

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Transport cytokininů: genotypizace knockoutových  
linií**

*Arabidopsis thaliana*

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Eliška Vroblová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. David Zalabák, Ph.D.</b>
Rok:	2017

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a 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. Byl/a jsem seznámen/a 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 ..... *podpis bakaláře*

## Poděkování

Především bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Mgr. Davidu Zalabákovi, Ph.D. za vedení při zpracování bakalářské práce, vysvětlení dané problematiky, odborné rady a věnovaný čas při seznámení s metodikami v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Yoshihisa Ikedovi Ph.D. za cenné rady a Mgr. Karolíně Kubiasové za všestrannou pomoc v laboratoři. Poděkování patří také kolektivu Oddělení molekulární biologie za možnost vypracování moji bakalářské práce a za vstřícnost jejich zaměstnanců.



Ekvilibrativní nukleosidové transportéry,  
*Arabidopsis thaliana*

Počet stran

53

Počet příloh

-

Jazyk

Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eliška Vrobllová
Title	Transport of cytokinins: genotyping knockout lines of <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. David Zalabák, Ph. D.
The year of presentation	2017

### Abstract

Cytokinins are plant hormones that significantly affect plant growth and development. Cytokinin biosynthesis is mediated through two alternative pathways *in planta*. The first so-called *de novo* pathway produces isopentenyladenine derivatives and by hydroxylation of its side chain then forms *trans*-zeatin derivatives. In the second pathway, so-called indirect pathway prenylation of adenosine, which is contained in the transfer RNA molecule (tRNA) takes place. Cytokinins are then released after the tRNA degradation. Cytokinins are transported in plant through the transport proteins such as purine permease (PUP), equilibrative nucleoside transporter (ENT) or AtABCG14 transporter, which mediates the long-distance cytokinin transport. PUPs mainly transport nucleobases whereas ENTs transport mainly nucleosides. The *Arabidopsis thaliana* genome contains eight *ENT* genes and twenty-one *PUP* genes. The main goal of this bachelor thesis was to select homozygous plants of selected *Arabidopsis thaliana* T-DNA insertion lines with nonfunctional genes that encode putative transporters which transport cytokinins through a vacuolar membrane (tonoplast). Within the framework of experimental part homozygotes of mutant *Arabidopsis thaliana ent1-2* SALK\_025174 and *ent1-3* SALK\_104866 were selected by using PCR genotyping method. Both selected lines have knocked out *ENT1* gene as a result of T-DNA cassette insertion and will be used in the forthcoming experiments.

Keywords Cytokinins, cytokinin transport, purine permease,

equilibrative nucleoside transporter, *Arabidopsis thaliana*

Number of pages	53
Number of appendices	-
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>2</b>
2.1	Struktura cytokininů .....	2
2.2	Biosyntéza cytokininů .....	5
2.2.1	Přímá biosyntéza cytokininů de novo .....	7
2.2.2	Nepřímá biosyntéza cytokininů zprostředkovaná degradací tRNA .....	8
2.3	Regulace cytokininové homeostázy ve vyšších rostlinách.....	8
2.3.1	Aktivace cytokininů .....	9
2.3.2	Inaktivace cytokininů .....	9
2.3.3	Ireverzibilní degradace cytokininů .....	11
2.4	Transport cytokininů .....	13
2.4.1	Purinové permeasy PUP .....	14
2.4.2	Ekvilibrativní nukleosidové transportéry ENT .....	18
2.4.3	AtABCG14 transportér .....	20
2.4.4	AtPUP14.....	21
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>22</b>
3.1	Materiál .....	22
3.1.1	Chemikálie.....	22
3.1.2	Roztoky a média .....	23
3.1.3	Biologický materiál .....	24
3.1.4	Programy a software .....	25
3.1.5	Přístroje.....	25
3.2	Metody.....	25
3.2.1	Příprava MS média ke kultivaci semen <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
3.2.2	Sterilizace semen <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
3.2.3	Výsev semen <i>Arabidopsis thaliana</i> na MS médium .....	26
3.2.4	Genotypizace .....	27



3.2.5	Izolace genomové DNA z pravých listů <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
3.2.6	PCR.....	28
3.2.7	Gelová elektroforéza.....	30
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>31</b>
4.1	EQUILIBRATIVE NUCLEOTIDE TRANSPORTER 1 (ENT1) .....	32
4.2	ADP/ATP CARRIER 1 (AAC1).....	36
4.3	ADENINE NUCLEOTIDE TRANSPORTER 1 (ADNT1).....	40
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>52</b>

## **Cíle práce**

- Vypracování literární rešerše na téma metabolismus a transport cytokininů.
- Genotypizace T-DNA inzerčních linií *Arabidopsis thaliana* v genech kódující hypotetické cytokininové transportéry, za účelem selekce homozygotů.
- Zpracování výsledků.
- Sepsání bakalářské práce.

# 1 ÚVOD

Cytokininy (CK) jsou třídou fytohormonů známé jako klíčové regulátory rostlinného růstu a vývoje zahrnující buněčné dělení, listovou senescenci, apikální dominanci, utváření postranních kořenů, stresovou toleranci a nutriční signalizaci (Mok, 1994; Sakakibara, 2006; Argueso *et al.*, 2009). Krátce po objevu cytokininů (Miller *et al.*, 1955) bylo zjištěno, že spolu s auxiny hrají hlavní roli v rostlinné morfogenezi (Skoog a Miller, 1957).

Cytokininy byly objeveny F. Skoog, C. Miller a spolupracovníky během let 1950 jako látky podporující buněčné dělení (cytokinezi) (Schmülling, 2004). V roce 1955 byla izolována ze staré nebo autoklávované DNA spermatu sledě a telecího brzlíku nová sloučenina zvaná kinetin (Miller *et al.*, 1955).

Název kinetin byl vybrán, protože tato látka podporuje buněčné dělení (cytokinezi). Tato schopnost také dala jméno této zcela nové třídě rostlinných hormonů, cytokininů. Mezi rostlinné hormony (fytohormony) dále patří auxiny, brasinosteroidy, gibereliny, polyaminy, kyselina abscisová (ABA), ethylen, jasmonáty, salicylové kyseliny a nová skupina hormonů strigolaktony.

Dnes jsou rostlinné hormony definovány jako přirozeně vyskytující se látky, aktivní při velmi nízkých koncentracích, které jsou ve většině případů schopny transportu v rostlinných pletivech a orgánech a vázat se na specifický receptorový protein (Frébort *et al.*, 2011).

V teoretické části bakalářské práce se věnuji charakteristice cytokininů, jejich metabolismu a transportu v rostlině, který je zajišťován purinovými permeasami (PUP) a ekvilibrativní nukleosidovými transportéry (ENT). Dále se v bakalářské práci zaměřuji na transportér AtABCG14 zajišťující v rostlině dálkový transport cytokininů. V neposlední řadě se detailně zabývám funkcí transportéru PUP14, který ovlivňuje cytokininovou signalizaci.

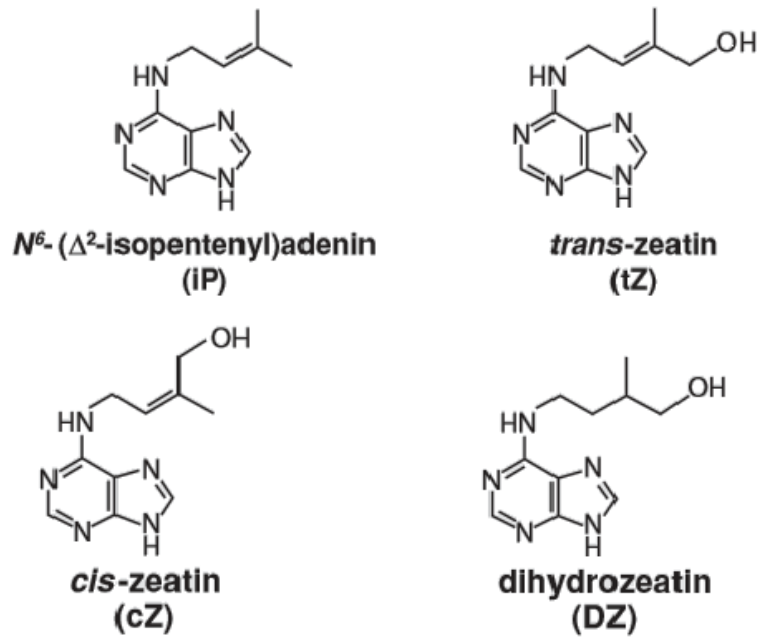
Cílem experimentální části mé bakalářské práce bylo vyselektovat homozygotní rostliny vybraných T-DNA inzerčních linií *Arabidopsis thaliana* s nefunkčními geny kódujícími domnělý tonoplastový transportér cytokininů.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Struktura cytokininů

Přírozně se vyskytujícími cytokininy jsou deriváty adeninu, které mají buď isoprenoidní nebo aromatický postranní řetězec na  $N^6$  pozici. Isoprenoidní cytokininy jsou v přírodě rozšířené, zatímco aromatické se vyskytují pouze ve stopových množstvích, a proto byly po dlouhou dobu považovány za syntetické látky. Isoprenoidní postranní řetězec isopentenyladeninu [ $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin] (iP) může být hydroxylován, buď v *cis*- nebo *trans*- terminální pozici a tvořit tak zeatin, pojmenovaný podle svého objevení v kukuřici (*Zea mays* L.; Letham, 1963). Dvojná vazba zeatinu může být redukována za tvorby dihydrozeatinu [ $N^6$ -(4-hydroxy-3-methylbutyl)adenin] (DZ), zatímco redukovaný ekvivalent isopentenyladeninu nebyl doposud objeven *in planta*. Deriváty *trans*-zeatinu (*tZ*) a isopentenyladeninu jsou považovány za převládající typy cytokininů, zatímco *cis* izomery jsou přítomny pouze v nízkých koncentracích a jejich aktivita je nízká nebo žádná (Schmitz a Skoog, 1972; Mok *et al.*, 1978).

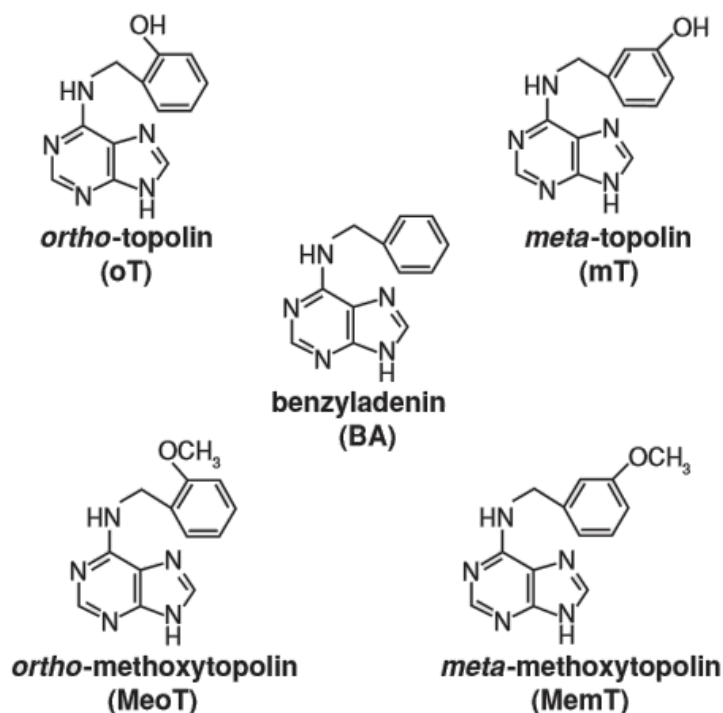
Cytokininy se v rostlinách vyskytují nejenom jako volné báze, ale také ve formě nukleosidů a nukleotidů. Cytokininové báze mohou být dále konjugovány s glukosou v  $N^3$ ,  $N^7$  a  $N^9$  pozici adeninového kruhu a na hydroxylovaný postranní řetězec. Hydroxylová skupina postranního řetězce může být také konjugována s xylosou (Turner *et al.*, 1987). Hlavními přírodními cytokininy vyskytujícími se v rostlinách jsou  $N^6$  prenylované adeninové deriváty  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*) a dihydrozeatin (DZ) (Mok a Mok, 2001; Sakakibara, 2006) (Obr. 1).



Obr. 1 Isoprenoidní cytokininy (Sakakibara, 2006).

Aromatické cytokininy mají benzylovou skupinu na pozici *N*<sup>6</sup> adeninu. Vyskytují se vzácně a mnohem méně je o nich známo. Vzhledem k jejich větší stabilitě jsou aromatické cytokininy často používány v explantátových kulturách, příkladem je benzyladenin (BA). Aromatické cytokininy, *ortho*-topolin (*oT*), *meta*-topolin (*mT*), methoxy-derivát *ortho*-topolinu (*meoT*), methoxy-derivát *meta*-topolinu (*memT*) a benzyladenin (BA) se nacházejí pouze u některých druhů rostlin (Strnad, 1997) (Obr. 2).

Kromě isoprenoidních a aromatických cytokininů existuje ještě skupina strukturně nesouvisejících syntetických cytokininů fenylnmočovinného typu (např. difenylnmočovina, thidiazuron). Tyto cytokininy jsou vysoce aktivní, ale nevyskytují se v přírodě (Schmülling, 2004).



Obr. 2 Aromatické cytokininy (Sakakibara, 2006).

Hladina endogenních cytokininů závisí na rovnováze mezi *de novo* syntézou, poměrem importu a exportu, vzájemných přeměn jednotlivých forem, přechodné inaktivaci konjugací (zejména glykosylací) a katabolických reakcích mající za následek kompletní ztrátu biologické aktivity (Sakakibara, 2006).

Během procesu stárnutí listů (senescence) dochází k postupné degradaci chlorofylu a fotosyntetických proteinů (Humbeck *et al.*, 1996). Zatímco některé fytohormony jako například ABA a ethylen urychlují příznaky stárnutí (Smart, 1994), exogenní aplikace cytokininů tento proces zpomaluje tím, že inhibuje degradaci chlorofylu a fotosyntetických proteinů (Richmond a Lang, 1957; Badenoch-Jones *et al.*, 1996). Richmond a Lang (1957) poprvé prokázali, že po ošetření cytokininy dochází k většímu zadržení chlorofylu a proteinu v oddělených listech rostliny řepně trnité (*Xanthium pennsylvanicum*) (Richmond a Lang, 1957). Tento cytokininový účinek byl prokázán i u mnoha jiných druhů, někdy dokonce vedl k znovu zezelenání žloutnoucích listů (Dyer a Osborne, 1971).

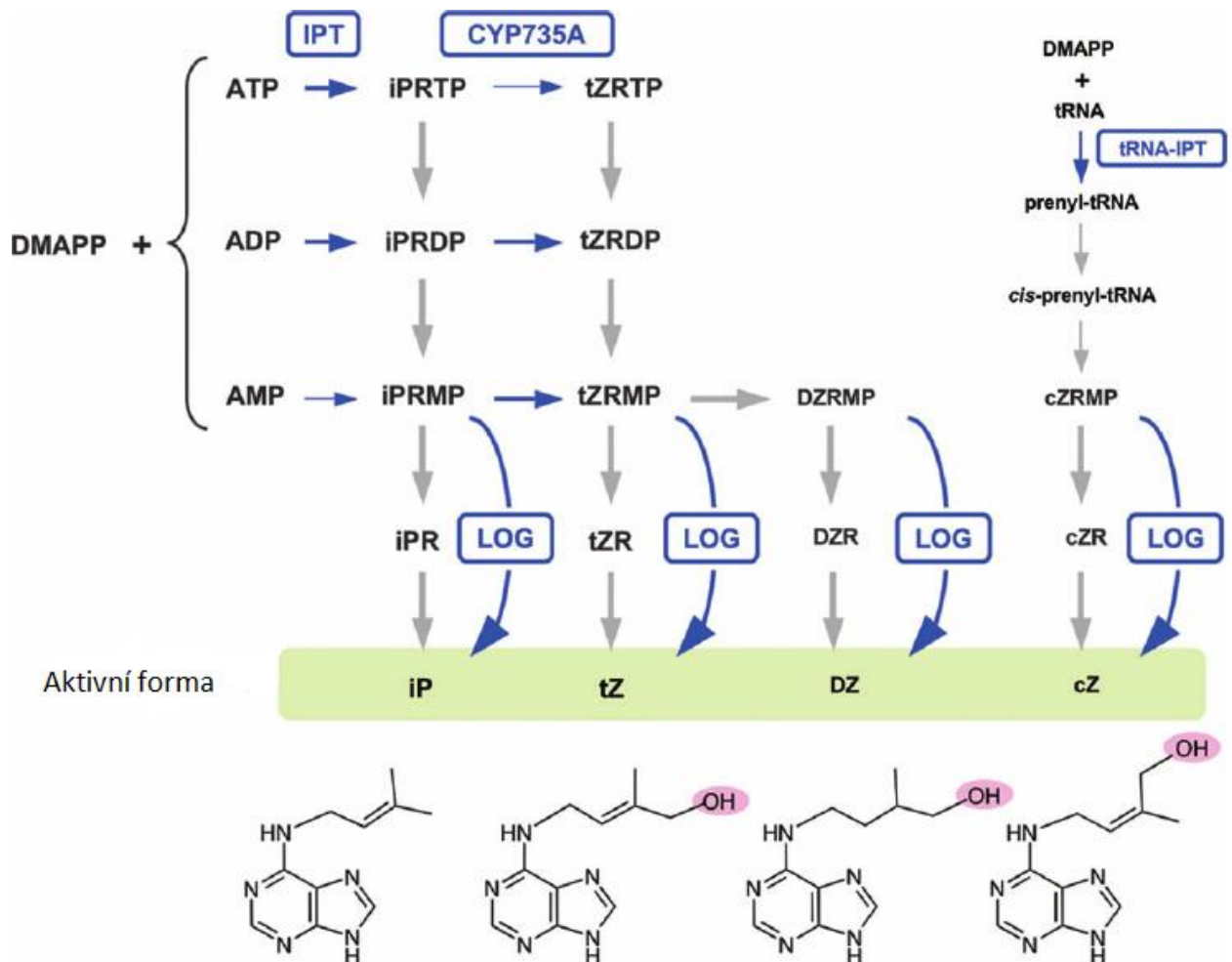
Cytokininy podporují oddalování senescence a prodlužují tak délku života rostlin, zejména listů. Nejen cytokininy se podílejí na oddálení senescence, ta může být ovlivněna řadou dalších faktorů, jako jsou například intenzita světla a koncentrace zásobních cukrů. Ze studií, ve kterých se zkoumaly změny v obsahu

cytokininů a exprese genů metabolismu cytokininů v průběhu senescence bylo zjištěno, že cytokininy působí jako endogenní negativní regulátor senescence (Gan a Amasino, 1996; Wingler *et al.*, 1998).

