

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Subcelulární lokalizace proteinů metabolismu cytokininů
u *Arabidopsis thaliana***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Střelcová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Šmehilová, Ph.D.
Rok:	2015

Prohlášení

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

V Olomouci dne *podpis bakaláře*

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí Mgr. Márii Šmehilové, PhD. za vedení při zpracování bakalářské práce, odborné rady, pozitivní přístup a veškerou pomoc. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Mgr. Janě Dobruškové za množství času, které mi věnovala při seznámení s metodikami v laboratoři i při konzultacích týkajících se bakalářské práce, taktéž za pozitivní přístup, množství cenných rad a velkou trpělivost. Mé poděkování patří také prof. Christopheru Taylorovi (Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri, USA) za poskytnutí vektorů a Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. (Oddělení buněčné biologie, CR Haná, UP Olomouc, ČR) za laskavou pomoc při konfokální mikroskopii.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Střelcová
Název práce	Subcelulární lokalizace proteinů metabolismu cytokininů u <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Mária Šmehilová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>Hladiny rostlinných hormonů cytokininů jsou v pletivech přísně regulovány enzymy jejich metabolismu. Jedním z takových regulačních mechanismů je inaktivace cytokininů glykosylací jejich molekuly působením glykosyltransferas (UGT). V genomu <i>Arabidopsis thaliana</i> bylo identifikováno celkem pět UGT, které by se měly dle predikce lišit v lokalizaci na úrovni buňky. Cílem bakalářské práce bylo odhalit buněčnou lokalizaci poslední, zbývající UGT – AtUGT73C1, u které ještě není známa a to pomocí fúze se zeleným fluorescenčním proteinem GFP. Experimentální část sestává z přípravy binárního vektoru, transformace <i>Agrobacterium rhizogenes</i>, přípravy transgenního pletiva, jeho ověření a konfokální mikroskopie. Navíc je ověřena funkčnost vakuolárního signálního peptidu pro cílení enzymů metabolismu cytokininů do vakuoly. Teoretická část se zabývá rešerší na dané téma, zatímco v experimentální části jsou popsány dílčí experimenty. V rámci práce je za pomoci vlastního modelu diskutována lokalizace inaktivační dráhy cytokininů v rámci doposud známého konceptu funkce metabolismu cytokininů na úrovni buňky.</p>
Klíčová slova	Subcelulární lokalizace, signální sekvence, vakuola, cytokinininy, UGT73C1, hairy root transformation, GFP
Počet stran	61
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Kateřina Střelcová
Title	Subcellular localization of proteins of cytokinin metabolism in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Mária Šmehilová, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	<p>Levels of plant hormones cytokinins in plant tissues are strictly regulated by enzymes of their metabolism. One of these regulatory mechanism is inactivation of cytokinins by glycosylation of their molecule by glycosyltransferases (UGT). In <i>Arabidopsis thaliana</i> genome, five UGT with different prediction of subcellular localization were identified. The aim of this bachelor thesis was to determine subcellular localization of the last UGT – AtUGT73C1 by fusion with green fluorescent protein GFP. Experimental part consisted of preparation of binary vector, transformation of <i>Agrobacterium rhizogenes</i>, preparation of transgenic tissue and its verifying by the confocal microscopy. Moreover, the function of vacuolar signal sequence for translocation proteins to vacuoles was verified. Theoretical part deals with research on the topic, while experimental part describes partial experiments. As part of this bachelor thesis, with use of own model, localization of inactivating pathway of cytokinins is discussed within help of known concept of function of cytokinin metabolism at the cellular level.</p>
Keywords	Subcellular localization, signal sequence, vacuole, cytokinins, UGT73C1, hairy root transformation, GFP
Number of pages	61
Number of appendices	-
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Lokalizace proteinů na úrovni buněčných kompartmentů	2
2.2 Od translace k subcelulární lokalizaci	2
2.2.1 Translace	2
2.2.2 Mechanismy, kterými proteiny mohou dosáhnout svého cílového kompartmentu	3
2.2.3 „Protein sorting“ a proteinové třídící signály	5
2.3 Vakuoly	8
2.3.1 Vývoj vakuol během života rostlin	10
2.3.2 Tonoplast	10
2.4 Mechanismus transportu do vakuol	12
2.4.1 Mechanismus transportu proteinů do vakuol	15
2.4.2 Signaling proteinů do tonoplastu	17
2.5 Cytokininy	18
2.5.1 Lokalizace metabolismu cytokininů na úrovni buňky v <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
2.5.2 Predikce buněčné lokalizace <i>in silico</i>	21
2.5.3 Inaktivace cytokininů glykosyltransferasami	22
2.5.4 UGT73C1 a predikce její lokalizace	23
2.5.5 Long-term a short-term transport cytokininů	24
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Materiál	27
3.1.1 Biologický materiál a enzymy	27
3.1.2 Primery	29
3.1.3 Chemikálie	29
3.1.4 Média a roztoky	30
3.1.5 Kity	32
3.1.6 Přístrojové vybavení	32

3.2 Metody	33
3.2.1 Kultivace bakterií	33
3.2.2 Klonování	34
3.2.2.1 Izolace plasmidové DNA	34
3.2.2.2 Restrikce DNA	34
3.2.2.3 Agarosová elektroforéza pro účely klonování	35
3.2.2.4 Purifikace DNA	35
3.2.2.5 Ligace	35
3.2.2.6 Transformace <i>E. coli</i> tepelným šokem	36
3.2.3 PCR	37
3.2.4 Agarosová elektroforéza po PCR	38
3.2.5 Tomato hairy root transformation	38
3.2.6 Fluorescenční mikroskopie	41
3.2.7 Konfokální mikroskopie	42
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	43
4.1 Klonování	43
4.1.1 Restrikce a separace fragmentů agarosovou elektroforézou	43
4.1.2 Agarosová elektroforesa pro ověření transformovaných kolonií	44
4.2 Ověření genotypů <i>A. rhizogenes</i>	45
4.3 Konfokální mikroskopie	47
5 ZÁVĚR	49
6 LITERATURA	50
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	59

Cíle práce

- Zpracování literární rešerše na téma subcelulární lokalizace, třídění proteinů v buňce a jednotlivé typy signálních sekvencí. Dále zaměření na vakuoly, mechanismus transportu do vakuol a tonoplastu. Nakonec shrnutí poznatků o cytokininech, jejich inaktivaci glykosyltrasferasami a transportu v rostlinách.
- Příprava binárního vektoru AKK1472B molekulárně biologickými metodami.
- Transformace *Agrobacterium rhizogenes*.
- Příprava transgenního pletiva metodou „Tomato hairy root transformation“.
- Ověření transgenního pletiva fluorescenční mikroskopií.
- Studium subcelulární lokalizace pomocí konfokální mikroskopie.
- Osvojení si metodiky při ověřování subcelulární lokalizace GFP.

1 ÚVOD

Organely eukaryotické buňky nemají schopnost syntetizovat potřebné proteiny, nebo je tato schopnost hodně omezená. Proto po translaci nově syntetizovaný protein musí být dopraven do místa působení. Translokace proteinu v buňce probíhá různými mechanismy, díky kterým jsou proteiny tříděny a zacíleny do správných kompartmentů v buňce na základě jejich vlastností a funkce.

Jedním z mechanismů, jakými mohou být proteiny v buňce tříděny, zahrnuje přítomnost signální sekvence na proteinovém řetězci. Jedná se o sekvenci aminokyselin, se kterou je protein syntetizován. Poloha této sekvence na proteinu a její charakteristické aminokyselinové složení jsou pak esenciální pro rozpoznání této sekvence receptory a transport do správné buněčné destinace.

Rostlinné hormony cytokininy hrají v buňce velmi důležitou roli, a proto musí být jejich metabolismus důkladně regulován různými mechanismy. Jedním z mechanismů je jejich inaktivace glykosylací pomocí enzymů glykosyltransferas. V rostlině *Arabidopsis thaliana* existuje pět cytokinin specifických UDP-glykosyltransferas, které se od sebe liší. S výjimkou UGT73C1 (EC 2.4.1.203) byly stanoveny jejich subcelulární lokalizace, které mohou nastínit, jakými metabolickými drahami tyto enzymy procházejí. Primárním cílem této bakalářské práce bylo stanovit subcelulární lokalizaci UGT73C1.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Lokalizace proteinů na úrovni buněčných kompartmentů

Proteiny jsou v eukaryotické buňce cíleny podle jejich funkce do jednotlivých kompartmentů. Proto u nových proteinů, které byly předpovězeny metodami sekvencování buněčného genomu, ale doposud nebyly charakterizovány, může být jejich funkce nastíněna na základě stanovení subcelulární lokalizace. (Dunkley *et al.*, 2004).

Většina proteinů je syntetizována v cytosolu a dále určena k sekreci přes systém endomembrán, aby mohly být dopraveny na místo určení, kde budou vykonávat svou funkci nebo mohly být uloženy ve vakuolách k pozdějšímu využití jako zdroj dusíku. Cílovou destinaci proteinu předurčují speciální aminokyselinové sekvence umístěné velmi často na N-konci proteinu (ale také na C-konci nebo uprostřed proteinu) (Nakai, 2000). Tyto sekvence jsou rozpoznávány receptory a následně tříděny pro transport různými mechanismy. Obecně jsou proteiny a další makromolekuly v buňce transportovány systémem váčků, tzv. vezikul.

2.2 Od translace k subcelulární lokalizaci

2.2.1 Translace

Translace mediátorové RNA je posledním krokem genové exprese. Je to proces, při kterém v buňce dochází ke skládání aminokyselin do polypeptidového řetězce, tzv. primární struktury proteinů. Syntéza proteinů je jeden z nejnáročnějších procesů na spotřebu energie, která je nutná k syntéze aminokyselin, transferové RNA, translačních faktorů, vytvoření peptidových vazeb a celému průběhu translace (Mathews *et al.*, 2000). Takto náročný a komplexní proces musí podléhat důkladné regulaci. Translace se dá rozdělit na několik samostatných fází – iniciace, elongace, terminace a recyklace ribozomů.

Syntéza proteinů je primárně regulovaná při iniciaci. Tato fáze začíná navázáním iniciační $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ na malou podjednotku ribozomu (40S) a následně se malá podjednotka ribozomu naváže na 5' konec mRNA. Při rozpoznání startovacího kodonu AUG dojde k připojení velké podjednotky ribozomu (60S) nesoucí peptidylové místo (P) a vytvoří se kompletní ribozom (80S). Tento sled reakcí bývá považován za klíčový při řízení

syntézy polypeptidového řetězce u eukaryot a je řízen tzv. iniciačními faktory (Dever, 2002).

Ve fázi elongace postupuje ribozom po jednotlivých kodonech mRNA vlákna směrem k 3' konci. Nabitá tRNA nesoucí konkrétní aminokyselinu (aa-tRNA) se naváže do aminoacylového místa (A) v závislosti na kodonu kódujícím danou aminokyselinu (Merrick a Nyborg, 2000). Aminokyselina je připojena k peptidovému řetězci peptidovou vazbou a tRNA je z A místa uvolněna. Ribozom přechází na následující kodon a tímto způsobem je syntetizován polypeptidový řetězec. Tato fáze je závislá na dodávkách energie a také dostupnosti aa-tRNA.

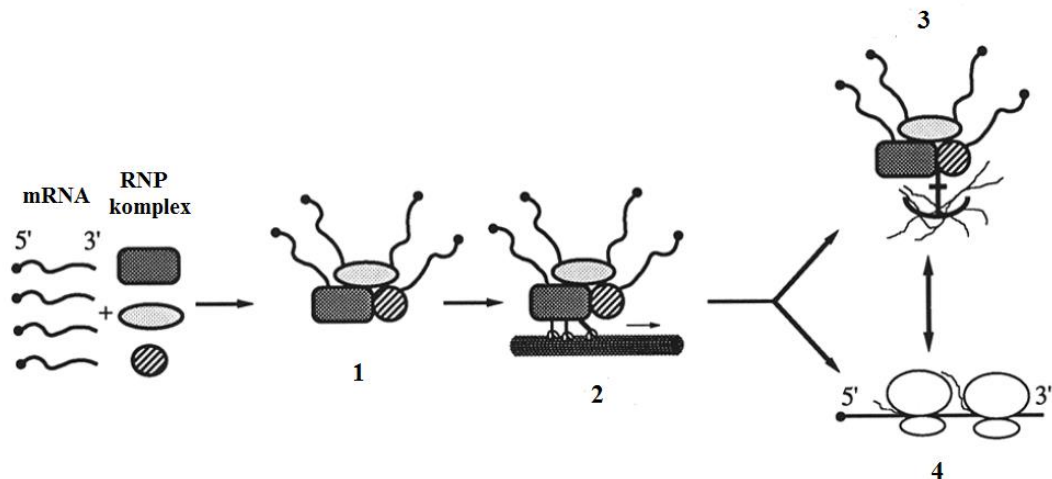
V ideálním případě je translace ukončena dosažením terminačního kodonu UAA, UAG nebo UGA po němž následuje uvolnění polypeptidového řetězce z ribozomu a rozpad ribozomu na 60S a 40S podjednotku (Skjøndal-Bar a Morris, 2006).

2.2.2 Mechanismy, kterými proteiny mohou dosáhnout svého cílového kompartmentu

Existuje více způsobů, jakými můžou proteiny dosáhnout jejich cílového kompartmentu v buňce. O konkrétním mechanismu rozhoduje typ proteinu, typ organely, do které má být zacílen, poloha signální sekvence v proteinu a lokalizace proteinu v příslušné organelle.

Velmi efektivním způsobem zacílení produktů genové exprese do specifického kompartmentu nebo regionu buňky je přímo zacílení mRNA. Lokalizace mRNA má mnoho důvodů. Ukázala se jako klíčový krok při určení funkce buňky a polárním růstu. Slouží k rozdělení speciálních mRNA a mRNA kódujících například izoenzymy, vymezení translace na specifické místo v buňce a zabezpečení produkce lokalizovaného proteinu v určitém regionu nebo kompartmentu buňky i ve vysoké koncentraci (Kloc *et al.*, 2002).

Po transkripci opouští mRNA jádro do cytoplasmy, aby mohla podstoupit translaci tak, jak byla popsána výše. Ovšem některé mRNA nepodstoupí translaci do doby, než dosáhnou jejich cílové destinace. Lokalizace může proběhnout několika mechanismy. RNA se můžou pohybovat difuzí nebo prouděním cytoplasmy a zakotvit na určitém místě buňky při rozpoznání receptory. Hlavní mechanismus ale probíhá tzv. RNA lokalizační drahou (Wilhelm a Vale, 1993), kdy je mRNA aktivně transportována na místo určení (obrázek 1).



Obrázek 1: Model aktivního transportu mRNA pomocí ribonukleoproteinového komplexu. (1) Vytvoření ribonukleoproteinové částice interakcí mRNA a RNP komplexu, (2) translokace RNP částice pomocí cytoskeletu, (3) zakotvení RNP částice, (4) translace mRNA (Převzato a upraveno Wilhelm a Vale, 1993).

Nejprve dojde k vytvoření velkého ribonukloproteinu, který se jako transportní komplex pohybuje podél mikrofilament a mikrotubulů. Nakonec dojde k zakotvení transportované mRNA. Při vytvoření transportního komplexu musí transportní proteinová částice rozpoznat RNA „zip-code“, sekvenci na 3' konci RNA, která nepodléhá translaci. Rozpoznání této sekvence proteinovou transportní částicí je důležité pro správnou lokalizaci a následnou translaci (Okita a Choi, 2002).

Další způsob dopravení proteinů na místo jejich určení může proběhnout konvenční sekreční drahou nebo nekonvenční sekreční drahou. V konvenční sekreční dráze je protein nejprve translokován za pomoci speciální sekvence aminokyselin, tzv. signálního peptidu lokalizovaného na N-konci polypeptidového řetězce do lumen endoplazmatického retikula, kde proteiny podléhají posttranslačním modifikacím nezbytným pro jejich funkci. Dále pomocí transportních vezikul putují přes Golgiho aparát a *trans*-Golgiho síť, aby dosáhly cytoplasmatické membrány nebo extracelulárního prostoru. Některé proteiny bez signálního peptidu ovšem přesto dojdou až k cytoplasmatické membráně a některé proteiny se signálními peptidy doputují k cytoplasmatické membráně nebo do extracelulárního prostoru bez průchodu Golgiho aparátem. Tyto dvě výjimky popisuje nekonvenční sekreční dráha proteinů (Ding *et al.*, 2014).

2.2.3 „Protein sorting“ a proteinové třídící signály

„Protein sorting“ by se dal v překladu vyjádřit jako třídění proteinů, které probíhá na základě jejich charakteristických vlastností a funkce do jednotlivých kompartmentů. Většina proteinů je syntetizována v cytosolu a dále tříděna do jednotlivých destinací v buňce jako jsou mitochondrie, chloroplasty nebo vakuoly. U většiny proteinů je informace o subcelulární lokalizaci uložena v krátkém úseku aminokyselinové sekvence nazývané proteinový třídící signál (Nakai, 2000). Konkrétní složení této aminokyselinové sekvence a charakter aminokyselin ovlivňuje zacílení proteinu do správné destinace. Proteiny lokalizované do cytosolu neobsahují žádnou signální sekvenci. Třídění proteinů je obecně založeno na dvou mechanismech. Signální sekvence může způsobit zamezení vstupu proteinu do transportní vezikuly a tím zadržet protein na určitém místě v buňce. Zadržení může způsobit i vytvoření oligomerů a agregátů proteinů, které tak mohou být moc velké na transportní vezikulu. Druhým způsobem může signální sekvence předurčovat protein k transportu na specifickou lokaci. V obou případech je signál rozpoznán receptory, které rozhodují o následném osudu proteinu (Harter, 1996).

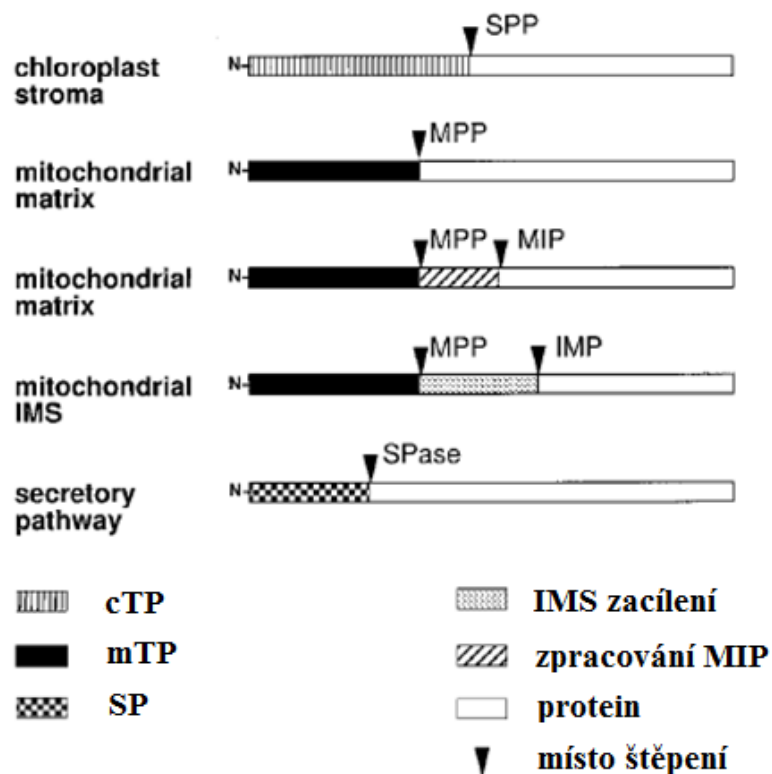
Proteiny určené k translokaci do lumen endoplazmatického retikula obsahují na N-konci signální sekvenci nazývanou vedoucí sekvence nebo tzv. signální peptid. Tato sekvence obsahuje kolem 7 – 30 reziduí a může být rozdělena na tři hlavní části: pozitivně nabitá N-terminální část, centrální hydrofobní část a polární C-terminální část, která také zahrnuje štěpící místo pro signální peptidasu (EC 3.4.21.89). Při translokaci proteinu do lumen ER hraje klíčovou roli signální rozpoznávací částice (SRP), která se skládá ze šesti proteinů (SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68 a SRP72) a jedné RNA molekuly (Keenan *et al.*, 2001). SRP se váže na signální peptid jakmile je syntetizován. Dochází ke zpomalení translace, což umožňuje komplexu ribozomu, vznikajícímu polypeptidovému řetězci a SRP rozpoznat SRP-receptor (SR) na membráně ER a připojit se k ní. (Potter, 2001). Po průchodu proteinu do ER signální peptidasa odštěpí signální peptid a polypeptidový řetězec je dále upravován tak, aby mohl správně plnit jeho funkci. Po odštěpení signálního peptidu mohou proteiny obsahovat sekundární sekvenci poskytující informaci o následné translokaci sekreční dráhou do buněčných kompartmentů.

