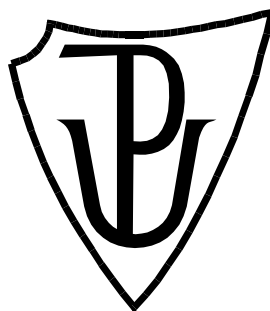


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Vliv anestetik na fotomorfogenetické procesy v rostlině ječmene (*Hordeum vulgare*)

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Andrea Štědrá</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.</b>
Rok:	2020

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

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu doc. Mgr. Andreji Pavlovičovi, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky a cenné rady při zpracování této práce. Dále bych chtěla touto cestou poděkovat panu prof. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph.D. za odbornou pomoc při praktické části práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Andrea Štědrá
Název práce	Vliv anestetik na fotomorfogenetické procesy v rostlině ječmene ( <i>Hordeum vulgare</i> )
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biofyziky
Vedoucí práce	doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

### Abstrakt

Bakalářská práce se zaměřuje na problematiku anestezie rostlin. V této práci bylo použito anestetikum diethylether a byl zkoumán jeho vliv na fotomorfogenetické procesy a především na formování fotosyntetického aparátu v průběhu deetiolizace u modelové rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*). Stále není zcela objasněn mechanismus působení anestetik, ačkoliv existuje řada teorií mechanismu jejich působení, mezi něž se řadí lipidová a proteinová teorie. Anestetika ovšem nepůsobí pouze na organismy živočichů, ale také na rostliny, u nichž vyvolávají účinky podobné těm, které lze pozorovat u živočichů. V rámci experimentální části této práce byl studován vliv diethyletheru na koncentraci chlorofylu a protochlorofylidu, pozornost byla zaměřena také na to, jakým způsobem diethylether ovlivňuje důležité proteiny související s fotomorfogenezí, a dále byla studována aktivita fotosystému II metodou *in vivo* fluorescence chlorofylu.

Klíčová slova	Anestetika, biosyntéza chlorofylu, diethylether, fotomorfogeneze, <i>Hordeum vulgare</i> , <i>in vivo</i> fluorescence, pigmenty
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Andrea Štědrá
Title	Effect of anaesthetics on photomorphogenetic processes in barley plant ( <i>Hordeum vulgare</i> )
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biophysics
Supervisor	doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D
The year of presentation	2020

### Abstract

This bachelor thesis focuses on the issue of plant anaesthesia. In this work, the anaesthetic diethyl ether was applied and its effect on photomorphogenetic processes and especially on the formation of the photosynthetic apparatus during deethiolization in a model plant of barley (*Hordeum vulgare*) was investigated. The mechanism of action of anaesthetics is still not fully elucidated, although there are number of theories on the mechanism of their action, including lipid and protein theory. However, anaesthetics act not only on animal organisms, but also on plants, in which they induce effects similar to those observed in animals. In the experimental part of this work, the effect of diethyl ether on the concentration of chlorophyll and protochlorophyllide was studied, attention was also focused on how diethyl ether affects important proteins related to photomorphogenesis, and the activity of photosystem II was studied by *in vivo* chlorophyll fluorescence.

Keywords	Anaesthetics, diethyl ether, chlorophyll biosynthesis, <i>Hordeum vulgare</i> , <i>in vivo</i> fluorescence, pigments, photomorphogenesis
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

1	Úvod	1
2	<b>Současný stav řešené problematiky</b>	2
2.1	Anestetika	2
2.1.1	Historie anestezie a teorie mechanismu účinku anestetik	2
2.1.2	Účinky anestetik	3
2.1.3	Akční potenciály u živočichů	4
2.1.4	Akční potenciály u rostlin	6
2.1.4.1	GABA <sub>A</sub> receptory	8
2.1.4.2	Draslíkový kanál se dvěma póry	10
2.1.4.3	NMDA receptory	12
2.2	Anestetika a jejich působení na rostliny	14
2.3	Fotomorfogeneze rostlin	16
2.3.1	Biosyntéza chlorofylu	18
2.3.2	Biosyntéza karotenoidů	20
2.4	Ječmen setý ( <i>Hordeum vulgare</i> )	22
3	<b>Experimentální část</b>	23
3.1	Materiál	23
3.1.1	Komerčně dostupné chemikálie a roztoky	23
3.1.2	Komerční soupravy	24
3.1.3	Roztoky pro izolaci proteinů, SDS-PAGE a Western blotting	24
3.1.4	Protilátky	24
3.1.5	Přístroje	25
3.1.6	Laboratorní materiál	26
3.1.7	Rostlinný materiál	26
3.1.8	Ostatní materiál	26
3.1.9	Software	26
3.2	Metody	27
3.2.1	Kultivace rostlinného materiálu	27
3.2.2	Analýza pigmentů	28
3.2.2.1	Stanovení koncentrace chlorofylu <i>a</i> a <i>b</i> a karotenoidů	28
3.2.2.2	Stanovení koncentrace protochlorofylidu a jeho detekce	28
3.2.3	Analýza proteinů metodou Western blotting	29
3.2.3.1	Izolace a stanovení koncentrace proteinů	29

3.2.3.2	Elektroforéza v denaturujících podmínkách	30
3.2.3.3	Western blotting	31
3.2.4	Nízkoteplotní fluorescence (77 K)	32
3.2.5	Stanovení aktivity PSII metodou <i>in vivo</i> fluorescence chlorofylu	33
4	<b>Výsledky a diskuze</b>	34
4.1.1	Kultivace rostlin	34
4.1.2	Stanovení koncentrace chlorofylu <i>a</i> a <i>b</i> a karotenoidů	34
4.1.3	Stanovení koncentrace protochlorofylidu a jeho detekce	37
4.1.4	Analýza proteinů metodou Western blotting	38
4.1.5	Nízkoteplotní fluorescence (77 K)	43
4.1.6	Stanovení aktivity PSII metodou <i>in vivo</i> fluorescence chlorofylu	46
5	<b>Závěr</b>	51
6	<b>Seznam použité literatury</b>	52
7	<b>Seznam zkratk</b>	58

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

Vypracovat literární rešerši na téma fotomorfogeneze rostlin.

### **Experimentální část**

Napěstovat pokusné rostliny a spektrofotometricky stanovit koncentraci chlorofylu a protochlorofylidu. Pomocí SDS-PAGE a Western blottingu imunodetekovat důležité proteiny související s fotomorfogenezí a stanovit aktivitu fotosystému II metodou *in vivo* fluorescence chlorofylu. Pomocí uvedených metod zjistit, zda diethylether inhibuje fotomorfogenetické procesy, především formování fotosyntetického aparátu v průběhu deetiolizace.

Zpracovat výsledky a sepsat experimentální část bakalářské práce.



# 1 ÚVOD

Termín anestezie je odvozen z řeckého slova „necitlivost“ a představuje stav, kdy je organismus necitlivý na podněty přicházející z vnějšího okolí. Nyní je anestezie spojována zejména s medicínským kontextem, kdy jsou využívány terapeutické cíle zahrnující analgezii, imobilitu a stav bezvědomí. Anestezie zaujímá v klinické péči velmi důležitou úlohu, ovšem anestetika působí na širší okruh organismů, než by se na první pohled mohlo zdát. Jedná se o organismy od paramecií až po živočichy a rostliny. Celková anestezie se tedy nevymezuje pouze na oblast moderní medicíny, ale má široký biologický význam.

Všechny živé organismy mohou být znecitlivěny volatilními anestetiky. Anestezii rostlin se věnoval také Charles Darwin a Claude Bernard. Experimenty Clauda Bernarda na rostlinách v 18. století jej dovedly k definování života tak, že veškeré živé organismy mohou být anestetizovány. Rostliny jsou navíc schopné vylučovat vlastní anestetické plyny, zejména během stresu.

Po většinu 20. století byly lipidy považovány za nescifický molekulární cíl volatilních anestetik. Jedná se o teorii Meyera a Overtona, která poukazuje na korelaci mezi účinností anestetik a jejich rozpustností a schopností se akumulovat v lipidových membránách. Následně došlo k objevu, že anestetika mohou podobně inhibovat i protein luciferasu, což byl první krok k definování další, tzv. proteinové teorie. Další teorií mechanismu účinku anestetik je kombinace lipidové a proteinové teorie.

Pozornost v této práci byla věnována nejdříve teoretické části pojednávající o anestezii a molekulárních cílech anestetik nacházejících se u živočichů a u rostlin. V druhém úseku teoretické části se práce zabývá fotomorfogenezí rostlin, biosyntézou pigmentů chlorofylů a karotenoidů, které patří mezi jevy, jež jsou u rostlin ovlivněny aplikací anestetik.

V experimentální části se práce zabývá otázkou, zda vybrané anestetikum diethylether inhibuje fotomorfogenetické procesy u modelové rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*) za pomoci spektrofotometrických metod, SDS-PAGE, Western blottingu a *in vivo* fluorescence chlorofylu.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Anestetika

#### 2.1.1 Historie anestezie a teorie mechanismu účinku anestetik

Pojem „anestezie“ byl poprvé použit už ve starověku řeckým chirurgem Dioscoridem. Poté jej v roce 1846 převzal Dr. Oliver Wendell Holmes k popisu necitlivého stavu, který se projevil u pacienta po inhalaci diethyletheru (Kissin, 1997).

Významným lékařem, zabývajícím se anestetikou a jejich působením, byl Claude Bernard. Už před více než 100 lety popsal u zvířat tři stádia anestezie, která závisí na dávce volatilních anestetik. V prvním stádiu je ovlivněn centrální nervový systém a zvíře není schopno vnímat chlad ani bolest, upadá do stavu bezvědomí, ovšem životní funkce zůstávají nepoškozené. V druhém stádiu je zasažen somato-senzorický systém, dochází k blokaci nervového systému a také k zástavě dýchání. V posledním stádiu buňky úplně ztrácí schopnost reagovat na podnět a může dojít k zástavě srdce (Grémiaux *et al.*, 2014). Formuloval také teorii koloidní koagulace protoplazmy, kdy protoplasmu považoval za „látku nesoucí život“ u všech organismů. Bernard se však nezabýval pouze studiem zvířat, anestezii aplikoval také na rostliny.

Na přelomu 20. století nezávisle na sobě Meyer a Overton formulovali lipidovou teorii. Tato teorie spočívá v korelaci mezi účinností anestetik a jejich rozpustností a schopností se akumulovat v olivovém oleji, který v tomto experimentu napodoboval lipidovou dvojvrstvu membrán (Meyer, 1899; Overton, 1901; Cantor, 2001). Anestetika podle této teorie modifikují vlastnosti membrán tím, že se v nich rozpouští. Aby se projevil anestetický účinek, musí koncentrace anestetika v membráně dosáhnout určité kritické koncentrace (Yoakawa *et al.*, 2019). Tato myšlenka však byla opuštěna zejména díky práci poukazující na podobnou korelaci mezi účinností anestetik a schopností inhibovat funkci rozpustného proteinu luciferasy. Jedná se o teorii protein-receptor, která předpokládá proteiny jako specifické receptory pro anestetika (Franks a Lieb, 1984; Saraiva, 1994). Anestetika se přednostně váží do vytvořených „dutin“ v proteinech, což způsobuje malou lokální strukturní změnu proteinu. Pro svoji správnou funkci anestetikum musí projít hematoencefalickou bariérou, což předpokládá, že musí být poměrně nepolární (Franks, 2008). Přestože má vazba anestetika na protein převážně nepolární povahu, zahrnuje také polární interakce, které pomáhají stabilizovat

a orientovat anestetikum v místě vazby (Bertaccini, 2007). Další teorií mechanismu účinku je kombinace lipidové a proteinové teorie. Anestetika podle této teorie mění vlastnosti lipidické membrány a zároveň blokují funkci proteinového kanálu (Lerner *et al.*, 1997; Andersen a Koeppe, 2007).

### 2.1.2 Účinky anestetik

Celková anestetika představují v medicíně jedinečnou skupinu léčiv, jako jediné jsou používány k cílenému vyvolání stavu bezvědomí (Forman a Chin, 2008).

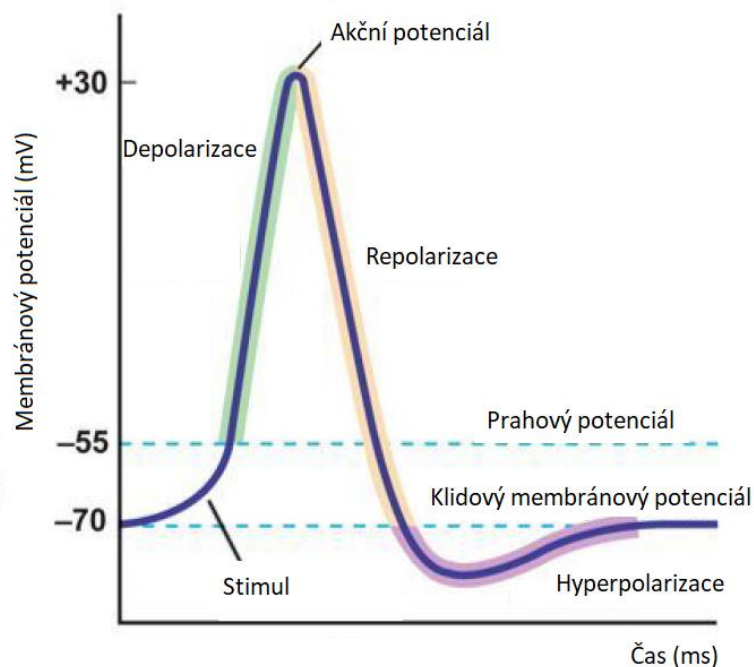
Obecná anestetika je možné rozdělit do čtyř skupin: volatilní anestetika, anestetické plyny, alkoholy a intravenózní anestetika (Harrison a Flood, 1998). Volatilní anestetika představují rozmanitou skupinu sloučenin (Seeman, 1972), do níž patří alkany, cykloalkany, diethylethery, cyklické ethery, alkeny, alkyny, alkoholy, ketony, aromatické sloučeniny a mnoho z jejich halogenovaných derivátů. Tyto sloučeniny se liší v mnoha vlastnostech, jako je velikost, tvar, konformační flexibilita, a rozložení náboje (Sonner a Cantor, 2013).

Fyziologický stav vyvolaný působením anestetik zahrnuje především bezvědomí, amnézii, analgezií, ztrátu schopnosti zpracování smyslového vjemu a depresi míšních motorických reflexů. Anestetika tlumí činnost nervového systému působením na iontové kanály. Inhibují většinu excitačních iontových kanálů, které jsou citlivé na anestetika, což jsou například nikotinové acetylcholinové receptory (nACh), *N*-methyl-*D*-aspartát receptory (NMDA) nebo napětově řízené sodné kanály. Zároveň ale zvyšují aktivitu inhibičních iontových kanálů, mezi něž patří například receptory kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné typu A (GABA<sub>A</sub>), glycinové receptory a draslíkové kanály se dvěma póry. Anestetika způsobují zvýšení toku iontů kanály inhibičních receptorů a snížení toku iontů kanály excitačních receptorů (Sonner a Cantor, 2013). Obecně lze říci, že všechna více polární anestetika působí na inhibiční receptory a na acetylcholinové receptory, zatímco méně polární anestetika působí na NMDA receptory (Miller, 2002). Ačkoli v průběhu let bylo zkoumáno velké množství různých iontových kanálů, receptorů, enzymů a dalších proteinů jako předpokládaných cílových molekul, na které anestetika působí, přesvědčivý důkaz o jejich přímém zapojení existuje pouze pro několik z nich (Franks, 2008).

### 2.1.3 Akční potenciály u živočichů

Neurony jsou specializované buňky pro komunikaci s dalšími neurony nebo jinými typy buněk. Typický neuron se skládá z těla obsahujícího jádro, dendritů, což jsou dlouhé filamenty vystupující z těla neuronu, a axonu, který může být několikanásobně větší než tělo neuronu (Sidiropoulou *et al.*, 2006).

GABA<sub>A</sub>, NMDA a další iontové kanály představují spolu s akčními potenciály významnou součást systému pro přenos informace mezi neurony. Akční potenciály mají odlišnou funkci v tělech neuronů, kde především kódují informace ve své frekvenci a vzorci, než v axonech, kde plní úlohu rychlého šíření signálů (Bean, 2007). Místo vzniku akčního potenciálu se nazývá *axon hillock*. Každý neuron udržuje na své membráně napěťový gradient, a to v důsledku metabolicky řízených rozdílů koncentrací sodných, draselných, chloridových a vápenatých iontů v buňce, z nichž každý má odlišný náboj (Borisyuk *et al.*, 2015). Při iniciaci a šíření akčního potenciálu hrají důležitou roli napěťově řízené sodné kanály, které se nachází na těle neuronu, dendritech a axonu. Tyto kanály mohou být aktivovány a deaktivovány během milisekund (Kress a Mennerick, 2009). Pokud se napětí na membráně dostatečně změní, vytváří se elektrochemický puls nazývaný akční potenciál. Tento puls putuje rychle podél axonu buňky a je přenášen



Obr. 1 Graf průběhu akčního potenciálu u živočišných neuronů.  
Upraveno dle: Zhang, 2019.

specializovaným spojením, které označujeme jako synapse, do sousedního neuronu, jenž jej přijímá pomocí dendritů (Borisjuk *et al.*, 2015).

Membránový klidový potenciál je rozdíl v elektrických potenciálech ve vnitřním a vnějším prostředí buňky, jeho hodnota je  $-70$  mV (Obr. 1). Intracelulární prostor je negativní vůči extracelulárnímu prostoru. Akční potenciály jsou vytvářeny speciálními typy napětově řízených iontových kanálů vyskytujících se v buněčné plazmatické membráně. Tyto kanály jsou uzavřeny, pokud je membránový potenciál blízko záporného klidového potenciálu buňky. Jestliže se membránový potenciál zvyšuje na přesně definované prahové napětí, jehož hodnota je obvykle  $-55$  mV (Obr. 1), dochází k rychlému otevření sodných kanálů a k depolarizaci transmembránového potenciálu (Barnett a Larkman, 2007; Zhang, 2019). Aktivace velkého množství sodných kanálů má za následek rychlý příliv sodných iontů do buňky a další depolarizaci membrány. Tento proces probíhá velmi rychle, dokud nejsou všechny dostupné sodné kanály otevřeny. Membránový potenciál velmi vzroste. Rychlý vtok sodných iontů do buňky způsobuje obrácení polaritu plazmatické membrány a následně dochází k rychlé inaktivaci sodných kanálů. Potom se aktivují draselné kanály a dochází k migraci draselných iontů ven z buňky a elektrochemický gradient se vrací do klidového stavu. Inaktivace sodných kanálů se spolu s otevíráním draslíkových kanálů podílí na repolarizaci akčního potenciálu (Zhang, 2019). Draslíkové kanály se aktivují mnohem pomaleji než sodné kanály (Barnett a Larkman, 2007).

Šíření akčního potenciálu bylo nejrozsáhleji studováno v periferním nervovém systému, jelikož tato vlákna jsou velká a myelinovaná a jsou snáze přístupná pro experimentální manipulace ve srovnání s nervovými vlákny centrálního nervového systému (Kress a Mennerick, 2009).

Interakce mezi neurony je elektrochemická. Každé zakončení axonu obsahuje molekuly neurotransmiteru, nejvíce zastoupenými neurotransmitery jsou glutamát a GABA, dále pak acetylcholin, dopamin, adrenalin, melatonin, histamin nebo serotonin (Valenzuela *et al.*, 2011). Po stimulaci elektrickým pulsem jsou neurotransmitery uvolněny z presynaptického neuronu do synaptické štěrbině (chemická synapse). Následně se váží na příslušné receptory na dendritech postsynaptického neuronu, což způsobí otevírání iontových kanálů a vstup vápenatých, sodných, draselných nebo chloridových iontů do buňky. To má vliv na potenciální náboj postsynaptického neuronu, který pak generuje nový elektrický signál. Elektrochemický signál uvolňovaný

konkrétním neurotransmiterem může podporovat postsynaptický neuron, aby obnovil, inhiboval nebo zabránil šíření akčního potenciálu. Existují neurotransmitery excitační (např. acetylcholin, glutamát, aspartát, noradrenalin, histamin) nebo inhibiční (např. GABA, glycin, serotonin), a některé mohou mít funkci obou (např. dopamin) (Zhang, 2019).

Elektrický přenos signálu mezi neurony je zprostředkován také pomocí mezerových spojů, jedná se o klastry mezibuněčných kanálů, jež přímo spojují vnitřní prostor sousedících buněk (elektrická synapse). Tento spoj zabezpečuje průchod elektrického proudu a také malých molekul oběma směry. Mezerové spoje jsou tvořeny dvěma hexamerními konexony, každý z nich pochází z jedné sousedící buňky. U bezobratlých a obratlovců jsou konexony tvořeny dvěma odlišnými multigenovými rodinami proteinů. Konkrétně to jsou konexiny, které jsou typické pro strunatce, druhá rodina zahrnuje innexiny a pannexiny, které se nachází jak u bezobratlých, tak i u strunatců (Pereda, 2014).

#### **2.1.4 Akční potenciály u rostlin**

Elektrické signály jsou schopny přenášet informace mnohem rychleji na velké vzdálenosti, než chemické signály jako jsou např. hormony. Tvorba a propagace akčních potenciálů je u rostlin spojována s primární odpovědí na působení různých faktorů z prostředí (Sukhov *et al.*, 2011) a není typická pouze pro sensitivní rostliny (např. *Mimosa*), ale také pro nesensitivní rostliny (např. *Vicia faba* L.) (Yan *et al.*, 2009). Akční potenciály vyvolávají změny ve fyziologických procesech rostlin, zahrnující fotosyntézu, respiraci, transport floémem a expresi genů (Grams *et al.*, 2009). Vodivé cévní svazky jsou místem tvorby akčních potenciálů v rostlinách. Tvorba akčního potenciálu je spojena s tokem  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{H}^+$  iontů (Król *et al.*, 2010; Sukhov *et al.*, 2011). Akční potenciály jsou výboj elektrické aktivity, který je závislý na depolarizačním proudu, kdy u rostlin je depolarizační fáze závislá na toku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do intracelulárního prostředí, zejména při počáteční fázi depolarizace, a toku  $\text{Cl}^-$  iontů do extracelulárního prostředí, což urychluje depolarizaci. Repolarizační fáze je naopak závislá na toku  $\text{K}^+$  a  $\text{H}^+$  iontů, díky nimž se membránový potenciál vrací zpět k negativním hodnotám (Felle a Zimmermann, 2007). Mechanismus akčního potenciálu je stejně jako u živočichů řízen elektrochemicky pomocí vlastností plasmatické membrány s iontově selektivními kanály. Jejich přítomnost byla předpokládána Hodgkinem a Huxleym a následně byla

i potvrzena Neherem a Sakmannem pomocí *patch clamp* metody (Król *et al.*, 2010). V roce 1984 byla objevena přítomnost iontových kanálů, které byly do té doby známy pouze u živočišných buněk, také u rostlin (Schroeder *et al.*, 1984). Bylo zjištěno, že u rostlin jsou exprimovány GABA receptory a receptory pro glutamát, které slouží pro signalizaci při kontrole růstu, vývoji a odpovědi na stres. Podobně jako u zvířat a lidí GABA snižuje a glutamát naopak zvyšuje excitabilitu membrán (Ramesh *et al.*, 2015; Žárský, 2015). Důležité je, že rostliny exprimují podobné napěťově a ligandem řízené kanály jako se vyskytují v neuronech zvířat a lidí (Yokawa *et al.*, 2019), ačkoliv se vyznačují nepřítomností nervového systému nebo jakékoli struktury umožňující elektrickou signalizaci podobnou neuronům (Lam *et al.*, 1998). Například rostliny *Arabidopsis* mutantní ve dvou glutamátových receptorech (*glr3.3a* a *glr3.6a*) nejsou schopné propagace elektrického signálu (Mousavi *et al.*, 2013), což dokazuje jejich zapojení v elektrické signalizaci.