## **2.2 Biosyntéza cytokininů**

Existují dvě biosyntetické cesty pro cytokininovou biosyntézu (Obr. 3). První je tzv. přímá cesta, která zahrnuje prenylaci adenosin mono-, di-, nebo trifosfátu za vytvoření příslušného  $N^6$ -isopentenyladenosin fosfátu ( $i^6$  AMP,  $i^6$  ADP a  $i^6$  ATP), následované hydroxylací postranního řetězce za vytvořením zeatinových derivátů.

Druhá cesta je tzv. nepřímá, kdy nejprve dochází k prenylaci adenosinu obsaženého v molekule transferové RNA (tRNA) a cytokininy jsou z ní uvolňovány po její degradaci.



Obr. 3 Aktuální model cytokininové biosyntézy a dvě známé aktivační dráhy. ADP adenosindifosfát, AMP adenosinmonofosfát, ATP adenosin trifosfát, *cZ* *cis*-zeatin, *cZR* *cis*-zeatin ribosid, *cZRMP* *cis*-zeatin ribosid 5'-monofosfát, DMAPP dimethylallyldifosfát, DZ dihydrozeatin, DZR dihydrozeatin ribosid, DZRMP dihydrozeatin ribosid 5'-monofosfát, iP *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin, iPR isopentenyladenosin ribosid, iPRDP isopentenyladenosin ribosid 5'-difosfát, iPRMP isopentenyladenosin ribosid 5'-monofosfát, iPRTP isopentenyladenosin ribosid 5'-trifosfát, IPT isopentenyltransferasa, LOG enzym Lonely Guy, tRNA transferová RNA, tRNA-IPT tRNA isopentenyltransferasa, *tZ* *trans*-zeatin, *tZR* *trans*-zeatin ribosid, *tZRDP* *trans*-zeatin ribosid 5'-difosfát, *tZRMP* *trans*-zeatin ribosid 5'-monofosfát, *tZRTP* *trans*-zeatin ribosid 5'-trifosfát. Modré šipky označují reakce katalyzované známými enzymy, zatímco šedé šipky označují reakce, u kterých klíčové enzymy nebyly doposud identifikovány. V tomto schématu jsou vyobrazeny pouze klíčové kroky biosyntézy a aktivace cytokininů. Další podrobnosti jsou uvedeny v Sakakibara (2006).



### 2.2.1 Přímá biosyntéza cytokininů *de novo*

Prvním krokem v biosyntéze isoprenoidních cytokininů je *N*-prenylace adenosin 5'-fosfátu (AMP, ADP nebo ATP) na *N*<sup>6</sup>-konci s dimethylallyldifosfátem (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyldifosfátem (HMBDP). Tato reakce je katalyzována adenosinfosfátisopentenyltransferasou (IPT; EC 2.5.1.27) (Sakakibara, 2006). Produktem této reakce je tedy buď *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP) nukleotid nebo *trans*-zeatin (*tZ*) nukleotid (Krall *et al.*, 2002; Sakakibara, 2004).

HMBDP je metabolitem methylerythritolfosfátové (MEP) dráhy, která probíhá v bakteriích a plastidech (Hecht *et al.*, 2001). DMAPP je produkován MEP a mevalonátovou (MVA) dráhou, která obvykle probíhá v cytosolu eukaryot (Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999).

První cytokininový biosyntetický gen byl identifikován v rostlinné patogenní bakterii *Agrobacterium tumefaciens* (Lichtenstein *et al.*, 1984). Transformace rostlinné buňky probíhá pomocí bakteriálního Ti-plazmidu, který zabudovává do jádra hostitelského organismu geny *Tmr* a *Tzs*. Gen *Tmr* kóduje IPT enzym zprostředkávající nadprodukcí cytokininů, zatímco *Tzs* gen působí v bakteriální buňce, kde stimuluje činnost přenosu.

IPT vyšších rostlin přednostně využívá ADP nebo ATP, před AMP jako prenylové akceptory, a jako prenylový donor výhradně DMAPP, za produkce iP ribosid-5-difosfát (iPRDP) nebo iP ribosid-5-trifosfát (iPRTP) (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2003; Sakano *et al.*, 2004; Sakakibara, 2004). Na druhé straně, *Agrobacterium tumefaciens* IPT, *Tmr*, využívá AMP a HMBDP nebo DMAPP, jako substráty *in vitro*, zatímco HMBDP je převážně užíván v *in vivo* (Sakakibara *et al.*, 2005).

Známe dva typy IPT, adenylátové IPT (EC 2.5.1.27; Blackwell a Horgan, 1993; Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001a), které přidávají isopentenylovou skupinu na *N*<sup>6</sup> atom AMP, ADP nebo ATP (ale ne adenosin ani adenin). Druhým typem IPT je tRNA IPT (EC 2.5.1.8) působící v nepřímé biosyntetické dráze cytokininů, kde prenyluje adenin obsažený v tRNA.

Genom *Arabidopsis thaliana* nese sedm genů kódujících adenylátové IPT, jmenovitě *AtIPT1* a *AtIPT3* až *AtIPT8* a dva geny kódující tRNA IPT (*AtIPT2* a *AtIPT9*) (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001a; Sun *et al.*, 2003). Fúze *AtIPT* s *GFP* (zelený fluorescenční protein) byla využita pro subcelulární lokalizaci jednotlivých

*AtIPT* izoforem (Kasahara *et al.*, 2004). *AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT5* a *AtIPT8* jsou lokalizovány v plastidech a produkují cytokininy s DMAPP odvozeného z MEP dráhy (Kasahara *et al.*, 2004). *AtIPT2*, *AtIPT4* a *AtIPT7* jsou umístěny v cytosolu a mitochondriích, což naznačuje, že MVA dráha jim poskytuje DMAPP pro cytokininovou biosyntézu (Kasahara *et al.*, 2004).

*Trans*-zeatinové deriváty jsou přednostně produkovány hydroxylací isopentenyladenin nukleotidů cytochrom P450 monooxygenasou (Takei *et al.*, 2004a). V *Arabidopsis thaliana* existují dva geny kódující cytokininovou *trans*-hydroxylasu, CYP735A1 a CYP735A2 (Takei *et al.*, 2004b). Oba tyto enzymy preferují iP nukleotidy, před iP nukleosidy a preferují iPRMP (iP ribosid-5-monofosfát) nebo iPRDP než iPRTP.

### **2.2.2 Nepřímá biosyntéza cytokininů zprostředkovaná degradací tRNA**

Předpokládá se, že tRNA modifikace (prenylace) také přispívá přinejmenším do jisté míry k produkci cytokininů. Některé druhy tRNA s antikodony komplementárními ke kodonům začínajícím uridinem, nesou prenylovaný adenosin přiléhající k antikodonu. V případě, že je tRNA degradovaná je uvolněn prenylovaný adenosin, tedy cytokinin. Prenylace je katalyzována tRNA-isopentenyltransferasou (tRNA-IPT, EC 2.5.1.8). Tato biosyntetická dráha je jedinou doposud známou potvrzenou drahou produkující deriváty *cis*-zeatinu. Genom *Arabidopsis thaliana* nese dva geny kódující tRNA IPT, *AtIPT2* a *AtIPT9* (Golovko *et al.*, 2002).

Kromě tRNA degradace by *cis*-zeatin mohl být hypoteticky produkován izomerací *trans*-zeatinu enzymem zvaným zeatin *cis-trans* isomerasa. Aktivita tohoto enzymu byla poprvé popsána v proteinovém extraktu nezralých semenech fazole *Phaseolus vulgaris* (Bassil *et al.*, 1993), avšak další charakterizace enzymu nebyla provedena a *cis-trans* izomerasová aktivita byla pozorována *in vivo* pouze ojedinelé.

### **2.3 Regulace cytokininové homeostázy ve vyšších rostlinách**

Homeostáze cytokininových nukleových bází je nutná pro normální růst a vývoj rostlin. Její regulace je pevně řízena expresí klíčových genů cytokininové biosyntézy a metabolismu. Do této skupiny genů patří zejména IPT, CYP735A, adenosin nukleosidasa, adenin fosforibosyltransferasa, cytokinin oxidasa/dehydrogenasa (CKX), a cytokinin glykosyltransferasa (Mok a Mok, 2001; Sakakibara *et al.*, 2005).

Adenosin nukleosida uvolňuje cytokininové nukleové báze z nukleosidů, adenin fosforibosyltransferasa převádí cytokininové nukleové báze na nukleotid, který má nízkou nebo žádnou aktivitu. CKX katalyzují ireverzibilní degradaci cytokininů s výjimkou dihydrozeatinu a glykosyltransferasa inaktivuje cytokininy konjugací s glukosou. Expres IPT, CKX a CYP735A je koordinovaně nebo rozdílně regulována cytokininy, auxinem a kyselinou abscisovou. Úroveň transkripce *AtIPT5* a *AtIPT7* je v kořenech *Arabidopsis thaliana* indukovaná auxinem, zatímco *AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT5* a *AtIPT7* je potlačena cytokininem (Miyawaki *et al.*, 2004). Expres CYP735A1 a CYP735A2 je stimulována cytokininy v kořenech, zatímco auxinem a ABA je potlačena (Takei *et al.*, 2004b).

### 2.3.1 Aktivace cytokininů

Cytokininy jsou *de novo* syntetizovány jako málo aktivní nukleotidy mono-, di- nebo trifosfáty, alternativně uvolněním nukleotid monofosfátů z tRNA. Biologicky aktivní nukleové báze iP a tZ vznikají z odpovídajících nukleotidů buď přímo nebo ve dvou krocích (Sakakibara, 2006; Kurakawa *et al.*, 2007; Zhao, 2008; Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009). Ve dvoukrokové dráze jsou cytokinin ribosid 5'-monofosfáty postupně přeměňovány na odpovídající nukleosidy a nukleové báze cytokinin-specifickou nukleotidasou a nukleosidasou, ačkoliv geny kódující tyto enzymy nebyly doposud identifikovány (Chen a Kristopeit, 1981a, 1981b).

Přímá dráha zprostředkovává produkci cytokinin nukleových bází z odpovídajících cytokinin ribosid 5'-monofosfátů prostřednictvím cytokinin ribosid 5'-monofosfát fosforibohydrolasy zvané LONELY GUY (LOG), která byla poprvé identifikována v rýži (*Oryza sativa*) (Kurakawa *et al.*, 2007).

Devět genů kódujících LOG bylo identifikované v genomu *Arabidopsis thaliana* a sedm z nich mělo enzymatickou aktivitu shodnou s rýžovými homology. Výsledky experimentů s vyřazením nebo naopak nadexpresí LOG genů naznačují, že přímá aktivační dráha hraje klíčovou roli v regulaci cytokininové aktivity během růstu a vývoje *Arabidopsis thaliana* (Kuroha *et al.*, 2009).

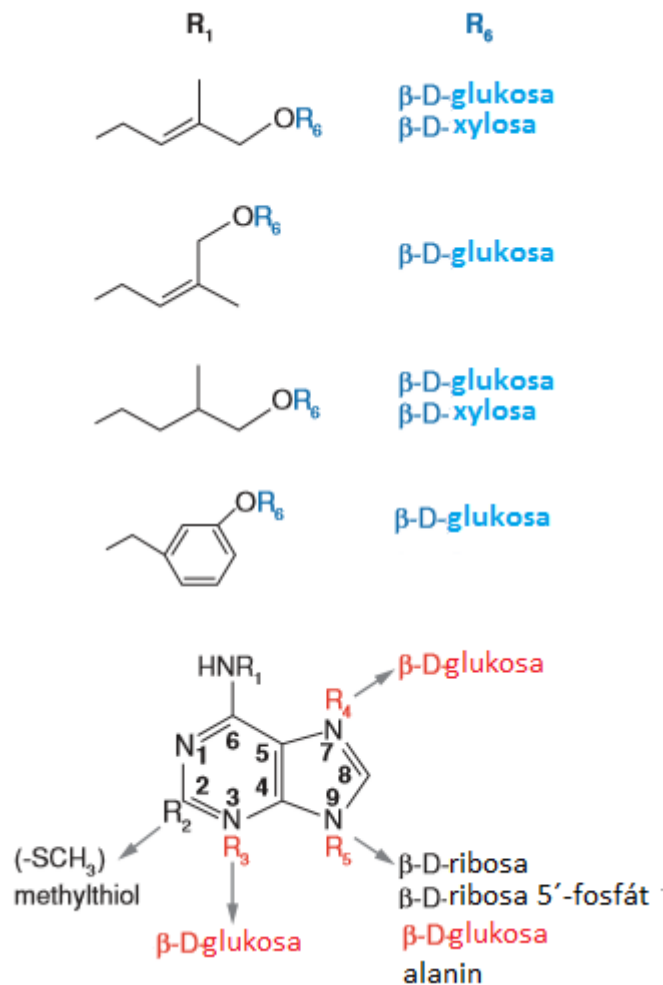
### 2.3.2 Inaktivace cytokininů

Aktivní cytokininy mohou být inaktivovány buď dočasně nebo trvale konjugací se sacharidy na různých pozicích molekuly cytokininu (Martin *et al.*, 1999a, 2001; Mok a Mok, 2001; Hou *et al.*, 2004). Cytokinin glykosyltransferasa konjuguje

glukosový zbytek na  $N^3$ ,  $N^7$  nebo  $N^9$  atom adeninového kruhu nebo xylosový zbytek na kyslíkový atom prenylového postranního řetězce zeatinů (Martin *et al.*, 1999a, 1999b, 2001; Mok a Mok, 2001; Hou *et al.*, 2004) (Obr. 4). Volné báze mohou být přeměňovány na nukleotidy, enzymy purinové recyklační dráhy (salvage) zahrnující adenin fosforibosyltransferasu (Moffatt *et al.*, 1991) a adenosin kinasu (von Schwartzenberg *et al.*, 1998; Kwade *et al.*, 2005).

Enzym podílející se na *N*-glykosylaci  $N^7$  a  $N^9$ , *N*-glykosyltransferasa (EC 2.4.1.118) používá uridin difosfát glukosu (UDPG) a uridin trifosfát glukosu (UTPG) jako glykosylové donory.  $N^7$  a  $N^9$  glykosidy nejsou aktivní v biologických testech, jelikož glykosylace je nevratně inaktivuje (Mok a Mok, 2001), zatímco  $N^3$  glykosidy mohou být převedeny zpět na volné báze  $\beta$ -glukosidasou (Brzobohatý *et al.*, 1993).

