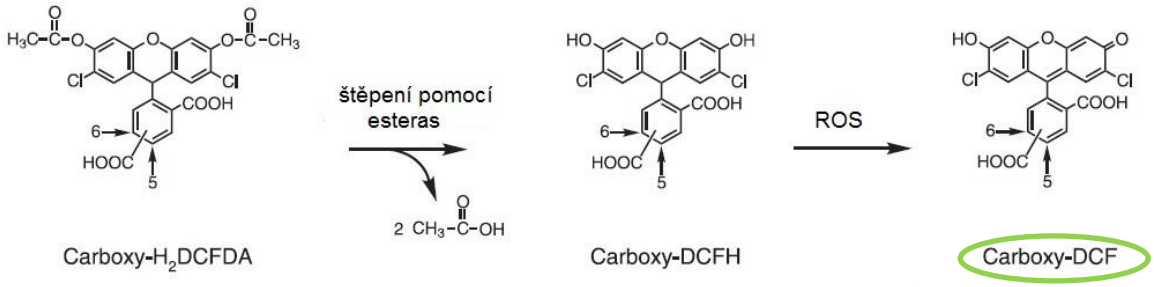
K detekci jednotlivých reaktivních forem kyslíku se využívají různé fluorescenční barvy, které jsou specifické pro daný typ ROS. Zde byly použity celkem tři fluorochromy a jejich emise byla pozorována a analyzována pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie. Zdrojem excitace byl zde argonový laser, s vlnovou délkou 488 nm s výkonem 30 mW. Pro detekci obrazu ve viditelném světle byl použit diodový laser, s vlnovou délkou 405 nm a výkonem 20 mW.

Snímky byly pořízeny pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX 81 s konfokální laserovou skenovací jednotkou Fluoview 1000 (Obr. 17). Výsledné snímky byly následně analyzovány pomocí obrazové analýzy, s využitím softwaru FV10-ASW Viewer a konkrétně se jednalo o analýzu integrálního rozložení intenzit signálu (bezrozměrná veličina).



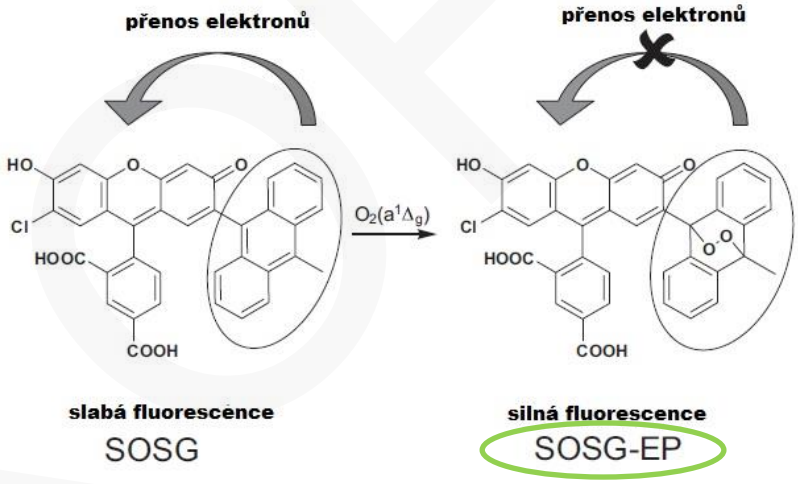
Obr. 17: Invertovaný fluorescenční mikroskop IX 81 s konfokální jednotkou Fluoview 1000.

Nedříve byly mikroskopicky stanoveny ROS jako H_2O_2, $HO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$ pomocí histochemického značení fluorochromem c-H_2DCF DA. Histochemické barvení probíhalo vždy ve tmě 10 min v koncentraci 25 µM. Jednalo se o indikátor oxidativního stresu, který po vstupu do buňky interaguje s více ROS a mění se na fluorescenční formu c-DCF s excitačním maximem 495 nm a emisní vlnovou délkou 529 nm (Obr. 18) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016).



Obr. 18: Přeměna c-H_2DCF DA na fluorescenční produkt c-DCF (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016).

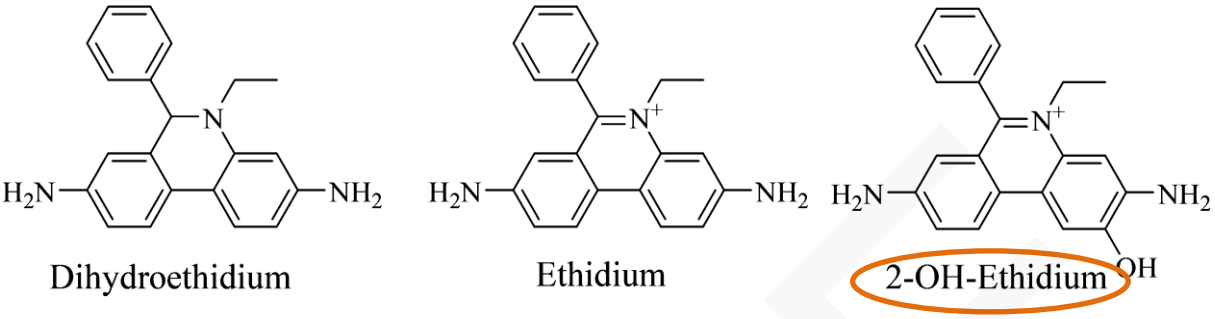
Pro detekci singletního kyslíku byly vzorky inkubovány ve tmě po dobu 30 min s fluorochromem Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) v koncentraci 50 µM, který se po vstupu do buňky mění na fluorescenční endoperoxid s maximální excitační vlnovou délkou 504 nm a emisí při 525 nm (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016). Komerčně je však tento fluorochrom považován za látku, která neprostupuje do nitra buněk. Tento fakt byl však v mnoha studiích (i zde) vyvrácen.



Obr. 19: Přeměna slabě fluorescenčního SOSG na SOSG-EP (endoperoxid) (Gollmer *et al.*, 2010).

Lokalizace superoxidu byla studována barvením dihydroethidiem (DHE) v koncentraci 50 µM 30 min ve tmě (Obr. 20) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016). Jedná se o chemicky redukovanou formu běžně užívaného ethidium bromidu, který funguje jako DNA interkalátor. Tato sloučenina se často využívá k detekci oxidačních procesů v živých buňkách, zejména však pro detekci superoxidových radikálů. Oxidovaná forma DHE (2-OH-Ethidium) má excitační vlnovou délku 518 nm a emisní maximum 605 nm. Po vstupu DHE do buňky a jeho dehydrogenaci (oxidaci) na ethidium může v delším časovém horizontu

taktéž interkalovat do jádra, proto je zapotřebí dodržovat dobu barvení (Marker Gene Technologies Inc., 2017).



Obr. 20: Strukturní vzorce ethidiových forem a fluorescenční produkt 2-OH ethidium (Chu *et al.*, 2014).

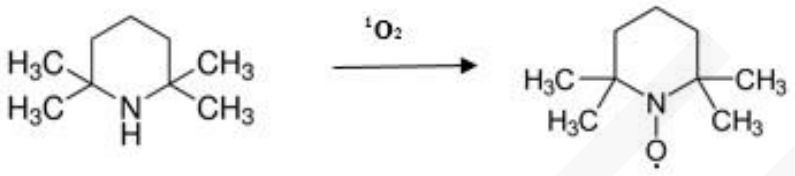
4.7 Elektronová paramagnetická rezonance

K detekci vybraných ROS, produkovaných vlivem kadmia, byla mimo metody konfokální mikroskopie použita také metoda elektronové paramagnetické rezonance (EPR), založená na EPR spinovém záchytu. Pomocí spektrometru MiniScope MS400 (Obr. 21) bylo možné detekovat vzniklé radikály s použitím specifických spin-trapů. Jelikož je poločas rozpadu volných radikálů velmi krátký, bez použití spin-trapu by nebyl spektrometr schopen detekovat dané radikály. Jedná se tedy o sloučeninu, která reaguje s radikálovými produkty za vzniku kovalentních vazeb a tvoří tak více stabilní adukty, jejichž paramagnetická rezonanční spektra lze již EPR zaznamenat.

Obr. 21: EPR spektrometr MinScope MS400 (katedra Biofyziky PřF UP).

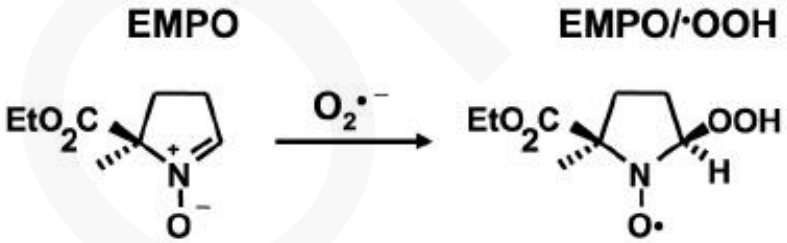
K záchytu vznikajícího singletního kyslíku byl použit lipofilní spin-trap TEMP (2,2,6,6-tetramethylpiperidine). Zásobní roztok této látky o koncentraci 750 mM, byl připraven rozpuštěním v 96% ethanolu, přičemž výchozí roztok spin-trapu byl pouze částečně

purifikovaný, tzn. že vykazoval standardní signál i bez přidání analyzovaného vzorku. Pracovní koncentrace spin-trapu ve vzorku odpovídala hodnotě 50 mM, přičemž byl spin-trap do vzorku přidán ihned na začátku inkubace buněk s kadmiem. Měření probíhalo ve skleněné kapiláře, utěsněné těsnící hmotou. Strukturní vzorce a schéma záchytu viz Obr. 22.



Obr. 22: Přeměna TEMP po vazbě singletního kyslíku na TEMPO ((2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-yl)oxyl) (Sigma-Aldrich Co LLC., 2017)

K detekci superoxidových radikálů byl použit spin-trap EMPO (2-ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole-1-oxide) (Obr. 23). Zásobní roztok o koncentraci 312 mM byl připraven rozpuštěním látky v destilované vodě. Ve vzorku se spin-trap vyskytoval v koncentraci 50 mM (Enzo Life Sciences Inc., 2017). Příprava vzorku i postup měření probíhal stejně jako v případě TEMP.



Obr. 23: Přeměna EMPO po vazbě superoxidového radikálu na stabilní adukt (Dikalov *et al.*, 2007).

4.7.1 Stanovení produkce organických hydroperoxidů

4.7.1.1 Extrakce lipidů (Folchova extrakce)

K extrakci lipidů z buněk *Chlamydomonas* byla vybrána metoda kapalina:kapalina (Hamilton *et* Hamilton, 1992). Jelikož jsou lipidy nepolárními látkami, bylo k jejich extrakci použito polární organické rozpouštědlo ve formě směsi. Následující postup extrakce lipidů byl navržen Folchem v roce 1957 (Folch *et al.*, 1957). Jedná se tak o tzv. Folchovu metodu extrake lipidů do směsi chloroformu s methanolem smíchané v poměru 2:1.

4.7.1.2 FOX assay

Pro FOX (Ferrous oxidation xylenol orange) test byly nejdříve připraveny zásobní roztoky, a to 250mM kyselina sírová, 50mM xylenová oranž a 250µM heptahydrát síranu železnatého. Ze zásobních roztoků byly následně připraveny pracovní roztoky, a to zředěním 250mM kyselinou sírovou. Následně byly obě dílčí reagencie smíchány v poměru 1:1 a vznikla tak směs s reagenty pro FOX assay. Následně bylo k 1 ml vzorku přidáno 200 µl této směsi a následovala inkubace ve tmě po dobu 30 min (včetně blanků). Po ukončení inkubace bylo provedeno měření na spektrofotometru při vlnové délce 560 nm.

KOPIE

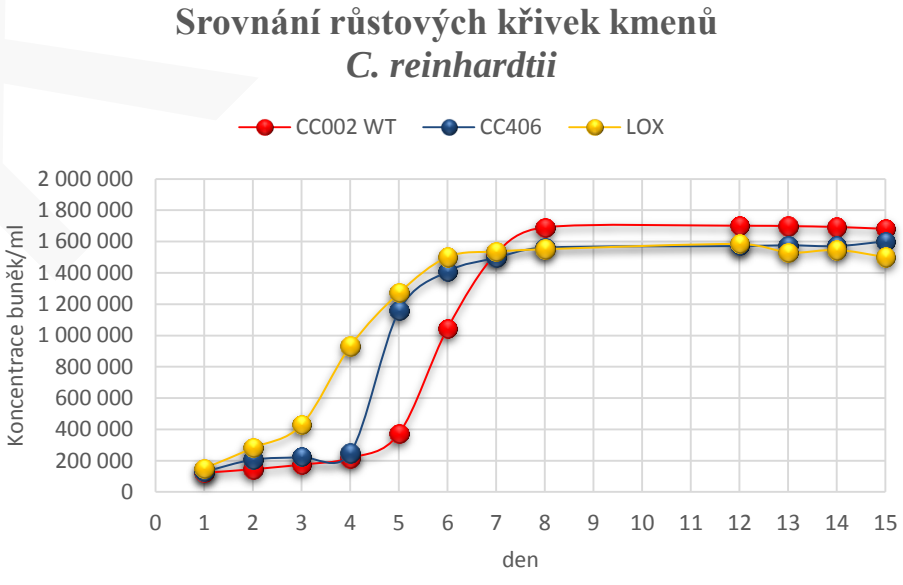
5 VÝSLEDKY

5.1 Vyhodnocení růstu jednotlivých kmenů řas

Před experimenty s kadmiem byly zpracovány růstové křivky všech studovaných kmenů *C. reinhardtii*. Po inokulaci odpovídala výchozí koncentrace buněk hodnotě ca $1{,}5x10^5$ buněk/ml a nárůst počtu buněk byl sledován u jednotlivých kmenů v průběhu 15 dnů.

Buňky v testovaných kulturách přecházely do exponenciální fáze (log fáze) růstu 3-6. den kultivace, což bylo dle očekávání, jelikož jsme vycházeli ze studované literatury. Jsou zde však rozdíly mezi jednotlivými kmeny, přičemž u CC002 WT kmene byla patrná delší adaptace buněk na nové prostředí, tudíž i nástup log fáze byl zde opožděn oproti dalším studovaným kmenům. Přechod do log fáze byl u kmene CC002 WT pozorován 6. den kultivace. U kmene CC406 byla tato adaptace o 1 den kratší (tj. nástup log fáze 5. den kultivace buněk) než u CC002 WT. Stejně tomu bylo i u LOX mutantního kmene, který vykazoval velmi brzký nástup log fáze, avšak zde byla patrná velmi rychlá adaptace buněk, tudíž buňky přecházely do log fáze již 4. den růstu.

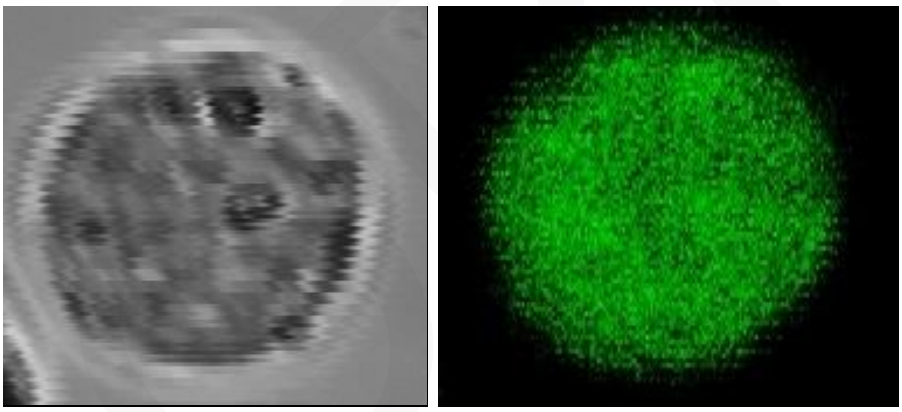
Co se týče maxima dosažených hodnot buněk ve stacionární fázi, nejvíce buněk bylo pozorováno u CC002 WT kmene, přičemž koncentrační maxima buněk se pohybovala okolo $1{,}7x10^6$ buněk/ml. U CC406 a LOX kmene jsou tyto maxima téměř srovnatelná a odpovídala hodnotám $1{,}5x10^6$ buněk/ml viz Obr. 24. Vždy však záleží na mnoha faktorech, které mohou charakteristiku růstové křivky ovlivnit jako je například stav inokulovaných buněk, teplota, aerace kultury, fotoperioda, pasážování atd.



Obr. 24: Charakteristika růstových křivek studovaných kmenů CC002 WT, CC406 a LOX.

5.2 Ověření knockoutu genu pro enzym lipoxygenázu u LOX kmene

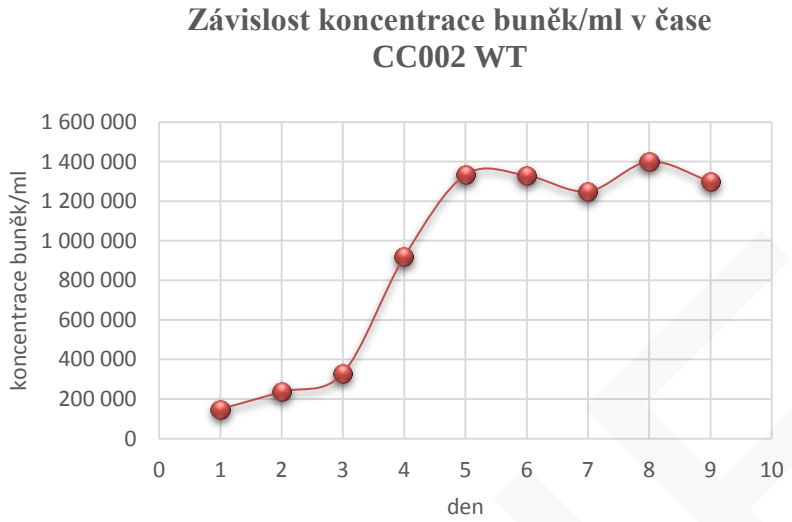
Cílená mutace v genové sekvenci pro lipoxygenázu byla u LOX kmene potrvzena pomocí PCR. Kromě kultury buněk s knocoutovaným *lox* genem, byla k dispozici také kultura buněk, u které byla do místa štěpení *lox* genu vložena také genová sekvence žlutého fluorescenčního proteinu (YFP), díky kterému bylo možné ověřit, zda byl *lox* gen úspěšně knocoutován. Sekvence YFP byla do genomu *Chlamydomonas* vložena pomocí CRISPR/CAS9 systému, konkrétně pomocí NHEJ-zprotředkovaný knock-in (vložení genu pomocí nehomologního spojení konců). Po úspešné expresi YFP v buňkách, bylo možné detekovat jeho fluorecescenci pomocí konfokální mikroskopie, přičemž maximum excitační vlnové délky YFP odpovídá 514 nm a emise 527 nm (Nagai *et al*., 2002). Je zřejmé, že lipoxygenázový gen byl úspešně knocoutován, jelikož jeho inaktivace byla potrvzena detekcí fluorescenčního signálu YFP viz Obr. 25.



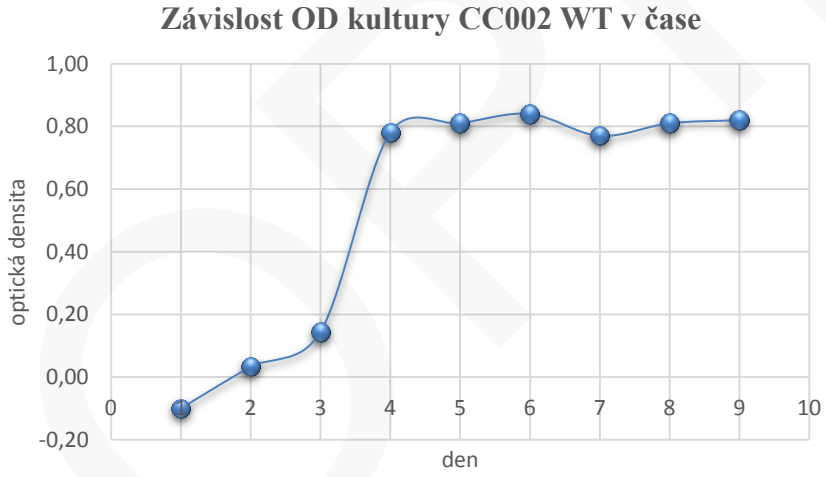
Obr. 25: Detekce fluorescenčního signálu YFP v buňkách kmene LOX. Detail buňky – vlevo – kanál Nomarského DIC, vpravo – fluorescenční kanál.

5.3 Srovnání metod stanovení hustoty buněk

Pro objektivní stanovení cytotoxicity kadmia a srovnání dat ze všech provedených experimentů na buňky *C. reinhardtii*, bylo vždy zapotřebí pracovat s kulturami o stejné koncentraci buněk a s buňkami nacházejícími se v log fázi jejich růstu. Na počátku byly srovnávány tři metody stanovení koncentrace buněk, a to počítání Bürkerovou komůrkou, spektrofotometrické stanovení optické denzity a automatického počítání buněk. Je patrné, že všechny použité metody jsou srovnatelné a data spolu korelují. Charakteristika křivky hodnot OD získané spektrofotometrickým změřením vykazuje stejný trend (Obr. 27) jako křivka koncentrací buněk pořízená automatickým počítačem buněk (Obr. 26).



Obr. 26: Růstová křivka zjištěná metodou automatického počítání, vyjadřující závislost naměřených koncentrací buněk v čase.



Obr. 27: Růstová křivka zjištěná metodou spektrofotometrického stanovení OD, vyjadřující závislost naměřených OD kultury CC002 WT v čase.

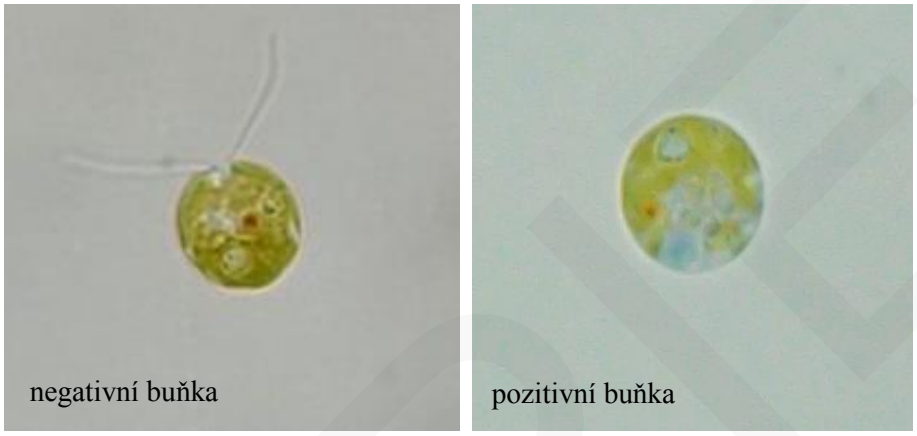
Druhý den kultivace buněk studovaných kmenů bylo taktéž provedeno počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky, přičemž zjištěná hodnota koncentrace buněk v suspenzi $2{,}5x10^5$ buněk/ml (Tab. II) odpovídala změřené koncentraci buněk pomocí automatického počítače buněk ve 2. den kultivace, tj. $2{,}37x\ 10^5$ buněk/ml (Obr. 26).

Tab. II: Počítání buněk na Bürkerově komůrce 2. den kultivace *C. reinhardtii.*

čtverec	počet buněk	čtverec	počet buněk
1	12	6	13
2	11	7	8
3	15	8	14
4	13	9	12
5	12	10	16
Celkem buněk	126		

$$\frac{126 \text{ x } 1000 \text{ x } 2}{10 \text{ } x \text{ } 0{,}1} = \textbf{250 000 buněk/ml suspenze}$$

Nakonec byla ověřena propustnost buněk pro trypanovou modř, jakožto indikátoru viability buněk, schopného prostupovat pouze poškozenými membránami buňky, tudíž umožňuje rozlišit mrtvé (obarvené) a živé (neobarvené) buňky (Obr. 28).



Obr. 28: Vitální barvení buněk CC002 WT trypanovou modří.

5.4 Vyhodnocení krátkodobého účinku kadmia na řasy

Krátkodobý vliv kadmia na buňky byl studován pomocí konfokální mikroskopie a metodou EPR, a to ve dvou koncentracích 100 a 400 mg/l $CdCl_2$. Po 2 h působení obou koncentrací kadmia na buňky byla změřena také viabilita buněk pomocí automatického počítače buněk, přičemž u koncentrace 400 mg/l byl u všech kmenů pozorován nepatrný úbytek množství buněk, jelikož vedlejším efektem kadmia v této koncentraci byla také lyze buněk. Úbytek buněk odpovídal zhruba 1 % z hodnoty celkového počtu buněk na počátku působení této koncentrace.

