



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Příprava a charakterizace nadprodukcujících
a knock-out linií cytokininových přenašečů
rodiny ENT v *Arabidopsis thaliana***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Beata Budíková
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Beata Budíková
Název práce	Příprava a charakterizace nadprodukcujících a knock-out linií cytokininových přenašečů rodiny ENT v <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Cytokininy (CK) jsou rostlinné hormony, které ovlivňují mnoho aspektů růstu a vývoje rostlin. K tomu musí být hladina CK v rostlinách regulována. Jedním ze způsobů této regulace je transport CK. K transportu CK v rostlině může sloužit několik skupin transportérů, mezi něž patří i ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT), na které je tato práce zaměřena. Cílem diplomové práce je blíže objasnit úlohu vybraných členů rodiny ENT, u kterých se předpokládá transportní funkce. K lepšímu pochopení úloh těchto transportních proteinů byly metodou klonování připraveny ENT expresní konstrukty ve fúzi se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Za použití konfokální laserové skenovací mikroskopie byla pozorována subcelulární lokalizace připravených ENT-GFP konstruktů. Také byla provedena fenotypizace mutantních rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> s umlčeným genem pro transportér ENT1. Výsledky by mohly sloužit k další práci k objasnění mechanismu transportu CK v rostlinách.</p>
Klíčová slova	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokininy, cytokininový transport, ekvilibrativní nukleosidové transportéry, ENT
Počet stran	90
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Beata Budíková
Title of thesis	Preparation and characterization of overexpressing and knock-out lines of cytokinins transporters of the ENT family in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>Cytokinins (CK) are plant hormones that affect many aspects of plant growth and development. To do so, the level of (CK) in plants needs to be regulated. One way of this regulation is the transport of CK. Several groups of transporters can be used to transport CK in the plant, including the equilibrative nucleoside transporters (ENT) on which this thesis is focused. The aim of the thesis is to clarify the role of selected members of the ENT family with assumed transport function. To better understand the roles of these transport proteins, ENT expression vectors in fusion with green fluorescent protein (GFP) were prepared by cloning. Using confocal laser scanning microscopy, the subcellular localization of the prepared ENT-GFP constructs was observed. Also, phenotyping of mutant <i>Arabidopsis thaliana</i> plants with a silenced ENT1 transporter gene was performed. The results could be used for further work to clarify the mechanism of CK transport in plants.</p>
Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokinins, cytokinin transport, equilibrative nucleoside transporters, ENT
Number of pages	90
Number of appendices	-
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Bc. Beata Budíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své práce RNDr. Ondřeji Plíhalovi, Ph.D. za vstřícný a přívětivý přístup, odborné znalosti, přínosné konzultace, cenné rady a připomínky a správné nasměrování při vypracování této práce.

Dále děkuji Mgr. Martinu Hudečkovi za veškerý věnovaný čas, trpělivost, pomoc s plánováním a realizací experimentů, nespočet rad při práci a za pomoc při vyhodnocování výsledků a vypracování diplomové práce. Děkuji také za umožnění samostatné práce v laboratoři, zajímavé myšlenky a podněty a v neposlední řadě za inspiraci k dalšímu pokračování.

Obrovské poděkování patří mým rodičům za jejich nekonečnou podporu nejen při psaní diplomové práce, ale v průběhu celého studia a života. Děkuji sestře Barboře Budíkové za pomoc s grafickou úpravou práce a dostatek optimismu a humoru, kterým mi psaní diplomové práce zpříjemňovala.

A děkuji také všem přátelům, kteří mě vždy vyslechli a dokázali povzbudit, a přispěli tak ke zdárnému dokončení diplomové práce.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	9
1 ÚVOD	11
2 CÍLE PRÁCE	12
3 TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1 Cytokininý	13
3.2 Metabolismus cytokininů.....	15
3.2.1 Biosyntéza cytokininů	15
3.2.1.1 Přímá biosyntéza	15
3.2.1.2 Nepřímá biosyntéza.....	16
3.2.2 Degradace a inaktivace cytokininů.....	18
3.3 Transport cytokininů.....	20
3.3.1 Transportéry ABCG	21
3.3.2 Purinové permeázy (PUP).....	23
3.3.3 Ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT).....	25
3.3.3.1 AtENT1	28
3.3.3.2 AtENT3	29
3.3.3.3 AtENT6.....	29
3.3.3.4 AtENT7	30
3.3.3.5 AtENT8.....	30
3.3.3.6 AtENT2, 4 a 5	31
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
4.1 Biologický materiál.....	32
4.2 Chemikálie	32
4.2.1 Antibiotika.....	33
4.2.2 Enzymy a pufrý	33
4.2.3 Standard molekulové hmotnosti	34
4.3 Použité roztoky	34
4.3.1 Roztok pro agarózovou elektroforézu	34
4.3.2 Roztoky a média pro výsev semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
4.3.3 Roztoky a média pro práci s bakteriemi	34
4.3.4 Roztoky pro izolaci a tranzientní transformaci protoplastů.....	34
4.3.5 Roztoky pro tranzientní transformaci rostlin <i>Nicotiana bethamiana</i>	35
4.3.6 Roztoky pro stabilní transformaci rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
4.4 Komerčně dostupné kity	35
4.5 Primery	35

4.6	Vektory	38
4.7	Přístrojové vybavení	39
4.8	Software	40
4.9	Metody	40
4.9.1	Sterilizace a výsev semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
4.9.2	Fenotypizace kořenové části rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
4.9.3	Fenotypizace nadzemní části rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
4.9.4	Příprava PCR amplikonů	42
4.9.5	Agarózová elektroforéza	42
4.9.6	Přečištění PCR produktů	43
4.9.7	Restrikce	43
4.9.8	Ligace	44
4.9.9	Transformace bakterií	45
4.9.9.1	Transformace bakterií <i>Escherichia coli</i> TOP10 metodou teplotního šoku	45
4.9.9.2	Transformace bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i> metodou elektroporace	45
4.9.10	Colony PCR	46
4.9.11	Příprava glycerolových bakteriálních zásobních kultur a izolace plazmidů	47
4.9.12	Sekvence DNA	47
4.9.13	Příprava expresních vektorů (LR reakce)	48
4.9.14	Přečištění konstruktů pro přípravu tranzientně nadprodukcujících protoplastů buněčné kultury <i>Ler</i>	48
4.9.15	Izolace a tranzientní transformace protoplastů pomocí PEG	49
4.9.16	Tranzientní transformace rostlin <i>Nicotiana benthamiana</i>	51
4.9.17	Stabilní transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> pomocí metody floral dip	52
5	VÝSLEDKY	54
5.1	Příprava expresních ENT konstruktů s GFP značkou	54
5.1.1	Příprava expresních ENT konstruktů s GFP značkou pro tranzientní transformaci do protoplastů <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
5.1.2	Příprava expresních ENT konstruktů s GFP značkou pro tranzientní transformaci rostlin <i>Nicotiana benthamiana</i> a stabilní transformaci rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
5.1.2.1	Příprava expresních ENT konstruktů s GFP značkou pod UBQ10 promotorem	59
5.1.2.2	Příprava expresních ENT konstruktů s GFP značkou pod nativním promotorem	62
5.2	Příprava tranzientně nadprodukcujících protoplastů buněčné kultury <i>Ler</i>	67
5.3	Příprava tranzientně nadprodukcujících rostlin <i>Nicotiana benthamiana</i>	69
5.4	Příprava stabilně transformovaných linií <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
5.5	Fenotypizace kořenové části T-DNA inzerční linie <i>Arabidopsis thaliana ent1</i>	71
5.5.1	Analýza délky primárního kořene	71
5.5.2	Analýza počtu laterálních kořenů	72

5.5.3	Analýza velikosti úhlu mezi primárním kořenem a laterálními kořeny	73
5.5.4	Fenotypizace nadzemní části T-DNA inzerční linie <i>Arabidopsis thaliana ent1</i>	74
6	DISKUZE.....	76
7	ZÁVĚR	80
8	LITERATURA.....	81

SEZNAM ZKRATEK

- A37 – adenin v pozici 37
ABC – „ATP-binding cassette“
ABCG – „G subfamily ATP-binding cassette“
ADP – adenosindifosfát
AMP – adenosinmonofosfát
APRT – adenin-fosforibosyltransferáza
ATP – adenosintrifosfát
BAP – benzylaminopurin
CCCP – m-chlorofenylhydrazon
cDNA – komplementární DNA
CK – cytokinin
CKX – cytokinin oxidáza/dehydrogenáza
CNT – koncentrativní nukleosidový transportér
CYP – cytochrom P450
cZ – *cis*-zeatin
cZRMP – *cis*-zeatin ribosid 5'-monofosfát
DHZ – dihydrozeatin
DMAPP – dimethylallyldifosfát
DMSO – dimethylsulfoxid
DNP – dinitrofenol
DPU – difenylmočovina
EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
ei – ekvilibrativní nesenzitivní
ENT – ekvilibrativní nukleosidové transportéry
ER – endoplazmatické retikulum
es – ekvilibrativní senzitivní
FAD – flavinadenindinukleotid
FUN – „function unknown now“
GA – Golgiho aparát
gDNA – genomická DNA
GFP – zelený fluorescenční protein
GUS – β -glukuronidáza

HMBDP – 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-difosfát
iP – isopentenyladenin
iPR – isopentenyladenin ribosid
iPRDP – isopentenyladenin ribosid 5'-difosfát
iPRMP – isopentenyladenin ribosid 5'-monofosfát
iPRTP – isopentenyladenin ribosid 5'-trifosfát
IPT – isopentenytransferáza
LOG – „*LONELY GUY*“
MEP – methylerythritol 4-fosfát
MVA – mevalonát
NBD – nukleotidová vazebná doména
NBMPR – nitrobenzylmerkaptopurinem
NRH - N-ribohydroláza
NSH – nukleosidová hydroláza
PCR – řetězová polymerázová reakce
PEG - polyethylenglykol
PUP – purinová permeáza
RPM – otáčky za minutu
SAME – S-adenosylmethionin
TAE – tris-acetát-EDTA
TMD – transmembránová doména
tRNA – transferová RNA
tRNA-IPT – Δ^2 -isopentenylypyrofosfáttransferáza
tZ – *trans*-zeatin
tZR – *trans*-zeatin ribosid
tZRMP – *trans*-zeatin ribosid 5'-monofosfát
UDP – uridindifosfát
UGT – UDP-glykosyltransferáza

1 ÚVOD

Cytokininy (CK) patří mezi rostlinné hormony. Jedná se o malé mobilní signální molekuly, které jsou syntetizovány v různých pletivech kořene i nadzemní části rostlin a které mají vliv na mnoho aspektů růstu a vývoje rostlin, mezi něž patří především regulace buněčného dělení nebo senescence. Přestože dnes jsme již schopni charakterizovat působení CK na molekulární úrovni a celá řada klíčových procesů u rostlin již byla objevena, stále existují oblasti, které ještě nebyly detailně prozkoumány. Zatímco tedy některé oblasti CK působení, jako například biosyntéza CK isoprenoidního typu, degradace CK nebo některé signální procesy, jsou již poměrně dobře popsány, o jiných zatím existuje jen málo informací. Poměrně neznámou oblastí CK hormonální regulace je jejich přenos v rostlinách. Na molekulární úrovni bylo dosud charakterizováno několik skupin CK přenašečů, mezi něž patří i přenašeče z rodiny ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT). Objasnění transportní funkce vybraných členů rodiny ENT v modelovém organismu *Arabidopsis thaliana*, ve kterém bylo identifikováno a částečně charakterizováno osm členů této rodiny, by nám mohlo pomoci blíže pochopit distribuci CK a jejich mechanismus účinku a přispět k poznatkům v oblasti hormonální regulace rostlin.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na téma cytokininů, zejména kompartmentalizace a transport cytokininů.
2. Klonování *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* sekvencí z genomické DNA a příprava expresních konstruktů pod kontrolou konstitutivního a nativního promotoru ve fúzi s proteinem GFP pro transformaci do *Arabidopsis thaliana*.
3. Transformace ENT-GFP konstruktů do protoplastů *Arabidopsis thaliana* (tranzientní exprese) a následná subcelulární lokalizace GFP-značených proteinů v tranzientním systému pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie.
4. Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* metodou floral dip připravenými konstrukty ENT-GFP pro odvození stabilních expresních linií.
5. Fenotypizace kořenové části mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* s umlčeným genem pro transportér ENT1.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Cytokininy

Cytokininy (CK) jsou nízkomolekulární látky patřící do skupiny rostlinných hormonů (fytohormonů), které se zásadně podílejí na růstu a vývoji rostlin v průběhu jejich celého života. Jsou důležité zejména pro stimulaci buněčného dělení (cytokinezi), odkud byl také odvozen jejich název (Skoog *et al.*, 1965). Jejich vliv v rostlinách závisí jak na jejich celkové koncentraci, tak na poměru ke koncentracím ostatních přítomných fytohormonů. Například je-li koncentrace CK vyšší než koncentrace auxinů, dochází ke stimulaci růstu nadzemní části rostliny, v případě opačném dochází ke stimulaci růstu kořenů (Skoog *et Miller*, 1957). Mezi další funkce CK patří zpomalení degradace proteinů, DNA a RNA ve stárnoucích pletivech a tím oddálení senescence, regenerace orgánů nebo navození vzniku adventivních pupenů a jejich proliferace (Mok *et Mok*, 1994).

Cytokininy (CK) jsou syntetizovány převážně v kořenové čepičce, ze které jsou xylémem přiváděny do vrcholových částí rostlin, dále jsou syntetizovány také v listech rostlin, ze kterých jsou naopak floémem přiváděny ke kořenům (Liu *et al.*, 2019).

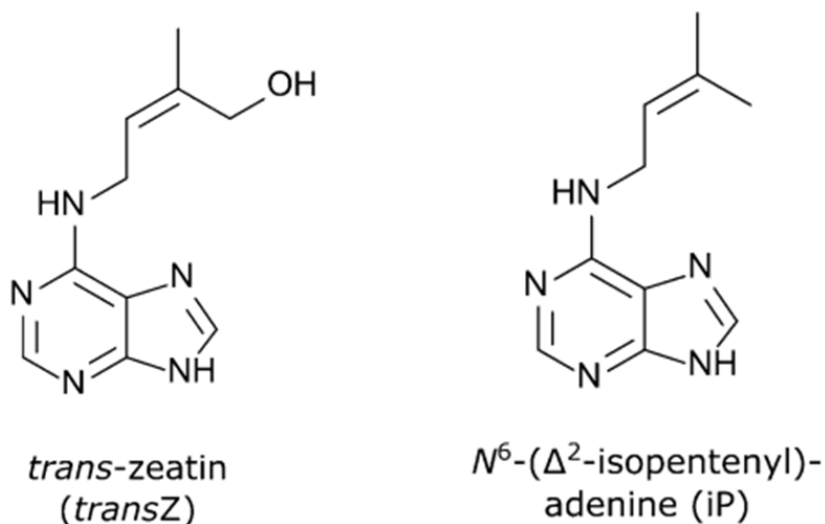
Z chemického hlediska jsou CK N⁶ substituované adeninové deriváty. Nejčastější jsou CK s isoprenoidním postranním řetězcem, některé rostlinné druhy ale obsahují i adeninové deriváty s aromatickými substituenty.

Vedle přirozeně se vyskytujících CK existují také CK syntetické, které jsou odvozeny od difenylmočoviny (DPU). Od CK adeninového typu se tedy liší chemickou strukturou, vykazují však poměrně vysokou biologickou aktivitu.

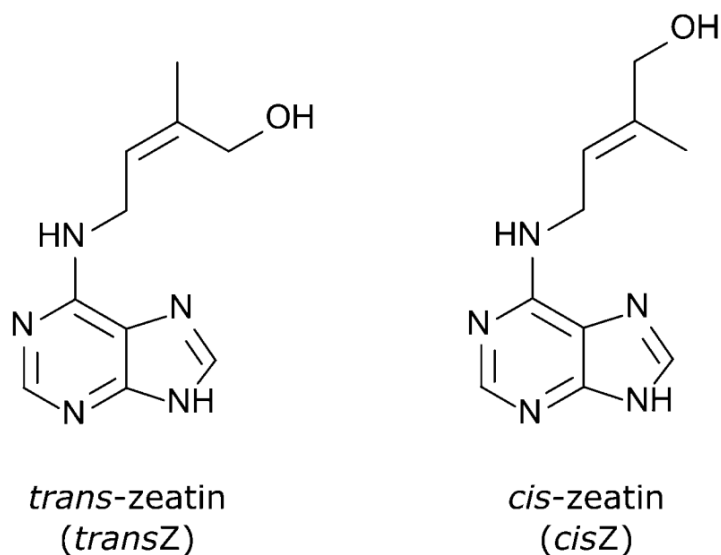
Zatímco isoprenoidní CK jsou v přírodě běžně hojně zastoupeny, aromatické CK byly poměrně dlouhou dobu pokládány za syntetické artefakty (Frébortová *et al.*, 2004; Frébort *et al.*, 2011). Od isoprenoidních CK se mohou lišit oblastí aktivity, například 6-benzylaminopurin (BAP) a jeho deriváty vykazují významnou antisenescenční aktivitu (Doležal *et al.*, 2006).

Mezi nejvýznamnější zástupce CK patří N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenin (iP) s isoprenoidním postranním řetězcem a zeatin, ve kterém je nacházející se isoprenoidní postranní řetězec hydroxylovaný (Obrázek 1) (Haberer *et Kieber*, 2002). V souvislosti s polohou hydroxylové skupiny isoprenoidního postranního řetězce zeatinu rozlišujeme dvě konformace, *cis* a *trans* (Obrázek 2). Chemická struktura a konformace bočního řetězce jsou pro aktivitu příslušného CK kritickým faktorem. Například *trans*-zeatin (tZ),

který je jedním z nejvíce zastoupených CK u vyšších rostlin, vykazuje ve srovnání s *cis*-zeatinem (cZ) výrazně vyšší CK aktivitu u dvouděložné rostliny *Arabidopsis thaliana*, zatímco u rostlin jednoděložných je naopak CK aktivní formou cZ (Haberer *et* Kieber, 2002). Dvojitá vazba zeatinu může být redukována v dihydrozeatinu (DHZ), ale redukováný ekvivalent iP nebyl v rostlinách dodnes identifikován (Frébort *et al.*, 2011).



Obrázek 1: Chemická struktura nejvýznamnějších přirozeně se vyskytujících CK *trans*-zeatinu (tZ) a *N*⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adeninu (iP), převzato z Kamínek, 2015



Obrázek 2: Chemická struktura *cis*-zeatinu a *trans*-zeatinu, převzato z Kamínek, 2015

3.2 Metabolismus cytokininů

3.2.1 Biosyntéza cytokininů

Cytokiny (CK) mohou být v rostlinách syntetizovány dvěma cestami. První neboli přímá cesta biosyntézy CK nesoucích isoprenoidní postranní řetězec začíná tak, že k molekule adenosinmono-, di- nebo trifosfátu (AMP, ADP, ATP) je adicí připojena prenylová skupina dimethylallyldifosfátu (DMAPP) nebo 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-difosfátu (HMBDP) na N⁶ pozici adeninu. Tato reakce je u rostlin katalyzována enzymem isopentenyltransferáza (IPT, nazývaná též *de novo* isopentenyltransferáza nebo adenylát isopentenyltransferáza, adenylát-IPT; EC 2.5.1.27) (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001). Druhá, nepřímá, cesta biosyntézy CK je zprostředkována degradací transferové RNA (tRNA) a byla potvrzena jak u rostlin, tak u bakterií a hub (Golovko *et al.*, 2002). Tato alternativní cesta je katalyzována enzymem Δ^2 -isopentenylpyrofosfáttransferáza (tRNA-IPT; EC 2.5.1.8) (Miyawaki *et al.*, 2004).

3.2.1.1 Přímá biosyntéza

U vyšších rostlin byly popsány dvě dráhy biosyntézy isoprenoidních CK (Obrázek 3). První dráha využívá jako donor postranního řetězce DMAPP, druhá pak HMBDP, který vzniká jako metabolický meziprodukt methylethritol 4-fosfátové (MEP) dráhy nacházející se u bakterií a v plastidech (Hecht *et al.*, 2001). K produkci DMAPP využívají rostliny primárně mevalonátovou (MVA) dráhu běžně lokalizovanou v cytosolu eukaryotních buněk nebo MEP dráhu, ve které je DMAPP syntetizován z HMBDP reakcí katalyzovanou HMBDP reduktázou (EC 1.17.1.2) (Rohmer 1999; Lichtenthaler 1999).

Stěžejním krokem biosyntézy je přenos isopentylové skupiny z DMAPP nebo HMBDP na AMP, ADP nebo ATP (Obrázek 3). Tato enzymová reakce je katalyzována enzymy IPT a dochází k ní v plastidech, ve kterých se enzymy IPT nacházejí a kde také dochází k syntéze DMAPP (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001). U *Arabidopsis thaliana* existuje celkem devět genů kódujících enzymy z proteinové rodiny IPT, přičemž sedm z nich je zapojeno do přímé biosyntézy CK, a sice *IPT1* a pak *IPT3* až *IPT8* (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001).

Jako akceptory prenylové skupiny využívají vyšší rostliny v dráze s DMAPP zejména ADP nebo ATP, přičemž dochází ke vzniku isopentenyladenin ribosid 5'-difosfátu (iPRDP) nebo isopentenyladenin ribosid 5'-trifosfátu (iPRTP) (Obrázek 3). (Kakimoto,

2001). V této dráze dochází k hydroxylaci isopentenylového postranního řetězce pomocí katalýzy cytochromem P450 monooxygenázou (CYP; EC 1.14.14.1). V *Arabidopsis thaliana* pak může docházet ke konverzi iP nukleotidů na tZ nukleotidy za pomoci CYP735A1 a CYP735A2 (Takei *et al.*, 2004).

Existuje také IPT kódovaná genem „Tumor morphology root“ (*Tmr*) nalezená v buňkách infikovaných bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, která dokáže katalyzovat N-prenylaci HMBDP s AMP, při níž dochází přímo ke vzniku *trans*-zeatin ribosid 5'-monofosfátu (tZRMP) místo isopentenyladenin ribosid 5'-monofosfátu (iPRMP). Tato dráha není závislá na CYP735A1/2 hydroxylaci (Sakakibara *et al.*, 2005).

Biologickou aktivitu vykazují CK ve formě volných bází. Dalším nezbytným krokem syntézy je tedy přeměna z ribosidových neaktivních forem na aktivní volné formy (Obrázek 3). V souvislosti s tvorbou aktivních forem CK bylo představeno zapojení dvou cest, dvoustupňová aktivační cesta a přímá aktivační cesta (Chen, 1997; Kurakawa *et al.*, 2007). Dvoustupňová aktivační cesta využívá hydrolytické štěpení fosfátu z ribotidu pomocí fosfohydrolázy. Vzniká tak ribosidová forma, ze které je poté pomocí nukleosidázy odštěpen samotný ribosid (Chen *et al.* Kristopeit, 1981a, 1981b). Přímá aktivační cesta je katalyzována enzymy kódovanými geny *LONELY GUY* (LOG). Enzymy LOG mají fosforibohydrolázovou aktivitu a v jediném kroku specificky štěpí CK nukleosidmonofosfáty rovnou na volné báze (Kurakawa *et al.*, 2007; Kuroha *et al.*, 2009).

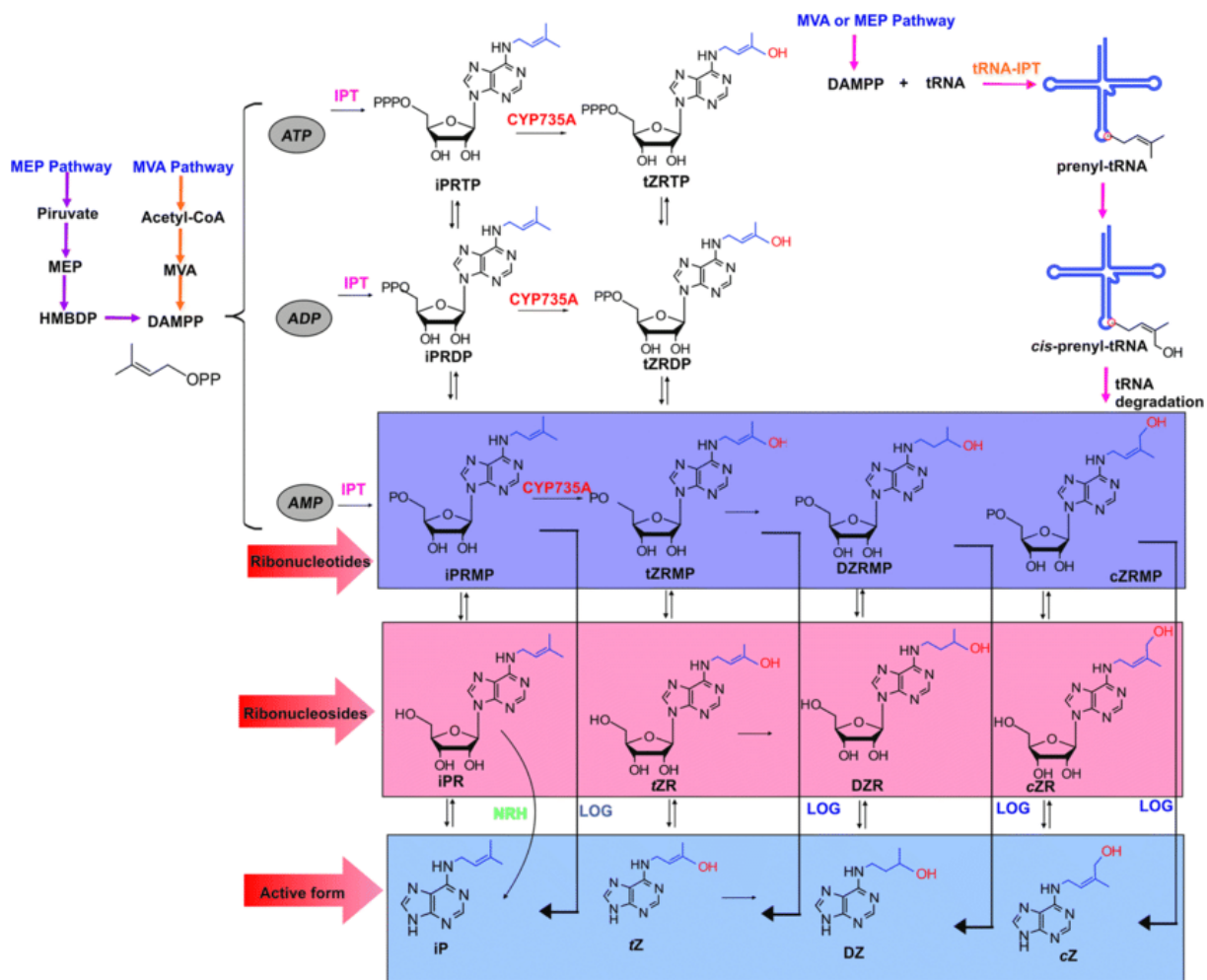
3.2.1.2 Nepřímá biosyntéza

Nepřímá biosyntetická dráha CK je spojena s degradací tRNA. Charakteristickým znakem tRNA je řada rozdílných posttranslačních modifikací, které jsou důležité pro její biologickou aktivitu, přičemž je v sekvencích těchto nukleových kyselin známo více než 50 rozdílných modifikací nukleotidů. Po objevení CK se předpokládalo, že tRNA je jejich hlavním zdrojem, neboť právě v hydrolyzátu tRNA byly identifikovány isoprenoidní CK (Skoog *et al.*, 1966).