Proteiny, jejichž cílovou destinací jsou chloroplasty, rovněž obsahují signální sekvenci na N-konci řetězce, která se nazývá tranzitní peptid (cTP). Ten se skládá z 13 – 146 reziduí s charakteristicky vysokým obsahem hydroxylovaných a hydrofobních

aminokyselin společně s pozitivně nabitými a pár kyselými aminokyselinami (Zhang, 2002). V chloroplastech jsou cTPs odštěpeny stromální procesující peptidasou (EC 3.4.21.102) (Schleiff a Becker, 2011).

Tranzitní peptid, který určuje protein k translokaci do mitochondrií (mTP), je charakteristický vysokým obsahem argininu, alaninu a serinu. Naopak přítomnost negativně nabitých AMK je ojedinělá. Na rozdíl od cTP má sklon utvářet amfifilní α -helix s hydrofobními rezidui zapojenými do interakce s receptorem Tom 20 na vnější mitochondriální membráně (Mackenzie, 2005). mTPs jsou po průchodu membránami do matrix mitochondriální procesující peptidasou (EC 3.4.24.64) (Lee, 2013).

Porovnání mitochondriálních a chloroplastových signálních sekvencí a signálních peptidů předurčujících protein pro vstup do ER můžeme vidět na obrázku 2.



Obrázek 2: N-koncové cílicí sekvence a peptidasy zodpovědné za odštěpení těchto sekvencí. cTP, chloroplastový tranzitní peptid; mTP, mitochondriální cílicí peptid; SP, signální peptid; IMS, mezimembránový prostor (u mitochondrií); MIP, mitochondriální intremediátová peptidasa (EC 3.4.24.59); SPP, stromální zpracující peptidasa; MPP, mitochondriální zpracující peptidasa; IMP, mitochondriální vnitromembránová peptidasa (EC 3.4.99); SPasa, signální peptidasa (převzato a upraveno z Emanuelsson, 2000).

Dále mohou být proteiny zacíleny do peroxisomů pomocí signální sekvence nazývané peroxisomální cílicí signál (PTS) u které rozeznáváme typ I a typ II. PTSI se u peroxisomálních proteinů vyskytuje častěji. Nachází se na C-konci proteinu a obvykle se skládá z konvenční sekvence (Serin/Alanin/cystein)-(Lysin/Arginin/Histidin)-(Leucin/Methionin) (Lametschwandtner *et al.*, 1998). Oproti tomu PTSII se nachází na N-konci proteinu a je popsán jako nonapeptid Arginin-(Leucin/Valin/Isoleucin/Glutamin)-xx-(Leucin/Valin/Isoleucin/Histidin)-(Leucin/Serin/Glycin/Alanin)-x-(Histidin/Glutamin)-(Leucin/Alanin) (Rachubinski a Subramani, 1995).

Proteiny se zacílením do jádra obsahují tzv. jaderný lokalizační signál (NLS) zprostředkovávající transport. NLS může mít několik motivů. Může se jednat o krátkou část aminokyselinové sekvence bohatou na pozitivně nabitá rezidua, nebo bohatou na glycin s obsahem pár kladně nabitých reziduí (Bonifaci *et al.*, 1997). Dále se může jednat o shluk bazických reziduí, kterým předchází aminokyselinový zbytek rozrušující helix nebo o dva shluky bazických reziduí separovaných devíti až dvanácti aminokyselinami (Boulikas, 1993).

Proteiny, jež jsou určeny k translokaci do vakuol, musí obsahovat vakuolární třídící determinanty (VSDs). V rostlinné buňce se můžou vyskytovat tři různé typy VSDs: specifické sekvenční VSDs (ssVSD), C-terminální VSDs (ctVSD) nebo strukturně fyzikální VSDs (psVSD) (Matsuoka a Neuhaus, 1999; Vitale a Raikhel, 1999). Funkce ssVSD není ovlivněna pozicí na polypeptidovém řetězci, i když častější je jejich umístění na N-konci (Koide *et al.*, 1999). Pro tyto determinanty je charakteristický motiv NPIRL. ctVSDs se musí striktně vyskytovat na C-konci proteinu a jsou bohaté na hydrofobní aminokyseliny. Tyto determinanty jsou vysoce variabilní v délce aminokyselinové sekvence. Nejmenší počet jsou čtyři AMK (Frigerio *et al.*, 2001). Fyzikálně strukturní VSDs jsou založeny na proteinové struktuře a mohou být dále děleny na dva podtypy. První podtyp je složen z mnohačetných interních domén, které mohou vytvářet struktury vyššího řádu, které pak fungují jako VSDs. Druhý podtyp je tvořen agregátem zásobních proteinů semene uložených pravděpodobně v Golgiho aparátu (Vitale a Hinz, 2005).

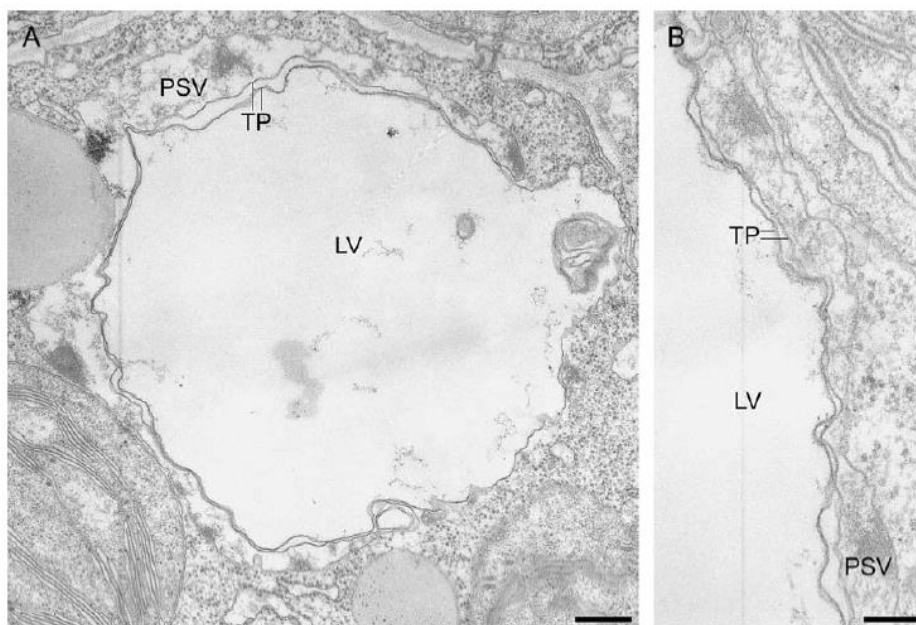
2.3 Vakuoly

Vakuoly rostlinných buněk jsou organely plnící řadu důležitých a esenciálních funkcí pro buňku. Fungují jako zásobárna pro ionty, proteiny, aminokyseliny, cukry, oxid uhličitý a metabolity, regulují pH uvnitř buňky, zajišťují buněčnou homeostázu, hrají klíčovou roli při detoxifikaci, jsou zapojeny do buněčné odpovědi při stresu vyvolaném biotickými a environmentálními faktory. Původně byly vakuoly objeveny v buňkách semene a byly tak považovány za nitrobuněčné organely sloužící pro skladování proteinů (Müntz, 1998). Později byly vakuoly objeveny také v jiných typech buněk, jako jsou buňky listů a dokonce kořenů (Jiang *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004).

Největší organelou v buňce je centrální vakuola, také nazývána lytická vakuola, která může zaujímat více než 80% celkového objemu buňky. Protože se v nich ukládá většina buněčných minerálů a vody, slouží tyto vakuoly k udržování turgoru a hrají tak zásadní roli ve fyziologii rostliny. Další funkcí je ukládání odpadních látek a xenobiotik z cytoplasmy a detoxifikace buňky. V těchto vakuolách se také ukládají sekundární metabolity a proteiny zapojené do rostlinné obrany před patogeny a herbivory. Stejně jako lysozomy v živočišných buňkách lytické vakuoly obsahují hydrolytické enzymy. Mají pH okolo 4 – 5, u citrusových rostlin mohou dosáhnout až pH 2 (Echeverria a Burns, 1989). V některých typech buněk tyto vakuoly dále mohou obsahovat signální molekuly nebo také barviva, jako například antokyany.

V rostlinné buňce se může vyskytovat více typů vakuol a můžou dokonce koexistovat vedle sebe v jedné buňce (Obrázek 3). Liší se tvarem, velikostí, funkcí, obsahem rozpustných proteinů a typem aquaporinů. Z hlediska jejich funkce můžeme rozlišovat vakuoly lytické, které byly popsány výše, proteinové zásobní vakuoly a vakuoly spojené se senescencí (SAVs).

Hlavní funkcí proteinových zásobních vakuol je skladování proteinů, aby mohly být použity později jako zdroj dusíku při vývoji semene a klíčení. Často také obsahují toxické proteiny, jako jsou lektiny, inhibitory proteas a proteiny inaktivující ribosomy, které pravděpodobně chrání semeno před predátory. Oproti lytickým vakuolám mají vyšší pH a nižší hydrolytickou aktivitu (Swanson a Jones, 1996). Nicméně také obsahují lytické proteasy, glykosidasy a RNasy (Hara-Nishimura *et al.*, 1993). Při mobilizaci proteinů se mohou dočasně přeměnit na lytické vakuoly (Swanson a Jones, 1996; Herman a Larkins, 1999).



Obrázek 3: Fotografie z mikroskopie využívající imunoznačení částicemi zlata zobrazující různé typy vakuol koexistující v jedné buňce ve vyvíjejících se embryonálních buňkách *Arabidopsis thaliana*. Měřítko: (A) 320nm, (B) 120 nm. (Převzato a upraveno ze Frigerio *et al.*, 2008).

Senescence listů je vysoce regulovaný proces (Swidzinski *et al.*, 2002). Během senescence dochází k degradaci proteinů, lipidů a nukleových kyselin a uvolněné živiny jsou odváděny z buňky pro další využití v jiných částech rostliny (Lim *et al.*, 2003). Proteolytická aktivita v odumírajícím listu je lokalizována zejména ve vakuole (Feller a Fisher, 1994). V buňce byly objeveny vakuoly spojené se senescencí (SAVs), hrající při senescenci důležitou roli. SAVs nejsou propojeny s centrální vakuolou a mají kyselější pH. Tyto vakuoly vykazují silnou Cys-proteasovou aktivitu a v jejich lumen nejspíše dochází k degradaci buněčného obsahu (Otegui *et al.*, 2005).

Různé typy aquaporinů neboli „tonoplast-instrict proteins“ (TIPs) jsou obsaženy v membráně vakuol. Proteinové zásobní vakuoly mají α -TIPs, lytické vakuoly mají v membráně γ -TIPs. Třetí typ δ -TIPs může být přítomen v membráně obou typů vakuol. SAVs v tonoplastu zcela postrádají γ -TIPs (Otegui *et al.*, 2005). Vakuoly, které v tonoplastu obsahují δ -TIPs jsou specializovány na skladování pigmentů a VSPs (Jauh *et al.*, 1998).

2.3.1 Vývoj vakuol během života rostlin

Vakuoly v rostlinných buňkách mají rozdílnou morfologii a dynamiku v různých typech buněk a při různých podmínkách. V buňkách procházejících diferenciací, zráním a v plně diferenciovaných buňkách byly pozorovány různé typy vakuol v reakci na aktuální potřeby buňky (Marty, 1999).

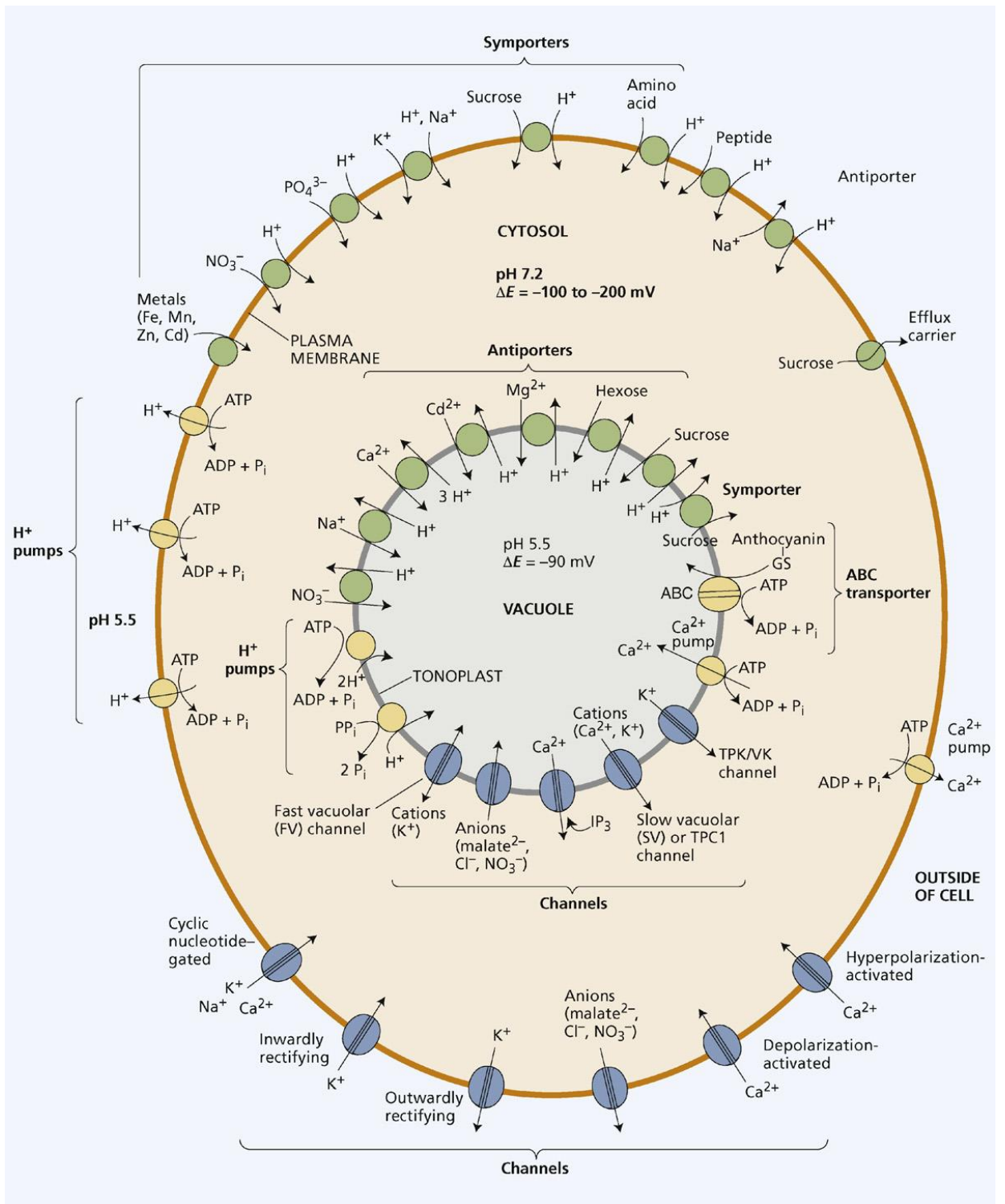
Během embryogeneze *Arabidopsis* se tvoří velká lytická vakuola v oplodněné zygote. Zygota se následně dělí, aby mohla vzniknout bazální buňka a apikální buňka. Lytická vakuola se rozvíjí v obou těchto buňkách (Zouhar a Rojo, 2009). Během vývoje embrya je tato lytická vakuola nahrazena proteinovou zásobní vakuolou, která shromažďuje zásoby minerálů a zásobní proteiny semene (SSPs) (Mansfiel a Briarty, 1991). Přitom PSV se zdá mít autofágovou ontogenezi. Začíná v buňce jako systém tubulů nebo cisteren, které obklopi již existující LV a pohlť jí (Hoh *et al.*, 1995).

Během germinace jsou zásoby využity jako zdroj energie pro rostoucí embryo (Pritchard *et al.*, 2002). Po jejich vyčerpání je PSV nahrazena opět LV, která zvětšuje objem a vytváří turgor, aby podpořila buňky při růstu (Mansfield a Briarty, 1996). Přeměnu PSV na LV je možno pozorovat také v buňkách kořene v meristematickém pletivu kořenové špičky (Olbrich *et al.*, 2007).

Předmětem studií je, jakým způsobem dokáže nahradit jeden typ vakuoly druhý. Jednou z možností, kterou potvrdily experimenty je, že vakuola je přeprogramována. Mansfield a Briarty (1996) pozorovali při germinaci a vývoji semene více PSV, které se spojily dohromady a vytvořily tak LV. Další možností je syntéza vakuoly *de novo*, jejímž příkladem je autofagie uvedena výše.

2.3.2 Tonoplast

Tonoplast je membrána vakuol s vysokou funkční organizací. Struktura odpovídá struktuře plazmatické membrány, ovšem liší se v zastoupení jednotlivých lipidů a obsahuje specifické proteiny (rozdíl v zastoupení transportních proteinů možno vidět na obrázku 4). Mnoho proteinů tonoplastu napomáhá a podporuje funkci různých typů vakuol. Jedná se o pumpy jako je vakuolární H^+ -ATPasa (V-ATPasa, EC 3.6.1.3) nebo H^+ -pyrofosfatasa (V-PPasa, EC 3.6.1.1), membránové přenašeče, jejichž příkladem může být Ca^{2+}/H^+ antiportér a Na^+/H^+ antiportér, iontové kanály, receptory a strukturní proteiny.



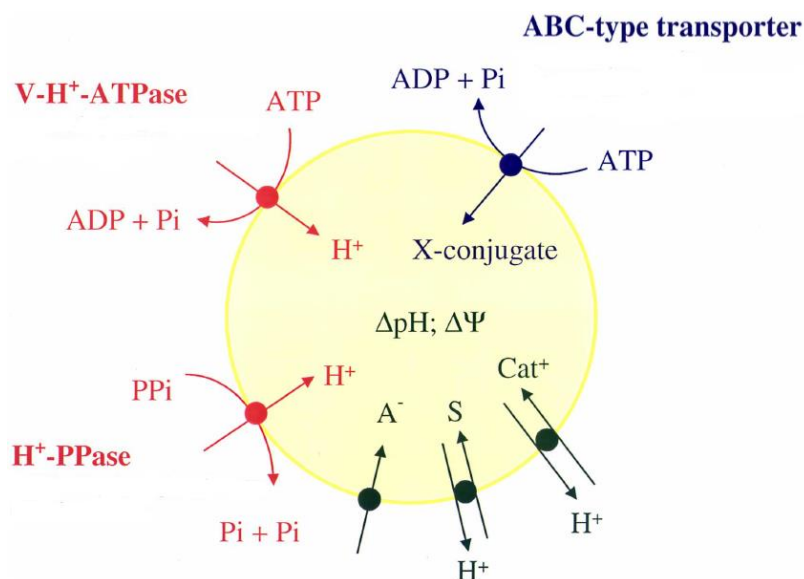
Obrázek 4: Nákres všech existujících transportních systémů v membránách rostlinných buněk. Tonoplast a plazmatická membrána obsahují iontové kanály a H⁺ pumpy, tonoplast navíc H⁺ antiportéry a ABC transportéry, PM navíc H⁺/rozpuštěné látky symportéry (převzato z Etzeberria, 2012)

Velké zastoupení v tonoplastu mají vodní kanály aquaporiny. Všechny proteiny v tonoplastu zprostředkovávající transport společně spolupracují. Například protonové pumpy vytvářejí pH gradient, který následně využívají pro svou funkci antiportéry. Iontové kanály využívají membránový potenciál vytvořený protonovými pumpami, což dále ovlivňuje funkci aquaporinů. Tato spolupráce reguluje pH uvnitř vakuol, množství uložených látek a objem vakuol (Maeshima, 2001).

2.4 Mechanismus transportu do vakuol

Klíčovou roli při transportu do vakuol hrají protonové pumpy, které vytváří transmembránový protonový elektrochemický gradient řídící transport rozpuštěných látek přes membránu (obrázek 5).