U rostlin se kromě akčních potenciálů vyskytují také potenciály variační a systémové. Variační potenciály vznikají jako odpověď na faktory poškozující rostlinu (např. zahřívání, mechanické poškození) (Zimmermann *et al.*, 2009). Tyto potenciály jsou lokální elektrickou odezvou, která je vyvolána propagací hydraulické vlny nebo chemického činidla a jsou definovány jako přechodná depolarizace s nepravidelným tvarem. Pro vyvolání variačního potenciálu je nejčastěji využíváno popálení rostliny. Variační potenciál má nepravidelný tvar, který se skládá z depolarizace trvající až několik minut, ovšem může také zahrnovat rychlou impulsní depolarizaci, která je podobná jako u akčních potenciálů. Amplituda variačního potenciálu je úměrná intenzitě poškozujícího podnětu a spolu s rychlostí šíření klesá se vzdáleností od místa poškození (Vodeneev *et al.*, 2015). Nejdůležitější rolí variačních potenciálů v rostlinách je tedy aktivace obrany v pletivech nacházejících se ve větší vzdálenosti od místa poranění. Při poranění rostliny putuje signál do vzdálenějších listů, spustí se syntéza jasmonové kyseliny a jejich prekurzorů v xylém kontaktních buňkách, ty pak prekurzory jasmonové kyseliny a samotnou jasmonovou kyselinu transportují do okolních tkání. Variační potenciály se šíří cévními svazky floému a xylému (Nguyen *et al.*, 2018).

Systémové potenciály byly popsány relativně nedávno a byly prokázány jak u jednoděložných, tak dvouděložných rostlin. Mohou být vyvolány poraněním rostliny, patogeny nebo napadením herbivorem a šíří se jako hyperpolarizace membrány. Na rozdíl od akčních a variačních potenciálů dochází k pohybu iontů jako jsou  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$

až po začátku změny napětí. Amplituda systémového potenciálu je ovlivňována povahou i koncentrací dané látky, tudíž je úroveň informace přenášené systémovým potenciálem vyšší než informace, kterou přenáší jeden akční potenciál. Systémový potenciál je realizován pomocí aktivace  $H^+$  pumpy, u variačního potenciálu dochází naopak k inaktivaci této pumpy (Zimmermann *et al.*, 2009).

#### 2.1.4.1 GABA<sub>A</sub> receptory

Receptory kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné typu A (GABA<sub>A</sub>) zprostředkovávají většinu rychlé synaptické inhibice v mozku savců, přičemž řídí aktivitu jak na úrovni nervové sítě, tak na buněčné úrovni (Jacob *et al.*, 2009). GABA je hlavním neurotransmiterem v centrálním nervovém systému (Beverley *et al.*, 2002). U savců GABA působí proti excitačním neurotransmiterům v mozku prostřednictvím aktivace vodivosti chloridových iontů, které prochází GABA<sub>A</sub> receptory, což vede k hyperpolarizaci membrány a tudíž k zabránění vzniku akčního potenciálu (Ramesh *et al.*, 2017).

Receptory tohoto typu se vyskytují v celém centrálním nervovém systému a jsou členy superrodiny, která zahrnuje také receptory pro acetylcholin, glycin a serotonin, z nichž některé jsou také citlivé na anestetika (Franks, 1994). Jedná se o heteropentamerní proteiny obsahující chloridový kanál. Pro celou tuto superrodinu je typické, že receptory jsou sestaveny z řady homologních podjednotek, které sdílí společnou strukturu, jedná se o velkou N-koncovou extracelulární doménu a 4 transmembránové domény s velkou intracelulární doménou mezi doménami 3 a 4 (Obr. 2) (Jacob *et al.*, 2009). Neuronální GABA<sub>A</sub> receptory jsou složeny z podjednotek  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon_{1-3}$ ,  $\phi$  a  $\pi$ . Tyto podjednotky jsou v centrálním nervovém systému různě rozmístěny a udělují receptorům odlišné biofyzikální a farmakologické vlastnosti (Jenkins *et al.*, 2001). Každá podjednotka má velkou N-koncovou doménu, která zahrnuje doménu vázající ligand a motiv cys-loop. Cys-loop se skládá ze dvou cysteinů, mezi nimiž je disulfidová vazba. Cysteiny jsou odděleny 13 aminokyselinovými zbytky, z nichž několik je vysoce konzervovaných a tvoří tak signaturní sekvenci. Vazebné místo agonisty GABA je lokalizováno na rozhraní mezi podjednotkami  $\beta$  a  $\alpha$  a je tvořeno ze smyček, které se vyskytují v N-terminální oblasti podjednotky (Hanrahan, 2011). Nejvíce zastoupenou kombinací podjednotek je  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , dále pak  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$  a  $\alpha_3\beta_{1-3}\gamma_2$ . Strukturální diverzita těchto receptorů je navíc zvýšena pomocí alternativního sestřihu některých receptorových mRNA.



GABA<sub>A</sub> receptory jsou sestavovány z dílčích podjednotek v endoplazmatickém retikulu. Teoreticky je možné sestavit mnoho kombinací z podjednotek, ovšem pouze několik z těchto kombinací může opustit endoplazmatické retikulum a začlenit se do membrány neuronů. Exprese a sestavení těchto podjednotek je v endoplazmatickém retikulu regulováno pomocí mechanismů, kterých se účastní chaperony, jako je vazebný protein těžkého řetězce a kalnexin (Connolly *et al.*, 1996). Sekvence na N-konci GABA<sub>A</sub> receptoru podjednotek regulují oligomerizaci receptoru, čímž podporují sestavování konkrétních kombinací podjednotek (Kittler *et al.*, 2002).

Receptory GABA<sub>A</sub> se na povrchu neuronálních buněk vyskytují jako difúzní receptorové populace, synaptické nebo extrasynaptické klastry. Navázáním GABA na specifická místa se aktivuje otevření kanálu, což způsobuje membránovou hyperpolarizaci a snížení excitability neuronů. Volatilní i intravenózní anestetika zvyšují synaptickou inhibici prostřednictvím postsynaptické modulace GABA<sub>A</sub> receptorů (Herold a Hemmings, 2012).

Receptory GABA<sub>A</sub> jsou klinicky relevantní cíle pro antikonvulzivní, anxiolytická a sedativně-hypnotická léčiva (Jacob *et al.*, 2009). Téměř všechna obecná anestetika zvyšují tok chloridových iontů kanály GABA<sub>A</sub> receptorů a ve vyšších koncentracích mohou přímo aktivovat GABA<sub>A</sub> receptory i v případě nepřítomnosti GABA. Pouze malá nepolární anestetika jako je xenon a cyklopropan mají malý nebo žádný účinek na GABA<sub>A</sub> receptory (Franks, 2008). Existují dvě vazebná místa pro anestetika: vysoce afinitní místo, kde je účinek GABA zesílen nízkými mikromolárními koncentracemi anestetika, a místem s nízkou afinitou, kdy vysoké mikromolární koncentrace anestetik přímo aktivují receptor (Hanrahan *et al.*, 2011). Deficity ve funkční expresi GABA<sub>A</sub> receptorů jsou závažné zejména u epilepsie, úzkostných poruch, kognitivních deficitů, schizofrenie, deprese a zneužívání návykových látek. Z tohoto důvodu existuje značný zájem o pochopení buněčných mechanismů, které regulují akumulaci těchto receptorů na neuronální plazmatické membráně (Jacob *et al.*, 2009).

V případě rostlin dochází k rychlému zvýšení koncentrace GABA v reakci na extrémní teploty, dehydrataci, salinitu, mechanické poškození, acidózu, virovou infekci a obranu vůči herbivorům. U rostlin se nachází hliníkem aktivované malátové receptory (ALMT) (Ramesh *et al.*, 2015), které vykazují podobnost se živočišnými GABA<sub>A</sub> receptory. Mezi těmito dvěma typy receptorů existují společné znaky, jako jsou např. vazebná místa pro GABA, regulace aniontového toku pomocí GABA a léčiva, která modulují aktivitu

receptoru GABA. Mezi rozdílné znaky patří omezená homologie mezi kompletní aminokyselinovou sekvencí receptoru GABA<sub>A</sub>, kdy podobnost nalezneme pouze u 12 aminokyselinových úseků. Další rozdílnou vlastností je, že savčí receptor má čtyři transmembránové domény, kdežto rostlinný ALMT jich obsahuje šest nebo více (Ramesh *et al.*, 2017).

Aktivace ALMT vede k depolarizaci membrány, naopak GABA inhibice vede k hyperpolarizaci membránového potenciálu, což má za následek stav nízké excitability membrány. Výsledek je podobný účinku GABA na živočišné neurony (Žárský *et al.*, 2015).

#### **2.1.4.2 Draslíkový kanál se dvěma póry**

Draslíkové kanály se dvěma póry (K2P kanály) představují hlavní větev v nadrodině K<sup>+</sup> kanálů. Nadrodina K<sup>+</sup> kanálů má důležitou roli při kontrole excitability neuronů a uvolňování neurotransmiterů v centrálním nervovém systému stanovením membránového potenciálu neuronů (Li *et al.*, 2018). Další dvě rodiny představují napěťově řízené K<sup>+</sup> kanály a usměrňovací draslíkové kanály. K2P kanály se vyskytují v buněčných membránách jak u živočichů, tak i u rostlin a v posledních letech byly identifikovány jako důležité molekulární cíle volatilních i intravenózních anestetik. Tok draselných iontů je důležitý pro udržování základních vlastností buňky, jako je její růst, objem, excitabilita membrán a udržování negativního klidového potenciálu (O'Connell *et al.*, 2002). Anestetiky aktivované draslíkové kanály byly poprvé identifikovány u měkkýše *Lymnaea stagnalis* (Franks a Lieb, 1988) a následně byla nová třída draslíkových kanálů objevena a popsána také u savců. Bylo prokázáno, že některé z těchto savčích draslíkových kanálů byly aktivovány pomocí volatilních anestetik, což je učinilo potenciálními cílovými strukturami pro anestetika.

Existuje 15 odlišných podjednotek těchto kanálů, ze kterých jsou skládány funkční kanály. Funkční kanál je sestaven z dimerů, které mohou být homomerické nebo heteromerické. Podjednotky tvořící K2P kanály jsou tvořeny čtyřmi odlišnými transmembránovými helixy, jež označujeme TM 1–4 a dvěma sekvencemi pórů, které označujeme jako P. Tyto jsou uspořádané v následujícím pořadí: TM1-P-TM2-TM3-P-TM4 s N- i C-konci umístěnými v cytosolu (Obr. 2) (Braun, 2012). Právě P oblast, která je vysoce konzervovaná, umožňuje rozlišit K<sup>+</sup> ionty od ostatních iontů a usnadňuje průchod kanálem více než milionu K<sup>+</sup> iontů za sekundu. Pro savčí K2P kanály je

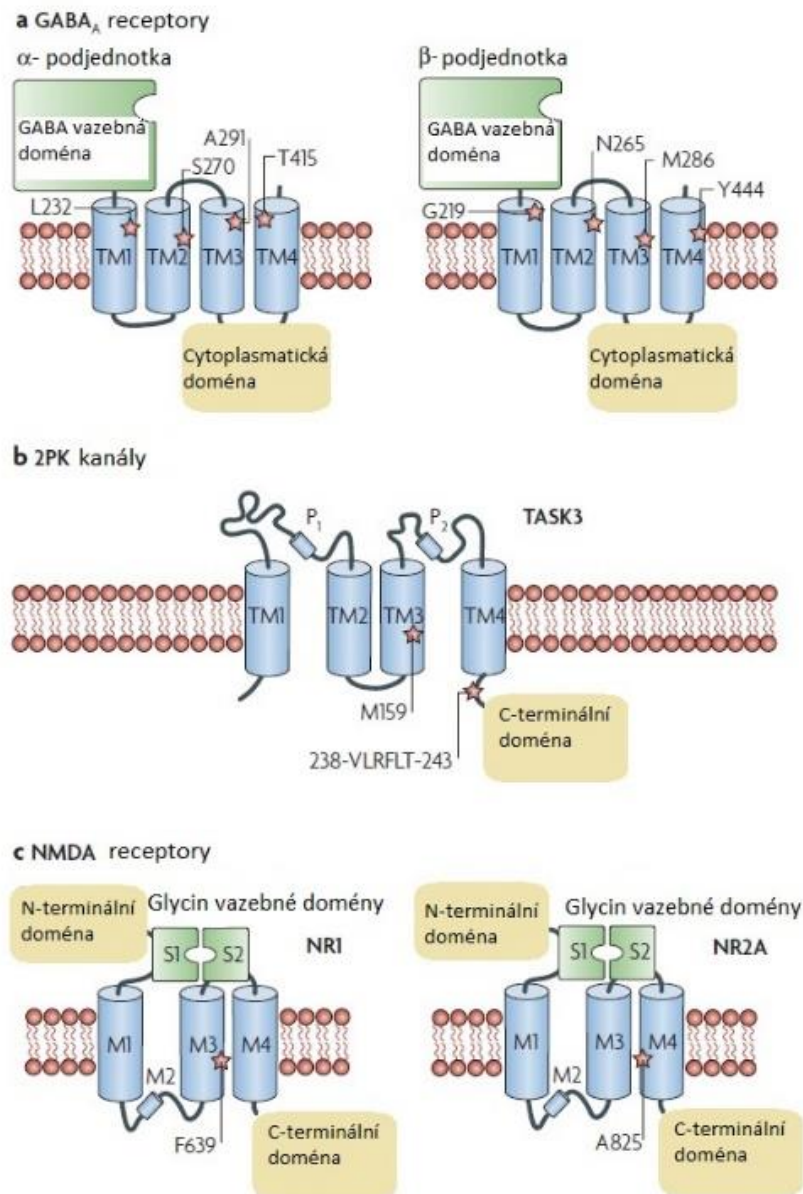
charakteristické, že v nepřítomnosti koncentračního gradientu prochází ionty přes membránu stejně dobře v obou směrech. Při normálních koncentračních gradientech, tzn. s vysokou koncentrací  $K^+$  uvnitř a nízkou koncentrací  $K^+$  vně buňky, je tok iontů směrem ven kvůli dostupnosti iontů větší než tok iontů směrem dovnitř buňky. Tato vnější korekce toku iontů je odstraněna, pokud se vnější koncentrace  $K^+$  zvýší na cytosolickou úroveň (O'Connell *et al.*, 2002).

K2P kanály jsou citlivé na anestetika, ovšem vykazují rozdílnou citlivost, co se týče inhalačních a lokálních anestetik. Zejména halogenovaná volatilní anestetika podporují otevírání těchto kanálů, zvyšují intenzitu toku draselných iontů, což vede ke snížení excitability neuronů. To přispívá k přechodu z vědomého stavu do stavu bezvědomí (Steinberg *et al.*, 2015). Naopak lokální anestetika reversibilně K2P kanály inhibují. Pět typů této skupiny kanálů, konkrétně TREK1, TREK2, TASK1, TASK3 a TRESK jsou volatilními anestetiky aktivovány přímo, ovšem citlivost na anestetika se mezi těmito typy liší (Berg *et al.*, 2004). Kanály typu TASK1 jsou v lidském organismu zastoupené nejvíce, nachází se například v mozku, slinivce břišní, ledvinách, žaludku a pokožce (O'Connell *et al.*, 2002). Kanály K2P nejsou řízeny napětím a jejich aktivita může být regulována řadou podnětů, jako je mechanická síla, polynenasycené mastné kyseliny (např. kyselina arachidonová), již zmíněná volatilní anestetika a jiná farmakologická činidla, pH, teplota a signalizace, zejména fosforylace a interakce protein-protein (Braun, 2012). Kanály K2P se liší také strukturami, které jsou potřebné pro jejich citlivost k anestetikům, např. pro kanál TREK1 je důležitá C-terminální doména, naopak u kanálu typu TASK má menší význam. Avšak region, který spojuje transmembránové jádro tohoto kanálu s velkou cytoplazmatickou C-terminální doménou, je důležitý pro oba typy kanálů. Bylo prokázáno, že segment šesti aminokyselin (238-VLRFLT-243) v této oblasti je nezbytný pro aktivaci kanálů TASK anestetiky (Patel *et al.*, 1999).

U savců diethylether aktivuje kanály TREK1, u rostlin jsou těmito kanálům nejvíce příbuzné TPK draslíkové kanály. Podílí se na kontrole membránového potenciálu a vnímání mechanických podnětů (Becker *et al.*, 2004).

### 2.1.4.3 NMDA receptory

Ionotropní glutamátové receptory jsou rozděleny na tři hlavní strukturálně odlišné třídy, kam kromě NMDA receptorů řadíme také AMPA a kainátové receptory. NMDA (*N*-methyl-D-aspartát) receptory se vyskytují presynapticky i postsynapticky, zprostředkovávají pomalé složky synaptického přenosu v centrální nervové soustavě, kde dochází zároveň k jejich expresi. Mají důležitou úlohu v procesu učení, paměti a jsou důležité v souvislosti se synaptickou plasticitou. Podílí se na patofyziologii několika



Obr. 2 Tři klíčové molekulární cíle anestetik a jejich determinanty důležité pro sensitivitu k anestetikům (označené hvězdičkou). Obrázek zaznamenává strukturu GABA<sub>A</sub> a NMDA receptoru a K2P kanálu v lipidové membráně. Upraveno dle: Franks, 2008.

poruch centrálního nervového systému (Traynelis *et al.*, 2010) a jsou spojovány s patologií depresí, psychóz a neurodegenerativních chorob, včetně Alzheimerovy choroby (Wudick *et al.*, 2018). NMDA receptory se od ostatních glutamátových receptorů liší vlastnostmi jako je vysoká propustnost pro  $\text{Ca}^{2+}$  kationty, napětově závislá blokáce iontového kanálu pomocí extracelulárních  $\text{Mg}^{2+}$  kationtů a nutnost vazby dvou koagonistů (glutamátu a glycinu, případně D-serinu) pro aktivaci kanálu (Traynelis *et al.*, 2010).

NMDA receptory vytváří tetramerické komplexy složené z podjednotek, jež vytváří pór iontového kanálu (Hansen *et al.*, 2018). Podjednotky jsou sestavovány do funkčních receptorů s různým složením, různými funkčními vlastnostmi a rolemi v centrálním nervovém systému. Receptory NMDA jsou složeny vždy z podjednotky NR1 a z alespoň jedné ze čtyř podjednotek NR2 (A–D), dále existují také dvě podjednotky NR3 (Obr. 2). Podjednotka NR1 je kódována genem *grin1*, čtyři geny *grin2* kódují podjednotky NR2 (A–D) a NR3 podjednotky jsou kódovány dvěma geny *grin3* (Traynelis *et al.*, 2010).

Tato heterogenita poskytuje bohatou kinetickou a farmakologickou variabilitu (Honoré *et al.*, 2002). Stechiometrie NMDA receptoru byla prokázána jako dvě NR1 podjednotky, na něž se váže glycin a dvě NR2 podjednotky vázající glutamát (Karakas a Furukawa, 2014). NR1 podjednotka se vyskytuje u všech funkčních NMDA receptorů, tudíž její exprese probíhá téměř ve všech centrálních neuronech (Hansen *et al.*, 2018). NR2 podjednotky zajišťují kontrolu více biofyzikálních vlastností. Sestavení a fyziologické role podjednotek NR3 zatím zůstávají nejasné. Receptory NMDA vyžadují pro svou funkci vazbu agonisty, jímž je glutamát, a koagonisty, jímž je glycin a D-serin (Benveniste a Mayer, 1991). D-serin je dominantním koagonistou v oblasti synapsí, přičemž glycin je naopak důležitý v extrasynaptických oblastech (Papouin *et al.*, 2012). Většina inhalačních anestetik na NMDA kanály působí inhibičně, ovšem míra jejich účinků se mezi nimi markantně liší. Inhibice těchto kanálů je částečně závislá na lokální koncentraci glycinu, který se váže na podjednotku NR1.

V rostlinách se vyskytují homology glutamátového receptoru (GLRs) a zabezpečují specifické fyziologické funkce jako je růst pylové láčky, fotomorfogeneze, proliferace kořenového meristému, vrozená imunita a systémová odpověď na mechanické poranění (Lam *et al.*, 1998; Michard *et al.*, 2011; Mousavi *et al.*, 2013). S živočišnými NMDA receptory sdílí sekundární strukturu (Lam *et al.*, 1998). Tyto receptory jsou spojeny se signalizací  $\text{Ca}^{2+}$  a jeho přílivem do cytosolu, nachází se zejména v membránách

chloroplastů, mitochondrií a také vakuol (Wudick *et al.*, 2018). GLRs jsou také senzory, které reagují na zvýšené množství glutamátu při poranění rostliny a převádí tento signál na elektrický signál, jenž se následně šíří do orgánů zodpovědných za spuštění obranných reakcí (Toyota *et al.*, 2018).

## 2.2 Anestetika a jejich působení na rostliny

Jak bylo již dříve zmíněno, významným lékařem a vědcem, zabývajícím se rostlinnou anestezí, byl Claude Bernard. Bernard navrhl hypotézu, že rostliny, stejně jako živočichové, mohou vnímat změny svého okolí. Tuto schopnost ve svých pracích označuje jako „sensitivita“. Pro potvrzení své hypotézy aplikoval anestetika na rostliny a výsledky výzkumu zveřejnil v roce 1878. Bernardovy experimenty ukázaly, že volatilní anestetika nepůsobí pouze na neurony, ale ovlivňují fyziologické procesy ve všech buňkách, tudíž že sensitivita není omezena pouze na organismy s nervovou soustavou, ale jedná se o obecnou vlastnost všech buněk. Různé druhy buněk mají k anestetikům odlišnou citlivost, přičemž právě neurony patří mezi nejcitlivější. Mezi neurony a rostlinnými buňkami nalezneme řadu podobností.