Nejčastějšími místy modifikace jsou pozice 34 kodonu, tzv. kolísavá pozice antikodonu, a pozice 37, která sousedí s 3'-koncem antikodonu, přičemž CK se vyskytují pouze v těch tRNA, které rozpoznávají kodony začínající uridinem (Armstrong *et al.*, 1969). Jsou-li CK v tRNA přítomny vyskytují se v její molekule pouze jedenkrát, a to výhradně modifikací adeninu v pozici 37 (A37). Prvním krokem modifikace A37 na CK nukleosid je přenos isopentylové skupiny (DMAPP) na A37 katalyzovaný pomocí tRNA-

IPT za vzniku *cis*-zeatin ribosid 5'-monofosfátu (cZRMP) (Obrázek 3) (Mok *et* Mok, 1994). V genomu rostliny *Arabidopsis thaliana* se nachází dva geny kódující tRNA-IPT, a sice *IPT2* a *IPT9*, jejichž exprese nevykazuje pletivovou specifitu (Miyawaki *et al.*, 2006). Právě málo aktivní cZ je pak hlavním CK nepřímé biosyntetické dráhy, může však být snadno přeměněn na vysoce aktivní tZ, a to buď pomocí enzymu *cis-trans* isomerázy (Bassil *et al.*, 1993), nebo v rámci neenzymatického procesu, neboť přestože se existence a zapojení tohoto enzymu do metabolismu CK u rostlin předpokládá, jeho kódující gen a odpovídající proteinový produkt nebyly dodnes identifikovány (Hluska *et al.*, 2017).

Zatímco biosyntéza isoprenoidních CK je tedy nyní již poměrně dobře známa a popsána, u aromatických CK nebyla dráha popisující jejich vznik do dnešní doby zcela objasněna u vyšších ani nižších rostlin (Zürcher *et* Müller, 2016).



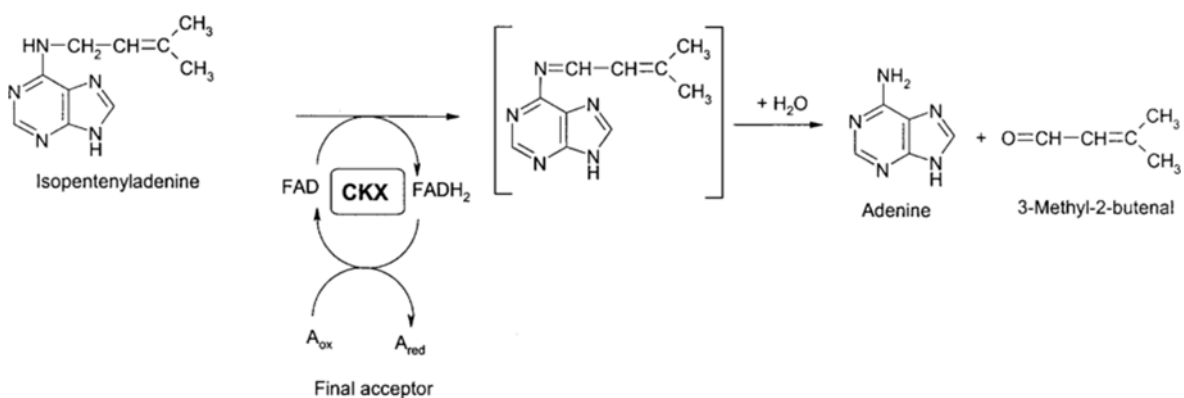
Obrázek 3: Model biosyntézy isoprenoidních CK v rostlinách. Biosyntéza CK začíná přenosem isopentylové skupiny z DMAPP na AMP/ADP/ATP za katalýzy IPT (růžové písmo). Počáteční produkty iPRMP/iPRDP/iPRTP jsou následně hydroxylovány na isoprenoidní postranní řetězec pomocí cytokinin hydroxyláz CYP735A1/2 (červené písmo) a dochází ke vzniku odpovídajících tZ nukleotidů. Tyto ribonukleotidy (tmavě modrý rámeček) lze převést na volné báze dvěma cestami – dvoustupňová aktivační cesta je katalyzována 5'ribonukleotid fosfohydrolázou za vzniku ribonukleosidů (růžový rámeček) a adenosin nukleosidázou za vzniku aktivních forem (světle modrý rámeček). Zatím byla identifikována pouze nukleosid N-ribohydroláza (NRH), která katalyzuje hydrolyzu isopentenyladenin ribosidu (iPR) na iP (zelené písmo). Přímá aktivační cesta je katalyzována 5' monofosfát fosforibohydrolázami (kódovanými geny LOG) (modré písmo). Vznik CK typu cZ začíná prenylací adeninu na pozici 37 tRNA pomocí tRNA-IPT (oranžové písmo) a následným uvolněním a následným uvolněním CK nukleotidů degradací tRNA. Převzato z Márquez-López *et al.*, 2019

3.2.2 Degradace a inaktivace cytokininů

Důležitou roli v modulaci hladin koncentrací CK v rostlinách hraje spolu s biosyntézou CK jejich degradace a inaktivace. Za degradaci molekul CK v rostlinách je zodpovědný enzym cytokinin oxidáza/dehydrogenáza (CKX; EC 1.5.99.12). Proteiny CKX ireverzibilně degradují aktivní formy CK oxidačním štěpením postranního řetězce N⁶ za vzniku adeninu, popřípadě jeho odpovídajícího derivátu pro N⁹-substituované CK, a aldehydu odvozeného z postranního řetězce CK (Frébert *et al.*, 2011).

Dlouhou dobu se předpokládalo, že tento enzym funguje jako oxidáza, na základě zkoumání reakčního mechanismu se však později ukázalo, že CKX obsahuje kovalentně vázaný flavinadenindinukleotid (FAD) jako kofaktor a reakce probíhá dehydrogenací CK na meziproduct v podobě iminu, při které akceptor elektronů přijme dva elektrony od kofaktoru. Ukázalo se taktéž, že různé typy akceptorů elektronů, zejména chinonových struktur, mohou být účinnější než molekulární kyslík, který tak nemusí být pro aktivitu CKX nezbytný (Galuszka *et al.*, 2001).

U *Arabidopsis thaliana* je známo celkem sedm genů pro enzymy CKX, které jsou označovány jako AtCKX1 až AtCKX7 a které mohou být exprimovány uvnitř buňky nebo v apoplastickém prostoru (Werner *et al.*, 2003). Z hlediska subcelulární lokalizace dochází k degradaci CK převážně v apoplastu, kde je přítomna většina CKX isoform (AtCKX2, AtCKX4, AtCKX5 a AtCKX6), u dvou forem se předpokládá vakuolární lokalizace (AtCKX1 a AtCKX3) a AtCKX7 je přítomna v cytoplasmě (Werner *et al.*, 2003; Köllmer *et al.*, 2014).



Obrázek 4: Reakční schéma degradace CK ve formě iP pomocí CKX za vzniku adeninu a příslušného aldehydu, převzato z Frébortová *et al.*, 2004

K inaktivaci molekul CK může docházet konjugací s cukrem, zejména glukózou, kde donorem cukru je uridindifosfát (UDP) a reakce je katalyzována pomocí UDP-glykosyltransferázy (UGT; EC 2.4.1.X) (Bowles *et al.*, 2006). Jedná se o cytosolické enzymy, které jsou rozděleny do 69 multigenových rodin, přičemž Rodina 1 (Family 1) obsahuje enzymy zodpovědné za glukosylaci malých molekul, jako jsou například právě rostlinné hormony (Hou *et al.*, 2004). Ke konjugaci/glukosylaci může docházet v pozici N³, N⁷ a N⁹ na purinovém skeletu CK, nebo na hydroxylové skupině postranního řetězce CK (tZ, cZ a DHZ), čímž dochází ke vzniku různých typů glukosidů, přičemž se

předpokládá, že N⁷- a N⁹-glukosidy jsou konečnými produkty ireverzibilní inaktivace (Letham *et al.*, 1983; Blagoeva *et al.*, 2004). Některé O-glukosidy mohou být naproti tomu reverzibilně deglykolyzovány pomocí β-glukosidázy a tím zpětně aktivovány. Předpokládá se tedy, že v rostlinách zastávají funkci neaktivních zásobních CK forem (Brzobohatý *et al.*, 1993).

Jednotlivé CK formy mohou všeobecně vykazovat rezistenci vůči účinkům CKX. Všechny CKX enzymy preferenčně štěpí isoprenoidní CK, naopak CK s aromatickým postranním řetězcem jsou poměrně obtížně štěpitelné (Galuszka *et al.*, 2007), ale některé mohou být štěpeny v některých rostlinných druzích, zejména v kukuřici (Zalabák *et al.*, 2014).

3.3 Transport cytokininů

Dlouhou dobu se předpokládalo, že CK jsou syntetizovány převážně v kořenech a odtud rozváděny do nadzemních částí rostlin (Letham *et al.*, 1983). Později se ukázalo, že k syntéze CK dochází v různých pletivech kořene i nadzemní části, kde mohou být transportovány jednak lokálně v místě jejich vzniku (parakrinní signál) nebo na dlouhou vzdálenost prostřednictvím vaskulárního systému (endokrinní signál) (Liu *et al.*, 2019). V kořeni jsou syntetizovány CK typu tZ, které jsou akropetálně transportovány xylémem do výhonků rostlin. Naproti tomu CK typu iP jsou syntetizovány hlavně v listech a jsou transportovány pomocí symplastických cest ve floému ke kořeni (Kudo *et al.*, 2010; Zürcher *et al.*, 2016). Zatímco například metabolismus CK je však u rostlin již do značné míry znám, informace o mechanismu transportu CK jsou stále neúplné.

Jelikož patří CK mezi mobilní fytohormony, lze předpokládat, že budou u vyšších rostlin vyvinuty transportní systémy CK pro jejich import nebo export skrz cytoplasmatickou membránu zprostředkovávající tak účinnou mobilizaci a cílený přenos těchto signálních molekul (Bürkle *et al.*, 2003). Rozdílná distribuce CK typu tZ v xylému a naopak CK typu iP ve floému naznačuje existenci a zapojení selektivního transportního systému a také, že CK mohou působit jak parakrinně, tedy lokálně v místě jejich vzniku, tak na dlouhou vzdálenost pomocí akropetálního respektive bazipetálního transportu, případně mohou působit autokrinně a regulovat signální procesy v rámci dané CK produkující buňky (Hirose *et al.*, 2008).

Na molekulární úrovni bylo dosud charakterizováno několik cytokininových přenašečů. Jedná se zejména o transportéry z rodiny purinových permeáz (PUP), přenašeče

patřící do rodiny ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT) a rovněž transportéry na bázi „G subfamily ATP-binding cassette“ (ABCG) proteinů (Kudo *et al.*, 2010).

3.3.1 Transportéry ABCG

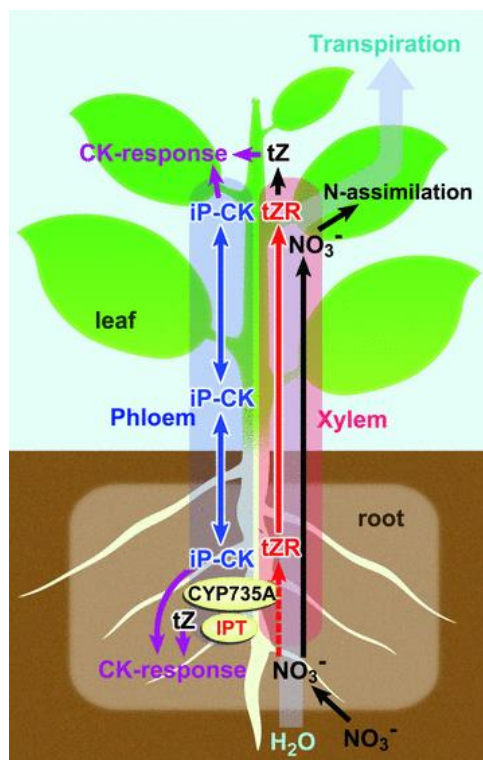
Transportéry ABCG spadají do podrodiny „ATP-binding cassette“ (ABC) transportérů. ABC transportéry se vyskytují napříč všemi biologickými říšemi a zajišťují transport velkého množství substrátů skrz membrány pomocí hydrolyzy ATP jakožto zdroje potřebné energie (Theodoulou, 2000). Jsou zpravidla složeny ze dvou nukleotidových vazebných domén (NBD) a dvou transmembránových domén (TMD), přičemž NBD nesou informace potřebné pro hydrolyzu ATP, zatímco TMD jsou složeny ze 4 – 10 α -helixových struktur, které zajišťují zakotvení proteinu v membráně a přenos substrátu skrz lipidovou dvouvrstvu (Schmitt *et al.*, 2002). Domény ABC transportérů mohou být kódovány jedním genem („full size“), dvěma geny („half size“), kdy je na jednom genu spojena jedna NBD a jedna TMD, nebo více geny, kdy je každá doména kódována zvlášť oddělenými geny (Schmitt *et al.*, 2002). V rostlinách je proteinová rodina ABC transportérů hojně zastoupena. V genomu *Arabidopsis thaliana* je v AtABC proteinové rodině známo přibližně 130 členů (Verrier *et al.*, 2008). Tyto AtABC proteiny jsou dále rozděleny do osmi podrodin, a sice AtABCA až AtABCG a AtABCI. Největší podrodinu pak představují právě „G subfamily ATP-binding cassette“ proteiny, tedy AtABCG (Kang *et al.*, 2011), přičemž se v této podrodině se vyskytuje 28 „half size“ a 15 „full size“ transportérů (Verrier *et al.*, 2008). Členové AtABCG podrodiny a především pak jejich „full size“ transportéry zastávají důležité postavení v transportu rostlinných hormonů, včetně CK (Ito *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2010; Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Ačkoli je dálkový transport CK do místa spotřeby klíčovým aspektem v regulaci růstu a vývoje rostlin, jeho mechanismus zůstával dlouhou dobu neobjasněn. Donedávna se předpokládalo, že dálkový transport CK je u vyšších rostli zprostředkován xylémem (Beveridge *et al.*, 1997). Dnešní model dálkového transportu CK uvažuje, že CK typu tZ jsou xylémem transportovány z kořene do nadzemní části rostlin pomocí akropetálního transportu, CK typu iP jsou zase floémem transportovány z nadzemní části do kořene pomocí bazipetálního transportu (Borghesi *et al.*, 2015). Stanovení hladin CK tuto domněnku potvrdilo, ukazovalo, že v xylému byly zastoupeny převážně CK typu *trans*-zeatin ribosidů (tZR) (Beveridge *et al.*, 1997), zatímco ve floému se vyskytovaly CK typu iP jako iPR a iP ribotidy (Corbesier *et al.*, 2003).

Různý směr transportu CK typu tZ a iP byl také potvrzen pomocí pokusů založených na roubování *Arabidopsis thaliana* divokého typu a čtyřnásobné mutantní linie *atipt1, 3, 5, 7* (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008), u které jsou hladiny obou těchto typů CK výrazně sníženy (Miyawaki *et al.*, 2006). Při roubování nadzemní části mutantní linie na kořeny rostlin divokého typu došlo v nadzemní části ke zvýšení hladiny CK typu tZ na fyziologické hodnoty, hladina CK typu iP zůstala ovšem snižena. Opačný účinek nastal při roubování nadzemní části divokého typu na kořeny mutantní linie (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008). Z tohoto modelu by mohlo vyplývat, že tZR plní v rostlinách funkci akropetálního posla, kdežto CK typu iP bazipetálních poslů (Kudo *et al.*, 2010).

Jako zásadní transportér ABCG podrodiny pro nakládání CK do xylému v kořenech rostlin a jejich transport byl u *Arabidopsis thaliana* identifikován AtABCG14 (Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Bylo zjištěno, že u umlčených mutantních linií *abcg14* byly ve srovnání s divokým typem menší listy a květní stopky. Množství a velikost buněk xylému a floému byly u mutantní linie také podstatně nižší. Ošetření pomocí tZ pak způsobilo obnovení fenotypu více podobného divokému typu, což potvrzovalo domněnku, že AtABCG14 by mohl mít zásadní roli v transportu CK typu tZ z kořene do nadzemní části. Stanovení hladin CK v kořeni a nadzemní části ukázalo, že obsah CK typu tZ v mutantní linii v nadzemní části byl snížen, kdežto v kořeni naopak zvýšen. Z pokusů se značenými CK typu tZ, které byly aplikovány do kořenů mutantních linií *abcg14*, také vyplynulo, že ve srovnání s divokým typem, byly tyto CK do nadzemní části rostlin transportovány méně, což potvrdilo transportní funkci AtABCG14 při translokaci CK typu tZ z kořenů do nadzemních částí rostlin (Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Obdobné transportní proteiny, které by naopak byly schopny specifického nakládání CK typu iP do floému, nebyly dosud identifikovány. Mnoho aspektů ohledně dálkového transportu CK tak zatím zůstává podrobněji neobjasněno. Jako hlavním zástupcem zprostředkovávajícím dálkový transport CK se prozatím jeví být AtABCG14, předpokládá se však, že by v něm mohlo být zapojených i několik dalších transportérů z rodiny PUP (Borghi *et al.*, 2015).



Obrázek 5: Model dálkového transportu CK v cévním systému rostlin. V xylému je hlavním transportovaným CK tZR (červený sloupec), hlavními transportovanými CK ve floému jsou CK iP typu (modrý sloupec). Dusičnany přijaté kořeny indukují expresi AtIPT3, což vede ke zvýšení translokace tZR CK v xylému (červená přerušovaná šipka). Cytokinin hydroxylázy CYP735A1/2 se podílejí na syntéze tZR, tyto xylémové CK jsou poté akropetálně transportovány transpiračním proudem (tyrkysová šipka). Xylémem jsou transportovány také dusičnany a následně v listech asimilovány na aminokyseliny (černá šipka). Floémové CK typu iP jsou transportovány systémově nebo bazipetálně (modrá šipka). K biosyntéze CK a příslušné odpovědi může docházet na různých místech rostlin (fialová šipka). Převzato z Kudo *et al.*, 2010.

3.3.2 Purinové permeázy (PUP)

Poměrně velkou rodinou genů kódující malé membránové proteiny jsou PUP. Homologní zástupci členů této rodiny byli nalezeni jak u bakterií a živočichů (Gillissen *et al.*, 2000), tak u několika různých druhů rostlin, například u banánu, kukuřice, tabáku, rajčete nebo rýže (Girke *et al.*, 2014). Transportéry PUP obsahují pravděpodobně 9 až 10 transmembránových domén α -helixových struktur a zprostředkovávají afinitní transport nukleových bází a nukleosidů. Mechanismem transportu zprostředkovaného PUP je pravděpodobně substrát-protonový symport (Gillissen *et al.*, 2000).

V *Arabidopsis thaliana* bylo popsáno 21 členů těchto transportních proteinů, tento poměrně vysoký počet však představuje komplikaci pro studium transportu CK zprostředkovaného PUP *in planta* za použití „loss-of-function“ mutantních linií, protože ztráta funkce vyřazených PUP může být díky překryvu aktivit kompenzována zbývajícími členy (Cedzich *et al.*, 2008).

Jako první rostlinný PUP transportér byl v *Arabidopsis thaliana* identifikován AtPUP1, a to na základě pokusů o komplementaci kvasinkové mutantní linie *fcy2* vykazující deficit v příjmu adeninu, do které byly vnášeny komplementární DNA (cDNA) expresní vektory *Arabidopsis thaliana* (Gillissen *et al.*, 2000). Z provedených kompetitivních testů vyplynulo, že AtPUP1 byl schopen transportovat nejen adenin, ale také kinetin a zeatin a v menší míře také jejich ribosidové formy (Gillissen *et al.*, 2000). Schopnost AtPUP1 transportovat CK byla pak později potvrzena právě pomocí tZ (Bürkle *et al.* 2003).

Ačkoli se při analýze transportních funkcí dalších dvou členů rodiny AtPUP, a sice AtPUP2 a AtPUP3, nepodařilo zapojení do transportu prokázat u AtPUP3, u AtPUP2 byla naopak transportní funkce potvrzena pro různé CK, například kinetin, tZ, cZ, BAP, iP a také tZR (Bürkle *et al.*, 2003).

Kromě CK byly PUP schopny transportovat i další molekuly, například kofein, nikotin (Gillissen *et al.*, 2000) nebo pyridoxin (vitamín B6) (Szydłowski *et al.*, 2013).

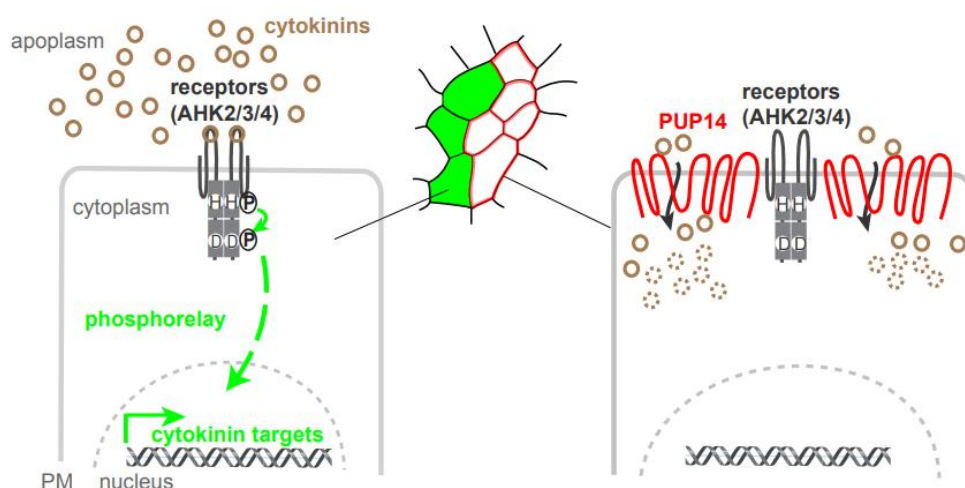
K expresi AtPUP1, AtPUP2 a AtPUP3 dochází v různých částech rostlin, přičemž AtPUP1 je exprimována ve stonku, listu květu nebo vodních skulinách hydratodách, což může mít souvislost se získáváním CK z xylému, které by v průběhu gutace zamezovalo jejich ztrátám. K expresi AtPUP2 dochází v cévách kořene, listu a květu a je naopak spojována s floémem, což může značit zapojení v transportu CK na dálku. Expres AtPUP3 pak byla detekována v pylu (Bürkle *et al.*, 2003).

Nejvýznamnějším zástupcem této rodiny transportérů se zdá být AtPUP14, k jehož silné expresi dochází napříč všemi rostlinnými orgány i vývojovými stádií, včetně embryonálního (Zürcher *et al.*, 2016). Umlčením exprese AtPUP14 za použití uměle nadprodukované microRNA (*amirPUP14*) v embryích *Arabidopsis thaliana* došlo později k výrazným fenotypovým změnám. Ty byly způsobeny aktivací CK signalizace i v těch buňkách embryí, které jsou za normálních podmínek vůči exogenně dodaným CK necitlivé. Je zde tedy předpokládáno, že AtPUP14 čerpá CK z apoplastu do cytosolu, v důsledku čehož jim zabraňuje v přístupu k CK receptorům umístěným v plazmatické membráně a následné aktivaci a přenosu signálu (Zürcher *et al.*, 2016).