5.4.1 Detekce produkce ROS konfokální mikroskopií

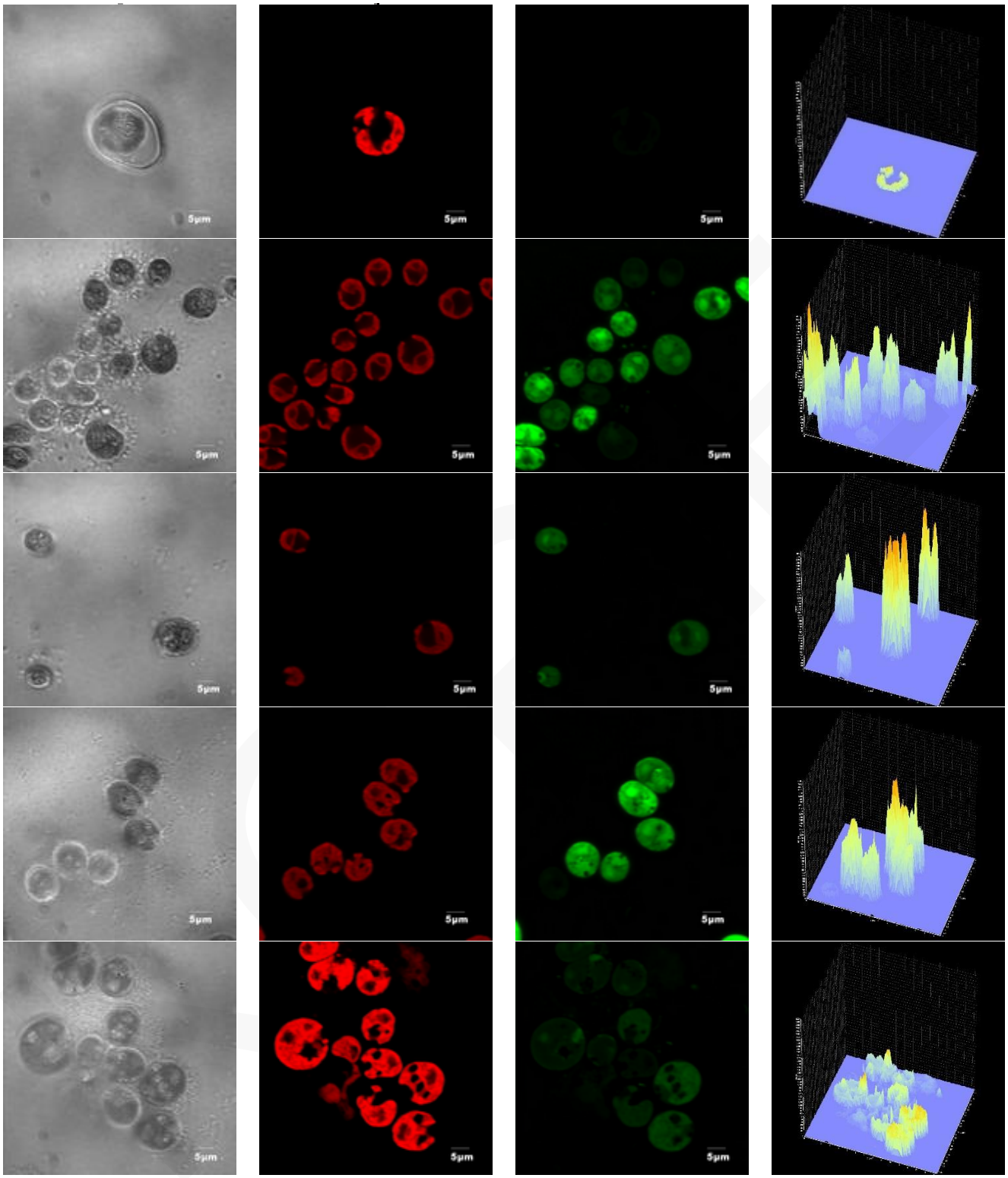
Po histochemickém značení kultur studovaných kmenů byla pozorována fluorescence použitých flurochromů. Vzorky byly pozorovány vždy po 30min a 120min inkubaci buněk s kadmiem, přičemž barvení probíhalo v případě c-H_2DCF DA 10 min a v případě SOSG a DHE 30 min. Nejdříve byl pozorován signál **c-H_2DCF DA**, díky kterému došlo k vizualizaci ROS jako H_2O_2, $HO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$.

U **kmene CC002 WT** byl v kontrolních buňkách detekován nepatrný fluorescenční signál s nejnižší intenzitou. U 40 % buněk ve vzorku byl detekován signál, přičemž u 10 % se jednalo o signál s vyšší intenzitou (Obr. 29 A). V případě koncentrace 100 mg/l $CdCl_2$, byl

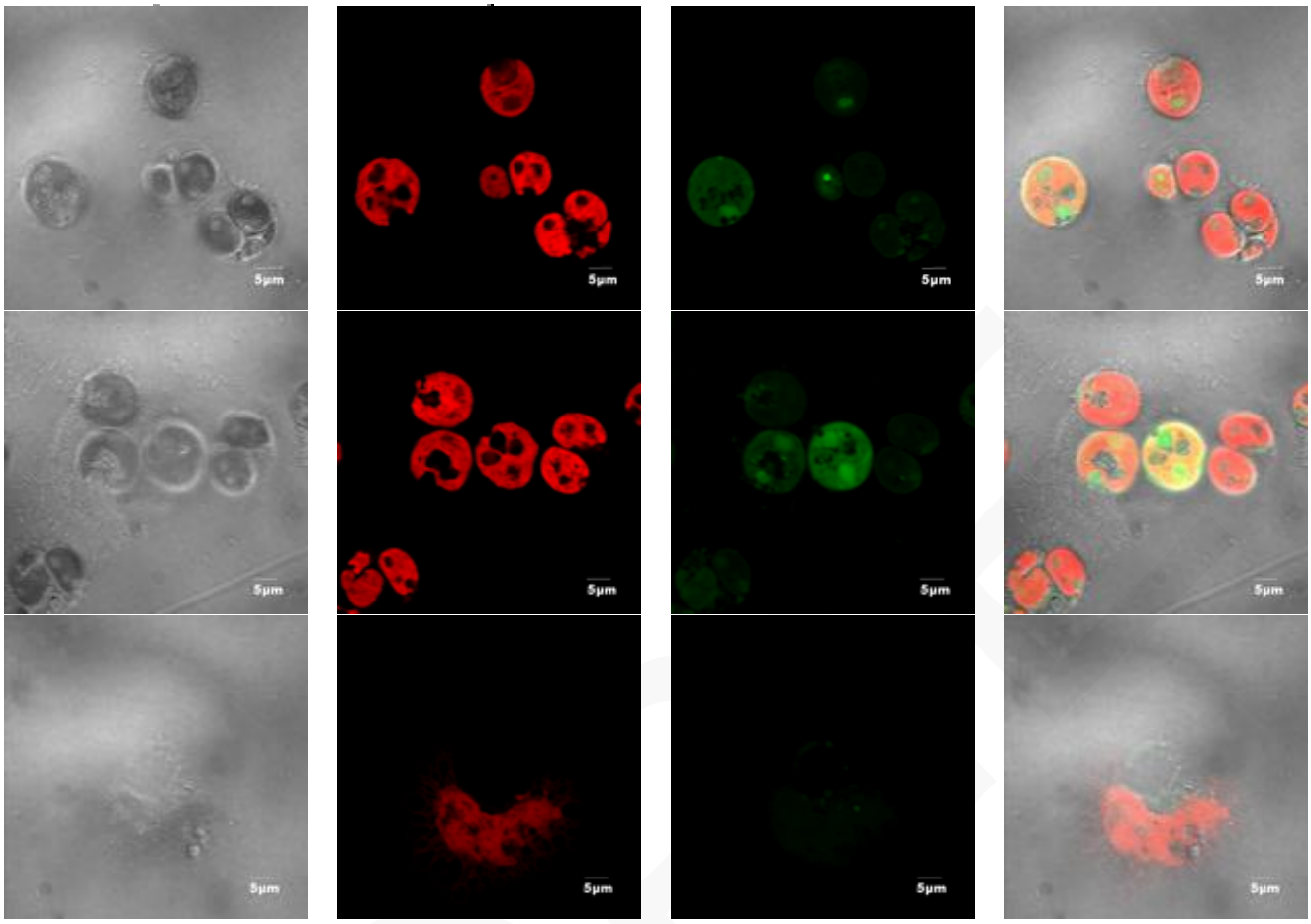
po 30min inkubaci buněk CC002 WT s kadmiem pozorován signál u 70 % buněk, z toho u 10-20% byl signál silný (Obr. 29 B1). Naopak po 2h inkubaci buněk s koncentrací 100 mg/l byl již signál detekován u 90 % buněk, z toho u 60 % buněk byl pozorován signál s nejvyšší intenzitou ze všech testovaných koncentrací (Obr. 29 B2). Při působení nejvyšší koncentrace tj. 400 mg/l $CdCl_2$ byl po 30 min pozorován silný signál u 80 % buněk (Obr. 29 C1). Po 120 min byl detekovaný signál již menší než po 30 min (Obr. 29 C2). U koncentrace 400 mg/l $CdCl_2$ **na CC002 WT** byly po 120 min pozorovány spíše morfologické změny (než nárůst signálu), které vznikaly v důsledku působení kadmia. Jedním z efektů kadmia byla změna velikosti buněk (Obr. 30 A), změna morfologie chloroplastu, vakuolizace (Obr. 30 B) a v neposlední řadě lyze buněk (Obr. 30 C).

U kmene **CC406**, byl nejvyšší signál c-H_2DCF DA pozorován po 120 min působení 100 mg/l $CdCl_2$ (Obr. 31 B2). V kontrolní kultuře se vyskytovalo asi 50 % buněk s velmi slabým signálem (Obr. 31 A). Nepatrný signál byl detekován také po 30 min u koncentrace 100 mg/l (Obr. 30 B1) a u koncentrace 400 mg/l (Obr. 31 C1), přičemž intenzita detekovaného signálu byla po 120 min vyšší (Obr. 31 C2).

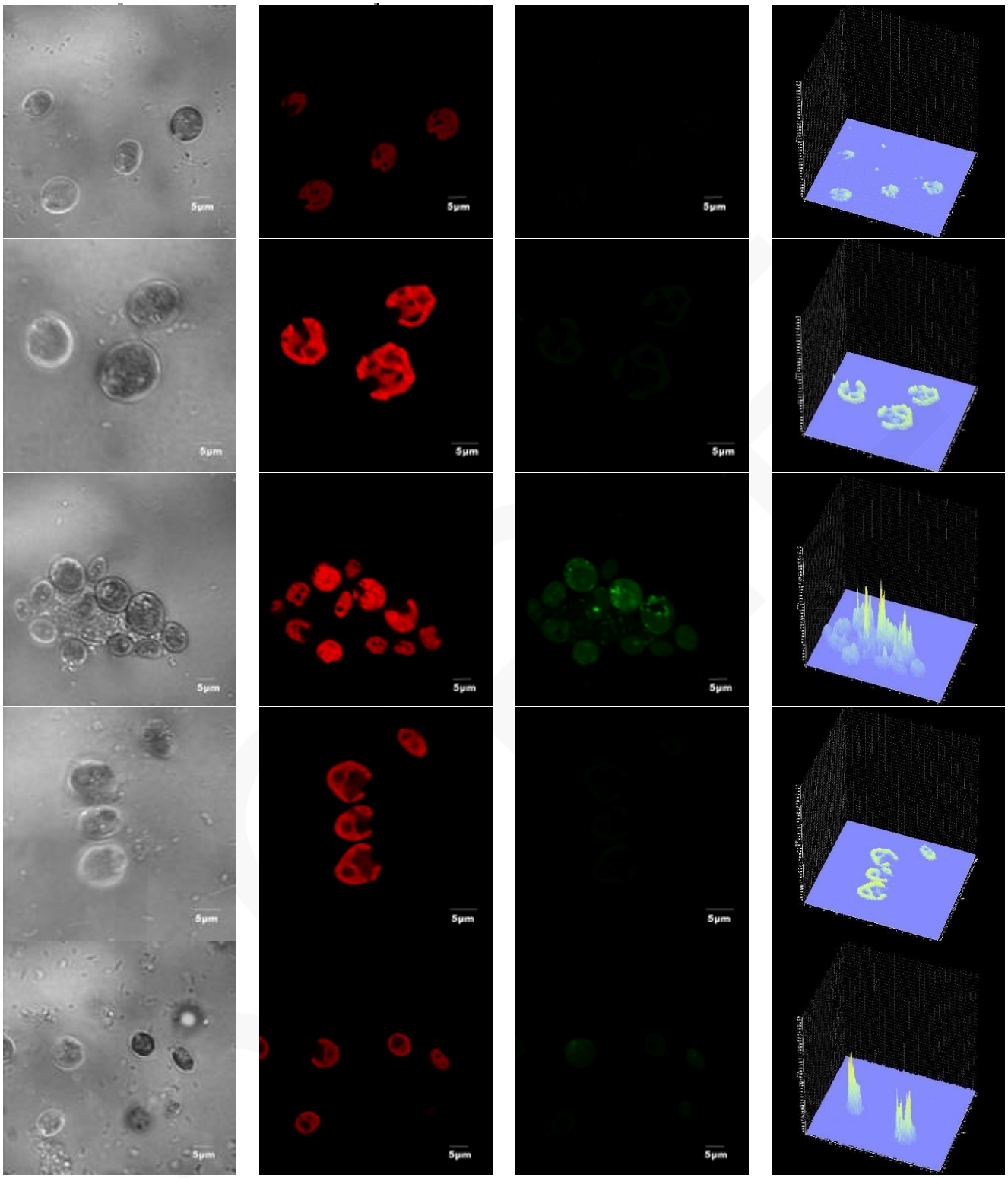
U kmene **LOX** byly oproti ostatním testovaným kmenům detekovány nejvyšší intenzity signálů. V kontrole byl signál pozorován u 30 % buněk, z toho 10 % buněk vykazovalo silný signál (Obr. 32 A). Buňky stresované 100 mg/l $CdCl_2$ vykazovaly vyšší signál po 30 min (Obr. 32 B1) než po 120min inkubaci (Obr. 32 B2). U koncentrace 400 mg/l tomu bylo naopak, jelikož buňky byly stresovány více po 120 min (Obr. 32 C2) než po 30 min inkubaci (Obr. 32 C1).



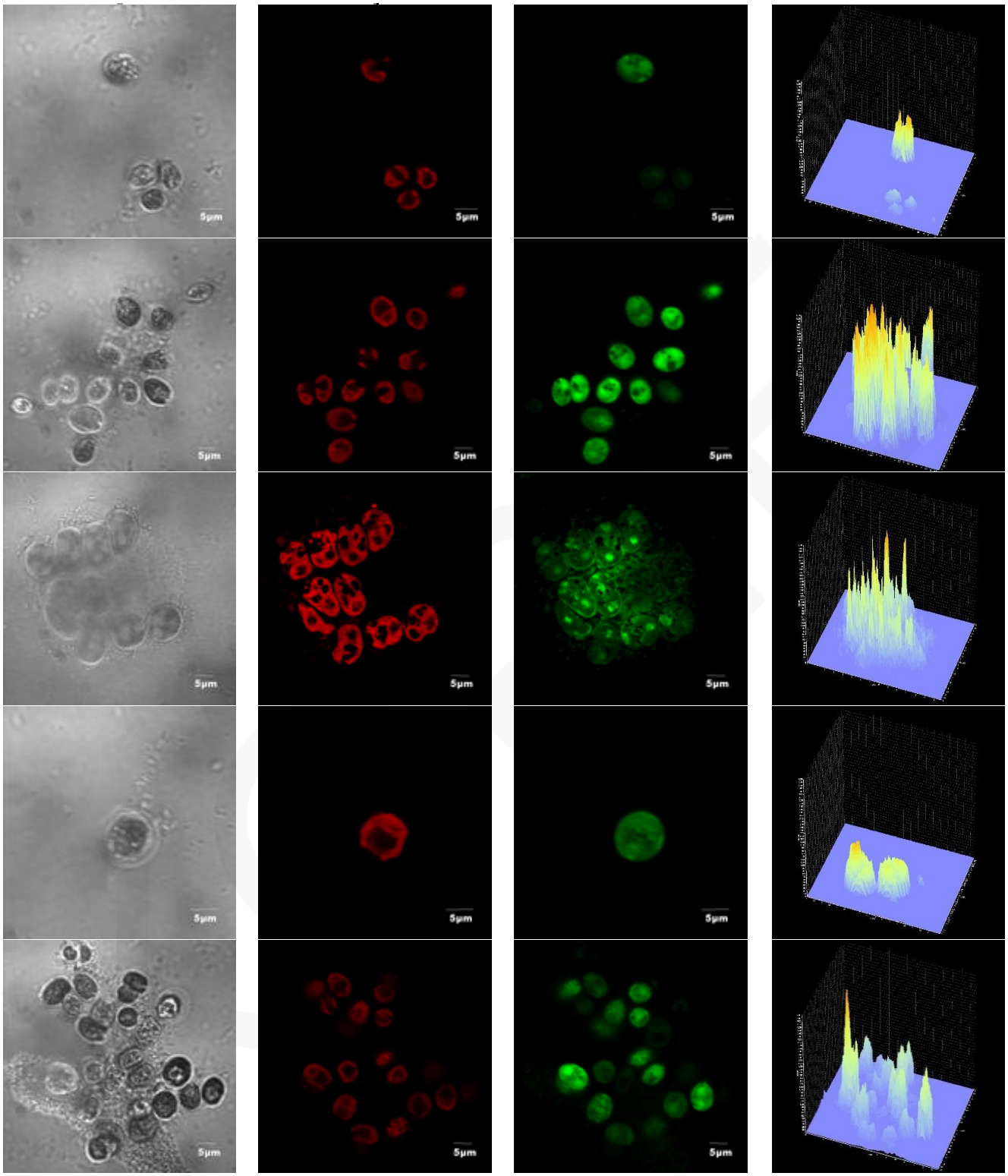
Obr. 29: Detekovaný signál **c-H_2DCF DA** u kmene **CC002 WT** v kontrolních buňkách (A), v buňkách stresovaných 100 mg/l $CdCl_2$ (B1 – 30 min, B2 – 120 min) a 400 mg/l $CdCl_2$ (C1 – 30 min, C2 – 120 min)). Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – autofluorescence chlorofylu – fluorescenční kanál c-DCF – integrální rozložení intenzit signálu (0-4000 jednotek jasu) vycházející z fluorescenčního kanálu.



Obr. 30: Detekovaný signál **c-H_2DCF DA** u kmene **CC002 WT** a efekty působení 400 mg/l $CdCl_2$ na buňky po 120 min – **změna velikosti buněk (A), změna morfologie chloroplastu a vakuolizace (B) a lyze buněk (C).** Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – autofluorescence chlorofylu – fluorescenční kanál c-DCF – složený kanál.



Obr. 31: Detekovaný signál **c-H_2DCF DA** u kmene **CC406** v kontrolních buňkách (A), v buňkách stresovaných 100 mg/l $CdCl_2$ (B1 – 30 min, B2 – 120 min) a 400 mg/l $CdCl_2$ (C1 – 30 min, C2 – 120 min)). Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – autofluorescence chlorofylu – fluorescenční kanál c-DCF – integrální rozložení intenzit signálu (0-4000 jednotek jasu) vycházející z fluorescenčního kanálu.



Obr. 32: Detekovaný signál **c-H_2DCF DA** u kmene **LOX** v kontrolních buňkách (A), v buňkách stresovaných 100 mg/l $CdCl_2$ (B1 – 30 min, B2 – 120 min) a 400 mg/l $CdCl_2$ (C1 – 30 min, C2 – 120 min)). Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – autofluorescence chlorofylu – fluorescenční kanál c-DCF – integrální rozložení intenzit signálu (0-4000 jednotek jasu) vycházející z fluorescenčního kanálu.

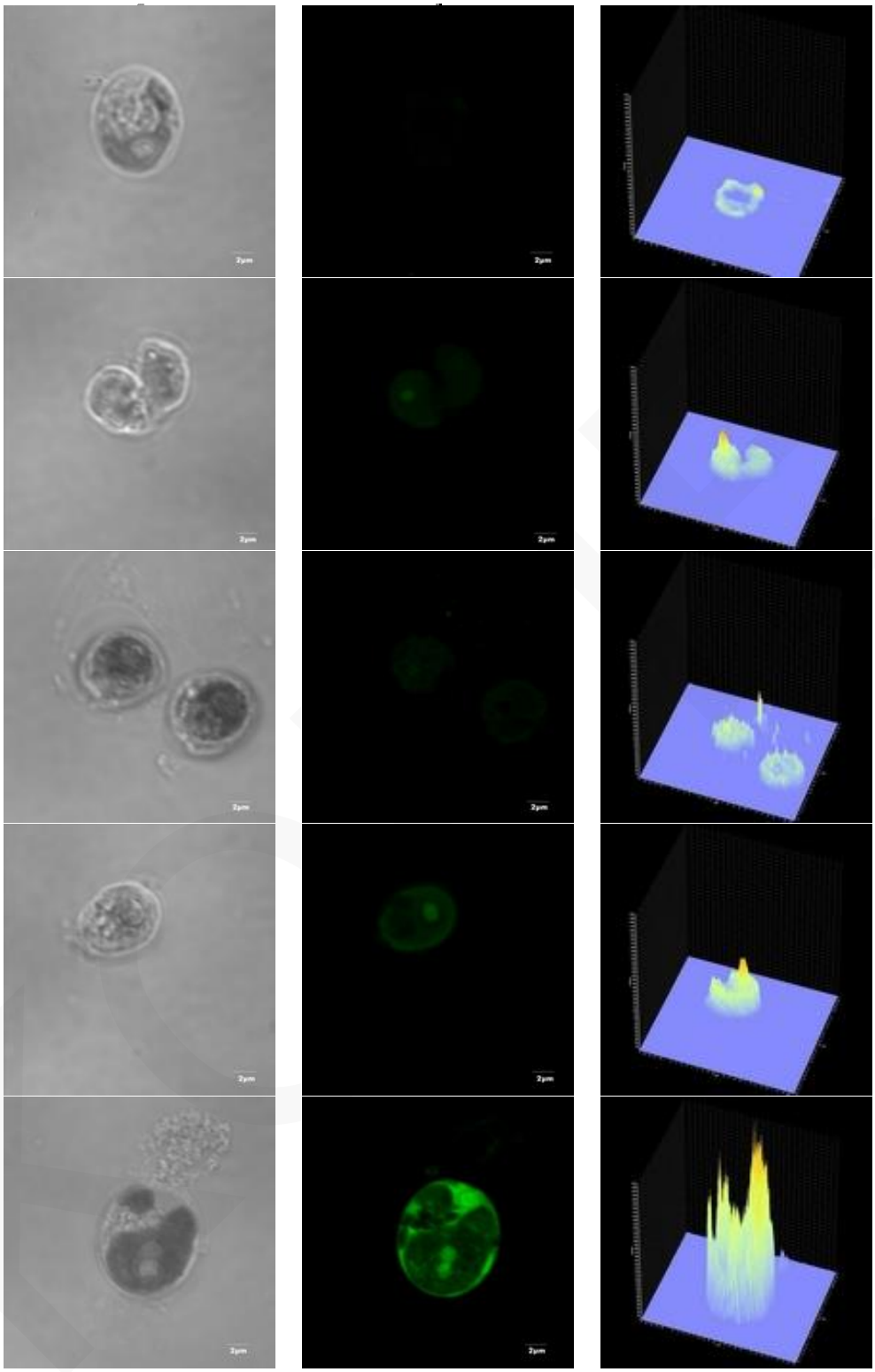
Ze snímků zobrazujících detekci signálu c-H_2DCF DA, jakožto obecného indikátoru oxidačního poškození buněk, je zřejmé, že po 30min inkubaci buněk s kadmiem dochází k nejvyššímu nárůstu signálu c-DCF v koncentraci 100 mg/l, přičemž po 2hod inkubaci už není patrný velký signál produkovaných ROS. Jsou však častěji pozorovány vedlejší efekty kadmia jako jsou morfologické změny buněk. Zejména u koncentrace 400 mg/l byly patrné změny v ultrastruktuře buňky jako je vakuolizace, změna velikosti buněk, dokonce i u některých buněk vyvolala tato koncentrace jejich lyzi. Co se týče rozdílů v míře oxidačního poškození mezy kmeny, nejvíce na daný abiotický stres reagoval kmen LOX, který vykazoval také nejvyšší signály. Důležitou roli, zde hrála i intenzita fotosyntézy v zásobní kultuře, jelikož se očekávalo, že mutantní kmen CC406, který postradá buněčnou stěnu, bude reagovat mnohem citlivěji na stres kadmiem než ostatní studované kmeny. Avšak co se týče fotosyntézy u kmene CC406, neprobíhala u této kultury v takové míře (nízký obsah chlorofylu) jako u kmene CC002 WT a LOX. Vzhledem k tomu, že je fotosyntéza hlavním procesem, při které vznikají ROS i za fyziologických podmínek, mohla hrát tato skutečnost důležitou roli právě při detekci nižších intenzit signálu u CC406.