V roce 1989 byla popsána nejpočetnější skupina proteinů v membráně vakuol nazvané α -TIPs, tzv. vnitřní tonoplastové proteiny (Johnson *et al.*, 1989). Později byly objeveny v membráně centrální vakuoly u ředkve γ -TIPs (Maeshima, 1992). Oba typy proteinů patří do super rodiny aquaporinů a plní funkci vodních kanálů (Martinoia *et al.*, 2007).



Obrázek 5: Protonové pumpy zajišťující elektrochemický gradient (červeně), sekundární aktivní transport poháněný protonovým gradientem (zeleně), aktivní transport ABC-typu transportéru (modře) v rostlinné vakuole. S – neutrální rozpuštěná látka; A^- - anion; cat^+ - kation; X-konjugát – konjugát metabolitu X (sekundární metabolit nebo xenobiotikum) s hydrofobní složkou jako je glukosa, glutathion, AMK, malonát nebo sulfát (převzato a upraveno z Martinoia *et al.*, 2000).

Vakuoly jsou důležité pro přechodné uchovávání primárních metabolitů a v zájmu udržení cytosolické homeostáze nezbytné pro správnou funkci metabolismu. V zásobním pletivu jsou sacharidy skladovány ve vakuolách ve vegetativním období, aby později mohly být využity jako zdroj energie pro růst. Oproti tomu vakuoly v listech musí být schopny rychle akumulovat a uvolnit sacharidy, jako je například sacharosa nebo glukosa. K příjmu takových sacharidů do vakuol v listech dochází usnadněnou difuzí (Kaiser a Heber, 1984; Martinoia *et al.*, 1987). Větší sacharidy (např. stachyosa) mohou být transportovány do vakuoly protonovým antiportérem.

Příjem aminokyselin je zprostředkován přenašečem nebo pumpou, které jsou modulovány volnou ATP a zprostředkovávají příjem i výdej aminokyselin (Dietz *et al.*, 1989).

Transport organických kyselin byl studován na kyselině malonové, která hraje klíčovou roli v metabolismu rostlin (Martinoia a Rentsch, 1994). Příjem je zprostředkován elektrochemickým potenciálem, který generují protonové pumpy. Výdej malátu probíhá přes kanál, který může být inhibován chloridovými anionty v lumen vakuoly (Plant *et al.*, 1994).

Při studiu propustnosti membrány pro anorganické ionty bylo prokázáno, že ionty NO_3^- jsou propouštěny rychleji, než Cl^- . Ionty SO_4^{2-} a HPO_4^{2-} prochází membránou velmi pomalu (Churchill a Sze, 1984). Cl^- je transportován přes tonoplast aktivním transportem. (Martinoia *et al.*, 1986). V buňkách *Vicia faba* byly identifikovány vakuolární Cl^- kanály (Pei *et al.*, 1996). NO_3^- vykazuje největší propustnost přes tonoplast (Sze, 1985). Transport je zprostředkován NO_3^-/H^+ antiportérem (De Angeli *et al.* 2006; Geelen *et al.*, 2000). Příjem SO_4^{2-} je iniciován MgATP. Buňka v cytosolu uchovává konstantní koncentraci P_i . Při snížení P_i v cytosolu dochází k uvolnění P_i z vakuoly, aby se jeho hladina vyrovnala. Naopak při nadbytku dochází k odčerpávání P_i do lumen vakuoly (Rebeille *et al.*, 1983). Transport do vakuol probíhá přes vakuolární fosfátový kanál, který je silně stimulován MgATP a Mg-pyrofosfátem. Příjem P_i je inhibován bafilomycinem a konkanamycinem, které inhibují H^+ pumpu. To naznačuje, že transport P_i přes membránu je založen na elektrochemickém gradientu generovaném protonovými pumpami (Massonneau *et al.*, 2000).

Membránový potenciál tonoplastu na straně cytosolu je negativní. To naznačuje, že transport anorganických kationtů ven z vakuoly je možný, pouze pokud je energeticky

poháněn. Pro K^+ bylo charakterizováno několik kanálů. První kanál se nazývá pomalu aktivující se vakuolární kanál (SV kanál) (Hedrich *et al.*, 1986). Ten je pomalu aktivován Ca^{2+} ionty a kalmodulinem, a dále je modulován reverzibilní fosforylací (Bethke a Jones, 1997). Druhým kanálem je rychlý vakuolární kanál (FV kanál), který reguluje průchod iontů rychle v reakci na změně napětí na membráně (Hedrich a Neher, 1987; Allen a Sanders, 1997). Na rozdíl od SV kanálů je FV kanál inhibován vysokými koncentracemi Ca^{2+} . Třetím typem kanálů jsou VK kanály (Ward a Schroeder, 1994), které jsou nezávislé na napětí na membráně a jsou aktivní při nízkém pH cytosolu. VK byly popsány v tonoplastu vakuol svěracích buněk průduchů a předpokládá se, že by mohly umožňovat vylití K^+ při jejich uzavření. Také byl popsán K^+/H^+ antiportér. Pro transport Na^+ slouží Na^+/H^+ antiportér. Na^+ kationty propouští také SV kanály stejně jako Ca^{2+} ionty. Pro Ca^{2+} existuje v membráně vakuol Ca-ATPasa (Malmström *et al.*, 2000), vykazující vysokou afinitu k Ca^{2+} . Tyto pumpy se nevyskytují v tonoplastu centrální vakuoly, ale v menších vakuolách (Geisler *et al.*, 2000). Dále byla v membránách vakuol prokázána přítomnost Ca^{2+}/H^+ antiportéru (Schumaker a Sze, 1985) a dalších kanálů podílejících se na transportu Ca^{2+} přes tonoplast. Pro Mg^{2+} byla popsána přítomnost Mg^{2+}/H^+ antiportéru ve vakuolách *Hevea brasiliensis* (Amalou *et al.*, 1992) a tonoplastových vezikulách izolovaných z kořenů kukuřice (Pfeiffer a Hager, 1993).

Rostliny pro svůj život potřebují také těžké kovy, jako například Cu^{2+} nebo Zn^{2+} . Těžké kovy se v rostlině vyskytují v zastoupení jako mikroprvky, protože mohou být ve větším množství pro rostlinu toxické. Poté, co se těžké kovy dostanou do buňky, jsou nejčastěji akumulovány ve vakuole. V tonoplastu byla prokázána přítomnost Cd^{2+}/H^+ antiportéru (Salt a Wagner, 1993). Rostliny s těžkými kovy tvoří cheláty syntézou fytochelatinů, které mohou být do vakuol transportovány prostřednictvím ABC transporterů (Ortiz *et al.*, 1992). Cadmium může být také transportováno pomocí ABC transporterů v podobě komplexu bisglutathione-kadmium (Li *et al.*, 1997).

Pro akumulaci sekundárních metabolitů, jako jsou fenolové látky (Werner a Matile, 1985), glykosidy (Ratabou *et al.*, 1985) a anthokyany z mrkve (Hopp a Seitz, 1987), v lumen vakuol slouží přenašeče se sekundárním aktivním transportem. Řada z nich ovšem může být také transportována tonoplastem prostřednictvím ABC-transporterů aktivním přenosem přes membránu (Klein *et al.*, 2000). Do vakuoly se ukládají modifikované xenobiotika. Mnohé z nich jsou modifikovány a detoxifikovány reakcí s glutathionem

(Kreuz *et al.*, 1996). Právě takto modifikované xenobiotika jsou do vakuoly transportovány aktivním transportem (Martinoia *et al.*, 1993).

Ve vakuolách byla detekována RNAsová aktivita, přítomnost RNA oligonukleotidů a uridinu (Leinhos *et al.*, 1986; Abel *et al.*, 1990). Z toho je zřejmé, že musí existovat i transportní systém, který tyto komponenty transportuje přes tonoplast. Tuto funkci zastávají rovnovážné nukleosidové transportéry (ENTs). ENT1 z *Arabidopsis* exportuje nukleosidy z vakuoly po degradaci RNA (Bernard *et al.*, 2011). Rostlinné hormony jsou taktéž transportovány do vakuoly a to prostřednictvím různých transportérů specifických pro dané hormony. Pro transport auxinu přes tonoplast slouží transportéry WAT1. Studie prokázaly, že tento transportér exportuje auxiny z vakuoly ven (Ranocha *et al.*, 2013). Cytokininy jsou přes membránu transportovány transportéry patřícími do rodiny purinových permeas (PUP).

2.4.1 Mechanismus transportu proteinů do vakuol

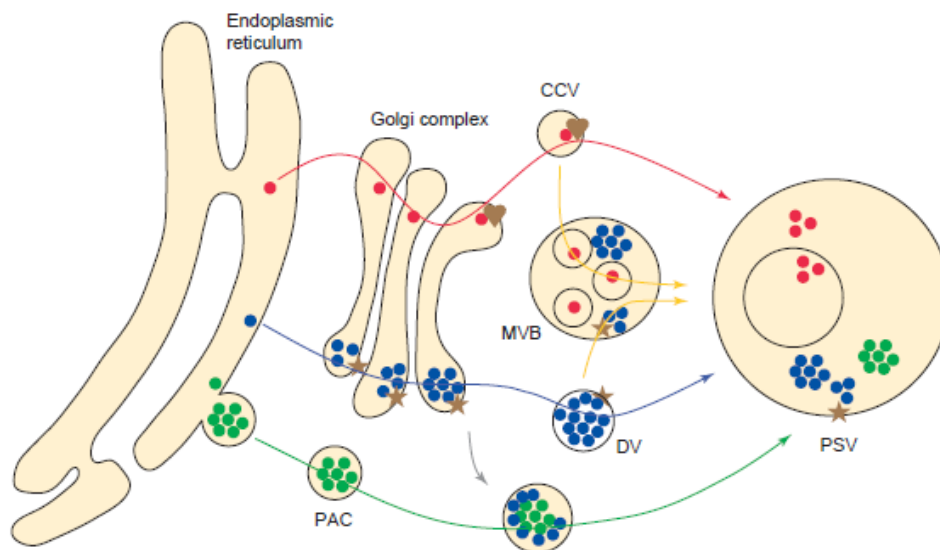
Proteiny, které obsahují vakuolární třídící determinanty, interagují se specifickými vakuolárními třídícími receptory (VSR) (Jiang a Roger, 2003), v membráně *trans*-Golgiho sítě (Rouillé *et al.*, 2000). VSRs jsou integrální membránové proteiny složené z transmembránové domény (TMD) a krátkého cytoplazmatického konce (CT) (Neuhaus a Rogers, 1998; Jiang a Rogers, 2003; Paris *et al.*, 1997). Všechny VSRs obsahují na N-konci doménu vážící náklad a epidermální růstový faktor (EGF) (Watanabe *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2000; Paris a Neuhaus, 2002). Doména vážící náklad je zodpovědná za třídění proteinů na konci Golgiho aparátu nebo v *trans*-Golgiho síti prostřednictvím specifické receptorové interakce (Cao *et al.*, 2000). TMD a CT jsou taktéž nezbytné pro zacílení proteinu do prevakuolárního kompartmentu (Jiang a Rogers, 1998; Tse *et al.*, 2004).

Do lytických vakuol a vakuol skladujících proteiny vedou oddělené vezikulární dráhy. Do lytických vakuol jsou rozpustné proteiny nesený vezikulami obalenými klathrinem (CCVs), které je nejprve vypustí do prevakuolárního oddílu (PVC) (Robinson *et al.*, 1998). Transport zásobních proteinů do PSV je zprostředkován pomocí minimálně tří různých intremediátových vezikul. Preferován je transport pomocí hladkých vezikul s elektronovou hustotou (DV), než pomocí CCVs (Hohl *et al.*, 1996), třetí možností jsou vezikuly akumulující prekurzory (PACs). PAC vezikuly přijímají agregáty proteinů semene přímo z ER a transportují je rovnou do PSV (Hara-Nishimura *et al.*, 1998). DVs mohou

transportovat agregáty proteinů semene z Golgiho aparátu taktéž přímo do PSV, nebo prostřednictvím PVC, tzv multivakuolární organely (obrázek 6).

Jako první VSR byl identifikován BP-80 v buňkách hrachu, který rozpoznává VSD NPIR motivu aleurainu z ječmene (Kirsch *et al.*, 1994; Paris *et al.*, 1997). Za použití světelné a elektronové imunomikroskopie byla prokázána jeho přítomnost v *trans*-Golgiho síti ve vegetativních (Sanderfoot *et al.*, 1998; Paris *et al.*, 1997) i zásobních buňkách (Hinz *et al.*, 1999) a PVC. V dalších experimentech byla jeho přítomnost prokázána v CCVs, ale ne v DVs (Hinz *et al.*, 1999), což naznačuje, že tento receptor je specifický pro transport rozpustných proteinů do lytických vakuol.

Pro transport proteinů do PSV byly identifikovány dva druhy receptorů: BP-80 typu receptory a receptory typu membránové RING-H2 domény (RMR). PV72 a PV82 jsou membránové proteiny BP-80 typu receptoru, které interagují s PAC vezikulami (Shimada *et al.*, 1997; Shimada *et al.*, 2002). Dalšími homology BP-80 jsou receptory VSR1 a VSR7 z *Arabidopsis thaliana* (Hanton a Brandizzi, 2006).



Obrázek 6: Model transportu proteinů do proteinových zásobních vakuol (PSV). CCV, vezikuly obalené klathrinem; MVB, multivakuolární organela; DV, vezikuly s elektronovou hustotou; PAC, komplex precursorových akumulacních vezikul; hnědé srdce představují BP-80 receptor; hnědé hvězdy představují RMR receptor; červeně dráha zprostředkovaná CCVs; modře dráha zprostředkovaná DVs tvořící agregáty, zeleně dráha nezávislá na Golgiho komplexu probíhající prostřednictvím PACs; šedě příjem DVs do PAC z Golgiho komplexu (převzato z Vitale a Hinz, 2005).

2.4.2 Signaling proteinů do tonoplastu

Zacílení proteinů do tonoplastu začíná po ko-translační translokaci v drsném ER (Bassham *et al.*, 2008). Pro transport transmembránových proteinů do tonoplastu byly popsány dvě dráhy: dráha závislá na Golgiho aparátu a dráha nezávislá na Golgiho aparátu. Doposud není jasné, zda jsou tyto rozdílné dráhy specifické druhově, nebo pro určité stádium vývoje nebo typ pletiva. Proteiny se zacílením do tonoplastu obsahují specifickou signální sekvenci, která může mít motiv založený na tyrosinu YXXØ, kde Ø je hydrofobní reziduum, nebo motiv založený na dileucinu (D/E)XXXL(L/I) (Bonifacino a Traub, 2003). Tyto motivy jsou platné taky pro zacílení do plazmatické membrány.

Aby mohl být do tonoplastu zacílen glukosový transportér ESL1 nebo transportéry peptidů a nitrátů (PTR, NRT1) musí na cytosolickém N-terminálním regionu taktéž nést cílicí sekvenci s dileucinovým motivem (Yamada *et al.*, 2010; Komarova, 2012). Ani u jednoho typu transportérů není tato sekvence striktně definována. Dileucinový motiv na svém N-konci nebo C- konci obsahují také vápníkový kanál TPC1, inositolový transportér INT1 a přenašeč molybdenanu MOT2, jež jsou určeny k lokalizaci do tonoplastu. V případě mutagenese leucinu nebo isoleucinu na alanin dojde k translokaci proteinů do plazmatické membrány (Larisch, 2012; Wolfenstetter, 2012; Gasber, 2011) a v případě ESL1 do vezikul (Yamada *et al.*, 2010). Signální sekvence na bázi dileucinového nebo tyrosinového motivu nemusí být přítomna u všech proteinů s lokalizací do tonoplastu. Takovou výjimkou je například transportér sacharosy SUC4, který tyto motivy nemá a přesto je do tonoplastu zacílen. Tato skutečnost naznačuje, že musí existovat další druh signálu, který je rozpoznáván. Naopak inositolový transportér INT4 má na svém hydrofilním C-konci motiv EVEKLL, ale lokalizován je do plazmatické membrány (Wolfenstetter, 2012). Přehled proteinů lokalizovaných do tonoplastu s jejich signálními sekvencemi je přehledně shrnut v tabulce 1.

Zajímavé výsledky přineslo studium translokace β -fruktosidasy 4 z *Arabidopsis*. Transport tohoto proteinu z TGN do MVB a následně do tonoplastu závisí na přítomnosti motivu YTRL a EEE, zatímco transport prostřednictvím vezikul probíhá při přítomnosti motivů DALL a PL. Bylo prokázáno, že mechanismus transportu proteinů do tonoplastu je řízený přítomností více sekvenčních motivů na jednom cytoplazmatickém regionu (Jung, 2011).

Tabulka 1: Přehled proteinů a jejich signálních sekvencí cílící tyto proteiny do tonoplastu (Pedrazzini, 2013).

Protein	Sekvence
ESL1	LEAGLLL
PTR2	EEEAPRLI
PTR4	DEERSLL
PTR6	DVEESLL
TPC1	MEDPLI
INT1	NMEGLLE
MOT2	METTTTPLL
β Fruc4	YTRL

2.5 Cytokininy

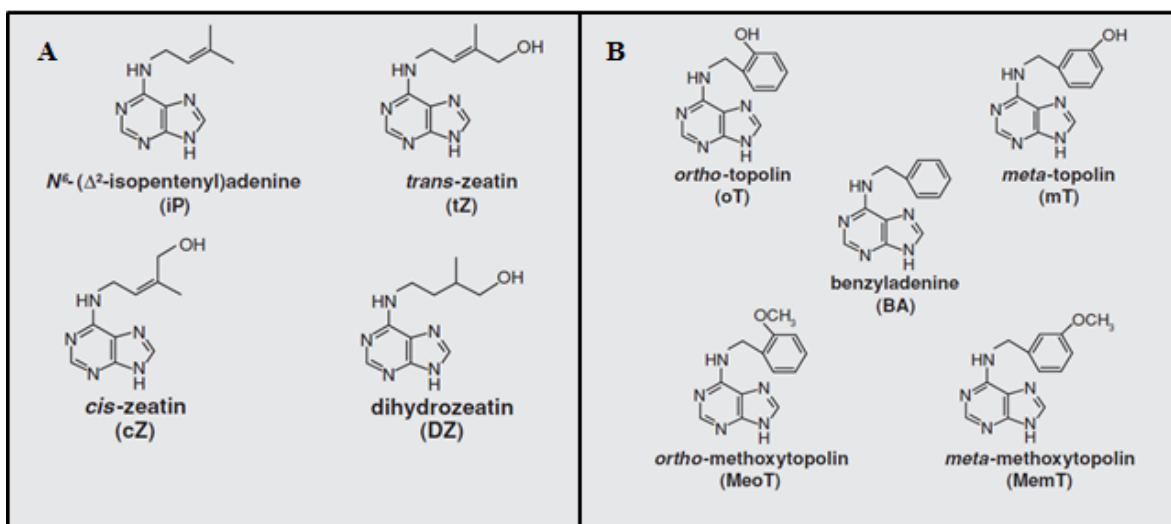
Cytokininy jsou rostlinné hormony významně ovlivňující růst rostliny, diferenciaci buněk, iniciaci meristemických pletiv, vývoj semene, růst kořenů a postranních kořenů, oddálení senescence a toleranci rostliny vůči stresu (Sakakibara, 2006).

Po chemické stránce se jedná o N^6 substituované deriváty adeninu. Charakter postranního řetězce určuje, zda se jedná o cytokininy isoprenoidní nebo aromatické (Mok, 2001) (obrázek 7).

Častým přirozeně se vyskytujícím isoprenoidním cytokininem je N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenin (iP), který se řadí mezi isoprenoidní cytokininy isopentenyladeninového typu. Dále se v přírodě vyskytují cytokininy zeatinového typu jako například *trans*-zeatin (tZ), *cis*-zeatin (cZ) nebo dihydrozeatin (DZ). *Trans* a *cis* zeatin jsou dva izomery lišící se v poloze hydroxylované methylové skupiny (Sakakibara, 2006).

Aromatické cytokininy mají na postranním řetězci aromatické jádro. Mezi typické představitele této skupiny patří benzyladenin (BA), funkční izomery topolinu a jejich methoxy-deriváty (Strnad 1997).

Protože cytokininy v rostlinách zastávají řadu důležitých funkcí, jejich hladina musí být důkladně regulována a to hned několika způsoby: *de novo* biosyntézou, konverzí mezi volnými bázemi, nukleotidy a nukleosidy, inaktivací nebo degradací (Spíchal, 2012).



Obrázek 7: Strukturální vzorce hlavních představitelů přirozeně se vyskytujících aktivních isoprenoidních (A) a aromatických (B) cytokininů (převzato ze Sakakibara, 2006 a upraveno).