Tento předpokládaný model působení AtPUP14 uvažuje extracelulární CK, které se váží na vazebné domény receptorů lokalizovaných v plazmatické membráně důležitých pro spuštění signální odpovědi, zatímco v cytoplazmě dochází k záchytu bioaktivních ligandů. Na ověření této hypotézy byly použity různě cílené enzymy CKX a byly porovnány jejich účinky na CK signální odpověď. Degradace CK prostřednictvím CKX2 s cílenou sekrecí

do apoplastu vykazovala podobný účinek CK signální odpověď jako transport CK z apoplastu do cytosolu buněk, zatímco varianta CKX2 s chybějícím N-terminálním signálním peptidem stejně jako CKX 7, která je také lokalizována v cytoplasmě, CK signální odpověď neovlivnily. To naznačuje, že za spuštění CK signální odpovědi by mohly odpovídat apoplastické CK, nikoliv cytoplazmatické (Zürcher *et al.*, 2016; Durán-Medina *et al.*, 2017).

Nedostatkem tohoto modelu je však zatím neznámá afinita AtPUP14 k CK, která je podstatná pro porozumění její fyziologické a transportní funkce. Předpokládá se, že je AtPUP14 součástí transportního systému s vysokou afinitou, který byl v *Arabidopsis thaliana* pozorován, nebyl ale jednoznačně objasněn (Cedzich *et al.* 2008). Přesto by však transport CK do cytosolu pomocí AtPUP14 nemusel být natolik efektivní, aby zabránil spuštění signální odpovědi CK receptory v cytoplazmatické membráně (Romanov *et al.*, 2018).



Obrázek 6: Model zapojení AtPUP14 v signalizaci CK. PUP14 (červená barva) způsobuje translokaci apoplastických CK do cytosolu, kde dochází k jejich přeměně na neaktivní formy (tečkované kruhy). To vede ke snížení vazby na CK receptory lokalizované v plazmatické membráně a tím následně ke snížení aktivace signální odpovědi (zelená barva označuje signální aktivitu CK). PM – plazmatická membrána, převzato ze Zürcher *et al.*, 2016.

3.3.3 Ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT)

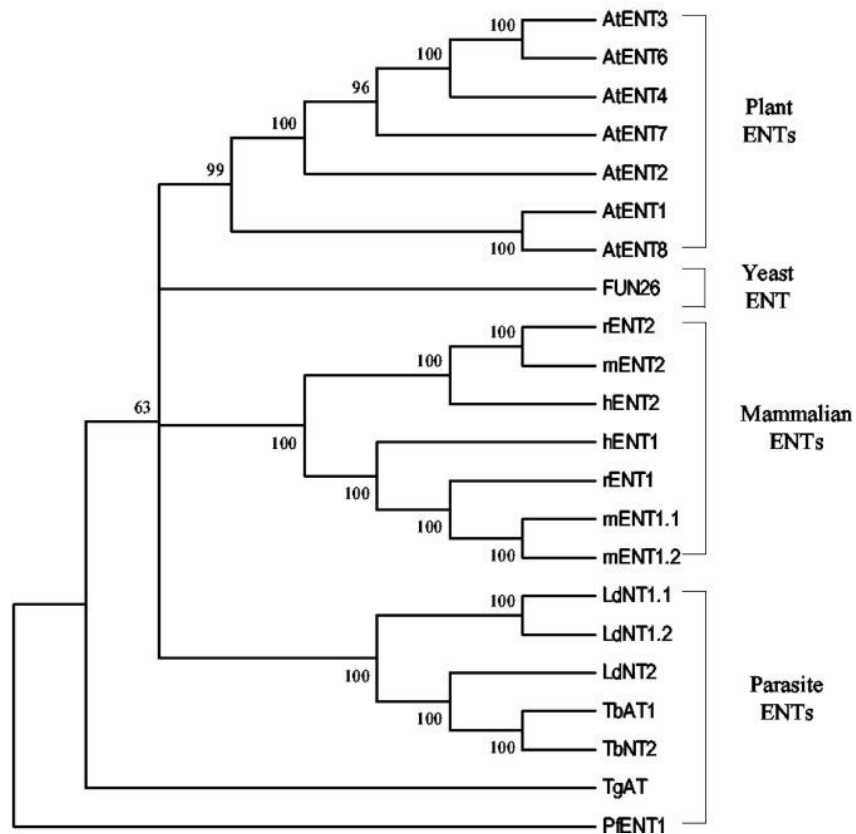
Nukleosidové transportéry zajišťují transport purinových a pyrimidinových nukleosidů a jejich analogů skrz plazmatické membrány (Li *et al.*, 2003; King *et al.*, 2006). Jsou také nezbytné pro syntézu nukleotidů, a to především v buňkách, ve kterých neprobíhá syntéza *de novo* (syntéza nového purinového kruhu), ale užitím takzvané „šetřící“ reakce (syntéza z bází a nukleosidů) (Hyde *et al.*, 2001).

V závislosti na mechanismu transportu, který zprostředkovávají, můžeme nukleosidové transportéry rozdělit do dvou skupin. První skupinu představují ENT, které obvykle transportují nukleosidy difuzí ve směru jejich koncentračního gradientu (Baldwin *et al.*, 1999), vyžadují tedy transmembránový protonový gradient a byly popsány u různých prokaryotních i eukaryotních organismů (Möhlmann *et al.*, 2001; King *et al.*, 2006). Druhou skupinou jsou koncentrativní nukleosidové transportéry (CNT). Jsou to membránové proteiny, které katalyzují transport nukleosidů proti jejich koncentračnímu gradientu. Řadí se mezi aktivní transportéry zprostředkovávající proton-nukleosidový symport (Griffith *et Jarvis*, 1996). Vyskytují se u eukaryot a bakterií, jejich výskyt v rostlinách však nebyl dosud potvrzen (King *et al.*, 2006).

Ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT) patří mezi integrální membránové proteiny zajišťující transport nukleosidů a jejich analogů skrz plazmatickou membránu ve směru koncentračního gradientu, vyjma prvoků, u kterých zprostředkovávají proton-nukleosidový symport (Hyde *et al.*, 2001; King *et al.*, 2006).

Na základě možné inhibice jejich transportních funkcí vyvolané nukleosidovým analogem nitrobenzylmerkaptopurinem (NBMPR) mohou být ENT rozděleny na ekvilibrativní nesenzitivní (*ei*), které nejsou tímto ribonukleosidem výrazně inhibovány, a ekvilibrativní senzitivní (*es*), u kterých k výrazné inhibici dochází (Griffith *et Jarvis*, 1996).

Zástupci ENT se vyskytují u různých taxonomicky odlišných organismů (Obrázek 7), mezi které patří i člověk, myš, pláštěnci, rostliny nebo bakterie, u kterých byly ENT objeveny teprve poměrně nedávno (Acimovic *et Coe*, 2002). Obecně vykazují ENT širokou substrátovou specifitu (Hyde *et al.*, 2001; Cabrita *et al.*, 2002).



Obrázek 7: Fylogenetická příbuznost ENT savců, rostlin, parazitů a kvasinek na základě jejich srovnání jejich transportních funkcí. AtENT – *Arabidopsis thaliana* ENT, FUN – funkčně necharakterizovaný transportér („function unknown now“), rENT – krysí ENT, mENT – myší ENT, hENT – lidský ENT, LdNT – *Leishmania donovani* nukleosidový transportér, PfENT – *Plasmodium falciparum* ENT, TbAT – *Trypanosoma brucei brucei* adenosinový transportér, TbNT – *Trypanosoma brucei brucei* nukleosidový transportér, TgAT – *Toxoplasma gondii* adenosinový transportér. Převzato z Li *et al.*, 2003.

U rostlin byly ENT poprvé identifikovány jako domnělé nukleosidové transportéry vykazující podobnost s hENT1 a hENT2, které se nacházejí v lidském organismu a jsou lokalizovány na cytoplazmatické membráně. Prvním identifikovaným členem této rodiny transportérů u rostlin byl ENT1 v *Arabidopsis thaliana* (Li *et Wang*, 2000).

V genomu *Arabidopsis thaliana* existuje 8 známých isoform ENT, a sice AtENT1 až AtENT8. Z fylogenetického hlediska mohou být rozděleny do dvou podskupin, kdy do první mohou být zařazeny AtENT1 a 8 a do druhé pak AtENT2, 3, 4, 6 a 7 (Obrázek 7), z čehož vyplývá, že i mezi ENT jednoho rostlinného druhu mohou existovat genetické a nebo funkční rozdíly (Li *et al.*, 2003). Transportéry patřící do této rodiny mají 11 předpokládaných transmembránových domén a z evolučního hlediska jsou příbuzní s prokaryotními nukleosidovými transportéry (Acimovic *et Coe*, 2002).

Jelikož ENT zajišťují transport nukleosidových derivátů, vznikl předpoklad, že by mohly být zapojeny také do transportu neaktivních forem CK v rostlinách. Mutace genu *AtENT8* mající za následek potlačení fenotypu CK nadprodukcujících rostlin a

charakterizace AtENT6 a OsENT2 v kvasinkovém expresním systému pak zapojení ENT do transportu CK potvrdily (Sun *et al.*, 2005).

3.3.3.1 AtENT1

Prvním u rostlin identifikovaným členem z rodiny ENT byl ENT1 v *Arabidopsis thaliana* lokalizovaný na plazmatické membráně (Li *et Wang*, 2000). Byl identifikován pomocí funkční komplementace kvasinkové mutantní linie W303, která vykazuje deficit v biosyntéze adeninu. Byla tak potvrzena jeho schopnost transportovat adenosin, k němuž vykazuje vysokou afinitu, a byl také schopen transportovat guanosin a cytidin, i když s menší afinitou než adenosin. Na transportu uridinu, který je běžně transportován různými ENT nalezenými u savců, se však AtENT1 významně nepodílel. Podrobení biochemickým analýzám ukázalo, že AtENT1 se podílel na katalýze nukleosid-protonového symportu. Lze tedy předpokládat, že AtENT1 funguje jako transportní protein se širokou substrátovou specifitou (Möhlmann *et al.*, 2001).

Gen kódující AtENT1 je exprimován konstitutivně s lokalizací na plazmatické membráně v kořeni, stonku, listu, květu a šišuli s přibližně stejnou intenzitou (Li *et Wang*, 2000), významně zvýšená exprese byla identifikována také v pylu rostlin (Bernard *et al.*, 2011). Přestože exprese ostatních členů AtENT vykazuje rozdílnou orgánovou specifitu, u všech byla exprese zaznamenána v listech a květech, což by mohlo naznačovat, že základ syntézy nukleotidů se odehrává právě v těchto dvou orgánech (Li *et al.*, 2003)

Na základě porovnání aminokyselinových sekvencí bylo zjištěno, že AtENT1 vykazovala významnou podobnost 20 – 30 % s několika dalšími ENT nalezenými u prvoků a savců (Li *et Wang.*, 2000).

Co se týče transportních funkcí, jakožto protonový symportér by AtENT1 mohl být zapojen i do exportu nukleosidů z vakuoly do cytosolu. Nabízí se domněnka, že by se AtENT1 mohl podílet na exportu adenosinu a dalších nukleosidů pocházejících z degradace RNA ve vakuolách, které pak mohou být recyklovány působením nukleosidových kináz nebo společným působením nukleosidové hydrolázy (NSH) a adenin-fosforibosyltranserázy (APRT). Tyto recyklační reakce mají vliv na intra- a extracelulární hladiny ATP. Extracelulární ATP spolu s adeninem obsaženým v cytosolu negativně ovlivňují metylaci zprostředkovanou S-adenosylmethioninem (SAME), což má za následek změny ve fenotypu mutantních linií ENT1 jako například redukci růstu nebo klíčení pylu (Bernard *et al.*, 2011).

3.3.3.2 AtENT3

Mezi členy rodiny AtENT byla nejvyšší exprese zaznamenána u AtENT1 a AtENT3, a to zejména v kořenech rostlin. Zatímco AtENT1 je exprimován především v prodlužovací zóně kořene, kořenové kůře, kořenových vláscích a v hydatodách listů (Li *et al.*, 2003), AtENT3 v kořenové špičce, v cévách kořene i listů, případně v květech či šešulích (Li *et al.*, 2003; Traub *et al.*, 2007; Cornelius *et al.*, 2012). Mezi transportními procesy zprostředkovanými těmito dvěma transportéry jsou však jisté rozdílnosti.

K téměř úplné inhibici adenosinového transportu u AtENT1 docházelo vlivem karbonyl kyanid m-chlorofenylhydrazonu (CCCP) a dinitrofenolu (DNP) (Möhlmann *et al.*, 2001), které slouží jako translokátory protonů přes membrány, zatímco u AtENT3 byl adenosinový nebo uridinový transport inhibován pouze asi o 10 % při použití CCCP a o 35 % při použití DNP (Li *et al.*, 2003). K částečné inhibici adenosinového transportu u AtENT3 pak docházelo při použití nanomolárních koncentrací dilazepu a dipyridamolu, kdežto u AtENT1 nebyl transport adenosinu významně ovlivněn ani jednou z těchto látek (Li *et al.*, 2003).

Z hlediska funkce by AtENT3 mohl být popsán jako substrát-protonový symportér lokalizovaný na plazmatické membráně (Traub *et al.*, 2007). Je hlavním transportérem pro příjem uridinu kořeny rostlin a rovněž je jím zprostředkován příjem nukleosidů semenáčky (Chen *et al.*, 2006).

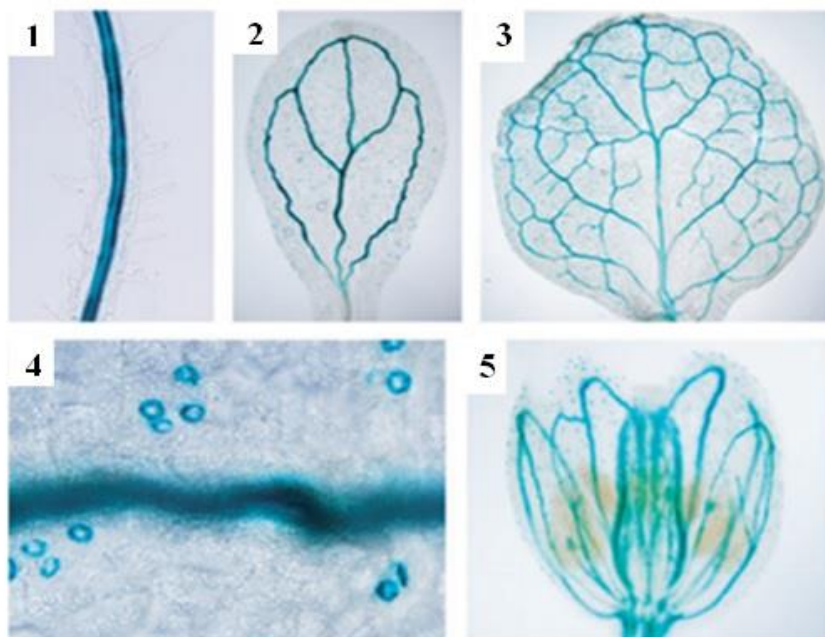
K objasnění transportních funkcí AtENT byly použity různé T-DNA inzerční linie klíčící za přítomnosti toxického analogu uridinu, 5-fluoruridinu, přičemž v jeho přítomnosti byla růstu schopna pouze T-DNA inzerční linie *ent3-1*. U této mutantní linie byl příjem 5-fluoruridinu blokován, z čehož vyplývá, že *ent3-1* vykazuje deficit funkčního genového produktu AtENT3 a také, že žádný z dalších AtENT není schopen ztrátu funkčního AtENT3 proteinu kompenzovat (Traub *et al.*, 2007). Snížená citlivost mutantní linie *ent3* vůči nukleosidovým formám CK, tZR a iPR, naznačuje, že by AtENT3 mohl být zapojen do transportu nukleosidových forem CK do buněk (Sun *et al.*, 2005).

3.3.3.3 AtENT6

Transportér AtENT6 byl prvním z členů AtENT, u kterého byla potvrzena schopnost transportu CK nukleosidů. Má až 91% sekvenční podobnost s AtENT3 (Li *et al.*, 2003) a je rovněž lokalizován na plazmatické membráně buněk (Wormit *et al.*, 2004), přičemž

může být exprimován v cévách kořene, listu a květu nebo v průduších rostlin (Obrázek 8) (Hirose *et al.*, 2008).

V experimentech s kvasinkovými expresními systémy byl adenosinový import pomocí iPR výrazně inhibován, z čehož vyplývá, že AtENT6 by podobně jako homologní AtENT3 mohl být zapojen do transportu iPR. Vyšší afinita AtENT6 k iPR než k tZR by mohla vysvětlovat rozdílnou distribuci iP nebo tZ typu CK (Hirose *et al.*, 2008).



Obrázek 8: Pletivově specifická exprese AtENT6 zobrazena za použití β -glukuronidázového (GUS) reportérového systému. Kořen (1), kotyledon (děložní lístek, 2), list růžice (3), list růžice po přiblížení (4) a květ (5), převzato z Hirose *et al.*, 2008Cabrita.

3.3.3.4 AtENT7

Mechanismus transportu zprostředkovaného AtENT7 je oproti ostatním dosud charakterizovaným AtENT protonově nezávislý a může být chápán jako klasický ekvilibrativní typ transportu, což naznačuje funkční podobnost s ENT nalezenými u savců. Biochemické analýzy ukázaly vysokou míru afinity AtENT7 k adenosinu a také jeho schopnost transportu volných bází, což naznačuje, že by AtENT7 mohla být zapojena do CK transportu, přestože dosud nebyla podrobněji popsána (Girke *et al.*, 2015).

3.3.3.5 AtENT8

Podle aminokyselinové sekvence vykazuje AtENT8 47,6% podobnost s AtENT1, zatímco AtENT2, 4, 6 a 7 mají větší podobnost mezi sebou navzájem než mezi kterýmkoli z nich a

AtENT1 a EtENT8. Proto jsou AtENT1 a 8 řazeny do jedné společné podskupiny, kdežto AtENT2, 4, 6 a 7 do druhé (Li *et al.*, 2003).

Silnou expresi má AtENT8 ve stonku a v šešuli (Wormit *et al.*, 2004). Na základě experimentů s AtENT8 to nejprve vypadalo, že transportní funkce u AtENT8 chybí, jelikož nedocházelo k transportu žádného z pěti testovaných nukleosidů – adenosinu, guanosinu, cytidinu, uridinu (Wormit *et al.*, 2004) ani thymidinu (Chen *et al.*, 2006). Teprve v pozdějších experimentech bylo potvrzeno zapojení AtENT8 do transportních procesů. Analýza T-DNA inzerční linie SOI33/AtENT8 ukázala sníženou citlivost této mutantní linie na nukleosidové typy CK, tZR a iPR.

Nadprodukce AtENT8, stejně jako příbuzného AtENT3, má za důsledek zvýšenou citlivost vůči iPR, ne však vůči iP. Mutace v genech kódujících tyto dva zmíněné transportéry způsobují snížený příjem iPR, což značí jejich CK specifickou transportní funkci. Rozdílné vzory exprese AtENT3 a AtENT8 mohou značit rozdílné působení těchto dvou transportérů v průběhu vývoje rostlin (Sun *et al.*, 2005).

3.3.3.6 AtENT2, 4 a 5

Sekvenční analýzy AtENT2 a AtENT5 naznačují, že by se mohly nacházet v plastidech a mitochondriích. Ani jeden z těchto členů se však nezdařilo klonovat a blíže popsat, což mohlo být pravděpodobně způsobeno nízkou úrovní exprese odpovídajících genů v použitých rostlinách. U AtENT4 byla zaznamenána nejvyšší afinita ke guanosinu, afinita ke všem ostatním nukleosidům však byla ve srovnání se všemi testovanými ENT nejnižší (Wormit *et al.*, 2004).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál

Arabidopsis thaliana, ekotyp Columbia (Col-0)

Arabidopsis thaliana, ekotyp Landsberg *erecta* (Ler)

Arabidopsis thaliana, T-DNA inzerční linie *ent1* (SALK_025174)

Nicotiana benthamiana

Chemokompetentní bakterie *Escherichia coli* TOP 10

Elektrokompetentní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

4.2 Chemikálie

2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina (MES) – Duchefa Biochemie (Holandsko)

2-amino-2-hydroxymetylpropan-1,3-diol (Tris) – Duchefa Biochemie (Holandsko)

3', 5'-dimetoxy-4'-hydroxyacetofenon (acetosyringon) – Sigma-Aldrich (USA)

Agaróza – Merck Life Science (Německo)

Alfa Aesar Gellan Gum – Thermo Fisher Scientific (USA)

DMSO – Thermo Fisher Scientific (USA)

dNTPs – Thermo Fisher Scientific (USA)

Dusičnan vápenatý – Lachner (Česká republika)

Ethanol – Lachner (Česká republika)

Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) – Penta (Česká republika)

GelRed – Sigma-Aldrich (USA)

Glukóza – Sigma-Aldrich (USA)

Glycerol – Sigma-Aldrich (USA)

Hydroxid draselný – Lachner (Česká republika)

Chlorid draselný – Lachner (Česká republika)

Chlorid hořečnatý – Penta (Česká republika)

Chlorid sodný – Lachner (Česká republika)

Isopropanol – Lachner (Česká republika)

Kyselina octová – Lachner (Česká republika)

LB Broth – Sigma-Aldrich (USA)

Manitol – Lachner (Česká republika)

Milli-Q voda (z přístroje Milli-Q Reference Water Purification System – Merck Life Science (Německo)

Murashige & Skoog including vitamins – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Nuclease-free voda – Sigma-Aldrich (USA)

Polyethylenglykol (PEG) 6000 – Sigma-Aldrich (USA)

Sacharóza – Lachner (Česká republika)

Silwet L-77 – Sigma-Aldrich (USA)

TriTrack DNA Loading Dye (6x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

4.2.1 Antibiotika

Gentamycin – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Kanamycin – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Karbenicilin – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Rifampicin – Duchefa Biochemie (Holandsko)

4.2.2 Enzymy a pufry

Cellulase Onozuka R-10 – Duchefa Biochemie (Holandsko)

DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest Buffer (10x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest EcoRI – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest Green Buffer (10x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest Hind III – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest NotI – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest SalI – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest XbaI – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest XhoI – Thermo Fisher Scientific (USA)

Gateway LR Clonase II Enzyme Mix – Thermo Fisher Scientific (USA)

Macerozyme R-10 – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Phusion HF Reaction Buffer (5x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase – Thermo Fisher Scientific (USA)

Proteinase K Solution – Thermo Fisher Scientific (USA)

T4 DNA Ligase – Thermo Fisher Scientific (USA)

T4 DNA Ligase Buffer (10x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

4.2.3 Standard molekulové hmotnosti

1 kb plus DNA ladder – Thermo Fisher Scientific (USA)

4.3 Použité roztoky

4.3.1 Roztok pro agarózovou elektroforézu

50x TAE pufr: 50 mol·l⁻¹ EDTA, 2 mol·l⁻¹ Tris, 1 mol·l⁻¹ kyselina octová

1x TAE pufr: 20 ml 50x TAE pufru doplněno Milli-Q vodou do 1000 ml

1% (w/v) agarózový gel: 4 g agarózy do 400 ml 1x TAE pufru, rozpuštěno a povařeno v mikrovlnné troubě

4.3.2 Roztoky a média pro výsev semen *Arabidopsis thaliana*

Murashige & Skoog (MS) médium: 4,3 g MS s vitamíny, 0,5 g MES, 10 g sacharóza, úprava pH na 5,7 pomocí KOH, 8 g Gellan Gum, Milli-Q voda do 1000 ml, sterilizace autoklávováním

4.3.3 Roztoky a média pro práci s bakteriemi

Tekuté Luria Bertani (LB) médium: 10 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt, 10 g NaCl, Milli-Q voda do 1000 ml, sterilizace autoklávováním

Agarové Luria Bertani (LB) médium: 10 g trypton, 5g kvasnicový extrakt, 10 NaCl, 15 g agar, Milli-Q voda do 1000 ml, sterilizace autoklávováním

SOC médium (super optimal broth with catabolite repression): 20 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mmol·l⁻¹ KCl (úprava pH na 7,0), Milli-Q voda do 1000 ml, sterilizace autoklávováním, 20 ml sterilní 1 mol·l⁻¹ D-glukóza a 5 ml sterilní 2 mol·l⁻¹ MgCl₂

4.3.4 Roztoky pro izolaci a tranzientní transformaci protoplastů

GM médium: 2,2 g MS s vitamíny, 15,25 g glukóza, 15,25 g manitol, úprava pH na 5,5 pomocí KOH, Milli-Q voda do 500 ml

PEG roztok: 2,36 g 0,1 mol·l⁻¹ Ca(NO₃)₂, 8,19 g 0,45 mol·l⁻¹ manitol, 25 g 25% PEG 6000, úprava pH 9 pomocí KOH, Milli-Q voda do 100 ml

Enzymový roztok: 60 mg celulóza, 100 mg macerozym, GM médium do 50 ml, sterilizace přes filtr

S roztok: 0,44 g MS s vitamíny, 9,6 g sacharóza, Milli-Q voda do 100 ml

4.3.5 Roztoky pro tranzientní transformaci rostlin *Nicotiana bethamiana*

Infiltrační médium: 2,13 g MES, 2,03 g MgCl₂, 0,29 g acetosyringon, Milli-Q voda do 1000 ml

4.3.6 Roztoky pro stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*

Inokulační médium: 2 g MgCl₂, 50 g sacharóza, 50 µl Silwet L-77, Milli-Q voda do 1000 ml

4.4 Komerčně dostupné kity

NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit – Machenery Nagel (Německo)

QIAprep Spin Miniprep Kit – Qiagen (Německo)

RNA, DNA, and protein purification - Machenery Nagel (Německo)

4.5 Primery

Primery dodané firmou Sigma Aldrich (USA) v lyofilizované formě byly dle návodu rozpuštěny v uvedeném množství nuclease-free vody pro získání zásobní koncentrace 100 µmol·l⁻¹. Poté byly do nové 1,5 ml mikrozkušavky 20 x zředěny pro získání pracovní koncentrace 5 µmol·l⁻¹. Všechny použité primery jsou uvedeny v Tabulce 1 a byly navrženy na základě sekvencí genů *ENT* rodiny v *Arabidopsis thaliana*.