5.4.2 Detekce produkce singletního kyslíku konfokální mikroskopií

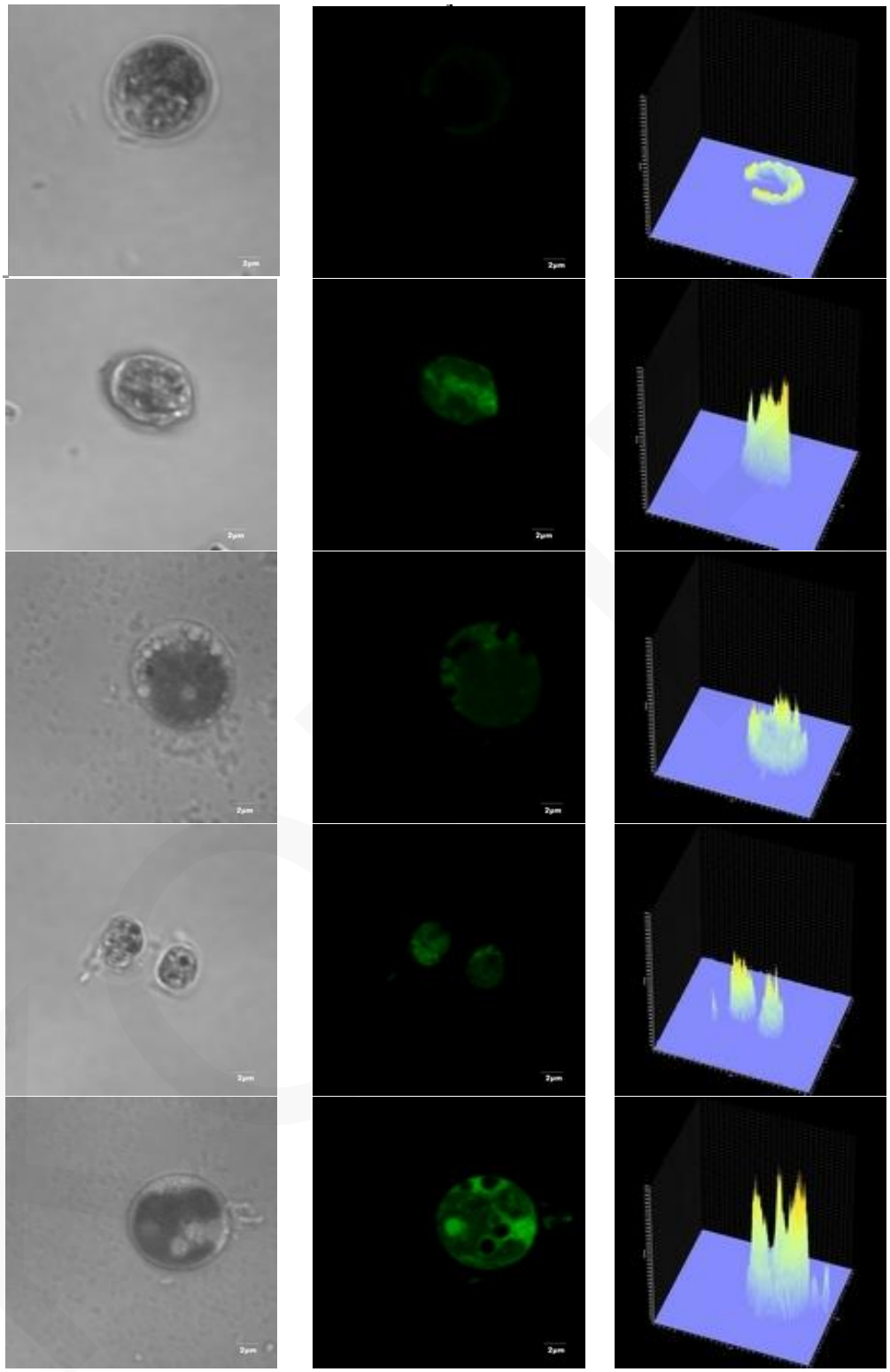
Druhou detekovanou reaktivní formou byl singletní kyslík. U kmene **CC002 WT** byl nejvyšší signál **SOSG** pozorován u koncentrace 400 mg/l, a to po 120 min (Obr. 33/C2). V ostatních případech se jednalo o nepatrný signál, přičemž po 2 h působení byl značný nárůst intenzity signálu oproti 30 min inkubaci s kadmiem (Obr. 33 A, B1, B2, C1).

V případě kmene **CC406** byl nejvyšší signál **SOSG** pozorován u působení 400 mg/l $CdCl_2$ po 2 h (Obr. 34 B2) Vždy byl patrný rozdíl mezi 30min a 120min inkubací, přičemž po 2 h byl pozorovatelný nárůst intenzit signálů, a to jak u 100 mg/l (Obr. 34 B1, B2), tak u 400 mg/l (Obr. 34 C1, C2). V kontrole byl zaznamenán velmi slabý signál (Obr. 34 A).

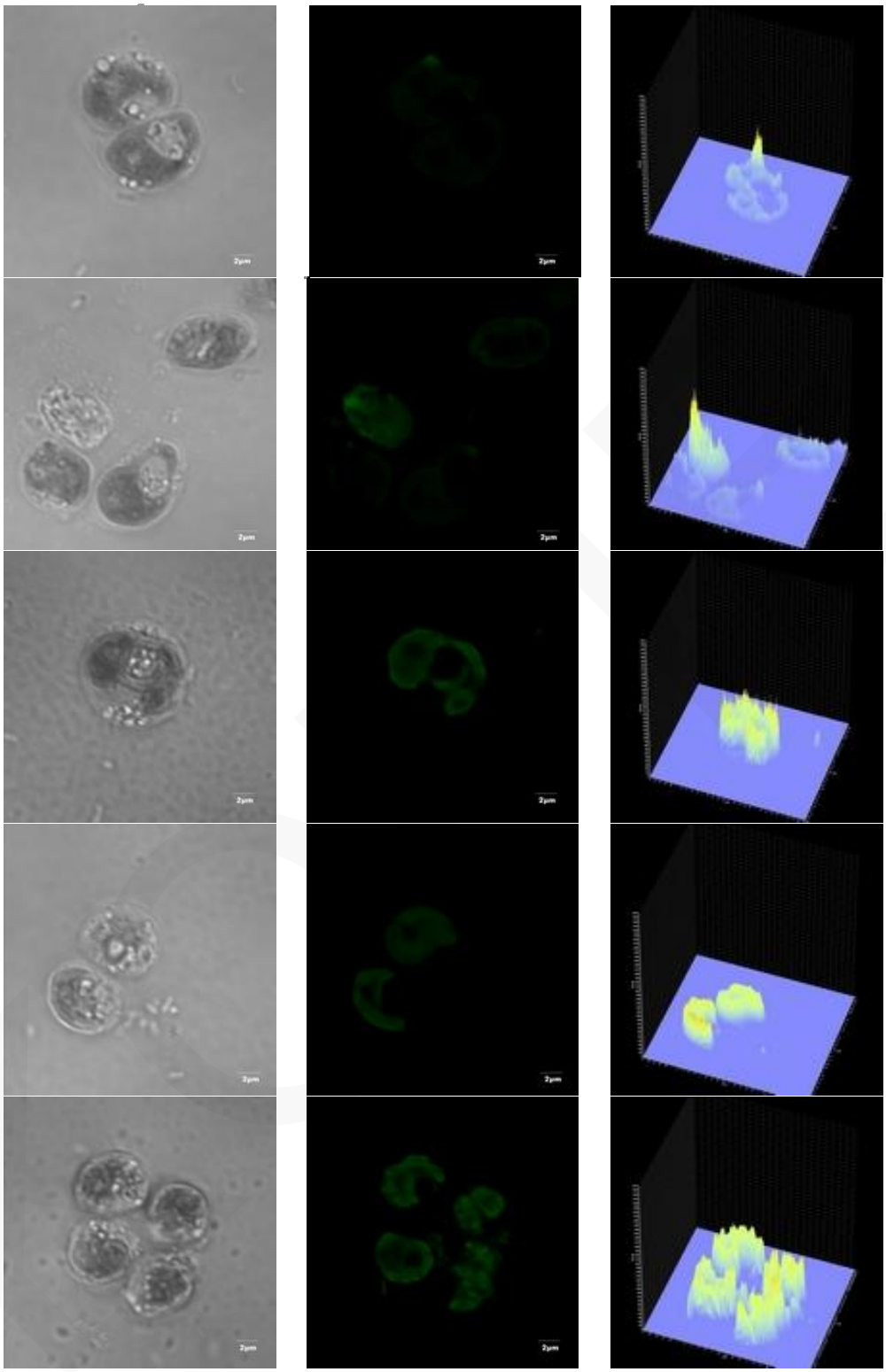
Produkce **singletního kyslíku** byla taktéž pozorována u kmene **LOX**. Zde byla odezva buněk na kadmium po 2 h srovnatelná jak u 100 mg/l (Obr. 35 B2), tak u 400 mg/l (Obr. 35 C2). Také míra odezvy byla vyšší oproti 30min inkubaci buněk s kadmiem (Obr. 35 B1, C1). Opět byl detekován také slabý signál v kontrolních buňkách (Obr. 35 A).



Obr. 33: Detekovaný signál **SOSG** u kmene **CC002 WT** v kontrolních buňkách (A), v buňkách stresovaných 100 mg/l $CdCl_2$ (B1 – 30 min, B2 – 120 min) a 400 mg/l $CdCl_2$ (C1 – 30 min, C2 – 120 min). Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – fluorescenční kanál SOSG-EP – integrální rozložení intenzit signálu (0-3400 jednotek jasu) vycházející z fluorescenčního kanálu.



Obr. 34: Detekovaný signál **SOSG** u kmene **CC406** v kontrolních buňkách (A), v buňkách stresovaných 100 mg/l $CdCl_2$ (B1 - 30 min, B2 – 120 min) a 400 mg/l $CdCl_2$ (C1 – 30 min, C2 – 120 min). Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – fluorescenční kanál SOSG-EP – integrální rozložení intenzit signálu (0-3400 jednotek jasu) vycházející z fluorescenčního kanálu.



Obr. 35: Detekovaný signál **SOSG** u kmene **LOX** v kontrolních buňkách (A), v buňkách stresovaných 100 mg/l $CdCl_2$ (B1 – 30 min, B2 – 120 min) a 400 mg/l $CdCl_2$ (C1 – 30 min, C2 – 120 min). Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – fluorescenční kanál SOSG-EP – integrální rozložení intenzit signálu (0-3400 jednotek jasu) vycházející z fluorescenčního kanálu.

Při detekci tvorby singletního kyslíku konfokální mikroskopií, vykazovaly buňky studovaných kmenů vyšší odezvu produkce singletního kyslíku při působení koncentrace 400 mg/l, přičemž po 2 h byl patrný nárůst intenzit signálu u obou testovaných koncentrací oproti 30min inkubaci buněk. Signál byl po 30 min působení kadmia lokalizován v oblastech chloroplastu

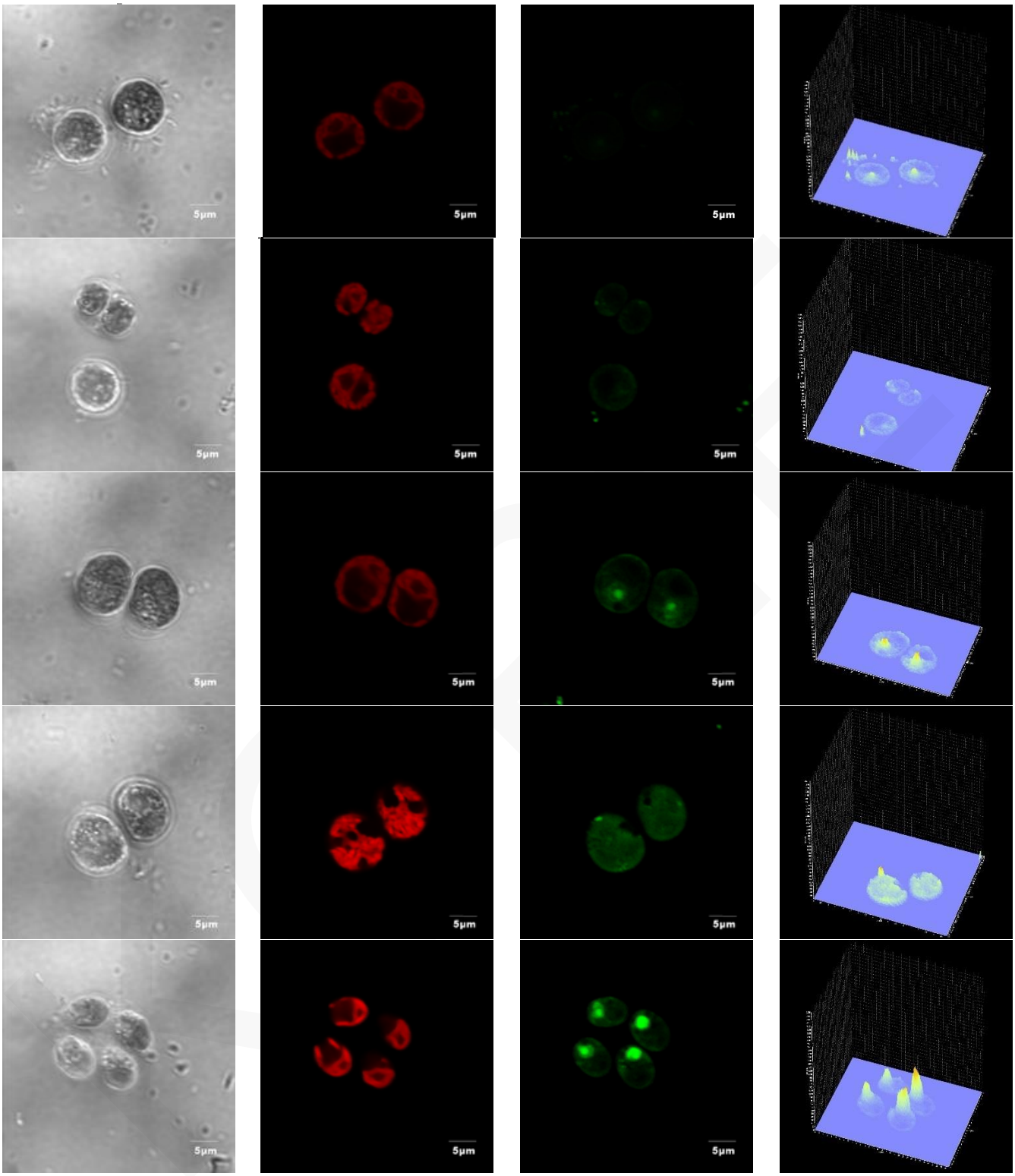
resp. pyrenoidu, přičemž po 2 h byl patrný signál již v celé buňce.

5.4.3 Detekce produkce superoxidového radikálu konfokální mikroskopií

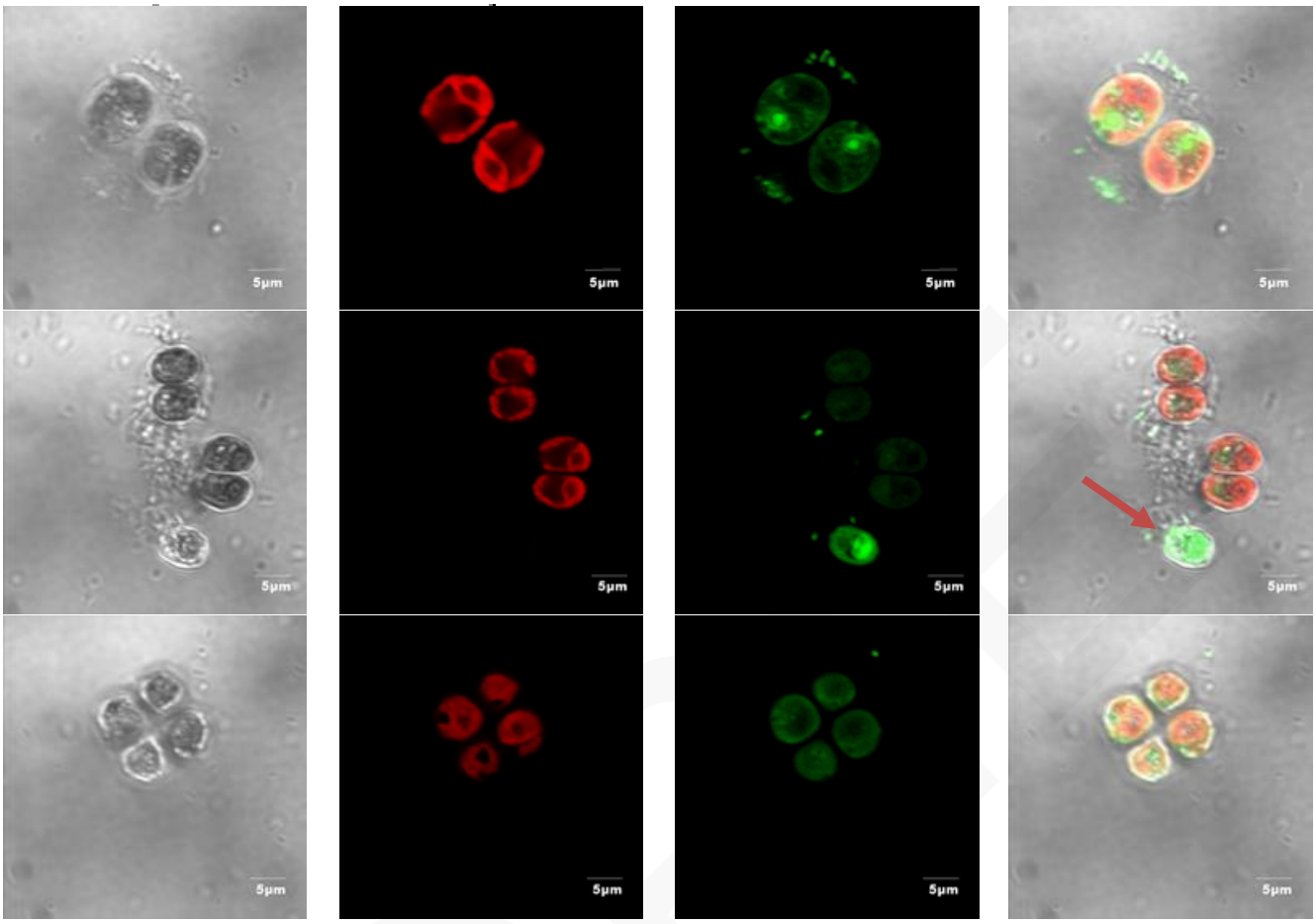
Při pozorování **DHE** signálu byly pozorovatelné nízké intenzity signálu. Signály DHE u kmene **CC002 WT** byly srovnatelné u obou koncentrací a kontroly (Obr. 36) tj. v kulturách se vyskytovaly buňky bez signálu nebo se slabým signálem, přičemž v pozdějších fázích stresu docházelo k soustředění signálu do jádra buněk (Obr. 36 B2, C2). Signál byl lokalizován především v oblasti chloroplastu (pyrenoid) a jádra, avšak u koncentrace 400 mg/l $CdCl_2$ byl signál patrný již v celé buňce (Obr. 36 C1, C2). Po 2h inkubaci buněk s kadmiem docházelo opět k morfologickým změnám buněk, a to konkrétně k vakuolizaci buněk (Obr. 37 A). Také bylo pozorováno, že v případě, že se v buňkách vyskytoval velmi silný signál, docházelo k rozkladu chlorofylu, s čímž souvisel jeho úbytek autofluorescence (Obr. 37 B). Po inkubaci buněk s kadmiem docházelo taktéž k častému shlukování buněk (Obr. 37 C).

Srovnatelná intenzita signálu **DHE** byla pozorována také u kmene **CC406**, avšak poněkud vyšší signál byl zaznamenán u koncentrace 400 mg/l $CdCl_2$ (Obr. 38). I zde se projevovaly efekty kadmia jako je vakuolizace či shlukování buněk.

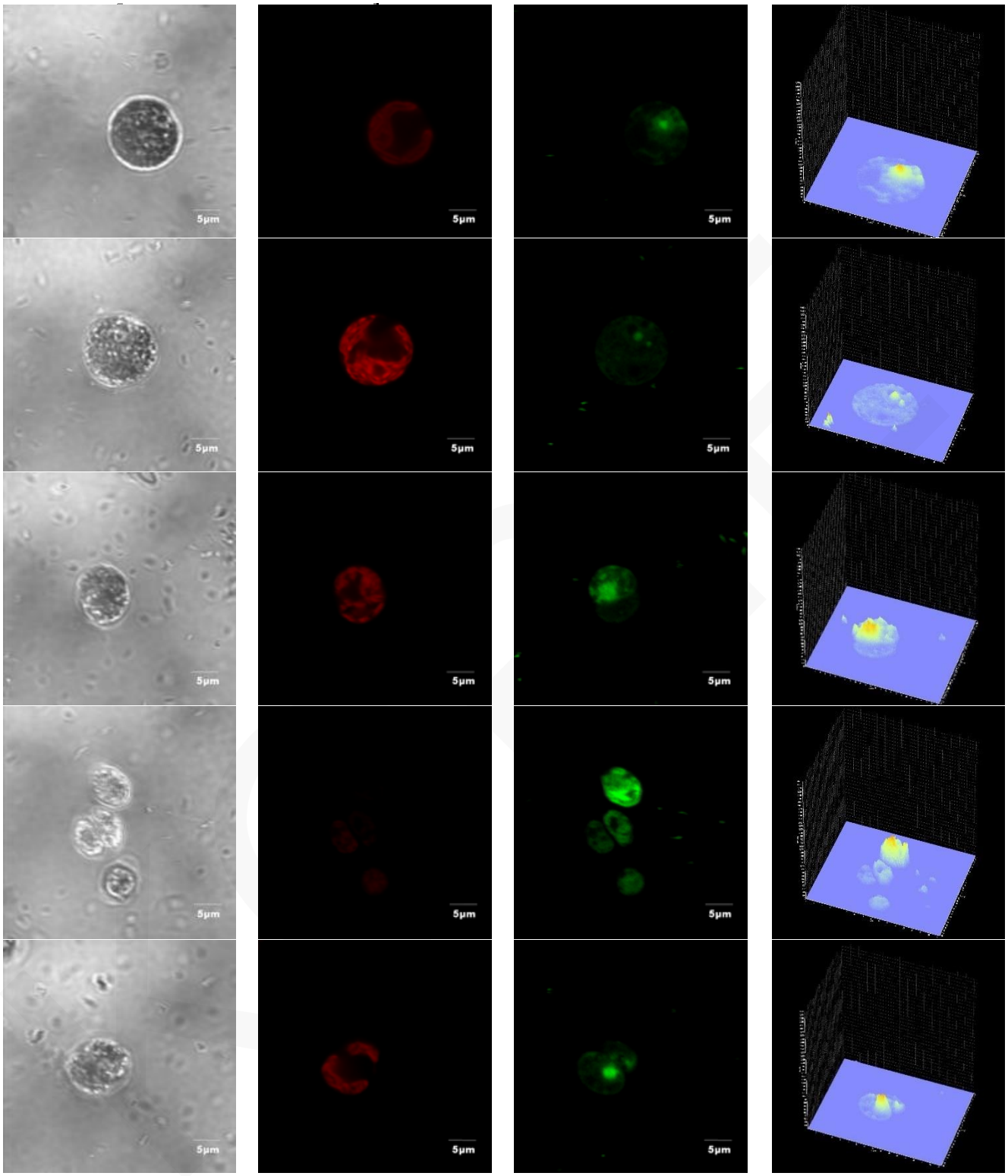
Největší odezvu, tj. vznik **superoxidových radikálů** vykazoval **LOX** mutant, konkrétně při koncentraci 100 mg/l po 30 min (Obr. 39 B1). V ostatních vzorcích byl detekován srovnatelný slabý signál (Obr. 39 A, B2, C1, C2).