Dalším typem modifikace je *O*-glykosylace na  $N^6$  postranním řetězci hydroxylovaných forem CK a také přispívá k modulaci aktivity CK. Geny kódující *O*-glykosyltransferasu (ZOG, EC 2.4.1.203; Dixon *et al.*, 1989) a *O*-xylosyltransferasu (EC 2.4.1.204; Turner *et al.*, 1987) byly klonovány z fazole *Phaseolus lunatus* L. a *Phaseolus vulgaris* L. ZOG užívá UDPG a uridin difosfát xylosu (UDPX) jako donor, zatímco *O*-xylosyltransferasa užívá pouze UDPX. Obě transferasy rozpoznávají cytokininové substráty vysoce specifickým způsobem a pouze *trans*-izomer zeatin a částečně dihydrozeatin jsou substráty (Martin *et al.*, 2001). Na rozdíl od *N*-glykosylace je *O*-glykosylace vratná a *O*-glykosidy jsou odolné vůči štěpení na  $N^6$  pozici postranního řetězce cytokinin oxidasou (Schmülling *et al.*, 2003). Protože tyto konjugáty mohou být zpět převedeny na aktivní cytokininové báze  $\beta$ -glukosidasou (Brzobohatý *et al.*, 1993) předpokládá se, že představují inaktivní, stabilní skladovatelné formy cytokininů.



Obr. 4 Modifikace molekuly cytokininu cukry, cukernými fosfáty a ostatními molekulami. *O*-glykosylace postranního řetězce (vybarvena modře) je katalyzována zeatin *O*-glykosyltransferasou nebo *O*-xylosyltransferasou. *N*-glykosylace adeninové části (vybarvena červeně) je katalyzována *N*-glykosyltransferasou.

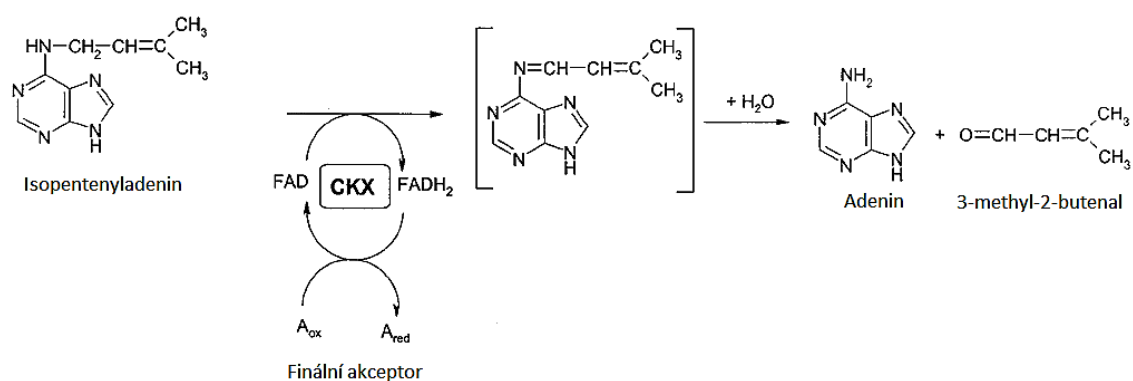
### 2.3.3 Ireverzibilní degradace cytokininů

Další klíčová metabolická regulace obsahu CK je ireverzibilní štěpení na  $N^6$  postranním řetězci. Tato enzymatická aktivita byla poprvé prokázána konverzí radioaktivně značeného  $N^6$ -isopentenyladeninu na adenin v hrubém proteinovém extraktu tabáku (Pačes *et al.*, 1971) a Whitty a Hall (1974) později nazval enzym cytokinin oxidasou.

Klonování prvního CKX genu z kukuřice (*ZmCKX1*) a jeho exprese v kvasinkách a mechu (Houba-Hérin *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999) zahájily důkladné biochemické studie CKX. Cytokinin dehydrogenasa je flavoprotein, který štěpí  $N^6$  postranní řetězec cytokininů a produkuje odpovídající aldehyd (Brownlee *et al.*, 1975) (Obr. 5).

Tento enzym využívá jako akceptorech elektronů buď kyslík nebo akceptory chinonového typu jako např. 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinonu (Q<sub>0</sub>) (Galuszka *et al.*, 2001; Frébortová *et al.*, 2004).

Ve vyšších rostlinách jsou CKX kódovány malými genovými rodinami s různými počty členů (Werner *et al.*, 2006). Analýza genomu *Arabidopsis thaliana* odhalila přítomnost sedmi CKX kódujících genů *AtCKX1* až *AtCKX7* (Schmülling *et al.*, 2003). *AtCKX* enzymy se liší v biochemických vlastnostech, v regulaci jejich exprese a v subcelulární lokalizaci (Schmülling *et al.*, 2003).



Obr. 5 Reakční schéma CKX (EC 1.5.99.12) (Frébortová *et al.*, 2004).

## 2.4 Transport cytokininů

Cytokiny mohou působit autokrinně, parakrinně nebo jako dálkové signály (Sakakibara, 2006; Hirose *et al.*, 2008). Různé druhy cytokininů jsou syntetizovány a distribuovány v odlišných pletivech nebo orgánech.

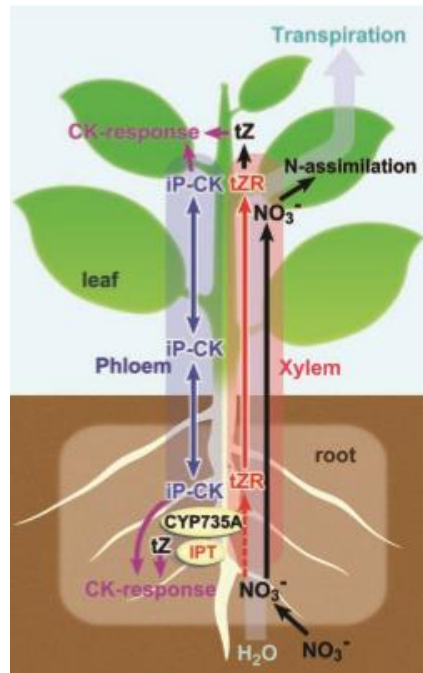
Několik cytokininových biosyntetických genů *IPT* je především exprimováno v kořenech. Transport cytokininů z kořene do nadzemní části přes xylém a jejich zpětný tok floémem, podporuje hypotézu, že tyto fytohormony slouží jako dálkové signální molekuly (Weiler a Ziegler, 1981; Beveridge *et al.*, 1997; Emery *et al.*, 2000). Cytokiny jsou tedy mobilní třídou fytohormonů a ve vyšších rostlinách nutně musí existovat mechanismy umožňující import a export cytokininů přes plazmatickou membránu (Cedzich *et al.*, 2008; Hirose *et al.*, 2008).

Ve vyšších rostlinách je dálkový transport cytokininů zprostředkován xylémovým, tzv. akropetálním transportním systémem, který nastává transpiračním proudem a zpětným floémovým translokačním systémem, který distribuuje asimiláty po celém těle rostliny (Kudo *et al.*, 2010). V xylémové šťávě je hlavní formou cytokininů *trans*-zeatin ribosid (*tZR*) (Beveridge *et al.*, 1997; Takei *et al.*, 2001b; Hirose *et al.*, 2008), zatímco ve floémové šťávě iP deriváty cytokininů jako isopentenyladenosin ribosid (*iPR*) a iP-ribotidy (Corbesier *et al.*, 2003; Hirose *et al.*, 2008). Dá se tedy předpokládat, že rostliny využívají *tZR* jako akropetální posly a naopak iP deriváty jako systemické nebo bazipetální posly (Obr. 6).

Cytokininová translokace přes xylém je řízena enviromentálními a endogenními signály. Obsah *tZR* a rychlost toku xylémovou šťávou je významně zvýšena přidávkem nitrátů ke kořeni ječmene (Samuelson *et al.*, 1992) a kukuřice (Takei *et al.*, 2001b) naznačující, že *tZR* působí jako posel nitrátové signalizace.

Xylémové cytokiny stimulované nitrátovým přídatkem indukují transkripci cílových genů v listech (Sakakibara *et al.*, 1998; Takei *et al.*, 2001b). Akumulace *AtIPT3* transkriptů v kořeni *Arabidopsis thaliana* je indukována nitrátem následované biosyntézou *tZ* ribotidů a *tZ* ribosidů. (Takei *et al.*, 2002, 2004a). U mutantů s vyřazeným genem *AtIPT3* je akumulace cytokininů po aplikaci nitrátu výrazně snížena (Takei *et al.*, 2004a), což dokazuje, že *AtIPT3* je klíčovým enzymem pro nitrát dependentní biosyntézu cytokininů.

Pomocí analýzy promotorových oblastí se ukázalo, že promotor *AtIPT3* je spíše aktivní ve floému než v xylémovém pletivu (Takei *et al.*, 2004a).



Obr. 6 Model pro transport cytokininů na dlouhé vzdálenosti do nadzemní části rostlin xylémem (červeně) a zpět do kořene floémem (modře), *tZR* *trans*-zeatin ribosid, *tZ* *trans*-zeatin, *iP-CK* cytokininy isopentenyladeninového typu, *AtIPT3* gen pro biosyntézu cytokininů, *CYP735A* cytokinin hydroxylasa (EC1.14.13.11). Nitrát indukuje expresi *AtIPT3* (Takei *et al.*, 2004b), dojde ke zvýšené regulaci cytokininů v xylému, *CYP735A1* a *CYP735A2* jsou zapojeny v biosyntéze *tZR*. Xylémové proteiny jsou transportovány akropetálně transpiračním proudem, floémové proteiny podléhají bazipetálnímu transportu.

Nicméně, na rozdíl od velmi dobře známého mechanismu polárního transportu auxinu je transport cytokininů velmi málo prostudován (Swarup *et al.*, 2000). Dodnes byli navrženi jako kandidáti cytokininových transportérů rodina purinových permeas (PUP) a rodina ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT) (Kudo *et al.*, 2010).

#### 2.4.1 Purinové permeasy PUP

Členové rodiny purinových permeas (PUP) jsou malé hydrofobní, polytopické transmembránové proteiny, zprostředkující transport nukleových bází (Gillissen *et al.*, 2000). Předpokládá se, že transport pracuje na principu substrát-protonového symportu (Gillissen *et al.*, 2000; Bürkle *et al.*, 2003; Szydlowski *et al.*, 2013). Homology těchto transportérů byly objeveny v několika rostlinných druzích např. v *Arabidopsis thaliana*, banánu, rýži, kukuřici, tabáku a rajčeti (Gillissen *et al.*, 2000; Hildreth *et al.*, 2011; Goodstein *et al.*, 2012; Jelesko, 2012). V genomu *Arabidopsis thaliana* je obsaženo 21 genů kódujících PUP proteiny,

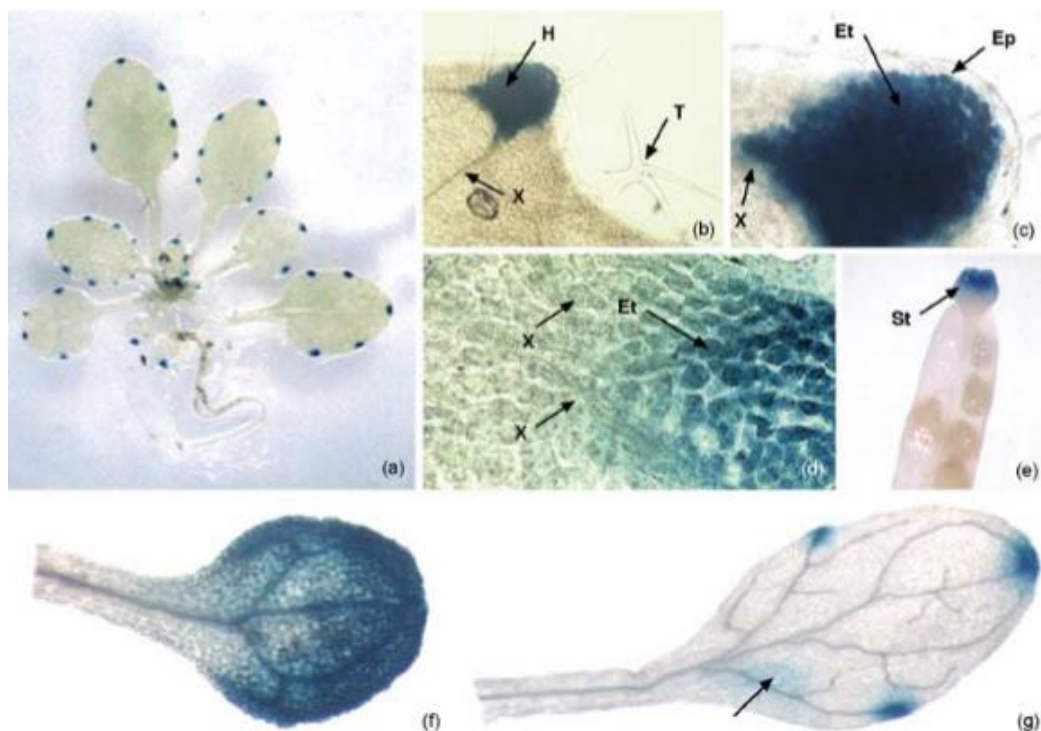


které jsou tvořeny 9-10 transmembránovými helixy (Schwacke *et al.*, 2003). Transportér *AtPUP1* zprostředkovává transport adeninu a dalších nukleových bází. Transport probíhá proti koncentračnímu gradientu a je stimulován nižším pH (Gillissen *et al.*, 2000).

Schopnost *AtPUP1* transportovat cytokininy byla demonstrována akumulací radioaktivně značeného *tZ* v kvasince exprimující tento transportér (Bürkle *et al.*, 2003). Kromě cytokininů může *AtPUP1* transportovat také kofein a některé ribosidy např. adenosin, které mají podobnou strukturu jako cytokininy (Vitória a Mazzafera, 1997; Bürkle *et al.*, 2003; Gillissen *et al.*, 2000).

Analýza exprese *AtPUP1* s využitím promotor-*GUS* ( $\beta$ -glukuronidasa) fúze ukazuje, že *AtPUP1* byl exprimován v epitemu hydatod a na povrchu stigmat šešulí (Bürkle *et al.*, 2003) (Obr. 7).

Buňky epitemu umístěné mezi xylémovým koncem a epidermis jsou zapojeny v získávání látek rozpuštěných v xylémové šťávě (Wilson *et al.*, 1991). Ve zralých rostlinách byla exprese *AtPUP1* detekována na povrchu stigmat šešulí (Obr. 7e). U dvoutýdenních rostlin byla exprese pozorována také v děložních listech a na některých částech zralých listů (Obr. 7f, g). Pomocí RT-PCR byla exprese *AtPUP1* prokázána také v dalších vegetativních pletivech a orgánech jako je řapík, stonek, hlavní cévy a květy.



Obr. 7 Analýza exprese *AtPUP1* pomocí fúze promotor-*GUS*.

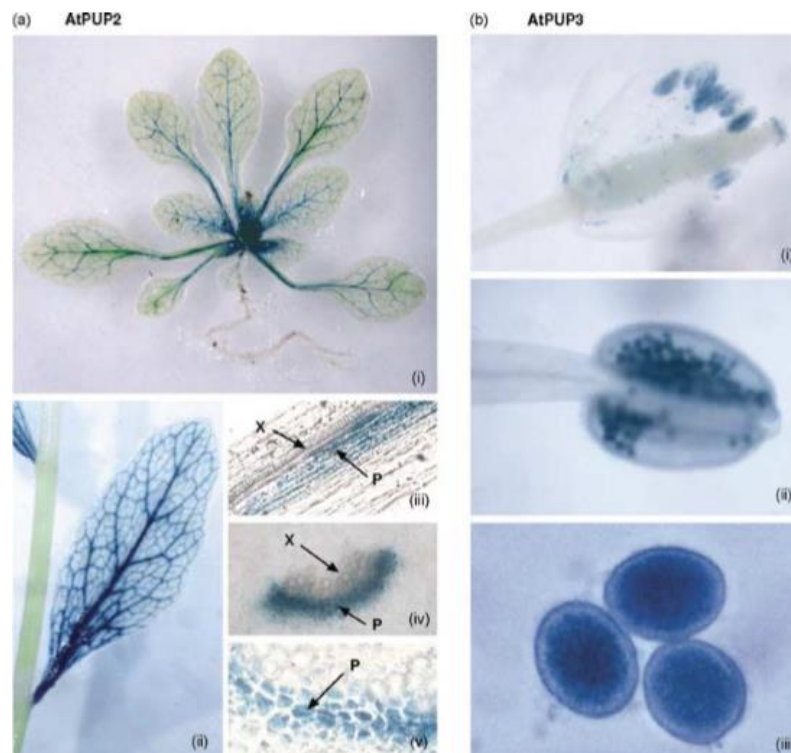
Transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* nesoucí *AtPUP1* promotorový fragment (1,9 kb) řídící expresi  $\beta$ -glukuronidasy. Celá rostlina (a), detail hydatod s epitemem a epidermis (b, c), část hydatod (d), detail vyvíjející šesule (e), děložní lístek (f), dospělý list s různorodým rozmístěním skvrn (g), Ep epidermis, Et epitem, H hydatoda, St vrchol šesule, T trichom, X xylém (Bürkle *et al.*, 2003).