Tabulka 1: Seznam použitých primerů

Název primeru	Sekvence	Účel
ENT1_SalI_FW	GTGTGTGTCGACATGACTCCC ATTAGTCAACGAATTTC	Příprava amplikonů se SalI a NotI restričními místy
ENT1_NotI_RE	GTGTGTGCGGCCCGCCCGTCAA TGACCCAGAACCAAGCAATG	
ENT3_SalI_FW	GTGTGTGTCGACATGGCGGAT AGATATGAGAACCAAC	
ENT3_NotI_RE	CACACAGCGGCCCGCCCGTCAA AGGCATTCTTCTTACCAATAA GC	
ENT6_SalI_FW	GTGTGTGTCGACATGGCGGAT ATATACGAGCACC	
ENT6_NotI_RE	CACACAGCGGCCCGCCCGTCAA AGGCATTCTTCTTACCAATAA	

	GC	
ENT8_SalI_FW	GTGTGTGTCGACATGGTTGAT GAGAAAGTGATTGTTGATG CACACAGCGGCCCGCCCGTCTGA	
ENT8_NotI_RE	TGAGCCAGAGCCAACCAATA A	
ENT1_prom_SalI_FW04	GTGTGTGTCGACATGAACATA TCAACTCCATAAGTGC	Příprava amplikonů se SalI a NotI nebo KpnI a NotI restričními místy (pro přípravu konstruktů pod kontrolou nativního promotoru)
ENT3_prom_KpnI_FW01	CACACAGGTACCCCATGCTCC TGAAAACCTTCAG	
ENT6_prom_KpnI_FW03	GTGTGTGGTACCGTTAAGGTG ACAATCTTCAAGTCG	
ENT8_prom_KpnI_FW03	CACACAGGTACCCTGCTTCGA GAGCTAGTCC	
ENT1_promseq_FW01	ACCGAAAGATAGTATCATCTA AGC	Sekvenace a colony PCR
ENT1promseq_RE01	GGCTTAGATGATACTATCTTT CG	
ENT1promseq_FW02	TGGCCTTTTCAAAAAGGCAGC	
ENT1promseq_FW03	CCAAAGACAAACAGTTGATTA AGG	
ENT1promseq_FW04	GGTGAGTTTGGATTATTGTTT GG	
ENT1promseq_FW05	CGTGCTAAAGTTCCAAATTAC GG	
ENT1seq_FW01	GACTAAAGCTGTGTATCCTCA AG	
ENT1seq_FW02	CTTGGTTGTTGGTTTGGCCTC	
ENT1seq_FW05	CGTAATCGCCTTGCTTGTGG	
ENT1seq_RE01	CATAACAACAATCCCCACAGC	
ENT1seq_RE02	GTGGTGGTCATTTGAATTTGT TTAG	
ENT3promseq_FW01	TCCAGGTACATCAAGTTTAGC	
ENT3promseq_RE01	TACCAGAGACCTTGAATATGC	
ENT3promseq_FW02	CTAACGATTGCGGTCTTGAC	
ENT3promseq_FW03	TGGCTTATTGGCAAGAAATAT GC	
ENT3promseq_FW04	CAAGTGCTTTCGTCATGTTGG	
ENT3promseq_FW05	GCTTCACTTATCCAACCTCAC C	

ENT3_FW03	ATGGCGGATAGATATGAGAA CCA
ENT3seq_FW01	TCTGTGTGTTTCTATATGCTTA TGTG
ENT3seq_FW02	GGATATTTGCAGGAGTTGCTT TG
ENT3seq_FW03	CAGTTCAAGGAGGAATGATC G
ENT3seq_RE01	GATTTTGGATACCAGCAGCAG
ENT3seq_RE02	CAAGAATACAGCAAACAACC ATTG
ENT6promseq_FW01	CCGCAATGTATATTTGTCAAA CG
ENT6promseq_RE01	ACACTCATGATTTGGCCAAC
ENT6promseq_FW02	TTGTGACGTCAATAGACATAA GG
ENT6promseq_FW03	TGCTTAAGAAAAGCTCATCCA G
ENT6promseq_FW04	ACATTTGGTGGTTTTTGTTCG
ENT6promseq_FW05	TCTAACCACACCTTATAGAGT GC
ENT6_FW03	ATGGCGGATATATACGAGCAC C
ENT6seq_RE01	CTGATTGATTTTGGATACCCG C
ENT6seq_RE02	CCAAGAATACAGTAGACAAT CATTG
ENT6seq_FW02	AGGGATATTTGCAGGAGTTGC
ENT6seq_FW03	GCAACAAAAGGACGTGGTG
ENT6seq_FW04	GTCACGTTATCTCCTCATTCC
ENT8promseq_FW01	CAGCACATGTAGGAACACC
ENT8promseq_RE01	GTTGCGAGCATTATGTGTTCG
ENT8promseq_FW02	CAAAATCAGAACATGAGAAG TGTCG
ENT8promseq_FW03	TGAGTAGAGCTCTCTTCGTG
ENT8promseq_FW04	ATGGATGTGGAACAAATTTG C
ENT8promseq_FW05	GTCACGAAGAAGAAGGCAAC G

ENT8_FW03	ATGGTTGATGAGAAAGTGATT GTTGATG
ENT8seq_FW01	TTCCTAGACAGTACATGCAAG C
ENT8seq_FW02	CATGGTTGTTTTCTAGGACT AGG
ENT8seq_FW03	GTTTTGTATAGGCTAGTGTTG G
ENT8seq_RE01	AAGCTGGCCACTTGATTTTCC
ENT8seq_RE02	AAGAAATGGATCACGTACGC AAC
GFPseq_RE01	CTTGCCGTAGGTGGCATCG
pENTR_FW	GCGAGAGTAGGGAAGTGC
pENTR_RE	AACATCAGAGATTTTGAGACA C
p2GW7.0_RE01	GAGATAGATTTGTAGAGAGA GACTGG
MASprom_FW01	GATACTTACGTCACGTCTTGC
UBQ10prom_RE01	CGGTGGAGCTGAAAATTGG
UBQ10prom_FW01	CTCTCTACCGTGATCAAGG

4.6 Vektory

Klonovací vektor s C-terminální GFP sekvencí pENTR2B:GFP, Gateway kompatibilní (poskytl Mgr. David Zalabák, Ph.D.)

Expresní binární vektor pUBQ:pMCS_GW s konstitutivním promotorem genu UBQ10 z *Arabidopsis thaliana*, Gateway kompatibilní

Expresní binární vektor pMCS_GW (bez promotorové oblasti), Gateway kompatibilní

Expresní binární vektor pGWB17 se sekvencí volného GFP pod kontrolou konstitutivního 35S promotoru, Gateway kompatibilní

Expresní vektor p2GW7.0 pro tranzientní expresi v rostlinných protoplastech, Gateway kompatibilní

Expresní vektor p2GW7.0 se sekvencí volného GFP pod kontrolou konstitutivního 35S promotoru, Gateway kompatibilní

4.7 Přístrojové vybavení

Analytické váhy XSR – Mettler Toledo (USA)

Autokláv SANOclav Laboratory autoclave La-MCS – SANOclav (Německo)

Digestoř 1800/900M – Merci (Česká republika)

Elektroporátor ECM 399 – BTX (USA)

Fytotron – Weiss Technik (Německo)

Horizontální elektroforéza Horizontal electrophoresis system Mini Gel II – VWR International, Avantor (USA)

Chlazená centrifuga Mega Star 600R – VWR International, Avantor (USA)

Inkubátor ICT – P-Lab (Česká Republika)

Inkubátor Memmert - VWR International, Avantor (USA)

Inkubátor řady INCU-Line – VWR International, Avantor (USA)

Inkubovaná třepačka Innova S44i – Eppendorf AG (Německo)

Konfokální mikroskop LSM 710 – Zeiss (Německo)

Laminární box Airstream Gen 3 Horizontal Laminar Flow Cabinet – Esco Micro Pte. Ltd. (Singapur)

Míchačka magnetická IKA IKAMAG – IKA (Německo)

Mikrocentrifuga/vortex Combi-spin PCV-2400 – Keison products (Velká Británie)

Mikrovlnná trouba – Sencor (Japonsko)

Milli-Q Reference Water Purification System – Merck Life Science (Německo)

NanoDrop One^C – Thermo Fisher Scientific (USA)

pH metr Ultra-Basic Bench-top Meter – Biotech (Francie)

Předvážky – váhy přesné – Mettler Toledo (USA)

Skener Epson Perfection V700 Photo – Epson (Japonsko)

Spektrofotometr UV-1600PC Spectrophotometer – VWR International, Avantor (USA)

Světelný mikroskop B-383PL – OPTIKA Italy (Itálie)

Termoblok ThermoMixer Temperature Control Device – Eppendorf AG (Hamburg, Německo)

Termocykler Doppio – VWR International, Avantor (USA)

Transilluminator Gel Doc EZ System – Bio-Rad Laboratories (USA)

Třepačka POS-300 Orbital Shaking Platform – Keison products (Velká Británie)

Třepačka rotační, inkubovaná – VWR International, Avantor (USA)

4.8 Software

ImageJ – National Institutes of Health (USA)

ImageLab – Bio-Rad (USA)

Microsoft Office Excel – Microsoft (USA)

NEBioCalculator – New England BioLabs (USA)

SnapGene – GSL Biotech LLC (USA)

ZEN blue/black – Zeiss (Německo)

4.9 Metody

4.9.1 Sterilizace a výsev semen *Arabidopsis thaliana*

Pro výsev semen *Arabidopsis thaliana* bylo připraveno Murashige & Skoog (MS) médium, které bylo ve flowboxu za sterilních podmínek nalito na Petriho misky.

Semena *Arabidopsis thaliana* byla před výsevem vysterilizována. Sterilizace i výsev semen probíhaly taktéž ve flowboxu. Semena byla nasypana do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky a následně byla promývána roztoky uvedenými v Tabulce 2. K semenům ve sterilní 1,5 ml mikrozkušavce byl přidán 1 ml 70% ethanolu a semena v něm byla promývána po dobu 3 minut. Následně byl ethanol odpipetován, do 1,5 ml mikrozkušavky byl přidán 1 ml sterilizačního roztoku 16% chlornanu sodného + sterilní destilované vody + 96% ethanolu v poměru 5:4:1 a semena v něm byla promývána po dobu 10 minut. Poté byl sterilizační roztok opět odpipetován a semena byla třikrát promyta sterilní destilovanou vodou. Následně byla semena rovnoměrně vyseta na připravené Petriho misky s MS médiem.

Tabulka 2: Postup sterilizace semen *Arabidopsis thaliana*

Použitý roztok	Čas [min]
Ethanol (70%)	3
NaClO (16%) + H ₂ O + Etanol (96%) (5:4:1)	10
H ₂ O (3x promytí)	-

4.9.2 Fenotypizace kořenové části rostlin *Arabidopsis thaliana*

Pro fenotypizaci kořenové části T-DNA inzerční linie *ent1* byly použity vyseté rostliny *Arabidopsis thaliana*, T-DNA inzerční linie *ent1* (SALK_025174), jako kontrola byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana*, divoký typ Columbia (Col-0). Vysterilizovaná semena byla rovnoměrně vyseta na Petriho misky s MS médiem a poté byly 3 dny ponechány ve tmě při teplotě 4 °C. Po třech dnech byly misky s vysetými semeny přeneseny do fytotronu (16h světlo/8h tma). Po týdnu od umístění do fytotronu byly semenáčky přeneseny na čtvercové misky s čistým MS médiem, kde byly na misku vždy uspořádány do jedné řady v počtu 3 semenáčků Col-0 a 3 semenáčků *ent1*. Tímto způsobem bylo připraveno 17 misek. Misky byly poté v kořenové části semenáčků obaleny černou fólií, aby došlo k omezení vlivu světla na růst kořenů. Kořeny byly poté po dvou dnech snímány použitím skeneru Epson Perfection V700 Photo, snímání bylo v rozmezí dvou až tří dnů opakováno, a to do devátého dne. Délka kořenů byla poté ze snímků analyzována za použití programu ImageJ. Získaná data byla vyhodnocena v programu MS Excel.

4.9.3 Fenotypizace nadzemní části rostlin *Arabidopsis thaliana*

Pro fenotypizaci nadzemní části T-DNA inzerční linie *ent1* byly použity vyseté rostliny *Arabidopsis thaliana*, T-DNA inzerční linie *ent1*, jako kontrola byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana*, divoký typ Columbia (Col-0). Před vysetím byla semena rostlin 1 den máčena v destilované vodě v lednici. Poté byla vyseta do substrátů do malých sazebníčků a byly umístěny do fytotronu (16h světlo/8h tma). Bylo připraveno 15 vzorků. Asi jeden týden byla navíc přes sazebníčky přetažena fólie, aby byla udržena vlhkost a semena vyklíčila. Po 2 – 3 týdnech byly rostliny přesazeny do větších květináčů a umístěny opět do fytotronu (16h světlo/8h tma). U 40 dní starých rostlin byl poté spočítán počet listů (vyjma děložních listů), a to tak, že nejprve bylo potřeba určit, zda rostou ve směru či proti směru hodinových ručiček a následně se odspodu počítají. Dále byla stanovena hmotnost nadzemní části, a to tak, že růžice listů byla odstřižena a zvážena.

Fenotypizace nadzemní části T-DNA inzerční linie *ent1* byla prováděna na katedře biofyziky Mgr. Terezou Vánskou.

4.9.4 Příprava PCR ampliconů

Pomocí řetězové polymerázové reakce (PCR) s využitím Phusion HF DNA polymerázy byla provedena amplifikace genů *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* obsahující *SalI* a *NotI* restrikční místa, v případě *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* pak také restrikční místa *KpnI* a *NotI*. Jako templát byla použita genomická DNA (gDNA) *Arabidopsis thaliana* (poskytl Mgr. David Zalabák, Ph.D.). Reakce byly připraveny podle Tabulky 3, program na termocykleru byl nastaven podle Tabulky 4. Po skončení PCR reakce byla amplifikace ověřena pomocí agarózové elektroforézy.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci genu

Složka	Objem na jednu reakci (μl)
gDNA <i>Arabidopsis thaliana</i>	1,0
DMSO (100 %)	0,6
5x Phusion HF buffer	4,0
Phusion DNA polymerase	0,2
dNTPs (10 mmol·l ⁻¹)	0,4
Forward primer (5 μmol·l ⁻¹)	2,0
Reverse primer (5 μmol·l ⁻¹)	2,0
Nuclease-free voda	9,8
Celkový objem	20,0

Tabulka 4: Podmínky PCR reakce pro PCR amplifikaci genu

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
1) Počáteční denaturace	98	30 s	1
2) Denaturace	98	10 s	
3) Nasednutí primerů	55	20 s	30
4) Elongace	72	variabilně	
3) Konečná elongace	72	5 min	1

4.9.5 Agarózová elektroforéza

Ze zásobního 50x TAE pufru byl doplněním 20 ml 50x TAE destilovanou vodou do 1 l připraven pracovní 1x TAE pufr. Následně byla rozpuštěním a povařením 4 g agarózy v 400 ml 1 x TAE pufru připravena 1 % agaróza. Ta byla poté nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem, k agaróze byly přidány 3 μl barvičky GelRed. Po vychladnutí a ztuhnutí agarózy byl hřebínek vytažen a vanička s gelem byla přenesena do elektroforetické komory naplněné 1x TAE puftrem tak, aby byl gel kompletně ponořen. Do

jamek na gelu byly poté napipetovány vzorky a standard molekulové hmotnosti. Poté byla spuštěna elektroforéza, kdy byly nanesené vzorky separovány při napětí 100 V po dobu 30 minut. Po provedení elektroforézy byl pro vizualizaci vzorků na gelu použit UV transiluminátor. Snímky gelů byly upravovány v programu ImageLab.

4.9.6 Přečištění PCR produktů

Po proběhnutí PCR a ověření produktů pomocí gelové elektroforézy byly získané amplikony přečištěny za použití NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu. Vybrané reakční směsi byly spojeny do jedné 1,5 ml mikrozkušavky, následně byl přidán NTI pufr v poměru dvou dílů pufru na jeden díl vzorku. Připravená směs byla nanesena na NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kolonku (maximální objem 700 μ l) a centrifugována (11000 \times g, 21 $^{\circ}$ C, 30 sekund). Tekutina prošlá kolonkou byla ze sběrné zkumavky vylita, v případě, že objem vzorku byl větší než 700 μ l, byl tento krok ještě jednou zopakován a na kolonku bylo naneseno zbývající množství vzorku (opět maximální objem 700 μ l). Po nanesení objemu celého vzorku byla kolonka promyta 700 μ l NT3 pufru a byla provedena centrifugace (11000 \times g, 21 $^{\circ}$ C, 30 sekund). Tekutina prošlá kolonkou byla ze sběrné zkumavky vylita a tento krok ještě jednou zopakován. Po následném vylití tekutiny prošlé kolonkou byla zkumavka s kolonkou centrifugována naprázdno (1000 \times g, 21 $^{\circ}$ C, 1 minuta), aby došlo k efektivnímu odstranění zbytkového ethanolu z NT3 pufru. Kolonka byla poté přenesena do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a DNA byla eluována do 20 μ l elučního NE pufru. Kolonky byly 1 minutu nechány inkubovat při teplotě 21 $^{\circ}$ C, poté byly centrifugovány (11000 \times g, 21 $^{\circ}$ C, 1 minuta). Koncentrace získaných přečištěných produktů byla poté stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop.

4.9.7 Restrikce

Metoda restrikce byla využita pro PCR produkty a pro vektory využitě ke klonování konstruktů. Také byla využívána kontrolní restrikce pro ověření správnosti připravených konstruktů. Reakce probíhaly za přítomnosti FastDigest pufru a FastDigest restrikčních enzymů a byly napipetovány podle Tabulky 5 nebo Tabulky 6. Po napipetování všech složek byla reakční směs promíchána po dobu přibližně 2 sekund pomocí vortexu s následnou krátkou mikrocentrifugací. Poté byla inkubována při teplotě 37 $^{\circ}$ C po dobu 15 – 20 minut.

Tabulka 5: Klonovací restrikční reakce PCR produktů a vektorů

Složka	Objem jednotlivých složek [μl]
FastDigest Buffer	10,0
Restrikční enzym 1	5,0
Restrikční enzym 2	5,0
PCR produkt / vektor	variabilně
Nuclease-free voda	variabilně
Celkový objem	100,0

Tabulka 6: Kontrolní restrikční reakce PCR produktů a vektorů

Složka	Objem jednotlivých složek [μl]
FastDigest Green Buffer (10x)	1,0
Restrikční enzym 1	0,5
Restrikční enzym 2	0,5
PCR produkt / vektor	variabilně
Nuclease-free voda	variabilně
Celkový objem	10,0

4.9.8 Ligace

Metoda ligace byla využita pro vložení naštěpených PCR produktů do klonovacího vektoru pENTR2B:GFP. Ligace byla nastavena v molárním poměru inzerť:vektor – 3:1, k jehož výpočtu byl použit NEBioCalculator. Reakce probíhala za přítomnosti ligačního pufru a enzymu T4 DNA ligázy, byla napipetována dle Tabulky 7. Po napipetování všech složek byla reakční směs promíchána po dobu přibližně 2 sekund pomocí vortexu s následnou krátkou mikrocentrifugací. Reakce poté probíhala přes noc při teplotě 21 °C.

Tabulka 7: Ligační reakce PCR produktů a vektorů

Složka	Objem jednotlivých složek [μl]
T4 DNA Ligase buffer	2,0
Vektor	přibližně 200 ng
PCR produkt	variabilně
T4 DNA Ligase	1,0
Nuclease-free voda	variabilně
Celkový objem	20,0

Pro ukončení ligační reakce byla reakční směs inkubována při teplotě 65 °C po dobu 10 minut. Část ligační reakční směsi byla poté použita k transformaci bakterií.

4.9.9 Transformace bakterií

4.9.9.1 Transformace bakterií *Escherichia coli* TOP10 metodou teplotního šoku

Pro transformaci bakterií metodou teplotního šoku byly použity chemokompetentní bakterie *Escherichia coli* TOP10. Nejprve byly vytaženy z mrazáku (- 80 °C) a pozvolna po dobu přibližně 20 minut nechány rozpustit na ledu. Následně bylo k bakteriím v 1,5 ml mikrozkušavce přidáno 5 µl směsi (po ligační nebo později LR reakci) a bakterie spolu s ligační nebo rekombinační směsí byly inkubovány na ledu po dobu přibližně 30 minut. Po uplynutí inkubační doby byly mikrozkušavky s bakteriemi umístěny na 50 sekund do termobloku předehřátého na 42 °C. Po vystavení bakterií tomuto teplotnímu šoku byly mikrozkušavky opět na 2 minuty umístěny na led. Poté bylo bakteriím s ligační nebo rekombinační směsí přidáno 250 µl tekutého SOC média. Takto připravená směs byla umístěna na třepačku, kde byla inkubována při 400 otáčkách za minutu (RPM) a teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Po uplynutí inkubační doby byly bakterie centrifugovány (3000 RMP, 21 °C, 3 minuty). Poté byla ve flowboxu přibližně polovina supernatantu z mikrozkušavky odpipetována a transformované bakterie byly resuspendovány ve zbývajícím objemu supernatantu. Následně byly bakterie napipetovány na předem připravené Petriho misky s LB médiem s přidaným antibiotikem kanamycinem a pomocí sterilní skleněné hokejky byly rozetřeny. Připravené misky s transformovanými bakteriemi byly přes noc inkubovány při teplotě 37 °C.

4.9.9.2 Transformace bakterií *Agrobacterium tumefaciens* metodou elektroporace

Pro transformaci bakterií metodou elektroporace byly použity elektrokompetentní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Nejprve byly vytaženy z mrazáku (- 80 °C) a pozvolna po dobu přibližně 10 minut nechány rozpustit na ledu. Následně bylo k bakteriím v 1,5 µl mikrozkušavce přidáno 5 µl rekombinační směsi (po LR reakci). Napětí elektroporátoru bylo nastaveno na 1800 V. Vzorky bakterií spolu s rekombinační směsí byly napipetovány do předem vychlazených kyvet, kyvety pak byly umístěny do elektroporační komory, kde bylo na vzorky aplikováno napětí 1800 V po dobu 5 ms. Po aplikaci napětí bylo do kyvet přidáno 200 µl předehřátého SOC média. Takto připravené vzorky byly poté umístěny na třepačku, kde byly inkubovány při 400 RPM a teplotě 28 °C po dobu 1 hodiny. Po uplynutí

inkubační doby bylo ve flowboxu 25 µl transformovaných bakterií napipetováno na předem připravené Petriho misky s LB médiem s přidanými antibiotiky gentamycin, kanamycin a rifampicin a pomocí sterilní skleněné hokejky rozetřeny. Připravené misky s transformovanými bakteriemi byly poté inkubovány při teplotě 28 °C po dobu dvou dnů.

4.9.10 Colony PCR

K ověření přítomnosti požadovaných klonovaných genů ve vektorech byla využita metoda colony PCR prováděna z narostlých bakteriálních kolonií. Pro colony PCR byl využit komerční DreamTaq Green PCR Master Mix, primery a jako templát sloužily bakteriální kolonie narostlé na Petriho misce s LB médiem s obsahem antibiotik odebrané pomocí špičky. Reakce byly napipetovány podle Tabulky 8, nejprve byla do mikrozkušavky napipetována reakční směs obsahující všechny složky, použité primery (uvedeny v Tabulce 1) byly vždy kombinovány tak, aby jeden, genově specifický primer, nasedal na klonovaný PCR produkt, zatímco co druhý pak na vektor. Následně byla reakční směs napipetována po 20 µl do PCR zkumavek (tzv. stripů) a do jednotlivých reakčních směsí byly pomocí špičky přidány vzorky bakteriálních kolonií. Všechny použité vzorky bakteriálních kolonií byly zároveň nanесeny na novou Petriho misku s LB médiem s obsahem antibiotik, tzv. „replica plate“, která sloužila k uchování testovaných bakteriálních klonů a pozdějšímu výběru těch klonů bakterií, u kterých byla potvrzena přítomnost požadovaného produktu, které byly po proběhnutí PCR reakce ověřovány pomocí agarózové elektroforézy. Podmínky reakce byly nastaveny podle Tabulky 9.