U rostlin citlivka stydlivá (*Mimosa pudica*), mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*) a rosnatka kapská (*Drosera capensis*) lze po aplikaci anestetik pozorovat dočasnou ztrátu schopnosti pohybu, který vzniká jako odpověď na dotyk, ovšem po odstranění dané látky s anestetickým účinkem dochází k úplné obnově této schopnosti (Yokawa *et al.*, 2018). Stimulace listu vyvolá lokální modifikaci elektrického potenciálu, který zahajuje řetězec reakcí, jež vedou k modifikaci turgoru v buňkách pulvinu a následně ke změnám tvaru a objemu buněk (Grémiaux *et al.*, 2014). Past masožravé rostliny je schopná se uzavřít během zlomku sekundy a zachytit tak kořist. Když se kořist dotkne smyslových vlásků, dojde k vytvoření akčního potenciálu, který se následně rychle šíří. Při dotyku stejných nebo jiných sensorických vlásků dvakrát v rozmezí 20 sekund další akční potenciál uzavře past. Po vyčerpání všech živin z polapené kořisti je past opět otevřena (Hedrich, 2012). Pod vlivem anestetik je tvorba elektrického vzruchu úplně blokována, stejně tak i jeho šíření, což způsobuje, že rostlina není schopná trávit svou kořist kvůli inhibici jasmonátové signální dráhy (Yokawa *et al.*, 2018; Pavlovič *et al.*, 2020). Anestetika ovlivňují další jevy v rostlinách, mimo jiné mají vliv také na zastavení klíčení semen, účinek je stejně jako v ostatních případech reversibilní (Yokawa *et al.*, 2018).

Vliv anestetik na fotosyntézu byl zkoumán pomocí experimentu s vodními rostlinami *Spirogyra* a *Potamogeton*. Tyto rostliny byly umístěny v nádobách obsahujících vodu a oxid uhličitý a byly umístěny na světlo. Do jedné láhve byla vložena houba nasáklá diethyletherem a do druhé byla vložena houba s destilovanou vodou. Plyn z kontrolní láhve byl bohatý na kyslík, na rozdíl od láhve obsahující diethylether, kde byl detekován pouze oxid uhličitý. Z toho vyplývá, že diethylether inhibuje fotosyntézu bez narušení procesů respirace (Yokawa *et al.*, 2018).

Anestetika u rostlin vyvolávají účinky podobné těm, které můžeme pozorovat u živočichů. Jedná se o zastavení tvorby akčních potenciálů, ovlivnění recyklace endocytických vezikul a homeostázu reaktivních forem kyslíku (Yokawa *et al.*, 2018).

Samotné rostliny vystavené stresu syntetizují vlastní anestetika, nejčastěji je to diethylether a ethylen. Ethylen je klasifikován jako rostlinný hormon, který rostliny syntetizují při poranění nebo napadení patogenem, stejně tak je důležitý pro zrání plodů (Grémiaux *et al.*, 2014). Mezi další anestetika vytvářené rostlinami patří alkaloidy, flavonoidy, mentol, kokain, atropin a monoterpeny (Behcet, 2014). Rostliny rovněž syntetizují mnohé blokátory NMDA receptorů, které ovlivňují i samotné rostliny, např. S(+)- $\beta$ -methyl- $\alpha,\beta$ -diaminopropionová kyselina (BMAA) a kainát (Lam *et al.*, 1998; Brenner *et al.*, 2000).

## 2.3 Fotomorfogeneze rostlin

Světlo je nezbytné pro růst a vývoj rostlin, slouží jako zdroj energie pro fotosyntézu a je nepostradatelným stimulem pro fotomorfogenezi. Vyšší rostliny se neustále přizpůsobují světelným podmínkám, aby optimalizovaly svůj vývoj a růst, což je zabezpečováno prostřednictvím různých fotoreceptorů včetně fytochromů. Fytochromy jsou dimerní chromoproteiny, které absorbují červené a dlouhovlnné, tzv. far red červené světlo. Každý monomer má kovalentně vázaný otevřený tetrapyrrolový fytochromobilin představující chromofor (Tripathi *et al.*, 2019).

Neaktivní fytochrom (Pr forma absorbující červené světlo) může být přeměněn na aktivní fytochrom (forma Pfr absorbující far red světlo) absorbováním červeného světla (Quail, 2010). Pfr forma může být přeměněna zpět na Pr formu po absorbování far red světla nebo ve tmě. Aktivní fytochrom je schopný migrace do jádra, kde může iniciovat transkripci na světle závislých genů (Yamaguchi *et al.*, 1999). Fytochromy rozpoznávají různé světelné informace včetně intenzity a délky osvětlení a přenáší tak signály, které zasahují do vývoje téměř každého kroku životního cyklu rostliny, od klíčení až po senescenci. Během růstu a vývoje rostlin fytochromy zabezpečují růst směrem za světlem, přechod z vegetativní do reprodukční fáze ve správný čas a také již zmíněnou senescenci. Účastní se procesu klíčení, deetiolizace, kvetení, vývoje chloroplastů a biosyntézy chlorofylu. (Tripathi *et al.*, 2019).

Další skupinou fotoreceptorů jsou kryptochromy. Jedná se o receptory modrého světla, které regulují cirkadiánní rytmy, otevírání průduchů, vývoj kořene, odpovědi na napadení bakteriemi či viry, reakce na abiotický stres a programovanou buněčnou smrt. Kryptochromy mají dvě domény, první z nich váže chromofor FAD a pterin 5,10-methyltetrahydrofolát (MTHF), druhá je důležitá pro regulaci kryptochromů (Yu *et al.*, 2010). Kryptochromy jsou hromaděny v jádře (Kleiner *et al.*, 1999) a podléhají fosforylaci nebo ubikvitinaci v závislosti na modrém světle. Fotony excitují elektrony flavinu, což vede k redoxní reakci a konformační změně fotoreceptorů. Fosforylací fotoexcitovaného kryptochromu vzniká otevřená konformace, která je schopná interagovat se signálními proteiny, což vede ke změně exprese genů, k metabolické a vývojové změně u rostlin (Yu *et al.*, 2010).

Třetí třídou fotoreceptorů jsou fototropiny. Jsou to receptory modrého světla, konkrétně se jedná o světlem aktivované serin/threoninové proteinové kinasy (Christie,



2007). Jejich úkolem je regulace zásadních fyziologických reakcí, které kontroluje světlo. Patří sem pozitivní fototropismus výhonků, negativní fototropismus kořenů, akumulace chloroplastů, expanze listů, prodlužování rostlin a otevírání průduchů (Li *et al.*, 2015). Vnímání světla fototropiny je umožněno díky opakujícímu se motivu v N-terminální oblasti proteinu, tedy tzv. LOV doménou. Pokud je LOV doména fotoexcitována, dochází k autofosforylaci receptoru a k iniciaci signalizace fototropinu (Christie, 2007).

Také UV-B světlo působí na fotomorfogenezi rostlin. UVR8 zprostředkovává fotomorfogenní odpovědi na UV-B záření tím, že reguluje transkripci cílových genů. Po absorpci UV-B záření dochází k disociaci dimeru UVR8 na monomery, což iniciuje transdukci signálu. Nejvíce charakterizovanou fotomorfogenní odpovědí na UV-B záření je biosyntéza flavonoidů, které se nachází ve fotoprotekčních strukturách rostliny (Jenkins, 2014). UV-B záření může také ve větších dávkách poškodit DNA (Rozema *et al.*, 1997), to je způsobeno zejména zářením o vlnové délce 260 nm, kdežto fotomorfogenní reakce způsobuje záření o vlnové délce 295–300 nm (Jenkins, 2009).

Plastidy jsou organely nacházející se u fotosyntetizujících eukaryotických buněk. Všechny plastidy se vyvíjí z proplastidů (Solymosi *et al.*, 2004). V případě nepřístupu světla se proplastidy vyvíjejí v etioplasty, které obsahují prolamelární tělísko, což je pravidelná síť tubulárních membrán, ze kterých vychází prothylakoidní lamely ve stromě. Prolamelární tělísko obsahuje protochlorofylid (Pchl<sub>id</sub>) spolu s proteiny, zejména NADPH-protochlorofylid oxidoreduktasou (POR), což je klíčový enzym pro deetiologizaci u krytosemenných rostlin. Během deetiologizace prolamelární tělísko desintegruje a reorganizuje se s prothylakoidy na thylakoidní membránu (Kanervo *et al.*, 2008). Následkem osvětlení etioplastů je fotoredukce Pchl<sub>id</sub> na chlorofylid (Chl<sub>id</sub>) pomocí POR, což představuje zásadní krok v procesu přeměny etioplastu na chloroplast (von Wettstein *et al.*, 1995). Chlorofyl je potřebný na stabilizaci pigment-proteinových komplexů, které se experimentují přes fytochromem aktivovanou transkripci, v thylakoidních membránách (Hooper *et al.*, 2007). Etiologizace je také spojena s typem růstu nazývaným skotomorfogeneze, po osvětlení takováto rostlina přechází na fotomorfogenetický růst. Pro etiologovanou rostlinu je typické, že má značně protáhlý hypokotyl, zkrácené kořeny a malé, uzavřené kotyledony. Deetiologizace tedy kromě přechodu z etioplastů na chloroplasty zahrnuje také procesy narovnání apikálního háčku, zezelenání kotyledonů a jejich otevření u dvouděložných rostlin (Armarego-Marriott *et al.*, 2019).

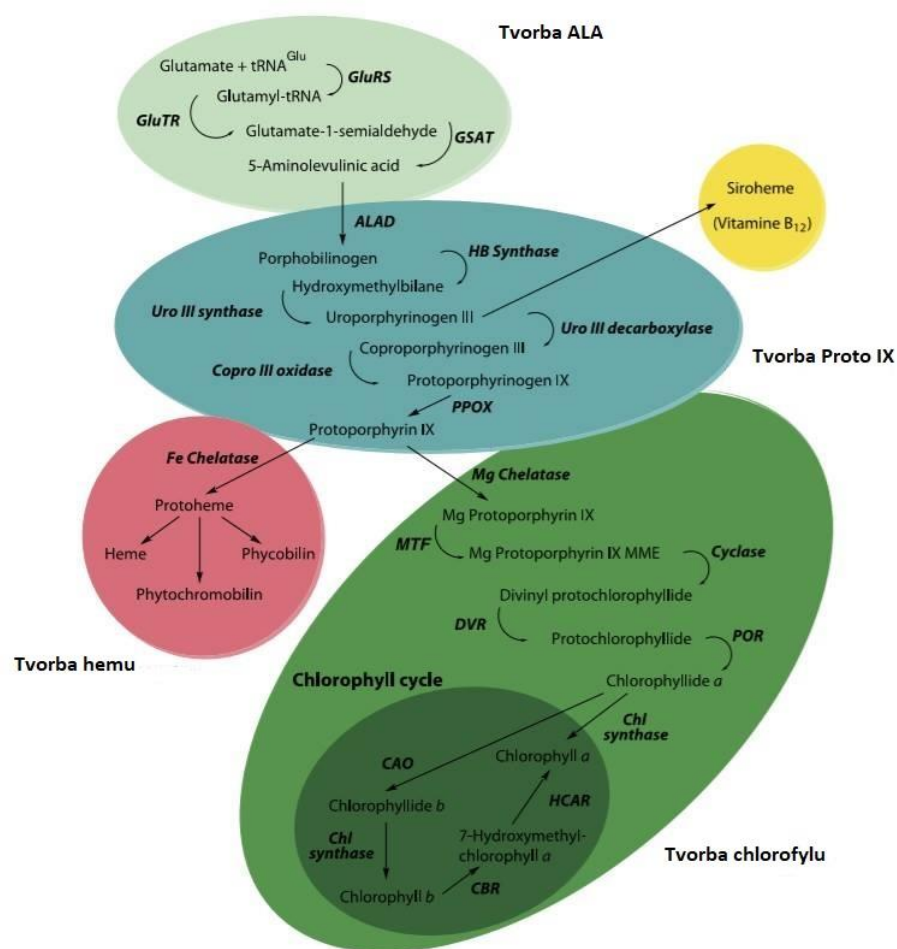
### 2.3.1 Biosyntéza chlorofylu

Fotosyntéza u vyšších rostlin probíhá v chloroplastech, což jsou specializované orgány se dvěma membránami. Ve vnitřním prostoru nazývaném stroma se nachází membránové útvary označované jako thylakoidy, v nichž probíhá světelná fáze fotosyntézy. Thylakoidy obvykle vytváří graná. Průběh temné fáze fotosyntézy zajišťují enzymy, které se nachází ve stromatu. Tmavá fáze zabezpečuje fixaci vzdušného CO<sub>2</sub> a jeho zabudování do organických molekul a následné metabolické procesy, kdežto světelná fáze zabezpečuje syntézu ATP a NADPH. V chloroplastech dochází také k mnoha biochemickým procesům, jako je biosyntéza pigmentů, lipidů a hormonů (Kodíček *et al.*, 2018).

Chlorofyl je tetrapyrrolový makrocyklus, který obsahuje Mg, fytolový řetězec a charakteristický pátý, tzv. isocyklický kruh. Chlorofyl je pro fotosyntézu zásadní, absorbuje světlo a přenáší světelnou energii nebo elektrony na další molekuly. Vyšší rostliny obsahují dva typy chlorofylu, konkrétně chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. U chlorofylu *b* je methylová skupina vyskytující se u chlorofylu *a* nahrazena formylovou skupinou (Tanaka a Tanaka, 2007). Molekuly chlorofylu *a* a *b* jsou nejvíce zastoupenými a nejdůležitějšími tetrapyrrolovými sloučeninami v rostlinách (Masuda, 2008).

Biosyntéza chlorofylu začíná aktivací glutamátu tRNA<sup>Glu</sup> pomocí glutamyl-tRNA syntetasy (Obr. 3). Glutamyl-tRNA reduktasa (GluTR) redukuje aktivovanou karboxylovou skupinu glutamyl-tRNA na formylovou skupinu za vzniku glutamát-1-semialdehydu (GSA). Následně je GSA konvertován na 5-aminolevulinovou kyselinu (ALA) pomocí GSA aminotransferasy (GSA-AT). Rostliny syntetizují ALA z glutamátu, dvě molekuly ALA jsou kondenzovány ALA dehydratasou a výsledkem je molekula porfobilinogenu (PBG). Čtyři molekuly PBG jsou polymerizovány PBG deaminasou. Dále dochází k tvorbě 1-hydroxymethylbilanu, z něhož vzniká uroporfyrinogen III pomocí uroporfyrinogen III synthasy (Tanaka a Tanaka, 2007). Uroporfyrinogen III představuje místo, ve kterém se biosyntetická dráha tetrapyrrolů rozděluje na větev hemu, chlorofylu, sirohemu a vitamínu B<sub>12</sub> (Papenbrock a Grimm, 2001). Uroporfyrinogen a následující meziprodukty této biosyntetické dráhy jsou fotosensibilní a mohou vytvářet singletní kyslík. V dalším kroku dochází ke konverzi uroporfyrinogenu III na koproporfyrinogen III za katalýzy uroporfyrinogen III dekarboxylasou. Následně dochází k dekarboxylaci dvou propionátových skupin koproporfyrinogenu III za vzniku protoporfyrinogenu IX pomocí na kyslíku závislé koproporfyrinogen III oxidasy

(CPOX). V další reakci protoporphyrinogen IX oxidasa (PPOX) katalyzuje vznik protoporphyrinu IX (Obr. 3) (Tanaka a Tanaka, 2007). Následujícím krokem je ATP-dependentní inzerce iontu  $Mg^{2+}$  do protoporphyrinogenu IX, tuto reakci katalyzuje Mg-chelataza. Mg-chelataza je enzym složený ze tří podjednotek ChIH, ChII, ChID (Joyard *et al.*, 2009). Podjednotka ChIH obsahuje katalytické místo, kdežto mezi podjednotkami ChII a ChID dochází k vazbě, což aktivuje podjednotku ChIH. V dalším kroku dochází k přenosu methylové skupiny z S-adenosyl-L-methioninu na karboxylovou skupinu 13-propionátu na Mg protoporphyrinu IX pomocí Mg-protoporphyrin IX methyltransferasy (MgMT), což vede k tvorbě Mg-protoporphyrin IX monomethyl esteru. Následně Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyklasa (MgCy) inkorporuje atomární kyslík do molekuly Mg-protoporphyrinu IX a vytváří tak 3,8-divinyl protochlorofylid. U rostlin



Obr. 3 Biochemická cesta biosyntézy rostlinných tetrapyrrolů. Prekurzorem všech tetrapyrrolů je kyselina 5-aminolevulinová (ALA), která je syntetizována z glutamátu. Biosyntéza dále pokračuje k protoforfyrinu IX, kde dochází k větvení na biosyntézu hemu a chlorofylu. V chlorofylovém cyklu dochází k vyvažování poměru chlorofylu a a b. Upraveno dle: Czarniecki a Grimm, 2012.

je tato reakce zabezpečena pomocí MgCy závislé na kyslíku. D pyrrolový kruh 3,8-divinyl protochlorofylidu je redukován NADPH-protochlorofylid oxidoreduktasou (POR), přičemž vzniká 3,8-divinyl chlorofylid (Obr. 3). U krytosemenných rostlin je tato reakce zcela závislá na světle, protože obsahují pouze na světle závislou POR (LPOR). Ostatní rostliny, řasy a cyanobakterie obsahují kromě LPOR také na světle nezávislou POR (DPOR), takže tyto organismy jsou schopné syntetizovat chlorofyl ve tmě (Tanaka a Tanaka, 2007). Jestliže krytosemenná rostlina začne klíčit ve tmě, dochází k nahromadění Pchl<sub>id</sub> spolu s NADPH a POR, rostliny nejsou schopny pokračovat v syntéze chlorofylu do té doby, než dojde k jejich expozici světlu (Masuda, 2008). V další reakci biosyntézy je 8-vinyllová skupina kruhu B redukována divinylchlorofylid reduktasou (DVR) a vzniká 3-vinyl chlorofylid *a*. V posledním kroku je 17-propionát na kruhu monovinyl chlorofylidu *a* esterifikován fytol-pyrofosfátem pomocí chlorofyl syntasy a výsledkem je vytvoření chlorofylu *a* (Obr. 3) (Tanaka a Tanaka, 2007).

Část chlorofylu *a* může být přeměněna na chlorofyl *b*, pro tuto přeměnu je klíčová reakce oxygenace chlorofylidu *a* na chlorofylid *b* pomocí chlorofylid *a* oxygenasy (CAO) (Tanaka a Tanaka, 2011). Tato přeměna se označuje jako chlorofylový cyklus, který je pro rostlinu důležitý zejména v procesu adaptace na rozdílné světelné podmínky.

Enzym GluTR plní nejvýznamnější úlohu v regulaci biosyntézy. Na transkripční úrovni je regulován světlem pomocí fytochromu a na posttranslační úrovni obsahem protochlorofylidu pomocí regulačního FLU proteinu. Ten se váže na enzym GluTR a tím inhibuje jeho aktivitu. Tyto mechanismy mají za úkol zabránit přílišné akumulaci protochlorofylidu ve tmě, což by po osvětlení způsobilo fotooxidační poškození membrán. Při deetiolicaci rostlin se uplatňuje regulace na úrovni transkripce, naopak posttranslační regulace se uplatňuje především při střídání dne a noci (Meskauskiene *et al.*, 2001; Kauss *et al.*, 2012).

### 2.3.2 Biosyntéza karotenoidů

Karotenoidy jsou pigmenty s typickou barvou v rozmezí žluté až červené. Tato fyzikální vlastnost je způsobena přítomností polyenového řetězce a konjugovaných dvojných vazeb, které fungují jako chromofor (Ruiz-Sola a Rodríguez-Concepción, 2012). Jedná se o skupinu isoprenoidních molekul, které jsou syntetizovány *de novo* fotosyntetickými organismy, ale také některými nefotosyntetickými bakteriemi a houbami. Karotenoidy dělíme do dvou hlavních tříd, konkrétně to jsou karoteny a xantofyly. U rostlin

karotenoidy zastávají celou řadu funkcí. Slouží jako přídavné pigmenty a tvoří tak základní strukturní jednotky fotosyntetického aparátu. Umožňují rostlinám se adaptovat na stres z osvětlení tím, že fungují jako fotoprotektanty. Při oxidačním štěpení karotenoidů vznikají apokarotenoidy. Ty mají signální roli ve vývoji rostlin a vyznačují se antifungálními účinky (Auldridge *et al.*, 2006). Nejvýznamnějším z apokarotenoidů je fytohormon kyselina abscisová (ABA).

Karotenoidy jsou syntetizovány v chromoplastech i ostatních typech plastidů. Množství akumulovaných karotenoidů se u různých typů plastidů liší, nejvyšší množství akumulují chromoplasty, velké množství těchto pigmentů se nachází také v chloroplastech fotosyntetizujících tkání. Jejich biosyntéza začíná syntézou pětiuhlíkaté molekuly isopentenylpyrofosfátu (IPP) a dimethylallyl pyrofosfátu (DMAPP) (Ruiz-Sola a Rodríguez-Concepción, 2012). Tři molekuly IPP jsou navázány k DMAPP za účasti geranyl-geranyl difosfát syntasy za vzniku geranyl-geranyl difosfátu (GGDP) (Lichtenthaler, 1999). Kondenzací dvou molekul GGDP fytoensyntasou (PSY) vzniká fytoen (Sandmann *et al.*, 2006). Fytoen je následně desaturován na lykopen pomocí fytoen desaturasy a  $\zeta$ -karoten desaturasy. Molekula lykopenu je místem, kde dochází k větvení biosyntézy. Cyklizací se získá  $\alpha$ -karoten ( $\beta$ ,  $\epsilon$ -karoten) za účasti lykopen  $\beta$ -cyklasy a lykopen  $\epsilon$ -cyklasy. Lykopen  $\epsilon$ -cyklasa je klíčová pro determinaci poměru  $\beta$ -karotenu a  $\alpha$ -karotenu. Z  $\alpha$ -karotenu a  $\beta$ -karotenu vzniká hydroxylací lutein a zeaxantin (Lu a Li, 2008), lutein je v listech nejvíce zastoupeným karotenoidem. Další epoxidací zeaxantinu zeaxantin epoxidasou (ZEP) vzniká violaxantin. V posledním kroku je violaxantin konvertován na neoxantin neoxantin syntasou (NSY) (North *et al.*, 2007). Na rozdíl od biosyntézy chlorofylu není syntéza karotenoidů striktně závislá na světle a karotenoidy syntetizují i etiolované rostliny.