2.5.1 Lokalizace metabolismu cytokininů na úrovni buňky v *Arabidopsis thaliana*

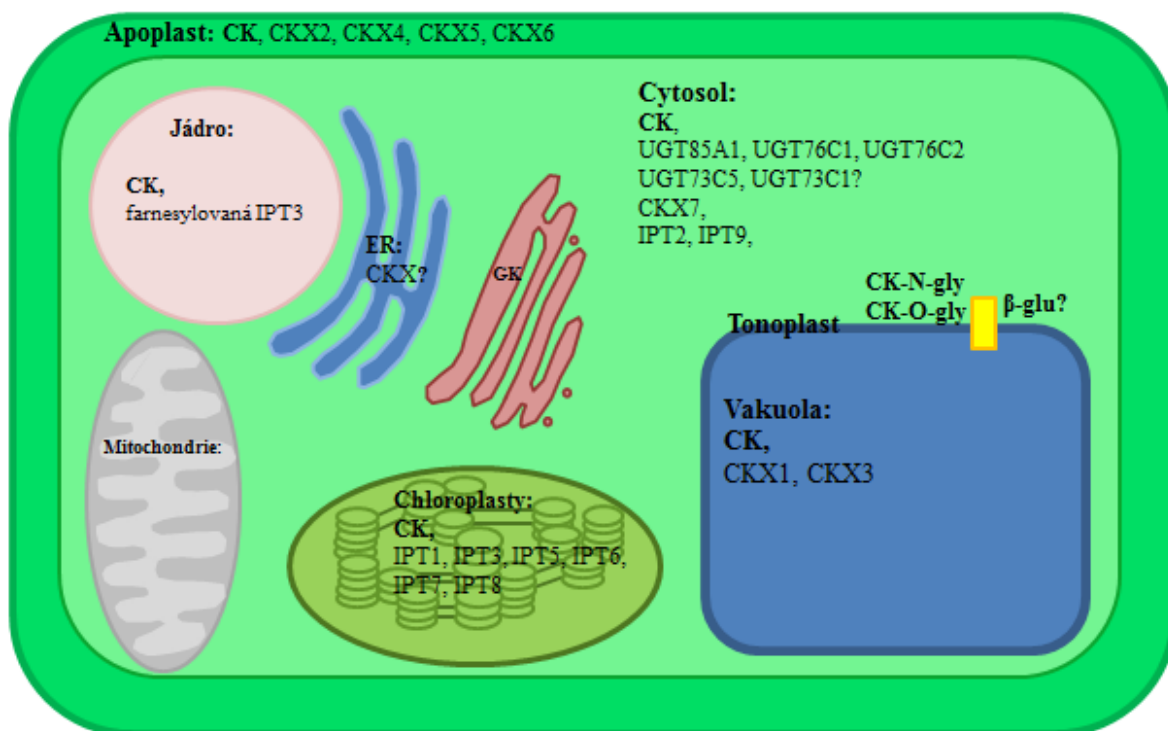
Hladina cytokininů v rostlině je důkladně regulována enzymy jejich metabolismu. Mezi nejvýznamější patří enzymy katalyzující jejich degradaci: cytokinin dehydrogenasa/oxidasa (CKX, EC 1.5.99.12), biosyntézu: isopentenyltransferasy (IPTs, EC 2.5.1.112) a inaktivaci: UDP-glykosyltransferasy (UGTs, EC 2.4.1.203).

Jedním z klíčových enzymů metabolismu cytokininů je CKX, která katalyzuje nevratné odštěpení N^6 - postranního řetězce cytokininů (Paces *et al.*, 1971). Jednotlivé isoformy jsou specifické vůči různým substrátům zahrnující volné báze, ribosidy isoprenoidních cytokininů (Šmečilová *et al.*, 2009), CK 9-glukosidy a nukleotidy (Galuszka *et al.*, 2007). CKX degraduje taktéž aromatické cytokininy, ovšem s menší rychlostí reakce (Frébortová *et al.*, 2004). V *Arabidopsis* se vyskytuje sedm isoform CKX (CKX1 až 7), které se liší v lokalizaci na úrovni buňky. CKX7 je jako jediná lokalizována v cytosolu (Köllmer *et al.*, 2014), v apoplastu se vyskytují CKX2 (Werner *et al.*, 2003), a nejpravděpodobněji i CKX4, CKX5 a CKX6 (hodnoceny predikčními softwary s mnohem vyšší hodnověrností než v cytosolu potvrzená CKX2; Werner *et al.*, 2003). Do vakuoly jsou lokalizovány CKX1 a CKX3 (Werner, 2003). Všechny sekretované CKX jsou posttranskripčně modifikovány glykosylací (Galuszka *et al.*, 2008), což zajišťuje translokaci enzymu, zvyšuje jeho stabilitu a aktivitu (Schmülling *et al.*, 2003).

Isopentenyltransferasy se dělí na ATP/ADP-IPT a tRNA-IPT podle jejich substrátu. ATP/ADP-IPTs katalyzují *N*-prenylaci adenosin 5'-fosfátu (ATP, ADP a AMP). Donory isoprenoidního řetězce jsou dimethylallyl pyrofosfát (DMAPP) nebo 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-difosfát (HMBDP) (Sakakibara *et al.*, 2005). Preferovaným donorem je DMAPP a preferovaným akceptorem je ATP a ADP. Proto primárními produkty syntézy jsou isopentenyladenosin-5'-trifosfát nebo isopentenyladenosin-5'-difosfát (Kakimoto, 2003). V *Arabidopsis* se také vyskytují dvě tRNA-IPTs (IPT2 a IPT9) lokalizované v cytosolu a jsou zodpovědné za syntézu *cis*-zeatinu (Miyawaki, 2006). Genom *Arabidopsis* obsahuje geny celkem pro sedm IPTs (Kakimoto, 2001) s rozdílnou subcelulární lokalizací. Pět z nich je lokalizováno do plastidů. IPT3 může být farnesylována a pomocí této modifikace zacílena do cytoplasmy a jádra (Galichet *et al.*, 2008). IPT4 se vyskytuje v cytosolu. (Kasahara *et al.*, 2004).

Cytokininy mohou být vratně nebo nevratně inaktivovány UDP-glykosyltransferasami (UGTs), které katalyzují přenos sacharidu na cytokinin. V *Arabidopsis* se vyskytuje pět cytokinin-specifických UGTs: UGT76C1, UGT76C2, UGT85A1, UGT73C1 a UGT73C5. Doposud byla u všech kromě UGT73C1 ověřena lokalizace do cytosolu (Bowles *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2013; Husar *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Dobrušková, 2014).

Subcelulární lokalizace klíčových enzymů metabolismu cytokininů je schématicky naznačen na obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma rostlinné buňky zobrazující subcelulární lokalizaci klíčových enzymů regulace homeostasy cytokininů; CKX, cytokinin dehydrogenasa/oxidasa; IPT, isopentenyltransferasa; UGT, UDP-glykosyltransferasa. CK – cytokininy, CK-N-gly – inaktivní cytokininové konjugáty cukernou skupinou, CK-O-gly - inaktivované CK-O-glykosidy s možností zpětné aktivace pomocí β -GLU, β -glukosidasy (Brzobohatý et al., 1993).

2.5.2 Predikce buněčné lokalizace *in silico*

Predikční softwary umožňují předpovědět na základě rozboru aminokyselinové sekvence signálního peptidu a jeho polohy na proteinu, jaká je cílová destinace proteinu. Pro tyto účely bylo vyvinuto mnoho softwarů, např.: TargetP, ProtComp, SignalP, ChloroP, WoLF PSORT, iPSORT. Všechny tyto softwary ale mají omezenou schopnost rozlišit mezi signální sekvencí a N-koncovými transmembránovými šroubovicemi. Z toho plynou následné chyby při predikcích (Petersen *et al.*, 2011).

SignalP 4.1 předpovídá přítomnost a lokaci štěpícího místa signální sekvence na aminokyselinové sekvenci z mnoha organismů: z gram-pozitivních i gram-negativních prokaryot a eukaryot. Grafickým výstupem (obrázek 9) tohoto softwaru je vyhodnocení tří různých parametrů; C-score poskytující informaci o prvotním štěpícím místě, S-score poskytující informaci o poloze signální sekvence, a Y-score což je geometrický průměr C-

score a S-score umožňující lepší předpovězení polohy štěpícího místa (Petersen *et al.*, 2011).

Software TargetP určuje subcelární lokalizaci na základě stanovení přítomnosti N-terminální třídící sekvence: cTP, mTP nebo SP (Emanuelsson *et al.*, 2007). Stejně zaměřením má software iPSORT (Bannai *et al.*, 2002). Software ProtComp využívá k predikci subcelulární lokalizace přímé porovnání sekvence s homologními proteiny s již známou lokalizací (Klee a Ellis, 2005). Software ChloroP se zabývá pouze predikcí přítomnosti cTP (Emanuelsson *et al.*, 1999). Dalším softwarem pro určení lokalizace proteinu na úrovni buňky je WoLF PSORT, který na základě třídících signálů, složení AMK sekvence a funkčních motivů převádí AMK sekvenci na číselnou funkci lokalizace (Horton *et al.*, 2006).

2.5.3 Inaktivace cytokininů glykosyltransferasami

Cytokininy mohou být v rostlinách přítomny ve formě volných bází jako aktivní forma, příslušných nukleosidů nebo nukleotidů (Mok a Mok, 2001). Dále mohou být cytokininy modifikovány na N^6 -postranním řetězci, což může výrazně ovlivňovat jejich aktivitu (Skoog a Armstrong, 1970). Jednou z takových modifikací je glykosylace postranního řetězce.

Glykosylace je děj, při kterém dochází ke kovalentnímu navázání oligosacharidového zbytku na organickou molekulu. Účastní se ho enzymy glykosyltransferasy, které přenášejí sacharid z aktivovaného sacharidového donoru na akceptorovou molekulu. Pokud jsou cytokininy glykosylovány, dochází k jejich inaktivaci, tedy ke ztrátě biologické aktivity.

Glykosyltransferasy patří do multigenové rodiny, která je doposud rozdělena na 97 rodin (červen 2015; http://www.cazy.org/fam/acc_GT.html) na základě sekvenční podobnosti, stechiometrie vytvořené glykosidové vazby a specifčnosti k substrátu (Campbell *et al.*, 1997). Rodina 1 zahrnuje uridindifosfát (UDP) glykosyltransferasy (Mackenzie *et al.*, 1997), které byly objeveny v rostlinách, živočiších, houbách, bakteriích a také virech (Cambell *et al.*, 1997). Tyto glykosyltrasferasy charakterizuje užití UDP-aktivovaných sacharidových molekul jako donory. Blízko C-konce obsahují UGT-definující sekvenční motiv (Mackenzie *et al.*, 1997). Tyto glykosyltransferasy se podílejí na glykosylaci rostlinných metabolitů, jako jsou například rostlinné hormony auxiny,

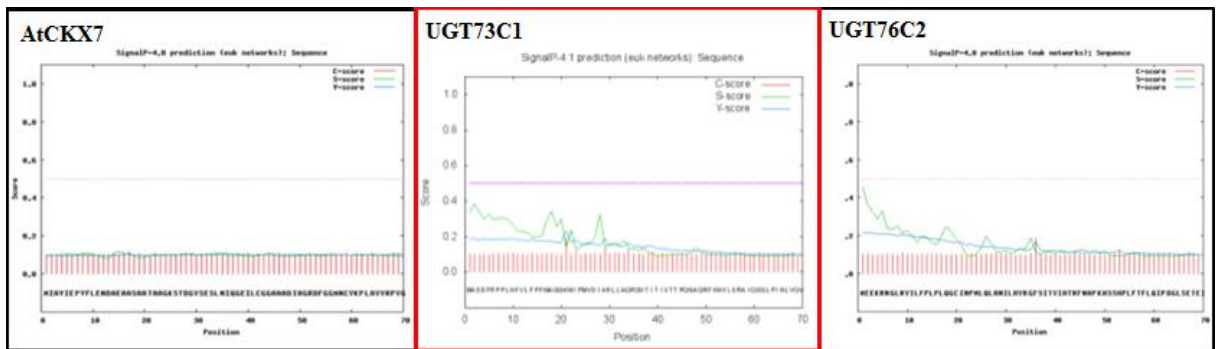
cytokininy, brasinosteroidy, kyseliny abscisové nebo kyseliny salicylové (Bowles *et al.*, 2006).

Sekvenční analýza odhalila v genomu *Arabidopsis thaliana* přítomnost 107 UGTs (Li *et al.*, 2001). Pět z těchto UGT projevila specifitu vůči cytokininům (Hou *et al.*, 2004) a všechny využívají jako donor UDP-glukosu. Jedná se o UGT76C1 a UGT76C2, které mají N-glykosyltransferasovou aktivitu. Glykosylace může proběhnout v pozici N³, N⁶ nebo N⁹ na purinovém kruhu. A dále jsou to UGT85A1, UGT73C5 a UGT73C1 vykazující O-glukosyltransferasovou aktivitu připojující sacharid na hydroxylovou skupinu cytokininů zeatinového typu (Poppenberger *et al.*, 2005). O-glukosylace je děj reverzibilní a aktivita může být cytokinům navracena β-glukosidasou (EC 3.2.1.21). Proto jsou O-glukosidy považovány za zásobní neaktivní formu hormonů. Oproti tomu N-glukosidy jsou vůči β-glukosidase rezistentní a jejich inaktivace je nevratná (Brzobohatý *et al.*, 1993).

2.5.4 UGT73C1 a predikce její lokalizace

Společně s UGT73C5 se tato glykosyltransferasa vyvinula z větve UGTs rozpoznávající množství metabolitů (Bowles *et al.*, 2006). UGT73C1 patří do skupiny cytokinin specifických UGTs a je schopna cytokininy inaktivovat prostřednictvím tvorby jejich O-glukosidů. Konkrétně katalyzuje glukosylaci OH skupiny na N⁶-postranním řetězci *trans*-zeatinu a dihydrozyeatinu (Hou, 2004).

Doposud není známá buněčná lokalizace UGT73C1 a i když byla předpovězena jako protein obsahující signální peptid, je možné, že vzhledem k podobnosti predikce s UGT76C2 (obrázek 9) je protein rovněž cytoplasmatický (Dobrušková, 2014).



Obrázek 9: Grafické výstupy z predikčního softwaru buněčné lokalizace SignalP. Protein AtCKX7 jako vzorová sekvence postrádající jakýkoli signál s již potvrzenou lokalizací v cytosolu (Köllmer *et al.*, 2014), predikce pro UGT73C1 a UGT76C2 rovněž potvrzený v cytosolu (Dobrušková *et al.*, 2014).

2.5.5 Long-term a short-term transport cytokininů

Syntéza cytokininů probíhá hlavně v meristematickém pletivu v kořenech (Miyawaki *et al.*, 2004). Odtud musí být cytokininy transportovány do místa působení (Sakakibara, 2005) nebo mohou vykonávat svou funkci přímo v místě syntézy (parakrinní hormony) (Faiss *et al.*, 1997). Přesto, že je dobře popsán polární transport dalších rostlinných hormonů auxinu, u cytokininů přesný mechanismus není znám (Swarup *et al.*, 2000). Důležitou roli hraje i difuze, což bylo ověřeno v buněčných kulturách *Arabidopsis* (Cedzich *et al.*, 2008).

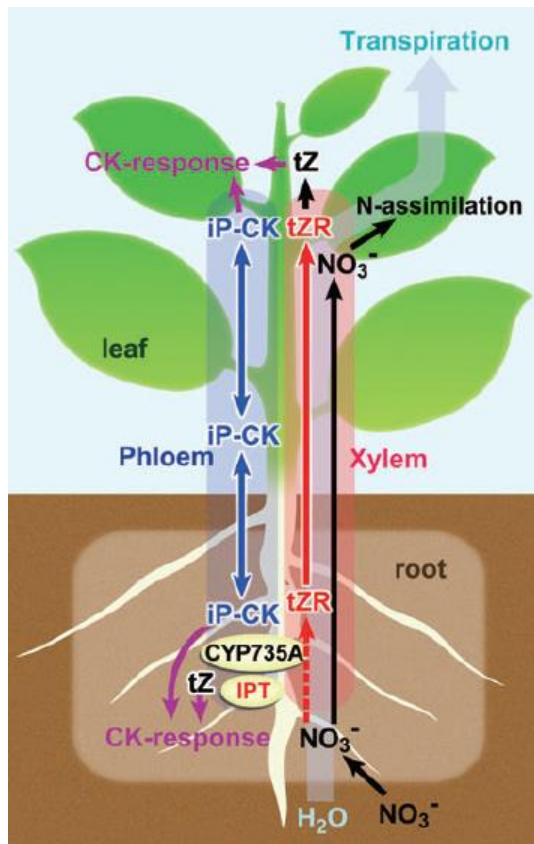
Vzhledem k důležitosti cytokininů pro rozvoj a růst musí mít vyšší rostliny vyvinuty transportní systémy pro import a export cytokininů přes plazmatickou membránu (Cedzich *et al.*, 2008; Hirose *et al.*, 2008). Pro transport cytokininů na dlouhé vzdálenosti (z kořene do vzrostných vrcholů a jiných pletiv) byly identifikovány dva typy transportérů, purinové permeasy (PUP) a rovnovážné nukleosidové transportéry (ENT), které jsou zodpovědné za transport cytokininů floémem (Bürkle *et al.*, 2003; Gillissen *et al.*, 2000). Pro transport cytokininů xylémem byl poměrně nedávno objeven ABC transportér G14 (AtABCG14) (Ko *et al.*, 2014). Cytokininy jsou z kořenů to nadzemních částí rostlin transportovány právě xylémem (Kudo *et al.*, 2010), a byla prokázána klíčová úloha AtABCG14 při nakládání cytokininů do xylému. Experimentální výsledky prokázaly, že translokace cytokininů prostřednictvím AtABCG14 má velký vliv na vývoj výhonků a koordinovaný růst rostliny (Ko *et al.*, 2014). Kromě transportu xylémem musí být cytokininy také naloženy do floému. S největší pravděpodobností je tento děj zajištěn prostřednictvím PUPs a ENTs (Hirose *et al.*, 2005).

ENT patří do rodiny integrálních membránových proteinů. V *Arabidopsis* byly zkoumány ENT3, ENT4, ENT6 a ENT7. Všechny mají širokou substrátovou specifitu a jsou schopné transportovat jak purinové nukleosidy adenosin a guanosin, tak pyrimidinové nukleosidy cytidin a uridin (Möhlmann *et al.*, 2001; Wormit *et al.*, 2004).

Purinové permeasy (PUPs) patří do rodiny malých hydrofobních membránových proteinů. V *Arabidopsis* se nachází 21 proteinů typu PUP, které mají 9-10 transmembránových helixů (Schwacke *et al.*, 2003). Charakterizovány z biochemického hlediska byly pouze PUP1, PUP2 a PUP3 z *Arabidopsis*, a dále také jejich homolog z tabáku NUP1. AtPUP1 a AtPUP2 jsou schopny transportovat adenin, *trans*-zeatin, *cis*-zeatin, isopentenyadenin a pyridoxin (Gillissen *et al.*, 2000; Bürkle *et al.*, 2003). Výsledky ukazují, že transport funguje na mechanismu substrát/H⁺ symportéru. Oproti tomu pro AtPUP3 zatím nebyly objeveny žádné substráty.

Studium AtPUP1 a AtPUP2 v kvasinkách prokázalo, že tyto transportéry přepravují přes PM *trans*-zeatin a isopentenyadenin (Bürkle *et al.*, 2003). Studium mutantů se ztrátou funkce a se zvýšenou funkčností PUPs u rostlin zatím nebyl publikován. ENT3, ENT6, ENT7 z *Arabidopsis thaliana* a ENT2 z rýže mohou přes PM transportovat isopentenyadenin ribosid (iPR) a *trans*zeatin ribosid (*tZR*) (Hirose *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2008). Dosavadní výsledky tedy ukazují, že ENT transportéry přenášejí ribosidy příslušných cytokininů. Tato hypotéza ovšem nebyla prokázána experimentálně.

Nadzemní část rostlin je závislá na transportu cytokininů z kořene pomocí transpiračního proudu v xylému (Letham a Palni, 1983; Horgan, 1992). Zpětný tok cytokininů je pak zajištěn floémem. Translokace cytokininů v rostlině byla sledována pomocí radioaktivního značení. V míze xylému se vyskytoval hlavně *tZR* a ve floému iPR (Hirose *et al.*, 2008). Proto se dá předpokládat, že rostliny využívají *tZR* jako akropetální posly a cytokininy iP-typu jako bazipetální posly (obrázek 10).