Analýza dalšího homologu *AtPUP2* exprimovaného v kvasince prokázala, že *AtPUP2* zprostředkovává akumulaci adeninu radioaktivně značeného pomocí uhlíku  $^{14}\text{C}$ . Jeho aktivita byla nižší oproti *AtPUP1*, a to v důsledku nižší účinnosti zacílení *AtPUP2* na plazmatickou membránu kvasinky. Míra transportu adeninu je závislá na pH. K nejúčinnějšímu transportu docházelo při pH 3,0. S pomocí analýzy užitím rovnice Michaelise-Mentenové a nelineární regrese byla stanovena hodnota  $K_m 22,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$  při pH 3,5. *AtPUP2* rozpoznává jako substráty *trans*- a *cis*-zeatin, isopentenyladenin, kinetin, a benzylaminopurin. Transport adeninu je inhibován *trans*-zeatin ribosidem (*tZR*) (Bürkle *et al.*, 2003).

U tří a pětitydenních rostlin byla exprese *AtPUP2* detekována pomocí promotor-*GUS* fúze v cévním pletivu listů (Obr. 8a-i). U starších rostlin byla silná exprese pozorována v cévním pletivu řapíkatých listů (Obr. 8a-ii). Exprese *AtPUP2* nebyla pozorována ve stoncích a kořenech, naopak silná exprese se vyskytovala ve floému listů *Arabidopsis thaliana*. Tento výsledek koreluje s expresí *AtIPT3* (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004a) a akumulací cytokininů ve floému

*ARR5-GUS* rostlin (Aloni *et al.*, 2005). Pomocí RT-PCR byla exprese *AtPUP2* detekována v hlavních cévách a řapících, v květech a kořenech. Tento expresní profil naznačuje, že *AtPUP2* hraje roli v nakládání a transportu adeninu a cytokininů ve floému. Aktivita transportu nebyla detekována v kvasinkách exprimující *AtPUP3*, nedocházelo k akumulaci adeninu a kvasinka nebyla schopna růstu na mediu obsahující adenin jako jediný zdroj dusíku. Rozdíly v aktivitě byly pozorovány i v případě jiných transportérů a často bývají přisuzovány neúčinnému zacílení transportérů na plazmatickou membránu kvasinky. Nicméně nelze vyloučit, že *AtPUP3* plní v *Arabidopsis thaliana* jinou transportní funkci (Bürkle *et al.*, 2003).

Exprese *AtPUP3* byla omezena pouze na pyl (Obr. 8b-i-iii), což poukazuje na potenciální úlohu *AtPUP3* v transportu purinových derivátů během pylového klíčení (Bürkle *et al.*, 2003).



Obr. 8 Analýza exprese *AtPUP2* a *AtPUP3* pomocí fúze promotor-*GUS*.

(a) Transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* nesoucí *AtPUP2* promotorový fragment (1,9 kb) řídící expresi genu pro  $\beta$ -glukuronidasu. Celistvá 3 týdny stará rostlina vykazující expresi *AtPUP2* ve vaskulatuře listů (i), detail cévního pletiva řapíkatých listů dospělé rostliny (ii), podélný řez řapíkatého listu (iii), příčný řez cévním systémem listu (iv), detail cévního pletiva (v), P floém, X xylém, (b) transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* obsahující *AtPUP3* promotorový fragment (0,7 kb) řídící expresi genu pro  $\beta$ -glukuronidasu. Prašník (i), detail prašníku (ii), pylová zrna (iii) (Bürkle *et al.*, 2003).

Nukleotidy jsou v metabolismu všudypřítomné, navíc se jedná o komponenty DNA a RNA a dále plní funkci nositele energie v buňce. Koenzymy a rostlinné hormony jsou tvořeny nukleotidy (Zrenner *et al.*, 2006). Nukleotidový metabolismus je rozdělený na *de novo* syntézy, dále tzv. recyklační (salvage) reakce a degradace. Během *de novo* syntézy je spotřebováván dusík ve formě aminokyselin a energie ve formě ATP. Salvage dráha je recyklující a uchovává dusík a energii ve formě purinové nebo pyrimidinové základní struktury. Metabolické intermediáty, které mohou být recyklovány jsou nukleové báze a nukleosidy. Oba mohou být také transportovány mezi buňkami specializovanými transportními proteiny.

#### **2.4.2 Ekvilibrativní nukleosidové transportéry ENT**

Ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT) představují rodinu integrovaných transmembránových proteinů, přítomných v širokém okruhu eukaryotických organismů a zprostředkující transport hydrofilních nukleosidových substrátů. Jejich transportní činnost je důležitá v recyklační (salvage) dráze nukleotidové syntézy (Cabrita *et al.*, 2002). Podle mechanismu transportu byly nukleosidové transportéry rozděleny do dvou rodin. Obecně ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT) transportují nukleosidy po jejich koncentračním gradientu (Hyde *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 1997), avšak nedávno bylo zjištěno, že několik ENT charakterizovaných v prvocích a vyšších rostlinách *Arabidopsis thaliana* pravděpodobně fungují jako proton-symporty (Möhlmann *et al.*, 2001). Koncentrativní nukleosidové transportéry (CNT) katalyzují transport nukleosidů proti jejich koncentračnímu gradientu a jsou buď sodné nebo protonové symporty (Hyde *et al.*, 2001; Cabrita *et al.*, 2002). U doposud studovaných ENT bylo predikováno, že mají 11 transmembránových helixů (Hyde *et al.*, 2001).

Některé ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT) z *Arabidopsis thaliana* a rýže mohou transportovat cytokininové ribosidy jako je iPR a tZR (Hirose *et al.*, 2005, 2008; Sun *et al.*, 2005). Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje 8 ENT genů, kódující transportéry *AtENT1* až *AtENT8* (Li *et al.*, 2003), zatímco genom rýže nese pouze 4 ENT geny (*OsENT1–OsENT4*; Hirose *et al.*, 2005). Několik členů této rodiny již bylo charakterizováno na biochemické úrovni. Konkrétně se jedná o *AtENT1*, 3, 4, 6 a 7 z *Arabidopsis thaliana*, *OsENT2* z rýže, *HvENT1* z ječmene a *SIENT1* a *SIENT13* z brambor.

OsENT2, který je exprimován v cévních svazcích listu a floémovém pletivu zprostředkovává transport adenosinu a dalších nukleosidů, včetně iPR a tZR. Tento transportér má vyšší afinitu pro iPR, než pro tZR (Hirose *et al.*, 2005).

Byly prozkoumány biochemické vlastnosti několika AtENT, které zprostředkují cytokininový transport. Zatím bylo analyzováno pět členů této rodiny jmenovitě AtENT1, AtENT3, AtENT4, AtENT6 a AtENT7, které vykazují širokou substrátovou specifitu a transportují purinové nukleosidy adenosin a guanosin stejně jako pyrimidinové nukleosidy cytidin a uridin (Girke *et al.*, 2014). Avšak jejich transportní proces je odlišně inhibován nukleosidovými analogy jako například nitrobenzylmerkaptopurinem ribonukleosidem (NBMPR) nebo vasodilatačními léčivy dipyridamolem a diazepamem. Tyto sloučeniny jsou specifickými inhibitory ENT, které nepůsobí na CNT-typ nukleosidových transportérů (Li *et al.*, 2003). ENT *es* typ je citlivý na inhibici NBMPR, zatímco *ei* typ nikoli (Griffith a Jarvis, 1996).

AtENT1 z *Arabidopsis thaliana* byl prvním členem ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT) rodiny, který byl identifikován v rostlině a charakterizován jako celulární importer nukleosidů s vysokou afinitou k substrátu. Tento transportér vykazuje vysokou afinitu k adenosinu a je inhibován purinovými a pyrimidinovými nukleosidy stejně jako 2'-deoxynukleosidy. Jedná se tedy o transportní protein s širokou substrátovou specifitou. Navíc se ukázalo, že uridin, který je běžně transportován různými typy savčích ENT nebyl významně transportován AtENT1 (Möhlmann *et al.*, 2001). AtENT1 byl nalezen ve vakuolární membráně mezofylových buněk *Arabidopsis thaliana* a jeho exprese byla detekována téměř ve všech orgánech, ale nejvíce v pylu (Bernard *et al.*, 2011).

Gen kódující AtENT1 byl exprimován konstitutivně v rozmanitých pletivech na rozdíl od ostatních AtENT, které mají různou pletivovou specifitu. AtENT1 je zapojen spolu s AtENT4 a 8 do nakládání a vykládání nukleosidových analogů v cévním systému a v transportu na delší vzdálenost. AtENT1 katalyzuje proton spřažený transport s vyšší afinitou adenosinu, který je odolný vůči inhibici nukleosidovým analogem NBMPR a vasodilatačních drog diazepamem a dipyridamolem (Möhlmann *et al.*, 2001). AtENT1 je proto možné považovat za koncentrativní typ nukleosidového transportéru. Všechny AtENT byly exprimovány v listu a květu, což naznačuje, že sběr nukleosidů a *de novo* dráha nukleotidové syntézy mohou být

soustředěny do těchto dvou orgánů. Transkripce *AtENT1* byla kromě listu a květu silná v šešuli, stonku a kořeni (Li *et al.*, 2003).

Pouze *AtENT1* a *AtENT3* vykazují vyšší expresi v kořeni, což indikuje, že transport nukleosidů v kořeni nemusí být tak intenzivní jako v listu, květu, šešuli nebo stonku. Na základě expresního profilu a biochemických vlastností se lze domnívat, že *AtENT1* a *AtENT3* by mohly být považovány za hlavní ENT transportéry v *Arabidopsis thaliana*. Aktivita *AtENT4*, 6 a 8 je nižší a funkce *AtENT2* a *AtENT7* je omezená na specifické orgány. *AtENT3* v porovnání s *AtENT1* transportuje kromě adenosinu s vysokou afinitou také uridin a nukleotidy (AMP, ADP, a ATP). *AtENT3* je pravděpodobně lokalizován v plazmatické membráně, kde se může účastnit transportu mnoha různých substrátů.

Expres *AtENT 1, 3, 4, 6 a 8* v *Arabidopsis thaliana* byla zřetelně indukována nedostatkem nitrátu nebo aplikací fluorouracilu a methotrexátu. Nedostatek nitrátu může mít za následek inhibici *de novo* dráhy syntézy nukleotidů, což vede ke zvýšení aktivity recyklační (salvage) dráhy nukleotidové syntézy spojenou se zvýšenou transkripcí rozmanitých *AtENT*. Výsledky experimentů poskytly užitečný důkaz o funkci *AtENT* v recyklační dráze nukleotidové syntézy. Expres *AtENT2* a *AtENT7* byla pod limitem detekce a jejich potenciální role v recyklační dráze nukleotidové syntézy tudíž není pravděpodobná (Li *et al.*, 2003).

### 2.4.3 *AtABCG14* transportér

Deriváty *tZ* jsou translokovány z kořene do nadzemní části rostliny přes xylém, kde regulují její růst (Kiba *et al.*, 2013). Naopak *iP* deriváty cytokininů jsou převládající formou ve floému a jsou translokovány opačným směrem a koordinují tak vývoj kořene (Hirose *et al.*, 2008). Transport cytokininů na dlouhou vzdálenost prostřednictvím xylému a floému je dlouhodobě znám (Kudo *et al.*, 2010), avšak molekulární mechanismus tohoto procesu byl odhalen teprve nedávno.

S využitím přístupu reverzní genetiky byly systematicky charakterizovány jednotliví členové rodiny ABC transportérů (z angl. ATP Binding Cassette transporter). Při inaktivaci *AtABCG14* genu došlo k porušení dálkové translokace a distribuce *tZ* typu cytokininů syntetizovaných v kořeni. Porucha transportu *tZ* derivátů následně vede k závažným morfologickým změnám v růstu a vývoji kořenů a výhonků (Zhang *et al.*, 2014). Tyto výsledky silně naznačují, že *AtABCG14* je zapojený do klíčového kroku transportu cytokininů z kořene do xylému,

a tak usnadňuje jeho přenos do nadzemní části. Lokalizace pomocí *GFP* odhalily, že *AtABCG14* se nachází v plazmatické membráně (Ko *et al.*, 2014). Kromě převládající exprese v pericyklu a buňkách kořenové elongační zóny, které jsou zapojeny do cytokininové biosyntézy byl *AtABCG14* také exprimován v květu, šešuli a mladých listech. Jeho přesné fyziologické funkce v těchto pletivech jsou zatím stále neznámé (Zhang *et al.*, 2014).

Geny *AtIPT1* a *AtIPT7* kódující enzymy cytokininové biosyntézy byly exprimovány zejména v cévním stéle elongační zóny kořene a v kořenových floémových buňkách. Tato místa jsou považována za hlavní místa biosyntézy cytokininů v kořeni (Takei *et al.*, 2004a). Navíc xylémová šťáva z několika rostlinných druhů obsahuje *tZ* deriváty cytokininů, zvláště *trans*-zeatin ribosid (*tZR*) (Hirose *et al.*, 2008; Kuroha *et al.*, 2002).

#### **2.4.4 AtPUP14**

V nedávných studiích bylo zjištěno, že odpovědi cytokininové signalizace ve vývoji *Arabidopsis thaliana* jsou silně ovlivněny transportérem AtPUP14. Protein AtPUP14 je lokalizovaný v plazmatické membráně a transportuje aktivní cytokininy do buňky, a tak vyčerpává extracelulární zásoby cytokininů a inhibuje tak vnímání cytokininových receptorů umístěných na plazmatické membráně (Zürcher *et al.*, 2016). Ztráta funkce AtPUP14 negativně ovlivňuje morfogenezi embrya, kořene a nadzemní části rostliny (Zürcher *et al.*, 2016). Experimenty s radioaktivně značenými aktivními cytokininy naznačují, že většina transportovaných cytokininů je inaktivována přeměnou na monofosfáty enzymy adenin fosforibosyl transferasami (Zhang *et al.*, 2013). Navíc *N*- nebo *O*-glykosylace, ireverzibilní oxidativní štěpení nebo transport do dalších buněk může přispívat k odstranění intracelulárních cytokininů, a tím ovlivňovat hladinu aktivních cytokininů v rostlinných pletivech (Kieber *et al.*, 2014). *AtPUP14* je jediný člen PUP rodiny, který je přímo spojený se signální drahou cytokininů ve všech rostlinných orgánech (Zürcher *et al.*, 2016).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

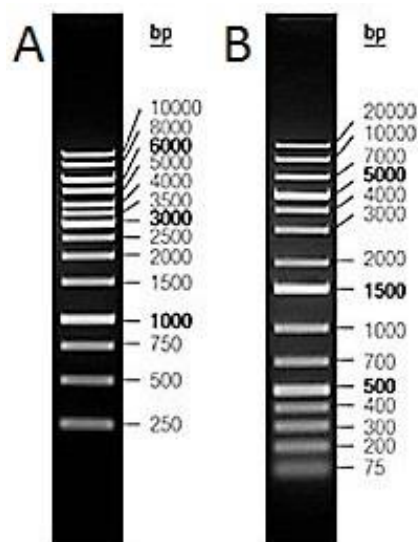
### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

- Agarosa (Amresco, USA)
- Destilovaná voda
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Penta, Česká republika)
- dNTPs 10mM (Bio Rad, USA)
- Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Ethidium bromid (NeoLab, Německo)
- Phytigel (Sigma, USA)
- Go Taq DNA polymerasa (Promega, Česká republika)
- Hydroxid draselný (KOH) (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid hořečnatý 25mM (Promega, Česká republika)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-Ner, Česká republika)
- Chloroform (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlornan sodný (Fluka, Německo)
- Isoamylalkohol (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Penta, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta, Česká republika)
- Morfolinethansulfonová kyselina monohydrát (MES) (Sigma-Aldrich, USA)
- Murashige and Skoog médium s vitamíny (Duchefa, Nizozemsko)
- Sacharosa (Lach-Ner, Česká republika)
- Tris (Duchefa, Holandsko)

Při gelové elektroforéze, byly využity standardy molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb DNA Ladder a Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (obojí od firmy Thermo Fisher Scientific) (Obr. 9).





Obr. 9 Standard molekulové hmotnosti: A Gene Ruler 1kb DNA Ladder  
B Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder.