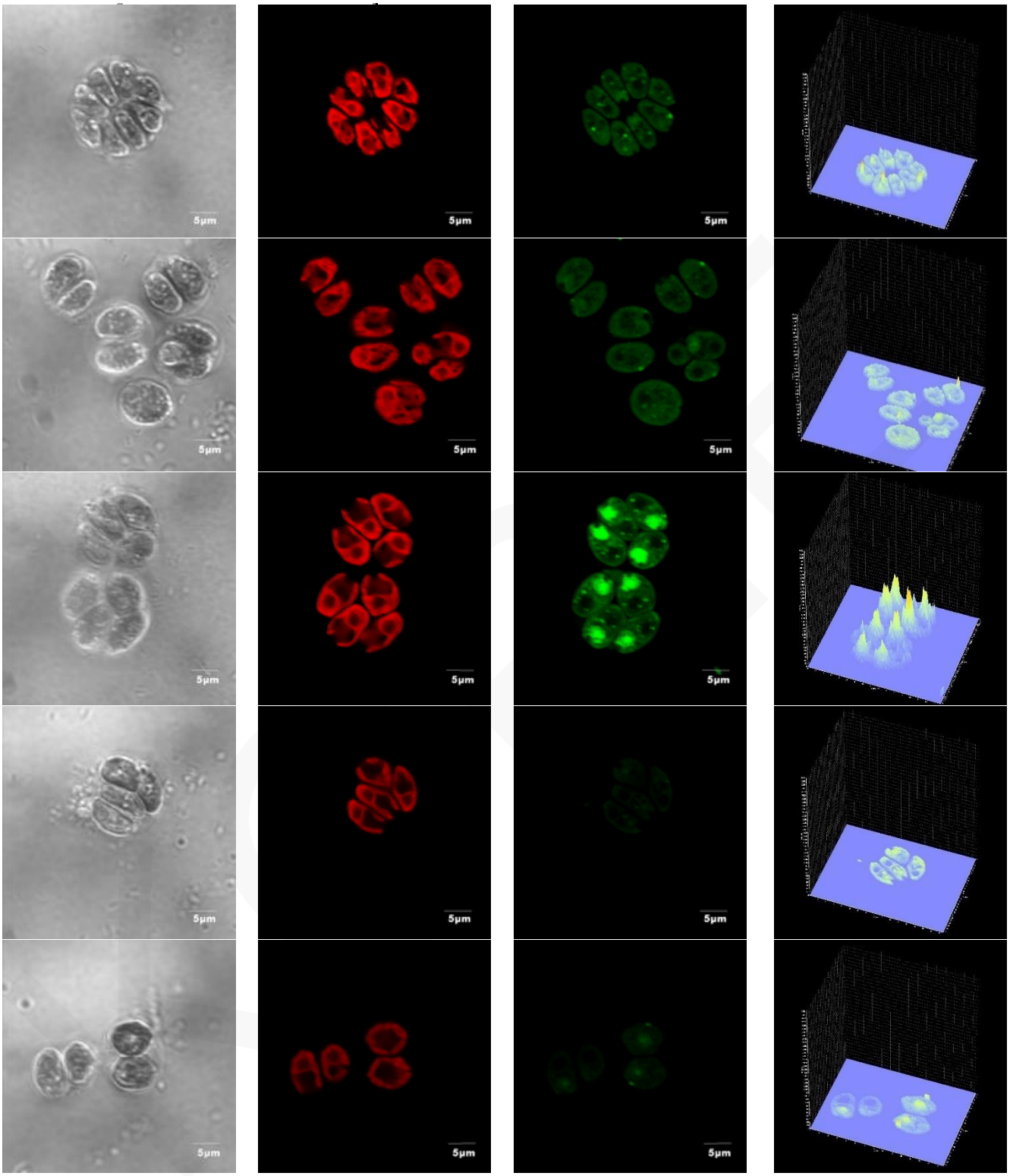
Obr. 36: Detekovaný signál **DHE** u kmene **CC002 WT** v kontrolních buňkách (A), v buňkách stresovaných 100 mg/l $CdCl_2$ (B1 – 30 min, B2 – 120 min) a 400 mg/l $CdCl_2$ (C1 – 30 min, C2 – 120 min). Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – fluorescenční kanál 2-OH-ethidium – integrální rozložení intenzit signálu (0-3500 jednotek jasu) vycházející z fluorescenčního kanálu.



Obr. 37: Detekovaný signál **DHE** u kmene **CC002 WT** a efekty působení 400 mg/l $CdCl_2$ na buňky po 120 min – **vakuolizace (A), rozklad chlorofylu (B) a shlukování buněk (C).** Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – autofluorescence chlorofylu – fluorescenční kanál 2-OH-ethidium – složený kanál.



Obr. 38: Detekovaný signál **DHE** u kmene **CC406** v kontrolních buňkách (A), v buňkách stresovaných 100 mg/l $CdCl_2$ (B1 – 30 min, B2 – 120 min) a 400 mg/l $CdCl_2$ (C1 – 30 min, C2 – 120 min). Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – fluorescenční kanál 2-OH-ethidium – integrální rozložení intenzit signálu (0-3500 jednotek jasu) vycházející z fluorescenčního kanálu.

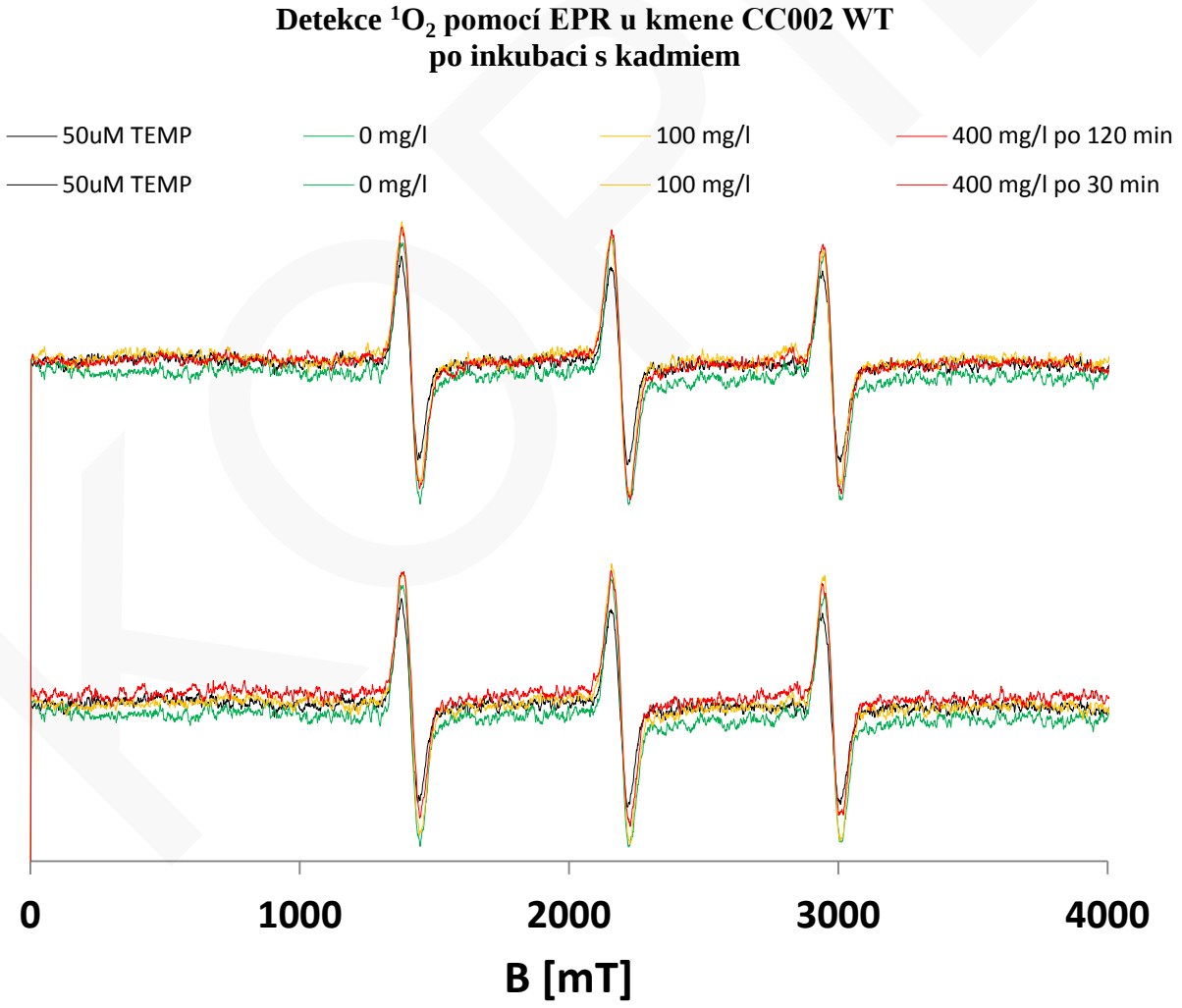


Obr. 39: Detekovaný signál **DHE** u kmene **LOX** v kontrolních buňkách (A), v buňkách stresovaných 100 mg/l $CdCl_2$ (B1- 30 min, B2 – 120 min) a 400 mg/l $CdCl_2$ (C1 – 30 min, C2 – 120 min). Pořadí kanálů zleva – kanál Nomarského DIC – fluorescenční kanál 2-OH-ethidium – integrální rozložení intenzit signálu (0-3500 jednotek jasu) vycházející z fluorescenčního kanálu.

5.4.4 Ověření produkce singletního kyslíku pomocí EPR

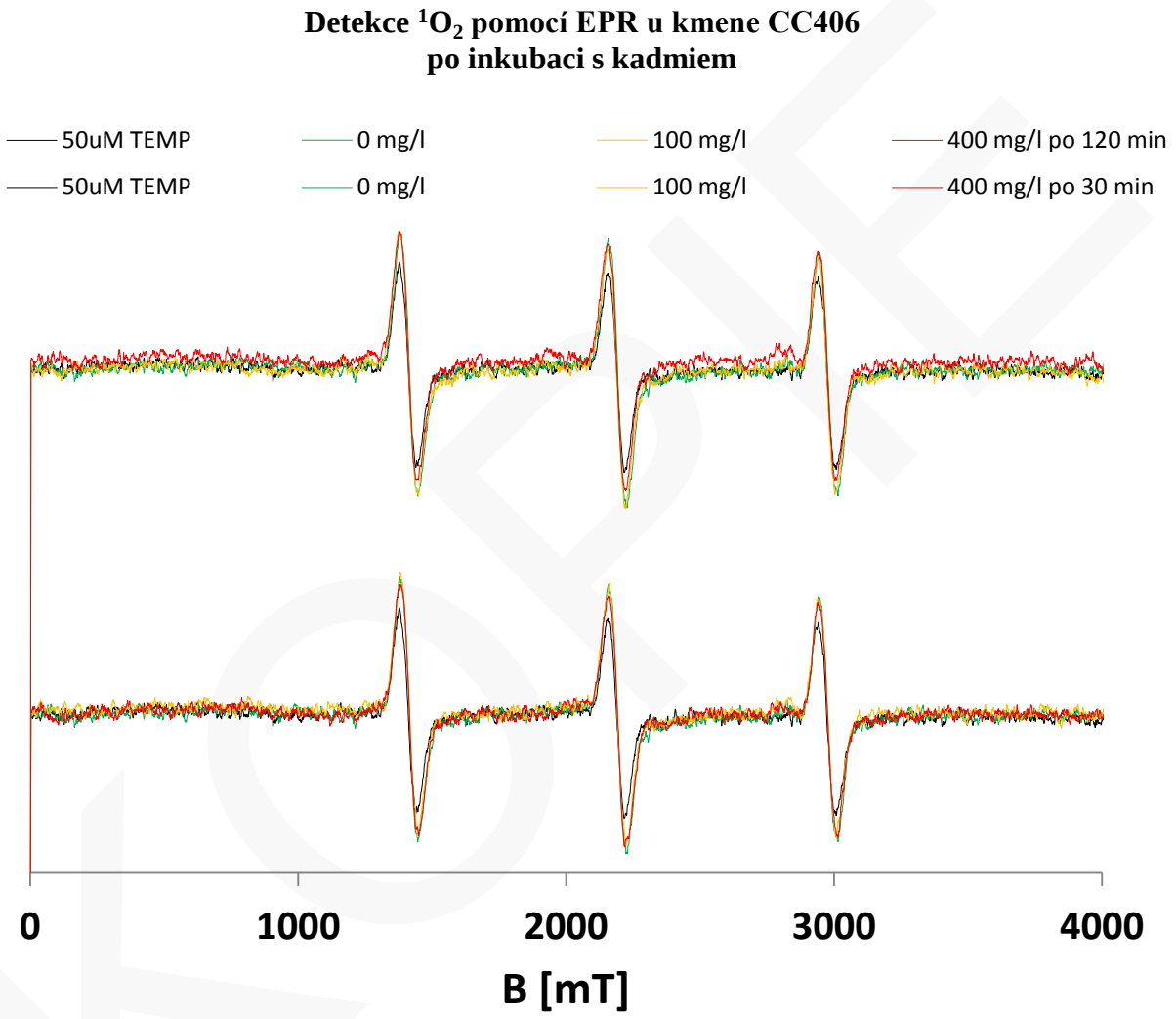
Produkce singletního kyslíku a superoxidových radikálů během oxidačního stresu byla taktéž studována pomocí elektronové paramagnetické rezonance. Spektra byla proměřena vždy po 30 min a po 120 min inkubace buněk s kadmiem.

U kmene **CC002 WT** byla potvrzena produkce singletního kyslíku, přičemž po 30 min byl patrný největší nárůst u koncentrace 100 mg/l. Nižší signál byl detekován u 400 mg/l, který byl srovnatelný s odezvou kontrolní kultury. Po 120 min inkubace s kadmiem byl pozorován trend v nárůstu signálu, tj. od nejvyšší koncentrace 400 mg/l, 100 mg/l a 0 mg/l $CdCl_2$ (Obr. 40). Také bylo proměřeno spektrum samotného spin-trapu, aby bylo možné odečíst jeho pozadí. Jednalo se pouze o částečně purifikovaný spin-trap, tudíž pozadí signálu bylo vysoké (v obrázcích značeno černě 50 µM TEMP).



Obr. 40: EPR spektrum produkce **singletního kyslíku** pro testované koncentrace $CdCl_2$ u kmene **CC002 WT** po inkubaci buněk s kadmiem.

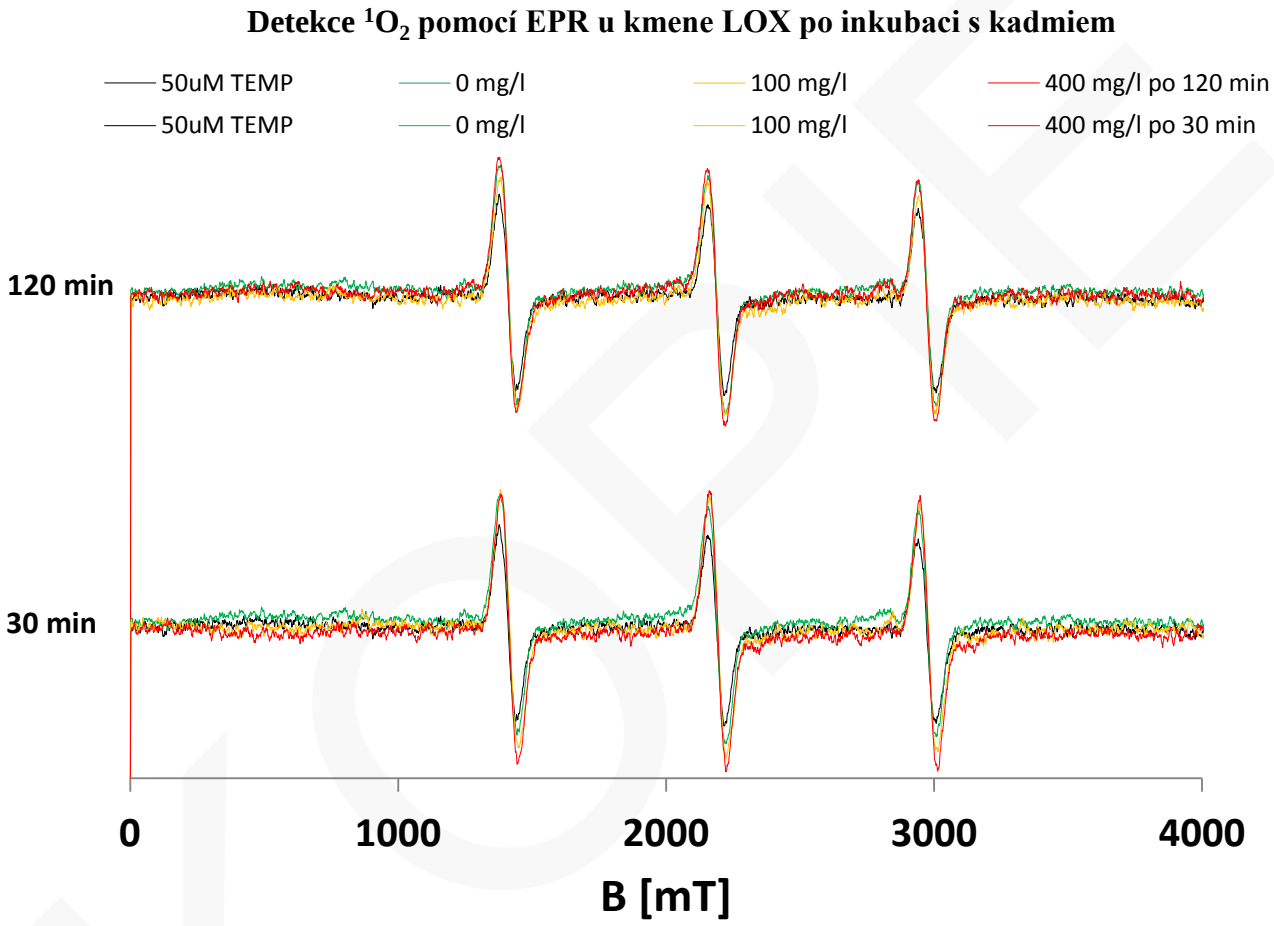
Stejně tomu bylo u kmene **CC406**, kdy byl po 30 min působení kadmia detekován nejvyšší signál vzniku $^1O_2$ u koncentrace 100 mg/l. Signál detekce singletního kyslíku byl u koncentrace 400 mg/l nižší než u kontroly. Po 2 h byl již detekován vyšší signál u koncentrace 400 mg/l než u 100 a 0 mg/l, přičemž tyto dvě koncentrace vykazovaly téměř stejný signál (Obr. 41).



Obr. 41: EPR spektrum produkce **singletního kyslíku** pro testované koncentrace $CdCl_2$ u kmene CC406 po inkubaci buněk s kadmiem.

Po měření vzniku singletního kyslíku u **LOX** kmene byl po 30 min (Obr. 42) detekován nejvyšší signál u koncentrace 400 mg/l, přičemž u 100 mgl/l byl vždy signál o něco nižší

a téměř srovnatelný s kontrolním vzorkem. Po 2h inkubaci buněk s kadmiem, byl již signál koncentrace 400 mg/l srovnatelný s koncentrací 0 mg/l, přičemž u 100 mg/l byl signál poněkud nižší než u těchto dvou koncentrací (Obr. 42).



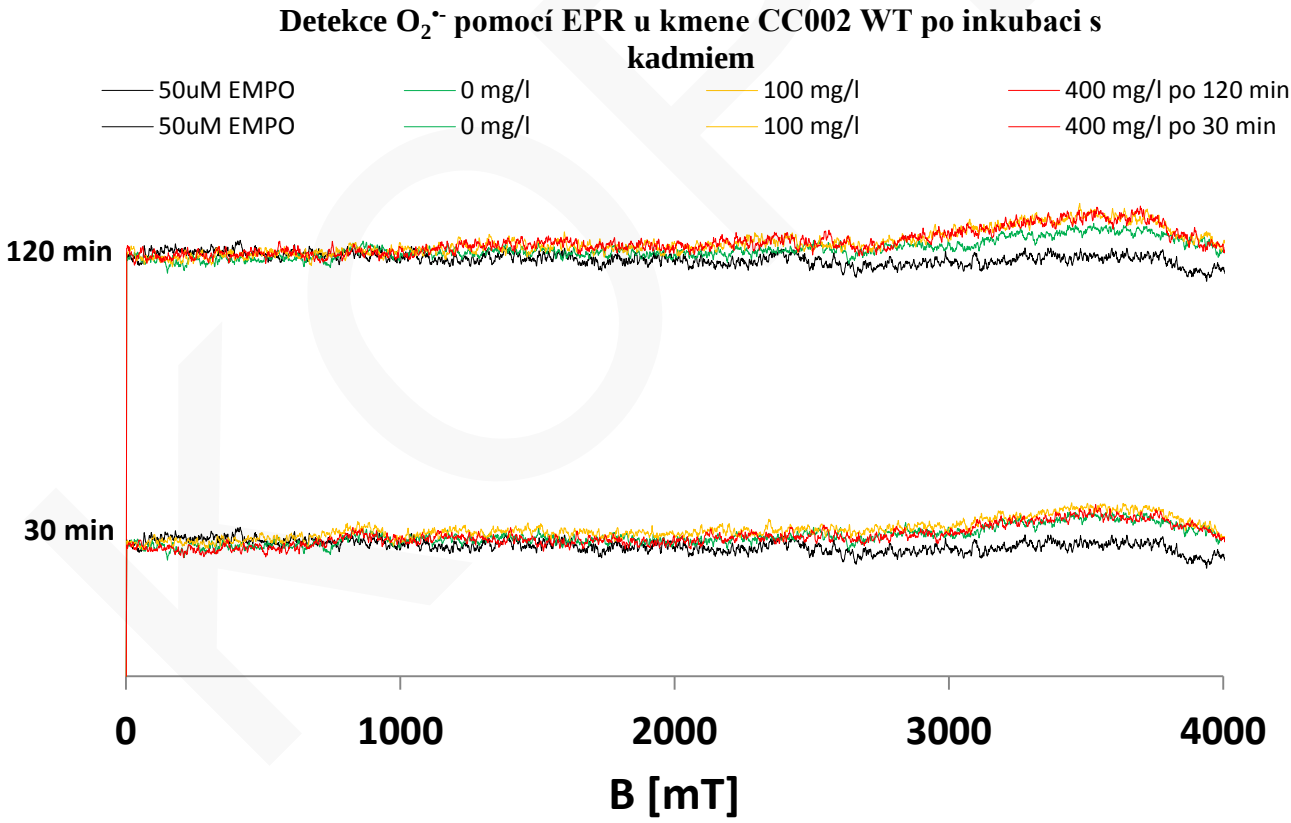
Obr. 42: EPR spektrum produkce **singletního kyslíku** pro testované koncentrace $CdCl_2$ u kmene **LOX** po inkubaci buněk s kadmiem.

U detekce produkce singletního kyslíku metodou EPR je zřejmé, že dle identifikovatelných peaků byla jeho produkce potrvzena. Celkově jsou mezi jednotlivými křivkami ve spektrech pouze nepatrné rozdíly, avšak EPR není natolik citlivá metoda, aby byly i tak malé rozdíly účinně pozorovány. Důvodem však může být i koncentrace buněk v analyzované kultuře, jelikož ve vzorku dochází ke kumulaci vznikajících radikálů během inkubace se spin-trapem, s čímž souvisí fakt, že čím více buněk je analyzováno, tím vyšší signál je detekován.

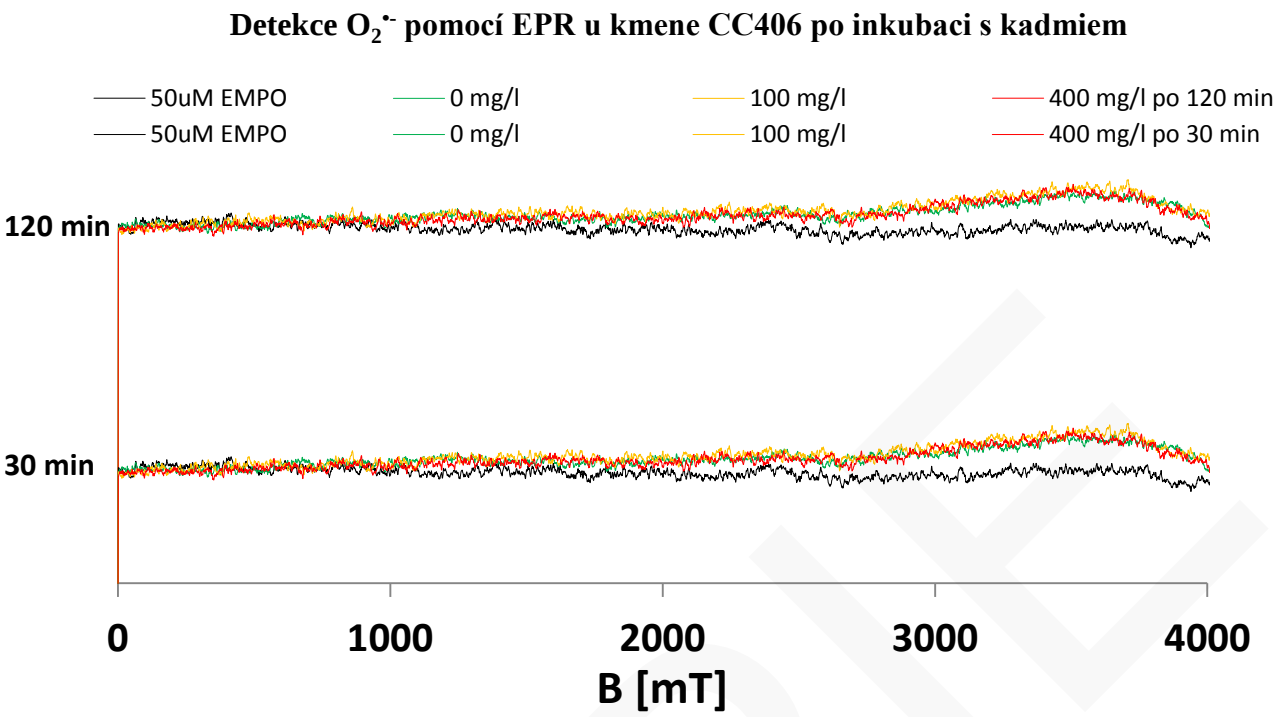
5.4.5 Ověření produkce superoxidového radikálu pomocí EPR

Následně byly detekovány superoxidové radikály pomocí EMPO spin-trapu. Dle následujících grafů je zřejmé, že EPR spektrometr nezachytil vznik téměř žádných superoxidových radikálů (Obr. 44-46), zřejmě z důvodu jejich malého množství. EPR spektrum detekující vznik superoxidových radikálů je znázorněno na Obr. 43.