Obrázek 10: Model pro transport cytokininů na dlouhé vzdálenosti do nadzemních částí rostlin xylémem (červeně) a zpět do kořenů floémem (modře). *tZR*, transzeatin ribosid; *tZ*, transzeatin; *iP-CK*, cytokininy insopentenyladeninového typu; *AtIPT3*, gen pro biosyntézu cytokininů; *CYP73A5*, cytokinin *transhydroxylasa* (EC 1.14.13.11). Nitrát indukce expresi *AtIPT3* (Takei *et al.* 2004b), dojde ke zvýšené regulaci cytokininů v xylému, *CYP735A1* a *CYP735A2* jsou zapojeny v biosyntéze *tZR*. Xylémové proteiny jsou transportovány akropetálně transpiračním proudem, floémové proteiny podléhají bazipetálnímu transportu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál a enzymy

Agrobacterium rhizogenes kmen 15834

dNTP Mix firmy Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

GeneRuller™ 1 kb DNA ladder firmy Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

GeneRuller™ 1 kb plus DNA ladder firmy Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Chemicky kompetentní *E. coli* DH5α (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Chemicky kompetentní *E. coli* TOP10

Pufr 10x CutSmart (New England BioLabs, MA, USA)

Pufr 10x EcoRI (New England BioLabs, MA, USA)

Pufr 10x pro T4 DNA ligasu firmy Life Technologies (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Restrikční endonukleasa *EcoRI* (New England BioLabs, MA, USA)

Restrikční endonukleasa *EcoRI*-HF (New England BioLabs, MA, USA)

Restrikční endonukleasa *PacI* (New England BioLabs, MA, USA) RNasa A firmy Qiagen (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Semena *Solanum lycopersicum* L., Peto 343

Transformované bakterie *Escherichia coli* s vektorem AKK1436::pSU::*UGT73C1-GFP* (obrázek 11) (Příprava viz Dobrušková, 2014)

T4 DNA ligasa firmy Life Technologies (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

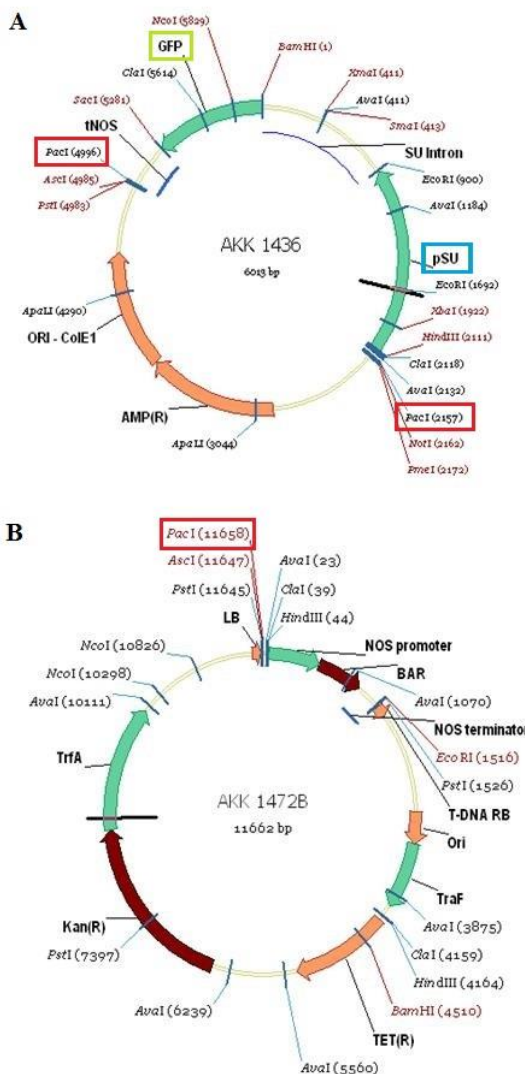
Transformované bakterie *E. coli* s vektorem AKK1472B (obrázek 11)

Taq DNA polymerasa a 10x PCR pufr (Šmečilová, 2004)

Pro účely této bakalářské práce byly použity 3 různé genotypy *Agrobacterium rhizogenes*: tzv. wild type, sloužící jako negativní kontrola, AKK1472B::*GFP* nesoucí binární vektor s genem *GFP* bez signální sekvence a sloužící jako pozitivní kontrola, a AKK1472B::vac:*GFP* nesoucí binární vektor s genem *GFP* se signální sekvencí cílící tento

protein do vakuoly. Vakuolární signální sekvence je původem z *Phaseolus vulgaris* (Frigerio, 1998) a má linkerovou sekvenci pro proricin z *Ricinus communis* (Frigerio, 2001). Vektor AKK1472B::*vac:GFP* byl připraven Dr. Šmežilovou , jednotlivé konstrukty *A. rhizogenes* pak metodami transformování připravila Mgr. Dobrušková.

Vektor AKK1436::*UGT73C1:GFP* byl připraven Dr. Šmežilovou vnesením genu *UGT73C1* skrze *Bam*HI místa.



Obrázek 11: (A) vektor AKK1436, (B) vektor AKK1472B, v zeleném rámečku je zvýrazněn gen *GFP*, který je ve vektoru AKK1436 vyznačen také zelenou šipkou, v modrém rámečku vyznačen superubikvitinovým promotorem, červenými rámečky jsou zvýrazněny restrikční místa pro restrikční endonukleasu *Pac*I.

3.1.2 Primery

rolA2_fw 5'-ACGGTGAGTGTGGTTGTAGG-3'
rolA2_rev 5'-GCCACGTGCGTATTAATCCC-3'
gfp_fw 5'-GAATTAGATGGTGATGTTAATGG-3'
gfp_rev 5'-CCATGCCATGTGTAATCCC-3'

Lyofilizované primery firem Metabion (Martinstried, Německo) a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) byly rozpuštěny v Nuclease-Free vodě podle doporučení výrobce pro získání výsledné koncentrace 100 mmol/l. Takto připravené primery pro PCR bylo pak nutné do reakční směsi naředit 10x pro získání koncentrace 10 mmol/l.

3.1.3 Chemikálie

Acetosyringon (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Agar pro bakterie (Himedia, Bombaj, Indie)
Agar pro rostliny (Merck, Praha, Česká Republika)
Agarosa (Amresco, Solon, OH, USA)
Agarosa pro klonování (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Bromfenolová modř (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Biotin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
DMSO (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Dodecylsírán sodný (Penta, Chrudim, Česká Republika)
Ethanol (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Ethidium bromid (NeoLab, Heidelberg, Německo)
Ethylendiamintetraoctová kyselina (Penta, Chrudim, Česká Republika)
Fosfinotricin (Wako, Osaka, Japonsko)
Gamborg's B-5 basal medium with minimal organics (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Gamborg's B-5 vitamíny 1000x (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Glukosa (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Glycerol (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Heptahydrát síranu hořečnatého (Penta, Chrudim, Česká Republika)

Hexahydrát síranu hořečnatého (Pancreac, Barcelona, Španělsko)
Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Hydroxid draselný (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, Česká Republika)
Chlorid draselný (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Chlorid hořečnatý (Promega, WI, USA)
Chlorid sodný (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Chlornan sodný (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Isopropanol (MACH Chemikálie, Ostrava-Hrušov, Česká Republika)
Kanamycin monosulfát (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Kvasničný extrakt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Kyselina L-glutamová (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Kyselina octová (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Mannitol (Penta, Chrudim, Česká Republika)
MS médium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Octan draselný (Penta, Chrudim, Česká Republika)
Polyethylenglykol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Sacharosa (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Síran hořečnatý (Penta, Chrudim, Česká Republika)
Timentin (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Trans-zeatin (Olchemim, Olomouc, Česká Republika)
Tris (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
TritonTM X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Trypton (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Xylencyanolová FF modř (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.1.4 Média a roztoky

½ MSO agar:

0,23% (w/v) MS basal salt mix, 3% (w/v) sacharosa, 0,8% (w/v) agar pro rostliny, 1x roztok Gamborg's B-5 vitamínů; pH = 5,8

0,8% (w/v) agarosový gel pro klonování:

0,8 g agarosa pro klonování, 100 ml 1x TAE pufr

1% (w/v) agarosový gel:

1 g agarosa, 100 ml 1x TAE pufr

10x PCR pufr:

100mM Tris/HCl, 500mM KCl, 20mM MgCl₂·6H₂O, 0,1% (v/v) Triton™ X-100;
pH = 9,0

D1 agar:

0,43% (w/v) MS basal salt mix, 3% (w/v) D-glukosa, 0,8% (w/v) agar pro rostliny, 1x roztok Gamborg's B-5 vitamínů, 1 mg/ml *trans*-zeatin; pH = 5,8

DNA-loading pufr:

0,05% (w/v) bromfenolová modř, 0,05% (w/v) xylycyanol FF modř, 1% (w/v) SDS, 25% (v/v) glycerol

Gamborg's B-5 agar:

0,32% (w/v) Gamborg's B-5 basal medium with minimal organics, 2% (w/v) sacharosa, 0,8% (w/v) agar pro rostliny, 1x roztok Gamborg's B-5 vitamínů; pH = 5,7

Gamborg's B-5 agar s timentimem:

Gamborg's B-5 agar, 1x roztok timentinu

LB agar:

1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) agar pro bakterie; pH 7,0

LB médium:

1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl; pH 7,0

MGL agar:

0,25% (w/v) kvasničný extrakt, 0,5% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) NaCl, 0,1% (w/v) L-glutamová kyselina, 0,5% (w/v) manitol, 0,026% (w/v) K₂HPO₄, 0,01% (w/v) MgSO₄·7H₂O, 1/1000% (w/v) biotin, 1,5% (w/v) agar pro kultivaci bakterií; pH = 7,0

MGL médium:

0,25% (w/v) kvasničný extrakt, 0,5% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) NaCl, 0,1% (w/v) L-glutamová kyselina, 0,5% (w/v) manitol, 0,026% (w/v) K₂HPO₄, 0,01% (w/v) MgSO₄·7H₂O, 1/1000% (w/v) biotin; pH = 7,0

MSO médium:

0,43% (w/v) MS basal salt mix, 3% (w/v) sacharosa, 1x roztok Gamborg's B-5 vitamínů;
pH = 5,8

Roztok P1:

50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA; pH = 8,0, 0,1 mg/ml RNasa A

Roztok P2:

0,2 M NaOH, 1% SDS

Roztok P3:

3 M octan draselný; pH = 5,5

S.O.C. médium:

2 % trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 10 mM NaCl, 20 mM Mg²⁺ (10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄), 20 mM glukosa

Timentin (1000x):

0,23 g/ml ticarcillin disodium, 7,7 mg/ml clavulanate potassium

TAE pufr:

70mM Tris/CH₃COOH, 1mM EDTA; pH = 8,0

Připravená média byla po úpravě pH autoklávována pro jejich sterilizaci po dobu 30 min. při 120°C. Termolabilní složky byly do médií přidávány až po ochlazení na 60°C, aby nedošlo k jejich denaturaci. Pevná média byla nalévána do jednorázových Petriho misek o průměru 10 cm a po ztuhnutí uchovávána v lednici při 4°C dnem vzhůru.

3.1.5 Kity

Kit Wizard® SV gel and PCR clean-up system: (Promega, WI, USA)

3.1.6 Přístrojové vybavení

Analytické váhy 5034/120 (Nahita-Auxilab, Berian, Španělsko)

Automatické pipety Eppendorf (Hamburk, Německo)

Centrifuga HeraeusTM 40R (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Digitální váhy PFB (Kern & Sohn, GmbH, Balingen, Německo)

Dokumentační systém Gel DocTM EZ s programem Image LabTM verze 5.1 build 8 (Bio-Rad, Kalifornie, USA)

Elektroforetická komůrka Agagel Standart (Biometra, Goettingen, Německo)
Elektromagnetická míchačka RH basic 2 IKAMAG ® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
Flowbox Polaris 72 (Adaye Danesh Afarin – ADACo, Teherán, Irán)
Flowbox SCS 2-6118 (Merci s.r.o., Brno, Česká Republika)
Fluorescenční mikroskop SMZ800, Nikon (Tokyo, Japonsko) s vysokotlakou výbojkou HBO-100W/2 (Osram, Mnichov, Německo) a fotoaparátem DS-Fil (Nikon, Tokyo, Japonsko)
Fytokomora E-41L2 (Perry, IA, USA)
Inkubátor Incubat 85 (Melag, Berlin, Německo)
Inkubátor SI-900R (Jeia Tech, Soul, Korea)
Konfokální mikroskop Zeiss LSM710 s přídatným piezzo-stolkem (Zeiss, Oberkochen, Německo), Zeiss ZEN software
Mikroobjemový UV/VIS spektrofotometr NuDrop (ACTgene Piscataway, NJ, USA)
Parní autokláv Sterivap HP IL (BMT Medical Technology s.r.o. Brno, Česká Republika)
pH metr 3503 Bench (Jenway – Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK)
Termocykler T-Gradient (Biometra, Goettingen, Německo)
Termoblok CHB-202 (Alpha Laboratories Ltd., Eastleigh, Hampshire, UK)
Transiluminátor UVT-20S (Herolab, Wieslach, Německo)
Vortex VSM-3 (Shelton Scientific, Shelton, CT, USA)
Zdroj napětí pro elektroforézu MS300V (Major Science, Saratoga, CA, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace bakterií

Pro zachování sterility byly všechny kultury inokulovány do médií a rozetřeny na misky v laminárním boxu. Kultury *E. coli* byly kultivovány na LB agaru nebo v tekutém LB médiu pod selekčním tlakem kanamycinu 100 mg/l a inkubovány přes noc při 37°C. Kultury *E. coli* v tekutém LB médiu byly navíc umístěny na třepačku při 180 rpm. Kultury *A. rhizogenes* byly kultivovány na MGL agaru nebo v tekutém MGL médiu pod selekčním tlakem kanamycinu 100 mg/l při 28°C, v tekutém médiu navíc při 250 rpm.

3.2.2 Klonování

3.2.2.1 Izolace plasmidové DNA

1,5 ml kultury *E. coli* nesoucí plasmid AKK1436::*UGT73C1-GFP* nebo nesoucí plasmid AKK1472B, která byla inkubována přes noc při 37°C za stálého třepání 180 rpm, bylo přeneseno do mikrozkuřavky a centrifugováno při 5000 g 2 minuty. Supernatant byl odlit a k buněčnému peletu bylo přidáno 0,3 ml roztoku P1. Pelet byl resuspendován v tomto roztoku pomocí vortexu. Následně bylo přidáno 0,3 ml roztoku P2 způsobujícího lýzi buněk. Roztok byl několikerým převrácením zkuřavky promíchán a 5 minut ponechán v klidu při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 0,3 ml neutralizujícího roztoku P3 a směs byla promíchána opět několikerým převrácením a ponechána 5 minut v klidu na ledě. Směs byla centrifugována 10 minut při 12000 g a supernatant byl přelit do nových mikrozkuřavek. K supernatantu bylo přidáno 0,6 ml 100% isopropanolu a směs byla centrifugována 10 minut při 12000 g. Vzniklý supernatant byl odlit a na dně mikrozkuřavky již bylo možné pozorovat pelet plasmidové DNA, která musela být promyta 0,5 ml 70% ethanolu vychlazeného na -20°C a směs byla centrifugována 5 minut při 12000 g. Supernatant byl odlit, jeho zbytky byly odstředěny na dno mikrozkuřavky a důkladně odpipetovány a takto vyizolovaná plasmidová DNA byla 30 minut ponechána ve flowboxu, aby se vysušila. Pelety byly pipetováním opatrně resuspendovány v 0,04 ml Nuclease-free vodě a takto mohly být uchovány při -20°C.

Takto izolovaná plasmidová DNA byla následně použita pro restrikci za účelem zaklonování genu *UGT73C1-GFP* do cílového vektoru AKK1472B.

3.2.2.2 Restrikce DNA

Pro vyjmutí úseku DNA obsahujícího gen *UGT73C1-GFP* z plasmidu AKK1436::*UGT73C1-GFP* bylo potřeba nastavit restrikci s restrikční endonukleasou *PacI*. Restrikce byly nastavovány do celkového objemu 40 µl, přičemž v reakci byl přítomen 1 mg plasmidové DNA a 0,3 µl restrikčního enzymu. Restrikce probíhala 2 hodiny při 37°C. Reakce byla nastavena stejně pro cílový vektor AKK1472B.

3.2.2.3 Agarosová elektroforéza pro účely klonování

Fragmenty DNA z restrikce vektoru AKK1436::*UGT73C1-GFP* byly separovány v 0,8% agarosovém gelu. Přibližně 100 ml připraveného roztoku 0,8% agarosu o teplotě 65°C bylo nalito do předem připravené komůrky. Do roztoku bylo přidáno 7 µl ethidium bromidu (5g/l) pro vizualizaci DNA po separaci. Na jeden konec gelu byl vložen hřebínek a gel byl ponechán 30 min ke ztuhnutí při laboratorní teplotě. Po ztuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek. Gel byl vložen do elektroforetické komůrky a komůrka byla naplněna 1x TAE pufrem tak, aby byl gel zcela ponořen. Do jamek byly následně nanášeny vzorky a standard. Do první jamky byl nanesen DNA standart 1 kb plus DNA ladder a do následujících jamek byly nanášeny vzorky obarvené loading pufrem. Elektroforéza probíhala při 90 V po dobu 45 minut. Po elektroforéze byly separované fragmenty vizualizovány na UV-transiluminátoru. Fragment nesoucí gen *UGT73C1-GFP* byl určen porovnáním velikosti s DNA standardem, sterilním skalpelem vyříznut z gelu a vnesen do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky.

3.2.2.4 Purifikace DNA

Fragment DNA vyříznutý z gelu a naštípaný vektor AKK1472B po restrikci byly purifikovány laboratorním kitem firmy Promega (viz 3.1.5 Kity) podle protokolu doporučeného výrobcem.

3.2.2.5 Ligace

Po purifikaci byla nastavena ligace pro vnesení *PacI* kazety nesoucí gen *UGT73C1-GFP* do cílového vektoru AKK1472B. Pro ligaci byla nastavena reakce dle Tab. 2. Ligační reakce byla inkubována při 16°C přes noc, poté bylo nutno ligasu inaktivovat při 70°C po dobu 10 minut.

Tab. 2 Složení ligační směsi

Složka	Objem [μl]
T4 DNA ligasa	1
10x pufr pro T4 DNA ligasu	2
PEG	2
plasmid:insert	3:1 (mol:mol)
ddH ₂ O	doplnění do objemu 20 μl
Celkem	20

3.2.2.6 Transformace *E. coli* tepelným šokem

S připravenou ligační reakcí byly transformovány chemicky kompetentní buňky *E. coli* TOP 10, případně *E. coli* DH5α. Buňky byly rozmrazeny na ledu. K 50 μl těchto buněk bylo připipetováno 1,5 μl plasmidové DNA z ligace a obsah byl špičkou opatrně promíchán, aby nedošlo k poškození buněk, a buňky byly s plasmidovou DNA inkubovány 30 minut na ledě. Následně byly buňky vystaveny teplotnímu šoku po dobu 30 sekund při 42°C, v případě DH5α buněk po dobu 45 sekund při 42°C, na vodní lázni a následně inkubovány 2 minuty na ledě. 250 μl S.O.C. média bylo připipetováno k buňkám a další inkubace probíhala 1 hodinu při 37°C a 180 rpm. Takto transformované buňky byly rozetřeny na misky s LB médiem pod selekčním tlakem kanamycinu 100 mg/l. Na médiu by tudíž neměly narůst bakterie, u kterých nedošlo k transformaci. Narostlé kolonie byly inokulovány do tekutého LB média se selekčním tlakem kanamycinu 100 mg/l a inkubovány přes noc.

Z transformované kultury *E. coli* byla vyizolována plasmidová DNA podle postupu výše (3.2.2.1 Izolace plasmidové DNA) a dále pro ni byla nastavena kontrolní restrikce *PacI* v celkovém objemu 20 μl. Po restrikci byla provedena agarosová elektroforéza s 1% agarosovým gelem pro ověření transformovaných kolonií.

3.2.3 PCR

Tato metoda byla využita pro screening transformovaných kolonií. Jedna kolonie daného genotypu *A. rhizogenes* byla přidána do 20 μ l sterilní vody a inkubována při 95°C 10 minut. Poté byly odebrány 4 μ l pro přípravu reakční směsi (Tab. 3).