### 3.1.2 Roztoky a média

#### MS médium

3,44 g MS s vitamíny (Murashige and Skoog médium s vitamíny)

0,8 g MES (Morfolinethansulfonová kyselina monohydrát)

8,0 g Sacharosy

4,4 g Phytagelu

pH = 5,7 upraveno  $4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KOH (hydroxidem draselným)

Sterilizační roztok (množství na 1 mikrozkušavku):

500  $\mu\text{l}$  Chlornanu sodného

100  $\mu\text{l}$  70% Ethanolu

400  $\mu\text{l}$  Sterilní vody

gDNA extrakční pufr B

$200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris/HCl

$250 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl

$20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA

0,5% SDS

pH = 8,0

CIA (chloroform: isoamylalkohol, v poměru 24:1)

TE pufr

$10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tris/HCl

1 mmol·dm<sup>-3</sup> EDTA

pH = 8,0

Agarosový gel

1% (w/ v) Agarosa v 1x TAE pufr

TAE pufr

1 mol·dm<sup>-3</sup> EDTA

40 mol·dm<sup>-3</sup> Tris-acetát

pH = 8,0

### 3.1.3 Biologický materiál

K práci byly využita semena T-DNA inzerčních linií *Arabidopsis thaliana* (Tab. 1), která byla získána z databáze The Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC).

Tab. 1 T-DNA inzerční linie *Arabidopsis thaliana*

Gen	Název linie
<i>ENT1-At1g70330</i>	<i>ent1-2</i> SALK_025174
	<i>ent1-3</i> SALK_104866
<i>AAC1-At3g08580</i>	<i>aac1-1</i> SALK_107166
	<i>aac1-2</i> SAIL_247_G08
<i>ADNT1-At4g01100</i>	<i>adnt1-1</i> WISCDXSLOX476E06

### 3.1.4 Programy a software

Gel Doc EZ System (Bio Rad, USA)

Image Lab™ Software

### 3.1.5 Přístroje

Autokláv HST 5-6-8 (Zirbus, Německo)

Centrifuga stolní (Eppendorf, ČR)

Digitální váhy Traveller TA302 (Ohaus, Švýcarsko)

Elektromagnetická míchačka (Boeco, Německo)

Flowbox (Schoeller INSTRUMENT, ČR)

Fytokomora (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)

Inkubátor (65 °C) (Mettler, Německo)

pH metr (Eutech Instruments, Singapur)

Stolní pikofuga (Biosan, Litva)

Termoblok Thermomixer komfort (Eppendorf, Německo)

Termocykler Applied Biosystems Veriti (Life Technologies, USA)

Vortex (Labnet, USA)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava MS média ke kultivaci semen *Arabidopsis thaliana*

Nejprve byly odváženy jednotlivé látky na digitální váze, které byly následně přidány s výjimkou Phytagelu, do kádinky s 780 ml destilované vody. Poté byla kádinka s míchadlem dána na elektromagnetickou míchačku. Za pomoci elektromagnetické míchačky došlo k rozpuštění látek v kádince. Do kádinky byla vložena elektroda pH metru a pH bylo upraveno 4 mol·dm<sup>-3</sup> KOH na hodnotu 5,7. Po ustálení pH byla elektroda vyjmuta z kádinky a míchání na elektromagnetické míchačce bylo ukončeno. V kádince byl po úpravě pH roztoku doplněn objem destilovanou vodou na 800 ml a nakonec byl přidán Phytigel. Takto připravené MS médium bylo vysterilizováno pomocí autoklávu při 121 °C, po dobu 23 minut.

### **3.2.2 Sterilizace semen *Arabidopsis thaliana***

Do mikrozkušavek se semeny *Arabidopsis thaliana* bylo v laminárním boxu napipetováno 1000  $\mu$ l 70% ethanolu a mikrozkušavky byly vortexovány po dobu 3 minut. Delší ponechání semen v ethanolu při sterilizaci by mohlo mít negativní vliv na klíčení. Poté byl odpipetován supernatant a bylo napipetováno 500  $\mu$ l sterilizačního roztoku. Mikrozkušavky byly vortexovány po dobu 10 minut. V případě, že semena nebyla usazena po zvortexování v mikrozkušavkách, byla stočena na stolní pikofuze. Supernatant byl odpipetován a semena byla třikrát promyta 1000  $\mu$ l sterilní vody po dobu 3 minut. Počet promytí sterilní vodou se odvíjel od množství semen v mikrozkušavce. Pokud se vyskytovalo větší množství semen v mikrozkušavce, semena byla vícekrát promyta. Semena byla promyta sterilní vodou od chlornanu sodného a ethanolu, které by rovněž přispívaly negativním vlivem na klíčení semen.

### **3.2.3 Výsev semen *Arabidopsis thaliana* na MS médium**

Sterilizovaná semena *Arabidopsis thaliana* byla vyseta na kulaté Petriho misky s MS médiem ve flowboxu pomocí sterilního párátko nebo sterilní špičky. Semena byla vysévána rovnoměrně po celé ploše misky v rozestupech cca 1 cm. Na jednu Petriho misku s MS médiem připadá cca 60 semen. Poté byly misky olepeny porézní lepící páskou, aby bylo zabráněno kontaminaci z vnějšího prostředí. Petriho misky se semeny byly ponechány v ledničce při 4 °C (ve tmě) po dobu 2 dnů, aby došlo k sjednocení klíčení. Misky byly po dvou dnech přemístěny z lednice do fytokomory, kde byly kultivovány při 21 °C, vlhkosti 70% a světelném režimu (16 hodin světlo/8 hodin tma) po dobu 14 dnů. Po vyklíčení prvních pravých listů byly rostliny za pomoci pinzety přesazeny do květináčků se zeminou. Přesazené rostliny byly dopěstovány ve fytokomoře při 24 °C, vlhkosti 60% a světelném režimu (16 hodin světlo/8 hodin tma).

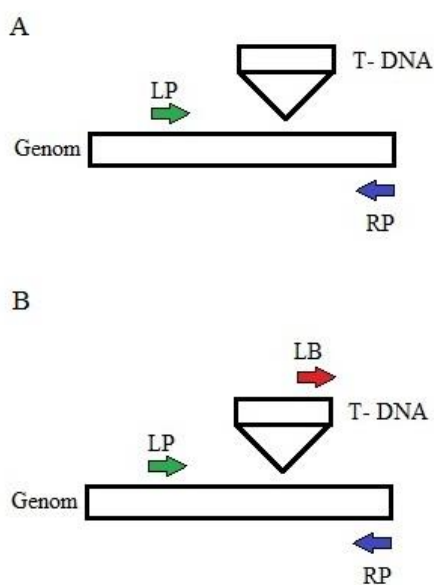
## 3.2.4 Genotypizace

### 3.2.4.1 Selektce homozygotní linie

Byla provedena PCR analýza u vybraných linií se specifickými primery pro WT alelu (wild type, tedy bez inzerce) a primery specifickými pro alelu s T-DNA inzercí (detekce tzv. knock-out, KO kazety).

U první PCR reakce sloužící k detekci WT alely, primery LP (levý primer) a RP (pravý primer) komplementárně nasedají na gDNA v místech ohraničujících očekávanou T-DNA inzerci. Pokud není přítomna T-DNA inzerce získáme od LP k RP PCR produkt o velikosti 1000 bp. Pozitivní signál získáme pouze u WT nebo heterozygota. V případě výskytu T-DNA inzerce jsou od sebe místa nasedání primerů příliš vzdálená (až 8000 bp) a PCR produkt se tak nestihne nasyntetizovat (Obr. 10A).

U druhé reakce (detekce KO kazety) primer RP zůstává stejný, zatímco místo LP primeru použijeme primer LB, který nasedá přímo v T-DNA inzerci. Pokud není přítomna T-DNA inzerce, PCR produkt nevzniká. Ovšem v případě přítomné T-DNA inzerce s LB a RP primery můžeme očekávat vznik PCR produktu o velikosti cca 500 bp (Obr. 10B). Pozitivní signál tedy získáme u homozygota nebo heterozygota.



Obr. 10 A) Detekce WT alely (wild type-divoký typ, tedy bez inzerce), B) Detekce T-DNA inzerce (KO kazeta), LP levý primer, RP pravý primer, LB primer, T-DNA transgenní DNA.

### 3.2.5 Izolace genomové DNA z pravých listů *Arabidopsis thaliana*

Jeden malý pravý list byl odebrán z rostliny *Arabidopsis thaliana*, přenesen do mikrozkuřavky, k němu bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  gDNA extrakčního pufru B a 120  $\mu\text{l}$  CIA. Do mikrozkuřavky se směs byla umístěna 1 ocelová kulička a mikrozkuřavka byla homogenizována v oscilačním mlýnku při 25 rps po dobu 50 s. Poté byl vzorek centrifugován při 11 000 g po dobu 3 minut. Následně byl přenesen supernatant do nové mikrozkuřavky a bylo přidáno 750  $\mu\text{l}$  96% ethanolu. Obsah byl promíchán převrácením mikrozkuřavky a centrifugován při 11 000 g po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a pelet promyt 500  $\mu\text{l}$  70% ethanolu. Vzorek byl centrifugován při 11 000 g po dobu 2 minut. Supernatant byl odstraněn a pelet vysušen v laminárním boxu. Nakonec byl pelet rozpuštěn v 50  $\mu\text{l}$  TE pufru pH 8,0.

### 3.2.6 PCR

Reakční směs pro PCR byla připravena podle předpisu (Tab. 2). Pro detekci WT alely a T-DNA inserce (detekce KO kazety) byly použity primery uvedené v (Tab. 3). PCR probíhala za podmínek uvedených v (Tab. 4), teplota nasedání primerů se lišila v závislosti na kombinaci primerů pro konkrétní linii.

Tab. 2 Složení reakční směsi pro PCR reakci

Složka	Koncentrace	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
Green buffer	5x	3
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol·dm <sup>-3</sup>	1,5
dNTPs	10 mmol·dm <sup>-3</sup>	0,15
Primer Forward	10 mmol·dm <sup>-3</sup>	0,75
Primer Reserve	10 mmol·dm <sup>-3</sup>	0,75
Templát (gDNA)		1
Go Taq polymerasa	5U/ $\mu\text{l}$	0,075
Voda		7,8
Celkový objem		15

Tab. 3 Nastavení PCR reakce s primery pro jednotlivé linie *Arabidopsis thaliana*

Gen	Linie	Primer pro WT alelu	Teplota nasedání primerů	Sekvence primerů (5'-3')
<i>ENT1</i> -At1g70330	<i>ent1-2</i> SALK_025174	ENT1_LP	57 °C	CCA TTG ATG CTC TCC TGG AAC TC
		ENT1_2_RP	58 °C	CGA CGG CCG TGG AAG GAT AGA
	<i>ent1-3</i> SALK_104866	ENT1_LP	57 °C	CCA TTG ATG CTC TCC TGG AAC TC
		ENT1_3_RP	59 °C	CGG CGT ATA ATC CGA CCT GTC C
<i>AAC1</i> -At3g08580	<i>aac1-1</i> SALK_107166	AAC1_LP	59 °C	CGT CTC TCT TCT CTG CTT CGC C
		AAC1_2_RP	59 °C	CCT TCA TCC TTA ATC GTC CTG CCG
	<i>aac1-2</i> SAIL_247_G08	AAC1_LP	59 °C	CGT CTC TCT TCT CTG CTT CGC C
		AAC1_2_RP	59 °C	CCT TCA TCC TTA ATC GTC CTG CCG
<i>ADNT1</i> -At4g01100	<i>adnt1-1</i> WISCDSLOX476E06	ADNT1_LP	59 °C	CAC AAG TGA GCC TCG TTA CAA CCG
		ADNT1_RP	59 °C	GTA CAG TGG GAC AGT CCA AGG ATT G
Gen	Linie	Primer pro KO alelu	Teplota nasedání primerů	Sekvence primerů (5'-3')
<i>ENT1</i> -At1g70330	<i>ent1-2</i> SALK_025174	LbaI_OP	59 °C	TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G
		ENT1_2_RP	58 °C	CGA CGG CCG TGG AAG GAT AGA
	<i>ent1-3</i> SALK_104866	LbaI_OP	59 °C	TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G
		ENT1_3_RP	59 °C	CGG CGT ATA ATC CGA CCT GTC C
<i>AAC1</i> -At3g08580	<i>aac1-1</i> SALK_107166	LbaI_OP	59 °C	TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G
		AAC1_2_RP	59 °C	CCT TCA TCC TTA ATC GTC CTG CCG
	<i>aac1-2</i> SAIL_247_G08	SAIL_LB2	60 °C	TAT TAT ATC TTC CCA AAT TAC CAA TAC A
		AAC1_2_RP	59 °C	CCT TCA TCC TTA ATC GTC CTG CCG
<i>ADNT1</i> -At4g01100	<i>adnt1-1</i> WISCDSLOX476E06	WISDSLOX_p74	60 °C	AAC GTC CGC AAT GTG TTA TTA AGT TGT C
		ADNT1_RP	59 °C	GTA CAG TGG GAC AGT CCA AGG ATT G

Tab. 4 Nastavení podmínek pro PCR reakci

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	3 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	52	30 s	30
Elongace	72	1 min 10 s	
Závěrečná elongace	72	3 min	1

### 3.2.7 Gelová elektroforéza

Při přípravě 1% roztoku agarosy bylo odváženo 5 g agarosy, která byla přidána v 10 ml 1x TAE pufru a následně byla doplněna destilovanou vodou na 500 ml. Poté byla agarosa dána do mikrovlnné trouby po dobu 3 minut, dokud nebyla zcela rozpuštěna.

Do elektroforetické vany byl nalit 1% roztok agarosy a do roztoku bylo napipetováno 8  $\mu$ l ethidium bromidu a promícháno. Poté byly do agarosy vloženy hřebínky, aby vytvořily jamky a gel byl ponechán ztuhnout cca 20 minut. Gel byl přenesen do elektroforetické komůrky a přelit 1x TAE pufrem, aby byly jamky zcela potopeny. Na 1% agarosový gel bylo po ukončení PCR reakce napipetováno do první jamky 5  $\mu$ l markru Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (nebo Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder) a do zbývajících jamek 8  $\mu$ l reakční směsi.

Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru po dobu 30 minut při 120 V. Gel byl po ukončení elektroforézy opatrně vyjmut z elektroforetické vany a dokumentován pomocí systému Gel Doc EZ System a softwaru Image Lab™ Software.

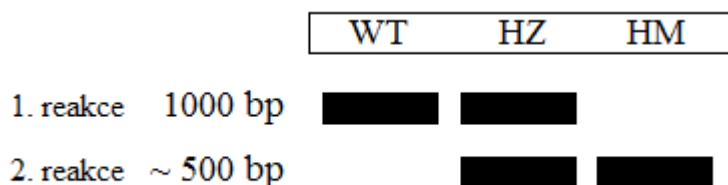


## 4 VÝSLEDKY

V rámci této práce bylo analyzováno pět T-DNA inzerčních linií *Arabidopsis thaliana*, lokalizovaných ve třech genech AT1G70330, AT3G08580 a AT4G01100 kódující hypotetický tonoplastový cytokininový transportér. Semena vybraných linií byla vyseta a vypěstované rostliny byly podrobeny genotypování za účelem selekce homozygotní linie, tedy linie nesoucí T-DNA inzerce v obou alelách studovaného genu.

Vyhodnocením gelové elektroforézy byly získány PCR produkty o různé velikosti. Srovnáním PCR reakce s primery pro WT alelu (wild type, divoký typ) a PCR reakce s primery pro KO alelu získáme informaci o genotypu konkrétní rostliny, zda se jedná o homozygota, heterozygota nebo divoký typ. Pokud získáme produkt o velikosti 1000 bp mluvíme o alele bez inzerce, alespoň na jedné sadě chromozomu. V případě mutantní alely získáme produkt o velikosti 500 bp.

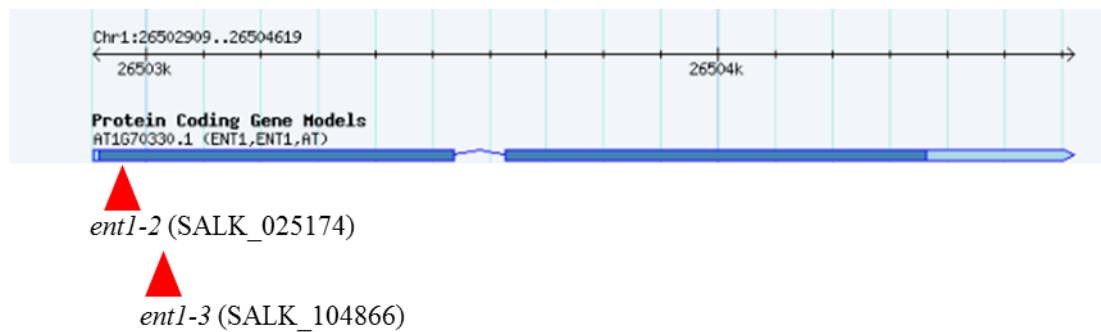
Divoký typ (WT) je rostlina bez mutace, vzniká tedy pouze produkt o velikosti 1000 bp. Heterozygot (HZ) má jednu z alel s výskytem inzerce T-DNA a druhou bez přítomnosti inzerce, vznikají tedy oba PCR produkty. Homozygot (HM) má obě alely s výskytem inzerce T-DNA, proto vznikne pouze jeden produkt o velikosti 500 bp (Obr. 11).