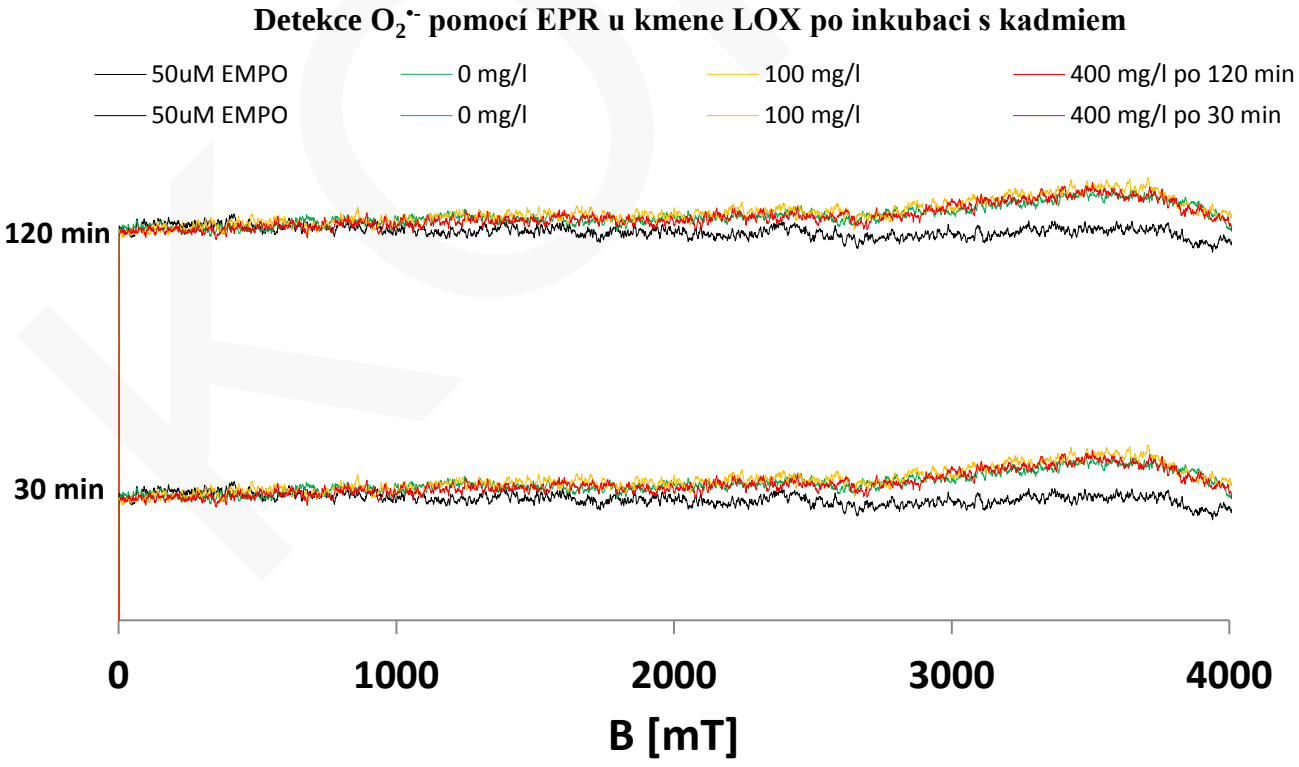
Obr. 43: EPR spektrum EMPO detekující superoxidový radikál.



Obr. 44: EPR spektrum produkce **superoxidového radikálu** pro testované koncentrace $CdCl_2$ u kmene **CC002 WT** po inkubaci buněk s kadmiem.



Obr. 45: EPR spektrum produkce **superoxidového radikálu** pro testované koncentrace $CdCl_2$ u kmene **CC406** po inkubaci buněk s kadmiem.



Obr. 46: EPR spektrum produkce **superoxidového radikálu** pro testované koncentrace $CdCl_2$ u kmene **LOX** po inkubaci buněk s kadmiem.

Při detekci superoxidových radikálů nedošlo k identifikaci jednotlivých peaků, přičemž důvodem mohla být okamžitá reakce vznikajících superoxidových radikálů s dalšími molekulami, nebo superoxidové radikály nevznikaly v takové míře, aby byly spin-trapem účinně zachyceny a následně detekovány. V porovnání s konfokální mikroskopií je však patrné, že při stresu buněk dochází ke vzniku superoxidových radikálů pouze v minimální míře.

5.4.6 Stanovení úrovně lipidové peroxidace

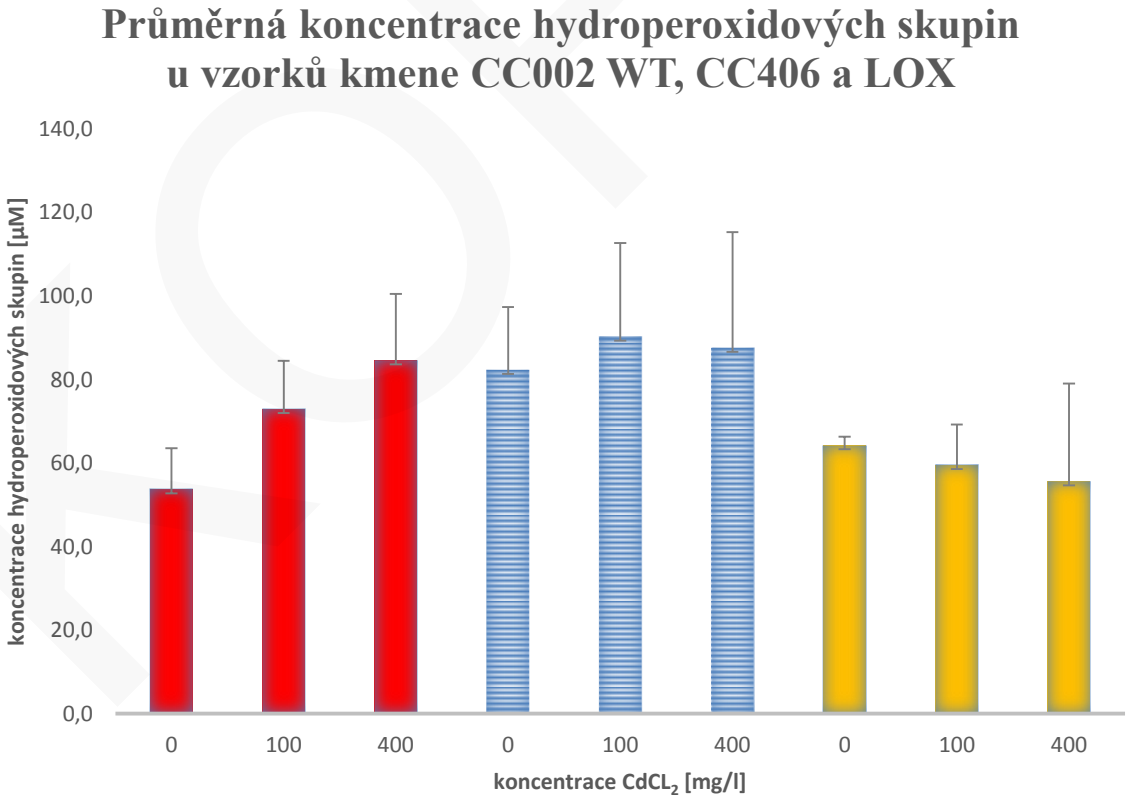
Stejně jako hydroperoxidy, tak i peroxid vodíku reaguje v prostředí xylenové oranže a zprostředkovává oxidaci železnatých iontů na ionty železité za vzniku barevného produktu. Proto byla nejdříve zhotovena kalibrační křivka pro peroxid vodíku viz Příloha, z jejíž regresní rovnice byly následně přepočteny absorbance na koncentrace peroxidu vodíku a vznikajících hydroperoxidů ve vzorku.

Po předchozí extrakci lipidů z jednotlivých kultur kmene CC002 WT, CC406 a LOX, byly vzorky inkubovány se směsí reagentů pro FOX test po dobu 30 min ve tmě. Následně byla postupně spektrofotometricky změřena jejich absorbace při vlnové délce 560 nm, jako blank byl vždy použit konkrétní vzorek s xylenovou oranží bez reagentu obsahující železnaté ionty. Následně byly naměřené absorbance přepočítany pomocí regresní rovnice získané z kalibrační křivky peroxidu vodíku **y = 0,0243x + 0,0042**, které byly vyneseny do grafu společně
se směrodatnými odchylkami. Z výsledných hodnot byla následně zjištěna úroveň lipidové peroxidace v jednotlivých vzorcích testovaných kmenů.

Ze zjištěných koncentrací hydroperoxidových skupin ve vzorku je zřejmé, že nejvíce hydroperoxidů bylo změřeno v kmeni CC406, který postrádá buněčnou stěnu. U kontrolního vzorku tohoto kmene odpovídala průměrná hodnota koncentrace hydroperoxidů hodnotě **82,3 µM**, ve vzorku obsahující kadmium 100 mg/l hodnotě **90,2 µM** a při nejvyšší koncentraci tj. 400 mg/l byla zjištěna koncentrace hydroperoxidů **87,6 µM** (Obr. 47). Tento kmen se z testovaných kmenů jevil jako nejcitlivější ke stresu vyvolaném působením kadmia. U koncentrace 400 mg/l $CdCl_2$ je průměrná koncentrace hydroperoxidů menší než u 100 mg/l, jelikož u 400 mg/l dochází k narušení struktur a lyzi buněk to znamená, že tato koncentrace není pro kultury tolik stresující, avšak jsou zde patrné spíše devastující účinky na buňky. Na základě zjištěných nejvyšších koncentrací vznikajících hydroperoxidů, byla potvrzena nejvyšší úroveň lipidové peroxidace u tohoto kmene.

Nižší koncentrace byly následně zjištěny u kmene CC002 WT, u kterého byla zjištěna rostoucí koncentrace hydroperoxidů s rostoucí koncentrací kadmia. V kontrolním vzorku byla zjištěna koncentrace hydroperoxidů **53,7 µM**, ve vzorku 100 mg/l **73 µM** a při nejvyšší koncentraci kadmia 400 mg/l byla zjištěna koncentrace hydroperoxidů **84,6 µM** (Obr. 47). Zde byla naměřena nejvyšší koncentrace vznikajících hydroperoxidů u koncentrace 400 mg/l, jelikož tento kmen má oproti kmeni CC406 buněčnou stěnu, tudíž zřejmě odolává lépe působení daného stresoru.

Nejnižší koncentrace hydroperoxidů byly naměřeny u LOX kmene, u kterého je mutován gen pro enzym lipoxygenázu, která přispívá do procesu lipidové peroxidace. Ze studovaných kmenů byly u tohoto kmene naměřeny nejnižší absorbance, z čehož byly zjištěny také nejnižší koncentrace hydroperoxidů. V kontrolní kultuře odpovídala koncentrace hydroperoxidů hodnotě **64,3 µM**, v kultuře 100 mg/l **59,5 µM** a v kultuře 400 mg/l **55,6 µM** (Obr. 47). Úroveň lipidové peroxidace byla dle očekávání u LOX kmene nejnižší, jelikož oproti ostatním studovaným kmenům, které mají funkční lipoxygenázu, je zde patrná absence tohoto enzymu.



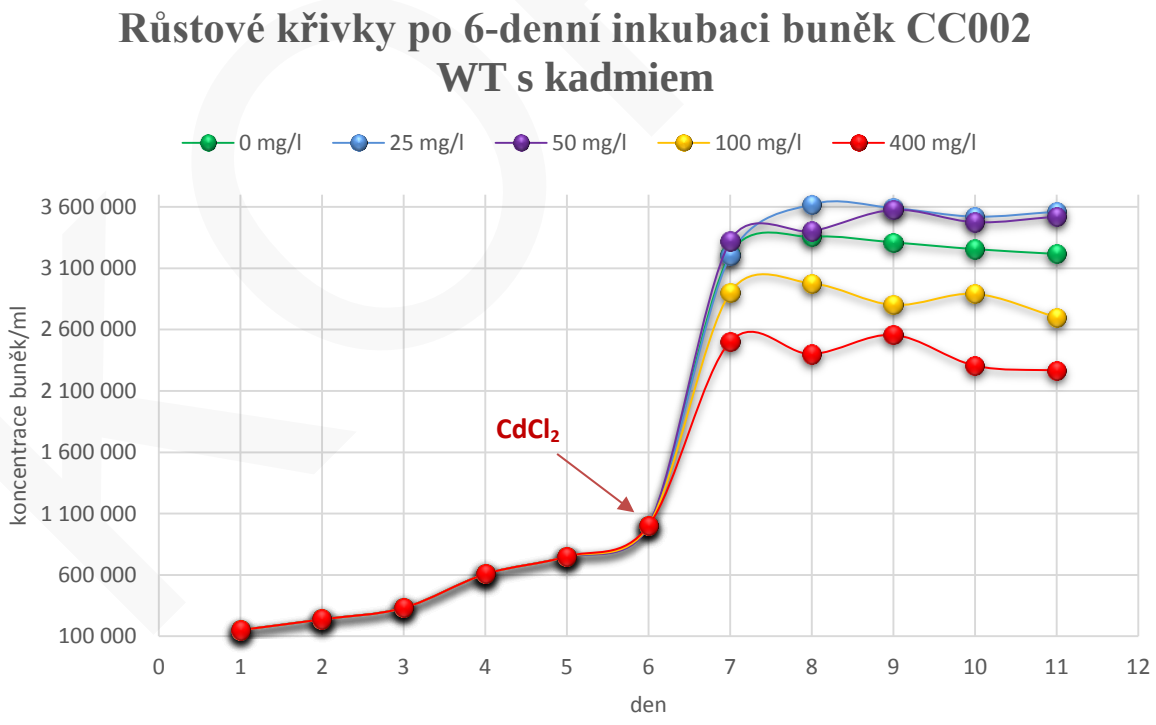
Vysvětlivky: CC002 WT – červeně, CC406 – modře, LOX – žlutě.

Obr. 47: Závislost zjištných koncentrací hydroperoxidových skupin na koncentraci $CdCl_2$ ve vzorcích kmene CC002 WT, CC406 a LOX (měřeno ve 4 opakování).

5.5 Vyhodnocení dlouhodobého účinku kadmia na řasy

Poté, co kultury kmenů CC002 WT a CC406 dosáhly počátku exponenciální fáze (tj. $1{,}0x10^6$ buněk/ml) (LOX mutant nebyl z dlouhodobého hlediska sledován, jelikož nebyl cílem tohoto experimentu), byl přidán $CdCl_2$ v koncentracích 0, 25, 50, 75, 100 a 400 mg/l. Následně byl během 6 dní studován vliv kadmia na charakter růstové křivky studovaných kmenů, přičemž byl v jednotlivé dny zjišťován celkový počet buněk a ze zjištěných hodnot byla vytvořena růstová křivka.

U kmene **CC002 WT** způsobovala koncentrace 400 mg/l $CdCl_2$ nejvyšší inhibici růstu. Menší inhibiční účinek byl pozorován u kultury ovlivněné koncentrací 100 mg/l $CdCl_2$, tudíž u obou koncentrací byl sledován negativní účinek kadmia na růstovou křivku CC002 WT. U koncentrací 25 a 50 mg/l byl zaznamenán pozitivní vliv na růst buněk (Obr. 48). Konkrétní hodnoty buněk v jednotlivé dny viz Tab. III.

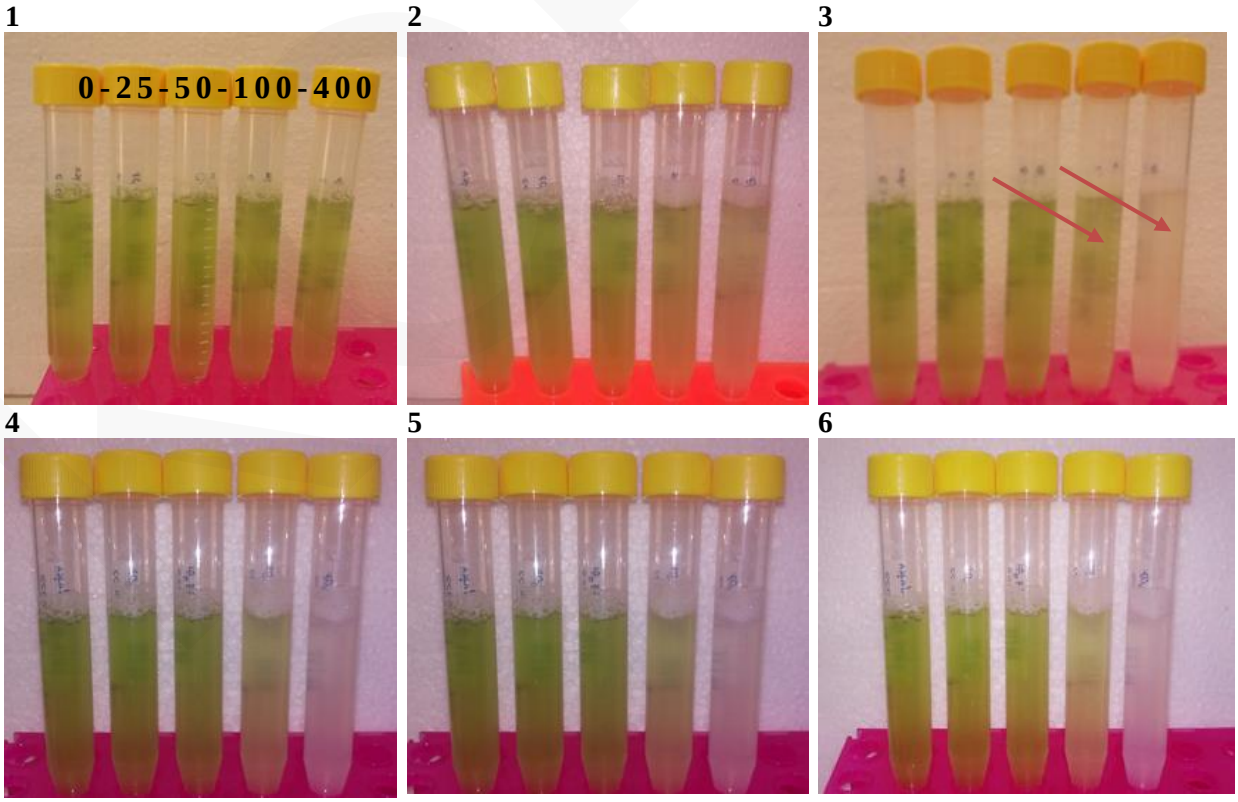


Obr. 48: Růstové křivky kmene CC002 WT po 6-denní inkubaci buněk s kadmiem.

Tab. III: Hodnoty celkového počtu buněk v jednotlivých kulturách CC002 WT na začátku a 6. den inkubace s kadmiem a jejich procentuální vyjádření.

Koncentrace $CdCl_2$ [mg/l]	**Výchozí koncentrace buněk**	**Koncentrace buněk 6. den inkubace s $CdCl_2$**	**Poměr počtu buněk ve srovnání s kontrolou**
0 (kontrola)	$1{,}0x10^6$ buněk/ml	**$3{,}2x10^6$**	**100 %**
25		**$3{,}6x10^6$**	**113 %**
50		**$3{,}5x10^6$**	**109 %**
100		**$2{,}7x10^6$**	**84 %**
400		**$2{,}2x10^6$**	**69 %**

Kromě celkového počtu byl během dlouhodobého působení kadmia zaznamenán také rozklad chlorofylu. Viditelný efekt rozkladu chlorofylu vlivem kadmia byl u CC002 WT pozorován ve 3. den inkubace buněk s kadmiem, a to u koncentrací 100 a 400 mg/l (Obr. 49). Konkrétní hodnoty buněk v jednotlivých dnech viz Tab. IV.



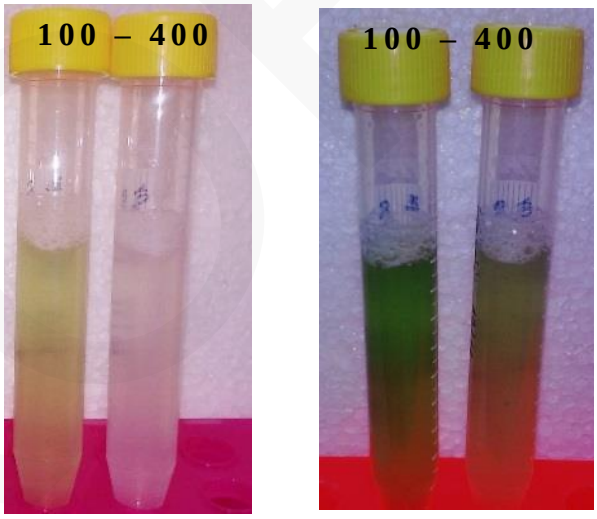
Obr. 49: Vizuální hodnocení vlivu kadmia na růst *C. reinhardtii* kmene **CC002 WT**, 1-6. den kultivace. Viditelný rozklad chlorofylu vlivem 100 a 400 mg/l $CdCl_2$.

V poslední den inkubace s kadmiem byly kultury s nejvyššími koncentracemi, tj. 100 a 400 mg/l $CdCl_2$ zcentrifugovány a k peletu buněk bylo přidáno čerstvé TAP médium a následující dva dny byla sledována regenerace buněk. U 100 mg/l byl zaznamenán nárůst buněk o 30 % a u 400 mg/l o 36 % oproti koncentracím buněk ve 6. den inkubace s kadmiem (Tab. IV). V kulturách došlo ke zvýšení obsahu chlorofylu, tudíž se plně obnovila funkce fotosyntézy (Obr. 50).

Tab. IV: Koncentrace buněk **CC002 WT** po pasážování buněk a procentuální nárůst buněk.