Tabulka 8: Reakční směs pro colony PCR

Složka	Objem jednotlivých složek [µl]
DreamTaq green PCR master mix	10,0
Forward primer (5 µmol·l ⁻¹)	2,0
Reverse primer (5 µmol·l ⁻¹)	2,0
Templát - vzorek kolonie	-
Nuclease-free voda	6,0
Celkový objem	20,0

Tabulka 9: Podmínky PCR reakce pro colony PCR

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
1) Počáteční denaturace	95	3 min	1
2) Denaturace	95	30 s	
3) Nasednutí primerů	55	30 s	27
4) Elongace	72	1 min	
5) Konečná elongace	72	15 min	1

4.9.11 Příprava glycerolových bakteriálních zásobních kultur a izolace plazmidů

Bakteriální kolonie narostlé na Petriho miskách s LB médiem s obsahem antibiotik byly pomocí sterilních špiček naočkovány do 50 ml centrifugačních zkumavek obsahujících 10 ml tekutého LB média a přidaná antibiotika. Poté byly bakterie v tekutém médiu nechány přes noc kultivovat při 180 RPM a teplotě 37 °C v případě bakterií *Escherichia coli* nebo 28 °C v případě bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Druhý den bylo ve flowboxu z každé bakteriální kultury odebráno 500 µl do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky, k těmto 500 µl bakteriální kultury bylo přidáno 500 µl 60% glycerolu a obsah mikrozkušavky byl řádně promíchán. Takto připravené bakteriální kultury s glycerolem byly poté zamrazeny v tekutém dusíku a umístěny do mrazáku na (- 80 °C).

Zbývající objem bakteriální kultury byl centrifugován (8000 RPM, 21 °C, 3 minuty). Po centrifugaci byl supernatant z centrifugačních zkumavek odlit a vzniklý pelet byl resuspendován ve 250 µl P1 pufru, který obsahoval RNázu A a činidlo Lyse Blue. Resuspendované bakterie byly poté přeneseny do nových 2 ml mikrozkušavek, kde k nim bylo přidáno 250 µl lyzačního P2 pufru, obsah mikrozkušavky byl několika otočeními promíchán, dokud nedošlo ke zbarvení domodra. Následně bylo přidáno 350 µl neutralizačního N3 pufru a obsah mikrozkušavek byl opět promíchán otáčením, dokud nedošlo k úplnému odbarvení. Vzorky byly centrifugovány (13000RPM, 21 °C, 10 minut). Po centrifugaci bylo 800 µl vzniklého supernatantu odpipetováno a nanášeno na QIAprep 2.0 spin kolonku, přes kterou byl centrifugován (13000 RPM, 21 °C, 50 sekund). Tekutina prošlá při centrifugaci kolonkou byla poté vylita a na kolonku bylo nanášeno 750 µl promývacího PE pufru, vzorek byl opět centrifugován (13000 RPM, 21 °C, 50 sekund) s následným vylitím prošlé tekutiny. Tento krok byl poté ještě jednou zopakován. Kolonky byly dále na prázdno centrifugovány (13000 RPM, 21 °C, 60 sekund), aby byl odstraněn zbylý PE pufr obsahující ethanol. Poté byly kolonky přeneseny do nových 1,5 ml mikrozkušavek a doprostřed kolonek bylo napipetováno 20 µl elučního EB pufru. Po jeho přidání byly vzorky centrifugovány (13000 RPM, 21 °C, 60 sekund). Koncentrace vzorků byly poté změřeny pomocí NanoDropu.

4.9.12 Sekvence DNA

Pro ověření správnosti připravených vzorků byla firmou SEQme (Dobříš, Česká republika) provedena sekvence DNA. Vzorky na sekvenaci byly připraveny podle Tabulky 10, z

izolované DNA byl odebrán objem odpovídající 500 ng, bylo přidáno 5 μ l primeru a reakce byla doplněna nuclease-free vodou do celkového objemu 10 μ l, takto nachystané vzorky byly poté odeslány na sekvenaci. Obdržená výsledná sekvence byla poté srovnána s očekávanou sekvencí. Použité sekvenační primery jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 10: Sekvenační reakce izolované DNA

Templát	Množství	Primer	Celkový objem
Plazmid	500 ng	5 μ l 5 μ M roztoku primeru	10 μ l

4.9.13 Příprava expresních vektorů (LR reakce)

Po izolaci plazmidů byla nasezena LR reakce, která probíhá mezi vstupními vektory pENTR2B:GFP nesoucími klonované ENT geny ohraničené attL rekombinačními místy (tzv. entry klony v systému klonování Gateway) a cílovými vektory p2GW7.0 nebo pUBQ10:pMCS_GW obsahujícími rekombinační attR místa. Výsledným produktem reakce je poté expresní vektor. Reakce byla napipetována podle Tabulky 11, byl použit linearizovaný entry klon a cílový vektor. Tyto objemy byly doplněny nuclease-free vodou a následně byl přidán LR Clonase II enzyme mix. Po napipetování všech složek byla reakční směs promíchána po dobu přibližně 2 sekund pomocí vortexu s následnou krátkou mikrocentrifugací a reakce byla nechána probíhat přes noc při teplotě 21 °C.

Tabulka 11: Reakční směs pro LR reakci

Složka	Objem [μ l]
Entry klon (50 – 150 ng)	1,0 – 7,0
Cílový vektor (150 ng)	1,0
Nuclease-free voda	do 8,0
LR Clonase II enzyme mix	2,0
Celkový objem	10,0

Pro ukončení rekombinační reakce byl druhého dne přidán 1 μ l proteinázy K, reakční směs pak byla krátce inkubována při teplotě 37 °C po dobu 10 minut. Část LR reakční směsi byla poté použita k transformaci bakterií.

4.9.14 Přečištění konstruktů pro přípravu tranzientně nadprodukcujících protoplastů buněčné kultury *Ler*

K přečištění připravených konstruktů pro přípravu tranzientně nadprodukcujících protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler* byl použit RNA, DNA, and protein

purification kit. Nejprve byly připraveny takzvané startovací kultury, a to tak, že do 10 ml tekutého LB média obsahujícího antibiotikum karbenicilin byly ve flowboxu pomocí sterilní špičky z již předem připravených a zamražených (- 80 °C) glycerolových bakteriálních zásobních kultur naočkovány transformované bakterie *Escherichia coli*, které nesly připravené konstrukty *p2GW7.0:ENT1:GFP*, *p2GW7.0:ENT3:GFP*, *p2GW7.0:ENT6:GFP* a *p2GW7.0:ENT:GFP*. Ze startovací kultury bylo na druhý den 500 µl napipetováno do 500 ml LB média obsahujícího antibiotikum karbenicilin a ponecháno přes noc kultivaci při 37 °C a 160 RPM.

Další den byly připravené kultury centrifugovány (6000×g, 4 °C, 15 minut). Vzniklý supernatant byl poté ze zkumavek odlit a k peletu bylo přidáno 12 ml resuspendačního RES pufru, v němž byl resuspendován. Poté bylo přidáno 12 ml lyzačního LYS pufru a vzorek byl při 21 °C po dobu maximálně 5 minut inkubován. Mezitím byl na kolonu umístěn filtr, který byl zvlhčen ekvilibračním EQU pufrem a kolona byla ekvilibrována. Po uplynutí doby maximálně 5 minut inkubace byla lyzovaná bakteriální kultura neutralizována přidáním 12 ml neutralizačního NEU pufru. Lyzovaná bakteriální kultura byla poté nanesena na filtr umístěný v koloně a bylo k ní přidáno 15 ml ekvilibračního EQU pufru, po jehož protečení přes filtr byl filtr vytáhnout a kolona byla promyta pomocí 25 ml promývacího WASH pufru. Lyzát byl poté pomocí 15 ml elučního ELU pufru eluován do 50 ml zkumavky. Sesbíraný eluát byl poté precipitován 10,5 ml isopropanolu při teplotě 21 °C, vzorek byl poté řádně promíchán pomocí vortexu a následně centrifugován (15000×g, 4 °C, 30 minut). Po centrifugaci byl odpipetován supernatant a usazený pelet DNA byl promyt 4 ml 70% ethanolu. Poté byla opět provedena centrifugace (15000×g, 21 °C, 15 minut). Supernatant byl odpipetován a pelet byl pomocí špičky sesbíráán a přenesen do čisté 2 ml mikrozkušavky. Mikrozkušavka se vzorkem byla umístěna do digestoře, aby mohl být ze vzorku vysušen zbylý ethanol. Po vysušení bylo ke vzorku přidáno 20 µl nuclease-free vody, zkumavky byly poté uschovány v mrazáku (- 20 °C) k dalšímu použití.

Takto připravené expresní konstrukty byly poté použity k přípravě tranzientně nadprodukcujících protoplastů.

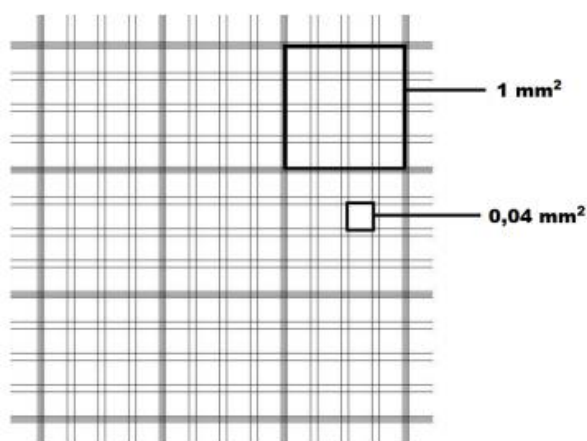
4.9.15 Izolace a tranzientní transformace protoplastů pomocí PEG

Dodaná třídenní kultura *Arabidopsis Ler* byla přenesena do 50 ml zkumavky a centrifugována (1200 RPM, 21 °C, 5 minut). Poté byl odpipetován přebytečný supernatant

tak, aby ve zkumavce zůstalo 5 ml buněčné kultury, ke kterým bylo přidáno 25 ml enzymového roztoku ES, tento objem byl doplněn do 50 ml GM médiem. Obsah zkumavky byl jemně homogenizován a následně přenesen na větší čistou Petriho misku, zabalený do hliníkové fólie, aby se zabránilo přístupu světla, a umístěny na třepačku, kde byly při pokojové teplotě inkubovány při 60 RPM po dobu 4 hodin.

Po 4 hodinách byla kultura s uvolněnými buňkami protoplastů rozdělena do dvou 50 ml zkumavek a centrifugovány (1200 RPM, 21 °C, 5 minut). Supernatant byl z obou zkumavek odpipetován a pelet byl promyt 25 ml GM média s následnou centrifugací (1000 RPM, 21 °C, 5 minut) Supernatant byl poté z obou zkumavek opět opatrně odpipetován, k peletu bylo přidáno 5 ml roztoku S, obsahy obou zkumavek byly poté spojeny do jedné 15 ml zkumavky, ve které byly centrifugovány (800 RPM, 21 °C, 7 minut). Po provedení centrifugace plovaly živé protoplasty na hladině, přibližně 2 ml buněk protoplastů byly z hladiny opatrně odpipetovány a přeneseny do nové 15 ml zkumavky, následně bylo 20 μ l odpipetováno do 2 ml zkumavky a smícháno s 980 μ l GM média, čímž došlo k zředění vzorku pro snadnější stanovení počtu protoplastů.

K tomu byla použita Bürkerova komůrka, na kterou bylo ustříženou špičkou napipetováno 15 μ l zředěného vzorku protoplastů a napipetovaný vzorek byl přikryt krycím sklíčkem. Protoplasty byly pozorovány pod světelným mikroskopem a počítány v devíti velkých čtvercích Bürkerovy komůrky o ploše 1 mm² ohraničených pomocí tří čar (Obrázek 9).



Obrázek 9: Schéma Bürkerovy komůrky

Byly počítány protoplasty, které se nacházely uvnitř velkého čtverce komůrky nebo se dotýkaly jeho dvou předem určených stran. Počet protoplastů v 1 μ l byl poté spočítán podle vzorce:

$$B = \frac{n \cdot z}{c \cdot V \cdot h}$$

kde B je počet buněk v 1 μl ,
 n je napočítané množství buněk
 c je počet započítaných čtverců
 V je plocha čtverce
 h je hloubka komůrky
 z je zředění.

Vypočítaná koncentrace protoplastů byla poté naředěna na požadovanou koncentraci 200 000 protoplastů $\cdot 50 \mu\text{l}^{-1}$.

Do čistých 2 ml mikrozkušavek byly napipetovány dříve izolované a přečištěné konstrukty *p2GW7.0:ENT1:GFP*, *p2GW7.0:ENT3:GFP*, *p2GW7.0:ENT6:GFP* a *p2GW7.0:ENT8:GFP* v množství 5 μg . K nim bylo přidáno 50 μl izolovaných protoplastů a 150 μl PEG, obsah zkumavek byl jemně promíchán a inkubován ve tmě po dobu 30 minut. Po uplynutí doby inkubace byl ke vzorkům přidán 1 ml dusičnanu vápenatého, vzorky byly centrifugovány (800 RPM, 21 °C, 5 minut). Po centrifugaci byl odpipetován supernatant, pelet byl resuspendován v 500 μl GM média a vzorky byly napipetovány na 6ti jamkovou destičku, která byla umístěna do tmy.

Takto připravené vzorky byly poté po dobu 16 hodin inkubovány ve tmě. Po uplynutí doby inkubace bylo 10 μl vzorku pomocí ustřižené špičky napipetováno na podložní sklíčko. Poté byly vzorky překryty krycím sklíčkem a byly pozorovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu.

4.9.16 Tranzientní transformace rostlin *Nicotiana benthamiana*

Nejprve byly připraveny takzvané startovací kultury, a to tak, že do 10 ml tekutého LB média obsahujícího antibiotika gentamycin, kanamycin a rifampicin byly ve flowboxu pomocí sterilní špičky z již předem připravených a zamražených (- 80 °C) glycerolových bakteriálních zásobních kultur naočkovány transformované bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, které nesly připravené konstrukty *pUBQ10::ENT1:GFP*, *pUBQ10::ENT3:GFP*, *pUBQ10::ENT6:GFP*, *pUBQ10::ENT8:GFP*, *pENT1:ENT1:GFP*, *pENT3:GFP*, *pENT6::ENT6:GFP* a *pENT8::ENT8:GFP*. Takto připravené naočkované kultury byly přes noc inkubovány při teplotě 28 °C a 180 RPM.

Pro všechny bakteriální kultury byly pomocí spektrofotometru nejprve změřeny hodnoty optické hustoty při vlnové délce 600 nm (OD_{600}), jako blank bylo použito čisté LB médium. Na základě naměřených hodnot OD_{600} byl do 2 ml mikrozkušavek pro každý konstrukt vypočítán a napipetován určitý objem bakteriální kultury tak, aby suspenze vzniklá po následné centrifugaci a resuspendaci v infiltračním médiu měla hodnotu OD_{600} 0,5. Následně byla provedena centrifugace ($2000\times g$, 4 °C, 10 minut). Resuspendované bakteriální kultury byly inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny.

Další den byly asi 6 týdnů staré rostliny *Nicotiana benthamiana* přeneseny z fytostronu (16h světlo/8h tma) do laboratoře. Před samotnou transformací byly zality vodou a zakryty plastovým obalem, aby tak došlo k otevření průduchů na spodní straně listů. Po uplynutí doby inkubace byly do spodní strany listu pomocí 1 ml stříkaček aplikovány 2 ml bakteriální suspenze. Stříkačka obsahující bakteriální suspenzi byla přiložena ke spodní straně listu, který byl z druhé strany podepřen prstem, a pomalým stláčením pístu byla suspenze do listu vpravena.

Po 72 hodinách byly za použití nůžek a pinzety z okolí místa opatrně odebrány vzorky, které byly přeneseny na podložní sklíčko do kapky vody. Poté byly vzorky překryty krycím sklíčkem a byly pozorovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu.

4.9.17 Stabilní transformace *Arabidopsis thaliana* pomocí metody floral dip

Nejprve byly připraveny takzvané startovací kultury, a to tak, že do 10 ml tekutého LB média obsahujícího antibiotika gentamycin, kanamycin a rifampicin byly ve flowboxu pomocí sterilní špičky z již předem připravených a zamražených (- 80 °C) glycerolových bakteriálních zásobních kultur naočkovány transformované bakterie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, které nesly připravené konstrukty *pUBQ10::ENT1:GFP*, *pUBQ10::ENT3:GFP*, *pUBQ10::ENT6:GFP*, *pUBQ10::ENT8:GFP*, *pENT1::ENT1:GFP*, *pENT3::GFP*, *pENT6::ENT6:GFP* a *pENT8::ENT8:GFP*. Takto připravené naočkované kultury byly přes noc inkubovány při teplotě 28 °C a 180 RPM.

Další den byly přichystány sterilní 2 l Erlenmeyerovy baňky s 500 ml tekutého LB média, do kterých byly ve flowboxu za sterilních podmínek přelity startovací kultury z předchozího dne a poté byly přes noc opět ponechány inkubaci při teplotě 28 °C a 180 RPM.

U rostlin vybraných pro transformaci byly třetího dne nejprve ostříhány všechny opylené květy a vytvořené šesule. Pro všechny bakteriální kultury byly pomocí spektrofotometru nejprve změřeny hodnoty optické hustoty při vlnové délce 600 nm (OD_{600}), jako blank bylo použito čisté LB médium. Po dosažení potřebných hodnot OD_{600} v rozmezí 1 – 1,5 byly bakteriální kultury centrifugovány ($12\ 000\times g$, 4 °C, 10 minut), vzniklý supernatant byl poté odlit a pelet byl resuspendován ve 400 ml inokulačního média.

Připravené vybrané rostliny byly celé na přibližně 10 sekund ponořeny do bakteriálních kultur. Poté byly pomocí papírových utěrek osušeny a zabaleny do potravinářské fólie a umístěny do tmy do následujícího dne.

Čtvrtého dne pak byly transformované rostliny opět rozbaleny, zality vodou a umístěny do fytotronu (16h světlo/8h tma).

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava expresních ENT konstruktů s GFP značkou

V této kapitole jsou popsány postupy klonování využité pro přípravu expresních konstruktů s GFP značkou. Bylo připraveno několik typů fúzních proteinových konstruktů, *35S::ENT1:GFP*, *35S::ENT3:GFP*, *35S::ENT6:GFP* a *35S::ENT8:GFP*, které byly dále použity k tranzientní transformaci protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler*; *pUBQ10::ENT1:GFP*, *pUBQ10::ENT3:GFP*, *pUBQ10::ENT6:GFP* a *pUBQ10::ENT8:GFP*, které byly dále použity k tranzientní transformaci rostlin *Nicotiana benthamiana* a k transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* pro tvorbu stabilních expresních linií; a nakonec série konstruktů pod kontrolou nativních promotorů *pENT1::ENT1:GFP*, *pENT3::pENT3:GFP*, *pENT6::ENT6:GFP* a *pENT8::ENT8:GFP*, které byly rovněž použity k stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*.

5.1.1 Příprava expresních ENT konstruktů s GFP značkou pro tranzientní transformaci do protoplastů *Arabidopsis thaliana*

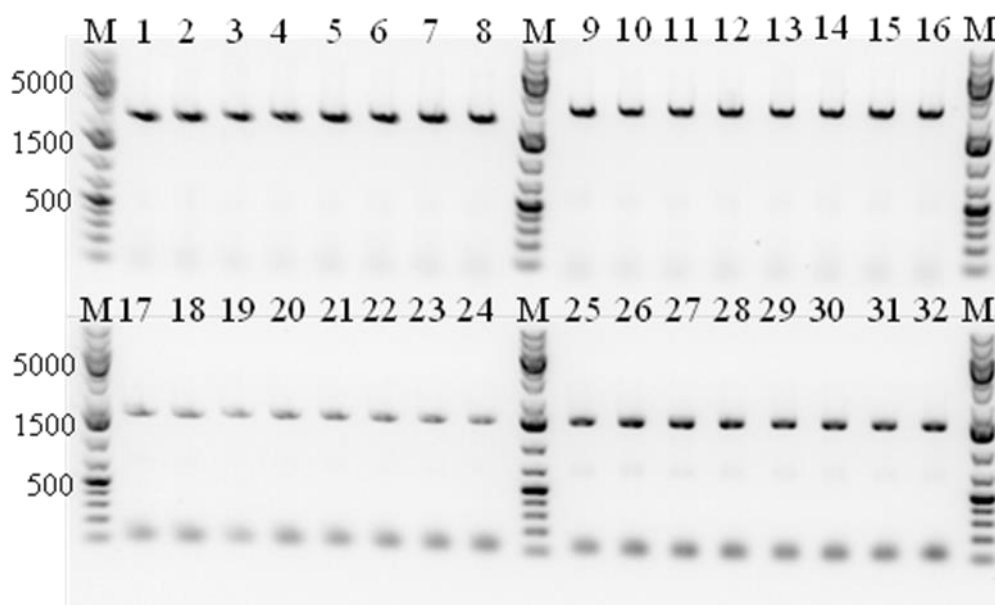
Pro rychlé testování navržených konstruktů byly nejprve připraveny jednotlivé ENT varianty ve fúzi s GFP značkou pro tranzientní expresi v protoplastech *Arabidopsis thaliana*. Za tímto účelem byly ENT klonovány s C-terminální GFP značkou pod konstitutivním 35S promotorem ve vektoru p2GW7.0, konkrétně byly připraveny *35S::ENT1:GFP*, *35S::ENT3:GFP*, *35S::ENT6:GFP* a *35S::ENT8:GFP* konstrukty.

Nejprve byla z genomické DNA *Arabidopsis thaliana* provedena PCR amplifikace genů *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8*; byly použity primery obsahující restrikční místa Sall a NotI. Použité dvojice primerů pro PCR amplifikaci a předpokládaná velikost vzniklých produktů jsou uvedeny v Tabulce 12, teplota tání všech DNA sekvencí (T_m) byla 55 °C.

Tabulka 12: Dvojice primerů pro PCR amplifikaci kompletních *ENT* sekvencí a předpokládaná velikost produktů

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]	T _m [°C]
<i>ENT1</i>	ENT1_SalI_FW	1469	55
	ENT1_NotI_RE		
<i>ENT3</i>	ENT3_SalI_FW	1967	
	ENT3_NotI_RE		
<i>ENT6</i>	ENT6_SalI_FW	2198	
	ENT6_NotI_RE		
<i>ENT8</i>	ENT8_SalI_FW	1404	
	ENT8_NotI_RE		

Vzniklé produkty byly po proběhnutí PCR amplifikace analyzovány pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 10).



Obrázek 10: Elektroforetogram pro kontrolu amplifikace PCR produktu se SalI a NotI restrikčními místy. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1-8 – amplicon *ENT3*, 9-16 – amplicon *ENT6*, 17-24 – amplicon *ENT1*, 25-32 – amplicon *ENT8*. Separace byla provedena v 1% agarózovém gelu.

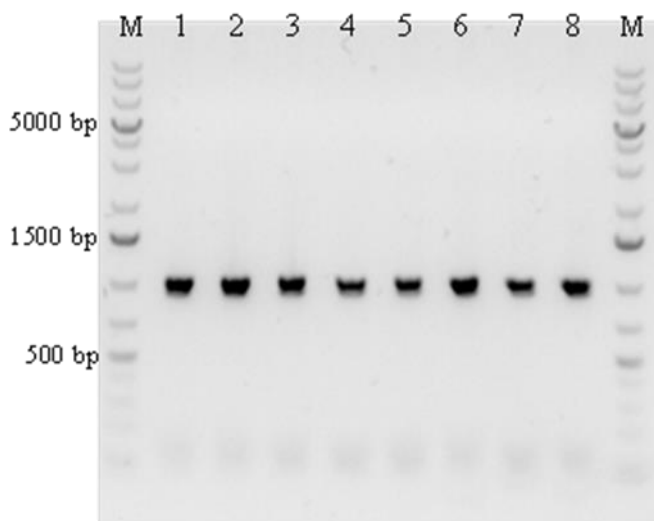
Následovalo přečištění PCR produktů pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu a restrikce, jak PCR produktu, tak vektoru pENTR2B:GFP, pro přípravu tvorby entry klonů jednotlivých *ENT* genů. Restrikce PCR produktů i vektoru pENTR2B:GFP probíhala za účasti FastDigest pufru a FastDigest restrikčních enzymů SalI a NotI po dobu 15 – 20 minut. Po provedení restrikce a naštěpení PCR produktu a vektoru následovala ligace, která sloužila pro vložení PCR produktů do klonovacího vektoru pENTR2B:GFP. Ligační směs byla poté teplotním šokem transformována do kompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10 a bakteriální suspenze byla natřena na Petriho misku s LB médiem obsahující

antibiotikum kanamycin. Bakteriální kolonie byly následně metodou colony PCR testovány na přítomnost inzertů *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* ve vektoru pENTR2B:GFP. Použité dvojice primerů a předpokládané velikosti produktů jsou uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13: Dvojice primerů pro colony PCR a předpokládaná velikost *ENT* produktů

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]	T _m [°C]
<i>ENT1</i>	ENT1seq_FW02	970	55
	pENTR_RE		
<i>ENT3</i>	ENT3seq_FW02	977	
	pENTR_RE		
<i>ENT6</i>	ENT6seq_FW02	979	
	pENTR_RE		
<i>ENT8</i>	ENT8seq_FW02	982	
	pENTR_RE		

Colony PCR reakce byly analyzovány pomocí agarózové elektroforézy – na Obrázku 11 je uveden příklad agarózové elektroforézy pro hledání inzertu *ENT3*. Na obrázku je patrný specifický produkt PCR reakce v očekávané velikosti (977 bp, Tabulka 13).



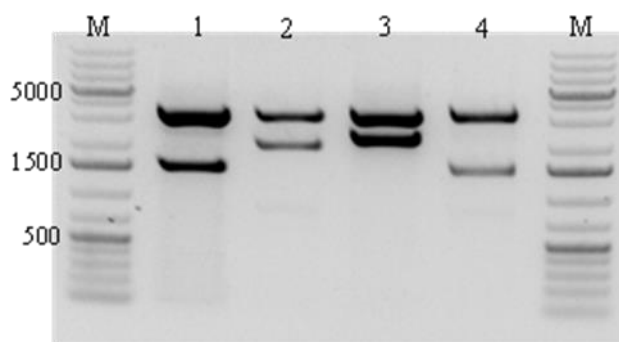
Obrázek 11: Elektroforetogram colony PCR *ENT3* inzertu v pENTR2B:GFP. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), čísla jsou označeny individuální bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení LR reakce. Separace byla provedena v 1% agarózovém gelu.