Obr. 11 Princip PCR genotypování. Pomocí specifických primerů dochází v 1. reakci k detekci WT alely (cca 1000 bp), zatímco ve 2. reakci je detekována T-DNA inzerce (cca 500 bp). Divoký typ (WT), heterozygot (HZ) a homozygot (HM).

#### 4.1 EQUILIBRATIVE NUCLEOTIDE TRANSPORTER 1 (ENT1)

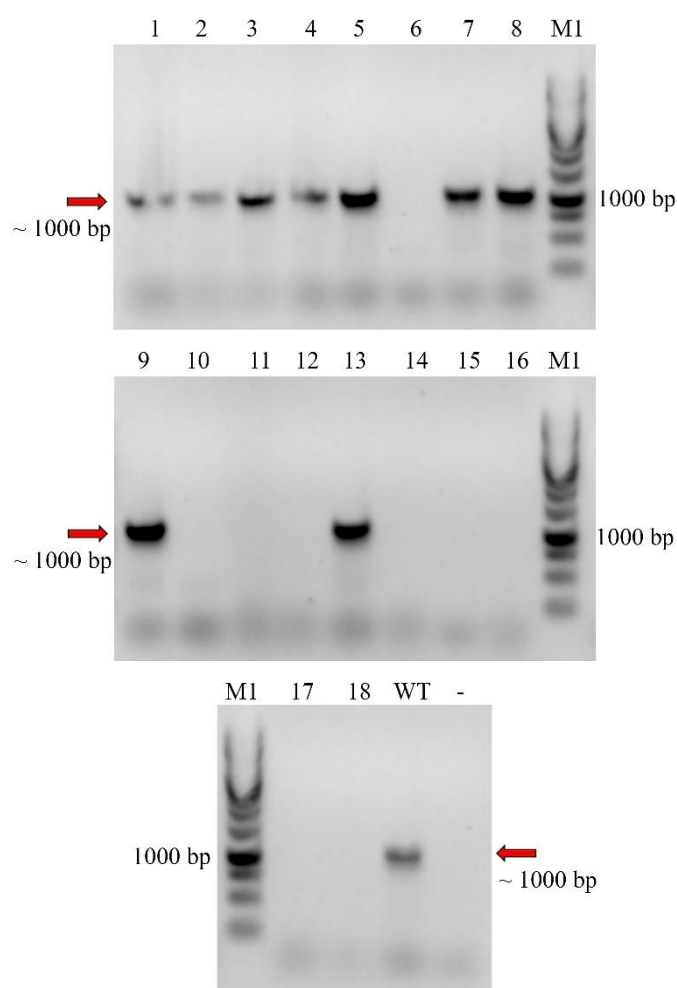
Prvním kandidátním genem byl AT1G70330 kódující EQUILIBRATIVE NUCLEOTIDE TRANSPORTER 1 (ENT1). Byly vybrány dvě T-DNA inzerční linie *ent1-2* SALK\_025174 a *ent1-3* SALK\_104866. Obě T-DNA inzerce jsou lokalizovány v prvním ze dvou exonů, krátce za iniciačním kodonem genu (Obr. 12).



Obr. 12 Pozice inzerčí *ent1-2* SALK\_025174 a *ent1-3* SALK\_104866 v úseku genu *ENT1*.

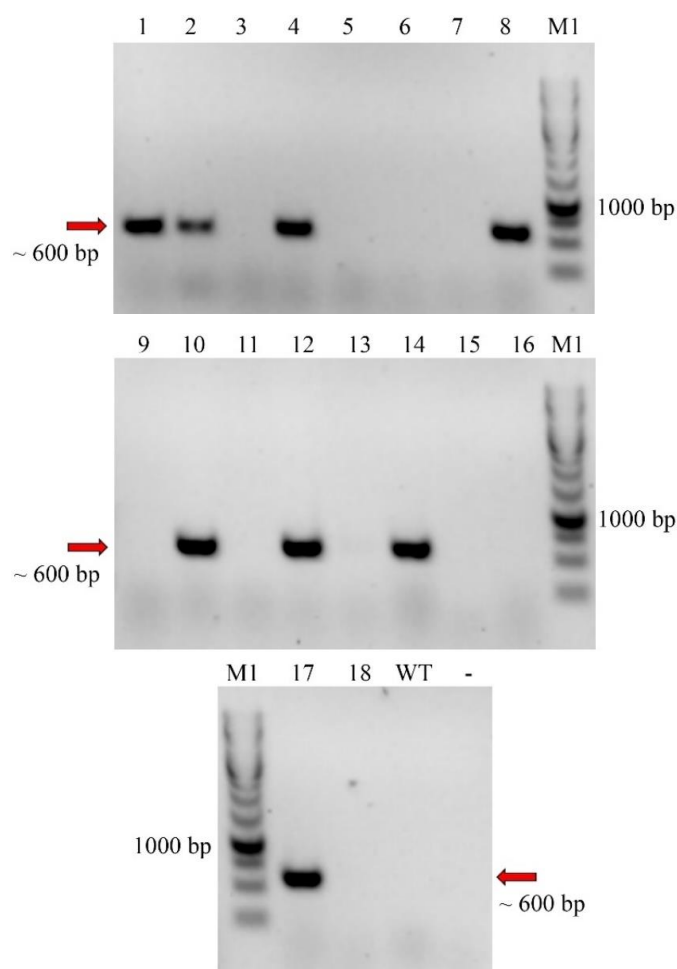
U linie *ent1-2* SALK\_025174 s knockoutovaným genem *ENT1* (AT1G70330) vyklíčilo celkem 18 kandidátních rostlin, u kterých byl stanovován genotyp. Za tímto účelem byly nastaveny dvě PCR reakce. První PCR reakce s primery pro WT alelu (nepřerušená alela KO kazetou) a druhá PCR reakce s primery pro detekci KO kazety (přerušená alela KO kazetou).

V případě detekce WT alely (nepřerušená alela KO kazetou) dostaneme produkt o velikosti 1000 bp, a to pouze u heterozygota nebo WT. Pozitivní signál byl získán u rostlin 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 13 a jamky WT Col-0 pozitivní kontroly. Zatímco u homozygota nedostaneme žádný PCR produkt. U rostlin 6, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18 nebyl signál zaznamenán (Obr. 13).



Obr. 13 Vyhodnocení PCR reakce a gelové elektroforézy linie *ent1-2* SALK\_025174 s WT primery (ENT1\_LP, ENT1\_2\_RP), kandidátní rostliny (1-18), M1 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb DNA, WT Col-0 pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

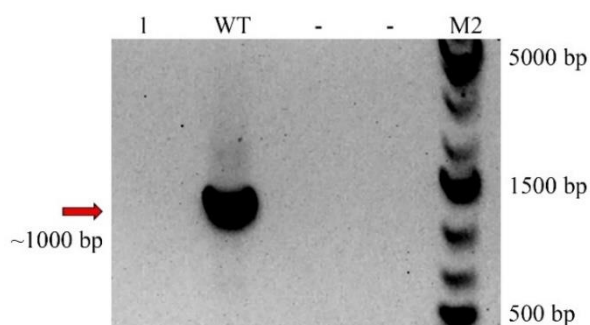
U linie *ent1-2* SALK\_025174 v případě detekce KO kazety dostaneme produkt o velikosti 600 bp, pokud se jedná o homozygota nebo heterozygota. Pozitivní signál byl získán u rostlin 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 17. Zatímco u WT nedostaneme žádný produkt. U rostlin 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 16, 18 a jamky WT nebyl signál detekován (Obr. 14). Na základě této analýzy byly identifikovány čtyři homozygotní rostliny číslo 10, 12, 14 a 17, které byly dopěstovány a semena byla sklizena pro další analýzy. Pozice T-DNA inserce byla ověřena sekvenováním PCR produktu získaného při detekci KO kazety.



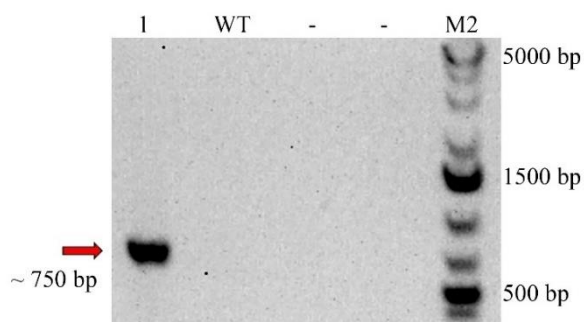
Obr. 14 Vyhodnocení PCR reakce a gelové elektroforézy linie *ent1-2* SALK\_025174 s primery pro KO kazetu (Lba<sub>OP</sub>, ENT1\_2\_RP), kandidátní rostliny (1-18), M1 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb DNA, WT Col-0 pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

U druhé kandidátní linie *ent1-3* SALK\_104866 s knockoutovaným genem *ENT1* (AT1G70330) vyklíčila pouze jediná rostlina, která byla podrobena genotypování. V případě detekce WT alely (nepřerušená alela T-DNA kazetou) dostaneme PCR produkt o velikosti 1000 bp. Dle očekávání byl PCR produkt detekován u vzorku WT Col-0 sloužící jako pozitivní kontrola. U rostliny 1 nebyl signál zaznamenán (Obr. 15).

U linie *ent1-3* SALK\_104866 dostaneme v případě detekce KO kazety PCR produkt o velikosti 750 bp. U rostliny 1 byl získán pozitivní signál, zatímco u WT nebyl signál zaznamenán (Obr. 16). Na základě této analýzy genotypu je zjevné, že rostlina číslo 1 je homozygotní v dané T-DNA inzerci. Pozice T-DNA inzerce byla opět ověřena sekvenováním PCR produktu získaného při detekci KO kazety.



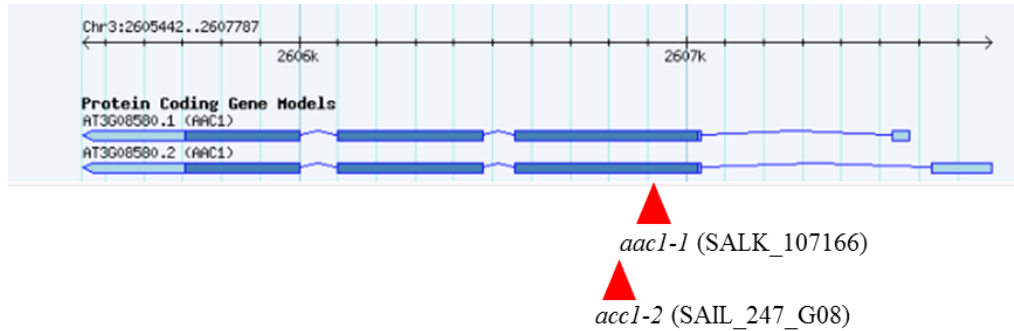
Obr. 15 Vyhodnocení PCR reakce a gelové elektroforózy linie *ent1-3* SALK\_104866 s WT primery (ENT1\_LP, ENT1\_3\_RP) jamka (1) rostlina, M2 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb Plus DNA, WT Col-0 pozitivní kontrola, - negativní kontrola.



Obr. 16 Vyhodnocení PCR reakce a gelové elektroforózy linie *ent1-3* SALK\_104866 s primery pro detekci KO kazety (LbaI\_OP, ENT1\_3\_RP) jamka (1) rostlina, M2 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb Plus DNA, WT Col-0 pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

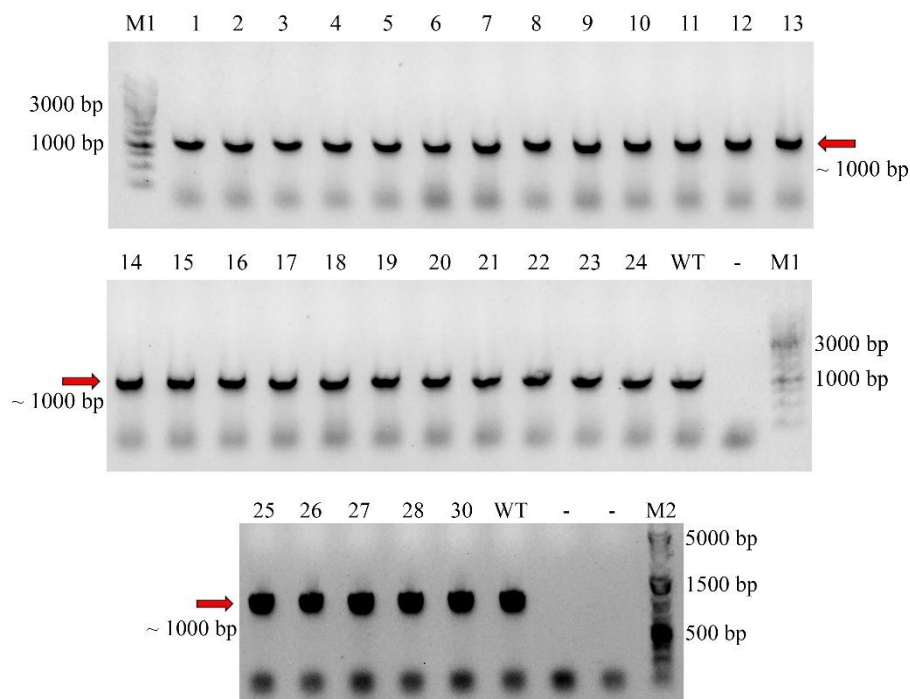
## 4.2 ADP/ATP CARRIER 1 (AAC1)

Dalším kandidátem domnělého cytokininového transportéru byl gen AT3G08580, kódující ADP/ATP CARRIER 1 (AAC1). Opět byly vybrány dvě T-DNA inzerční linie *aac1-1* SALK\_107166 a *aac1-2* SAIL\_247\_G08. Obě inzerce jsou lokalizovány v prvním ze tří exonů, poblíž iniciačního kodonu (Obr. 17).



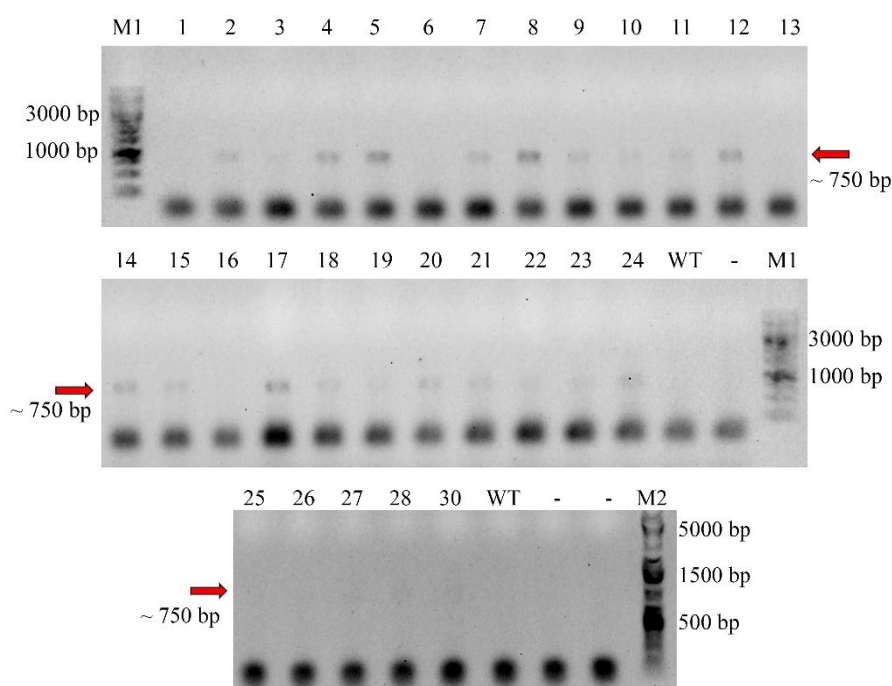
Obr. 17 Pozice inzerce *aac1-1* SALK\_107166 a *aac1-2* SAIL\_247\_G08 v úseku genu *AAC1*.

U linie *aac1-1* SALK\_107166 s knockoutovaným genem *AAC1* (AT3G08580) vyklíčilo celkem 30 kandidátních rostlin u kterých byl stanoven genotyp. V případě detekce WT alely (nepřerušená alela T-DNA kazetou) dostaneme produkt o velikosti 1000 bp. Pozitivní signál byl získán u všech 30 kandidátních rostlin a jamky WT Col-0 sloužící jako pozitivní kontrola (Obr. 18).