U jednotlivých genotypů *A. rhizogenes* byla zkoumána přítomnost genů *rolA2* pomocí primerů *rolA2_fw* a *rolA2_rev*, které mají T_m 56,4°C, a *GFP* pomocí primerů *gfp_fw* a *gfp_rev* s T_m 57°C. Výsledná velikost fragmentů genů *rolA2* odpovídá přibližně 403 bp a u genu *GFP* přibližně 650 bp.

PCR reakce probíhaly v termocykleru v 200 μ l mikrozkušavkách. Podmínky v termocykleru byly nastaveny pro všechny reakce stejně (Tab. 4).

Tab. 3: Složení reakční směsi pro PCR pro ověření genotypů *A. rhizogenes*.

Složka	Koncentrace	Objem [μ l]	Výsledná koncentrace
PCR pufr	10x	2,50	1x
dNTP	10 mM	0,50	0,2 mM
primer fw	10 mM	1,00	0,4 mM
primer rev	10 mM	1,00	0,4 mM
<i>Taq</i> DNA polymeráza		0,50	
templát DNA	~ 25 μ g/ml	1,00	1 ng
DMSO	100%	1,25	5%
ddH ₂ O		19,50	
Celkový objem		25	

Tab. 4: Podmínky PCR.

Krok	Teplota [°C]	Čas
1. Počáteční denaturace	95	90 s
2. Denaturace	95	15 s
3. Hybridizace primerů	T_m	45 s
4. Elongace	72	90 s
5. Závěrečná elongace	72	10 min
6. Ochlazení	4	1 min

Kroky 2-4 byly opakovány 35x

3.2.4 Agarosová elektroforéza po PCR

Amplifikované geny z PCR byly separovány v 1% agarosovém gelu. Do první jamky byl nanesen DNA standart 1 kb DNA ladder a do následujících jamek byly nanášeny vzorky. Elektroforéza probíhala při 120 V po dobu 30 minut. Po separaci byla DNA vizualizována pomocí fotodokumentačního systému Biorad a zpracována pomocí programu ImageLab, ve kterém lze softwarově odečíst velikosti fragmentů DNA.

3.2.5 Tomato hairy root transformation

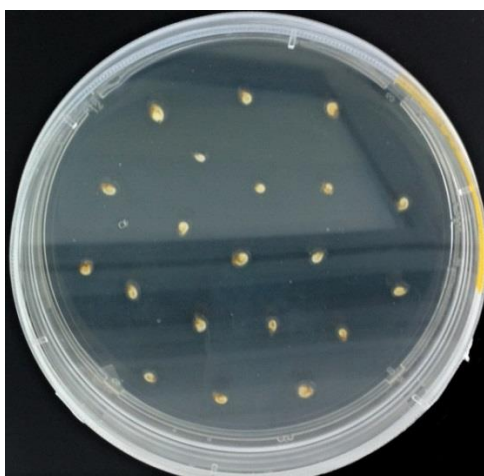
Tato metoda je velmi efektivní pro přípravu transgenního pletiva. Pomocí bakteriálního kmene *Agrobacterium rhizogenes* je možné připravit transgenní kořeny. Tento půdní patogen má Ri (root-inducing) plasmidy (Moore *et al.*, 1979), které obsahují T-DNA region schopné inkorporovat se do rostlinného genomu. Rostlina následně exprimuje geny v těchto regionech, což se projeví tvorbou adventivních kořenů v blízkosti místa infekce. Za proliferaci kořenů jsou zodpovědné geny *root locus (Rol)*.

V této bakalářské práci byl použit nízkovirulentní kmen *Agrobacterium rhizogenes* 15834 (Collier *et al.*, 2005), kterým byly infikovány děložní lístky *Solanum lycopersicum*. K selekci transgenních kořenů byl použit jako reportérový gen *gfp*. Při postupu je nutné striktně dodržovat časovou posloupnost.

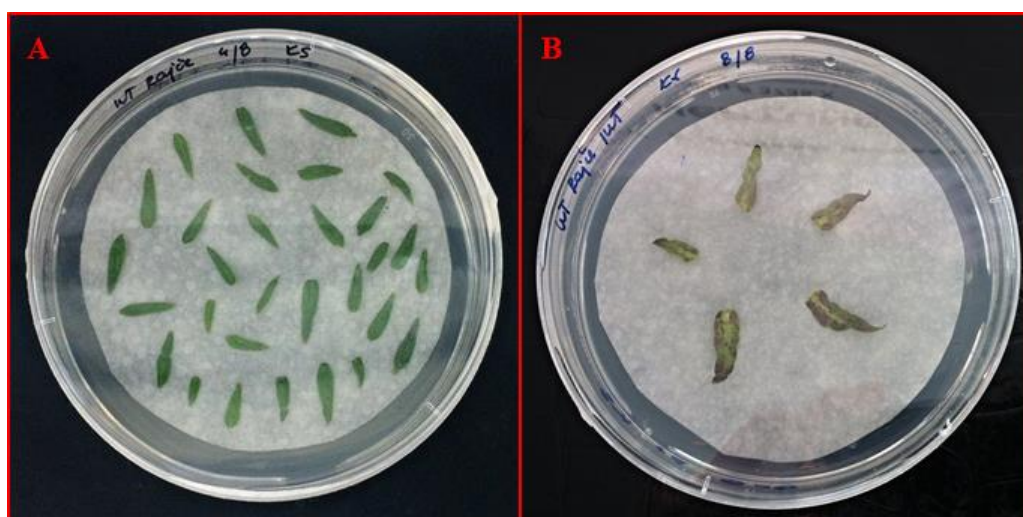
1. den: Nejprve bylo nutné vysterilizovat semena wild typu *Solanum lycopersicum* a připravit je tak k vysetí. Semena byla po dobu 1 minuty promývána v 70% ethanolu, následně byl ethanol odlit a semena promyta 7% chlornanem sodným po dobu 5 minut. Následně musela být semena důkladně promyta sterilní vodou, což bylo opakováno 5x. Sterilní semena byla vyseta po 20 kusech na 10 připravených Petriho misek s ½ MSO agarem (obrázek 12), celkem tedy bylo vyseto 200 semen. Takto vysetá semena byla kultivována ve fyto komoře při 24°C s fotoperiodou 14 hodin světlo 1000-1500 lux/10 hodin tma po dobu 7 dnů.

8. den: Děložní lístky *S. lycopersicum*, které právě opustily obaly semena, byly využity k přípravě explantátů. Při sterilních podmínkách ve flowboxu byly děložní lístky ustříhány a přeneseny do Petriho misky s tekutým MSO médiem. Následně byly přeneseny na víčko Petriho misky tak, aby ležely adaxiální (svrchní) stranou směrem nahoru. Sterilním skalpelem byly děložní lístky poraněny tak, aby nebyly zcela proříznuty.

Poraněny byly přibližně 10x jeden lísteček. Poraněné lístečky byly po 30 kusech položeny na Petriho misky s D1 agarem překrytým malým filtračním papírem taktéž adaxiální stranou směrem nahoru (obrázek 13, A). Misky byly utěsněny parafilmem a uloženy ve fytokomoře k inkubaci po dobu 2 dnů při 24°C s fotoperiodou 14 hodin světlo 1000-1500 lux/ 10 hodin tma. Téhož dne bylo nutné připravit tekutou kulturu *A. rhizogenes*. Do skleněných zkumavek bylo připraveno 3 ml tekutého MGL média s kanamycinem pod selekčním tlakem 100 mg/l. Každé médium bylo inokulováno jednou kolonií příslušného konstruktu *A. rhizogenes*. Kultury byly kultivovány v inkubátoru při 29°C a 250 rpm po dobu 2 dnů.



Obrázek 12: Semena *S. lycopersicum* vysázené na Petriho misky s ½ MSO agarem.



Obrázek 13: (A) Připravené explantáty na D1 agaru, (B) Explantáty infikované *A. rhizogenes* a přenesené na Gomborg's B-5 agar.

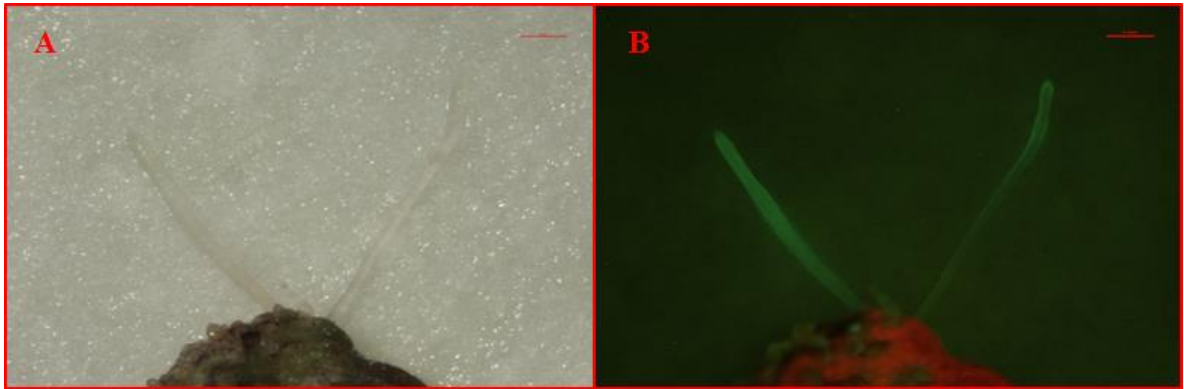
10. den: K tekutým kulturám *A. rhizogenes* bylo připipetováno 7 ml MGL média s kanamycinem a kultury se nechaly kultivovat dalších 6 hodin. Poté byly centrifugovány 15 minut při 4700 rpm, pelety byly promyty v 10 ml MSO tekutého média a znovu zcentrifugovány. Promytí a centrifugace byly ještě jednou zopakovány a následně byly pelety resuspendovány v 10 ml tekutého MSO média. K buněčné suspenzi bylo přidáno 50 μ l 0,074 M acetosyringonu. Takto připravenými kulturami *A. rhizogenes* byly ihned infikovány připravené děložní lístky při sterilních podmínkách ve flowboxu. Děložní lístky byly přeneseny na Petriho misku a bylo k nim přidáno 5 ml připravené kultury určitého konstruktů. Inkubace probíhala 10 minut za občasného promíchání. Následně byla kultura odpipetována a děložní lístky byly přeneseny a rozloženy po 30 kusech na nové Petriho misky s D1 agarem a filtračním papírem. Petriho misky byly utěsněny parafilmem a inkubovány ve fotokomoře při stejných podmínkách.

12. den: Infikované děložní lístky byly po 5 kusech přeneseny na selekční Gamborg's B-5 agar s obsahem timentinu a fosfotricinu překrytý filtračním papírem a otočeny adaxiální stranou dolů (obrázek 13, B). I nadále byly inkubovány ve fotokomoře za stejných podmínek.

19. den: Na miskách bylo možno pozorovat nárůst transgenních kořenů (obrázek 14) a bylo možné je selektovat pod fluorescenčním mikroskopem. Po ozáření kořene světlem o vlnové délce 490 nm bylo možné pozorovat zelenou fluorescenci GFP. Tyto kořeny byly pozitivně transformované (obrázek 15). Vyselektované kořeny byly lihovým fixem označeny na Petriho misce.



Obrázek 14: Nárůst transgenních kořenů z infikovaných explantátů.

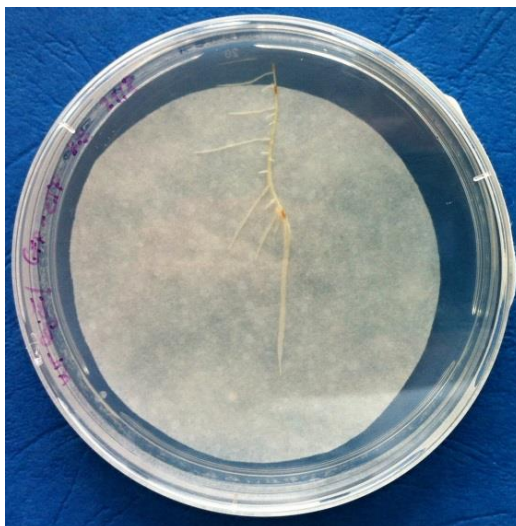


Obrázek 15: Fotografie transgenních kořenů, (A) detail transgenního kořene před ozáření (B) fotografie stejného kořene z fluorescenčního mikroskopu po ozáření světlem o vlnové délce 490 nm. Možnost pozorovat emisi fluorescence. Měřítko 1 mm.

Při dostatečné délce kořenů byly za sterilních podmínek odstřižnuty 3-4 cm kořene s kořenovou špičkou a kořen byl přenesen na nový Gamborg's B-5 agar překrytý filtračním papírem tak, aby kořenovou špičkou směřoval co nejvíce do středu Petriho misky a popřípadě nedošlo k prorůstání do agaru (obrázek 16). Bylo třeba dávat pozor na kořenovou špičku, která je velmi křehká a při jejím narušení by kořínek přestal dále růst. Tímto způsobem je možné uchovávat kořeny po delší dobu (maximálně však 4-6 měsíců). Kořeny byly takto uchovávány do doby, než byly mikroskopovány konfokálním mikroskopem.

3.2.6 Fluorescenční mikroskopie

Pro selekci transgenních kořenů byl použit přístroj Nikon SMZ800 využívající jako zdroj světla vysokotlakou rtuťovou výbojku s GFP filtrem. Pro vizualizaci fluorescence v transgenních kořenech nebylo potřeba připravovat preparáty, protože mohly být pozorovány přímo v Petriho misce. Tento mikroskop může být taktéž propojen s počítačem a pomocí dokumentačního zařízení můžou být pořízeny fotografie.



Obrázek 16: Transgenní kořen přenesený na nový Gamborg's B-5 agar.

3.2.7 Konfokální mikroskopie

Pro účel ověření subcelulární lokalizace zeleného fluorescenčního proteinu v transgenních kořenech transformovaných jednotlivými genotypy *A. rhizogenes* byl použit konfokální skenovací laserový mikroskop Zeiss LSM710 s přidavným piezzo-stolkem, který urychluje snímání v 3D. Z transgenních kořenů bylo nutné připravit preparáty. Na delší strany podložního sklíčka byly nalepeny tenké pásky oboustranné lepicí pásky, doprostřed podložního sklíčka do kapky vody byl vložen 1 cm kořenové špičky. Na každé sklíčko byly takto připraveny 3 kořenové špičky daného genotypu *A. rhizogenes*. Nakonec byly kořeny překryty krycím sklíčkem tak, aby v preparátu nezůstaly vzduchové bubliny. Jako excitační zdroj pro indukci GFP fluorescence byla využita energie modrého laseru produkujícího světlo o vlnové délce 490 nm odpovídající excitační vlnové délce GFP, emise fluorescence byla zachycena při 500-525 nm s využitím 395 band-pass filtru. Správná intenzita laseru byla upravena s využitím kontrolních WT kořenů rajčete, které bylo infikováno WT *A. rhizogenes* 15834. Snímky byly pořízeny s použitím 63x objektivu. Zpracování snímků z mikroskopu bylo provedeno pomocí Zeiss ZEN softwaru.

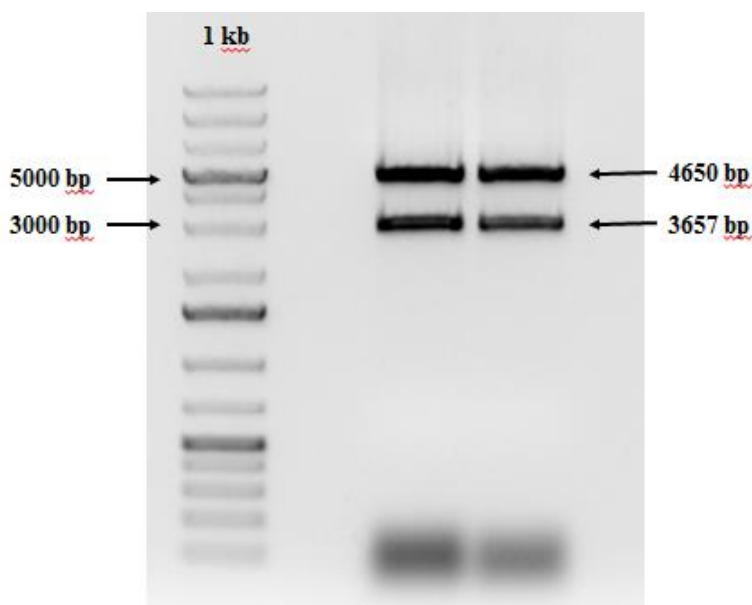
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Klonování

4.1.1 Restrikce a separace fragmentů agarosovou elektroforézou

Při přípravě binárního vektoru AKK1472B::*UGT73C1-GFP* byla provedena restrikce vektoru AKK1436::*UGT73C1-GFP* restrikční endonukleasou *PacI*, která štěpila plasmid za tvorby dvou fragmentů DNA, tzv. *PacI* kazety obsahující gen *UGT73C1-GFP* pod superubikvitinovým promotorem a fragmentu obsahující geny zbytku plasmidu. *PacI* kazeta má velikost 4650 bp. Celý plasmid AKK1436 včetně genu *UGT73C1-GFP* má velikost přibližně 8307 bp.

Fragmenty byly separovány agarosovou elektroforézou (obrázek 17), čímž došlo k ověření přítomnosti genu *UGT73C1-GFP* ve vektoru a zároveň separovaná *PacI* kazeta mohla být dále použita při dalším postupu pro klonování.



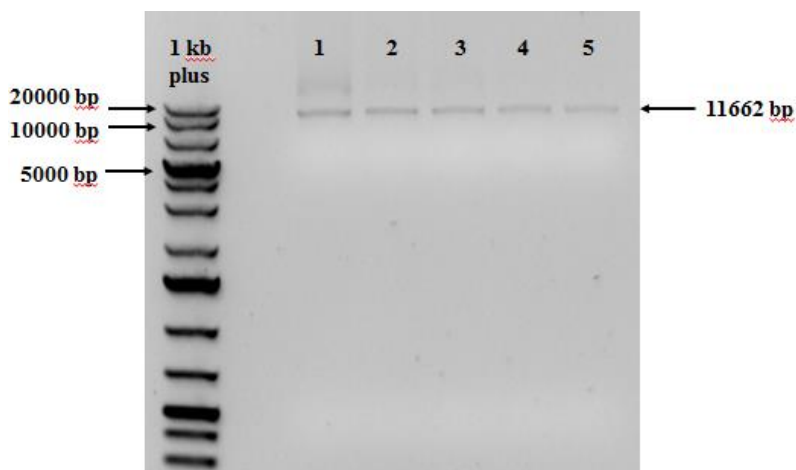
Obrázek 17: Fotografie agarosového gelu fragmentů vektoru AKK1436 po restrikci *PacI* restrikční endonukleasou za použití markeru 1 kb DNA ladder.

4.1.2 Agarosová elektroforesa pro ověření transformovaných kolonií

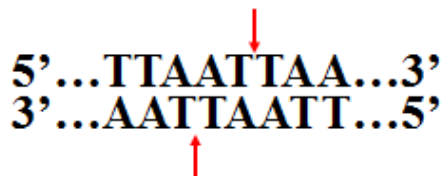
Výsledkem klonování měly být transformované bakterie *E. coli* nesoucí binární vektor AKK1472B::*UGT73C1-GFP* vytvořené ligací *PacI* kazety a binárního vektoru AKK1472B. Pro ověření těchto transformovaných bakterií sloužila po izolaci plasmidové DNA a restrikci ověřovací agarosová elektroforéza (obrázek 16). Jak již bylo zmíněno, *PacI* kazeta má velikost 4650 bp, vektor AKK1472B 11662 bp a celý transformovaný vektor pak má po součtu velikost 16312 bp.

Jak je možné pozorovat na gelu (obrázek 18), ověření transformovaných kolonií bylo neúspěšné. Na gelu bylo možné pozorovat pouze prázdný binární vektor AKK1472B. Lze tedy předpokládat, že při klonování byly špatně nastaveny podmínky ligace a proto nebyla *PacI* kazeta zaligována do binárního vektoru AKK1472B. Pro přípravu transformovaných bakterií byly vyzkoušeny různě pozměněné podmínky ligace, jako například různé molární poměry plasmidu k insertu nebo změny podmínek inkubace ligačních reakcí. Veškeré změny neměly vliv na výsledek, ověření transformovaných kolonií bylo vždy neúspěšné a to i při pokusu ověření po nastavení restrikce s různými restrikčními endonukleasami jako jsou *EcoRI* a *EcoRI-HF*, které mohou taktéž sloužit k ověření transformovaných bakterií.