Na základě této colony PCR byly vybrány domněle pozitivní klony 2, 6 a 8, které byly naočkovány do tekutého LB média obsahujícího antibiotika pro následnou izolaci plazmidů. Obdobně byly připraveny i colony PCR pro *ENT1*, *ENT6* a *ENT8* s následným výběrem domněle pozitivních klonů pro izolaci plazmidů. Izolované plazmidy byly poté ověřovány pomocí kontrolní restrikce. Použité restrikční enzymy a předpokládané velikosti vzniklých naštěpených produktů jsou uvedeny v Tabulce 14.

Tabulka 14: Použité restriční enzymy pro ověření přítomnosti inzertů *ENT* sekvencí a předpokládané velikosti vzniklých naštěpených produktů

Gen	Restriční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
<i>ENT1</i>	NotI + Sall	3014 + 1450
<i>ENT3</i>	NotI + Sall	3014 + 1948
<i>ENT6</i>	NotI + Sall	3014 + 2179
<i>ENT8</i>	NotI + Sall	3014 + 1385

Provedené restrikce byly poté analyzovány pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 12).



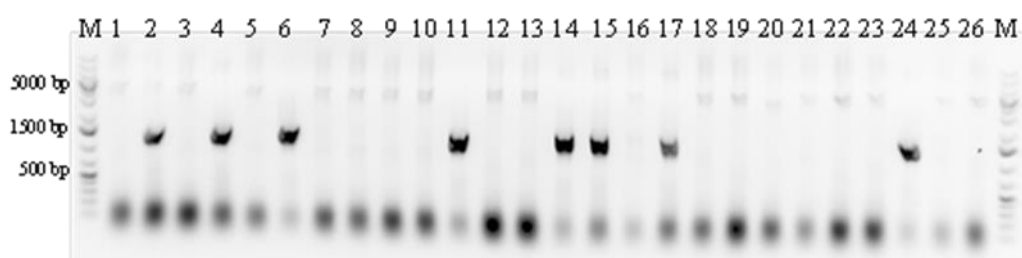
Obrázek 12: Elektroforetogram kontrolní restrikce vybraných klonů pENTR2B:GFP nesoucí geny *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8*. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp). 1 – *pENTR2B:ENT1:GFP* po štěpení NotI + Sall, 2 – *pENTR2B:ENT3:GFP* po štěpení NotI + Sall, 3 – *pENTR2B:ENT6:GFP* po štěpení NotI + Sall, 4 – *pENTR2B:ENT8:GFP* po štěpení NotI + Sall. Separace byla provedena v 1% agarózovém gelu.

Po ověření přítomnosti inzertů *ENT* v pENTR2B:GFP pomocí kontrolní restrikce byla u všech připravených konstruktů provedena série sekvenačních reakcí, které ověřily správnost sekvencí. Po tomto ověření byla následně nasezena LR reakce, která probíhá mezi vstupními vektory *pENTR2B:GFP:ENT* (entry klony) nesoucími klonované geny ohraničené tzv. *attL* rekombinačními místy a cílovým vektorem p2GW7.0 obsahujícími rekombinační *attR* místa – tento vektor je specificky navržený pro tranzientní transformaci do rostlinných protoplastů. Reakční LR směs byla poté teplotním šokem transformována do kompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10 a bakteriální suspenze byla natřena na Petriho misku s LB médiem obsahujícím antibiotikum karbenicilin. Bakteriální kolonie byly následně metodou colony PCR znovu testovány na přítomnost inzertů *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* ve vektoru p2GW7.0. Použité dvojice primerů a předpokládané velikosti produktů jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15: Dvojice primerů pro colony PCR a předpokládaná velikost *ENT* produktů

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]	T _m [°C]
<i>ENT1</i>	ENT1seq_FW01 p2GW7.0_RE01	1563	
<i>ENT3</i>	ENT3seq_FW01 p2GW7.0_RE01	1722	55
<i>ENT6</i>	ENT6seq_FW02 p2GW7.0_RE01	921	
<i>ENT8</i>	ENT8seq_FW01 p2GW7.0_RE01	1800	

Colony PCR reakce byly analyzovány pomocí agarózové elektroforézy – na Obrázku 13 je uveden příklad pro klonování genu *ENT1*.



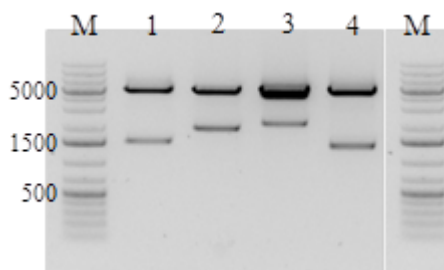
Obrázek 13: Elektroforetogram colony PCR *ENT1* ve vektoru p2GW7.0. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), čísla jsou označeny individuální bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení LR reakce. Separace byla provedena v 1% agarózovém gelu.

Na základě colony PCR byly v případě klonování *p2GW7.0:ENT1:GFP* vybrány domněle pozitivní klony 11, 14 a 15, které byly naočkovány do tekutého LB média obsahujícího antibiotikum karbenicilin pro následnou izolaci plazmidů. Obdobným způsobem byly připraveny i colony PCR pro konstrukty *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* a následně byly vybrány domněle pozitivní klony pro izolaci plazmidů. Izolované plazmidy byly poté ověřovány pomocí kontrolní restrikce za použití vybraných restrikčních endonukleáz, jak je uvedeno v Tabulce 16.

Tabulka 16: Použité restrikční enzymy pro ověření přítomnosti inzertů *ENT* sekvencí a předpokládané velikosti vzniklých naštěpených produktů

Gen	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
<i>ENT1</i>	NotI	5017 + 1512
<i>ENT3</i>	NotI	5017 + 2010
<i>ENT6</i>	NotI	5017 + 2241
<i>ENT8</i>	NotI	5017 + 1447

Kontrolní restrikce byly poté analyzovány pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 14).



Obrázek 14: Elektroforetogram kontrolní restrikce vybraných klonů p2GW7.0 nesoucí geny *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8*. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp). 1 – *p2GW7.0:ENT1:GFP* po štěpení NotI, 2 – *p2GW7.0:ENT3:GFP* po štěpení NotI, 3 – *p2GW7.0:ENT6:GFP* po štěpení NotI, 4 – *p2GW7.0:ENT8:GFP* po štěpení NotI. Separace byla provedena v 1% agarózovém gelu.

Po provedení kontrolní restrikce byly plasmidy znovu odeslány na kontrolní sekvenaci za použití sekvenačních primerů uvedených v Tabulce 1. Po ověření správnosti ENT sekvencí byly čtyři získané ENT klony použity pro preparativní izolaci plasmidové DNA, kterážto byla dále použita pro transformaci a přípravu tranzientně nadprodukcujících protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler*.

5.1.2 Příprava expresních ENT konstruktů s GFP značkou pro tranzientní transformaci rostlin *Nicotiana benthamiana* a stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*

Pro přípravu stabilně nadprodukcujících rostlin *Arabidopsis thaliana* a zároveň i pro rychlé testování ENT konstruktů v rostlinách tabáku byly připraveny ENT konstrukty s GFP značkou pod *UBQ10* promotorem ve vektoru *pUBQ10:pMCS-GW*, což je binární vektor určený pro transformaci dvouděložných rostlin se selekcí na herbicid BASTA. Konkrétně byly vytvořeny konstrukty *pUBQ10::ENT1:GFP*, *pUBQ10::ENT3:GFP*, *pUBQ10::ENT6:GFP* a *pUBQ10::ENT8:GFP* a pro stabilně nadprodukcující rostliny *Arabidopsis thaliana* rovněž konstrukty pod kontrolou nativního promotoru jednotlivých *ENT* genů (asi 4 kb upstream oblast v genomické DNA): *pENT1::ENT1:GFP*, *pENT3::GFP*, *pENT6::ENT6:GFP* a *pENT8::ENT8:GFP*.

5.1.2.1 Příprava expresních ENT konstruktů s GFP značkou pod *UBQ10* promotorem

Pomocí metod klonování byly připraveny konstrukty *pUBQ10::ENT1:GFP*, *pUBQ10::ENT3:GFP*, *pUBQ10::ENT6:GFP* a *pUBQ10::ENT8:GFP*, které byly použity

k tranzientní transformaci rostlin *Nicotiana benthamiana* a ke stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*.

Začátek postupu přípravy těchto konstruktů byl stejný jako v případě konstruktů pro tranzientně nadprodukcující protoplasty buněčné kultury *Arabidopsis Ler* (kapitola 5.1.1) – připravené a ověřené entry klony *pENTR2B:ENT1:GFP*, *pENTR2B:ENT3:GFP*, *pENTR2B:ENT6:GFP* a *pENTR2B:ENT8:GFP* byly použity pro LR reakci do cílového vektoru *pUBQ:pMCS_GW*, který již obsahuje silný konstitutivní promotor genu pro ubiquitin z *Arabidopsis thaliana* (*UBQ10*) a je Gateway kompatibilní.

Byla tedy nasezena LR reakce, která probíhá mezi vstupními vektory *pENTR2B:GFP* nesoucími klonované *ENT* geny ohraničené *attL* rekombinačními místy (entry klony) a cílovými vektory *pUBQ10:pMCS_GW* obsahujícími rekombinační *attR* místa. Reakční LR směs byla poté teplotním šokem transformována do kompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10 a bakteriální suspenze byla natřena na Petriho misku s LB médiem obsahujícím antibiotikum kanamycin. Bakteriální kolonie byly následně testovány metodou colony PCR na přítomnost inzertů *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* ve vektoru *pUBQ10:pMCS_GW*. Použité dvojice primerů a předpokládané velikosti produktů jsou uvedeny v Tabulce 17.

Tabulka 17: Dvojice primerů pro colony PCR a předpokládaná velikost *ENT* produktů

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]	T _m [°C]
<i>ENT1</i>	UBQ10prom_FW01	1169	55
	ENT1seq_RE01		
<i>ENT3</i>	UBQ10prom_FW01	1552	
	ENT3seq_RE01		
<i>ENT6</i>	UBQ10prom_FW01	1564	
	ENT6seq_RE01		
<i>ENT8</i>	UBQ10prom_FW01	1279	
	ENT8seq_RE01		

Colony PCR reakce byly analyzovány pomocí agarózové elektroforézy – na Obrázku 15 je uveden příklad agarózové elektroforézy pro hledání inzertu *ENT8*. Na obrázku je patrný specifický produkt PCR reakce v očekávané velikosti u několika bakteriálních klonů (1279 bp, Tabulka 17).



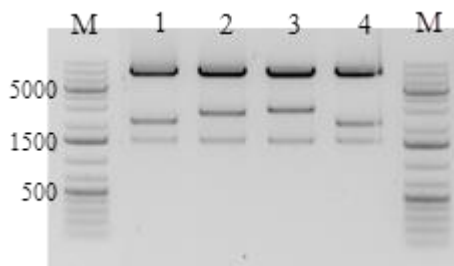
Obrázek 15: Elektroforetogram colony PCR *ENT8* ve vektoru pUBQ10:pMCS_GW. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), čísla jsou označeny individuální bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení LR reakce. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

Na základě colony PCR byly vybrány domněle pozitivní klony 12, 13 a 15, které byly naočkovány do tekutého LB média obsahujícího selekční antibiotika pro následnou izolaci plazmidů. Obdobně byly připraveny i colony PCR pro *ENT1*, *ENT3* a *ENT6* s následným výběrem pozitivních klonů pro izolaci plazmidů. Izolované plazmidy byly poté ověřovány pomocí kontrolní restrikce za použití vybrané restrikční endonukleázy (Tabulka 18).

Tabulka 18: Použité restrikční enzymy a předpokládané velikosti vzniklých naštěpených *ENT* produktů

Gen	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
<i>ENT1</i>	XhoI	8677 + 2255 + 1589
<i>ENT3</i>	XhoI	8677 + 2753 + 1589
<i>ENT6</i>	XhoI	8677 + 2984 + 1589
<i>ENT8</i>	XhoI	8677 + 2190 + 1589

Kontrolní restrikce byly poté analyzovány pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 16).



Obrázek 16: Elektroforetogram kontrolní restrikce vybraných klonů pUBQ10:pMCS_GW nesoucí geny *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8*. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp). 1 – *pUBQ10:ENT1:GFP* po štěpení XhoI, 2 – *pUBQ10:ENT3:GFP* po štěpení XhoI, 3 – *pUBQ10:ENT6:GFP* po štěpení XhoI, 4 – *pUBQ10:ENT8:GFP* po štěpení XhoI. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

Po provedení kontrolní restrikce byly plazmidy odeslány na kontrolní sekvenaci za použití sekvenačních primerů uvedených v Tabulce 1. Po ověření správnosti sekvenací byly následně tyto konstrukty elektroporací transformovány do bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, které byly poté využity k tranziční transformaci rostlin *Nicotiana benthamiana* a ke stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* metodou floral dip.

5.1.2.2 Příprava expresních ENT konstruktů s GFP značkou pod nativním promotorem

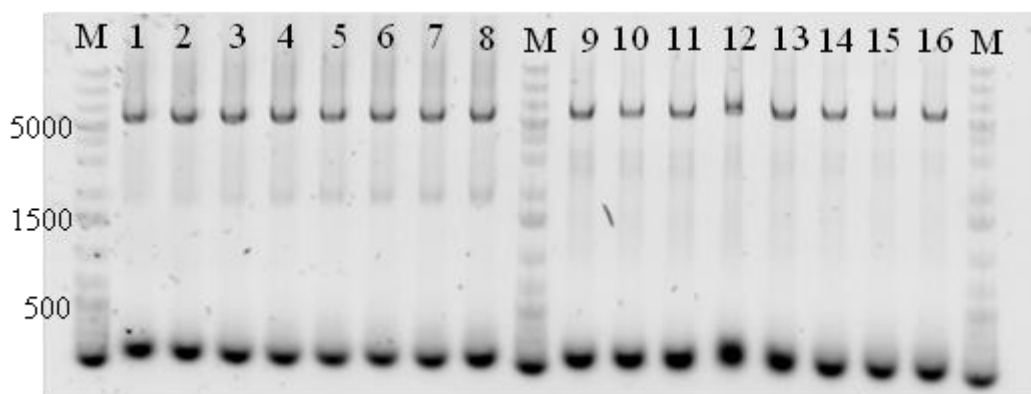
Pro stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* byly dále připraveny konstrukty pod kontrolou nativního promotoru studovaných genů (asi 4 kb upstream oblast v genomické DNA), *pENT1::ENT1:GFP*, *pENT3::ENT3:GFP*, *pENT6::ENT6:GFP* a *pENT8::ENT8:GFP*.

Nejprve byla z genomické DNA *Arabidopsis thaliana* opět provedena PCR amplifikace genů *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8*, tentokrát včetně promotorových oblastí genů. V případě genu *ENT1* byly použity primery s restrikčními místy SalI a NotI a v případě genů *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* byla zvolena restrikční místa KpnI a NotI. Použité dvojice primerů pro PCR amplifikaci a předpokládaná velikost vzniklých produktů jsou uvedeny v Tabulce 19, teplota tání DNA (T_m) byla 55 °C.

Tabulka 19: Dvojice primerů pro PCR amplifikaci kompletních *ENT* sekvencí včetně promotorové oblasti a předpokládaná velikost PCR produktů

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]	T_m [°C]
<i>ENT1</i>	ENT1_prom_SalI_FW04	5520	55
	ENT1_NotI_RE		
<i>ENT3</i>	ENT3_prom_KpnI_FW01	6088	
	ENT3_NotI_RE		
<i>ENT6</i>	ENT6_prom_KpnI_FW03	6255	
	ENT6_NotI_RE		
<i>ENT8</i>	ENT8_prom_KpnI_FW03	5469	
	ENT8_NotI_RE		

Vzniklé PCR produkty byly po proběhnutí PCR amplifikace analyzovány pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 17, uvedeny PCR produkty pro *ENT3* a *ENT6*).



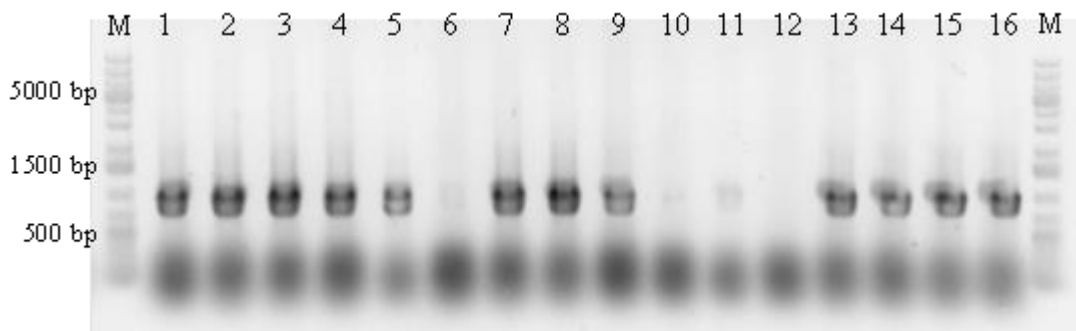
Obrázek 17: Elektroforetogram pro kontrolu amplifikace *ENT3* a *ENT6* PCR produktů s KpnI a NotI restrikčními místy. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1-8 – amplicon *ENT3*, 9-16 – amplicon *ENT6*. Separace byla provedena v 1% agarózovém gelu.

Obdobně byly provedeny i amplifikace pro *ENT1* a *ENT8* amplicony, *ENT1* amplicon obsahoval restrikční místa SalI a NotI, *ENT8* amplicon pak opět KpnI a NotI místa. Následovalo přečištění PCR produktu pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu a restrikce, jak PCR produktu, tak vektoru pENTR2B:GFP. Restrikce PCR produktů i vektoru pENTR2B:GFP probíhala za účasti FastDigest pufru a FastDigest restrikčních enzymů SalI a NotI v případě *ENT1* KpnI a NotI v případě *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* po dobu 15 – 20 minut. Po provedení restrikce a naštěpení PCR produktu a vektoru následovala ligace, která sloužila pro vložení PCR produktů do klonovacího vektoru pENTR2B:GFP. Ligační směs byla poté teplotním šokem transformována do kompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10 a bakteriální suspenze byla natřena na Petriho misku s LB médiem obsahující selekční antibiotikum. Bakteriální kolonie byly následně metodou colony PCR testovány na přítomnost inzertů *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* ve vektoru pENTR2B:GFP. Použité dvojice primerů a předpokládané velikosti produktů jsou uvedeny v Tabulce 20.

Tabulka 20: Dvojice primerů pro colony PCR a předpokládaná velikost *ENT* produktů

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]	T_m [°C]
<i>ENT1</i>	pENTR_FW	1057	55
	ENT1promseq_RE01		
<i>ENT3</i>	pENTR_FW	1159	
	ENT3promseq_RE01		
<i>ENT6</i>	pENTR_FW	1080	
	ENT6promseq_RE01		
<i>ENT8</i>	pENTR_FW	1015	
	ENT8promseq_RE01		

Colony PCR reakce byly analyzovány pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 18, příklad pro *ENT8* amplikon).



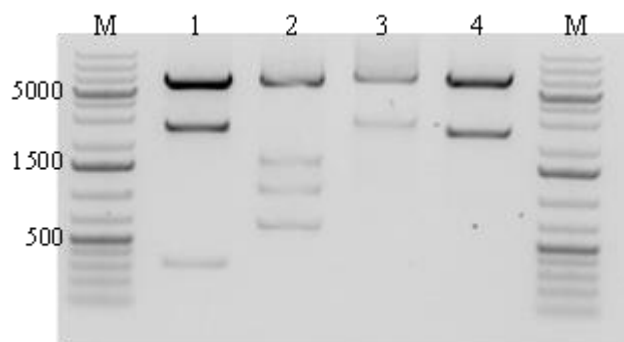
Obrázek 18: Elektroforetogram colony PCR *ENT8* inzertu s 4 kb promotorovou oblastí v *pENTR2B:GFP*. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), čísla jsou označeny individuální bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení LR reakce. Separace byla provedena v 1% agarózovém gelu.

Na základě colony PCR byly pro *pENTR2B:pENT8:ENT8:GFP* vybrány pozitivní klony 2, 3 a 8, které byly naočkovány do tekutého LB média obsahujícího antibiotika pro následnou izolaci plazmidů. Obdobně byly připraveny i colony PCR pro *ENT1*, *ENT3* a *ENT6* s následným výběrem pozitivních klonů pro izolaci plazmidů. Izolované plazmidy byly poté ověřovány pomocí kontrolní restrikce. Použité restrikční enzymy a předpokládané velikosti vzniklých naštěpených produktů jsou uvedeny v Tabulce 21.

Tabulka 21: Restrikční enzymy a předpokládané velikosti vzniklých naštěpených produktů

Gen	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
<i>ENT1</i>	HindIII	5709 + 2497 + 309
<i>ENT3</i>	EcoRI	5854 + 1570 + 1047
<i>ENT6</i>	HindIII	6490 + 2743
<i>ENT8</i>	XbaI	6139 + 2338

Provedené restrikce byly poté analyzovány pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 19).



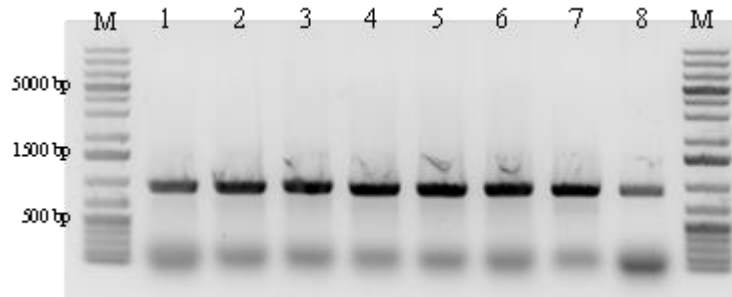
Obrázek 19: Elektroforetogram kontrolní restrikce vybraných klonů pENTR2B:GFP nesoucí geny *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* s 4 kb promotorem. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp). 1 – *pENTR2B:pENT1:ENT1:GFP* restrikce HindIII, 2 – *pENTR2B:pENT3:ENT3:GFP* restrikce EcoRI, 3 – *pENTR2B:pENT6:ENT6:GFP* restrikce HindIII, 4 – *pENTR2B:pENT8:ENT8:GFP* restrikce XbaI. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

Po ověření izolovaných plazmidů byla nasezena LR reakce, která probíhá mezi vstupními vektory pENTR2B:GFP s ENT promotorovými inzerty (entry klony) a cílovým vektorem pMCS_GW. Reakční LR směs byla poté teplotním šokem transformována do kompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10 a bakteriální suspenze byla natřena na Petriho misku s LB médiem obsahujícím antibiotika. Bakteriální kolonie byly následně testovány metodou colony PCR a opět testovány na přítomnost inzertů *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* s 4 kb promotorem ve vektoru pMCS_GW. Použité dvojice primerů a předpokládané velikosti produktů jsou uvedeny v Tabulce 22.

Tabulka 22: Dvojice primerů pro colony PCR a předpokládaná velikost *ENT* produktů

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]	T _m [°C]
<i>ENT1</i>	MASprom_FW01	794	55
	ENT1promseq_RE01		
<i>ENT3</i>	MASprom_FW01	896	
	ENT3promseq_RE01		
<i>ENT6</i>	MASprom_FW01	713	
	ENT6promseq_RE01		
<i>ENT8</i>	MASprom_FW01	752	
	ENT8promseq_RE01		

Colony PCR reakce byly analyzovány pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 20, příklad pro ENT3 konstrukt).



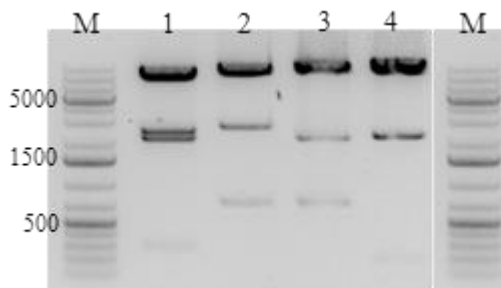
Obrázek 20: Elektroforetogram colony PCR *ENT3* s 4 kb promotorem ve vektoru pMCS_GW. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), čísla jsou označeny individuální bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení LR reakce. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

Na základě colony PCR byly vybrány domněle pozitivní klony 4, 5 a 6, které byly naočkovány do tekutého LB média obsahujícího selekční antibiotika pro následnou izolaci plazmidů. Obdobně byly připraveny i colony PCR pro *ENT1*, *ENT6* a *ENT8* s 4 kb promotorem s následným výběrem pozitivních klonů pro izolaci plazmidů. Izolované plazmidy byly poté ověřovány pomocí kontrolní restrikce za použití restrikce. Použité restrikční enzymy a předpokládané velikosti vzniklých naštěpených produktů jsou uvedeny v Tabulce 23.

Tabulka 23: Restrikční enzymy a předpokládané velikosti vzniklých naštěpených produktů

Gen	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
<i>ENT1</i>	HindIII	10 016 + 2497 + 2161 + 309
<i>ENT3</i>	SalI	12 050 + 2760 + 754
<i>ENT6</i>	SalI	12 695 + 2252 + 754
<i>ENT8</i>	HindIII	12 428 + 2226 + 227 + 64

Kontrolní restrikce byla poté analyzována pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 21).