## 2.4 Ječmen setý (*Hordeum vulgare*)

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) byl domestikován na Blízkém východě. Jedná se o samosprašnou, dobře prostudovanou plodinu co se týče genetiky, genomiky a šlechtění. Je to modelová rostlina pro výzkum tribu *Triticeae*, patřícího do čeledi *Poaceae* (Sreenivasulu *et al.*, 2008). Ječmen je jako modelová rostlina využíván v biochemii, fyziologii, genetice a molekulární biologii. Jedná se o diploid se 14 chromosomy, přibližně 84 % jeho genomu tvoří mobilní elementy nebo jiné repetitivní struktury. Velkou výhodou ječmene je jeho snadná kultivace v laboratorních podmínkách (Gozukirmizi a Karlik, 2017). Dnes se ječmen řadí mezi obilovinami na čtvrté místo v celosvětové produkci. Kromě jeho využití jako modelové rostliny se také používá jako krmivo pro hospodářská zvířata, jako výchozí surovina pro produkci piva a dalších potravin (Sreenivasulu *et al.*, 2008).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Komerčně dostupné chemikálie a roztoky

- 50% akrylamid/bisakrylamid (AB-3) (Biorad, USA)
- Aceton (VWR, Francie)
- Diethylether (Sigma-Aldrich, USA)
- Dithiotreitol (DTT) (Biorad, USA)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Biorad, USA)
- Ethanol 96% (Lihovar Kojetín, ČR)
- Glycin (Sigma, USA)
- Hexan (Supelco, Německo)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Lachema, ČR)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lachema, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta, ČR)
- Kyselina octová (Lachner, ČR)
- Kyselina trichloroctová (TCA) (Sigma, USA)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma, USA)
- Methanol (Roth, Německo)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (BioRad, USA)
- NaCl (Lachner, ČR)
- $\text{NH}_4\text{OH}$  (Sigma, USA)
- Peroxodisírán amonný (APS) (BioRad, USA)
- Sacharosa (Lachner, ČR)
- Savo (Unilever, ČR)
- Standard molekulových velikostí Protein Ladder (Thermo Scientific, USA)
- Tableta antiproteas (Merck, USA)
- Tekutý dusík (Linde, ČR)
- Tricin (Biorad, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Sigma, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)

- Uhličitan sodný ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Lachema, ČR)
- Uhličitan vápenatý ( $\text{MgCO}_3$ ) (Lachema, ČR)

### 3.1.2 Komerční soupravy

- BCA kit (Thermo Scientific, USA)
- Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, USA)

### 3.1.3 Roztoky pro izolaci proteinů, SDS-PAGE a Western blotting

- **Anodový (lower) tlumivý roztok 10x** (1 M Tris báze; 0,225 M HCl; pH 8,9)
- **Barvicí roztok** (0,1% (w/v) Ponceau S; 5% (v/v) kyselina octová)
- **Blokovací roztok** (5% (w/v) BSA v TBST)
- **Blotovací roztok 10x** (15,1 g Tris báze; 72 g glycin; 0,01 g SDS; doplnit  $\text{dH}_2\text{O}$  do 1000 ml)
- **DTE extrakční roztok** (28 mM DTT; 28 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 175 mM sacharosa; 5% SDS; 10 mM EDTA; 1 tableta antiproteas na 50 ml roztoku)
- **Gelový tlumivý roztok 3x** (3 M Tris; 1 M HCl; 0,3% SDS; pH 8,45)
- **Katodový (upper) tlumivý roztok 10x** (1 M Tris báze; 1 M Tricin; 1% SDS; pH 8,9)
- **Odbarvovací roztok** (250 ml methanol; 100 ml kyselina octová; 650 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ )
- **Separační gel 10%** (7,5 ml gelový pufr 3x; 8,55 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ ; 4,5 ml AB-3; 2,4 ml glycerol; 115  $\mu\text{l}$  APS (10%); 15  $\mu\text{l}$  TEMED)
- **TBS tlumivý roztok 10x** (7,5 g Tris báze; 44 g NaCl; doplnit  $\text{dH}_2\text{O}$  do 500 ml; pH 7,4 upravit pomocí 37% (v/v) HCl)
- **TBST tlumivý roztok** (100 ml TBS 10x; 1 ml Tween 20; 900 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ )
- **Transferový roztok 1x** (100 ml blotovací roztok 10x; 900 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ )
- **Vzorkový tlumivý roztok** (25 mg bromfenolová modř, 3 ml glycerol, doplnit  $\text{dH}_2\text{O}$  do 10 ml)
- **Zaostřovací gel 4%** (2,25 ml gelový pufr 3x; 6 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ ; 0,75 ml AB-3; 70  $\mu\text{l}$  APS (10%); 7,5  $\mu\text{l}$  TEMED)

### 3.1.4 Protilátky

- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-actin 1:2500 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-CP43 1:2000 (Agrisera, Švédsko)



- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-CP47 1:1000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-D1 1:30000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-D2 1:5000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-GluTR 1:1000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-Lhca1 1:2000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-Lhca2 1:2000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-Lhca3 1:2000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-Lhca4 1:2000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-Lhcb2 1:500 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-Lhcb3 1:2000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-Lhcb4 1:500 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-Lhcb5 1:2000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-POR 1:2000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-PsaA 1:1000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-PsaB 1:1000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-PsbO 1:2000 (Agrisera, Švédsko)
- Primární polyklonální protilátka rabbit anti-RbcL 1:5000 (Agrisera, Švédsko)
- Sekundární polyklonální protilátka goat anti-rabbit 1:10000 (BioRad, USA)

### 3.1.5 Přístroje

- Amersham Imager 600 (GE Health Care Life Sciences, Japonsko)
- Analytické váhy (Kern, Německo)
- Centrifuga (Eppendorf, Německo)
- Fluorometr Hansatech PEA (Hansatech, UK)
- Fotoaparát (Nikon D50, Japonsko)
- Fytokomora (Percival, USA)
- Laboratorní chladnička a mraznička
- Magnetické míchadlo s ohřevem (Ika, Německo)
- Spektrofluorometr JASCO FP-8500 (Jasco, USA)
- Spektrofotometr (Specord 250 Plus Jena, Německo)
- Termoblok (Biosan, Lotyšsko)
- Třepačka výkyvná (Wavetec, Španělsko)
- Výrobník ledu (Scotsman, USA)

- Zdroj elektrického napětí (Biorad USA)

### **3.1.6 Laboratorní materiál**

- Eppendorf mikrozkušavky 1,5 ml (Eppendorf, Německo)
- Eppendorf mikrozkušavky 2 ml (Eppendorf, Německo)
- Falcon zkumavky (15 ml)
- Filtrační papír
- Kádinky
- Nástroje pro elektroforézu (BioRad, Německo)
- Nitrocelulosevá membrána (BioRad, Německo)
- Odměrné válce
- Pipety (Eppendorf, Německo)
- Plastové krabičky s víčky
- Sestava pro elektroforézu (BioRad, USA)
- Sestava pro Western blotting Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, Německo)
- Skleněné zkumavky
- Sterilní špičky (Eppendorf, Německo)
- Třecí misky s tloučkem

### **3.1.7 Rostlinný materiál**

- Ječmen setý (*Hordeum vulgare* cv. *Bojos* L.)

### **3.1.8 Ostatní materiál**

- Květináče
- Mořský písek
- Perlit
- Polypropylenové sáčky

### **3.1.9 Software**

- Biolyzer.V.1.800 (The Fluoromatics Lab, MediaSoft, Švýcarsko)
- Excel (Microsoft, USA)
- Origin 8.5.1. (Northampton, USA)
- Spectra Manager ver. 2 (Jasco, USA)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Kultivace rostlinného materiálu

Semena ječmene (*Hordeum vulgare* cv. *Bojos* L.) byla nejprve sterilizována 2 hodiny v roztoku Sava a následně ponechána namočená v destilované vodě po dobu 3 hodin. Do květináčů byl nabrán perlit a tyto květináče byly vystaveny po dobu 1 hodiny teplotě 72 °C pro sterilizaci. Semena byla umístěna na povrch perlitu, zalita destilovanou vodou a následně kultivována po dobu 7 dní ve tmě v dřevěné bedně. Tato bedna byla před umístěním květináčů také vysterylizována Savem. Po týdenní kultivaci byla jedna skupina rostlin (3 květináče) vystavena na 8 hodin atmosféře s diethyletherem, kdy 4 ml diethyletheru byly napipetovány do kádinky, jež byla umístěna spolu s květináčem do 5 l polypropylenového sáčku. Kontrolní rostliny (3 květináče), neošetřené diethyletherem, byly umístěny rovněž do polypropylenového sáčku, aby byla zaručena stejná intenzita osvětlení při následné expozici světlu. Takto připravené rostliny byly ponechány 2 hodiny ve tmě a následně byly přemístěny na 6 hodin na světlo o intenzitě  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PAR. Po 8 hodinách byly diethyletherové i kontrolní rostliny vyjmuty ze sáčků. U diethyletherových rostlin byl následně sledován jejich návrat z anestezie (tzv. recovery) a pokračovalo vystavení kontrolních i diethyletherových rostlin světlu o intenzitě  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PAR po dobu 24 a 48 hodin od vystavení anestetiku.

Vzorky pro analýzu obsahu chlorofylů, karotenoidů a proteinů byly nejdříve odebrány v čase 0 hodin, tzn. z rostlin, které byly etiolované a nevystavené světlu. Další vzorky byly odebrány v čase 6 hodin, tzn. z kontrolních rostlin a z rostlin, které byly vystaveny diethyletheru po dobu 2 hodin ve tmě a 6 hodin světlu. Analogicky proběhl odběr vzorků z rostlin po 24 a 48 hodinách.

Pro analýzu chlorofylů a karotenoidů bylo v každém zmíněném časovém úseku odebráno 500 mg vzorku z kontrolních i diethyletherových rostlin do 15 ml Falcon zkumavek. K analýze protochlorofylidu bylo odebráno 100 mg vzorku, které byly nejdříve zafixovány pomocí horkých vodních par. Fixace kontrolních i diethyletherových vzorků odebraných v čase 0 a 6 hodin probíhala ve tmě, vzorky odebrané v časech 24 a 48 hodin byly fixovány na světle. Fixace horkou párou má za úkol zejména denuraci enzymu LPOR, který by při další práci probíhající na světle mohl redukovat Pchl<sub>ide</sub> na Chlide, což je nežádoucí. Vzorky byly odebrány do 2 ml Eppendorf mikrozkuvek. Pro analýzu proteinů metodou Western blot bylo odebráno 50 mg listů z kontrolních

i diethyletherových rostlin do 2 ml Eppendorf mikrozkušavek. Zkušavky se vzorky byly zmrazeny v tekutém dusíku a umístěny do laboratorní mrazničky při teplotě -80 °C pro pozdější analýzu.

### **3.2.2 Analýza pigmentů**

#### **3.2.2.1 Stanovení koncentrace chlorofylu *a* a *b* a karotenoidů**

Připravené vzorky rostlinného materiálu (500 mg) byly zhomogenizovány ve 4 ml chlazeného 80% acetonu s přidáním uhličitanem hořečnatým a mořským pískem. Uhličitan hořečnatý byl přidán z důvodu zamezení degradace pigmentů a mořský písek pro lepší rozmělnění materiálu. Následně byl extrakt centrifugován v 15 ml Falcon zkušavkách 10 min při teplotě 4 °C a při rychlosti 6000 g. Supernatant byl použit pro spektrofotometrické měření absorbancí při vlnových délkách 663,2 nm (Chl *a*); 648,8 nm (Chl *b*); 470 nm (karotenoidy) a 700 nm (pozadí) pomocí spektrofotometru. Koncentrace asimilačních pigmentů byla vypočtena podle Lichtenthalera (1987). Výsledné hodnoty byly přepočteny na jednotky  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  FW. Na závěr byly výsledky vyhodnoceny statisticky dvouvýběrovým Studentovým *t*-testem.

#### **3.2.2.2 Stanovení koncentrace protochlorofylidu a jeho detekce**

Protochlorofylid byl ze vzorků (100 mg) extrahován pomocí 3 ml alkalizovaného acetonu (100% aceton s 0,1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  v poměru 9:1) ve třecí misce. Extrakt byl poté přenesen do 15 ml Falcon zkušavky. Postupně bylo přidáno 2,5 a 1,2 ml hexanu pro promytí. Při každém promývání bylo nutné vzorky důkladně protřepat. V acetonové fázi se akumulují neesterifikované tetrapyrroly, kdežto v hexanové fázi se akumulují esterifikované tetrapyrroly s fytolem, tedy chlorofyly, a také karotenoidy. Při každém promytí byla hexanová fáze odpipetována. Vzorky pročištěné od esterifikovaných tetrapyrrolů byly nakonec centrifugovány při rychlosti 8000 g a výsledný extrakt byl použit na stanovení Pchl<sub>id</sub>. Koncentrace Pchl<sub>id</sub> byla stanovena pomocí spektrofluorometru (JASCO PMU 830 FP-8500), excitační vlnová délka byla nastavena na 438 nm a emisní spektrum skenováno v rozsahu 600–700 nm.

Pro správné vyhodnocení bylo nutné vytvořit kalibrační přímku Pchl<sub>id</sub>. Ke stanovení byly použity rostliny pěstované 7 dní ve tmě. Vzorky byly homogenizovány pomocí třecí misky a tloučku v alkalizovaném acetonu (100% aceton s 0,1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  v poměru 9:1). Extrakt byl centrifugován při rychlosti 8000 g. K supernatantu bylo přidáno 20 ml hexanu

pro odstranění karotenoidů. Následně byl odstraněn hexan a vzorek byl dvakrát promyt dalším přidáním 15 ml hexanu. Hexan byl opět odstraněn a v následujícím kroku bylo přidáno 5 ml diethyletheru, 2 ml saturovaného roztoku NaCl a 2 ml saturovaného roztoku  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , celá směs byla protřepána a Pchlid se akumuloval do diethyletheru. Takto připravený vzorek byl převeden do skleněné zkumavky, jelikož diethylether interaguje s plastem. Přebytečný aceton byl vymyt 4 ml vody. Výsledný objem vzorku pro stanovení kalibrační přímky Pchlid byl 3 ml. Koncentrace Pchlid byla stanovena pomocí spektrofotometrického měření při vlnové délce 623 nm. Koncentrace byla vypočtena pomocí vzorce Lambert-Beerova zákona  $A = c \cdot l \cdot \epsilon$ , kde  $A$  = absorbance,  $c$  = koncentrace,  $l$  = tloušťka kyvety a  $\epsilon$  = molární extinkční absorpční koeficient, jehož hodnota je v případě Pchlid v diethyletheru rovna  $3,56 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Následně bylo provedeno spektrofluorometrické měření pro sestavení kalibrační přímky při excitační vlnové délce 438 nm a emisní vlnové délce 633 nm, kdy do alkalizovaného acetonu (100% aceton s 0,1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  v poměru 9:1) bylo postupně napipetováno 0; 10; 25; 50; 75 a 100  $\mu\text{l}$  standardu do celkového objemu 2 ml (Stolárik *et al.*, 2017).

Na závěr byl obsah Pchlid ve vzorcích přepočítán na jednotky  $\mu\text{g}$  Pchlid  $\text{g}^{-1}$  FW a výsledky byly vyhodnoceny dvouvýběrovým Studentovým  $t$ -testem.

### **3.2.3 Analýza proteinů metodou Western blotting**

#### **3.2.3.1 Izolace a stanovení koncentrace proteinů**

Vzorky (50 mg) byly vytaženy z mrazáku a zhomogenizovány na jemný prášek v tekutém dusíku pomocí třecí misky a tloučku. Do mikrozkuavky o objemu 1,5 ml bylo napipetováno 700  $\mu\text{l}$  DTE extrakčního roztoku a následně byl přidán vzniklý prášek. Tyto mikrozkuavky byly ponechány po dobu 10 minut na třepačce a poté byly vzorky denaturovány v termobloku 30 minut při 70 °C. Dále byly vzorky centrifugovány 10 minut při rychlosti 20000  $g$  při 20 °C. Supernatant byl odpipetován a byly vytvořeny alikvoty po 100  $\mu\text{l}$ , které byly uskladněny v mrazáku při teplotě -80 °C pro pozdější použití.

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí BCA kitu. Nejdříve byly připraveny vzorky pro stanovení kalibrační přímky BSA podle Tab. 1.

Tab. 1 Příprava standardu naředěného sérového hovězího albuminu (BSA).

Zkumavka	Objem 0,1 M NaOH (μl)	Objem BSA o koncentraci 2 mg/ml (μl)	Výsledná koncentrace BSA (μg/ml)
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175 ze zkumavky B	750
E	325	325 ze zkumavky C	500
F	325	325 ze zkumavky E	250
G	325	325 ze zkumavky F	125
H	400	100 ze zkumavky G	25
I	400	0	0 (= blank)

Z každého rostlinného vzorku bylo odpipetováno 25 μl do 525 μl 10% TCA pro vysrážení proteinů. Následně byly vzorky centrifugovány 10 minut při rychlosti 14770 g. Supernatant byl odstraněn a pelet byl vysušen v termobloku při 40 °C, mikrozkušavky se vzorky byly ponechány při vysoušení otevřené. Po vysoušení byl pelet rozpuštěn v 50 μl 0,1 M NaOH. Do vzorků pro stanovení kalibrační přímky i do rostlinných vzorků byl přidán 1 ml vyvíjejícího roztoku. Následně proběhla inkubace při 37 °C po dobu 30 minut.

Po inkubaci byla spektrofotometricky změřena absorbance vzorků pro stanovení kalibrační přímky při vlnové délce 562 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda. Následně byla změřena absorbance také u rostlinných vzorků. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační přímka, s jejíž pomocí byla vypočtena koncentrace proteinů v rostlinných vzorcích a také množství proteinů pro nanášky pro elektroforézu.

### 3.2.3.2 Elektroforéza v denaturujících podmínkách

Zmražené alikvoty byly rozmrazeny a následně denaturovány pomocí termobloku po dobu 15 minut a teplotě 70 °C. Do každého vzorku bylo přidáno 30 μl vzorkového tlumivého roztoku, který zbarvil vzorek, což bylo důležité při nanášení vzorku na gel a při samotné separaci vzorku. Vzorkový tlumivý roztok obsahuje také glycerol, který napomáhá správnému dosednutí vzorku do jamky v gelu.

Pro separaci proteinů byly připraveny dva typy gelu, separační a zaostřovací. Jako první byl připraven 10% separační gel. Na čtyři skla bylo pro přípravu gelu použito 7,5 ml gelového tlumivého roztoku 3x; 8,55 ml dH<sub>2</sub>O; 4,5 ml AB-3; 2,4 ml glycerolu; 115 μl

APS (10%) a 15  $\mu$ l TEMEDu. APS a TEMED bylo nutné přidat jako poslední, jelikož způsobují polymerizaci gelu. Separační gel byl během přípravy promícháván pomocí magnetického míchadla. Takto připravený roztok gelu byl nanesen mezi skla upevněná ve stojanu a ihned byl převrstven 96% etanolem. Během následujících 30 minut proběhla polymerizace gelu, po níž byl ethanol slit a jeho zbytky byly vysušeny pomocí filtračního papíru. Následně byl připraven zaostřovací gel, po jeho nanesení na již ztuhlý separační gel do něj byly vloženy hřebeny, které vytváří příslušné jamky pro nanášení vzorků. Po 30 minutách byl gel již zpolymerizovaný a hřebeny z něj mohly být vytaženy. Mezi dvojice skel byl nalit 1x ředěný katodový tlumivý roztok tak, aby byly zality také jamky a zároveň bylo důkladně zkontrolováno, zda tento tlumivý roztok neuniká ze sestavené aparatury. Do první jamky byly nejdříve nanесeny 3  $\mu$ l standardu molekulových velikostí a následně také příslušné objemy vzorků vždy ve stejném pořadí na každý gel. Skla s gely upevněná ve stojáncích byla přenesena do elektroforetické vany, do níž byl nalit 1x ředěný anodový tlumivý roztok po naznačenou rysku. Poté byla celá aparatura uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Při použití čtyř skel bylo použito konstantní napětí 130 V po dobu 80 minut. V průběhu elektroforetické separace bylo sledováno rozdělování proteinů a pokud se frakce vzorku s nejnižší molekulovou velikostí blížila ke konci skel, byla elektroforéza ukončena. V této fázi byla aparatura odpojena od zdroje napětí a gely byly z aparatury vyjmuty.

### **3.2.3.3 Western blotting**

Na blotovací zařízení byla umístěna podložka navlhčená v blotovacím roztoku, na niž byla položena nitrocelulosová membrána. Na nitrocelulosovou membránu byly umístěny gely s elektroforeticky rozdělenými proteiny, které byly následně přikryty další navlhčenou podložkou. Dále byla celá aparatura uzavřena víkem blotovacího zařízení a připojena ke zdroje elektrického napětí. Blotování probíhalo po dobu 70 minut při elektrickém proudu 200 mA (50 mA na jeden gel). Po přenesení elektroforeticky separovaných proteinů na nitrocelulosovou membránu byly tyto membrány inkubovány 10 minut v roztoku Ponceau S, pomocí něhož se na membráně obarvily proteiny, tímto byl ověřen správný přenos proteinů na membránu. Následně byly membrány odbarveny v 1x TBST tlumivém roztoku a přes noc byly inkubovány v blokovacím roztoku v lednici. Následující den byl blokovací roztok vymyt v 1x TBS tlumivém roztoku. Membrány byly vloženy do vhodně naředěných primárních protilátek a byly inkubovány

po dobu 1 hodiny na výkyvné třepačce. Po inkubaci byly membrány promyty v 1x TBST tlumivém roztoku na výkyvné třepačce. Membrány byly promyty v tomto tlumivém roztoku celkem pětkrát. Následně byly inkubovány v sekundární protilátce konjugované s křenovou peroxidasou s ředěním 1:10000 po dobu 1 hodiny. Sekundární protilátka byla vždy na rozdíl od primární protilátky připravována čerstvá, primární protilátky byly již naředěny v 5% BSA a uchovávány v laboratorní mrazničce. Sekundární protilátka byla opět pětkrát vymývána v 1x TBST tlumivém roztoku a po šesté v 1x TBS tlumivém roztoku. Pro vizualizaci proteinů značených protilátkou byl použit kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate a signál byl zaznamenán a kvantifikován pomocí přístroje Amersham Imager 600.

### **3.2.4 Nízkoteplotní fluorescence (77 K)**

Pro zjištění, zda dochází u rostlin ošetřených diethyletherem k inhibici fotofyzikálních drah, bylo provedeno měření nízkoteplotní fluorescence. Pomocí této metody bylo sledováno, zda ve vzorcích dojde k redukci protochlorofylidu na chlorofylid, k čemuž je nutná přítomnost enzymu protochlorofylid oxidoreduktasy (POR) a fotonu. Při emisní vlnové délce 635 nm je pomocí nízkoteplotní fluorescence detekovatelný volný Pchlid a při vlnové délce 656 nm lze touto metodou detekovat Pchlid vázaný v prolamelárním tělísku s LPOR.

Při měření nízkoteplotní fluorescence (77 K) byly použity vzorky kontrolní a ošetřené diethyletherem stejně jako u předešlých metod, a také vzorky osvětlené pouze po dobu 5 minut, které byly následně vystaveny tmě po dobu 2; 10 a 20 minut pro sledování tzv. Shibata shiftu. Reprezentativní klíčenec byl odebrán a připevněn na podložku z lepenky pomocí drátku. Takto připravený vzorek byl vložen do vialky naplněné tekutým dusíkem. Vialka byla vždy nejdříve řádně vychlazená pomocí kapalného dusíku, jinak by docházelo k tvorbě bublin, díky nimž vzniká nežádoucí šum v emisních spektrech. Kapalný dusík byl ve vialce pravidelně vyměňován, jinak by docházelo k tvorbě ledových krystalků, které opět nepříznivě ovlivňují výsledky měření. Měření proběhlo při následujícím nastavení spektrofluorometru: excitační vlnová délka 440 nm a emisní vlnová délka od 600–800 nm. Štěrbina na excitačním a emisním monochromátoru byla nastavena na 2,5 nm. Veškerá práce s rostlinnými vzorky byla provedena ve tmě pouze při tlumeném zeleném osvětlení.