Obr. 18 Vyhodnocení PCR reakce a gelové elektroforézy linie *aac1-1* SALK\_107166 s WT primery (*AAC1\_LP*, *AAC1\_2\_RP*), kandidátní rostliny (1-30), M1 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb DNA a M2 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb Plus DNA, WT Col-0 pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

U linie *aac1-1* SALK\_107166 v případě detekce KO kazety dostaneme produkt o velikosti 750 bp. Pozitivní, avšak velmi slabý signál byl zaznamenán u rostlin 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 a 24. U jamek 1, 3, 6, 13, 16, 25, 26, 27, 28, 30 a WT, sloužící jako negativní kontrola nebyl signál detekován (Obr. 19). Z důvodu velmi slabého signálu byla PCR zopakována, tentokrát nebyl detekován signál u žádné kandidátní rostliny. Domníváme se, že původní slabý signál vznikal nespecificky. Na základě této analýzy se zdá, že žádná ze 30 kandidátních rostlin nenese T-DNA inzerci v genu *AAC1*. Nepodařilo se tedy získat žádnou homozygotní ani heterozygotní *aac1-1* linii.

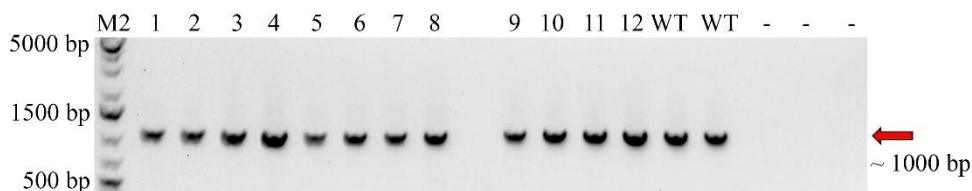


Obr. 19 Vyhodnocení PCR reakce a gelové elektroforózy linie *aac1-1* SALK\_107166 s primery KO kazetu (LbaI\_OP, AAC1\_2\_RP), jamky (1-30) rostliny, M1 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb, M2 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb Plus DNA, WT Col-0 pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

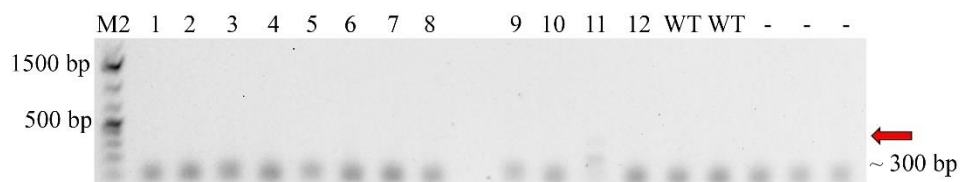


U linie *aac1-2* SAIL\_247\_G08 s knockoutovaným genem *AAC1* (AT3G08580) vyklíčilo 12 kandidátních rostlin, které byly podrobeny genotypování. V případě detekce WT alely (nepřerušená alela T-DNA kazetou) dostaneme PCR produkt o velikosti 1000 bp. Pozitivní signál byl získán u všech 12 kandidátních rostlin a WT Col-0 sloužící jako pozitivní kontrola (Obr. 20).

U linie *aac1-2* SAIL\_247\_G08 v případě detekce KO kazety dostaneme produkt o velikosti 300 bp. U žádné ze 12 kandidátních rostlin a WT Col-0 sloužící jako negativní kontrola, nebyl získán pozitivní signál (Obr. 21). Na základě této analýzy se zdá, že žádná ze 12 kandidátních rostlin nenese T-DNA inzerci v genu *AAC1*. Nepodařilo se tedy získat žádnou homozygotní ani heterozygotní *aac1-2* linii.



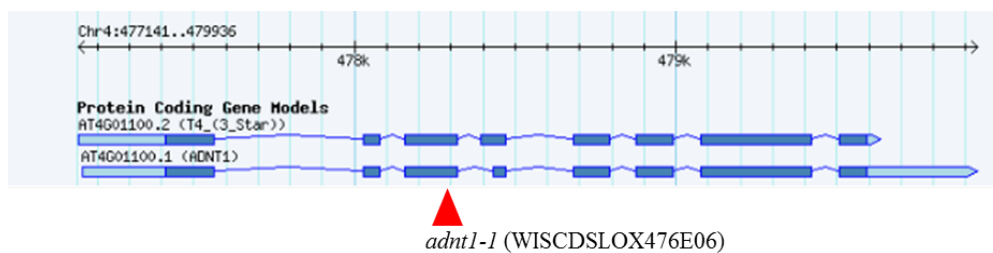
Obr. 20 Vyhodnocení PCR reakce a gelové elektroforézy linie *aac1-2* SAIL\_247\_G08 s WT primery (*AAC1\_LP*, *AAC1\_2\_RP*), kandidátní rostliny (1-12), M2 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb Plus DNA, WT Col-0 pozitivní kontrola, - negativní kontrola.



Obr. 21 Vyhodnocení PCR reakce a gelové elektroforézy linie *aac1-2* SAIL\_247\_G08 s primery pro detekci KO kazety (*SAIL\_LB2*, *AAC1\_2\_RP*) jamky (1-12) rostlina, M2 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb Plus DNA, WT Col-0 pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

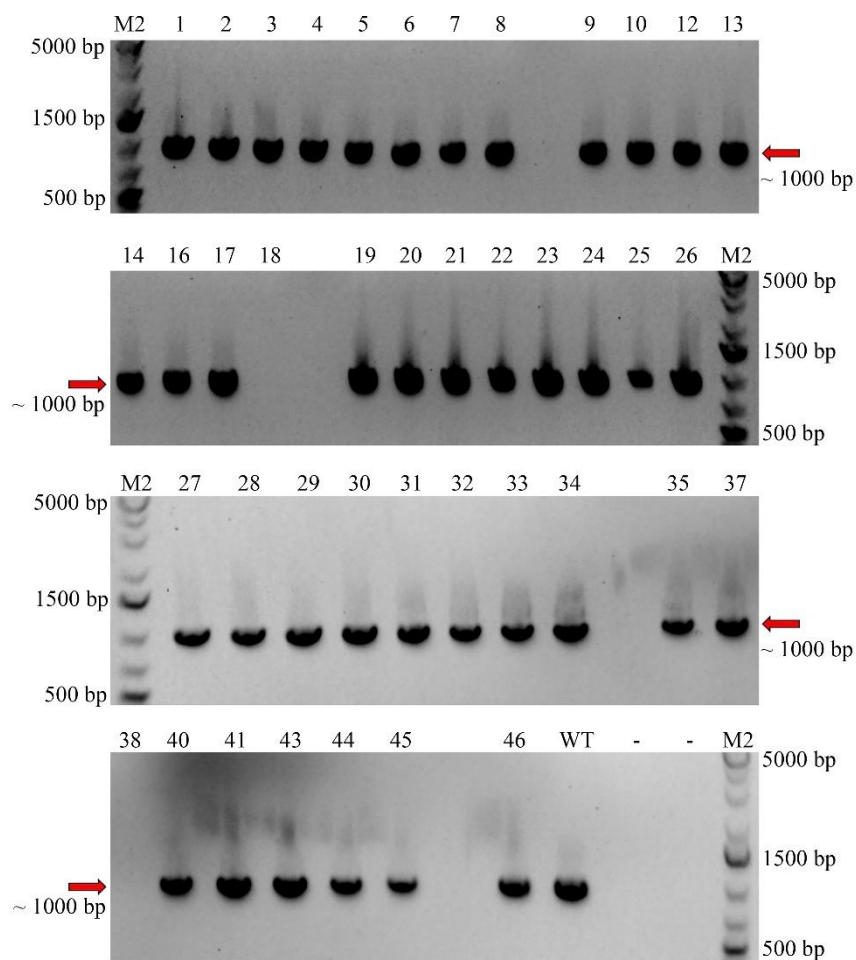
### 4.3 ADENINE NUCLEOTIDE TRANSPORTER 1 (ADNT1)

Třetím kandidátním genem je AT4G01100 kódující ADENINE NUCLEOTIDE TRANSPORTER 1 (ADNT1). V tomto případě byla vybrána linie *adnt1-1* WISCDSLOX476E06, nesoucí T-DNA inzerci ve třetím z osmi exonů genu *ADNT1* (Obr. 22).



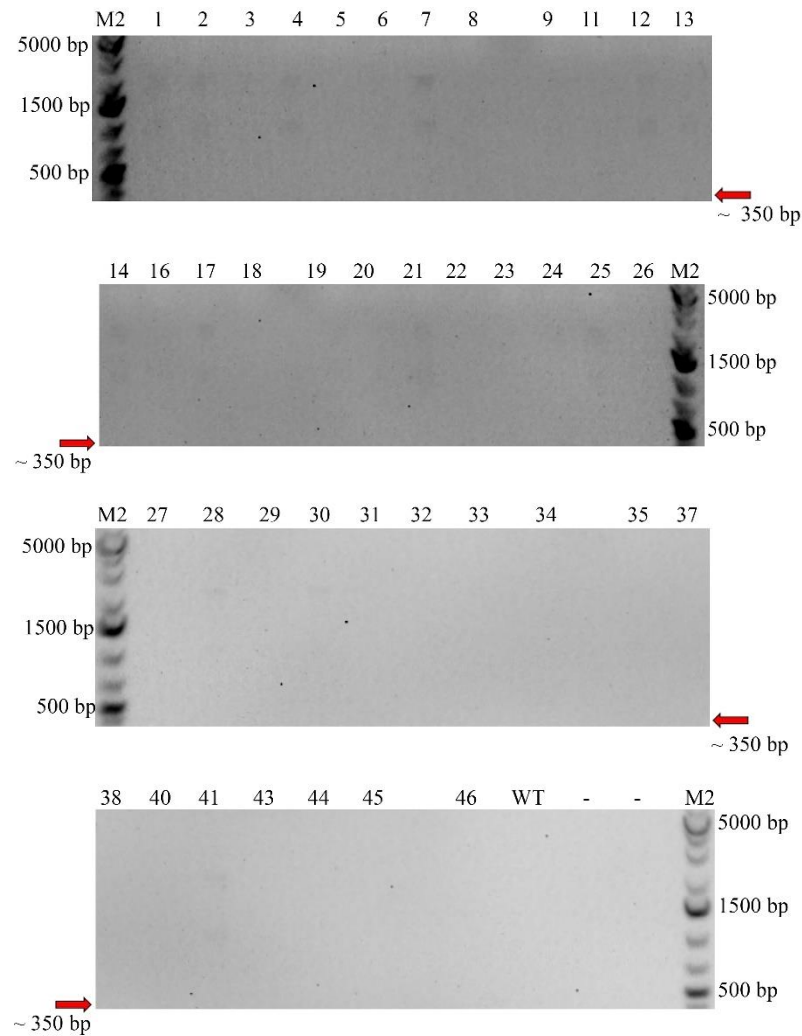
Obr. 22 Pozice inzerce *adnt1-1* WISCDSLOX476E06 v úseku genu *ADNT1*.

U linie *adnt1-1* WISCDSLOX476E06 s knockoutovaným genem *ADNT1* (AT4G01100) vyklíčilo celkem 46 semen, které byly podrobeny genotypizaci. V případě detekce WT alely (nepřerušená alela T-DNA kazetou) dostaneme produkt o velikosti 1000 bp. Pozitivní signál byl získán u všech rostlin s výjimkou rostlin číslo 18 a 38. U rostliny WT Col-0 sloužící jako pozitivní kontrola byl taktéž získán signál (Obr. 23).



Obr. 23 Vyhodnocení PCR reakce a gelové elektroforézy linie *adnt1-1* WISCDSLOX476E06 s WT primery (ADNT1\_LP, ADNT1\_RP), kandidátní rostliny (1-46), M2 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb Plus DNA, WT Col-0 pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

U linie *adnt1-1* WISCDSLOX476E06 v případě detekce T-DNA kazety dostaneme produkt o velikosti 350 bp. U žádné ze 46 kandidátních rostlin a WT nebyl signál detekován (Obr. 24). Na základě této analýzy se zdá, že žádná ze 46 kandidátních rostlin nenese T-DNA inzerci v genu *ADNT1*. Nepodařilo se tedy získat žádnou homozygotní ani heterozygotní *adnt1-1* linii.



Obr. 24 Vyhodnocení PCR reakce a gelové elektroforózy linie *adnt1-1* WISCDSLOX476E06 s primery pro detekci KO kazety (WISDSLOX\_p74, ADNT1\_RP), kandidátní rostliny (1-46), M2 standard molekulové váhy Gene Ruler 1 kb Plus DNA, WT Col-0 pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

## 5 DISKUZE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo vyselektovat homozygotní rostliny *Arabidopsis thaliana* vybraných T-DNA linií ve třech genech kódujících hypotetické tonoplastové transportéry cytokininů. Jedná se o klasickou metodu tzv. reverzní genetiky, kdy je studován fenotypový projev genu s neznámou funkcí. Čtecí rámec genu je přerušen náhodně vloženou T-DNA inzerční kazetou vnesenou prostřednictvím rostlinného patogenu *Agrobacterium tumefaciens*. V současné době existuje několik veřejných databází poskytujících T-DNA inzerční linie *Arabidopsis thaliana* se známou lokalizací jednotlivých inzercí. Jedná se například o databáze Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC), Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC), RIKEN Bioresource Center (BRC)/ SENDAI *Arabidopsis* Seed Stock Center (SASSC) a INRA-Versailles Genomic Resource Center. Aby bylo možno použít poskytovaný rostlinný materiál pro následné experimenty je nejprve nutné ověřit přítomnost T-DNA inzerční kazety v daném genu pomocí metody PCR se specifickými páry primerů, tzv. genotypizace. Metoda umožňuje od sebe odlišit rostliny homozygotní a heterozygotní, nesoucí T-DNA inzerci v obou, respektive pouze v jedné alele daného genu, od rostlin divokého typu (WT), které postrádají danou kazetu. Vyselektovaná homozygotní linie má již zafixovanou T-DNA kazetu, v dalších generacích nedochází k segregaci genu a tyto linie jsou tedy vhodné pro další experimenty, např. analýzu fenotypového projevu. Inzerce nacházející se v exonu a pokud možno co nejbližší iniciačního kodonu značně zvyšují šanci, že transkript cílového genu bude nefunkční vlivem posunu čtecího rámce, případně nebude exprimován vůbec. Tuto skutečnost je však nutné ověřit na úrovni RNA metodou PCR s využitím reverzní transkripce (RT-PCR) a porovnat se situací v rostlině divokého typu.

V našem případě byly nejprve vybrány kandidáti ze seznamu proteinů identifikovaných v tonoplastovém proteomu (Jaquinod *et al.*, 2007) na základě homologie ke známým cytokininovým transportérům třídy Purinových permeas (PUP) a Ekvilibrativních Nukleosidových Transportérů (ENT), případně jiných obecných transportérů.

V rámci této práce byly selektovány dvě T-DNA inzerční linie *ent1-2* SALK\_025174 a *ent1-3* SALK\_104866 lokalizovaných v genu kódujícím

EQUILIBRATIVE NUCLEOTIDE TRANSPORTER 1 (ENT1; AT1G70330). Obě mutace se nacházejí v prvním ze dvou exonů genu, hned za iniciačním kodonem. Druhým kandidátem tonoplastového cytokininového transportéru byl ADP/ATP CARRIER 1 (AAC1; AT3G08580), u kterého byly studovány dvě inzerční linie *aac1-1* SALK\_107166 a *aac1-2* SAIL\_247\_G08. Obě inzerce jsou opět lokalizovány v prvním ze tří exonů, poblíž iniciačního kodonu. Posledním studovaným genem byl ADENINE NUCLEOTIDE TRANSPORTER 1 (ADNT1; AT4G01100). U tohoto genu byla vybrána pouze jedna vhodná T-DNA inzerční linie *adnt1-1* WISCDSLOX476E06, nesoucí T-DNA inzerce ve třetím z osmi exonů genu *ADNT1*. Semena jednotlivých linií *Arabidopsis thaliana*, získaná z veřejně dostupných zdrojů (většinou z databáze NASC), byla vyseta a po vyklíčení přesazena do zeminy a dopěstována. U těchto kandidátních rostlin byla následně izolována genomická DNA a ověřena přítomnost T-DNA inzerce v příslušném genu a zároveň stanoven genotyp. V rámci této bakalářské práce se podařilo získat čtyři homozygotní rostliny linie *ent1-2* SALK\_025174 a jednu homozygotní rostlinu linie *ent1-3* SALK\_104866. Obě mutace se nacházejí v genu *ENT1*. V případě zbývajících linií *aac1-1* SALK\_107166, *aac1-2* SAIL\_247\_G08 a *adnt1-1* WISCDSLOX476E06 v genech *AAC1* a *ADNT1* bohužel nebyly nalezeny žádné homozygotní ani heterozygotní rostliny.

Vliv přítomné T-DNA inzerce na expresi genu *ENT1* u obou homozygotních linií *ent1-2* SALK\_025174 a *ent1-3* SALK\_104866 bude ověřena na RNA úrovni a následně budou podrobeny důkladné fenotypové analýze. Jelikož se jedná o transportér hypoteticky přenášející cytokiny do nebo z vakuoly, bude také studován efekt exogenní aplikace různých cytokininových metabolitů na fenotyp těchto mutantů. Tyto experimenty již budou probíhat mimo rámec této bakalářské práce.

## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce sestává z části teoretické a části praktické. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše zaměřená na biosyntézu, konverzi a ireversibilní degradaci rostlinných hormonů cytokininů. Druhá část teoretické práce je zaměřena na transport cytokininů v rostlinách, který je zprostředkován především dvěma rodinami proteinů purinovými permeasami (PUP) a ekvilibrativními nukleosidovými transportéry (ENT). Poslední kapitola shrnuje nejnovější poznatky týkající se cytokininového transportu na dlouhé vzdálenosti zprostředkovaného AtABCG14 (ATP-binding cassette transporter 14) a PUP14 transportéry.

Náplní experimentální části práce bylo vyselektovat homozygotní rostliny vybraných T-DNA inzerčních linií *Arabidopsis thaliana* v genech kódující hypotetický cytokininový transporter lokalizovaný v tonoplastu. Kandidátní transportéry byly vybrány ze seznamu proteinů identifikovaných v proteomu tonoplastu. V rámci této práce se podařilo vyselektovat homozygoty linií *ent1-3* SALK\_104866 a *ent1-2* SALK\_025174 v genu *ENT1* pomocí metody PCR genotypizace. Homozygotní rostliny zbývajících tří linií *aac1-1* SALK\_107166, *aac1-2* SAIL\_247\_G08 a *adnt1-1* WISCDSLOX476E06 umístěných v genech *AAC1* a *ADNT1* se i přes veškerou snahu bohužel nepodařilo vyselektovat.

Získané homozygotní linie poslouží v nadcházejících experimentech ke zjištění případné role ENT1 v transportu cytokininů přes vakuolární membránu.

## 7 LITERATURA

- Aloni R., Langhans M., Aloni E., Dreieicher E., Ullrich C.I. (2005): Root-synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1535–1544.
- Argueso C.T., Ferreira F.J., Kieber J.J. (2009): Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment* **32**, 1147–1160.
- Badenoch-Jones J., Parker C.W., Letham D.S., Singh S. (1996): Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in derooted seedlings of oat and wheat. *Plant, Cell and Environment* **19**, 504–516.
- Bassil N.V., Mok D.W.S., Mok M.C. (1993): Partial purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* **102**, 867–872.
- Bernard C., Traub M., Kunz H.H., Hach S., Trentmann O., Möhlmann T. (2011): Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4627–4637.
- Beveridge C.A., Murfet I.C., Kerhoas L., Sotta B., Miginiac E., Rameau C. (1997): The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant Journal* **11**, 339–345.
- Blackwell J.R., Horgan R. (1993): Cloned *Agrobacterium tumefaciens* ipt1 gene product, DMAPP: AMP isopentenyl transferase. *Phytochemistry* **34**, 1477–1481.
- Brownlee B.G., Hall R.H., Whitty C.D. (1975): 3-methyl-2-butenal: An enzymatic degradation product of the cytokinin N6-(D2isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37–41.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051–1054.
- Bürkle L., Cedzich A., Döpke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kühn C., Frommer W.B. (2003): Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **34**, 13–26.
- Cabrita M.A., Baldwin S.A., Young J.D., Cass C.E. (2002): Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochemistry and Cell Biology* **80**, 623–638.
- Cedzich A., Stransky H., Schulz B., Frommer W.B. (2008): Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiology* **148**, 1857–1867.
- Corbesier L., Prinsen E., Jacqmar A., Lejeune P., Van Onckelen H., Périlleux C., Bernier G. (2003): Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2511–2517.
- Dixon S.C., Martin R.C., Mok M.C., Shaw G., Mok D.W.S. (1989): Zeatin glycosylation enzymes in *Phaseolus*. Isolation of *O*-glucosyltransferase from *P. lunatus* and comparison to *O*-xylosyltransferase from *P. vulgaris*. *Plant Physiology* **90**, 1316–1321.
- Dyer T.A., Osborne D.J. (1971): Leaf nucleic acids. II. Metabolism during senescence and the effect of kinetin. *Journal of Experimental Botany* **22**, 552–560.
- Emery R.J., Ma Q., Atkins C.A. (2000): The forms and sources of cytokinins in developing white lupine seeds and fruits. *Plant Physiology* **123**, 1593–1604.



- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431–2452.
- Frébortová J., Fraaije M.W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2004): Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121–130.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001): Cytokinin oxidase or dehydrogenase. Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **268**, 450–461.
- Gan S.S., Amasino R.M. (1996): Cytokinins in plant senescence: From spray and pray to clone and play. *BioEssays* **18**, 557–565.
- Gillissen B., Bürkle L., André B., Kühn C., Rentsch D., Brandl B., Frommer W.B. (2000): A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 291–300.
- Girke C., Daumann M., Witz S.N., Möhlmann T. (2014): Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Frontiers in Plant Science* **5**, 443.
- Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002): Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **49**, 161–169.
- Goodstein D. M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R.D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N., Rokhsar D.S. (2012): Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* **40**, 1178–1186.
- Griffith D.A., Jarvis S.M. (1996): *Biochimica et Biophysica Acta* **1286**, 153–181.
- Griffiths M., Beaumont N., Yao S.Y., Sundaram M., Boumah C.E., Davies A., Kwong F.Y., Coe I., Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A. (1997): Cloning of human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nature Medicine* **3**, 89–93.
- Hecht S., Eisenreich W., Adam P., Amslinger S., Kis K., Bacher A., Arigoni D., Rohdich F. (2001): Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14837–14842.
- Hildreth S. B., Gehman E. A., Yang H., Lu R. H., Ritesh K. C., Harich K. C., Yu S., Lin J., Sandoe J.L., Okumoto S., Murphy A.S., Jelesko J.G. (2011): Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18179–18184.
- Hirose N., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. (2005): Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology* **138**, 196–206.
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008): Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* **59**, 75–83.
- Hou B., Lim E.K., Higgins G.S., Bowles D.J. (2004): N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 47822–47832.
- Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M. (1999): Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant Journal* **17**, 615–626.
- Humbeck K., Quast S., Krupinska K. (1996): Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant, Cell and Environment* **19**, 337–344.
- Hyde R.J., Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A. (2001): The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Molecular Membrane Biology* **18**, 53–63.

- Chen C.-M., Kristopeit S.M. (1981a): Metabolism of cytokinin: Dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiology* **67**, 494–498.
- Chen C.-M., Kristopeit S.M. (1981b): Metabolism of cytokinin: Deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiology* **68**, 1020–1023.
- Jaquinod M., Villiers F., Kieffer-Jaquinod S., Hugouvieux V., Bruley C., Garin J., Bourguignon J. (2007): A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Molecular and Cellular Proteomics* **6**, 394–412.
- Jelesko J. G. (2012): An expanding role for purine uptake permease-like transporters in plant secondary metabolism. *Frontiers in Plant Science* **3**, 78–82.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677–685.
- Kamada-Nobusada T., Sakakibara H. (2009): Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 444–449.
- Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004): Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14049–14054.
- Kiba T., Takei K., Kojima M., Sakakibara H. (2013): Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **27**, 452–461.
- Kieber J.J., Schaller G. E. (2014): Cytokinins. *The Arabidopsis Book* **12**, e0168.
- Ko D., Kang J., Kiba T., Park J., Kojima M., Do J., Kim K.Y., Kwon M., Endler A., Song W.Y., Martinoia E., Sakakibara H., Lee Y. (2014): *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **13**, 7150–7155.
- Krall L., Raschke M., Zenk M.H., Baron C. (2002): The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Letters* **527**, 315–318.
- Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010): Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 53–60.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–655.
- Kuroha T., Kato H., Asami T., Yoshida S., Kamada H., Satoh S. (2002): A *trans*-zeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2193–2200.
- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H. (2009): Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3152–3169.
- Kwade Z., Swiatek A., Azmi A., Goossens A., Inzé D., Van Onckelen H., Roef L. (2005): Identification of four adenosine kinase isoforms in Tobacco BY-2 cells and their putative role in the cell cycle-regulated cytokinin metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 17512–17519.
- Letham D.S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences* **8**, 569–573.
- Li G., Liu K., Baldwin S. A., Wang D. (2003): Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, expression pattern and analysis of transport activities. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 35732–35742.
- Lichtenstein C., Klee H., Montoya A., Garfinkel D., Fuller S., Flores C., Nester E., Gordon M. (1984): Nucleotide sequence and transcript mapping of the *tmr* gene of the pTiA6NC octopine Ti-plasmid: a bacterial gene involved in plant tumorigenesis. *Journal of Molecular and Applied Genetics* **2**, 354–362.

- 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.
- Martin R.C., Mok M.C., Mok D.W.S. (1999a): Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin *O*-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 284–289.
- Martin R.C., Mok M.C., Mok D.W.S. (1999b): A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin *O*-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* **120**, 553–558.
- Martin R.C., Mok M.C., Habben J.E., Mok D.W.S. (2001): A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5922–5926.
- Miller C.O., Skoog F., von Saltza M.H., Strong F.M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392–1392.
- Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004): Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal* **37**, 128–138.
- Moffatt B., Pethe C., Laloue M. (1991): Metabolism of benzyladenine is impaired in a mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity. *Plant Physiology* **95**, 900–908.
- Möhlmann T., Mezher Z., Schwerdtfeger G., Neuhaus H.E. (2001): Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1, At). *FEBS Letters* **509**, 370–374.
- Mok M.C., Mok D.W., Armstrong D.J. (1978): Differential cytokinin structure–activity relationships in *Phaseolus*. *Plant Physiology* **61**, 72–75.
- Mok M.C. (1994): Cytokinins and plant development: an overview. In: *Cytokinins: Chemistry, activity, and function*. (Mok D.W.S., Mok M.C., eds.), Boca Raton, FL: CRC Press, 155–166.
- Mok D.W., Mok M.C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89–118.
- Morris R.O., Bilyeu K.D., Laskey J.G., Cheikh N.N. (1999): Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**, 328–333.
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R.H. (1971): Conversion of N<sup>6</sup>-(D<sub>2</sub>isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology* **48**, 775–778.
- Richmond A.E., Lang A. (1957): Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science* **125**, 650–651.
- Rohmer M. (1999): The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* **16**, 565–574.
- Sakakibara H., Suzuki M., Takei K., Deji A., Taniguchi M., Sugiyama T. (1998): A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *Plant Journal* **14**, 337–344.
- Sakakibara H. (2004): Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. (Davies P.J., ed.), Springer, Dordrecht, 95–114.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005): *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9972–9977.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431–449.
- Sakano Y., Okada Y., Matsunaga A., Suwama T., Kaneko T., Ito K., Noguchi H., Abe I. (2004): Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate

- isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry* **65**, 2439–2446.
- Samuelson M.E., Eliasson L., Larsson C.M. (1992): Nitrate-regulated growth and cytokinin responses in seminal roots of barley. *Plant Physiology* **98**, 309–315.
- Schmitz R.Y., Skoog F. (1972): Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiology* **50**, 702–705.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/ dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* **116**, 241–252.
- Schmülling T. (2004): Cytokinin. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*. (Lennarz W., Lane M.D., eds.), Academic Press/Elsevier Science, 562-567.
- Schwacke R., Schneider A., van der Graaff E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W.B., Flügge U.I., Kunze R. (2003): ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology* **131**, 16–26.
- Skoog F., Miller C. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **11**, 118–130.
- Smart C.M. (1994): Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**, 419–448.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674–688.
- Sun J., Niu Q.W., Tarkowski P., Zheng B., Tarkowska D., Sandberg G., Chua N.H., Zuo J. (2003): The *Arabidopsis* *AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in *de novo* cytokinin biosynthesis. *Plant Physiology* **131**, 167–176.
- Sun J., Hirose N., Wang X., Wen P., Xue L., Sakakibara H., Zuo J. (2005): *Arabidopsis* *SOI33/AtENT8* gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport *in planta*. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**, 588–603.
- Swarup R., Marchant A., Bennett M.J. (2000): Auxin transport: providing a sense of direction during plant development. *Biochemical Society Transactions* **28**, 481–485.
- Szydlowski N., Bürkle L., Pourcel L., Moulin M., Stolz J., Fitzpatrick T. B. (2013): Recycling of pyridoxine (vitamin B6) by PUP1 in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **75**, 40–52.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001a): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405–26410.
- Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T. (2001b): Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* **42**, 85–93.
- Takei K., Takahashi T., Sugiyama T., Yamaya T., Sakakibara H. (2002): Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany* **53**, 971–977.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2003): A method for separation and determination of cytokinin nucleotides from plant tissues. *Journal of Plant Research* **116**, 265–269.
- Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004a): *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1053–1062.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004b): *Arabidopsis* *CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866–41872.
- Turner J.E., Mok D.W.S., Mok M.C., Shaw G. (1987): Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of *O*-xylosylzeatin in *Phaseolus vulgaris* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 3714–3717.

- Vitória A.P., Mazzafera P. (1997): Cytokinin-like effects of caffeine in bioassays. *Biologia Plantarum* **40**, 329–335.
- von Schwartzberg K., Kruse S., Reski R., Moffatt B., Laloue M. (1998): Cloning and characterization of an adenosine kinase from *Physcomitrella* involved in cytokinin metabolism. *Plant Journal* **13**, 249–257.
- Weiler E.W., Ziegler H. (1981): Determination of phytohormones in the phloem exudate from tree species by radioimmunoassay. *Planta* **152**, 168–170.
- Werner T., Köllmer I., Bartrina y Manns I., Holst K., Schmülling T. (2006): New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology* **8**, 371–381.
- Whitty C.D., Hall R.H. (1974): A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal of Biochemistry* **52**, 787-799.
- Wilson T.P., Canny M.J., McCully M.E. (1991): Leaf teeth, transpiration and the retrieval of apoplastic solutes in balsam poplar. *Physiologia Plantarum* **83**, 225–232.
- Wingler A., von Schaewen A., Leegood R.C., Lea P.J., Quick W.P. (1998): Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology* **116**, 329-335.
- Zhang K., Novák O., Wei Z., Gou M., Zhang X., Yu Y., Yang H., Cai Y., Strnad M., Liu C.J. (2014): *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature Communications* **5**, 3274.
- Zhang W., Swarup R., Bennett M., Schaller G.E., Kieber J.J. (2013): Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the *Arabidopsis* root apical meristem. *Current Biology* **23**, 1979–1989.
- Zhao Y. (2008): The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 16-22.
- Zrenner R., Stitt M., Sonnewald U., Boldt R. (2006): Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 805–836.
- Zürcher E., Liu J., Donato M., Geisler M., Müller B. (2016): Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science* **353**, 1027-1030.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ABC transportér	z angl. ATP Binding Cassette transporter
BA	benzyladenin
CIA	chloroform: isoamylalkohol
CK	cytokininy
CKX	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa
CNT	koncentrativní nukleosidový transportér
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid
<i>cZRMP</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid 5'-monofosfát
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DZ	dihydrozeatin
DZR	dihydrozeatin ribosid
DZRMP	dihydrozeatin ribosid 5'-monofosfát
ENT	ekvilibrativní nukleosidový transportér
<i>GFP</i>	zelený fluorescenční protein
<i>GUS</i>	$\beta$ -glukuronidasa
HM	homozygot
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
HZ	heterozygot
<i>i</i> <sup>6</sup> AMP	<i>N</i> <sup>6</sup> -isopentenyladenosin monofosfát
<i>iP</i>	<i>N</i> <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin
<i>iPR</i>	isopentenyladenosin ribosid
<i>iPRDP</i>	isopentenyladenosin ribosid 5'-difosfát
<i>iPRMP</i>	isopentenyladenosin ribosid 5'-monofosfát
<i>iPRTP</i>	isopentenyladenosin ribosid 5'-trifosfát
<i>IPT</i>	isopentenyltransferasa
KO	knockoutovaná rostlina
LOG	ribosid 5'-monofosfát fosforibohydrolasy
<i>memT</i>	methoxy-derivát <i>meta</i> -topolinu
<i>meoT</i>	methoxy-derivát <i>ortho</i> -topolinu
MEP	methylerythritolfosfátová dráha

MES	Morfolinethansulfonová kyselina monohydrát
MS	Murashige a Skoog medium
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
MVA	mevalonátová dráha
NBMPR	nitrobenzylmerkaptopurin
<i>oT</i>	<i>ortho</i> -topolin
PCR	polymerázová řetězová reakce
PUP	purinová permeasa
Q <sub>0</sub>	2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinonu
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
tRNA	transferová RNA
tRNA-IPT	tRNA isopentenyltransferasa
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
tZRDP	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-difosfát
tZRMP	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-monofosfát
tZRTP	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-trifosfát
UDPG	uridin difosfát glukosa
UDPX	uridin difosfát xylosa
UTPG	uridin trifosfát glukosa
WT	divoký typ
ZOG	<i>O</i> -glykosyltransferasa