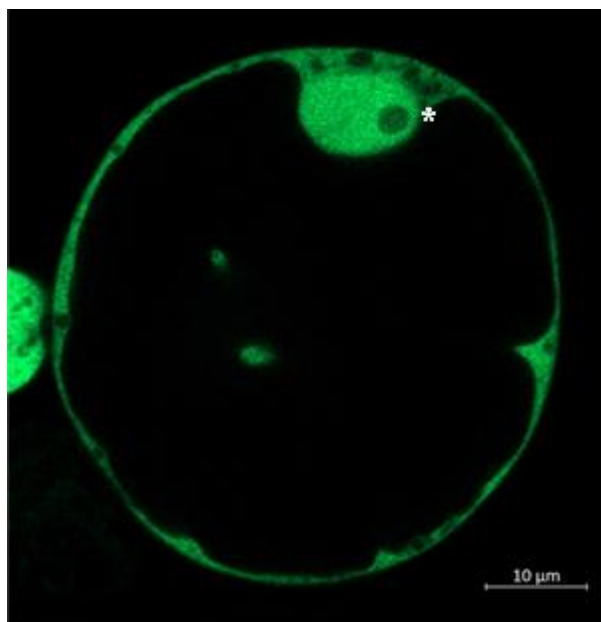
Obrázek 21: Elektroforetogram kontrolní restrikce vybraných klonů pMCS_GW nesoucí geny *ENT1*, *ENT3*, *ENT6* a *ENT8* s 4 kb promotorem. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp). 1 – pMCS_GW:p*ENT1*:*ENT1*:GFP po štěpení HindIII, 2 – pMCS_GW:p*ENT3*:*ENT3*:GFP po štěpení SalI, 3 – pMCS_GW:p*ENT6*:*ENT6*:GFP po štěpení SalI, 4 – pMCS_GW:p*ENT8*:*ENT8*:GFP po štěpení HindIII. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

Po provedení kontrolní restrikce byly plazmidy odeslány na kontrolní sekvenaci za použití sekvenačních primerů uvedených v Tabulce 1. Po ověření správnosti sekvenací byly tyto konstrukty elektroporací transformovány do *Agrobacterium tumefaciens*. Výsledné konstrukty *pMCS_GW:pENT:ENT:GFP* obsahující *ENT* sekvence pod kontrolou jejich přirozených promotorových oblastí byly následně transformovány do rostlin *Arabidopsis thaliana* pro odvození stabilních expresních linií.

5.2 Příprava tranzientně nadprodukcujících protoplastů buněčné kultury Ler

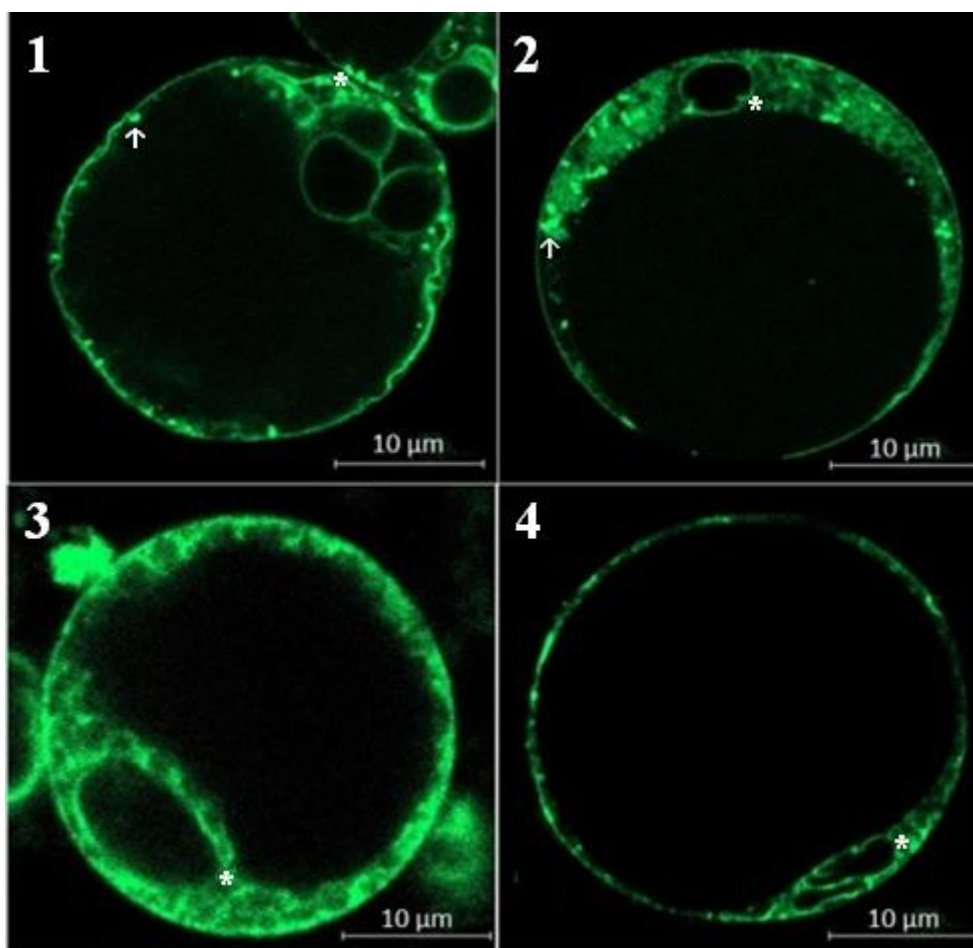
Pro rychlé testování navržených konstruktů byla provedena PEG transformace izolovaných protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler* bakteriemi *Escherichia coli* TOP10 obsahující konstrukty *35S::ENT1:GFP*, *35S::ENT3:GFP*, *35S::ENT6:GFP*, *35S::ENT8:GFP*, které byly připraveny C-terminální GFP fúzí, a konstrukt *35S::GFP*, který sloužil jako kontrola.

Za použití konfokálního laserového skenovacího mikroskopu byl poté po 16 hodinách od transfekce protoplastů pomocí PEG pozorován zelený fluorescenční signál kontrolního GFP (Obrázek 22) a fúzních ENT proteinů (Obrázek 23).



Obrázek 22: Pozitivní GFP kontrola pro srovnání tranzientní exprese fúzních ENT proteinů v protoplastech buněčné kultury *Arabidopsis Ler*. Pozorováno po 16 hodinách od transfekce. Hvězdička (*) označuje jádro. Měřítko 10 μm.

Fluorescenční signál volného GFP, který sloužil jako pozitivní kontrola, byl pozorován v jádře a v okolí cytoplazmatické membrány (Obrázek 22).



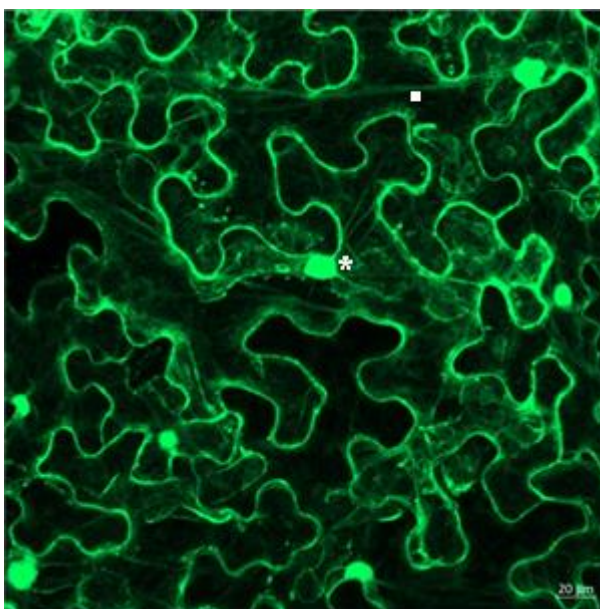
Obrázek 23: srovnání tranzientní exprese fúzních ENT proteinů v protoplastech buněčné kultury *Arabidopsis Ler.* 1 – ENT1-GFP, 2 – ENT3-GFP, 3 – ENT6-GFP, 4 – ENT8-GFP. Pozorováno po 16 hodinách od transfekce. Hvězdička (*) označuje jádro, šipka (↑) označuje bodovité struktury. Měřítka 10 μm .

Fluorescenční signál fúzních ENT proteinů ukázal, že obecně byly tyto proteiny na subcelulární úrovni lokalizovány v okolí jádra a cytoplazmatické membrány (Obrázek 23). U většiny pozorovaných protoplastů mohl být také pozorován vzor exprese podobný endoplazmatickému retikulu (ER) a také bodovité struktury (Obrázek 23 – 1, Obrázek 23 – 2) připomínající Golgiho aparát (GA). V případě ENT1-GFP (Obrázek 23 – 1) a ENT8-GFP (Obrázek 23 – 4) nebyla jádra zcela patrná, v buňkách se vyskytovaly další vakuolární membránové útvary připomínající pre-vakuolární kompartmenty, v jejichž blízkosti byl fluorescenční signál pozorován. Nejsilnější fluorescenční signál a nejlepší expresi poskytoval ENT3-GFP (Obrázek 23 – 2), nejslabší naopak ENT6-GFP (Obrázek 23 – 3). U žádného z fúzních ENT proteinů nebyl fluorescenční signál lokalizován v jádře, jako v případě volného GFP (Obrázek 22), což svědčí o funkčnosti připravených konstruktů.

5.3 Příprava tranzientně nadprodukcujících rostlin *Nicotiana benthamiana*

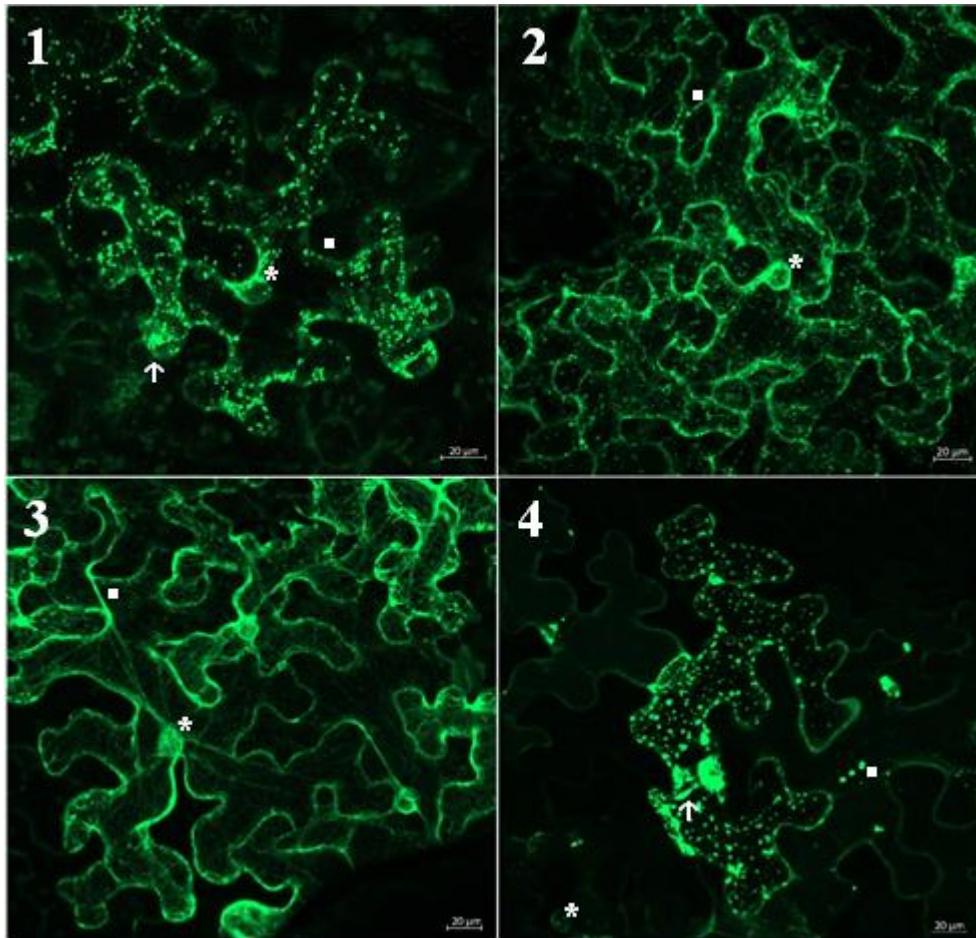
Listy rostlin *Nicotiana benthamiana* byly pomocí metody infiltrace transformovány bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, které obsahovaly konstrukty *pUBQ10::ENT1:GFP*, *pUBQ10::ENT3:GFP*, *pUBQ10::ENT6:GFP*, *pUBQ10::ENT8:GFP*, připravené C-terminální GFP fúzí, a konstrukt *35S::GFP* ve vektoru pGWB17, který sloužil jako kontrola.

Za použití konfokálního laserového skenovacího mikroskopu byl poté po 72 hodinách od infiltrace pozorován zelený fluorescenční signál kontrolního GFP (Obrázek 24) a fúzních ENT proteinů (Obrázek 25).



Obrázek 24: Pozitivní GFP kontrola pro srovnání tranzientní exprese fúzních ENT proteinů v listech měsíc starých rostlin *Nicotiana benthamiana*. Pozorováno 72 hodin od infiltrace. Hvězdička (*) označuje jádro, čtvereček (▪) označuje cytoplazmatické vlákno. Měřítka 20 μm .

Fluorescenční signál volného GFP, který sloužil jako pozitivní kontrola, byl pozorován především v jádře, v okolí cytoplazmatické membrány a v cytoplazmě (pozorována cytoplazmatická vlákna) (Obrázek 24).



Obrázek 25: srovnání tranzientní exprese fúzních ENT proteinů v listech měsíc starých rostlin *Nicotiana benthamiana*. 1 – ENT1-GFP, 2 – ENT3-GFP, 3 – ENT6-GFP, 4 – ENT8-GFP. Pozorováno 72 hodin od infiltrace. Hvězdička (*) označuje jádro, čtvereček (■) označuje cytoplazmatické vlákno, šipka (↑) označuje váčkovité struktury. Měřítko 20 μm .

Fluorescenční signál fúzního proteinu ENT1-GFP byl pozorován v okolí jádra, méně pak v okolí cytoplazmatické membrány nebo v cytoplazmě (méně viditelná cytoplazmatická vlákna), bylo však pozorováno poměrně velké množství váčkovitých struktur (Obrázek 25 – 1) připomínajících GA. Podobnou lokalizaci v okolí jádra, v okolí cytoplazmatické membrány a v cytoplazmě vykazoval také fúzní protein ENT3-GFP (Obrázek 25 – 2). U ENT6-GFP byl fluorescenční signál lokalizován v blízkosti jádra a téměř spojitě v blízkosti cytoplazmatické membrány a v cytoplazmě (dobře viditelná cytoplazmatická vlákna), váčkovité struktury byly v tomto případě ojedinělé (Obrázek 25 – 3). Fluorescenční signál fúzního proteinu ENT8-GFP byl oproti předchozím konstruktům v okolí jádra a cytoplazmatické membrány a v cytoplazmě slabší (cytoplazmatická vlákna nebyla téměř viditelná), bylo ale opět pozorováno velké množství blíže nespecifikovaných váčkovitých struktur (Obrázek 25 – 4) připomínající GA. Ve většině případů byl pozorován také vzor exprese podobný ER a jím vytvářené síť.

U žádného z fúzních ENT proteinů nebyl fluorescenční signál lokalizován v jádře, jako v případě volného GFP (Obrázek 24), což svědčí o funkčnosti připravených konstruktů.

5.4 Příprava stabilně transformovaných linií *Arabidopsis thaliana*

Vzhledem k průběhu pandemie COVID-19 se podařilo provést pouze transformaci do rostlin *Arabidopsis thaliana*, byla tedy získána generace T₀; odvození stabilních linií bude předmětem dalšího studia. Pro přípravu stabilně nadprodukcujících rostlin *Arabidopsis thaliana* byly přibližně 1 měsíc staré rostliny za použití metody floral dip transformovány bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, které obsahovaly konstrukty *pUBQ10::ENT1:GFP*, *pUBQ10::ENT3:GFP*, *pUBQ10::ENT6 GFP*, *pUBQ10::ENT8:GFP*, *pENT1::ENT1:GFP*, *pENT3::GFP*, *pENT6::ENT6:GFP* a *pENT8::ENT8:GFP*, připravené C-terminální GFP fúzí.

Po přibližně po 14 dnech od transformace byla zralá semena z transformovaných rostlin posbírána do papírových sáčků a mohou být dále použita na selekci a přípravu homozygotních nadprodukcujících ENT linií.

5.5 Fenotypizace kořenové části T-DNA inzerční linie *Arabidopsis thaliana ent1*

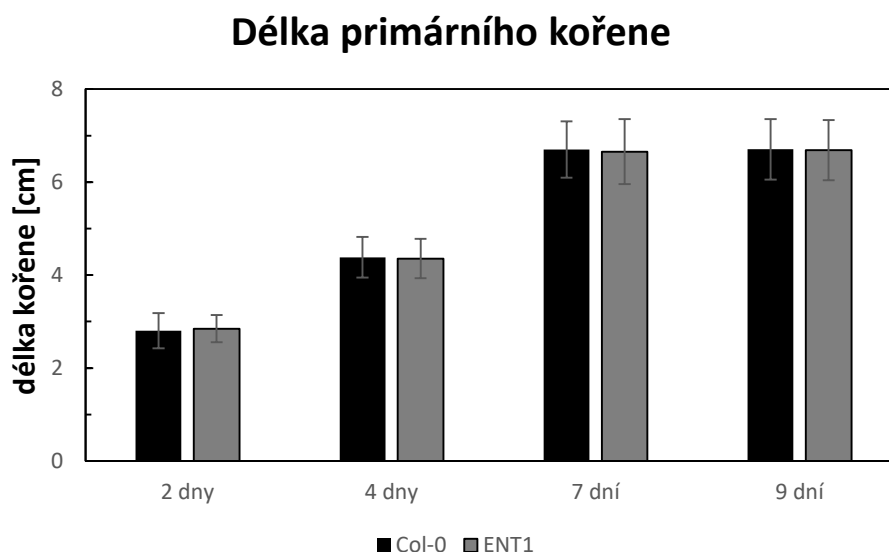
Fenotypizace kořenové části rostlin byla rozdělena na tři části, analýzu délky primárního kořene (Obrázek 26), analýzu počtu laterálních kořenů (Obrázek 27) a analýzu velikosti úhlů mezi hlavním kořenem a kořeny laterálními (Obrázek 28).

Nejprve byly týden staré semenáčky přeneseny na čtvercové misky s MS médiem, misky byly v kořenové části semenáčků obaleny černou fólií, aby došlo k omezení vlivu světla na růst kořenů. Poté byly misky po 2, 4, 7 a 9 dnech nasnímány za použití skeneru Epson Perfection V700 Photo, následně byly dané parametry (délka primárního kořene, počet laterálních kořenů, velikost úhlů mezi hlavním kořenem a laterálními kořeny) analyzovány v programu ImageJ. Získaná data byla dále zpracována v programu MS Excel, ve kterém bylo provedeno také statistické vyhodnocení pomocí t-testu.

5.5.1 Analýza délky primárního kořene

Analýza délky primárního kořene byla ze skenerem nasnímaných obrázků provedena pomocí programu ImageJ, ve kterém byla změřena. V programu MS Excel byly poté

z naměřených hodnot délek primárních kořenů vypočítány aritmetický průměr a směrodatná odchylka (SD). Pomocí t-testu byla určena také p-hodnota určující případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).



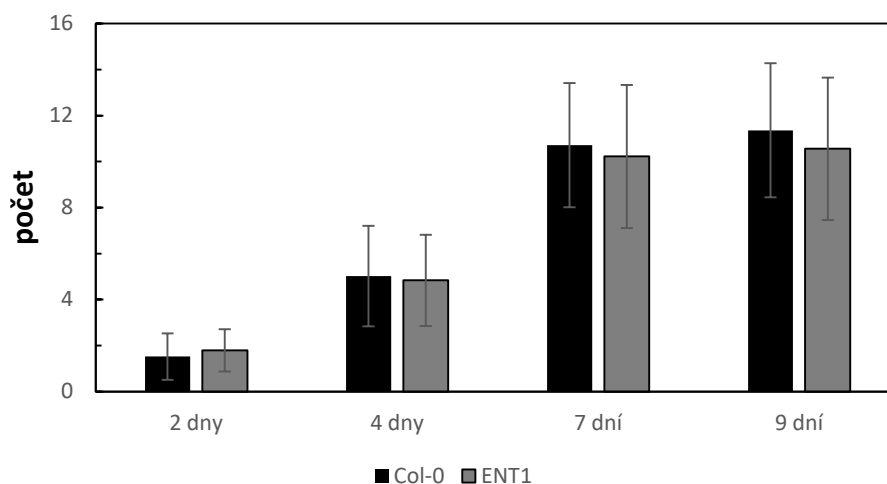
Obrázek 26: Graf znázorňující průměrnou délku kořene rostlin T-DNA inzerční line *ent1* (SALK_025174) (ENT1) a divokého typu Columbia (Col-0) za standardních podmínek v přítomnosti MS média po 2, 4, 7 a 9 dnech od přenesení týden starých semenáčků na čtvercové misky. Hodnoty v grafu představují aritmetický průměr ± SD z 50 biologických vzorků.

Bylo zjištěno, že průměrná délka kořene byla po 2 dnech od přenesení týden starých semenáčků na čtvercové misky $2,80 \pm 0,38$ cm pro Col-0 a $2,84 \pm 0,30$ cm pro ENT1, po 4 dnech $4,38 \pm 0,44$ cm pro Col-0 a $4,35 \pm 0,42$ cm pro ENT1, po 7 dnech $6,70 \pm 0,61$ cm pro Col-0 a $6,66 \pm 0,70$ cm pro ENT1 a po 9 dnech $6,70 \pm 0,65$ cm pro Col-0 a $6,69 \pm 0,65$ cm pro ENT1. Provedením t-testu bylo zjištěno, že mezi průměrnými délkami primárního kořene T-DNA inzerční line *ent1* (SALK_025174) a divokého typu (Col-0), který sloužil jako kontrola, nebyly za daných podmínek pozorovány žádné statisticky významné rozdíly.

5.5.2 Analýza počtu laterálních kořenů

Analýza počtu laterálních kořenů byla ze skenerem nasnímaných obrázků provedena pomocí programu ImageJ, ve kterém byly laterální kořeny spočítány. V programu MS Excel byly poté ze spočítaného množství laterálních kořenů vypočítány aritmetický průměr a směrodatná odchylka (SD). Pomocí t-testu byla určena také p-hodnota určující případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

Počet laterálních kořenů



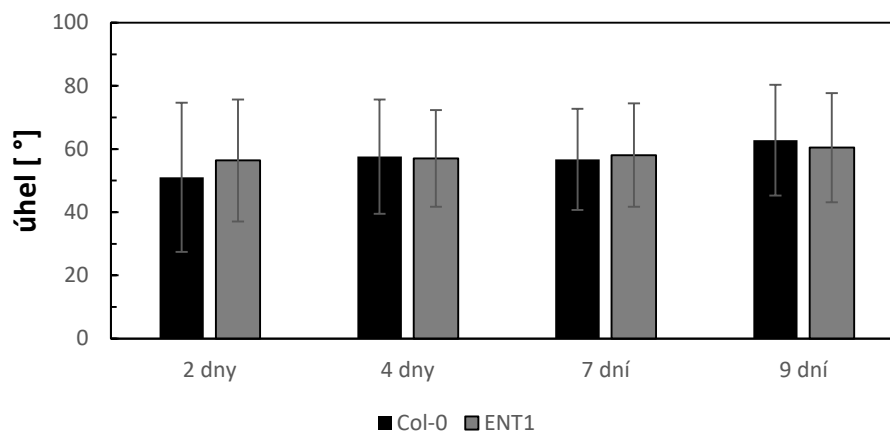
Obrázek 27: Graf znázorňující průměrný počet laterálních kořenů rostlin T-DNA inzerční line *ent1* (SALK_025174) (ENT1) a divokého typu Columbia (Col-0) za standardních podmínek v přítomnosti MS média po 2, 4, 7 a 9 dnech od přenesení týden starých semenáčků na čtvercové misky. Hodnoty v grafu představují aritmetický průměr \pm SD z 50 biologických vzorků.

Bylo zjištěno, že průměrný počet laterálních kořenů byl po 2 dnech od přenesení týden starých semenáčků na čtvercové misky $1,52 \pm 1,00$ pro Col-0 a $1,80 \pm 0,92$ pro ENT1, po 4 dnech $5,02 \pm 2,19$ pro Col-0 a $4,83 \pm 1,99$ pro ENT1, po 7 dnech $10,72 \pm 2,71$ pro Col-0 a $10,22 \pm 3,11$ pro ENT1 a po 9 dnech $11,36 \pm 2,92$ pro Col-0 a $10,56 \pm 3,10$ pro ENT1. Provedením t-testu bylo zjištěno, že mezi průměrnými počty laterálních kořenů T-DNA inzerční line *ent1* (SALK_025174) a divokého typu (Col-0), který sloužil jako kontrola, nebyly za daných podmínek pozorovány žádné statisticky významné rozdíly.