Koncentrace $CdCl_2$ [mg/l] v kultuře	**Výchozí koncentrace buněk**	**Koncentrace buněk 6. den inkubace s $CdCl_2$**	**Koncentrace buněk 2. den po pasážování**	**Procentuální nárůst buněk oproti 6. dni s kadmiem**
100	$1{,}0x10^6$ buněk/ml	$2{,}7x10^6$	$3{,}5x10^6$	30 %
400		$2{,}2x10^6$	$3{,}0x10^6$	36 %

12. den inkubace s kadmiem **2. den po pasážování buněk**



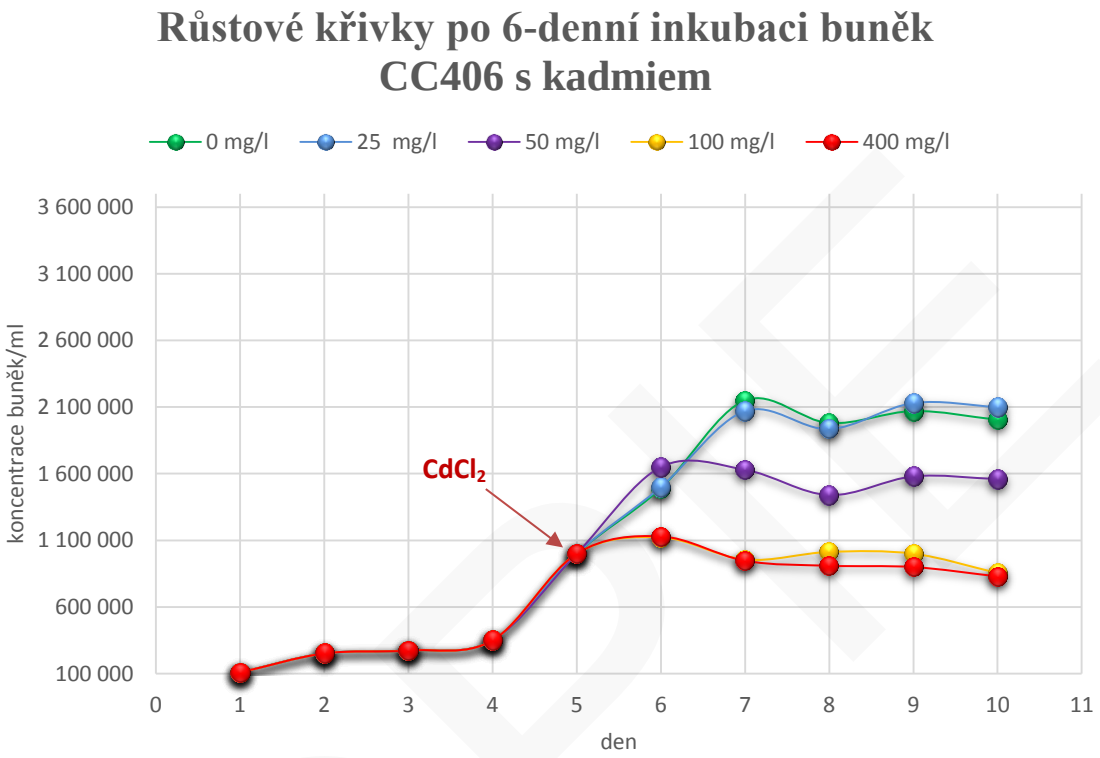
Obr. 50: Obnova syntézy chlorofylu a opětovné zvýšení jeho obsahu v kultuře stresované 100 a 400 mg/l $CdCl_2$ kmene **CC002 WT**.

U kmene **CC406** (bez buněčné stěny) byl negativní vliv $CdCl_2$ pozorován taktéž u koncentrace 100 a 400 mg/l, avšak zde byl negativní účinek pozorován již u koncentrace 50 mg/l. Pouze koncentrace $CdCl_2$ 25 mg/l pozitivně ovlivňovala růst buněk (Obr. 51). Konkrétní hodnoty buněk v jednotlivých dnech viz Tab. V.

V porovnání s růstovými křivkami CC002 WT jsou u kmene CC406 nižší maxima hodnot buněk. Maximální hodnoty u CC002 WT dosahovaly hodnot $3{,}6x10^6$ buněk/ml,

zatímco

u kmene CC406 maxima buněk dosahovala hodnot 2,1x10^6 buněk/ml.



Obr. 51: Růstové křivky kmene **CC406** po 6-denní inkubaci buněk s kadmiem.

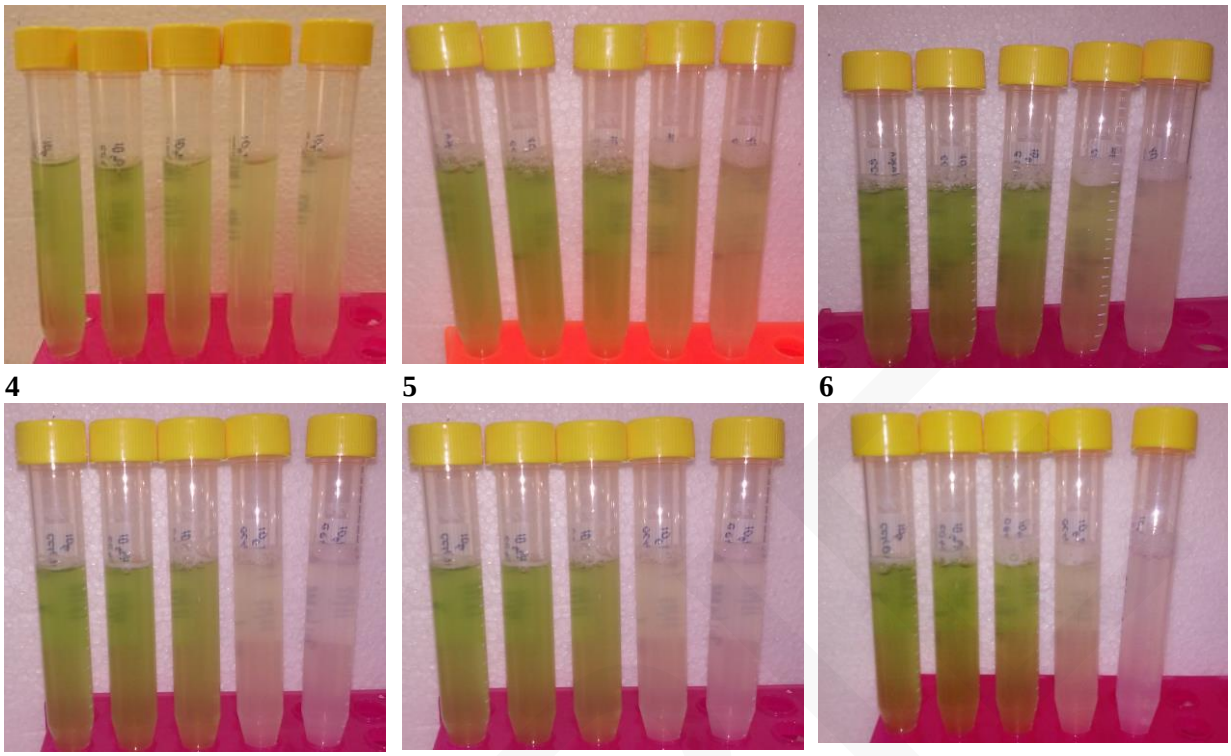
Tab. V: Hodnoty celkového počtu buněk v jednotlivých kulturách CC406 na začátku a na konci 6-denní inkubace a jejich procentuální vyjádření.

Koncentrace $CdCl_2$ [mg/l]	**Výchozí koncentrace buněk**	**Koncentrace buněk 6. den inkubace s $CdCl_2$**	**Poměr počtu buněk ve srovnání s kontrolou**
0 (kontrola)	1,0x10^6 buněk/ml	**2,0x10^6**	**100 %**
25		**2,1x10^6**	**101 %**
50		**1,6x10^6**	**80 %**
100		**8,6x10^5**	**43 %**
400		**8,3x10^5**	**41,5 %**

U dlouhodobého působení kadmia na buňky **CC406** byl taktéž patrný rozklad chlorofylu, avšak tento kmen byl ke kadmiu mnohem citlivější a již druhý den byla patrná razantní barevná změna kultury (Obr. 52).

1 **2** **3**

0-25-50-100-400



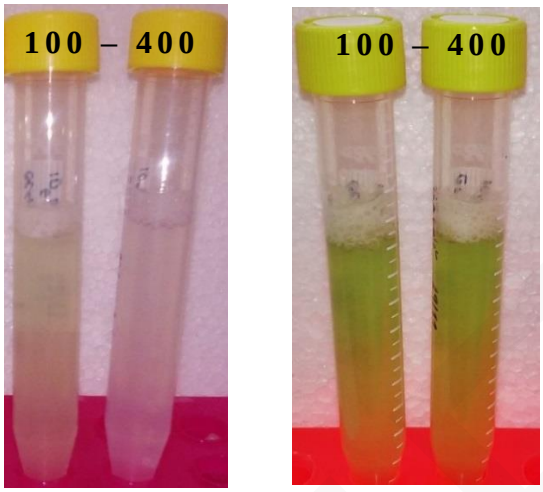
Obr. 52: Vizuální hodnocení vlivu kadmia na růst *C. reinhardtii* kmene **CC406**, 1-6. den kultivace. Viditelný rozklad chlorofylu vlivem 100 a 400 mg/l $CdCl_2$.

U kmene **CC406** byla taktéž sledována následná regenerace buněk u koncentrací 100 a 400 mg/l, tudíž bylo po centrifugaci buněk k peletu přidáno čerstvé TAP médium. U 100 mg/l byl zaznamenán nárůst buněk o 105 % a u 400 mg/l o 153 % oproti koncentracím buněk ve 12. den působení kadmia (Tab. VI). I zde došlo k navýšení obsahu chlorofylu (Obr. 53), stejně jako po pasážování kultur CC002 WT.

Tab. VI: Koncentrace buněk **CC406** po pasážování buněk a procentuální nárůst buněk.

Koncentrace $CdCl_2$ [mg/l] v kultuře	**Výchozí koncentrace buněk**	**Koncentrace buněk 6. den inkubace s $CdCl_2$**	**Koncentrace buněk 2. den po pasážování**	**Procentuální nárůst buněk oproti 6. dni s kadmiem**
100	$1{,}0x10^6$ buněk/ml	**$8{,}55x10^5$**	**$1{,}76x10^6$**	**105 %**
400		**$8{,}3x10^5$**	**$2{,}1x10^6$**	**153 %**

12. den inkubace s kadmiem **2. den po pasážování buněk**



Obr. 53: Obnova syntézy chlorofylu a opětovné zvýšení jeho obsahu v kultuře stresované 100 a 400 mg/l $CdCl_2$ kmene **CC406**.

KOPIE

6 DISKUSE

Stres spouští v exponovaných buňkách nadprodukci reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou následně poškozovat buněčné struktury, DNA a vést až k buněčné smrti. Ve své diplomové práce jsem se zaměřila na studium tvorby ROS během abiotického stresu u řas, způsobeného chloridem kademnatým. Kadmium je řazeno mezi těžké kovy, které nepříznivě působí na buňky živočišné, rostlinné i bakteriální. U tří kmenů zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* jsem s využitím fluorochromů a konfokální mikroskopie lokalizovala ROS (H_2O_2, $HO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$), singletní kyslík a superoxidový radikál, vznikající v souvislosti s expozicí různým koncentracím $CdCl_2$. V závislosti na koncentraci a míře odezvy buněk divokého kmene CC002 (WT) či mutantů CC406 (bez buněčné stěny) a LOX (bez lipoxygenázové aktivity) se po histochemickém značení vyskytovaly ve vzorku v různém poměru buňky se signálem, neobarvené buňky či buňky lyzované, tj. mrtvé. Při histochemickém značení vzorků bylo zapotřebí striktně dodržovat metodiku barvení ve tmě a po konstantní doporučenou dobu. Fluorochromy určené k detekci ROS snadno podléhají autooxidaci na světle, či při nesprávném skladování, proto je nezbytně nutné metodiku dodržovat, aby výsledky byly vypovídající (Wardman, 2007). Obecně vznikají reaktivní formy kyslíku hlavně v organelách spojených s primárním metabolismem, jako jsou chloroplasty, mitochondrie a peroxizomy. V této diplomové práci byly ROS detekovány především v oblasti chloroplastu či v pyrenoidu. Singletní kyslík byl konfokální mikroskopií v minulosti již lokalizován v chloroplastech buněk WT (kmen CC002) i během teplotního stresu, tj. po vystavení buněk teplotě 40 °C (Prasad *et al.*, 2016). Produkce singletního kyslíku byla autory potvrzena pomocí EPR spektroskopie, stejně jako v mé diplomové práci, ale experimenty byly prováděny u buněk ve stacionární fázi (koncentrace $7x10^7$ buněk/ml), což mohlo ovlivnit rozdíly peaků detekovaného signálu, jelikož je produkovaný singletní kyslík kumulován z většího množství buněk. V mé práci byly pro optimalizaci všech experimentů vybrány koncentrace buněk v počátku log fáze tj. cca $1,5x10^6$ buněk/ml, což mohlo být příčinou nižších signálů.

EPR spektroskopie potvrdila souvislost působení kadmia s tvorbou singletního kyslíku, ale ne superoxidového radikálu. Při detekci superoxidového radikálu mohla hrát roli jeho příliš nízká hladina pod detekčním limitem EPR, ale také nižší koncentrace buněk v analyzované kultuře. Na katedře biofyziky PřF UP se metodika EPR s využitím spin-trapu TEMP, EMPO

a POBN využívá zejména na izolovaných protoplastech rostlin po aplikaci stresorů jako je intenzivní osvětlení, vysoká teplota či tma. Kromě TEMP (spin-trap pro detekci singletního kyslíku) a EMPO (k detekci superoxidového radikálu), byl v průběhu experimentů použit také spin-trap POBN (α-(4-Pyridyl N-oxide)-N-tert-butylnitrone; Sigma-Aldrich Co LLC., 2017), který umožňuje detekci hydroxylových radikálů. V porovnání s teplotním stresem však nebyl po ovlivnění řas *C. reinhardtii* kadmiem detekován žádný signál. Důvodem mohla být nižší koncentrace vznikajícího hydroxylového radikálu spojená s menším množstvím analyzovaných buněk ve vzorku.

Szivák *et al.* (2009) potvrdili produkci reaktivních forem kyslíku buňkami *Chlamydomonas reinhardtii* v přítomnosti iontů kovů (Pb^{2+}, Fe^{3+}, Cd^{2+}, Ag^{1+}, Cu^{2+}, As^{5+}, Cr^{6+} a Zn^{2+}). Ionty působící na buňky po dobu 2,5 h vyvolávaly oxidační stres v koncentračním rozmezí 1 μM-1 nM (s výjimkou Fe^{3+}, který byl účinný při 10^{-18} M), což odpovídá možnému výskytu kovů v životním prostředí. Tvorba ROS zde byla stanovena průtokovou cytometrií a mikroskopicky. Histochemické barvení bylo provedeno fluorovaným derivátem fluoresceinu c-H_2DFF DA, který vykazuje lepší fotostabilitu oproti chlorovanému c-H_2DCF DA (Haugland, 2006). V této studii byly ROS detekovány i v kontrolních buňkách, přičemž se jednalo
o fyziologickou produkci ROS, která taktéž závisí na metabolickém stavu buňky. Závěrem této studie bylo, že zvýšenou produkci ROS v buňkách *C. reinhardtii* způsobují některé redox aktivní kovy (Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ag^{+1}, Cr^{6+}) i redox neaktivní kovy (Cd^{2+}, Zn^{2+} a Pb^{2+}). Tvorba ROS oproti kontrolním buňkám se indukovala v pořadí iontů $Pb^{2+} > Fe^{3+} > Cd^{2+} > Ag^{1+} > Cu^{2+} > As^{5+} > Cr^{6+} > Zn^{2+}$, zatímco u As^{3+} a Cr^{3+} iontů nebyl zjištěn účinek. Tato práce prokázala, že Ag je velmi silným induktorem tvorby ROS, což potvrdili ve své studii i Navabpour *et al.* (2003), kdy aplikace Ag na listy *Arabidopsis* spouštěla peroxidaci lipidů v důsledku zvýšené hladiny ROS.

V proteomických studiích zelených řas (Jamers *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004) byla dále potvrzena přechodná up-regulace rodin antioxidačních enzymů (např. superoxidázy, peroxidázy a katalázy) vlivem působení Cu^{2+} a Fe^{3+}. Ve studii Jamers *et al.* (2009) byla toxicita kadmia na buňky řasy *C. reinhardtii* stanovena průtokovou cytometrií po obarvení fluorescein diacetátem (FDA), dihydrorhodaminem 123 (DHR123) a tetramethylrhodamin methylesterem (TMRM), které odrážejí aktivitu esterázy (vitální barvení), přítomnost reaktivních forem kyslíku a membránový potenciál. Buňky řas zde byly vystaveny kadmiu v koncentracích

a 100 μM. Kadmium bylo aplikováno na kulturu o hustotě 10 000 buněk/ml po dobu 0, 24, 48 a 72 h. V těchto časových intervalech byl pozorován nárůst fluorescence DHR123 (tj. produkce ROS) a nárůst fluorescence FDA (tj. aktivita esterázy, která může hrát důležitou roli v detoxikačních mechanismech buněk *Chlamydomonas* vůči kadmiu. Konkrétní role esterázy v těchto systémech je stále předmětem několika studií. Jamers *et al.* (2009) potvrdili negativní vliv kadmia na buňky (v podobě změny ultrastruktury buněk) po 24 h v nižších koncentracích než v této diplomové práci, kde byl stejný negativní efekt pozorován již po 2 h. Je tedy zřejmé, že míra reakce buněk na daný stres je závislá na koncentraci a době působení daného stresoru.

Kadmium patří mezi těžké kovy často znečišťující životní prostředí a působí vysoce toxicky zejména na bakterie, houby, řasy a sinice. Mechanismy toxicity těžkých kovů jsou různé a závisejí především na povaze studovaného organismu, chemické formě kovu a podmínkách prostředí. Výsledky studií zabývajících se působením různých koncentrací kadmia na stejném druhu organismu nemusí být vždy identické, jelikož neexistuje žádná koncentrace kadmia, na kterou by všechny sledované druhy reagovaly za standardních podmínek stejně. Mezi řasami a sinicemi jsou velmi citlivé druhy organismů, které reagují na nízké koncentrace, kdežto bakterie a houby jsou obecně odolnější (Trevors *et al*., 1986).

U bakterií byly používané koncentrace kadmia různé v závislosti na cíli pozorování. Ve studii Surowitz *et al.* (1984) byl studován vliv kadmia na růst a respiraci rezistentního a senzitivního kmene *Bacillus subtillis*. Citlivý kmen byl ovlivněn již koncentrací 10 μg/ml, zatímco rezistentní kmen v minimální míře. Také samotné protoplasty rezistentního kmene byly odolnější ke stresu kadmiem než celé buňky citlivého kmene. Rozdíl mezi těmito kmeny *B. subtillis* byl vysvětlen schopností akumulace kademnatých iontů, přičemž v senzitivním kmeni došlo po 4 h působení kadmia v koncentraci 1 μM k nahromadění Cd^{2+} iontů 10x více než u rezistentního kmene.

Podobné rozdíly v citlivosti vůči kadmiu jsou známy i u řas; například Overnell (1975) ve své studii popsal, že zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* byly citlivé ke kadmiu v koncentraci 1 μM a byla zde patrná značná inhibice fotosyntézy. Naopak mořské druhy, příbuzná zelená řasa *Dunaliella tertiolecta* ani rozsivka *Phaeodactylum tricornutum*, nevykazovaly takovou citlivost na stres kadmiem a až při koncentraci kadmia 0,1 mM byla patrná pouze slabá inhibice jejich fotosyntézy.

Díky studiím toxicity kadmia na různé druhy řas, jsou již pro jednotlivé druhy k dispozici specifické, srovnávací i kvantitativní údaje (EC_{50}, treshold hodnoty). Účinky

kadmia jsou však zavislé jak na druhu organismu, tak i na mechanismu působení jeho toxicity. Ačkoliv specifické trendy působení a účinků na řasy lze obtížně identifikovat. EC_{50} hodnota pro *Chlamydomonas reinhardtii* byla studována v závislosti na ovlivnění fotosyntézy, přičemž se jednalo o hodnotu 0,17 ppm (Overnel, 1975). V této diplomové práci nebyla hodnota EC_{50} stanovena, reaktivní formy kyslíku totiž vznikají i za fyziologických podmínek v procesu fotosyntézy či dýchání. Nebyla měřena ani LD_{50} (koncentrace kadmia, která usmrtí 50 % testovaných buněk), protože v těchto experimentech bylo zapotřebí studovat pouze koncentrace kadmia, které v buňkách vyvolávají mírné stresové reakce (produkce ROS, inaktivace enzymů atd.), nikoliv jejich letalitu. Obě tyto hodnoty byly v této práci nahrazeny měřením vitality buněk v průběhu jednotlivých experimentů.

Jak je již zmíněno výše, že každý druh organismu může na stejný stres reagovat různými způsoby, tak i mechanismy účinků těžkých kovů mohou být různé v závislosti na koncentraci, době působení, prostředí a zejména na studovaném druhu. V mnoha studiích se autoři zabývají mechanismy účinku těžkých kovů v souvislosti s biosorpcí a bioakumulací těžkých kovů. V přírodních nezněčištěných vodách se koncentrace kadmia pohybuje okolo 0,1 nM. Avšak vlivem lidské činnosti a dalších faktorů dochází v mnoha řekách ke zvýšení koncentrace kadmia, které jsou následně toxické pro vodní organismy v daném ekosystému.

Například ve studii Le Faucheur *et al*. (2005) byla studován vztah mezi koncentrací fytochelatinů, bioakumulací kadmia a ovlivnění růstu kadmiem. Zde byla analyzována intracelulární koncentrace kadmia a thiol obsahující molekuly u zelené řasy *Scenedesmus vacuolatus*. Jelikož thiolové molekuly ovlivňují mechanismus působení a následné účinky kadmia, konkrétně byl studován obsah glutathionu, γ-glutamylcystein a fytochelatiny. Kadmium bylo na buňky aplikováno v koncentracích 10^{-14}-10^{-7} M. Zjistilo se, že v kontrolní kultuře bez přídavku kadmia, byl detekován pouze glutathion a jeho obsah se s přidáním kadmia již neměnil. Zatímco prekurzor glutathionu γ-glutamylcystein a fytochelatiny v kontrolní kultuře nebyly přítomny, ve stresovaných kulturách se hladina těchto molekul zvyšovala
se zvyšující se koncentrací kadmia. Při působení nejvyšších koncentrací kadmia byl zaznamenán nárůst fytochelatinů, kdy došlo až k dvojnásobnému zvýšení celkových thiolů ve srovnání s kontrolou.

Studie autorů Awad *et* Chu (2005), ze které jsem v diplomové práci vycházela, se zabývala dlouhodobými účinky kadmia ve formě $CdCl_2$ v koncentracích 2, 10, 25, 50, 75 a 100 mg/l na růst *C. reinhardtii*. Autoři se zaměřili zejména na spektrofotometrické měření

změn optické hustoty a koncentrace chlorofylu. Závěrem uvádějí, že životnost buněk a obsah chlorofylu během kultivace klesá se zvyšující se koncentrací, což je srovnatelné s dlouhodobou studií vlivu kadmia na buňky v této diplomové práci. Taktéž výsledek působení 25 mg/l $CdCl_2$ na studované řasy koreluje se závěrem této diplomové práce, kdy byla zjištěna rezistence buněk k této nízké koncentraci a stimulace dělení. Vysoké koncentrace $CdCl_2$ byly pro mutantní kmen CC406 i pro kmen CC002 WT již po několika dnech letální.

Ke stejným závěrům došli ve své studii i Collard *et* Matagne (1990), kteří buňky řas pěstovali na agaru obsahujícím kadmium ve vysoké koncentraci i přes vysokou úmrtnost. Přeživší klony buněk byly analyzovány s cílem odhalit geny zodpovědné za rezistenci vůči kadmiu. Výsledkem bylo, že za schopnost rezistence je zodpovědná jaderná mutace *cadA*, která pravděpodobně již existovala v původních WT buňkách.

U *Chlamydomonas* byly kromě kadmia studovány také účinky dalších kovů, jako je kobalt, měď a nikl. Předmětem studia byly kmeny *Chlamydomonas* s buněčnou stěnou a kmeny, které ji postrádají. Zjistilo se, že hodnota pH může ovlivnit toxicitu daných kovů, a že všechny studované kovy vykazovaly nižší toxicitu při pH 5 než při pH 7. Tato studie přispěla zejména do problematiky mechanismu rezistence vůči těžkým kovům, jelikož byla během této studie patrná změna v citlivosti studovaných kmenů na studované kovy. Zejména však kmen bez buněčné stěny byl mnohem citlivější ke kadmiu, než kmen s buněčnou stěnou (Macfie *et al.*,1994).

Abiotický stres silně ovlivňuje bioenergetiku buňky. U rostlin tak mohou mitochondrie kontrolovat produkci ROS prostřednictvím systémů schopných pohlcovat přebytečnou energii. Proto jsou právě mitochondrie schopné hrát důležitou roli v adaptaci buněk k abiotickým stresům, které vyvolávají oxidační stres. Bylo také zjištěno, že například u pšenice je přebytečná energie přenesena do detoxikačních systémů mitochondrií, čímž dochází k poklesu produkce ROS (Pastore *et al.,* 2002). Kromě mitochondrií se na produkci ROS v rostlinných buňkách podílí chloroplasty, jejichž součástí je tylakoidní membránový systém (Pfannschmidt, 2003).

V souvislosti s programovanou smrtí buněk vlivem abiotického stresu, byla také studována exprese anti-apoptotického Bcl-2 proteinu v transgenním tabáku, která odhalila vliv chloroplastů v procesu programované buněčné smrti vyvolané stresem (Chen *et* Dickman, 2004).