Jedná se o velmi nevýhodnou ligaci, protože vektor AKK1472B je poměrně velký a navíc restrikční endonukleasa *PacI* štěpí DNA za tvorby krátkých lepivých konců (obrázek 19).



Obrázek 18: Fotografie ověřovacího agarosového gelu pro 5 různých plasmidových DNA izolovaných z transformovaných kolonií *E. coli* restrikční endonukleasou *PacI* za použití markeru 1 kb plus DNA ladder.



Obrázek 19: Palindromová sekvence, kterou rozpoznává *PacI*. Červené šipky vyznačují místa, na kterých *PacI* štěpí DNA.

Při posledních pokusech klonování byly ligačními reakcemi transformovány místo chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP 10 chemicky kompetentní vysoce efektivní DH5 α buňky *E. coli*, které jsou vhodnější pro transformování velkými plasmidy. Bohužel ani tato změna nevedla k pozitivnímu výsledku.

4.2 Ověření genotypů *A. rhizogenes*

Osvojení si metodiky přípravy transgenního pletiva a následná práce s fluorescenčním a konfokálním mikroskopem proběhlo v rámci experimentu, jehož cílem bylo ověřit funkčnost signální sekvence cílicí proteiny do vakuoly.

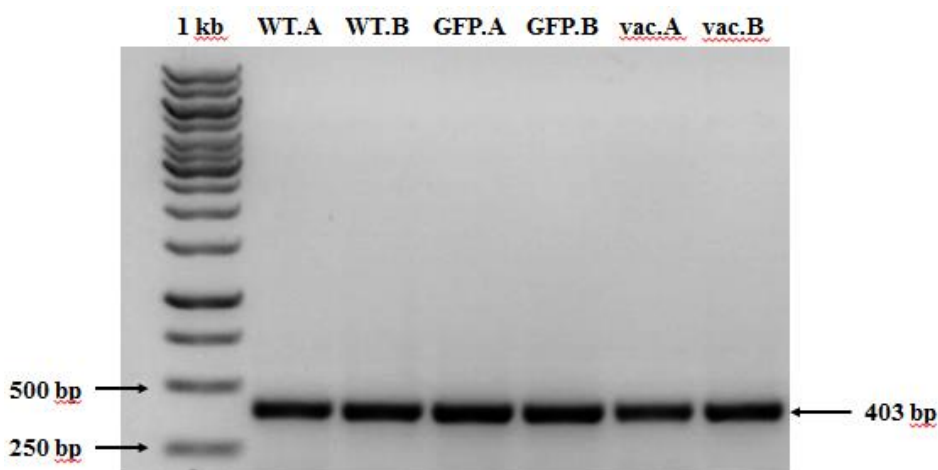
Ověřování genotypů *A. rhizogenes* probíhalo agarosovou elektroforézou po amplifikaci genů *GFP* a *RolA2* metodou PCR.

Gen *RolA2* je typický pro *A. rhizogenes*. Po infekci rostliny je gen *RolA2* inkorporován do rostlinného genomu a při jeho expresi způsobuje indukci růstu transgenních adventivních kořenů.

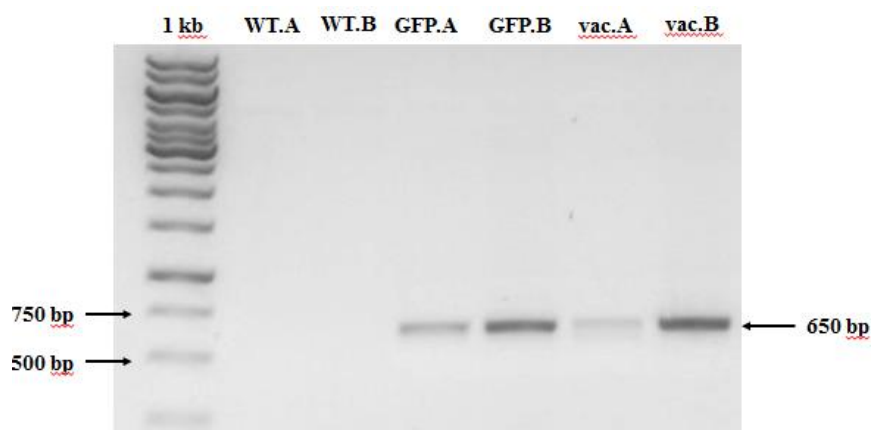
Proto při ověřování přítomnosti tohoto genu agarosovou elektroforézou musel být přítomen ve všech konstruktech, aby bylo prokázáno, že se nejedná například o kmen *Agrobacterium tumefaciens*. Gen *RolA2* má velikost 403 bp. Od každého konstruktů byly ověřovány dva biologické replikáty. Z fotografie agarosového gelu na obrázku 20 jde vidět, že gen *RolA2* byl přítomen u všech konstruktů a skutečně se tak jedná o kultury *A. rhizogenes*.

Gen *GFP* byl přítomen v konstruktech transformovaných *A. rhizogenes*. Jeden konstrukt obsahoval pouze gen *GFP* bez signální sekvence, druhý konstrukt obsahoval *GFP* sfúzovaný se signální sekvencí cílicí GFP do vakuoly. V těchto dvou konstruktech musela být přítomnost genu *GFP* pozitivně potvrzena. Poslední genotyp *A. rhizogenes* byl wild type a tudíž neměl obsahovat *GFP*. Gen *GFP* má velikost 650 bp. Pozitivní ověření konstruktů je možné vidět na fotografii agarosového gelu na obrázku 21. U WT

A. rhizogenes není gen pro *GFP* přítomen, u zbylých dvou konstruktů byl gen *GFP* pomocí PCR amplifikován a separován agarosovou elektroforézou.



Obrázek 20: Fotografie agarosového gelu pro ověření *A. rhizogenes* po amplifikaci genů *RolA2* PCR za použití markeru 1 kb DNA ladder. WT, *A. rhizogenes* wild type; GFP, *A. rhizogenes* obsahující gen *GFP*; vac, *A. rhizogenes* obsahující gen *GFP* sfúzovaný se signální sekvencí do vakuoly.



Obrázek 21: Fotografie agarosového gelu pro ověření konstruktů *A. rhizogenes* po amplifikaci genů *GFP* PCR za použití markeru 1 kb DNA ladder. WT, *A. rhizogenes* wild type; GFP, *A. rhizogenes* obsahující gen *GFP*; vac, *A. rhizogenes* obsahující gen *GFP* sfúzovaný se signální sekvencí do vakuoly.

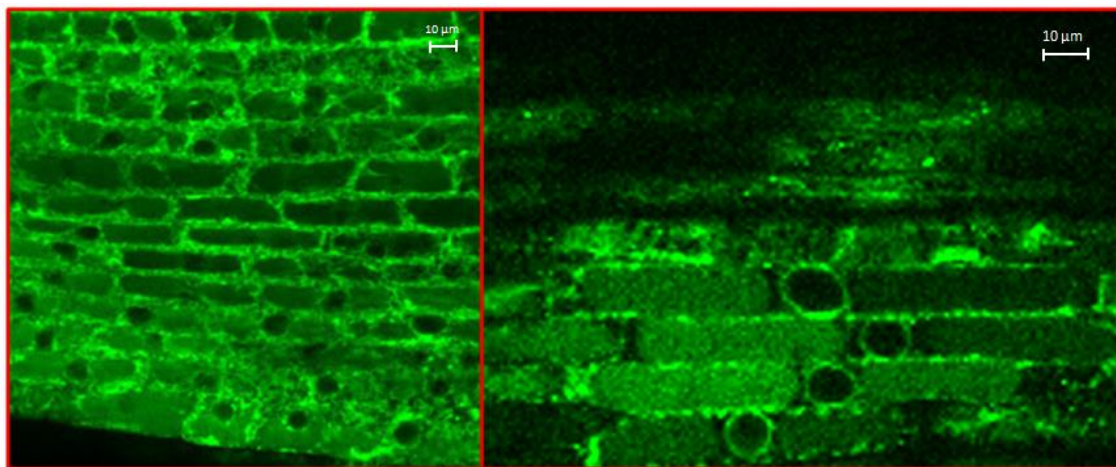
4.3 Konfokální mikroskopie

Konfokálním mikroskopem byly pozorovány preparáty připravené z transgenních kořenů vyrůstajících z explantátů *S. lycopersicum* infikovaných konstrukty *A. rhizogenes* obsahujících gen *GFP* bez signální sekvence a se signální sekvencí cílicí zelený fluorescenční protein do vakuoly. Jednotlivé vrstvy buněk v kořenech byly skenovány a byla pozorována subcelulární lokalizace GFP. Konstrukt *A. rhizogenes* s *GFP* bez signální sekvence sloužil jako pozitivní kontrola, protože lokalizace GFP bez signální sekvence je již známá (Frigerio, 1998). Zelený fluorescenční protein je lokalizován do cytosolu se zpětnou difuzí do jádra (obrázek 22). Protože je cytosol vytlačen vakuolou k periferii buňky, lemuje cytoplazmatickou membrána a může se zdát, jako by signál vycházel z ní. Dále z důvodu zpětné difuze signál vychází taktéž z jádra. Zpětná difuze dimeru i trimeru GFP již byla popsána v práci Von Arnim *et. al.*, 1998.

V transgenních kořenech, ve kterých byl GFP zacílen pomocí signální sekvence do vakuoly se signál lišil (obrázku 23). Nejsilnější signál vychází taktéž z periferie buňky. Podrobnější analýza ukázala, že signál vychází z cytosolu. Slabší signál vychází z vakuol. Výrazný rozdíl oproti GFP bez signální sekvence je v tom, že GFP se signální sekvencí nedifunduje zpět do jádra. Výsledky se lišily od očekávání, protože signál u GFP se signální sekvencí cílicí do vakuoly byl očekáván nejsilnější právě z vakuol. Je potřeba vzít v úvahu, že signální sekvence pocházela z fazole a ověřována byla v rajčatech. Navíc se v buňkách kořene vyskytují různé typy vakuol v různém stádiu vývoje. Čím jsou buňky starší, tím vyspělejší jsou vakuoly a může z nich vycházet silnější signál. Ovšem v takových buňkách je již exprese *GFP* minimalizována. Do výsledku nutno zahrnout všechny tyto aspekty. I když se očekávání lišilo, byla potvrzena funkčnost signální sekvence cílicí GFP do vakuoly.



Obrázek 22: Fotografie vrstvy buněk v transgenních kořenech overexprimujících SU:GFP z konfokálního mikroskopu, ve kterých je GFP lokalizováno do cytosolu se zpětnou difuzí do jádra. Měřítko 10 μm .



Obrázek 23: Fotografie vrstvy buněk v transgenních kořenech overexprimujících SU:vac:GFP z konfokálního mikroskopu, ve kterých je GFP lokalizováno do vakuoly. Měřítko 10 μm .

5 ZÁVĚR

Byla zpracována literární rešerše na téma subcelulární lokalizace, mechanismus třídění proteinů v buňce a typy signálních sekvencí, které determinují proteiny pro různé buněčné kompartmenty. Dále byly shrnuty poznatky o vakuolách, mechanismu transportu do vakuol a do tonoplastu. Poslední kapitoly byly věnovány cytokininům, jejich inaktivaci glykosyltransferasami a transportu v rostlinách.

Bylo připraveno transgenní pletivo overexprimující GFP pod vakuolárním signálním peptidem a pomocí konfokální mikroskopie byl detekován fluorescenční signál ve vakuolách. Tímto byla úspěšně potvrzena funkčnost tohoto konstruktu pro cílení enzymů metabolismu cytokininů do vakuol jako jeden z možných nástrojů studia jejich funkce. Kvůli velice náročnému klonování se nepodařilo připravit binární vektor nesoucí *UGT73C1-GFP* a proto nebylo možné ověřit jeho předpovězenou subcelulární lokalizaci.

V rámci experimentální části jsem se naučila metodiku klonování zahrnující přípravu binárního vektoru a transformaci bakterií, metodiku přípravy transgenního pletiva, práci s fluorescenčním mikroskopem a práci s konfokálním mikroskopem. Tyto znalosti budou dále využity pro studium enzymů metabolismu cytokininů.

6 LITERATURA

- Abel S., Blume B., Glund K. (1990): Evidence for RNA-oligonucleotides in plant vacuoles isolated from cultured tomato cells. *Plant Physiology* **94**, 1163-1171.
- Allen G. J., Sanders D. (1997): Vacuolar ion channels of higher plants. In: *Advances in Botanical Research*. Vol. 25, (Leigh R. A., Sanders D., eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 217-252.
- Amalou Z., Gibrat R., Trouslot P., Dauzac J. (1992): Evidence for an amiloride-inhibited $Mg^{2+}/2H^{+}$ antiporter in lutoid (vacuolar vesicles from latex of *hevea-brasiliensis*. *Plant Physiology* **100**, 255-260.
- Armstrong D.J. (1994): Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: *Cytokinin*
- Bannai H., Tamada Y., Maruyama O., Nakai K., Miyano S. (2002): Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **18**, 298-305.
- Bassham D. C., Brandizzi F., Otegui M. S., Sanderfoot A. A. (2008): The secretory system of *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book/ American Society of Plant Biologists* **6**, 1-29.
- Bernard C., Traub M., Kunz H.H., Hach S., Trentmann O., Mohlmann T. (2011): Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4627-4637.
- Bethke P. C., Jones R. L. (1997): Reversible protein phosphorylation regulates the activity of the slow-vacuolar ion channel. *Plant Journal* **11**, 1227-1235.
- Bonifaci N., Moroianu J., Radu A., Blobel G. (1997): Karyopherin $\beta 2$ mediates nuclear import of a mRNA binding protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **94**, 5055-5060.
- Bonifacino J. S., Traub L. M. (2003): Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Biochemistry* **72**, 395-447.
- Boulikas T. (1993): Nuclear localization signals (NLS). *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* **3**, 193-227.
- Bowles D., Lim E.K., Poppenberger B., Vaistij F.E. (2006): Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 567-597.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root-meristem. *Science* **262**, 1051-1054.
- Bürkle L., Cedzich A., Dopke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kuhn C., Frommer W. B. (2003): Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **34**, 13-26.
- Campbell J.A., Davies G.J., Bulone V., Henrissat B. (1997): A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid. *Biochemical Journal* **326**, 929-939.
- Cao X. F., Rogers S. W., Butler J., Beevers L., Rogers J. C. (2000): Structural requirements for ligand binding by a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* **12**, 493-506.
- Cedzich A., Stransky H., Schulz B., Frommer W. B. (2008): Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiology* **148**, 1857-1867.
- Collier R., Fuchs B., Walter N., Lutke W.K., Taylor C.G. (2005): *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant Journal* **43**, 449-457.
- De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G., Frachisse J. M., Thomine S., Gambale F., Barbier-Brygoo H. (2006): The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**, 939-942.
- Dever T. E. (2002): Gene-Specific Regulation by General Translation Factors. *Cell* **108**, 545-556.
- Dietz K. J., Martinoia E., Heber U. (1989): Mobilization of vacuolar amino-acids in leaf-cells as affected by ATP and the level of cytosolic amino-acids – ATP regulates but appears not to energize vacuolar amino.acid release. *Biochemica et Biophysica Acta* **984**, 57-62.

- Ding Y., Robinson D.G., Jiang L. (2014): Unconventional protein secretion (UPS) pathways in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **29**, 107-115.
- Dobrušková J. (2014): *Subcelulární lokalizace cytokinin glykosyltransferasy Arabidopsis thaliana pomocí fluorescenčního značení*. Diplomová práce, UPOL Olomouc, Česká Republika.
- Dunkley T.P.J., Watson R., Griffin J.L., Dupree P., Lilley K.S. (2004): Localization of organelle proteins by isotope tagging (LOPIT). *Molecular & Cellular Proteomics* **3**, 1128-1134.
- Echeverria E., Burns J.K. (1989): Vacuolar acid-hydrolysis as a physiological mechanism for sucrose. *Plant Physiology* **90**, 530-533.
- Emanuelsson O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. (2007): Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* **2**, 953-971.
- Emanuelsson O., Nielsen H., von Heijne G. (1999): ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* **8**, 978-984.
- Emanuelsson O., Nielsen H., Bruna S., von Heijne G. (2000): Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* **300**, 1005-1016.
- Etxeberria E., Pozueta-Romero J. (2012): In and out of the plant storage vacuole. *Plant Science* **190**, 56-61.
- Faiss M., Zalubilova J., Strnad M., Schmulling T. (1997): Conditional transgenic expression of the ipt gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant Journal* **12**, 401-415.
- Feller U., Fischer A. (1994): Nitrogen-metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**, 241-273.
- Frébortová J., Fraaije M.W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2004): Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121-130.
- Frigerio L., de Virgilio M., Prada A., Faoro F., Vitale A. (1998): Sorting of *phaseolin* to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. *Plant Cell* **10**, 1031-1042.
- Frigerio L., Hinz G., Robinson D.G. (2008): Multiple vacuoles in plant cells: Rule or exception? *Traffic* **9**, 1564-1570.
- Frigerio L., Jolliffe N. A., Di Cola A., Felipe D. H., Paris N., Neuhaus J. M., Lord J. M., Ceriotti A., Roberts L. M. (2001): The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting. *Plant Physiology* **126**, 167-175.
- Galichet A., Hoyerova K., Kaminek M., Gruissem W. (2008): Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**, 1155-1164.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Kollmer I., Schmulling T., Frébort I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255-267.
- Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. In: *Studies in natural products chemistry*. Vol. 34. (UrRahman A., ed.), Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands
- Gasber A., Klaumann S., Trentmann O., Trampczynska A., Clemens S., Schneider S., Sauer N., Feifer I., Bittner F., Mendel R.R., Neuhaus H.E. (2011): Identification of an *Arabidopsis* solute carrier critical for intracellular transport and inter-organ allocation of molybdate. *Plant Biology* **13**, 710-718.
- Geelen D., Lurin C., Bouchez D., Franchisse J. M., Lelievre F., Courtial B., Barbier-Brygoo H. (2000): Disruption of putative anion channel gene AtCLC-a in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content. *Plant Journal* **21**, 259-267.
- Geisler M., Axelsen K. B., Harper J. F., Palmgren M. G. (2000): Molecular aspects of higher plant P-type Ca²⁺-ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**, 52-78.

- Gillissen B., Bürkle L., Andre B., Kuhn C., Rentsch D., Brandl B., Frommer W.B. (2000): A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 291-300.
- Hanton S. L., Brandizzi F. (2006): Protein transport in the plant secretory pathway. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **84**, 523-530.
- Hara-Hishimura I., Takeuchi Y., Inoue K., Nishimura M. (1993): Vesicle transport and processing of the precursor to 2S-albumin in pumpkin. *Plant Journal* **4**, 793-800.
- Hara-Nishimura I., Shiamada T., Hatano K., Takeuchi Y., Nishimura M. (1998): Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* **10**, 825-836.
- Harter C., Wieland F. (1996): The secretory pathway: Mechanism of protein sorting and transport. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* **1286**, 75-93.
- Hedrich R., Flugge U. I., Fernandez J. M. (1986): Patch-clamp studies of ion-transport in isolated plant vacuoles. *Febs Letters* **204**, 228-232.
- Hedrich R., Neher E. (1987): Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature* **329**, 833-836.
- Herman E. M., Larkins B. A. (1999): Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* **11**, 601-613.
- Hinz G., Hillmer S., Baumer M., Hohl I. (1999): Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the Golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *Plant Cell* **11**, 1509-1524.
- Hirose N., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. (2005): Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology* **138**, 196-206.
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008): Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* **59**, 75-83.
- Hoh B., Hinz G., Jeong B. K., Robinson D. G. (1995): Protein storage vacuoles form *de novo* during pea cotyledon development. *Journal of Cell Science* **108**, 299-310.
- Hohl I., Robinson D. G., Chrispeels M. J., Hinz G. (1996): Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *Journal of Cell Science* **109**, 2539-2550.
- Hopp W., Seitz H.U. (1987): The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell-suspension culture of *Daucus-carota*. *Planta* **170**, 74-85.
- Horton P., Park K.J., Obayashi T., Nakai K. (2006): Protein subcellular localization prediction with WOLF PSORT. In: *Series on Advances in Bioinformatics and Computational Biology*. Vol. 3. (Jiang T., Yang U.C., Chen Y.P.P., Wong L., eds.), Asia-Pacific Bioinformatics Conference, Taipei, Taiwan.
- Hou B.K., Lim E.K., Higgins G.S., Bowles D.J. (2004): N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 47822-47832.
- Husar S., Berthiller F., Fujioka S., Rozhon W., Khan M., Kalaivanan F., Elias L., Higgins G.S., Li Y., Schumacher R., Krska R., Seto H., Vaistij F., Bowles D., Poppenberger B. (2001): Overexpression of the *UGT73C6* alters brassinosteroid glucoside formation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **11**:51 (open access).
- Churchill K. A., Sze H. (1984): Anion-sensitive, H⁺-pumping ATPase of oat roots – direct effects of Cl⁻, NO₃⁻, and a disulfonic stilbene. *Plant Physiology* **76**, 490-497.
- Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M. (2011): Rice two-pore K⁺ channels are expressed in different types of vacuoles. *Plant Cell* **23**, 756-768.
- Jauh G.Y., Fischer A.M., Grimes H.D., Ryan C.A., Rogers J.C. (1998): Delta-tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **95**, 12995-12999.
- Jiang L.W., Phillips T. E., Rogers S. W., Rogers J. C. (2000): Biogenesis of the protein storage vacuole crystalloid. *Journal of Cell Biology* **150**, 755-769.