### 3.2.5 Stanovení aktivity PSII metodou *in vivo* fluorescence chlorofylu

Pomocí PEA fluorometru (Hansatech) byl změřen maximální kvantový výtěžek fotosystému II ( $F_v/F_m$ ) u rostlin kontrolních i ošetřených diethyletherem. Pro měření byly napěstovány všechny varianty rostlin (kontrolní a ošetřené diethyletherem, osvětlené 6; 24 a 48 hodin i etiolované). Rostliny byly před samotným měřením vystaveny tmě po dobu 20 minut pro reoxidaci plastochinonu. Následně byly na každý list připevněny svorky a bylo provedeno měření se sedmi opakováními pro každou variantu vzorků. Saturační záblesk světla byl nastaven na  $24000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$  s časem měření 3 sekundy. Pomocí programu Biolyzer.V.1.800 byla získaná data z fluorometru exportována do počítače a zpracována pomocí Excelu.

Při změření minimální fluorescence ( $F_0$ ) a maximální fluorescence ( $F_m$ ) ve vzorku, který byl adaptován na tmu, lze vypočítat poměr  $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$  ( $F_v$  je variabilní fluorescence ( $F_m - F_0$ )). Tento poměr vyjadřuje maximální kvantový výtěžek fotochemických reakcí ve fotosystému II (PSII) a charakterizuje míru funkčnosti PSII, tedy míru využití světla na fotochemické reakce. Ideální hodnota tohoto poměru je 0,83, pokud je ovšem rostlina vystavena stresovým faktorům, hodnota maximálního kvantového výtěžku se snižuje, což značí poškození PSII. Tento parametr je hojně využíván při studiu změn fotosyntézy při stresu rostlin, funguje také jako citlivý nástroj pro detekci vývinu fotosyntetického aparátu v průběhu deetiologizace. Pomocí fluorometru PEA byl detekován OJIP průběh fluorescence, kde fáze O odpovídá  $F_0$  a fáze P odpovídá  $F_m$  (Kalaji *et al.*, 2014). Na závěr byly výsledky vyhodnoceny dvouvýběrovým Studentovým *t*-testem.

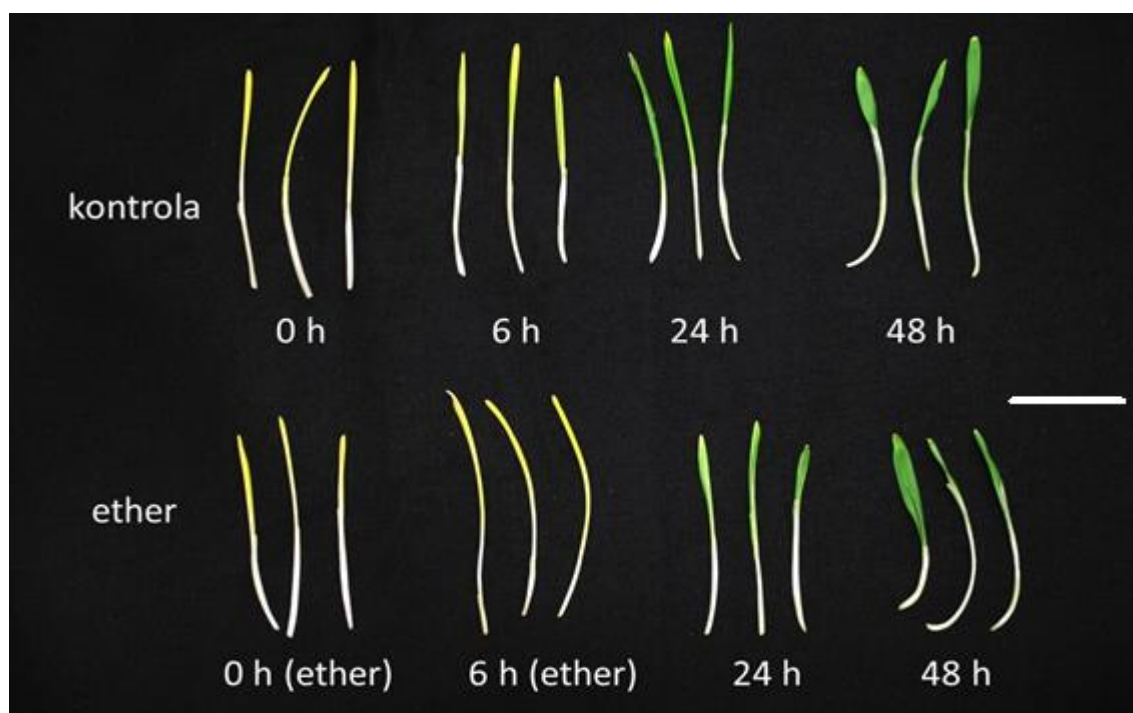
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1.1 Kultivace rostlin

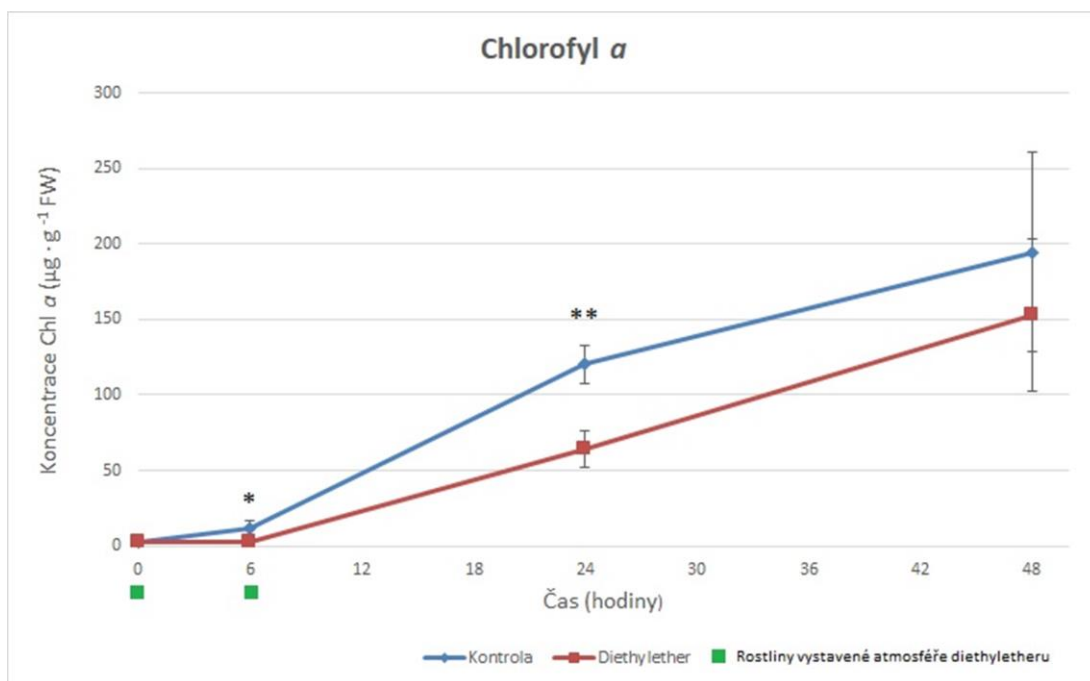
Experiment byl zahájen výsevem semen ječmene (*Hordeum vulgare* cv. *Bojos* L.), k analýze koncentrace chlorofylu *a* a *b*, karotenoidů, protochlorofylidu a proteinů. Pro analýzu Western blot byly použity vzorky zmražené v kapalném dusíku, kdežto pro analýzu nízkoteplotní fluorescence a fluorescence *in vivo* byly použity čerstvé vzorky. Vliv diethyletheru na biosyntézu chlorofylu byl zřejmý již při kultivaci rostlin, ošetření diethyletherem a jejich následném vystavení světlu. Kontrolní rostliny byly více zelené než rostliny ošetřené diethyletherem. Největší rozdíl v barvě rostlin byl pozorován v čase osvětlení 6 hodin, což je dokumentováno na Obr. 4. S narůstajícím časem od přenesení rostlin na světlo a odstranění diethyletheru se rozdíly v barvě postupně vyrovnávaly.

### 4.1.2 Stanovení koncentrace chlorofylu *a* a *b* a karotenoidů

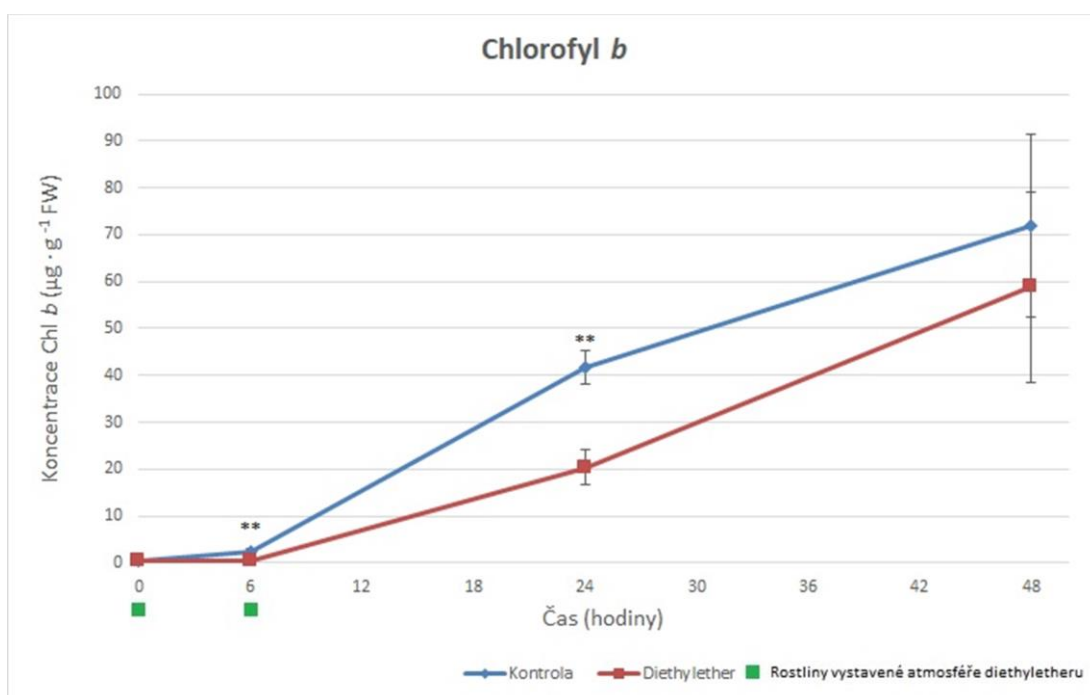
Při stanovení koncentrace chlorofylu *a* a *b* a karotenoidů bylo zjištěno, že v časovém intervalu osvětlení 6 hodin je koncentrace chlorofylu u rostlin po aplikaci diethyletheru na úrovni 23 % hodnoty koncentrace kontrolních rostlin vystavených osvětlení po stejnou



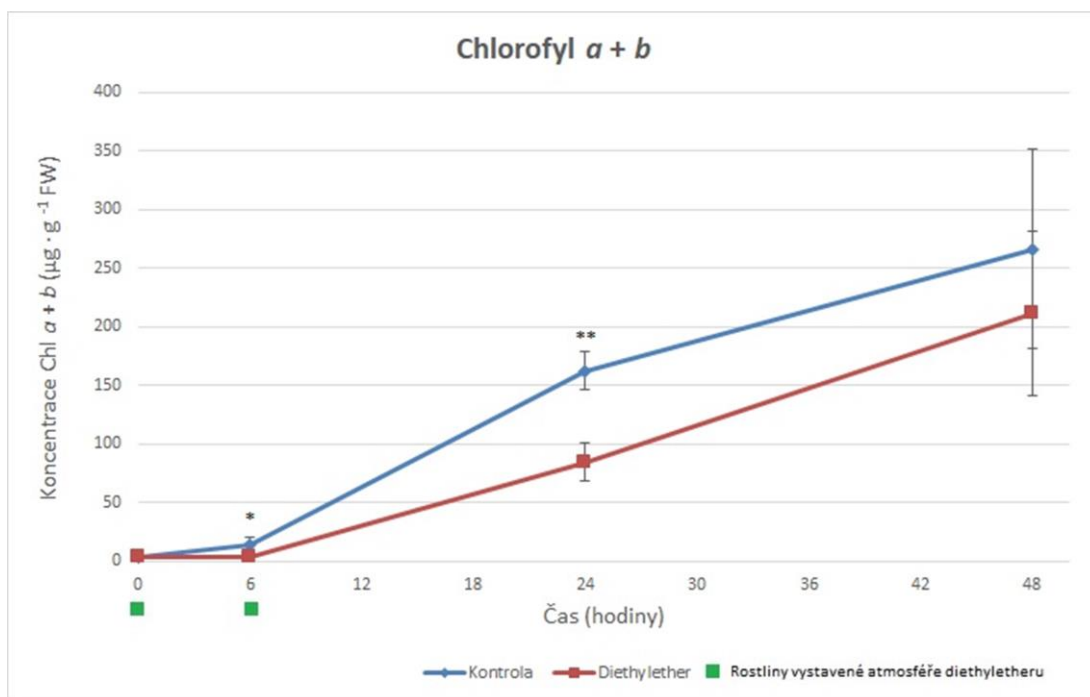
Obr. 4 Snímek zachycující klíčence ječmene v jednotlivých fázích experimentu. Měrka představuje 4 cm.



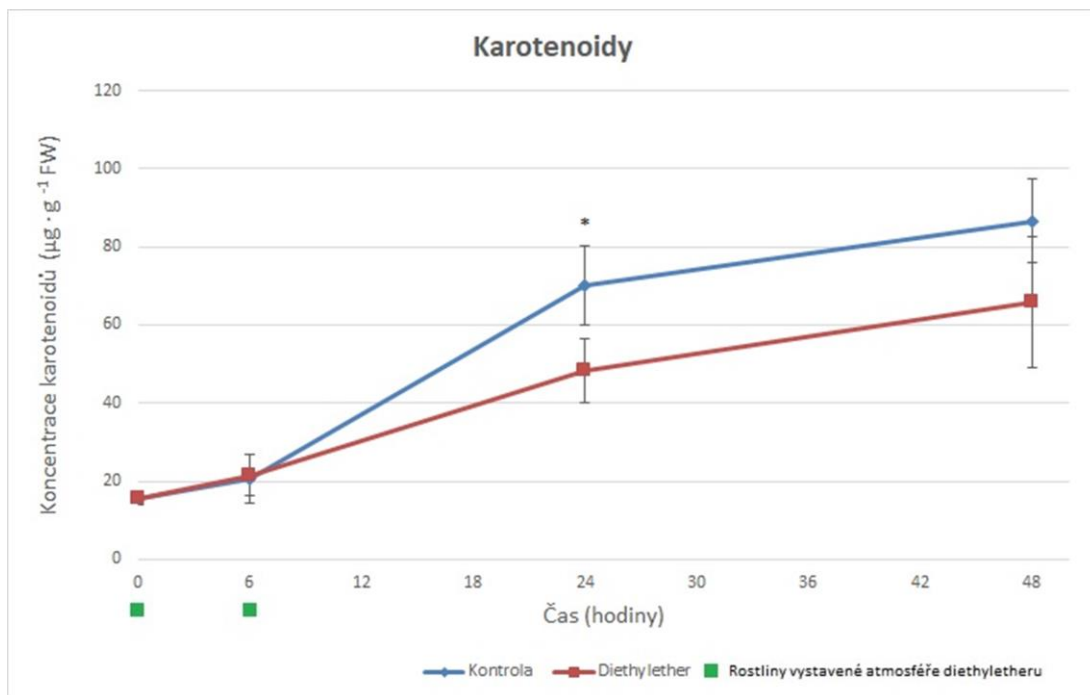
Obr. 5 Graf závislosti koncentrace chlorofylu *a* na čase, po který byly rostliny vystaveny osvětlení  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PAR. Srovnání koncentrace chlorofylu *a* u vzorků z rostlin ošetřených diethyletherem se vzorky z rostlin kontrolních. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Studentovým *t*-testem,  $n = 3$ . \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ .



Obr. 6 Graf závislosti koncentrace chlorofylu *b* na čase, po který byly rostliny vystaveny osvětlení  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PAR. Srovnání koncentrace chlorofylu *b* u vzorků z rostlin ošetřených diethyletherem se vzorky z rostlin kontrolních. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Studentovým *t*-testem,  $n = 3$ . \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ .



Obr. 7 Graf závislosti koncentrace chlorofylu *a* a *b* na čase, po který byly rostliny vystaveny osvětlení  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PAR. Srovnání koncentrace chlorofylu *a* a *b* u vzorků z rostlin ošetřených diethyletherem se vzorky z rostlin kontrolních. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Studentovým *t*-testem,  $n = 3$ . \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ .



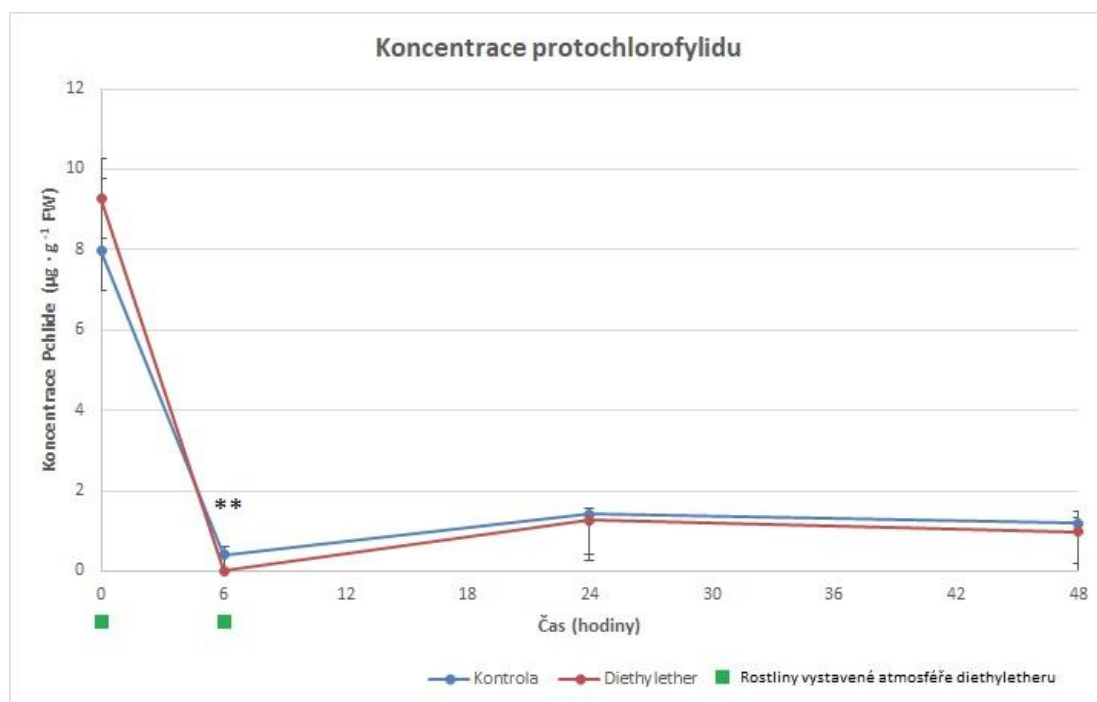
Obr. 8 Graf závislosti koncentrace karotenoidů na čase, po který byly rostliny vystaveny osvětlení  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PAR. Srovnání koncentrace karotenoidů u vzorků z rostlin ošetřených diethyletherem se vzorky z rostlin kontrolních. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Studentovým *t*-testem,  $n = 3$ . \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ .

dobu, tedy 6 hodin. V případě vzorků odebraných po 24 hodinách osvětlení dosahovala koncentrace chlorofylu *a* i *b* u diethyletherových rostlin 50 % z hodnoty koncentrace kontrolních rostlin. Po 48 hodinách byla koncentrace u diethyletherových vzorků pouze o 20 % nižší než u vzorků pocházejících z rostlin kontrolních, což dokumentuje Obr. 5, 6 a 7. V případě karotenoidů po 6 hodinách expozice světlu se koncentrace u diethyletherových a kontrolních rostlin výrazně nelišila, po 24 hodinách koncentrace karotenoidů ve vzorcích z diethyletherových rostlin dosahovala 69 % z hodnoty koncentrace kontrolních rostlin. Po 48 hodinách už koncentrace karotenoidů dosahovala 76 % hodnoty koncentrace kontrolních rostlin, jak lze vidět na Obr. 8. Se zvyšujícím se časem od expozice rostlin v atmosféře s diethyletherem (tedy vzorky 24 a 48 h) dochází k návratu rostlin z anestezie, s tím je také spojena tvorba fotosyntetického aparátu a následná syntéza tetrapyrrolových barviv a karotenoidů.

#### **4.1.3 Stanovení koncentrace protochlorofylidu a jeho detekce**

Při stanovení koncentrace Pchl<sub>ide</sub> byl pozorován opačný trend než u stanovení koncentrace chlorofylu *a* a *b*, tedy že koncentrace Pchl<sub>ide</sub> se s narůstajícím časem osvětlení nezvyšovala. Nejvyšší množství Pchl<sub>ide</sub> bylo detekováno v čase 0 hodin, po 6 hodinách byla naopak zaznamenána nejnižší koncentrace, jak lze vidět na Obr. 9. V čase 24 hodin bylo množství Pchl<sub>ide</sub> u kontrolních i diethyletherových vzorků vyšší než v čase 6 hodin. To souvisí s nastartováním biosyntézy chlorofylu. V čase 48 hodin se množství Pchl<sub>ide</sub> výrazně nezměnilo. Koncentrace Pchl<sub>ide</sub> se výrazně liší od koncentrací zjištěných u chlorofylů, které se pohybovaly zejména v rámci desítek až stovek  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  FW, kdežto koncentrace Pchl<sub>ide</sub> se pohybovala v rámci jednotek  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  FW. Při srovnání koncentrace Pchl<sub>ide</sub> v kontrolních vzorcích a ve vzorcích z rostlin ošetřených diethyletherem nebyly shledány významné rozdíly.

Enzym POR je nezbytný pro přeměnu protochlorofylidu na chlorofylid. Ke své funkci vyžaduje také přítomnost NADPH a fotonu. Existují dva typy POR u krytosemenných rostlin, PORA a PORB, jejich přítomnost byla prokázána u *Arabidopsis thaliana* i *Hordeum vulgare*. V případě *Hordeum vulgare* je PORA negativně regulován světlem, kdežto PORB je exprimován konstitutivně (Armstrong *et al.*, 1995; Holtorf *et al.*, 1995). mRNA obou typů POR se tvoří v etiolovaných rostlinách, ovšem po expozici světlu mRNA PORA rychle mizí, kdežto mRNA PORB se stále aktivně akumuluje (Masuda, 2008). PORA a PORB plní svou funkci společně během časných stádií zelenání



Obr. 9 Graf závislosti koncentrace protochlorofylidu na čase, po který byly rostliny vystaveny osvětlení  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PAR. Srovnání koncentrace protochlorofylidu u vzorků z rostlin ošetřených diethyletherem se vzorky z rostlin kontrolních. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Studentovým  $t$ -testem,  $n = 4$ . \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ .

a diferenciaci chloroplastů, kdežto udržování biosyntézy Chl u starších rostlin má pod kontrolou samotný PORB (Armstrong *et al.*, 1995).