5.5.3 Analýza velikosti úhlu mezi primárním kořenem a laterálními kořeny

Analýza velikosti úhlů mezi primárním kořenem a laterálními kořeny byla ze skenerem nasnímaných obrázků provedena pomocí programu ImageJ, ve kterém byly příslušné úhly změřeny. V programu MS Excel byly poté z naměřených hodnot délek primárních kořenů vypočítány aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Pomocí t-testu byla určena také p-hodnota určující případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

Velikost úhlů mezi primárním kořenem a laterálními kořeny



Obrázek 28: Graf znázorňující průměrnou velikost úhlů mezi primárním kořenem a laterálními kořeny rostlin T-DNA inzerční line *ent1* (SALK_025174) (ENT1) a divokého typu Columbia (Col-0) za standardních podmínek v přítomnosti MS média po 2, 4, 7 a 9 dnech od přenesení týden starých semenáčků na čtvercové misky. Hodnoty v grafu představují aritmetický průměr ± SD z 50 biologických vzorků.

Bylo zjištěno, že průměrná velikost úhlů mezi primárním kořenem a laterálními kořeny byla po 2 dnech od přenesení týden starých semenáčků na čtvercové misky $51,03 \pm 23,64^\circ$ pro Col-0 a $56,38 \pm 19,34^\circ$ pro ENT1, po 4 dnech $57,60 \pm 18,10^\circ$ pro Col-0 a $57,02 \pm 15,29^\circ$ pro ENT1, po 7 dnech $56,71 \pm 16,01^\circ$ pro Col-0 a $58,08 \pm 16,40^\circ$ pro ENT1 a po 9 dnech $62,79 \pm 17,53^\circ$ pro Col-0 a $60,43 \pm 17,32^\circ$ pro ENT1. Provedením t-testu bylo zjištěno, že mezi průměrnými velikostmi úhlů mezi primárním kořenem a laterálními kořeny T-DNA inzerční line *ent1* (SALK_025174) a divokého typu (Col-0), který sloužil jako kontrola, nebyly za daných podmínek pozorovány žádné statisticky významné rozdíly.

5.5.4 Fenotypizace nadzemní části T-DNA inzerční linie *Arabidopsis thaliana ent1*

Fenotypizace nadzemní části rostlin byla provedena u 15 vzorků 40 dní starých rostlin pomocí analýzy počtu listů a analýzy hmotnosti růžice listů (Obrázek 29).



Obrázek 29: Srovnání nadzemní části rostlin T-DNA inzerční line *ent1* a divokého typu Columbia (Col-0) ve 40ti denních rostlinách *Arabidopsis thaliana* L. (obrázky z připravované publikace poskytl Mgr. Tereza Vánská)

Nejprve byl spočítán počet listů (vyjma děložních listů), a to tak, že bylo potřeba určit, zda listy rostou ve směru či proti směru hodinových ručiček a následně byly odspodu spočítány. Poté byla růžice listů odštířena a hmotnost nadzemní části rostlin zvážena. V programu MS Excel byly poté ze získaných hodnot vypočítány aritmetický průměr a směrodatná odchylka (SD). Pomocí t-testu byla určena také p-hodnota určující případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) (Tabulka 24).

Tabulka 24: Počet listů a hmotnost nadzemní části rostlin T-DNA inzerční line *ent1* a divokého typu Columbia (Col-0).

	Col-0	ENT1
Počet listů	19 ± 1,3	21 ± 1,5 *
Hmotnost [mg]	475,2 ± 88,45	491,2 ± 116,9

Bylo zjištěno, že průměrný počet listů byl 19 ± 1,3 pro Col-0 a 21 ± 1,5 (*) pro ENT1, což představovalo statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Průměrná hmotnost růžice listů byla 475,2 ± 88,45 mg pro Col-0 a 491,2 ± 116,9 mg pro ENT1. Mezi průměrnými hmotnostmi růžice listů T-DNA inzerční line *ent1* a divokého typu (Col-0), který sloužil jako kontrola, nebyl tedy pozorován statisticky významný rozdíl.

6 DISKUZE

Nepostradatelnou roli v řadě fyziologických procesů během růstu a vývoje rostlin hrají rostlinné hormony, mezi něž patří i CK a jejichž koncentrace musí být pro zajištění správných fyziologických funkcí efektivně regulována. Kromě biosyntézy a degradace či inaktivace se na modulaci hladin a distribuci CK v rostlinách podílí také jejich transport. Jednu ze skupin CK transportérů představují ENT, přičemž v modelovém organismu *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno 8 členů této rodiny (Li *et al.*, 2003).

O možném zapojení AtENT proteinů do transportu různých forem CK však bylo dosud publikováno pouze omezené množství prací (například Sun *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2008), diplomová práce měla tedy přispět k rozšíření těchto poznatků.

Cílem experimentální části diplomové práce byla příprava konstruktů sloužících pro přípravu nadprodukcujících linií vybraných ENT v *Arabidopsis thaliana*, u kterých se na základě dostupné literatury předpokládá vztah k CK buněčné kompartmentalizaci. Konkrétně se jednalo o ENT1, ENT3, ENT6 a ENT8. Ověřené konstrukty byly transformovány do protoplastů *Arabidopsis thaliana* a do listů rostlin *Nicotiana benthamiana* a za použití konfokální laserové skenovací mikroskopie a technologie značení GFP byla sledována subcelulární lokalizace ENT1-GFP, ENT3-GFP, ENT6-GFP a ENT8-GFP v tranzientních systémech *Arabidopsis thaliana* i *Nicotiana benthamiana*. Dále se pak práce také blíže zabývala charakterizací transportní funkce proteinu AtENT1, a to pomocí fenotypizace kořenové a nadzemní části rostlin jeho dostupné T-DNA inzerční linie.

Za účelem rychlého testování a ověření funkčnosti ENT-GFP proteinových fúzí byly tedy připraveny dvě řady konstruktů pro uvedené rostlinné modely a ověřené konstrukty byly následně použity pro stabilní transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*. Prvním krokem k určení lokalizace ENT1, ENT3, ENT6 a ENT8 proteinů bylo tedy jejich klasické a Gateway klonování k přípravě expresních konstruktů. V rámci práce bylo C-terminální GFP fúzí úspěšně připraveno hned několik typů ENT proteinových konstruktů, které poté sloužily k různým účelům. Jednalo se o ENT konstrukty s GFP značkou pod konstitutivním 35S promotorem ve vektoru p2GW7.0, konkrétně *35S::ENT1:GFP*, *35S::ENT3:GFP*, *35S::ENT6:GFP*, *35S::ENT8:GFP*, které byly použity k tranzientní transformaci protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis thaliana* (ekotyp *Ler*), ENT konstrukty s GFP značkou pod UBQ10 promotorem ve vektoru pUBQ10:pMCS_GW, konkrétně *pUBQ10::ENT1:GFP*, *pUBQ10::ENT3:GFP*, *pUBQ10::ENT6:GFP* a

pUBQ10::ENT8:GFP, které byly použity pro přípravu tranzientně nadprodukcujících rostlin *Nicotiana benthamiana* a stabilně nadprodukcujících rostlin *Arabidopsis thaliana* a nakonec ENT konstrukty s GFP značkou pod kontrolou nativního promotoru ve vektoru pMCS_GW, konkrétně *pENT1::ENT1:GFP*, *pENT3::GFP*, *pENT6::ENT6:GFP* a *pENT8::ENT8:GFP*, které byly určeny pro odvození stabilních rostlinných linií v *Arabidopsis thaliana*.

Připravenými konstrukty byly nejprve transformovány bakterie *Escherichia coli* TOP 10, pomocí kterých byla poté provedena tranzientní transformace protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler*, nebo *Agrobacterium tumefaciens* GV3103, pomocí kterých byla poté provedena tranzientní transformace rostlin *Nicotiana benthamiana* a stabilní transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* metodou floral dip.

Pozorování pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu ukázalo, že docházelo k expresi všech připravených konstruktů, a to jak v protoplastech, tak u *Nicotiana benthamiana*, přičemž k nejsilnější expresi docházelo u proteinu ENT3. Fluorescenční signál fúzních ENT proteinů ukázal, že obecně byly tyto proteiny na subcelulární úrovni lokalizovány v okolí jádra a cytoplazmatické membrány, což převážně odpovídá dosavadním předpokladům o lokalizaci ENT proteinů. U ENT1 dosavadní poznatky naznačují navíc i lokalizaci v tonoplastech, membránách obklopujících obsah vakuol (Jaquinod *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2011). U proteinů ENT3 a ENT6 uvádějí dosavadní publikace lokalizaci v cytoplazmatické membráně (Li *et al.*, 2003; Wormit *et al.*, 2004), což bylo pozorováno i v našem případě. V případě ENT8 nebyla dosud lokalizace v publikacích potvrzena, na základě její sekvenční podobnosti s ENT1 je však předpokládána její lokalizace v cytoplazmatické membráně, čemuž by odpovídala i naše pozorování.

Ve většině případů pozorovaných protoplastů byl také pozorován vzor exprese podobný ER a také bodovité struktury připomínající GA, které byly patrné zejména u ENT1 a ENT3. Mohlo by se jednat o nadprodukované proteiny, které mohly být pozorovány v jednotlivých kompartmentech dráhy transportu a třídění proteinů z ER do GA a následně do vakuol, kde mohou být proteiny uchovávány (zásobní vakuoly) nebo naopak může docházet k jejich degradaci (lytické vakuoly), případně do cytoplazmatické membrány (Xiang *et al.*, 2013). Z tohoto důvodu byly proto připraveny i konstrukty pod kontrolou předpokládaných přirozených promotorových oblastí, kde by se tyto možné artefakty neměly vyskytovat.

U listů *Nicotiana benthamiana* bylo pozorováno také množství blíže neurčených váčkovitých struktur, které by mohly představovat proteinové agregáty nebo transportní formy těchto proteinů, z toho důvodu se proto dále připravují konstrukty s N-terminální GFP fúzí. Opět byl pozorován také vzor exprese připomínající ER v okolí jádra a jím vytvářená síť. Signál pozorovaný v cytoplasmě by připravené konstrukty poskytovat neměly, protože se jedná o transmembránové proteiny, nicméně u rostlin *Nicotiana benthamiana* dochází k heterologní expresi, takže proteiny z *Arabidopsis thaliana* nemusí v tomto rostlinném druhu vykazovat přesnou lokalizaci. Na základě těchto poznatků se nám heterologní systém *Nicotiana benthamiana* obecně jeví jako nejméně vhodný pro studium proteinů AtENT.

Tyto experimenty však sloužily především pro ověření funkčnosti připravených proteinových konstruktů, tedy toho, že nedochází k štěpení konstruktů a pozorování volného GFP v jádře. Konkrétnější lokalizaci jednotlivých ENT tak poskytnou až konstrukty *pUBQ10::ENT:GFP* použité pro tvorbu stabilně nadprodukcujících rostlinných linií *Arabidopsis*.

U žádného z připravených fúzních ENT proteinů nebyl u transformovaných protoplastů ani rostlin *Nicotiana benthamiana* fluorescenční signál lokalizován v jádře, jako je tomu v případě volného GFP, který sloužil jako pozitivní kontrola, což svědčí o úspěšném naklonování a funkčnosti fúzních ENT-GFP připravených konstruktů. Tuto domněnku by bylo vhodné potvrdit i dalšími experimenty, například imunodetekcí fúzních ENT proteinů metodou Western blottingu nebo pomocí kvantitativní PCR (qPCR), což bude předmětem dalšího studia.

Další část práce byla zaměřena na konkrétnější charakterizaci transportní funkce proteinu AtENT1, a to pomocí charakterizace fenotypového projevu dostupné T-DNA inzerční linie *ent1*. V rámci této fenotypizace byla analyzována kořenová a nadzemní část rostlin. Fenotypizace kořenové části byla prováděna v prostředí MS média a byly sledovány tři parametry, a sice délka primárního kořene, počet laterálních kořenů a úhly svírané primárním kořenem a úhly laterálními. V ani jednom z analyzovaných parametrů však už na první pohled nebyl ve fenotypu T-DNA inzerční linie *ent1* a divokého typu patrný rozdíl, což bylo změřením a vyhodnocením daných parametrů potvrzeno.

Je možné, že v standardním prostředí MS média nemuselo k fenotypovému projevu docházet, protože jednotlivé ENT formy by se v transportu CK mohly doplňovat. Patrný rozdíl ve fenotypu T-DNA inzerční linie *ent1* a divokého typu by však mohl být pozorován za podmínek sníženého obsahu dusíku v MS médiu, neboť při sníženém obsahu dusíku

vykazovaly AtENT1 a AtENT3 vyšší expresi a byl zvýšen také nukleosidový import. (Cornelius *et al.*, 2012).

Výsledky fenotypizace nadzemní části rostlin z připravované publikace poskytla Mgr. Tereza Vánská. Byla provedena analýza počtu listů a analýza hmotnosti růžice listů. Bylo zjištěno, že průměrný počet listů rostlin T-DNA inzerční linie *ent1* byl ve srovnání s divokým typem signifikantně vyšší. Průměrná hmotnost listů růžice byla u mutantních rostlin *ent1* také vyšší než u divokého typu, ačkoliv tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní.

Přestože analýzou kořenové části T-DNA inzerční linie *ent1* se tedy za daných podmínek transportní funkci AtENT1 sledováním fenotypového projevu potvrdit nepodařilo, výsledky analýzy nadzemní části fenotypový projev této mutantní linie naznačují a bude zapotřebí provedení dalších experimentů, například v podmínkách sníženého obsahu dusíku, případně v podmínkách exogenní aplikace různých forem CK.

7 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium vybraných členů ENT s předpokládanou transportní funkcí. Teoretická část shrnuje dosavadní poznatky o biosyntéze, degradaci a transportu CK v rostlinách.

V experimentální části práce byly metodou klasického a Gateway klonování úspěšně připraveny expresní konstrukty *35S::ENT1:GFP*, *35S::ENT3:GFP*, *35S::ENT6:GFP* a *35S::ENT8:GFP* pro testování v tranzientně nadprodukcujících protoplastech buněčné kultury *Arabidopsis thaliana* (ekotyp *Ler*) a *pUBQ10::ENT1:GFP*, *pUBQ10::ENT3:GFP*, *pUBQ10::ENT6:GFP* a *pUBQ10::ENT8:GFP*, které byly nejprve testovány v listech rostlin *Nicotiana benthamiana* metodou tranzientní exprese.

Za použití konfokální laserové skenovací mikroskopie a technologie fluorescenčního značení pomocí GFP byla poté určena subcelulární lokalizace fúzních proteinů ENT1-GFP, ENT3-GFP, ENT6-GFP a ENT8-GFP v blízkosti jádra a cytoplazmatické membrány, a to jak u tranzientně nadprodukcujících protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler*, tak u listů tranzientně nadprodukcujících rostlin *Nicotiana benthamiana*.

Úspěšně otestované konstrukty v uvedených tranzientních systémech, *pUBQ10::ENT1:GFP*, *pUBQ10::ENT3:GFP*, *pUBQ10::ENT6:GFP* a *pUBQ10::ENT8:GFP*, byly spolu s dalšími připravenými konstrukty *pENT1::ENT1:GFP*, *pENT3::GFP*, *pENT6::ENT6:GFP* a *pENT8::ENT8:GFP* použity také pro přípravu stabilních homozygotních nadprodukcujících linií ENT v *Arabidopsis thaliana*, které budou předmětem dalšího studia.

Dále byla provedena bližší charakterizace dostupné T-DNA inzerční linie *ent1*, v rámci které byla provedena fenotypizace homozygotních mutantních rostlin *ent1*. Ačkoli analýzou kořenové části T-DNA inzerční linie *ent1* nebyl fenotyp prokázán, analýza nadzemní části prokázala významně vyšší počet listů linie *ent1* ve srovnání s divokým typem. Výsledky analýzy nadzemní části tedy naznačují fenotypový projev této linie a bude zapotřebí dalších experimentů pro potvrzení možného cytokinin-hyposensitivního efektu u *ent1* mutantních rostlin.

Výsledky dosažené v rámci práce mohou být v budoucnu využity k dalšímu zkoumání a přispět k objasnění transportních funkcí CK přenašečů, které by mohly pomoci blíže porozumět distribuci CK a jejich mechanismu účinku a rozšířit tak dosavadní poznatky v oblasti hormonální regulace rostlin.

8 LITERATURA

Acimovic Y., Coe I. R. (2002) Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: Identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, **19**(12), 2199-2210.

Armstrong D. J., Burrows W. J., Skoog F., Roy K. L., Soll D. (1969) Cytokinins: distribution in transfer RNA species OF *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **63**(3), 834-841.

Baldwin S. A., Mackey J. R., Cass C. E., Young J. D. (1999) Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Molecular Medicine Today*, **5**(5), 216-224.

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**(3), 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**(13), 4627-4637.

Beveridge C. A., Symons G. M., Murfet I. C., Ross J. J., Rameau C. (1997) The rms1 mutant of Pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal(s). *Plant Physiology*, **115**(3), 1251-1258.

Blagoeva E., Dobrev P. I., Malbeck J., Motyka V., Strnad M., Hanus J., Vankova R. (2004) Cytokinin N-glucosylation inhibitors suppress deactivation of exogenous cytokinins in radish, but their effect on active endogenous cytokinins is counteracted by other regulatory mechanisms. *Physiologia Plantarum*, **121**(2), 215-222.

Borghi L., Kang J., Ko D., Lee Y., Martinoia E. (2015) The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochemical Society Transactions*, **43**(5), 924-930.

Bowles D., Lim E.-K., Poppenberger B., Vaistij F. E. (2006) Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annual Review of Plant Biology*, **57**(1), 567-597.

Brzobohaty 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**(5136), 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. *The Plant Journal*, **34**(1), 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**(5), 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**(4), 1857-1867.

Corbesier L., Prinsen E., Jacquard A., Lejeune P. J., Onckelen H. V., 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**(392), 2511-2517.

Cornelius S., Traub M., Bernard C., Salzig C., Lang P., Möhlmann T. (2012) Nucleoside transport across the plasma membrane mediated by equilibrative nucleoside transporter 3 influences metabolism of Arabidopsis seedlings. *Plant Biology*, **14**(5), 696-705.

Dolezal K., Popa I., Krystof V., Spichal L., Fojtikova M., Holub J., Lenobel R., Schmülling T., Strnad M. (2006) Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**(3), 875-884.

Duran-Medina Y., Díaz-Ramírez D., Marsch-Martínez N. (2017) Cytokinins on the move. *Frontiers in Plant Science*, **8**.

Frebort I., Kowalska M., Hluska T., Frebortova J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, **62**(8), 2431-2452.

Frebortova J., Fraaije M. W., Galuszka P., Sebela M., Pec P. , Hrbac J., Novak O., Bilyeu K. D., English J. T., Frebort I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal*, **380**(1), 121-130.

Galuszka P., Frebort I., Sebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry*, **268**(2), 450-461.

Galuszka P., Popelkova H., Werner T., Frebortova J., Pospisilova H., Mik V., Köllmer I., Schmülling T., Frebort I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, **26**(3), 255-267.

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*. *The Plant Cell*, **12**(2), 291-300.

Girke C., Daumann M., Niopek-Witz S., Möhlmann. T (2014) Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 443.

Girke Ch., Arutyunova E., Syed M., Traub M., Möhlmann T., Lemieux M. J. (2015) High yield expression and purification of equilibrative nucleoside transporter 7 (ENT7) from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1850**(9), 1921-1929.

Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **49**, 161–169.

Griffith D. A., Jarvis S. M. (1996) Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, **1286**(3), 153-181.

Haberer G., Kieber J. J. (2002) Cytokinins. New Insights into a Classic Phytohormone. *Plant Physiology*, **128**(2), 354-362.

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**(1), 75-83.

Hluska T., Sebel M., Lenobel R., Frebort I., Galuszka P. (2017) Purification of maize nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase casts doubt on the existence of zeatin cis–trans isomerase in plants. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 1473.

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**(46), 47822-47832.

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**(1), 53-63.

Chen C. (1997) Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiologia Plantarum*, **101**(4), 665-673.

Chen C.-M., Kristopeit S. M. (1981a) Metabolism of cytokinin. *Plant Physiology*, **67**(3), 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**(5), 1020-1023.
- Chen K. L., Xu M. X., Li G. Y., Liang H., Xia Z. L., Liu X., Zhang J. S., Zhang A. M., Wang D. W. (2006) Identification of AtENT3 as the main transporter for uridine uptake in Arabidopsis roots. *Cell Research*, **16**(4), 377-388.
- Ito H., Gray W.M. (2006) A gain-of-function mutation in the Arabidopsis pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. *Plant Physiology*, **142**, 63-74.
- Jaquinod M., Villiers F., Kieffer-Jaquinod S., Hugouvieux V., Bruley C., Garin J., Bourguignon J. (2006) A proteomics dissection of Arabidopsis thaliana vacuoles isolated from cell culture. *Molecular & Cellular Proteomics*, **6**(3), 394-412.
- Kakimoto T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, **42**(7), 677-685.
- Kaminek M. (2015) Tracking the Story of Cytokinin Research. *Journal of Plant Growth Regulation*, **34**(4), 723-739.
- Kang J., Hwang J.U., Lee M., Kim Y.Y., Assmann S.M., Martinoia E., Lee Y. (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(5), 2355-2360.
- Kang J., Park J., Choi H., Burla B., Kretzschmar T., Lee Y., Martinoia E. (2011) Plant ABC transporters. *The Arabidopsis Book*, **9**, e0153.
- King A. E., Ackley M. A., Cass C. E., Young J. D., Baldwin S. A. (2006) Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, **27**(8), 416-425.

- Ko D., Kang J., Kiba T., Park J., Kojima M., Do J., Kim K. Y., Kwon M., Endler A., Song W.-Y. (2014) Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**(19), 7150-7155.
- Köllmer I., Novák O., Strnad M., Schmölling T., Werner T. (2014) Overexpression of the cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX7) from Arabidopsis causes specific changes in root growth and xylem differentiation. *The Plant Journal*, **78**(3), 359-371.
- Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, **52**(1), 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**(7128), 652-655.
- 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. *The Plant Cell*, **21**(10), 3152-3169.
- Letham D. S., Palni L. M. S. (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology*, **34**(1), 163-197.
- Li G., Liu K., Baldwin S. A., Wang D. (2003) Equilibrative nucleoside transporters of Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(37), 35732-35742.
- Li J., Wang D. (2000) Cloning and in vitro expression of the cDNA encoding a putative nucleoside transporter from Arabidopsis thaliana. *Plant Science*, **157**(1), 23-32.
- 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**(1), 47-65.

- Liu C.-J., Zhao Y., Zhang K. (2019) Cytokinin Transporters: Multisite Players in Cytokinin Homeostasis and Signal Distribution. *Frontiers in Plant Science*, **10**, 693.
- Marquez-Lopez R. E., Quintana-Escobar A. O., Loyola-Vargas V. M. (2019) Cytokinins, the Cinderella of plant growth regulators. *Phytochemistry Reviews*, **18**, 1387-1408.
- Matsumoto-Kitano M., Kusumoto T., Tarkowski P., Kinoshita-Tsujimura K., Vaclavikova K., Miyawaki K., Kakimoto T. (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(50), 20027-20031.
- 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. *The Plant Journal*, **37**(1), 128-138.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(44), 16598-16603.
- 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**(3), 370-374.
- Mok D. W. S., Mok M. C. (1994) Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. CRC Press
Moore TC (2012) Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer Science & Business Media.
- Rohmer M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports*, **16**(5), 565-574.
- Romanov G. A., Lomin S. N., Schmuelling T. (2018) Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question! *New Phytologist*, **218**(1), 41-53.

Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(28), 9972-9977.

Schmitt L., Tampe R. (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology*, **12**(6), 754-760.

Skoog F., Armstrong D. J., Cherayil J. D., Hampel A. E., Bock R. M. (1966) Cytokinin activity: Localization in transfer RNA preparations. *Science*, **154**(3754), 1354-1356.

Skoog F., Miller C. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **11**, 118-131.

Skoog F., Strong F. M., Miller C. O. (1965) Cytokinins. *Science*, **148**(3669), 532-533.

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**(5), 588-603.

Szydlowski N., Bürkle L., Pourcel L., Moulin M., Stolz J., Fitzpatrick T. B. (2013) Recycling of pyridoxine (vitamin B6) by PUP1 in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **75**(1), 40-52.

Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(28), 26405-26410.

Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004) Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(40), 41866-41872.

Theodoulou F. L. (2000) Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **1465**(1-2), 79-103.

Traub M., Flörchinger M., Piecuch J., Kunz H.-H., Weise-Steinmetz A., Deitmer J. W., Neuhaus H. E., Möhlmann T. (2007) The fluorouridine insensitive 1 (fur1) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **49**(5), 855-864.

Verrier P. J., Bird D., Burla B., Dassa E., Forestier C., Geisler M., Klein M., Kolukisaoglu Ü., Lee Y., Martinoia E. (2008) Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, **13**(4), 151-159.

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmülling T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, **15**(11), 2532-2550.

Wormit A., Traub M., Flörchinger M., Neuhaus H. E., Möhlmann T. (2004) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochemical Journal*, **383**(1), 19-26.

Xiang, L., Etxeberria, E., Van den Ende, W. (2013) Vacuolar protein sorting mechanisms in plants. *FEBS Journal*, **280**(4), 979–993.

Zalabák D., Galuszka P., Mrízová K., Podlešáková K., Gu R., Frébortová J. (2014) Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **74**, 283-293.

Zhang K., Novak 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**(1), 3274.

Zürcher E., Liu J., di Donato M., Geisler M., Müller B. (2016) Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science*, **353**(6303), 1027-1030.

Zürcher E., Müller B. (2016) Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function -- Advances and New Insights. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 324, 1-38.