- Jiang L.W., Rogers J. C. (1998): Integral membrane protein sorting to vacuoles in plant cells: Evidence for two pathways. *Journal of Cell Biology* **143**, 1183-1199.
- Jiang L.W., Rogers J. C. (2003): Sorting of lytic proteins in the plant Golgi apparatus. *Annual Plant Review* **9**, 114-140.
- Jin S.-H., Ma X.-M., Kojima M., Sakakibara H., Wang Y.-W., Hou B.-K. (2013) Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences *trans*-zeatin homeostasis and *trans*-zeatin response likely through O-glucosylation. *Planta* **237**, 991-999.
- Johnson K. D., Herman E. M., Chrispeels M. J. (1989): An abundant, highly conserved tonoplast protein in seeds. *Plant Physiology* **91**, 1006-1013.
- Jung C., Lee G.J., Jang M., Lee M., Lee J., Kang H., Sohn E.J., Hwang I. (2011): Identification of sorting motifs of At beta Fruct4 for trafficking from the ER to the vacuole through the golgi and PVC. *Traffic* **12**, 1774-1792.
- Kaiser G., Heber U. (1984): Sucrose transport into vacuoles isolated from barely mesophyll protoplasts. *Planta* **161**, 562-568.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677-685.
- Kakimoto T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* **116**, 233-239.
- Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004): Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14049-14054.
- Keenan R.J., Freymann D.M., Stroud R.M., Walter P. (2001): The signal recognition particle. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 755-775.
- Kirsch T., Paris N., Butler J. M., Beevers L., Rogers J. C. (1994): Purification and initial characterization of potential plant vacuolar targeting receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **91**, 3403-3407.
- Klee E.W., Ellis L.B.M. (2005): Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. *BMC Bioinformatics* **6**, 256.
- Klein M., Martinoia E., Hoffmann-Thoma G., Weissenböck G. (2000): A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *Plant Journal* **21**, 289-304.
- Kloc M., Zearfoss N.R., Etkin L.D. (2002): Mechanisms of Subcellular mRNA Localization. *Cell* **108**, 533-544.
- Ko D., Kang J., Kiba T., Park J., Kojima M., Do J., Kim K.Y., Kwon M., Endler A., Song W.Y., Martinoia E., Sakakibara H., Lee Y. (2014): *Arabidopsis* ABC14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 7150-7155.
- Koide Y, Matsuoka, K., Ohto M., Nakamura K. (1999): The N-terminal propeptide and the C terminus of the precursor to 20-kilo-dalton potato tuber protein can function as different types of vacuolar sorting signals. *Plant and Cell Physiology* **40**, 1152-1159.
- Kollmer I, Novak O., Strand M., Schmullig T., Werner T. (2014): Overexpression of the cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX7) from *Arabidopsis* causes specific changes in root growth and xylem differentiation. *Plant Journal* **78**, 359-371.
- Komarova N.Y., Meier S., Meier A., Grotemeyer M.S., Rentsch D. (2012): Determinants for *Arabidopsis* peptide transporter targeting to the tonoplast or plasma. *Traffic* **13**, 1090-1105.
- Kreuz K., Tommasini R., Martinoia E. (1996): Old enzymes for a new job – Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiology* **111**, 349-353.
- Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010): Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 53-60.
- Lametschwandtner G., Brocard C., Fransen M., Van Veldhoven P., Berger J., Hartig A. (1998): The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 33635-33643.

- Larisch N., Schulze C., Galione A., Dietrich P. (2012): An N-terminal dileucine motif directs two-pore channels to the tonoplast of plant cells. *Traffic* **13**, 1012-1022.
- Lee D. W., Jung C., Hwang I. (2013): Cytosolic events involved in chloroplast protein targeting. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1833**, 245-252.
- Leinhos V., Krauss G.J., Glund K. (1986): Evidence that a part of cellular uridine of a tomato (*Lycopersicon-esculentum*) cell-suspension culture is located in the vacuoles. *Plant Science* **47**, 15-20.
- Letham D. S., Palni L. M. S. (1983): The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **34**, 163-197.
- Li Y., Baldauf S., Lim E.K., Bowles D.J. (2001): Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 4338-4343.
- Li Z.S., Lu Y.P., Zhen R.G., Szczypka M., Thiele D.J., Rea P.A. (1997): A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 42-47.
- Lim P.O., Woo H.R., Nam H.G. (2003): Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **8**, 272-278.
- Mackenzie P.I., Owens I.S., Burchell B., Bock K.W., Bairoch A., Belanger A., FournelGigleux S., Green M., Hum D.W., Iyanagi T., Lancet D., Louisot P., Magdalou J., Chowdhury J.R., Ritter J.K., Schachter H., Tephly T.R., Tipton K.F., Nebert D.W. (1997): The UDP glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**, 255-269.
- Mackenzie S. A. (2005): Plant organellar protein targeting: a traffic plan still under construction. *Trends in Cell Biology* **15**, 548-554.
- Maeshima M. (1992): Characterization of the major integral protein of vacuolar membrane. *Plant Physiology* **98**, 1248-1254.
- Maeshima M. (2001): Tonoplast transporters: organization and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 469-497.
- Malmström S., Akerlund H. E., Askerlund P. (2000): Regulatory role of the N terminus of the vacuolar calcium-ATPase in cauliflower. *Plant Physiology* **122**, 517-526.
- Mansfield S. G., Briarty L. G. (1991): Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* .2. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **69**, 461-476.
- Mansfield S. G., Briarty L. G. (1996): The dynamics of seedling and cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve mobilization. *International Journal of Plant Sciences* **157**, 280-295.
- Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K., Amrhein N. (1993): ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **364**, 247-249.
- Martinoia E., Kaiser G., Schramm M. J., Heber U. (1987): Sugar-transport across the plasmalemma and the tonoplast of barely mesophyll protoplasts – evidence for different transport-systems. *Journal of Plant Physiology* **131**, 467-478.
- Martinoia E., Maeshima M., Neuhaus H. E. (2007): Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**, 83-102.
- Martinoia E., Massonneau A., Frangne N. (2000): Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant and Cell Physiology* **41**, 1175-1186.
- Martinoia E., Rentsch D. (1994): Malate compartmentation – responses to a complex metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 447-467.
- Martinoia E., Schramm M. J. (1986): Transport of anions in isolated barely vacuoles .1. permeability to anions and evidence for a Cl⁻-uptake system. *Plant Physiology* **80**, 895-901.
- Marty F. (1999): Plant vacuoles. *Plant Cell* **11**, 587-599.
- Massonneau A., Martinoia E., Dietz K. J., Mimura T. (2000): Phosphate uptake across the tonoplast of intact vacuoles isolated from suspension-cultured cells of *Catharanthus* (L.) G. Don. *Planta* **211**, 390-395.

- Mathews M. B., Sonenberg N., Hershey J.W.B. (2000): Origins and principles of translational control. In: *Translational Control of Gene Expression*. Vol. 39, (Sonenberg N., Hershey J., Mathews M.B., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A., 1-31.
- Matsuoka K., Neuhaus J.M. (1999): Cis-elements of protein transport to the plant vacuoles. *Journal of Experimental Botany* **50**, 165-174.
- Merrick W.C., Nyborg J. (2000): The protein biosynthesis elongation cycle. In: *Translational Control of Gene Expression*. Vol. 39, (Sonenberg N., Hershey J., Mathews M.B., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A., 89-125.
- Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004): Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal* **37**, 128-138.
- 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 of the United States of America* **103**, 16598-16603.
- Mohlmann T., Mezher Z., Schwerdtfeger G., Neuhaus H.E. (2001): Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters* **509**, 370-374.
- Mok D.W.S., Mok M.C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.
- Moore L., Warren G., Strobel G. (1979): Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium-rhizogenes*. *Plasmid* **2**, 617-626.
- Muntz K. (1998): Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology* **38**, 77-99.
- Nakai, K. (2000): Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. In: *Advances in Protein Chemistry*. Vol. 54, (Bork I. P., ed.), Academic Press, San Diego, 277-344.
- Neuhaus J.-M., Rogers J. C. (1998): Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Molecular Biology* **38**, 127-144.
- Okita T.W., Choi S-B. (2002): mRNA localization in plants: targeting to the cell's cortical region and beyond. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 553-559.
- Olbrich a., Hillmer S., Hinz G., Oliviusson P., Robinson D. G. (2007): Newly formed vacuoles in root meristems of barley and pea seedlings have characteristics of both protein storage and lytic vacuoles. *Plant Physiology* **145**, 1383-1394.
- Ortiz D. F., Kreppel L., Speiser D. M., Scheel G., McDonald G., Ow D. W. (1992): Heavy-metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO Journal* **11**, 3491-3499.
- Otegui M.S., Noh Y.S., Martinez D.E., Vila Petroff M.G., Andrew Staehelin L., Amasino R.M., Guiamet J.J. (2005): Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant Journal* **41**, 831-844.
- Paces V., Werstiuk E., Hall R.H. (1971): Conversion of N-6-(delta-2-isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology* **48**, 775-778.
- Paris N., Neuhaus J. M. (2002): BP-80 as a vacuolar sorting receptor. *Plant Molecular Biology* **50**, 903-914.
- Paris N., Rogers S. W., Jiang L. W., Kirsch T., Beevers L., Phillips T. E., Rogers J. C. (1997): Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiology* **115**, 29-39.
- Park M., Kim S. J., Vitale A., Hwang I. (2004): Identification of the protein storage vacuole and protein targeting to the vacuole in leaf cells of three plant species. *Plant Physiology* **134**, 625-639.
- Pei Z.M., Ward J.M., Harper J.F., Schroeder J.I. (1996): A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *Embo Journal* **15**, 6564-6574.

- Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**, 785-786.
- Pfeiffer W., Hager A. (1993): A Ca²⁺-ATPase and a Mg²⁺/H⁺-antiporter are present on tonoplast membranes from roots of zea-mays L. *Planta* **191**, 377-385.
- Pitchard S. L., Charlton W. L., Baker A., Graham I. A. (2002): Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **31**, 639-647.
- Plant P. J., Gelli A., Blumwald E. (1994): Vacuolar chloride regulation of an anion-selective tonoplast channel. *Journal of Membrane Biology* **140**, 1-12.
- Poppenberger B., Fujioka S., Soeno K., George G.L., Vaistij F.E., Hiranuma S., Seto H., Taktsuko S., Adam G., Yoshida S., Bowles D. (2005): The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **102**, 15253-15258.
- Potter M. D., Seiser R. M., Nicchitta C. V. (2001): Ribosome Exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. *Trends in Cell Biology* **11**, 112-115.
- Rachubinski R. A., Subramani S. (1995): How proteins penetrate peroxisomes. *Cell* **83**, 525-528.
- Ranocha P., Dima O., Nagy R., Felten J., Corratge-Faillie C., Novak O., Morreel K., Lacombe B., Martinez Y., Pfrunder S., Jin X., Renou J.P., Thibaud J.B., Ljung K., Fischer U., Martinoia E., Boerjan W., Goffner D. (2013): *Arabidopsis* WAT1 is a vacuolar auxine transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nature Communications* **4**, 2625.
- Rataboul P., Alibert G., Boller T., Boudet A.M. (1985): Intracellular-transport and vacuolar accumulation of ortho-coumaric acid glucoside in melilotus-alba mesophyll cell protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **816**, 25-36.
- Rebeille F., Bligny R., Martin J. B., Douce R. (1983): Relationship between the cytoplasm and the vacuole phosphate pool in acer-pseudoplatanus cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **225**, 143-148.
- Robinson D. G., Hinz G., Holstein S. E. H. (1998): The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Molecular Biology* **38**, 49-76.
- Rouillé Y., Rohn W., Hoflack B. (2000): Targeting of lysosomal proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **11**, 165-171.
- Sakakibara H. (2005): Cytokinin biosynthesis and regulation. *Plant Hormones* **72**, 271-287.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Reviews in Plant Biology* **57**, 431-449.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005): *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9972-9977.
- Salt D.E., Wagner G.J. (1993): Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots – evidence for a CD2⁺/H⁺ antiport activity. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 12297-12302.
- Sanderfoot A. A., Ahmed S. U., Marty-Mazars D., Rapoport I., Kirchhausen T., Marty F., Raikhel N. V. (1998): A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **95**, 9920-9925.
- Shimada T., Kuroyanagi M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (1997): A pumpkin 72-kDa membrane protein of precursor-accumulating vesicles has characteristics of a vacuolar sorting receptor. *Plant and Cell Physiology* **38**, 1414-1420.
- Shimada T., Watanabe E., Tamura K., Hayashi Y., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2002): A vacuolar sorting receptor PV72 on the membrane of vesicles that accumulate precursors of seed storage proteins (PAC vesicles). *Plant and Cell Physiology* **43**, 1086-1095.
- Schleiff E., Becker T. (2011): Common ground for protein translocation: access control for mitochondria and chloroplasts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 48-59.

- Schmulling T., Werner T., Riefler M., Krupkova E., Manns I.B.Y. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* **116**, 241-252.
- Schumaker K. S., Sze H. (1985): A Ca²⁺/H⁺ antiport system driven by the proton electrochemical gradient of a tonoplast H⁺-ATPase from oat roots. *Plant Physiology* **79**, 1111-1117.
- Schwacke R., Schneider A., van der Graaff E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W.B., Flugge U.I., Kunze R. (2003): ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology* **131**, 16-26.
- Skjøndal-Bar N., Morris D.R. (2007): Dynamic Model of the Process of Protein Synthesis in Eukaryotic Cells. *Bulletin of Mathematical Biology* **69**, 361-393.
- Skoog F., Armstrong D.J. (1970): Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* **21**, 359-384.
- Spíchal L. (2012): Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* **39**, 267-284.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.
- Swanson S. J., Jones R. L. (1996): Gibberellic acid induces vacuolar acidification in barely aleurone. *Plant Cell* **8**, 2211-2221.
- Swarup R., Marchant A., Bennett M. J. (2000): Auxin transport: providing a sense of direction during plant development. *Biochemical Society Transaction* **28**, 481-485.
- Swidzinski J.A., Sweetlove L.J., Leaver C.J. (2002): A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **30**, 431-446.
- Sze H. (1985): H⁺-translocation ATPases – advances using membrane-vesicles. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **36**, 175-208.
- Šmehilová M. (2004): *Purifikace a využití termostabilní DNA-polymerasy exprimované v Escherichia coli*. Bakalářská práce, UP Olomouc, Česká Republika.
- Šmehilová M., Galuszka P., Bilyeu K.D., Jaworek P., Kowalská M., Šebela M., Sedlářová M., English J.T., Frébort I. (2009): Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2701-2712.
- Tse Y. C., Mo B. X., Hillmer S., Zhao M., Lo S. W., Robinson D. G., Jiang L. W. (2004): Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell* **16**, 672-693.
- Vitale A., Hinz G. (2005): Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms?. *Trends in Plant Science* **10**, 316-323.
- Vitale A., Raikhel N. V. (1999): What do proteins need to reach different vacuoles?. *Trends in Plant Science* **4**, 149-155.
- von Armim A.G., Deng X.-W., Stacey M.G. (1998): Cloning vector for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* **221**, 35-43.
- Wang J., Ma X.M., Kojima M., Sakakibara H., Hou B.K. (2011): N-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **52**, 2200-2213.
- Ward J. M., Schroeder J. I. (1994): Calcium-activated K⁺ channels and calcium-induces calcium-release by slow vacuolar ion channels in guard-cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* **6**, 669-683.
- Watanabe E., Shimada T., Kuroyanagi M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2002): Calcium-mediated association of putative vacuolar sorting receptor PV72 with a propeptide of 2S albumin. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 8708-8715.
- Werner C., Matile P. (1985): Accumulation of coumarylglucosides in vacuoles of barely mesophyll. *Journal of Plant Physiology* **118**, 237-249.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmulling 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. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.

- Wilhelm J.E., Vale R.D. (1993): RNA on the move: the mRNA localization pathway. *Journal of Cell Biology* **123**, 269-274.
- Wolfenstetter S., Wirsching P., Dotzauer D., Schneider S., Sauer N. (2012): Routes to the tonoplast: The sorting of tonoplast transporters in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Cell* **24**, 215-232.
- Wormit A., Trab M., Florchinger M., Neuhaus H.E., Mohlmann T. (2004): Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochemical Journal* **383**, 19-26.
- Yamada K., Osakabe Y., Mizoi J., Nakashima K., Fujita Y., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2010): Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 1138-1146.
- Zhang X-P., Glaser E. (2002): Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperon. *Trends in Plant Science* **7**, 14-21.
- Zouhar J., Rojo E. (2009): Plant vacuoles: where did they come from and where are they heading? *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 677-684.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC transportér	z angl. ATP Binding Cassette transporter
AtPUP	purinová permeasa v <i>A. thaliana</i>
BA	benzyladenin
β Fruc4	β -fruktosidasa 4
BP-80	z angl.. binding protein 80
CCVs	vakuoly obalené klathrinem
CKX	cytokinin dehydrogenasa/oxidasa
CT	cytoplazmatický konec
cTP	chloroplastový tranzitní peptid
ctVSD	C-koncový vakuolární třídící determinant
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DMSO	dimethylsulfoxid
DV	vezikula s elektronovou hustotou
DZ	dihydrozeatin
EGF	epidermální růstový faktor
ENT	rovnovážný nukleosidový transportér
ER	endoplazmatické retikulum
ESL	glukosový transportér
FV kanál	rychlý vakuolární kanál
GFP	zelený fluorescenční protein
IMP	mitochondriální vnitromembránová peptidasa
IMS	mitochondriální mezimembránový prostor
INT	inositol transportér
iP	N ⁶ -(Δ^2 -isopentenyl)-adenin
iPR	isopentenyladenin ribosid
IPT	isopentenyltransferasa
LV	lytická vakuola
Met-tRNA _i ^{Met}	iniciační transferová RNA nesoucí methionin
MIP	mitochondriální intremediátová peptidasa
MOT	transportér molybdenanu
MPP	mitochondriální zpracující peptidasa

mRNA	messenger RNA
mTP	mitochondriální tranzitní peptid
NLS	jaderný lokalizační signál
NTR	transportér nitrátu
PACs	vezikuly akumulující prekurzory
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
PM	plazmatická membrána
PPasa	pyrofosfatasa
PSV	proteinová zásobní vakuola
psVSD	strukturně fyzikální vakuolární třídící determinant
PTR	peptidový transportér
PTS	peroxisomální cílicí signál
PVC	prevakuolární oddíl
PUP	purinové permeasy
RNP	ribonukleoprotein
<i>rol</i>	<i>root locus</i> gen
SAV	vakuoly spojené se senescencí
SP	signální peptid
SPasa	signální peptidasa
SPP	stromatální zpracující peptidasa
SRP	signální rozpoznávací částice
SSPs	zásobní proteiny semene
ssVSD	specifické sekvenční vakuolární třídící determinant
SV kanál	pomalou se aktivující vakuolární kanál
RMR	receptory typu membránové RING-H2 domény
TGN	trans-Golgiho síť
TIP	tonoplastové vnitřní proteiny
TMD	transmembránová doména
TPC	vápníkový kanál
tRNA	transferová RNA
<i>tZ</i>	<i>trans-zeatin</i>

<i>t</i> ZR	<i>transzeatin</i> ribosid
UDP	uridindifosfát
UGT	uridindifosfát glykosyltransferasa
VSDs	vakuolární třídící determinanty
VSR	vakuolární třídící receptor
WAT	transportér, z angl. „walls are thin“
WT	wild type