#### 4.1.4 Analýza proteinů metodou Western blotting

Metodou Western blot byla stanovena přítomnost důležitých proteinů souvisejících s biosyntézou chlorofylu a fotosyntézou, konkrétně se jednalo o proteiny D1, D2, CP43, CP47, PsbO, Lhcb2, Lhcb3, Lhcb4, Lhcb5, GluTR, RbcL, aktin, PsaA, PsaB, Lhca1, Lhca2, Lhca3, Lhca4, PORA a PORB. Byl zkoumán vliv diethyletheru na přítomnost těchto proteinů ve vzorcích pocházejících z rostlin ošetřených diethyletherem. Při porovnání kontrolních vzorků a vzorků ošetřených diethyletherem byly pozorovány největší rozdíly u vzorků po expozici světlu po dobu 6 hodin, se zvyšujícím se časem se rozdíly mezi kontrolou a vzorky vystavenými diethyletheru snižovaly. Lze říci, že u každého stanovovaného proteinu bylo pozorováno, že proteiny ze vzorků odebraných z diethyletherových rostlin měly menší abundanci (případně nebyly detekované vůbec v čase 6 hodin) ve srovnání s kontrolními vzorky v každém časovém úseku, kdy byl proveden odběr.

CP47 a CP43 jsou jádrové antény vyskytující se u rostlin, řas a sinic. Obě jsou kódovány chloroplastovým genomem a jejich funkcí je vázat chlorofyly a karotenoidy v reakčním centru fotosystému II. Oba tyto proteiny jsou pozitivně regulované světlem (Kanervo *et al.*, 2008), což znamená, že s delší expozicí rostlin světlu se jejich množství zvyšuje (Obr.10).

Protein PsbO je jedním ze čtyř proteinů, které společně u rostlin tvoří kyslík vyvíjející komplex. V tomto případě byl jeho výskyt u diethyletherových rostlin výrazně vyšší, než u rostlin kontrolních, jak dokumentuje Obr. 10. PsbO protein se v nižší hladině exprimuje i ve tmě (Kanervo *et al.*, 2008).

Další dvojici proteinů, na kterou byla zaměřena pozornost, jsou D1 a D2 proteiny. Ty tvoří dimer reakčního centra PSII, na něj jsou vázány redoxní faktory, mezi něž patří také chlorofyl P680 (Nanba a Satoh, 1989). U proteinu D1 bylo možné vidět velký rozdíl v abundanci v čase 6 hodin u diethyletherových a kontrolních rostlin (Obr. 10). Oba jsou pozitivně regulovány světlem (Kanervo *et al.*, 2008).

Lhcb2, Lhcb3, Lhcb4 a Lhcb5 jsou proteiny, které jsou součástí světlosběrného komplexu II (LHCII). Opět se jedná o pozitivně fotoregulované proteiny (Kanervo *et al.*, 2008), největší rozdíl mezi diethyletherovými vzorky a kontrolními lze pozorovat v případě Lhcb2 (Obr. 10).

Glutamyl-tRNA reduktasa (GluTR) je klíčovým enzymem v biosyntéze tetrapyrrolů, stejně jako předešlé proteiny je pozitivně fotoregulován. Exprimuje se i ve tmě, ovšem v nižším množství (McCormac *et al.*, 2001) (Obr. 10).

Dále byla použita protilátka proti ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylase/oxygenase (RbcL), což je enzym zapojený do hlavního kroku fixace uhlíku, tedy do procesu, kdy je oxid uhličitý přeměněn na energeticky bohaté molekuly (Obr. 10). Exprimuje se na světle i ve tmě, na světle však větší intenzitou (Kanervo *et al.*, 2008).

Protilátka proti aktinu značí strukturální protein nacházející se v buňkách, jehož polymerizací vznikají mikrofilamenta, která jsou součástí cytoskeletu buněk. Aktin není závislý na světle a jeho přítomnost byla prokázána ve všech vzorcích podle očekávání (Obr. 10).

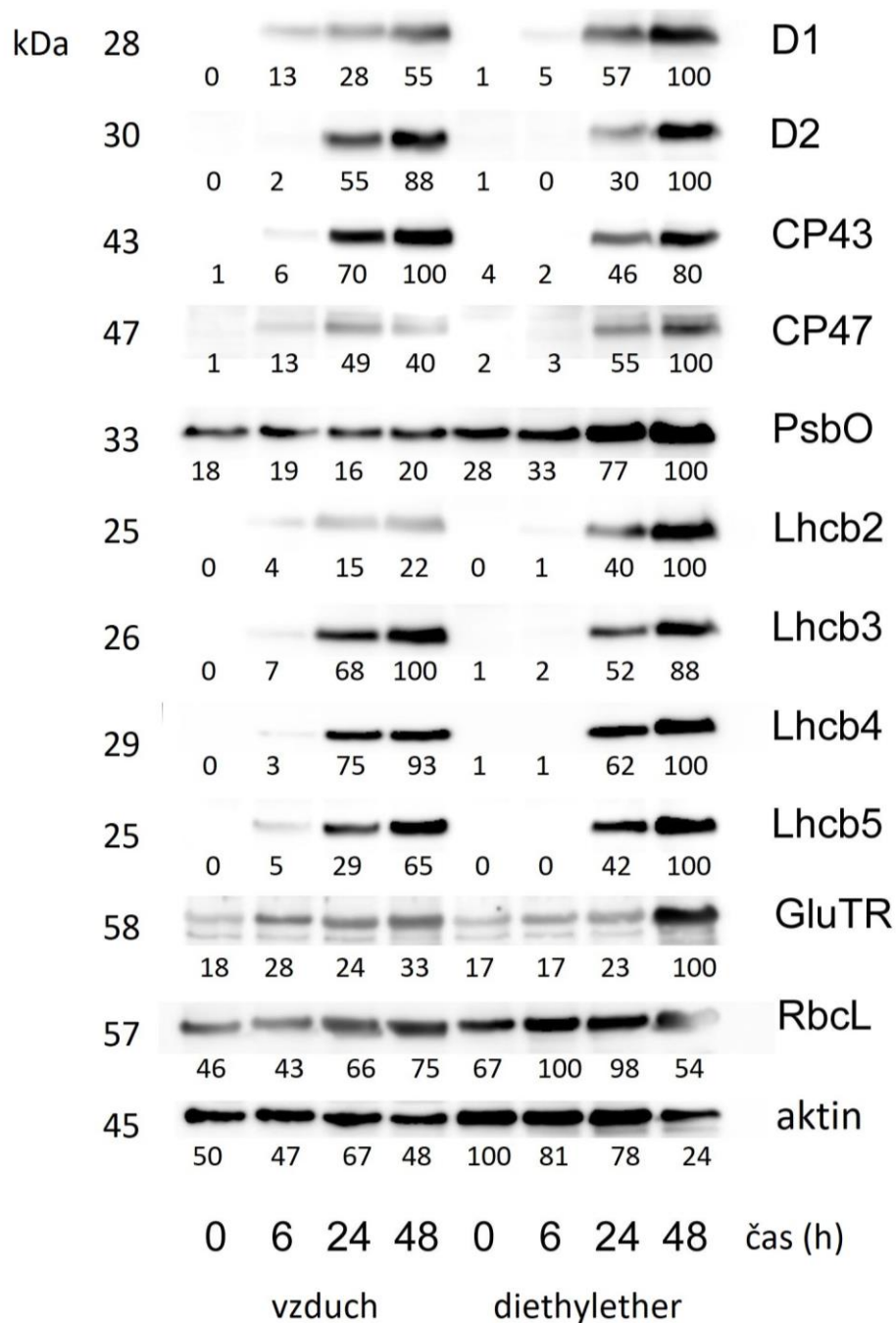
PsaA a PsaB jsou proteiny, které tvoří reakční centrum fotosystému I (PSI), bylo potvrzeno, že u kontrolních vzorků byla jejich přítomnost vyšší než v případě diethyletherových vzorků (Obr. 11). Proteiny PsaA a PsaB pozitivně fotoregulované

(Kanervo *et al.*, 2008), i po 48 hodinách nedošlo k úplnému vyrovnání množství těchto proteinů u diethyletherových a kontrolních rostlin (Obr. 11).

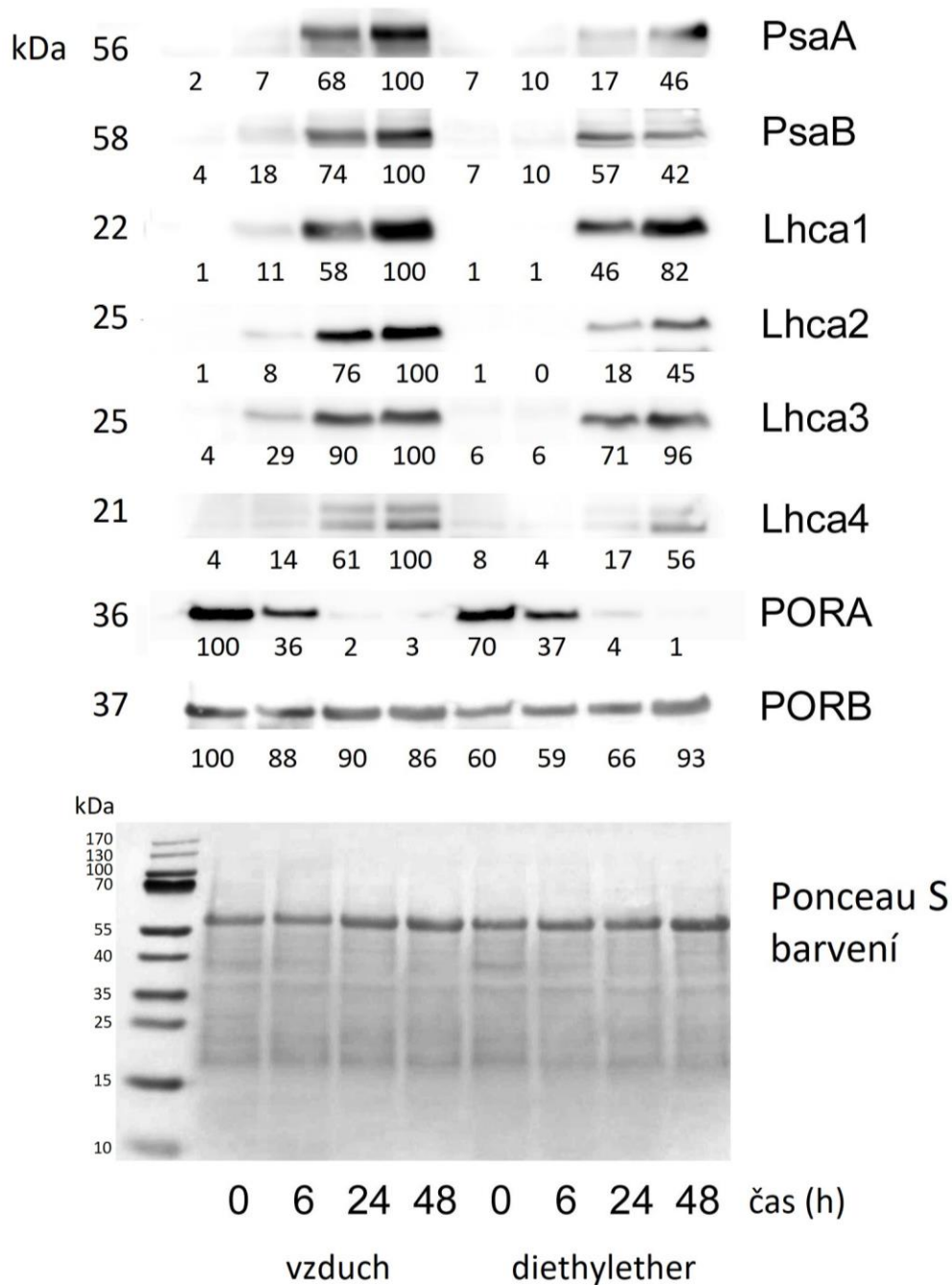
V případě LHCI se jedná o přídatnou integrální anténu sestávající ze čtyř proteinů, které jsou kódovány jádrovým genomem, konkrétně se jedná o proteiny kódované geny *lhca1*, *lhca2*, *lhca3* a *lhca4*, kdy proteiny Lhca1 s Lhca4 vytváří heterodimer a proteiny Lhca2 a Lhca3 spolu vytváří heterodimer nebo homodimer. Dohromady vytváří přídatnou integrální anténu. Tyto proteiny jsou také pozitivně fotoregulované, jak vidíme na Obr. 11.

Posledními proteiny, které byly v rámci této práce detekovány metodou Western blot, jsou PORA a PORB. Jedná se o dva isoenzymy, které katalyzují na světle závislý krok biosyntézy chlorofylu u vyšších rostlin. Bylo prokázáno, že PORB není citlivý na světlo, jeho množství zůstávalo konstantní při přenesení rostlin z tmy na světlo, kdežto PORA je negativně fotoregulován, (Holtorf *et al.*, 1995) bez ohledu na přítomnost diethyletheru, jak lze vidět na Obr. 11.





Obr. 10 Ověření přítomnosti důležitých proteinů souvisejících s fotosyntézou pomocí metody Western blot v různých časových úsecích, v nichž byl odebrán rostlinný materiál. Byl zkoumán efekt přítomnosti nebo nepřítomnosti diethyletheru (0 a 6 hodin) a jeho odstranění (24 a 48 hodin) na abundanci jednotlivých proteinů. Molekulová hmotnost je uváděna v kDa v levém sloupci. Kvantifikace byla provedena pomocí Amersham Imager 600 a relativní abundanci proteinu značí hodnoty nacházející se pod jednotlivými imunobloty.

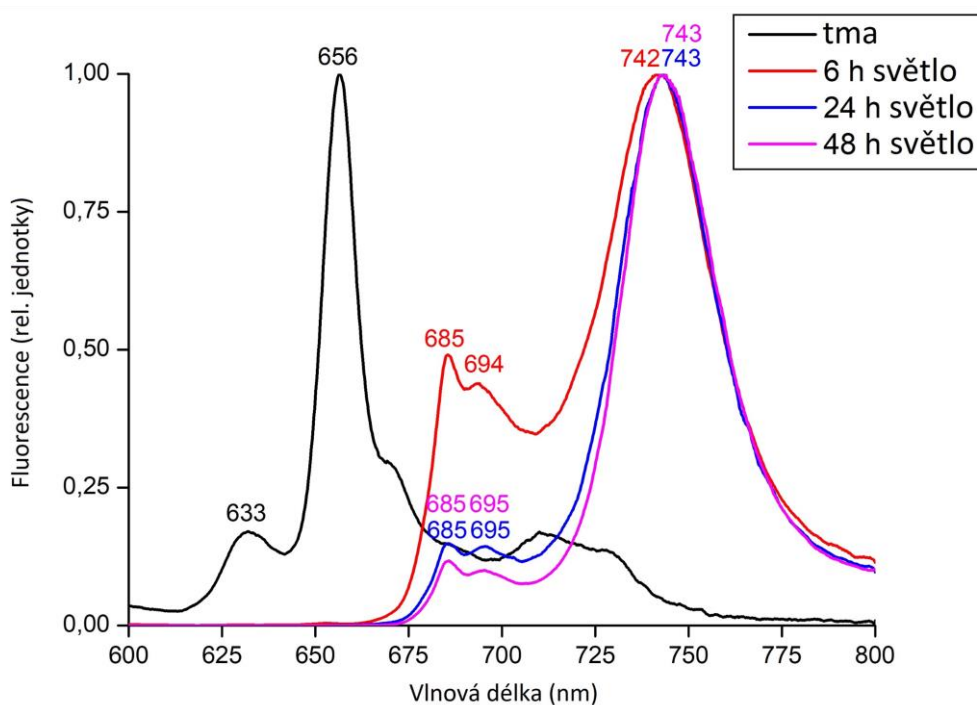


Obr. 11 Ověření přítomnosti důležitých proteinů souvisejících s fotosyntézou pomocí metody Western blot v různých časových úsecích, v nichž byl odebrán rostlinný materiál. Byl zkoumán efekt přítomnosti nebo nepřítomnosti diethyletheru (0 a 6 hodin) a jeho odstranění (24 a 48 hodin) na abundanci jednotlivých proteinů. Molekulová hmotnost je uváděna v kDa v levém sloupci. Kvantifikace byla provedena pomocí Amersham Imager 600 a relativní abundanci proteinu značí hodnoty nacházející se pod jednotlivými imunoblody. Na spodní části obrázku se nachází snímek nitrocelulosové membrány s přenesenými proteiny, která byla obarvena pomocí Ponceau S.

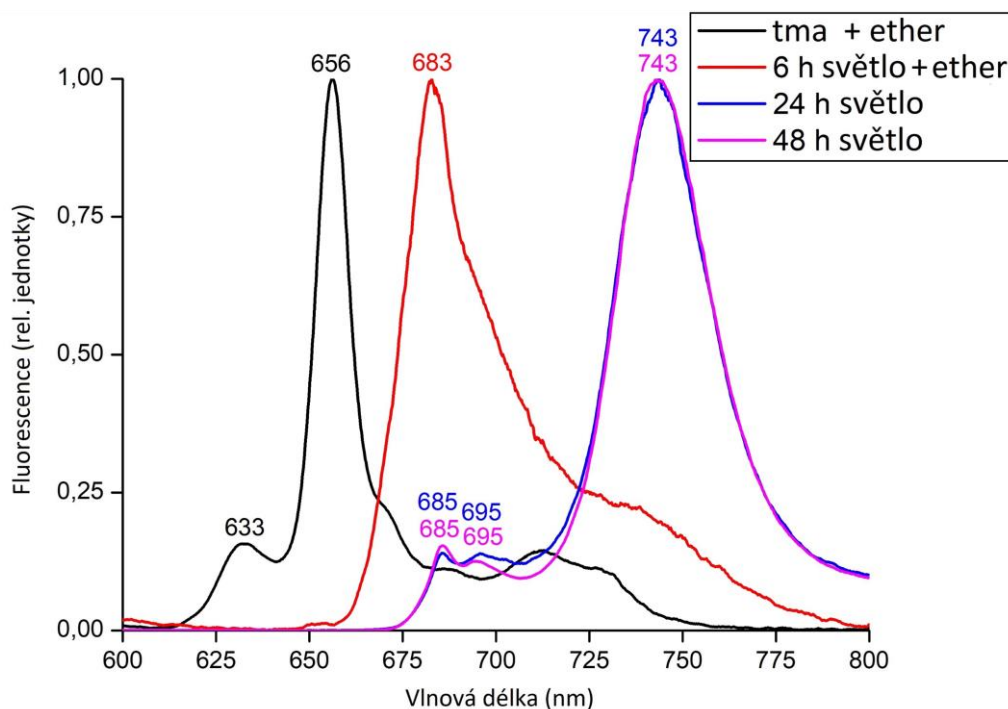
#### 4.1.5 Nízkoteplotní fluorescence (77 K)

Při měření nízkoteplotní fluorescence (77 K) byly měřeny vzorky kontrolní a ošetřené diethyletherem stejně jako u předešlých metod, a navíc byly pro analýzu použity také vzorky osvětlené pouze po dobu 5 minut, které byly následně vystaveny tmě po dobu 2; 10 a 20 minut (pro měření Shibata shiftu). V prvním případě se u vzorků, které nebyly vůbec osvětleny, nachází fluorescenční maxima (633; 656 nm), které představují volný protochlorofylid a vázaný protochlorofylid v prolamelárním tělísku. U kontrolních vzorků osvětlených po dobu 6 h pak lze pozorovat maxima (685; 694 nm) představující jádrové antény PSII CP43 a CP47 a maximum při 742 nm, které značí přítomnost PSI (Obr. 12), kdežto u vzorků ošetřených diethyletherem a osvětlených po dobu 6 h, pozorujeme maximum při 683 nm představující navázaný chlorofylid/chlorofyl na neznámý protein (pravděpodobně LHCII anténu) (Obr. 13), přičemž jádro fotosystému se neformuje (absence emise při 685 a 694 nm). Při delším osvětlení (24 a 48 h) jsou křivky pro kontrolu i pro vzorky ošetřené diethyletherem velmi podobné, což dokumentuje návrat z anestezie (Obr. 12 a 14). V druhém případě, kdy byly vzorky osvětleny pouze 5 minut a následně umístěny do tmy po dobu 2; 10 a 20 minut, lze pozorovat tzv. Shibata shift (Obr. 14 a 16). Už pouhé 5 minutové osvětlení bylo dostatečné na kompletní redukci vázaného Pchlidle v POR u obou variant pokusu. Následně, čím delší dobu jsou osvětlené vzorky vystaveny tmě, tím více se maxima posouvají k nižším hodnotám vlnových délek. Spektra jsou i v tomto případě pro kontrolní vzorky i vzorky ošetřené diethyletherem shodná, což značí, že diethylether neinhibuje fotochemické reakce redukce protochlorofylidu, čímž lze vysvětlit přítomnost chlorofylu ve vzorcích pod anestezii, ačkoliv ve výrazně nižším množství (Obr. 5-7).

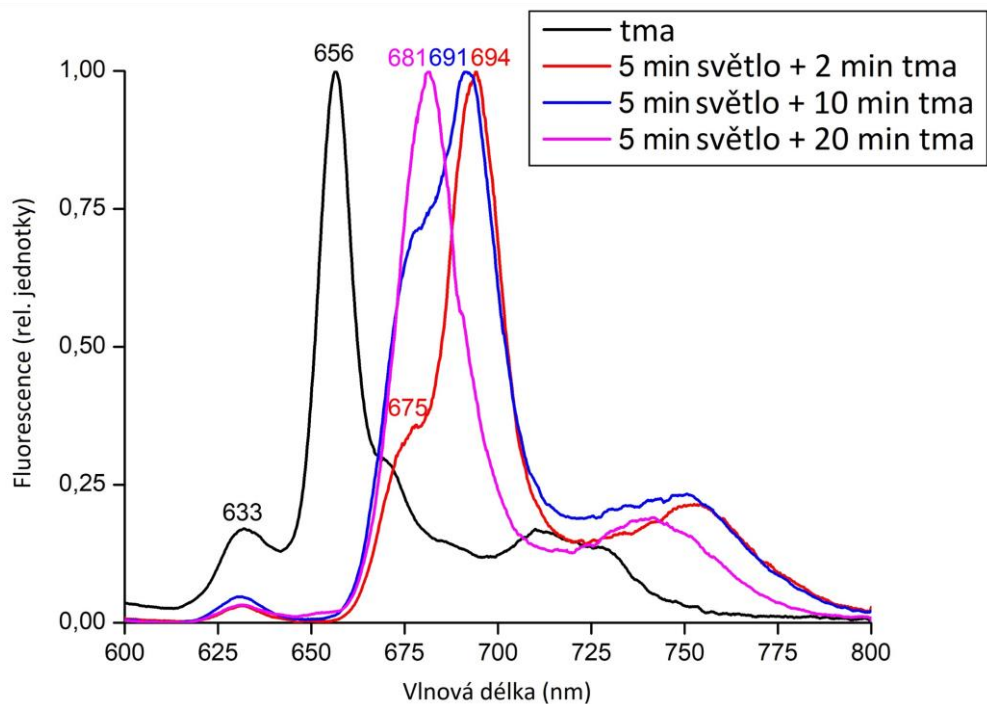
Jak bylo dříve zmíněno, k přeměně protochlorofylidu na chlorofylid je potřebný enzym NADPH-protochlorofylid oxidoreduktasa (POR) za přítomnosti NADPH a fotonu. Jako fotoaktivní Pchlidle je označován ternární komplex Pchlidle-NADPH-POR, který umožňuje přeměnu Pchlidle na Chlide při krátkém osvětlení v rozmezí 1–5 ms. Naopak jako fotoinaktivní Pchlidle je označován Pchlidle, který není rychle přeměněn na Chlide. Jedná se zejména o směs komplexů POR-Pchlidle-NADP<sup>+</sup>, Pchlidle a protochlorofylu. Po osvětlení je při fluorescenčním maximu 675 nm detekován spektrální shift, který odpovídá uvolněnému Chlide z aktivního místa POR. Fluorescenční maximum při 694 nm představuje komplex Chlide, NADPH a POR.