Lipidová peroxidace vlivem nadměrné produkce ROS byla potvrzena zejména na rostlinách vystavených abiotickým stresům. Konkrétně ve studiích Ammar *et al.* (2007); Mobin *et* Khan (2007); Noriega *et al.* (2007); Razinger *et al.* (2008); Singh *etal.* (2008)*;* Wang *et* Song (2009) byl studován účinek kadmia, tj. zvýšení akumulace peroxidů lipidů u studovaných rostlin. Kromě kadmia byla ve studii Khan *et* Panda (2008) studována reakce rýže *Oryza sativa* v souvislosti s vysokou salinitou (NaCl po dobu 24 h, v koncentracích 50, 100 a 150 mM), přičemž se zjistila taktéž zvýšená peroxidace lipidů.

Membránová lipidová peroxidace u řas byla již publikována v několika studiích, avšak jednalo se o odlišné metodiky jejího stanovení. Jak je již zmíněno v literárním přehledu, produkty lipidové peroxidace mohou být různé (MDA, thiobarbiturová kyselina, organické hydroperoxidy aj.). V mé práci byla použita Folchova metoda k extrakci lipidů z řas (po sonikaci) a následně byla pomocí FOX testu stanovena míra vznikajících organických hydroperoxidů. Fox assay je metodika původně prováděná na rostlinách. Při studiu řas byl FOX test použit například ve studii Tannin-Spitz *et al.* (2005). Zde byla tato metoda stanovení organických hydroperoxidů využita ke stanovení autooxidace linoleové kyseliny při studiu antioxidační aktivity polysacharidů u červené řasy *Porphyridium* sp. Neexistuje mnoho studií, ve kterých se metoda stanovení FOX testem využívá na řasách, jelikož se v dnešní době přistupuje spíše k novějším metodám stanovení lipidové peroxidace jako je stanovení MDA či thiobarbiturové kyseliny metodou HPLC. V této diplomové práci bylo FOX testem prokázáno zvýšení lipidové peroxidace vlivem působení vysokých koncentrací kadmia (100 a 400 mg/l), přičemž u studovaného kmene CC406 bez buněčné stěny byla míra lipidové peroxidace nejvyšší, tudíž se jevil jako nejcitlivější ze všech testovaných kmenů.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly předmětem studia řasy druhu *Chlamydomonas reinhardtii*, který slouží jako modelový organismus v molekulární a buněčné biologii. Tato zelená řasa se totiž snadno kultivuje, má krátkou generační dobou, heterotrofní i fakultativně autotrofní výživu, snadné pohlavní a nepohlavní rozmnožování, osekvenovaný genom a lze ji dobře transformovat. Cílem této práce bylo zhodnotit růst studovaných kmenů CC002 (WT), CC406 (bez buněčné stěny) a LOX (mutován lipoxygenázový gen), a zejména pozorovat vlivy různých koncentrací kadmia na produkci reaktivních forem kyslíkuu u studovaných kmenů.

Krátkodobý stres po dobu 2 h byl spojen s produkcí reaktivních forem kyslíku, která byla studována jak konfokální mirkroskopií, tak i metodou elektronové paramagnetické rezonance. U koncentrace 400 mg/l $CdCl_2$ byly pozorovány změny v ultrastruktuře buněk, jako je vakuolizace, změna velikosti a shlukování buněk, rozklad chlorofylu, a dokonce i jejich lyze. Vysoká úroveň ROS v buňce má nepříznivý vliv zejména na membránové lipidy a způsobuje jejich peroxidaci. Proto i úroveň lipidové peroxidace korelovala s působením vysoké koncentrace kadmia na buňky řas, přičemž kmen CC406 bez buněčné stěny se k tomuto stresu jevil jako nejcitlivější.

Dlouhodobý účinek kadmia byl sledován z hlediska ovlivnění růstové fyziologie řas, se zaměřením na změny charakteru růstových křivek. Dlouhodobě byly buňky kultivovány s kadmiem o koncentracích 0, 25, 50, 100 a 400 mg/l $CdCl_2$. Ukázalo se, že kadmium v nízkých koncentracích působí na růst buněk pozitivně, zatímco ve vysokých koncentracích působí rozklad chlorofylu a úhyn buněk.

Z výsledků dlouhodobého působení kadmia na buňkách *C. reinhardtii*, je taktéž patrné, že po opětovné kultivaci buněk v čerstvém médiu, jsou buňky schopné regenerovat. Do budoucna zůstává otázkou, jaké mechanismy tolerance vůči těžkým kovům zelené řasy v přírodě využívají a jak se dokáží narůstajícímu znečištění vod přizpůsobovat. Míru znečištění vodních ekosystémů lze měřit, ale jak toto znečištění ovlivňuje různé vodní organismy a jaké toxické účinky mají látky obsažené v přírodních vodách na řasy, je zapotřebí dále prostudovat na buněčné i molekulární úrovni.

8 SEZNAM LITERATURY

Alscher, R. G., Hess, J. L. (1993): Antioxidants in higher plants. Boca Raton: CRC Press.

Alscher, R. G., Donahue, J. L., Cramer, C. L. (1997): Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*, 100, 224-233.

Ammar, W. B., Nauairi, I., Zarrouk, M., Jamel, F. (2007): Cadmium stress induces changes in the lipid composition and biosynthesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves. *Plant Growth Regulation*, 53, 75-85.

Asada, K. (1996): Radical production and scavenging in the chloroplasts. In Photosynthesis and the Environment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 123-150.

Asada, K., Takahashi, M. (1987): Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D. J., Osmond, C. B., Arntzen, C. J. eds. *Photoinhibition Topics in Photosynthesis*, 9, 227-287.

Bang S. W, Clark, D. S. Keasling, J. D. (2000): Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (phsABC) from *Salmonella enterica serovar typhimurium* in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3939-3944.

Barsanti, L., Gualtieri, P. (2014): Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, pp. 141-172. ISBN: 978-1-4398-6732-7.

Bencko, C., Cikrt, M., Lenert, J. (1995): Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka. Grada Publishing. Praha, pp. 288. ISBN: 80-7169-150-X.

Bischoff, H. W., Bold, H. C. (1963): Phycological Studies IV. Some Soil Algae From Enchanted Rock and Related Algal Species. University of Texas, Austin, 6318, 1-95.

Blowers, A., Bogorad, L., Shark, K., Sanford, J. (1989): Studies on *Chlamydomonas* chloroplast transformation: foreign DNA can be stably maintained in the chromosome. *Plant Cell*, 1, 123-132.

Bold, H. C. (1949): The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. Bull. *Torrey Botanical Club*, 76, 101-108.

Boynton, J., Gillham, N., Harris, E., Hosler, J., Johnson, A., Jones, A., Randolph-Anderson, B., Robertson, D., Klein, T., Shark, K., Sanford, J. (1998): Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 240, 1534-1538.

Brash, A. R. (1999): Lipoxygenases: occurrence, function, catalysis, and acquisition of substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 23679-23682.

Bundock, P., Den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. G. M, Hooykaas, P. J. J. (1995): Trans-kingdom gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 14, 3206-3214.

Butler, M., Haskew, A. E., Young, M. (1980): Copper tolerance in the green algae *Chlorella vulgaris*. *Plant, Cell & Environmen*t, 3, 119-128.

Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Ravanat, J. L. (2002): Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531, 5-23.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192-208.

Chen, S., Dickman, M. B. (2004): Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2617-2623.

Chu, W., Chepetan, A., Zhou, D., Shoghi, K. I., Xu, J., Dugan, L. L., Mach, R. H. (2014): Development of a PET Radiotracer for Noninvasive Imaging of the Reactive Oxygen Species, Superoxide, *in vivo*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12, 4421-4431.

Cobbett, C., Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 159-182.

Collard, J. M., Matagne, R. F. (1990): Isolation and Genetic Analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* Strains Resistant to Cadmium. *Applied and Environmental Microbiology, 56,* 2051-2055.

D'Autre´aux, B., Toledano, M. B. (2007): ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specifity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 8, 813-824.

Dat, J., Vandenbeele, S., Varnova, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2000): Dual action of active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, 779-795.

DeLong, J. M., Prange, R. K., Hodges, D. M., Forney, C. F., Bishop, M. C., Quilliam, M. (2002): Using a modified ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) assay for detection of lipid hydroperoxides in plant tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 248-254.

Den, R. M., Han, M., Niyogi, K. K (2001): Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends in Plant science*, 6, 364-371.

Dikalov, S., Griendling, K. K., Harrison, D. G. (2007): Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension, 49,* 717-727.

Dutta Gupta, S. (2010): Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Science Publishers, CRC Press, New York, pp. 384.

Dunahay, T.G. (1993): Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers, *Biotechniques*, 15, 452-460.

Duxbury, T. (1985): Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. *Advances in Microbial Ecology*, 8, 185-235.

Finkel, T., Holbrook, N. J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.

Flora, S. J. S, Mittal, M., Mehta, A. (2008): Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 128, 501-523.

Folch, J., Lees, M., Stanley, H. S. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Foyer, C. H., Harbinson, J. (1994): Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-42.

Friis, N., Myers-Keith, P. (1986): Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 21-28.

Gaur, J. P., Rai, L. C. (1994): Introduction. In: Rai, L.C., Gaur, J.P., Soeder, C.J., Eds. Algae and Water Pollution. E. Schweitzerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Germany, pp. 1-29.

Gaur, J. P., Rai, L. C. (2001): Heavy metal tolerance in algae. Algal Adaptation to Environmental Stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms. Springer-Verlag, Berlin, pp. 363-388.

Gelvin, S. B. (2000): *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 51, 223-256.

Gibella, M., Crucqa, A-S., Tilquina, B., Stockerb, P., Lesgardsb, G., Rac, J. (2000): Electron spin resonance studies of some irradiated pharmaceuticals. *Radiation Physics and Chemistry*, 58, 69-76.

Gill, S. S, Tuteja, N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress olerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909–930.

Girotti, A. W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological system. *The Journal of Lipid research*, 39, 1529-1542.

Goodenough, U. W. (1978): Genetics. *Holt, Rinehart, and Winston*, New York.

Groot de, M. J. A., Bundock, P., Hooykas, P. J. J., Beijersbergen, A. G. M. (1998): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*,16, 839-842.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999): Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). Oxford: Oxford University Press.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007): Free radicals in biology and medicine (4th ed). Oxford: Oxford University Press.

Hamilton, C. M., Frary, A., Lewis, C., Tanksley, S. (1996): Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 9975–9979.

Hamilton, R. J., Hamilton S. (1992): Lipid Analysis: A practical Approach. Oxford University Press, New York, pp. 65-111.

Hammond-Kosack, K., Jones, J. D. G. (2000): 21-Responses to pathogens. In: Buchanan B., Gruissem, W., Jones R.: Biochemistry and molecular biology of plants. ASPP, Maryland, pp. 1102-1156.

Harris, E. H. (2001): *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of plant physiology and plant molecular biology*, 52, 363-406.

Harris, E. H. (2009): The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to *Chlamydomonas* and Its Laboratory Use. Volume I. Academic press, San Diego, pp. 480. ISBN: 978-0-12-370874-8.

Haugland, R. P. (2006): Assaying oxidative activity in live cells with leuco dyes. Improved version of H_2DCF DA. *In* Haugland, R. P. [Ed.] *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. Invitrogen, Eugene, Oregon, 754-756.

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Komashiro, T. (1994): Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T–DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.

Holková, M. (2009): Lipoxygenázy a ich význam v biochemických procesoch v rostlinných organizmoch. *Chemické Listy*, 103, 487-495.

Ikner, A., Shiozaki, K. (2005): Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutation Research*, 569, 13-27.

Imlay, J. A. (2003): Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*. 57, 395-418.

Imlay, J. A. (2008): Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 755-776.

Jaishankar, M., Mathew, B. B., Shah, M. S., Gowda, K. R. S. (2014): Biosorption of Few Heavy Metal Ions Using Agricultural Wastes. *Journal of Environment Pollution and Human Health*, 1, 1-6.

Jamers, A., Van der Ven, K., Moens, L., Robbens, J., Potters, G., Guisez, Y., Blust, R., De Coen, W. (2006): Effect of copper exposure on gene expression profiles in *Chlamydomonas reinhardtii* based on microarray analysis. *Aquatic Toxicology*, 80, 249–260.

Jamers., A., Lenjou, M., Deraedt, P., Van Bockstaele, D., Blust, R., De Coen, W. (2009): Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae)*. *European Journal Of Phycology*, 44, 541-550.

Jones, H. G., Jones, M. B. (1989): Introduction: some terminology and common mechanisms, in: H. G. Jones, T. J. Flowers, M. B. Jones (Eds.), Plants Under Stress, Cambridge university Press, Cambridge, pp. 1-10.

Kalina, T., Váňa, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. 1. vyd. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, Praha, pp. 606. ISBN: 80-246-1036-1.

Khan, M. H., Panda, S. K. (2008): Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 81-89.

Kindle, K. (1990): High–frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*, *PNAS–Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 1228-1232.

Kinoshita, T., Fukuzawa, H., Shimada, T., Saito, T., Matsuda, Y. (1992): Primary structure and expression of a gamete lytic enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*: similarity of functional domains to matrix metalloproteases. *PNAS– Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 4693-4697.

Křísa, B., Prášil, K. (1989): Sběr, preparace a konzervace rostlinného materiálu. SPN, Praha, pp. 229.

Kubo, T., Saito, T., Fukuzawa, H., Matsuda, Y. (2001): Two tandemly-located matrix metalloprotease genes with different expression patterns in the *Chlamydomonas* sexual cell cycle. *Current Genetics*, 40, 136-143.

Kumar, S. V., Misquitta, R. W., Reddy, V. S., Ran, B. J., Rajam, M. V. (2004): Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 166, 731-738.

Kumria, R., Waie, B., Rajam, M. V. (2001): Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite indica rice via *Agrobacterium*. *PCTOC-Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, 63-71.

Kusuzawa, S., Honda, T., Fukata, Y., Fukata, M., Kanatani, S., Tanaka, D. H., Nakajima, K. (2012): Leucine–rich glioma inactivated 1 (Lgi1), an epilepsy–related secreted protein, has a nuclear localization signal and localizes to both the cytoplasm and the nucleus of the caudal ganglionic eminence neurons. *European Journal of Neuroscience*, 36, 2284-2292.

Kvesitadze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., Ramsden, J. J. (2006): Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants. *Springer Verlag*, Berlin, pp. 103-133.

Lambert, M., Leven, B. A., Green, R. M. (2000): New methods of cleaning up heavy metal in soils and water. *Environmental science and technology briefs for citizens*, Manhattan, KS: Kansas State University.

Lavens, P., Sorgeloos, P. (1996): Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*, Rome, 295.

Le-Faucher, S., Behra, R., Sigg, L. (2005): Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus. Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1731-1737.

Leichert, L. I., Gehrke, F., Gudiseva, H. V., Blackwell, T., Ilbert, M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., Jakob, U. (2008): Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 8197-8202.

Lipová, N. (2016): Oxidativní poškození lipidů v lidských nádorových buňkách. Diplomová práce. Depon. In: Oddělení biofyziky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Palackého v Olomouci.

Loy, A., Lehner, K., Drake, H. L., Wagner, M. (2004): Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6998-7009.

Maccarrone, M., Melino, G., Finazzi-Agro`, A. (2001): Lipoxygenase and their involvement in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 8, 776-784.

Macfie, S. M., Tarmohamed, Y., Welbourn, P. M. (1994): Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth f the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology,* 27, 454-458.

Mahajan, S., Tuteja, N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139-158.

Marnett, L. J., (1999): Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424, 83-95.

McCord, J. M., Keele, B. B., Fridovich, I. (1971): An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68, 1024-1027.

Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz–Laylin, L. K., Maréchal–Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L. H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S. M., Grimwood, J., Schmutz, J., Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S., Grossman, A. R. (2007): The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, 318, 245-251.

Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Prado, F. M., Uemi, M., Correa, T. C., Toma, I. N., Bertolucci, A., Oliveira, M. C. B., Motta, F. D., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (2007): Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation: *IUBMB Life*, 59, 322-331.

Miyata, S., Komatsu, Y., Yoshimura, Y., Taya, C., Kitagawa, H. (2012): Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6–sulfation. *Nature Neuroscience*, 15, 414-422.

Mobin, M., Khan, N. A. (2007): Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 164, 601-610.

Møller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. (2007): Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459-481.

Morais, S., Costa, F. G., Pereira, M. L. (2012): Heavy metals and human health. *Environmental health – emerging issues and practice*, 227-246.

Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., Miyawaki, A. (2002): A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*, 20, 87-90.

Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M. (2010): Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8, 199-216.

Nathan, C., Ding, A. (2010): SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI), *Cell*, 140, 951.

Nathan, C., Cunningham-Bussel, A. (2013): Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology*, 13, 349-361.

Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., A-H-Mackerness, S., Buchanan-Wollaston, V. (2003): Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 54, 2285-2292.

Nies, D. H. (1999): Microbial heavy metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 730-750.

Nies, D. H. (2003): Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 313-339.

Nicholas, R. A., Stenberg, S.P.K., and Kathryn, C. (2003): Lead nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. *Bioresource Technology*, 89, 41-48.

Niki, E. (2009): Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 47, 469-484.

Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M. (2005): Handbook on the Toxicology of Metals, 3rd edn. AP Oxford, New York, pp. 487-510.

Noriega, G. O., Balestrasse, K. B., Batlle, A., Tomaro, M. L. (2007): Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of δ-aminolevulinic acid. *Biometals*, 20, 841-851.

Okamura, H., Aoyama, I. (1994): Interactive toxic effect and distribution of heavy metals in phytoplankton. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9, 7-15.

Ospina-Alvarez, N., Peña-Salamanca, E. J., Benítez, R. (2006): The effect of salinity on the bioaccumulation capacity of lead on green algae *Rhizoclonium riparium* (Roth) Harvey *(Chlorophyceae, Cladophorales). Actualidades Biológicas*, 28, 17-25.

Overnell, J. (1975): The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater alga. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 5, 19-26.

Pastore, D., Lausa, M. N., Di Fonzo, N., Passarella, S. (2002): Reactive oxygen species inhibit the succinate oxidation-supported generation of membrane potential in wheat mitochondria. *FEBS Letters*, 516, 15-19.

Peña-Salamanca, E. J., Ospina-Alvarez, N., Benitez, R. (2004): Estudio de la contaminación por plomo, cobre y mercurio en la bahía de Buenaventura (Pacífico Colombiano) para la identificación de algas bénticas como organismos indicadores. Pub. CYTED, 10, 167-176.

Peña-Salamanca, E. J., Palacios, M. L., Ospina-Álvarez, N. (2005): Algas como indicadores de contaminacion. Universidad del. Valle, Cali, 75-146.

Peña-Salamanca, E. J., Rengifo-Gallego, A. L., Benitez-Campo, N. (2011): Detoxification Mechanisms of Heavy Metals by Algal-Bacteria Consortia. *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*, 441-453.

Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J., Cañizares-Villanueva, R. O. (2006): Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64, 1-10.

Pfannschmidt, T. (2003): Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science*, 8, 33-41.

Pinto, E., Sigaud-kutner, T., Leitao, M. A., Okamoto, O. K., Morse, D., Colepicolo, P. (2003): Heavy metal-induces oxidative stress in algae. *Journal od Phycology*, 39, 1008-1018.

Porta, H., Rocha-Sosa, M. (2002): Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130, 15-21.

Porter, N. A., Caldwell, S. E., Mills, K. E. (1995): Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30, 277-290.

Prasad, A., Ferretti, U., Sedlářová, M., Pospíšil, P. (2016): Singlet oxygen production in *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress. *Scientific Reports*, 6.

Prime, T. A., Forkink, M., Logan, A., Finichiu, P. G., McLachlan, J., Li Pun, P. B., Koopman, W. J. H., Larsen, L., Latter, M. J., Smith, R. A. J., Murphy, M. P. (2012): A ratiometric fluorescent probe for assessing mitochondrial phospholipid peroxidation within living cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 53, 544-553.

Rauser, W. E. (1990): Phytochelatins. *Annual Review of Biochemistry*, 59, 61-86.

Razinger, J., Dermastia, M., Koce, J. D., Zrimec, A. (2008): Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 153, 687-694.

Robert Li, Y. R. (2012): Free Radical Biomedicine: Principles, Clinical Correlations, and Methodologies. Virginia Tech Corporate Research Centre, Blacksburg, USA, pp. 326. ISBN: 978-1-60805-530-2

Robinson, N. J. (1989): Metal-binding polypeptides in plants. In: Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects (ed Shaw, A.J.). CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 195-214.

Robinson, N. J. (1989): Algal metallothioneins: secondary metabolites and proteins. *Journal of Applied Phycology*, 1, 5-18.

Rochaix, J. D. (1995): *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic green yeast. *Annual Review of Genetics*, 29, 209-230.

Samek, D. 2013. Vliv způsobu kultivace a dezintegrace řasové biomasy na obsah a výtěžnost nutričních faktorů. MS, Disertační práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín.

Schiewer. S., Wong, M. H. (2000): Ionic strength effects in biosoportion of metals by marine algae. *Reviews for "Chemosphere*, 41, 271-282.

Schmitt, D., Muller, A., Csogor, Z., Frimmel, F. H., Posten, C. (2001): The absorption kinecs of metal ions onto different microalgae and siliceous earth. *Water Research*, 35, 779-785.

Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., Usuda, H. (1998): High–efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*, 148, 1821-1828.

Shin, S. E., Lim, J. M., Koh, H. G., Kim, E. K., Kang, N. K., Jeon, S., & Kim, J. (2016). CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific reports*, 6.

Singh, S., Khan, N. A., Nazar, R., Anjum, N. A. (2008): Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress. *American Journal of Plant Physiology*, 3, 25-32.

Soldo, D., Hari, R., Sigg, L., Behra, R. (2005): Tolerance of *Oocystis nephrocytioides* to copper: intracellular distribution and extracellular complexation of copper. *Aquatic Toxicology*, 71, 307-317.

Stadtman, E. R. (2006): Protein oxidation and aging. *Free Radical Research,* 40, 1250-1258.

Stauber, J. L., Florence, T. M. (1987): Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology*, 94, 511-519.

Surowitz, G., Titus, J. A., Pfister, M. (1984): Effects of cadmium accumulation on growth and respiration of a cadmium-sensitive strain of *Bacillus subtilis* and selected cadmium-resistant mutant. *Archives of Microbiology,* 140, 107-112.

Szivák, I., Behra, R., Sigg, L. (2009): Metal-induces reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae)*. *Journal of Phycology*, 45, 427-435.

Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van-Moppes, D., Shlomo Grossman, S., Arad, S. (2005): Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga Porphyridium *sp. Journal of Applied Phycology,* 17, 215-222.

Toumi, A., Nejmeddine, A., Hamouri, B. (2000): Heavy metal removal in waste stabilization ponds and high rate ponds. *Water Science & Technology*, 42, 17-21.

Trevors, J. T., Stratton, G. W., Gadd, G. M. (1986): Cadmium transport, resistence, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 32, 447-464.

Umezawa, N., Tanaka, K., Urano. Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., Nagano, T. (1999): Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen. *Angewandte Chemie International Edition* , 38, 2899-2901.

Varnova, E., Inze, D., Breusegem, F. V. (2002): Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1227-1236.

Vieira, R., Volesky, B. (2000): Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiology,* 3, 17-24.

Wang, S. B., Chen, F., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2004): Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta,* 220, 17-29.

Wang, C. Q., Song, H. (2009): Calcium protects *Trifolium repens* L. seedlings against cadmium stress. *Plant Cell Reports*, 28, 1341-1349.

Wardman, P. (2007): Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology & Medicine,* 43, 995-1022.

Wertz, J. E., Bolton, J. R. (1972): Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications. McGraw-Hill, New York, pp. 496. ISBN 07-069454-0.

Willey, J., Sherwood, L., Woolverton, C. (2008): Prescott´s principles of microbiology, McGraw-Hill, New York, 2008. ISBN-13: 978-0077213411, ISBN-10: 0077213416.

Winterbourn, C. C. (2008): Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4, 278-286.

Whitton, B.A. (1984): Algae as monitors of heavy metals in freshwaters, In: Algae as Ecological Indicators (ed. Elliot, S. L.). Academic Press, New York, pp. 257-280.

Xie, K., Yang, Y. (2013): RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Molecular Plant*, 6, 1975-1983.

Yamano, T., Iguchi, H., Fukuzawa, H. (2012): Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 6, 691-694.

Yamauchi, Y., Furutera, A., Seki, K., Toyoda, Y., Tanaka, K., Sugimoto, Y. (2008): Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 786-793.

Yin, H., Xu, L., Porter, N. A. (2011): Free Radical Lipi Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111, 5944-5972.

Internetové zdroje:

Awad, S., Chu, T-C. (2005): Effect of cadmium on the growth of Chlamydomonas. *Journal of young investigators: The undergraduate Research Journal* [online] [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: http://www.jyi.org/issue/effect-of-cadmium-on-the-growth-of-chlamydomonas/

Chlamydomonas Resource Center (2017) [online] [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: http://www.chlamycollection.org

Cronodon (2007) [online] [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: http://cronodon.com/sitebuilder/images/Chlamydomonas_detailed-574x411.jpg

Enzo Life Sciences Inc. (2017) [online] [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: http://www.enzolifesciences.com/ALX-430-098/empo/

Marker Gene Technologies, Inc. (2017) [online] [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: http://www.markergene.com/dihydroethidium.html

NCBI – National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA (2017) [online] [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?refseq:XP_001690405

Nepa Gene Co., Ltd. (2017) [online] [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: http://www.nepagene.jp/img/products/NEPA21_02.jpg

Thermo Fisher Scientific (2016) [online] [cit. 2017-04-09]. Dostupné z:
https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1168
https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S36002
https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C400

Sigma Aldrich Co. LLC (2017) [online] [cit. 2015-04-13]. Dostupné z:
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/115754?lang=en&region=CZ
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/215430?lang=en&region=CZ

9 PŘEHLED ZKRATEK

$^1O_2$	singletní kyslík
AS	acetosyringon
BBM	Bold Basal Medium
CAT	kataláza (catalase)
c-DCF	5-(a-6)-carboxy- 2',7'-dichlorofluorescein
c-H_2DCF DA	5-(a-6)-carboxy-2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetát
CAS9	protein asociovaný s CRISPR (CRISPR Associated Protein 9)
CRISPR	segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetic (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
Cys	cystein
DHE	dihydroethidium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC_{50}	koncentrace látky, která vyvolá odpověď u 50 % testovaných buněk (effective concentration inhibiting 50% of the cells)
EMPO	2-ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole-1-oxide
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
FDA	fluorescein diacetát dihydrorhodamin 123
FOX	Ferrous oxidation xylenol orange
DHR123	dihydrorhodamin 123
GFP	zelený fluorescenční protein
GR	glutathionreduktáza
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
GUS	β-glukuronidázu
H_2O	voda
H_2O_2	peroxid vodíku
$HO^{\cdot}$	hydroxylový radikál
$HO_2^{\cdot}$	hydroperoxylový radikál
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
HPT	hygromycinfosfotransferáza
HSF	heat-shock factor
LD_{50}	koncentrace látky, která usmrtí 50 % testovaných buněk (lethal dose)
$LOO^{\cdot}$	lipoperoxylový radikál
LOOH	lipidový hydroperoxid
LOX	lipoxygenáza

MDA	malondialdehyd
MT	metalothioneiny
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NHEJ	nehomologní spojení konců (Non-homologous end joining)
O_2	molekulární kyslík
$O_2^{\cdot -}$	superoxidový radikál
OD	optická denzita
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCS	fytochelatiny
POBN	α-(4-Pyridyl N-oxide)-N-tert-butylnitrone
POD	peroxidáza
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (PolyUnsaturated Fatty Acids)
$ROO^{\cdot}$	peroxylový radikál
ROS	reaktivní formy kyslíku
RUBISCO	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa
sg RNA	single guide RNA
SiC	karbid křemíku
sno RNA	malá jadérková ribonukleová kyselina
SOD	superoxiddismutáza
SOSG	Singlet Oxygen Sensor Green
SOSG-EP	endoperoxid SOSG
TAP	tris acetát fosfát (Tris Acetate Phosphate)
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina
TEMP	2,2,6,6-tetramethylpiperidine
TEMPO	(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl
Ti-plazmid	tumor-indukující plazmid
TMRM	tetramethylrhodamin methylester
WT	wild type
XO	xylenová oranž
YFP	žlutý fluorescenční protein (yellow fluorescent protein)

KOPIE

10 PŘÍLOHY

➢ *Chlamydomonas reinhardtii* strain CC-503 cw92 mt+

NCBI Reference Sequence: XM_001690353.1- Probable lipoxygenase, contains LH2 domain

>gi|159464350|ref|XM_001690353.1| *Chlamydomonas reinhardtii* strain CC-503

TTCTACATCTCGGAGGATCGGCTGTACTACACGGCCAATGAGAAGAACGCCACGCGCGTGCGCTACATCT
GCCTGGACCGCGTGCCGGTGCGCCCGTTGCCGCACAGCCGCACACCGCGGAAGGGCTTGGTCGGCACCGT
GCCCGACATCGGCATTGCGCTGGTTGACCCGCACAACATGAAGCAGAAGCCCGGCTTCCCCAGCCCCGCC
AAGTCGCCACGCGGGAACGCCACGCTGGGAAAGAGCAGCGTCATCGGCCTGGTGTCGGGCTCGCACACCT
ACTTCCTGGCGGCAGGCTCGCACGAGGAGGCCAAGATCTGGCTCAAGATGCTGCGCGAGACGTGGTACCA
CTGCTTCAAGCACACGCTGCGCGCGA**G**CAACGTGCGCGACAACCAGGGGCTCCACCTGGCCTCCAAGGTG
ATGGCGGAGAACATCACGCTGCGCGAGAGCGTGCGCGACCTCACCTCCAAGGCGCAGGGACTCGACAGCG
AGTACTGGAGGCAGTGGCTGGAGGAGAAGGCGCGCAACCGCTTCCTGGAGCAGCGCCACGCCGAGGCGGG
GATTTACGAGATCGAGGTCAAGACCGGCCGCATGAAGGGCGCCTCCTCGGACGCGCGTGTGTACGTGGAG
CTGTACAGCGCGCACGAGGAGGACGTGTCTACCGGCGAGCTGCGGCTGCTGGACAAGGACGTGCTGACCA
AGCCCTTTGGCCGCGACGCCCTGGACCTATTTATCATCCCCTGCAAGAACGTGGGCATGCCCAACCACAT
CAAGGTGTGGCACGACAACACCGGCAAGCGGCCGGACTGGTTCCTGGAGTGGATCCGCATCCGCAAGAAG
GGCGCCATCAACTGGACCGTCTTCCCCTGCCAGCGCTGGTTCTCCACGCAGCTGGACGACTGCCGCATCA
GCCGCATCCTGTTCGCAGGCCACGCCACGCCCTACATCCAGTACAAGGTGACAACCTTGACCTCAGACAT
TCGTGGCGCGGGCACGGACGCCAACGTGCACTTCGTCATGCACGGCACGCTGGGTGACGGCACGCGGCAC
ATCCTGTCCAGCGGCCAGGACGACTTCGAGCGCGGCATGGTGAACGAGTTCCTCATTGAGGACGAGGAGC
TGGGCGACCTGCTGGAGGTGACGATCGGGCACGACAACACCGGCAACGGCCCCAGCTGGCACTTGGACCA
CCTCACAGTGACCAACCTCAAGACCGGCGCCATCTACCTGTTCCCCTGCCGCATGTGGTTCGACTCGCGC
ATCGGTGACGGCGCGCTGGAGCGTACATTGGAGGTTGGCGACTCGCTGCTCAAGATCACGCCCTACCATT
TCTACGTCACCACCTCAGAAATCCGCGGCGCGGGCACAGACGCCGACGTGTTCGTGGTGCTGCATGGCGA
GTTCGGAGACACGCCCTCCACCATCCTGCCGTCACAGCTGGAGCACTTTGAGCGCGGCCAGACCGACCAC
TTCAGGCTGGAACTGCCGCACGTGGGCAAGCTGCGCGCCATGACCATCGGCCACAACAACAAGGGCGAGG
GGCCGGACTGGCACCTGCTCATGGTGGAGGTGCGCGAGGAGCTGGACGGCACGGACGGCGAGCTGGGGCC
CATCACGCGCTTCGTGTGCAACAAGTGGATCGGGCTGGGCCACCCCGACCCCGACAGCGGCTCGGAGGAG
GGCGTGCTGCAGCGCACGCTCAAGCCCGGCGGCGAGGACCCCCGCCTGGAGATGACGGACTACCGGCTCG
AGTTCCACACCAGCTCCCTGCGCGGAGCCGGCACCGACGCCACCGTCAGCTTCAACATGACTGGCGAGCG
CGGCGAGAGCGGGCCGGTGCGTGTGGACGCGCCGCTGGAGGCTTTTGAACGCGGCTGCATCGACGCCTTC
ACCTTCCGGCTGCGGCGGCTGGGCAAGCTGCGGCGCATGCTGCTGTCGCACGACAACACCGGGAAGAACC
CTGCCTGGCACCTGCTCAAGGTGGTTGTCACCAGCACGCACCCCGAGGAGCCCGAGGTGACGACCTTCAT
CTGCAACCAGTGGCTCCAGGACCCTGACCGCGCCGTGCATCCGGTCGTGGAGCTGCTGCCGGGCGGCGAG
CTGCCCGTCACCTTGCACTACAAGGTGGAGGTGGTCACGTCAGACATCAAGGGCGCCGGCACCGAGTCCA
AGGTATTCCTGGAGCTGCGCGGCGTGGGCGGCAAACTGGGCCCCGTGCACCTGGACAACCCCAGCGCCTT
CGAGCGCGGCGCCGCCGACACCTTCATCCTGGACGGCCCGGACCTGGGCGAGCTGCTGGTGGCGGTGGTC
ACCTGCGACGGCAGCGGCATGCGGCCGCTGTGGCACCTGGACAGCATCACCGTGTGGCGTGACCCGTCCT
TCACAGACCCAGAGACGGGCGTGTACTTCCCGTGCAGACAGTGGTTTGACAAGGACGCGGGCTGGGTGAA
GGAGCTGCTGCCGAGCCGCCGGACGCTGGACGTGGTCAAGATCCCCTACACACTCAAGGTGTACACGGGC
GACCTGAAGAACGCGGGCACGGACGCCGGCATCCACATCAACCTCATCGGCGAGCGCGGCGAGACCGGCT
ACGTGCCGCTGCTGGCCAACTACGACACCTTTGAGCGCGGACAGGTGGACACGTTCGAGCTGCTGCTGCT

GGACGTAGGCCGCCCGCTGTTCCTGCTGGTGCGCAGCGACGGCCTCAGCCGAAAGCCCACCTGGTACATG
GACTTTGCGGAGCTCACCAATGCCATGATCCCGCCCACCTTCTTCGTGGCAGGCCTGTGGGTGGGCCCCG
AGACGGGCCTGGAGATCCGCATCCCCGCCAGCTACATGGACCCCCGTGTGGACCGGGCCGAGTACCTGGT
GCAGGTGTTCACCTCGGACGTCAAGAACGCGGGCACGGACGCCGGCATATGGATTGAGGTCATCGGCGAC
AAGCTCACTAGCGGGCGTCAGGCTCTGCTGGACAGCAGCAAGGACACGTTTGAGCGCGCGCAGGTGGACG
ACTTCAAGGTGCAGTGCCGCAACCTGGGGCCGCTCAAGGCGGTGCGCGTGTGGCACGACGGCAAGGGCAC
GCCGTGGCACCTGGACATGATCGTCATCACGCTGGCCACGGGCGAGAAGTACTACTTCCCCTACGCCAAC
TGGCTGGGCCAGGAGACGCCCACGGTGGAGATCCCCGCCTCGCTGCAGGACCCCACTGCCGACCGCCGCG
TCTACAAGGTGGTTGTGCGCACGTCGGATCTGCCTGGCGCCGGCACCGACGCCAACGTGTACCTGGAGAT
GCGCGGCACGCGAGCCAACCTGCCGCGCCACTTCCTGCGCAACAAGGCAGTCAACCTCTTTGAGCGGGGC
CAGGTGGACGAGTTTGAGATCAAGGCCCCCGACCTGGGTGCGCTGACGGAGATCACCATCGGCCACGACA
ACGCCGGCTACGGCCCCAACTGGCACCTGGAGCAGGTGGAGATCACAGACACCAAGATCAACCAGACGTG
GTACTTCGAGTGCAACAAGTGGTTCGACGCCAAGGAGGGCGACTGCAAGCTGGAGCGGGTGCTGTTCCCA
TCGCTGCAGAACCCGCGCAGCCAGCGCACACTGTACAAGGTGCGCGTCAAGACCAGCGACCGCTCCGGCG
CCGGCACCGACGCCAACGTGTACGTCGACATCCGCGGCGACTCTGCCAGCACGGGCAAGACGTTCCTCAA
GAACCGCAACCTCAACAATTTCGAGCGCGGCAACAGCGACGACTTTGAGATCACGTGCCGGCCGCTGGGG
CGGCTGACGGAGCTGCTGGTGGGGCACGACAACAGCGGCATGGGCGCGTCCTGGCACCTGGAGCACGTGG
AGGTGTACGACAGCACCACAGGCGTGACCTGGTACTTCGAGTGCAACGCCTGGCTGAGCGCCACGGAGGA
GGACTGCCGGCTGGAGCGGGTGCTGCCCGCCTCGCTGGACGACCCCGCAAAGAAGAAGACGCAGTACAAG
GTGGTTGTGGTCACCAGCGACAAGATGGGCGCGGGCACGGACGCCAACGTGTTTATCGACATCTTCGGCA
TGGACGGCACGCACACCGGCCGCATGCTACTCAACAACAAAGGCAACGACTTTGAGCGCGGCCAGACAGA
CACGTACCAGATTGCTGGTCGCGACGTGGGGCCGATGAAGAAGATCCGCATCGGCCACGACAACAGCGGG
CTGGGCCCCGCATGGCACCTGAACCGTGTGGAGGTGACCAACCTCAAAACCGGCGAGCACCGCATCTTCC
CCGCAAACAAGTGGTTCTCCAAGACCGACGACGACTACCAGATCGAGCGCGACCTGTTCCCGGGCGACGC
GCCCGACCTCAACGTGGAGTACGAGGTGGTGGTCATCACCTCCAACATACCCGGGGCCGGCACGGACGCC
AACGTGTTCGTGCAGATGTTCGGCACCGAAGGCAAGTGGCGCCGCCCGTGCGAGGCGGGCCCGCTGCGGC
TGGACAACCCCAAGAACAACTTCGAGGCGGGCGACACGGACGTGTTCAACATCAAGGCGCCGGACGTGGG
CGACCTCAAGAAGCTGCGCCTCTACCACGACAACAAGGGCCTGGGCGCGGCCTGGCACTGCGAGATCGTC
ATCATCACCAACAAGGAGCGGCGGCGCACGTGGTACTTCTACTGCGGCCAGTGGCTGGACAAGCGCACGG
GCGTGGAGAAGATCCTGTTTGCCAGCGACACCGACCCGCGCGCCCACCTGGTCACCTACAGCGTCACGGT
GCACACCAGCGACATCAAGGGCGCGGGCACGGACGCCAACGTGTGCTTGGAGATGTTTGGCGCCAAGGGC
AGCAGCGGCGTGCGCGAGCTCACGGGCAAAGGCAACCTGTTTGAGCAGGGCAAGTCGGACAAGTTCATCT
TCAAGATGGCGGACCTGGGCGACCTGTCGGAGCTGGAGATCTGGCACGACGGCAAGGGCTTCGGCGCGGG
CTGGCACCTGGACTTTGTGGAGGTGCACAGCAGCGCCACCGGCAAGGTGTACTACTTCCCTTGCGGCCGC
TGGCTGGCGGAGGACGAGGACGACGGCGCTATCCGGCGGCGGCTGCAGGTTTCGCACAAGGACCCGCGCA
CCTTCAAGGCGCAGTACCGCGTCAGCGTCACCACCTCCGACATCCGCGGCGCCGGCACGGACGCCAACGT
GTTCATCCAGCTGTACGGCGACGCGGGCGAGACGGCGCGCATTAAGCTGGACAACCCCGGGAAGAACGAC
TTCGAGCGTGGCTGCACGGACGTGTTCCTGTTTGAGGACCGCAACGTGGGCGGCATCAAGAAGATCCGCA
TCGGGCACGACGGCGCGGGGCTGGGCTCGGGCTGGCACCTGCAGCGGGTGGTTGTGGAGAACCTCACCAC
CGGGCAGGTGGTGGTGTTCGACGTCAACAGGTGGTTCGACAAGGGCGAGGACGACGGCGCGATCGAGCGC
GAGCTGTTCCCCACCTCGGGCGGCGGCGACGGCTCCAGCACCAACTGGCGCCTGGTGGTGGTCACAGCCA
ACGTCAGCGGCGCCGGCACGGACGCTGACGTGTACGTGCAGCTCAACGGCGACAAGGCCAGCTTCGGGCC
CTACACGCTGCCGGCGTCCAAGGAGGCCTTTGAGACCGGCTCCACGGACACCTTCAGCCTCACCACACCC
GAGCTGGGCCGCATCCAGACGCTCACCATCGGGCACAACAACAAGGGCTTTGGGGCGGCCTGGTGCTTGT

CGCGTGTGGAGCTGGAGAACATGAACACGGGCGAGCGCTACCTGTGGAACTTCGACAACGCCTGGCTGGA
CACGGAGCACGGCACCAGCCGCACCATGGCGCCCACCACCTACATGCAGGGCTCTGGCGGCAAGGACATG
ATGCCTGCCGCGGGCGAGGGCCGCGCCAACTACCGCATGGAGCTGGCCACGGGGCTGGGGCCGGACGGCG
CCATGGTGGACGGACAGGTCATGGTCAACATCATCGGAGTCAACGCCGAGACGGGCCGTCAGCTGCTGGA
GAACCCGGTGCAGGGCTTCCAGCCGGGGCGTGTGGAGGAGTTTGGTCTGGCGGACCTGGCCGAGGTGGGC
GGCATGACGCAGCTGGAGCTGGTGCACGCAGGCAGCGCGCCCTGGGCGGTGCGCTTCGTCAAGGTGCACA
ACGAGACCAGCGGCGAGAAGGCCGTGTTCGTGCCAGAGGGTCCGCTGCTGCCGGGCATGCCGCTGCTGCT
GTCGCTGTGGATCGCCTCGCCCTGCGACTACCGCGTGGAGGTGCAGACCGGCGACACCTTTGGCGCCGGC
ACCAACGCCAAGATCATGATCAACGTGTTCGGCGAGCTGGGGTCCACGGGCCGCGTGCAGCTGACCTACG
ACAGCAGCGCGGCGGAGGGCAAGCGCGGCGGCATCTGTGGTGACGTGTGCGCCACGCAGCCGTTCAAGCG
CAACCAGCTGGATGTGTTCATGCTGGGGGGTCTGCAAGACACGGGCGACATTAAGCAGATCGAGATCGGG
CACGACGACGCGGGCGCGGGGTCAGCCTGGTTCCTGTCCTGGGTGCGTGTGACCAACCTGACCACGGGTG
CGTCCGCCTACTTCCTGTCGGACTCATGGCTGGCCAAGAACAAGGGAGACGGATTCACCAAGCGCCTGCT
CACAGCCATGACGTCCACGGGGCCGCAGATGGCCAACACGGGCATGCTGGCGGACGGCACTGCCACCGCG
CACGTCAGCGTGTCGCCGCGCGACCCGCGCGACACCGCCTTCGCCTCCTCCGCGCTGGCCCGCAAGCTGG
CGGGCGGCGTGGGCGCGCCCGGCTACCGAGTGACGCTGCACACCAGCAACGTGTGCATGGCGGGCACCGG
CGCGGGCGTGTTCTTCGAGCTCATTGGCGAGTACGGCTCGTCAGACGCGACACGGCGACCAGGCATTGAT
GCATGCATGGACTGTTG

➢ BBM (Bold Basal medium)

1.	$NaNO_3$	2,5 g / 1000 ml
2.	$CaCl_2 . 2H_2O$	2,5 g / 1000 ml
3.	$MgSO_4 . 7H_2O$	7,5 g / 1000 ml
4.	K_2HPO_4	7,5 g / 1000 ml
5.	KH_2PO_4	17,5 g / 1000 ml
6.	NaCl	2,5 g / 1000 ml
7.	Roztok EDTA	100 ml
	EDTA	5 g
	KOH	3,1 g
8.	Kyselý roztok železa	100 ml
	$FeSO_4 . 7H_2O$	0,498 g
	H_2SO_4 (96%)	0,1 [ml]
9.	H_3BO_3	1,142 g / 100 ml
10.	Roztok stopových prvků	1000 ml
	$ZnSO_4 . 7H_2O$	8,82 g
	$MnCl_2 . 4H_2O$	1,44 g
	MoO_3	0,71 g
	$CuSO_4 . 5H_2O$	1,57 g
	$Co(NO_3)_2 . 6H_2O$	0,49 g

Na přípravu 1 l BBM média použít vždy 10 ml z roztoků 1-6 a 1 ml z roztoků 7-10 a doplnit destilovanou vodou na 1000 ml a autoklávovat 1 h při 121 °C (Bischoff *et* Bold, 1963; Bold, 1949).

KOPIE

➢ TAP médium (modifikované Durnford Lab)

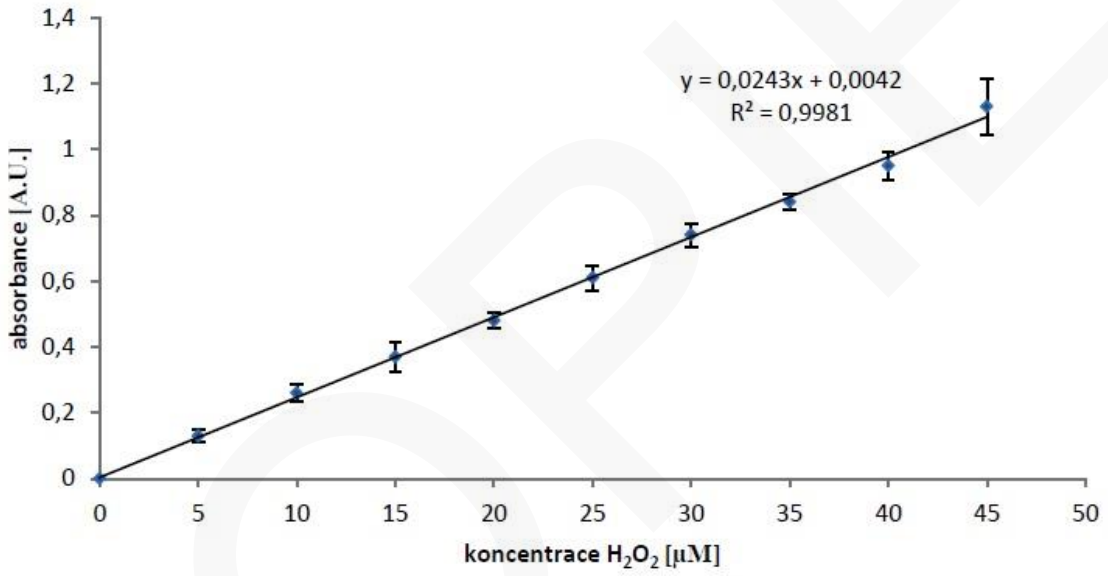
- 2X Filner´s Beijernicks Solution
    - zásobní roztok (500 ml)
        - 8g NH_4Cl, 1 g $CaCl_2 . 2H_2O$, 2g $MgSO_4 . 7H_2O$
- 1 ml 1M Potassium phosphate
    - zásobní roztok (50 ml; pH 7,2)
        - 20 ml 1M KH_2PO_4 (1M 6,3 g/50 ml)
        - 30 ml 1M K_2HPO_4 (1M 8,7 g/50 ml)
- 5 ml Trace mineral solution
    - zásobní roztok (500 ml)
        - 5 g Na_2EDTA rozpustit ve 400 ml destilované H_2O při teple
            - neutralizace na pH 6,5 (5M NaOH)
        - 0,5 g $FeSO_4 . 7H_2O$
        - 2.2 g $ZnSO_4 . 7H_2O$
        - 1.14 g H_3BO_3
        - 0,51 g $MnCl_2 . 4H_2O$
        - 0,016 g $CuSO_4 . 5H_2O$
        - 0,073 g $Na2MoO_4 . 2H_2O$
        - 0,016 g $CoCl_2 . 6H_2O$
- 2,42 g TRIS BASE
- 1 ml ledové kyseliny octové

Doplnit destilovanou vodou do 1 000 ml a upravit pH na 7,2 pomocí 35% HCl a autoklávovat 1 h při 121 °C

KOPIE

➢ Kalibrační křivka peroxidu vodíku

Kalibrační křivka pro H_2O_2 byla získána na základě zjištěných absorbancí v závislosti na koncentraci H_2O_2. Pro zpracování kalibrační křivky byla vybrána koncentrační řada H_2O_2: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 a 45 µM a u jednotlivých koncentrací byla měřena absorbance pomocí FOX testu, která byla následně přepočtena na koncentrace peroxidu vodíku (Obr. 54) V referenčním vzorku byla proměřena voda se specifickými reagenty pro FOX assay. Získaná regresivní rovnice přímky následně sloužila k přepočtu absorbancí studovaných vzorků na koncentrace vzniklých hydroperoxidů.



Obr. 54: Kalibrační křivka pro H_2O_2 získaná z průměru ze tří měření s příslušnými směrodatnými odchylkami (Lipová, 2016).