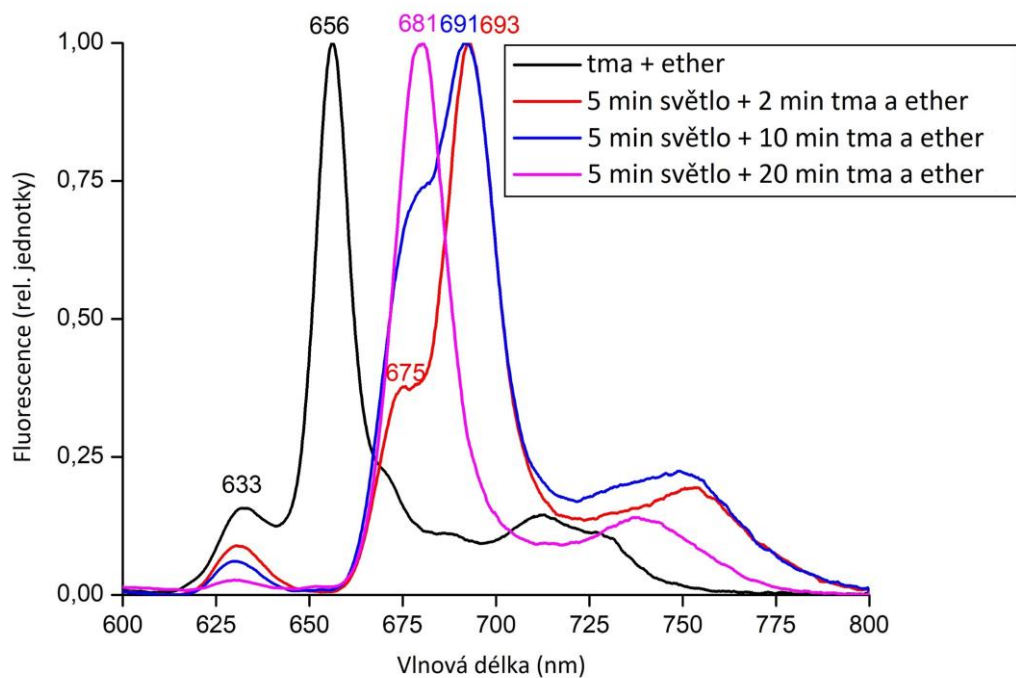
Obr. 12 Emisní fluorescenční spektrum. Jedná se o kontrolní vzorky (nadzemní část) vystavené tmě a následně osvětlené, jak je uvedeno v rámečku v pravém horním rohu. Byl sledován vliv délky osvětlení na přeměnu Pchlíde na Chlídě pomocí enzymu POR.



Obr. 13 Emisní fluorescenční spektrum. Jedná se o vzorky (nadzemní část), jež byly vystaveny diethyletheru a tmě, následně byly osvětlené, jak je uvedeno v rámečku v pravém horním rohu. Byl sledován vliv diethyletheru a délky osvětlení na přeměnu Pchlíde na Chlídě pomocí enzymu POR. Rozdíl oproti kontrolním vzorkům lze pozorovat zejména v čase 6 hodin.



Obr. 14 Emisní fluorescenční spektrum. Jedná se o kontrolní vzorky (nadzemní část) vystavené tmě a následně osvětlené na 5 minut, přičemž vzorky poté byly opět vystaveny tmě, jak je uvedeno v rámečku v pravém horním rohu. Sledován byl vliv délky opětovného vystavení rostlin tmě na uvolnění Chl<sub>a</sub> z ternárního komplexu.



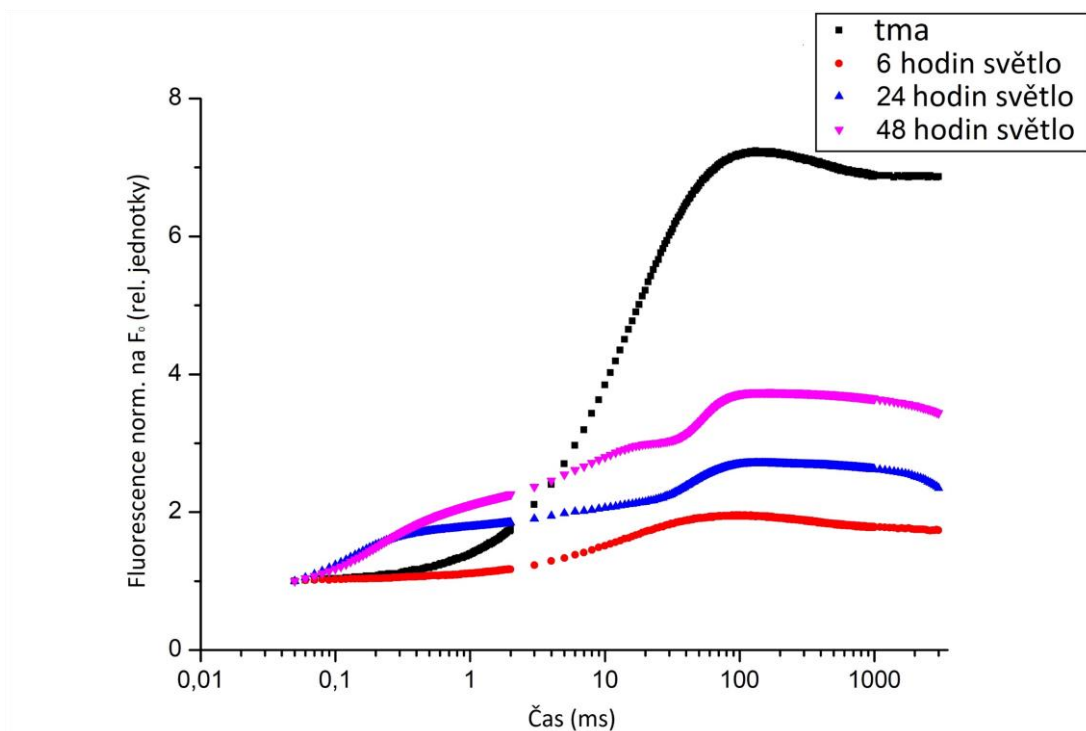
Obr. 15 Emisní fluorescenční spektrum. Jedná se o vzorky (nadzemní část) vystavené diethyletheru a tmě a následně osvětlené na 5 minut, přičemž vzorky poté byly opět vystaveny tmě, jak je uvedeno v rámečku v pravém horním rohu. Sledován byl vliv délky opětovného vystavení rostlin tmě na uvolnění Chl<sub>a</sub> z ternárního komplexu.

Fluorescenční maximum při 681 nm, označované jako Shibata shift, odpovídá rozrušení komplexu vzniklým mezi Chlide a POR, dochází k uvolnění Chlide z aktivního místa enzymu POR (Schoefs a Bertrand, 1997).

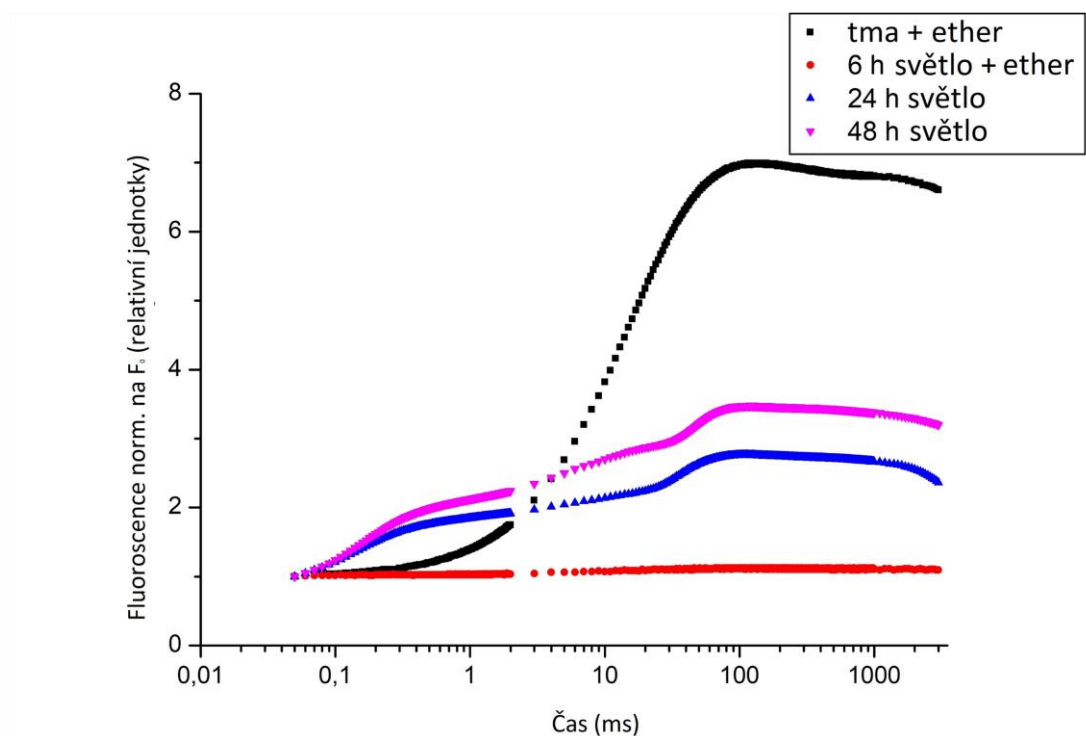
#### **4.1.6 Stanovení aktivity PSII metodou *in vivo* fluorescence chlorofylu**

Pro stanovení aktivity fotosystému II byl změřen maximální kvantový výtěžek PSII. Při porovnání křivek je největší rozdíl vidět opět v případě osvětlení po dobu 6 h, kdy u vzorku ošetřeném diethyletherem nevykazuje křivka typický OJIP průběh, jak lze vidět na Obr. 16 a 17. V případě osvětlení po dobu 24 a 48 hodin byla fluorescenční kinetika u kontrolních vzorků téměř shodná se vzorky diethyletherovými. Při měření vzorků, které nebyly vůbec vystaveny světlu, byly získány křivky, které také nemají OJIP průběh, ovšem důvod této skutečnosti je rozdílný. Jelikož aktivační světlo způsobilo konverzi protochlorofylidu na chlorofylid, nejedná se v tomto případě o sledování aktivity PSII, ale o změnu absorpčních a fluorescenčních vlastností molekul (molární extinkční koeficient a kvantový výtěžek fluorescence u Pchlide nižší).

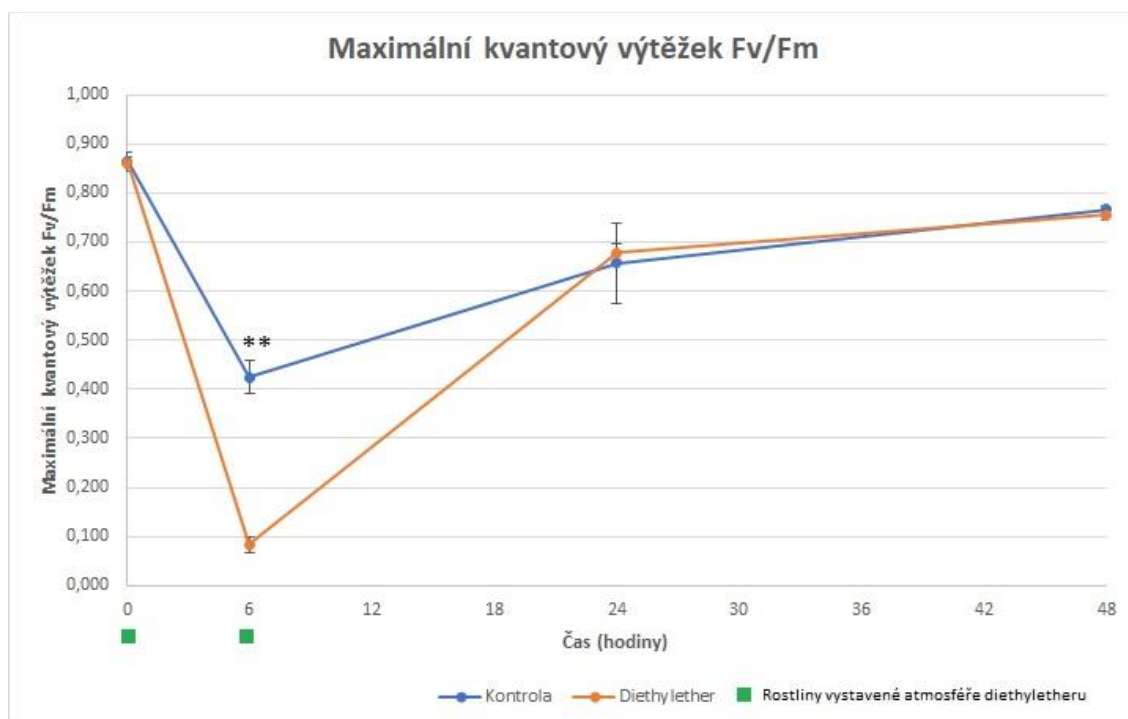
Při porovnání hodnot maximálního kvantového výtěžku u kontrolních rostlin a u rostlin diethyletherových bylo zjištěno, že nejvyšší rozdíl mezi hodnotami je v čase 6 hodin, kdy v případě diethyletherových rostlin dosahuje hodnota maximálního kvantového výtěžku pouze 0,084, kdežto u rostlin kontrolních je to hodnota výrazně vyšší, konkrétně 0,425. Jedná se o důkaz, že přenesení etiolovaných rostlin na světlo indukuje tvorbu funkčního fotosyntetického aparátu, především u rostlin nevystavených diethyletheru. Hodnoty v časech 0; 24 a 48 hodin nejsou mezi kontrolními a diethyletherovými rostlinami výrazně odlišné, což lze vidět na Obr. 18.



Obr. 16 OJIP křivka pro vzorky (nadzemní část) pocházející z kontrolních rostlin zobrazená na logaritmické časové stupnici. Zkoumán byl vliv doby osvětlení rostlin, které byly týden kultivovány ve tmě a následně osvětleny, jak je uvedeno v tabulce v pravém horním rohu.



Obr. 17 OJIP křivka pro vzorky (nadzemní část) pocházející z rostlin ošetřených diethyletherem zobrazená na logaritmické časové stupnici. Zkoumán byl vliv doby osvětlení rostlin, které byly týden kultivovány ve tmě, následně vystaveny diethyletheru a osvětleny, jak je uvedeno v tabulce v pravém horním rohu.



Obr. 18 Graf znázorňuje hodnoty maximálního kvantového výtěžku u kontrolních rostlin a rostlin ošetřených diethyletherem v čase 0; 6; 24 a 48 hodin. Hodnoty nižší než 0,83 značí nekompletní zotavení PSII. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Studentovým *t*-testem,  $n = 7$ . \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ .



Z výše prezentovaných výsledků vyplývá, že hypotéza o inhibici zelenání rostlin způsobené aplikací diethyletheru byla potvrzena. Jelikož proces budování fotosyntetického aparátu je velice komplexní, nabízí se hned několik možných hypotéz, kde může všeobecné anestetikum diethylether působit. Po osvětlení etiolovaných rostlin se indukuje transkripce genů, kódujících pigment-proteinové komplexy a enzymy biosyntetické dráhy chlorofylů. Světlo redukuje Pchl<sub>id</sub> na Chl<sub>id</sub> a vznikající chlorofyly jsou nutné na stabilizaci translatovaných pigment-proteinových komplexů v thylakoidních membránách. Na to vše je potřebný vtok Ca<sup>2+</sup> do buňky řízený fytochromem (Spalding, 2000). Diethylether proto může působit v kterémkoliv bodu této kaskády, případně může inhibovat i vícero procesů.

Jednou z možných příčin inhibice deetioloizace může být inhibice migrace fytochromu do jádra. Fytochrom je složen ze dvou domén, k NH<sub>2</sub>-terminální části se připojuje chromofor, díky němuž fytochrom získává charakteristické spektrální vlastnosti. COOH-terminální část se podílí na dimerizaci molekuly a také na přenosu signálu. (Quail, 1997). Fytochrom A a B se za účelem zprostředkování světelných reakcí přemísťují do jádra (Sakamoto a Nagatani, 1996), kde mohou iniciovat transkripci na světle závislých genů (Yamaguchi *et al.*, 1999). Jestliže je tento proces inhibován, nedochází k transkripci příslušných genů. Jelikož lipofilní anestetika mohou ovlivňovat vlastnosti membrán (včetně jaderné), může to být místo působení anestetika.

Dalším možným vysvětlením je, že diethylether může mít také negativní účinky na tvorbu thylakoidních membrán chloroplastů kvůli jeho lipofilnímu charakteru. To může bránit stabilizaci pigment-proteinových komplexů v thylakoidních membránách. Výsledky Yokawa *et al.* (2018) naznačují, že anestetika jako diethylether výrazným způsobem narušují vezikulární transport, což může podporovat hypotézu o narušené tvorbě thylakoidních membrán. Anestetika také narušují mitochondriální funkce (Sanchez *et al.*, 2011; Boscolo *et al.*, 2012), které jsou na membránách závislé.

Další možnou příčinou je inhibice Ca<sup>2+</sup> signalizace. Jak už bylo zmíněno, u rostlin se vyskytují homology glutamátového receptoru (GLRs), které zabezpečují specifické fyziologické funkce, mezi něž se řadí přenos světelného signálu a tedy i fotomorfogeneze. (Lam *et al.*, 1998). S živočišnými ionotropními glutamátovými receptory sdílí homologní sekvence, dokonce i v místě, v němž dochází k vazbě ligandu. Po aplikaci látky 6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dionu (DNQX), což je antagonistu živočišných kainátových/AMPA ionotropních glutamátových receptorů, došlo u rostlin ke zhoršení

v transdukci světelného signálu, což bylo posuzováno podle dvou nezávislých kritérií. DNQX blokuje schopnost světla inhibovat prodloužení hypokotylu rostlin a indukovat syntézu chlorofylu u rostlin pěstovaných ve tmě a následně osvětlených, jak uvádí Lam *et al.* (1998). Z těchto poznatků je patrné, že zmíněné receptory jsou nezbytné pro správný přenos světelných signálů rostlinou, pokud dojde k inhibici těchto kanálů, dojde k narušení signálních drah.

Je známo, že červené světlo působící prostřednictvím fytochromu indukuje proud  $\text{Ca}^{2+}$  iontů skrze kanály do vnitřního prostředí buňky (Ermolayeva *et al.* 1996; Ermolayeva *et al.*, 1997; Spalding 2000), tedy fotokonverze Pr na Pfr formu fytochromu vede ke změně aktivity  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu (Shacklock *et al.*, 1992; Spalding 2000). Během několika sekund dochází k depolarizaci membrány a současně dochází ke zvyšování koncentrace těchto iontů v cytoplazmě buňky (Ermolayeva *et al.* 1996; Ermolayeva *et al.*, 1997; Spalding 2000). Mikroinjektáž  $\text{Ca}^{2+}$  do fytochrom deficientního hypokotylu rajčete mimikovala fytochromem indukované procesy (Neuhaus *et al.*, 1997). Diethylether tedy může způsobovat inhibici těchto kanálů a může tak docházet k přerušení signální dráhy.

To, že tomu tak opravdu může být, naznačují výsledky inhibice elektrických signálů anestetiky v rostlinách (Yokawa *et al.*, 2018; Pavlovič *et al.*, 2020). Rostliny mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*) byly kultivovány v atmosféře 15% diethyletheru a následně byly jejich senzoričké vlásky stimulovány každých 100 sekund. Při měření akčních potenciálů bylo zjištěno, že aplikace diethyletheru zcela utlumila akční potenciály v reakci na stimulaci senzoričkových vlásků. Jakmile byl diethylether odstraněn, amplituda akčních potenciálů se postupně začala obnovovat. Amplituda byla měřena každých 100 sekund a až po 900 sekundách se vrátila do normálního stavu, tedy stavu srovnatelného s kontrolou (Yokawa *et al.*, 2018).

Další výzkum v této oblasti je nezbytným krokem k pochopení, které mechanismy se při anestezii rostlin uplatňují, jelikož zde zůstává velké množství nezodpovězených otázek, pomoci mohou především analýza genové exprese metodou qPCR a imunolokalizační studie týkající se migrace fytochromu do jádra rostlinné buňky.

## 5 ZÁVĚR

V rámci této práce byla v teoretické části zpracována témata týkající se obecných informací o anestetických, akčních potenciálech u živočichů i rostlin a významných receptorech interagujících s diethyletherem, vyskytujících se jak u živočichů, tak i u rostlin. Na závěr této části byla popsána biosyntéza chlorofylu a karotenoidů.

Experimentální část se zabývá otázkou vlivu anestetika diethyletheru na fotomorfogenetické procesy u modelové rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*), zejména zda-li toto anestetikum inhibuje formování fotosyntetického aparátu. V první fázi experimentu byly napěstovány pokusné rostliny a spektrofotometricky byla stanovena koncentrace chlorofylu a protochlorofylidu. Již po vystavení rostlin diethyletheru byl pozorován rozdíl ve zbarvení klíčenců a to zejména v čase 6 hodin od počátku osvětlení, po 48 hodinách, kdy byl proveden poslední odběr vzorků, bylo možné pozorovat, že s narůstajícím časem po odstranění diethyletheru se rostliny z anestezie probraly. Ze zjištěných dat o koncentraci chlorofylu a jeho prekurzoru protochlorofylidu vyplývá, že se zvyšujícím se časem od expozice rostlin v atmosféře s diethyletherem dochází k postupnému návratu rostlin z anestezie, s tím je také spojena tvorba fotosyntetického aparátu a následná syntéza tetrapyrrolových barviv a karotenoidů.

Následně byly imunodetekovány důležité proteiny související s fotomorfogenézou rostlin pomocí SDS-PAGE a Western blottingu. Bylo zjištěno, že u rostlin ošetřených diethyletherem byl vždy daný protein méně abundantní než u rostlin kontrolních, což potvrzuje působení diethyletheru na rostlinu ječmene.

Dále byla stanovena aktivita fotosystému II metodou nízkoteplotní fluorescence a metodou *in vivo* fluorescence chlorofylu. Metodou nízkoteplotní fluorescence bylo potvrzeno, že diethylether neinhibuje biofyzikální reakce redukce protochlorofylidu na chlorofylid, ale spíše signální kaskádu zodpovědnou za akumulaci chlorofylu a budování fotosyntetického aparátu. Ze zjištěných dat z měření *in vivo* fluorescence chlorofylu se opět potvrdil inhibující efekt diethyletheru.

Anestezie rostlin není zcela dobře prozkoumanou oblastí, tudíž je nutné se zabývat dalším výzkumem v této oblasti, která by mohla přinést poznatky aplikovatelné i na anestezii živočichů, jejíž mechanismus není také zcela objasněn, ačkoliv je nedílnou součástí dnešní medicíny.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Andersen O.S., Koeppe R.E. (2007): Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **36**, 107-130.
- Armarego-Marriott T., Sandoval-Ibanez O., Kowalewska L. (2020): Beyond the darkness: recent lessons from etiolation and de-etiolation studies. *Journal of Experimental Botany* **71**, 1215-1225.
- Armstrong G.A., Runge S., Frick G., Sperling U., Apel K. (1995): Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: A branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **108**, 1505-1517.
- Auldridge M.E., McCarty D.R., Klee H.J. (2006): Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 315-321.
- Barnett M.W., Larkman P.M. (2007): The action potential. *Practical Neurology* **7**, 192-197.
- Bean B. P. (2007): The action potential in mammalian central neurons. *Nature reviews neuroscience* **8**, 451-465.
- Becker D., Geiger D., Dunkel M., Roller A., Bertl A., Latz A., Carpaneto A., Dietrich P., Roelfsema M.R.G., Voelker C., Schmidt D., Mueller-Roeber B., Czempinski K., Hedrich R. (2004): AtTPK4, an Arabidopsis tandem pore K<sup>+</sup> channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH and Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 15621-15626.
- Behcet A. (2014): The source-synthesis: history and use of atropine. *Journal of Academic Emergency Medicine* **13**, 2-3.
- Benveniste M., Mayer M.L. (1991): Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D- aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine. *Biophysical Journal* **59**, 560-573.
- Berg A.P., Talley E.M., Manger J.P., Bayliss D.A. (2004): Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *Journal Neuroscience*. **24**, 6693-6702.
- Bertaccini E.J., Trudell J.R., Franks N.P. (2007): The common chemical motifs within anesthetic binding sites. *Anesthesia and Analgesia* **104**, 318-324.
- Borisyuk A., Friedman A., Ermentrout B., Terman D. (2005): Introduction to Neurons. In: *Tutorials in Mathematical Biosciences I*. 1st ed., (Morel J.-M., Takens F., Teissier B. eds.), Springer, Berlin, Germany, 1-20.
- Boscolo A., Starr J.A., Sanchez V., Lunardi N., DiGrucchio M.R., Ori C., Erisir A., Trimmer P., Bennett J., Jevtovic-Todorovic V. (2012): The abolishment of anesthesia-induced cognitive impairment by timely protection of mitochondria in the developing rat brain: the importance of free oxygen radicals and mitochondrial integrity. *Neurobiology of Disease* **45**, 1031-1041.
- Braun A.P. (2012): Two-pore domain potassium channels. *Channels* **6**, 139-140.
- Brenner E.D., Martinez-Barboza N., Clark A.P., Liang Q.S., Stevenson D.W., Coruzzi G.M. (2000): Arabidopsis Mutants Resistant to S(+)-β-Methyl-α,β-Diaminopropionic Acid, a Cycad-Derived Glutamate Receptor Agonist. *Plant Physiology* **124**, 1615-1324.
- Cantor R.S. (2001): Breaking the Meyer-Overton rule: predicted effects of varying stiffness and interfacial activity on the intrinsic potency of anesthetics. *Biophysical Journal*. **80**, 2284-97.
- Connolly C.N., Krishek B.J., McDonald B.J., Smart T.G., Moss S.J. (1996): Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric γ-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 89-96.
- Czarnecki O., Grimm B. (2012): Post-translational control of tetrapyrrole biosynthesis in plants, algae, and cyanobacteria. *Journal of Experimental Botany* **63**, 1675-1687.
- Ermolayeva E., Hohmeyer H., Johannes E., Sanders D. (1996): Calcium-dependent membrane depolarisation activated by phytochrome in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **199**, 352-358.

- Ermolayeva E., Sanders D., Johannes E. (1997): Ionic mechanism and role of phytochrome-mediated membrane depolarisation in caulonemal side branch initial formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **201**, 109-118.
- Felle H.H., Zimmermann M.R. (2007): Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta* **226**, 203-214.
- Forman S.A., Chin V.A. (2008): General Anesthetics and Molecular Mechanism of Unconsciousness. *International anesthesiology clinics* **46**, 43-53.
- Franks N.P., Lieb W.R. (1984): Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* **310**, 599-601.
- Franks N.P., Lieb W.R. (1988): Volatile general anaesthetics activate a novel neuronal K<sup>+</sup> current. *Nature* **333**, 662-664.
- Franks N.P., Lieb W.R. (1994): Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* **367**, 607-614.
- Franks N.P. (2008): General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nature Review Neuroscience* **9**, 370-386.
- Geiger J.R.P., Lübke J., Roth A., Frotscher M., Jonas P. (1997): Submillisecond AMPA receptor-mediated signaling at a principal neuron-interneuron synapse. *Neuron* **18**, 1009-1023.
- Gozukirmizi N., Karlik E. (2017): Barley (*Hordeum vulgare* L.) Improvement Past, Present and Future. In: *Brewing technology*. (Kanauchi M. ed.), IntechOpen, London, UK, 49-77.
- Grams T.E.E., Koziolok C., Lautner S., Matyssek R., Fromm J. (2007): Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon reirrigation in *Zea mays* L. *Plant Cell and Environment* **30**, 79-85.
- Grémiaux A., Yokawa K., Mancuso S., Baluška F. (2014): Plant anesthesia supports similarities between animals and plants Claude Bernards' sforgotten studies. *Plant Signaling and Behavior* **9**, e27886 <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.27886>.
- Hanrahan J., Chebib M., Johnston G.A.R. (2011): Flavonoid modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *British Journal of Pharmacology* **163**, 234-245.
- Hansen K.B., Yi F., Perszyk R.E., Furukawa H., Wollmuth L.P., Gibb A.J., Traynelis S.F. (2018): Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *Journal of General Physiology* **150**, 1081-1105.
- Harrison N.L., Flood P. (1998): Molecular mechanisms of general anesthetic action. *Social Science and Medicine* **5**, 18-27.
- Hedrich R. (2012): Ion channels in plants. *Physiological Reviews* **92**, 1777-1811.
- Herold K.F., Hemmings H.C. (2012): Sodium channels as targets for volatile anesthetics. *Frontiers in Pharmacology* **3**, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2012.00050/full>.
- Holtorf H., Reinbothe S., Reinbothe C., Bereza B., Apel K. (1995): Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 3254-3258.
- Honoré E., Maingret F., Lazdunski M., Patel A.J. (2002): An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1. *EMBO Journal* **21**, 2968-2976.
- Hooper J.K., Eggink L.L., Chen M. (2007): Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts. *Photosynthesis Research* **94**, 387-400.
- Christie, J.M. (2007): Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 21-45.
- Jacob T.C., Moss S.J., Jurd R. (2009): GABA<sub>A</sub> receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience* **9**, 331-343.
- Jenkins A., Greenblatt E.P., Faulkner H.J., Bertraccini E., Light A., Lin A., Andreasen A., Viner A., Trudell J.R., Harrison N.L. (2001): Evidence for a common binding cavity for three general anesthetics within the GABA<sub>A</sub> receptor. *The journal of Neuroscience* **21**, RC136 <https://www.jneurosci.org/content/21/6/RC136>

- Jenkins G.I. (2009): Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Reviews of Plant Biology* **60**, 407-431.
- Jenkins G.I. (2014): The UV-B Photoreceptor UVR8: From Structure to Physiology. *The Plant Cell* **26**, 21-37.
- Joyard J., Ferro M., Masselon C., Seigneurin-Berny D., Salvi D., Garin J., Rolland N. (2009): Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Molecular Plant* **2**, 1154-1180.
- Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dabrowski P., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S. W., Jajoo A., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Belle Poli D., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Serodio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yanniccari M., Zivcak M. (2014): Frequently asked question about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis research* **122**, 121-158.
- Kanervo E., Singh M., Suorsa M., Paakkarinen V., Aro E., Battchikova N., Aro E.-M. (2008): Expression of Protein Complexes and Individual Proteins Upon Transition of Etioplasts to Chloroplasts in Pea (*Pisum sativum*). *Plant Cell Physiology* **49**, 396-410.
- Karakas E., Furukawa H. (2014): Crystal structure of heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* **344**, 992-997.
- Kauss D., Bischof S., Steiner S., Apel K., Meskauskiene R. (2011): FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to final steps of the Mg<sup>++</sup>-branch of this pathway. *FEBS Letters* **586**, 211-216.
- Kissin I. (1997): A concept for assessing interactions of general anesthetics. *Anesthesia and analgesia* **85**, 204-210.
- Kittler J.T., McAinsh K., Moss S.J. (2002): Mechanisms of GABA<sub>A</sub> receptor assembly and trafficking: implications for the modulation of inhibitory neurotransmission. *Molecular Neurobiology* **26**, 251-268.
- Kleiner O., Kircher S., Harter K., Batschauer A. (1999): Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *Plant Journal* **19**, 289-296.
- Kodíček M., Valentová O., Hynek R. (2018): Aerobní a anaerobní respirace; světlá fáze fotosyntézy. In: *Biochemie chemický pohled na biologický svět*. 2nd ed., (Dibuszová E. ed.), Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, Česká republika, 244-256.
- Kress G.J., Mennerick S. (2009): Action potential initiation and propagation: upstream influences on neurotransmission. *Neuroscience* **158**, 211-222.
- Król A., Dziubińska H., Trebacz K. (2010): What do plants need action potentials for? In: *Action Potential*. (DuBois M.L. ed.), Nova Science Publishers Inc., New York, USA, 1-26.
- Lam H.M., Chiu J., Hsieh M.H., Meisel L., Oliveira I.C., Shin M., Coruzzi G. (1998): Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* **396**, 125-126.
- Lerner R.A. (1997): A hypothesis about the endogenous analogue of general anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**, 13375-13377.
- Li F.-W., Rothfels C.J., Melkonian M., Villarreal J.C., Stevenson D.W., Graham S.W., Wong G.K.-S., Mathews S., Pryer K.M. (2015): The origin and evolution of phototropins. *Frontiers in Plant Science* **6**, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00637/full>.
- Li Y., Xu J., Xu Y., Zhao X.-Y., Liu Y., Wang J., Wang G.-M., Lv Y.-T., Tang Q.-Y., Zhang Z. (2018): Regulatory Effect of General Anesthetics on Activity of Potassium Channels. *Neuroscience Bulletin* **34**, 887-900.
- Lichtenthaler H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Lichtenthaler H.K. (1999): The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 47-65.
- Lu S., Li L. (2008): Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 778-785.

- Masuda T. (2008): Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls. *Photosynthetic research* **96**, 121-143.
- McCormac A.C., Fischer A., Kumar A.M., Soll D., Terry M.J. (2001): Regulation of HEMA1 expression by phytochrome and a plastid signal during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **25**, 549-561.
- Meskauskiene R., Nater M., Goslings D., Kessler F., op den Camp R., and Apel K. (2001): FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 12826-12831.
- Meyer H. (1899): Welche Eigenschaft der Anästhetika bedingt ihre narkotische Wirkung? *Arch Exp Pathol Pharmacol (Naunyn-Schmiedeberg's)* **42**, 109–118.
- Michard E., Lima P.T., Borges F., Silva A.C., Portes M.T., Carvalho J.E., Gilliam M., Liu L.H., Obermeyer G., Feijó J.A. (2011): Glutamate receptor-like genes form Ca<sup>2+</sup> channels in pollen tubes are regulated by pistil D-serine. *Science* **332**, 434-437.
- Miller K.W. (2002): The nature of sites of general anaesthetic action. *British Journal of Anaesthesia* **89**, 17-31.
- Mousavi S.A., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E.E. (2013): GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **500**, 422-426.
- Nanba O., Satoh K. (1989): Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b559. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **84**, 109-112.
- Neuhaus G., Bowler C., Hiratsuka K., Yamagata H., Chua N.-H. (1997): Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *The EMBO Journal* **16**, 2554-2564.
- Nguyen C.T., Kurenda A., Stolz S., Chételat A., Farmer E.E. (2018): Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **115**, 10178-10183.
- North H.M., De Almeida A., Boutin J.-P., Frey A., To A., Botran L., Sotta B., Marion-Poll A. (2007): The *Arabidopsis* ABA deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant Journal* **50**, 810-824.
- O'Connell A.D., Morton M.J., Hunter M. (2002): Two-pore domain K<sup>+</sup> channels—molecular sensors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1566**, 152-161.
- Overton E. (1901): Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. Fischer, Jena
- Papenbrock J., Grimm B. (2001): Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis – studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta* **213**, 667-681.
- Papouin T., Ladépeche L., Ruel J., Sacchi S., Labasque M., Hanini M., Groc L., Pollegioni L., Mothet J.P., Oliet S.H. (2012): Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonist. *Cell* **150**, 633-646.
- Patel A.J., Honoré E., Lesage F., Fink M., Romey G., Lazdunski M. (1999): Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels. *Nature Neuroscience* **2**, 422-426.
- Pavlovič A., Libiaková M., Bokor B., Jakšová J., Petřík I., Novák O., Baluška F. (2020): Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Annals of Botany* **125**, 173-183.
- Pereda A.E. (2014): Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature* **15**, 250-263.
- Quail P.H. (1997): An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant Cell and Environment* **20**, 657-665.
- Quail P.H. (2010): Phytochromes. *Current Biology* **20**, R504-R507, [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(10\)00450-1](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(10)00450-1)
- Ramesh S.A., Tyerman S.D., Xu B., Bose J., Kaur S., Conn V., Domingos P., Ullah S., Wege S., Shabala S., Feijó J.A., Ryan P.R., Gilliam M. (2015): GABA signalling modulates plant

- growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nature Communication* **6**: 7879, <https://doi.org/10.1038/ncomms8879>.
- Ramesh S.A., Tyerman S.D., Gilliam M., Xu B. (2017):  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **74**, 1577-1603.
- Reinbothe C., Lebedev N., Reinbothe S. (1999): A protochlorophyllide light-harvesting complex involved in de-etiolation of higher plants. *Nature* **397**, 80-84.
- Rozema J., van de Staaij J., Björn L.O., Caldwell M. (1997): UV-B as an environmental factor in plant life: Stress and regulation. *Trends in Ecology and Evolution* **12**, 22-28.
- Ruiz-Sola M.Á., Rodríguez-Concepción M. (2012): Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colourful Pathway. *The Arabidopsis book* **10**, e0158, <https://bioone.org/journals/The-Arabidopsis-Book/volume-2012/issue-10/tab.0158/Carotenoid-Biosynthesis-in-Arabidopsis-A-Colorful-Pathway/10.1199/tab.0158.full>.
- Sakamoto K., Nagatani A. (1996): Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant Journal* **10**, 859-868.
- Sanchez V., Feinstein S.D., Lunardi N., Joksovic P.M., Boscolo A., Todorovic S.M., Jevtovic-Todorovic V. (2011): General anesthesia causes long-term impairment of mitochondrial morphogenesis and synaptic transmission in developing rat brain. *Anesthesiology* **115**, 992-1002.
- Sandmann G., Romer S., and Fraser P.D. (2006): Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering* **8**, 291-302.
- Saraiva R.A. (1994): Inhalation Anesthetics. *Revista Brasileira de Anestesiologia* **44**, 43-52.
- Seeman P. (1972): The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacological Review* **24**, 583-655.
- Schroeder J.I., Hedrich R., Fernandez J.M. (1984): Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **312**, 361-362.
- Schoefs B., Bertrand M. (1997): Chlorophyll Biosynthesis In: *Handbook of Photosynthesis*. 1st ed. (Pessaraki M. ed.), New York, Marcel Dekker, 49-69.
- Shacklock P.S., Read N.D., Trewavas A.J. (1992): Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorphogenesis. *Nature* **358**, 753-755.
- Sidiropoulou K., Pissadaki E.K., Poirazi P. (2006): Inside the brain of a neuron. *EMBO reports* **7**, 886-892.
- Solymosi K., Martinez K., Kristóf Z., Sundqvist C., Boddi B. (2004): Plastid differentiation and chlorophyll biosynthesis in different leaf layers of white cabbage (*Brassica oleracea* cv. capitata). *Physiologia Plantarum* **121**, 520-529.
- Sonner J.M., Cantor R.S. (2013): Molecular Mechanisms of Drug Action: An Emerging View. *Annual Review of Biophysics* **42**, 143-167.
- Spalding E.P. (2000): Ion channels and the transduction of light signals. *Plant, Cell and Environment* **23**, 665-674.
- Sreenivasulu N., Graner A., Wobus U. (2008): Barley genomics: An overview. *International Journal of Plant Genomics*, 486258, <https://new.hindawi.com/journals/ijpg/2008/486258/>.
- Steinberg E.A., Wafford K.A., Brickley S.G., Franks N.P., Wisden W. (2015): The role of K2P channels in anaesthesia and sleep. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **467**, 907-916.
- Stolárik T., Hedtke B., Šantůček J., Ilík P., Grimm B., Pavlovič A. (2017): Transcriptional and post-translational control of chlorophyll biosynthesis by dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase in Norway spruce. *Photosynthesis research* **132**, 165-179.
- Sukhov V., Nerush V., Orlova L., Vodeneev V. (2011): Simulation of action potential propagation in plants. *Journal of Theoretical Biology* **291**, 47-55.
- Tanaka R., Tanaka A. (2007): Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 321-346.
- Tanaka R., Tanaka A. (2011): Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 968-976.



- Toyota M., Spencer D., Sawai-Toyota S., Jiaqi W., Zhang T., Koo A. J., Howe G.A., Gilroy S. (2018): Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* **361**, 1112-1114.
- Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myres S.J., Dingledine R. (2010): Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews* **62**, 405-496.
- Tripathi S., Hoang Q.T.N., Han Y.-J., Kim J.-I. (2019): Regulation of Photomorphogenic Development by Plant Phytochromes. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 6165 <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/24/6165>.
- Valenzuela C.F., Puglia M.P., Zucca S. (2011): Focus on: Neurotransmitter systems. *Alcohol Research and Health* **34**, 106-120.
- Vodeneev V., Akinchits E., Sukhov V. (2015): Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Plant Signaling and Behavior* **10**, e1057365, <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15592324.2015.1057365>
- von Wettstein, D., Gough, S. and Kannangara, C.G. (1995): Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1039-1057.
- Wudick M.M., Michard E., Nuns C.O., Feijó J.O. (2018): Comparing plant and animal glutamate receptors: common traits but different fates? *Journal of Experimental Botany* **69**, 4151-4163.
- Yan X., Wang Z., Huang L., Wang C., Hou R., Xu Z., Qiao X. (2009): Reserch progress on electrical signals in higher plants. *Progress in Natural Science* **19**, 531-541.
- Yokawa K., Kagenishi T., Baluška F. (2019): Anesthetics, Anesthesia, and Plants. *Trends in Plant Science* **24**, 12-14.
- Yokawa K., Kagenishi T., Pavlovič A., Gall S., Weiland M., Mancuso S., Baluška F. (2018): Anaesthetics stop diverse plant organ movements, affect endocytic vesicle recycling and ROS homeostasis, and block action potentials in Venus flytraps. *Annals of botany* **00**, 1-10.
- Yu X., Liu H., Klejnot J., Lin C. (2010): The Cryptochrome Blue Light Receptors. *The Arabidopsis book* **8**, e0135, <https://bioone.org/journals/The-Arabidopsis-Book/volume-2010/issue-8/tab.0135/The-Cryptochrome-Blue-Light-Receptors/10.1199/tab.0135.full>.
- Zhang J. (2019): Basic Neural Units of the Brain: Neurons, Synapses and Action Potential. [https://www.researchgate.net/publication/333640329\\_Basic\\_Neural\\_Units\\_of\\_the\\_Brain\\_Neurons\\_Synapses\\_and\\_Action\\_Potential](https://www.researchgate.net/publication/333640329_Basic_Neural_Units_of_the_Brain_Neurons_Synapses_and_Action_Potential).
- Zimmermann M.R., Maischak H., Mithöfer A., Boland W., Felle H.H. (2009): System potentials, a novel electrical long-distance apoplasmic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiology* **149**, 1593-1600.
- Žárský V. (2015): GABA receptor found in plants. *Nature Plants* **1**, 15115, <https://www.nature.com/articles/nplants2015115>.

## 7 SEZNAM ZKRATEK

A	absorbance
ALA	5-aminolevulinová kyselina
ALMT receptory	hliníkem aktivované malátové receptory
AMPA	kys. $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové
ATP	adenosintrifosfát
BCA	bicinchoninová kyselina
BMAA	S(+)- $\beta$ -methyl- $\alpha,\beta$ -diaminopropionová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CAO	chlorofylid <i>a</i> oxygenasa
CPOX	koproporfyirinogen III oxidasa
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DMAPP	dimethylallyl pyrofosfát
DNQX	6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion
DPOR	na světle nezávislá protochlorofylid oxidoreduktasa
DVR	divinylchlorofylid reduktasa
$\epsilon$	molární extinkční absorpční koeficient
F <sub>0</sub>	minimální fluorescence
FAD	flavinadenindinukleotid
F <sub>m</sub>	maximální fluorescence
F <sub>v</sub>	variabilní fluorescence
FW	čerstvá hmotnost
<i>g</i>	tíhové zrychlení
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GABA <sub>A</sub> receptory	receptory kyseliny $\gamma$ -aminomáselné typu A
GGDP	geranyl-geranyl difosfát
GLRs	rostlinné homology glutamátových receptorů
GluTR	glutamyl-tRNA reduktasa
GSA	glutamát-1-semialdehyd
GSA-AT	GSA aminotransferasa
Chlide	chlorofylid
IPP	isopentenylpyrofosfát

K2P kanály	draslíkové kanály se dvěma póry
I	tloušťka kyvety
Lhca	anténní chlorofyl fotosystému I
Lhcb	anténní chlorofyl fotosystému II
LHCI	světloběrný komplex fotosystému I
LHCII	světloběrný komplex fotosystému II
LPOR	na světle závislá protochlorofylid oxidoreduktasa
MgCy	Mg-protoporfyrin IX monomethyl ester cyklasa
MgMT	Mg-protoporfyrin IX methyltransferasa
MTHF	5,10-methyltetrahydrofolát
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
nACh receptory	nikotinové acetylcholinové receptory
NMDA receptory	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartát receptory
NSY	neoxantin syntasa
PAR	fotosynteticky aktivní záření
PBG	porfobilinogen
Pchl <sub>id</sub>	protochlorofylid
POR	NADPH-protochlorofylid oxidoreduktasa
PPOX	protoporfyrinogen IX oxidasa
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
PSY	fytoensyntasa
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RbcL	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
TCA	kyselina trichloroctová
TPK draslíkové kanály	draslíkové kanály se dvěma póry (z angl. Tandem-Pore K <sup>+</sup> )
UV záření	ultrafialové záření
UVR8	receptor UV-B záření
v/v	objem na objem
w/v	hmotnost na objem
ZEP	zeaxantin epoxidasa