

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Štúdium vybraných proteínov ENT rodiny a ich úloha pri
transporte cytokinínov

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Martin Hudeček
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok:	2019

Pod'akovanie

Rád by som pod'akoval vedúcemu práce RNDr. Ondřeji Plíhalovi, Ph.D. za jeho čas, obohacujúce konzultácie, trpezlivý a ústretový prístup a odborné vedenie pri tvorbe tejto diplomovej práce, Mgr. Davidovi Zalabákovi, Ph.D. za jeho nespočetné cenné rady pri práci, Mgr. Olge Šamajovej, Dr. za venovaný čas a pomoc pri konfokálnom mikroskope, Mgr. Janovi Humplíkovi, Ph.D. za spracovanie a konzultáciu dát z fenotypizácie, Mgr. Vladimírovi Skalickému za naučenie metódy izolácie vakuol a spracovanie MS dát, Bc. Davidovi Kopečnému za pomoc pri Western blottingu a rovnako obom kolektívom Oddělení molekulární biologie CRH a Oddělení buněčné biologie CRH, ktoré vytvárali ideálne prostredie pre štúdium a prácu v laboratóriu. Moje pod'akovanie taktiež patrí Romane Nesnadnej za vytvorenie príjemného prostredia pri spisovaní tejto diplomovej práce.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som predloženú diplomovú prácu vypracoval samostatne za použitia citovanej literatúry.

Olomouc, 6. 5. 2019

.....

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Martin Hudeček
Názov práce	Štúdium vybraných proteínov ENT rodiny a ich úloha pri transporte cytokinínov
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Oddělení molekulární biologie – Centrum regionu Haná
Vedúci práce	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Diplomová práca je zameraná na štúdium ekvilibratívnych nukleozidových transportérov a ich transportnej funkcie v modelovej rastline *Arabidopsis thaliana*. V teoretickej časti diplomovej práce bola vypracovaná literárna rešerš na tému cytokiníny so zameraním na biosyntézu, inaktiváciu a degradáciu, cytokinínový transport a distribúciu cytokinínov vo vakuolách. V praktickej časti boli pomocou GATEWAY technológie pripravené ENT expresné konštrukty (*35S::GFP:ENT1*, *35S::ENT1:GFP*, *35S::GFP:ENT3*, *35S::ENT3:GFP*, *35S::GFP:ENT6* a *35S::ENT6:GFP*). Pomocou *Agrobacterium tumefaciens*, nesúceho príslušné konštrukty, boli transformované rastliny *Nicotiana benthamiana* a *Arabidopsis thaliana*. Pomocou konfokálnej laserovej skenovacej mikroskopie bola pozorovaná subcelulárna lokalizácia fúzneho proteínu ENT3 s N-terminálnou GFP značkou v listoch *Nicotiana benthamiana*. Bol preukázaný fenotyp T-DNA inzerčnej línie *ent1* reagujúci na cytokiníny. Z T-DNA inzerčnej línie *ent1* a divého typu boli izolované protoplasty a vakuoly. UHPLC-MS/MS analýzou obsahu cytokinínových foriem vo vakuolách *ent1* a divého typu bola zistená transportná funkcia AtENT1, ktorý pravdepodobne plní funkciu vakuolárneho cytokinínového exportéru.

Kľúčové slová	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokiníny, cytokinínový transport, ekvilibratívny nukleozidový transportér, ENT
Počet strán	98
Počet príloh	1 CD
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's name	Martin Hudeček
Title	Study of selected Arabidopsis ENT family proteins and their role in the transport of cytokinins
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Molecular Biology – Centre of the region Haná
Supervisor	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

The diploma thesis is focused on the study of equilibrative nucleoside transporters and their transport function in the model plant *Arabidopsis thaliana*. In the theoretical part of the diploma thesis, existing literature was reviewed on the topic of cytokinins, with a focus on biosynthesis, inactivation and degradation, cytokinin transport and cytokinin distribution in vacuoles. In the practical part, ENT expression constructs (*35S::GFP:ENT1*, *35S::ENT1:GFP*, *35S::GFP:ENT3*, *35S::ENT3:GFP*, *35S::GFP:ENT6* a *35S::ENT6:GFP*) were prepared. *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* plants were transformed by *Agrobacterium tumefaciens* carrying these expression constructs. Using confocal laser scanning microscopy, the subcellular localization of the N-terminal GFP fusion ENT3 protein was followed in *Nicotiana benthamiana* leaves. The cytokinin-responsive phenotype of T-DNA insertion line *ent1* was demonstrated. Protoplasts and vacuoles were isolated from the T-DNA insertion line *ent1* and wild-type plants. UHPLC MS/MS analysis of cytokinin forms in *ent1* and wild type vacuoles revealed AtENT1 transport function, which is likely to function as a vacuolar cytokinin exporter.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokinins, cytokinin transport, equilibrative nucleoside transporters, ENT
Number of pages	98
Number of appendices	1 CD
Language	Slovak

Obsah

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČASŤ	11
2.1	Štruktúra a biologická aktivita cytokinínov	11
2.2	Biosyntéza cytokinínov	12
2.2.1	Priama biosyntetická dráha cytokinínov	12
2.2.2	Nepriama biosyntetická dráha cytokinínov	13
2.3	Degradácia a inaktivácia cytokinínov	15
2.4	Transport cytokinínov	17
2.5	ABCG transportéry a diaľkový transport cytokinínov	17
2.6	Purínové permeázy (PUP)	20
2.7	Ekvilibratívne nukleozidové transportéry (ENT)	23
2.7.1	AtENT1	25
2.7.2	AtENT3	27
2.7.3	AtENT6	28
2.7.4	AtENT7	29
2.7.5	AtENT8	29
2.7.6	Ľudské nukleozidové transportéry	30
2.8	Podiel a distribúcia cytokinínových foriem v bunke	31
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	34
3.1	Biologický materiál	34
3.2	Chemikálie	34
3.2.1	Štandardy molekulovej hmotnosti	35
3.2.2	Antibiotiká	35
3.2.3	Enzýmy a enzýmové pufry	35
3.2.4	Protilátky	36
3.3	Roztoky	36
3.3.1	Roztoky pre agarózovú elektroforézu	36
3.3.2	Roztoky pre izoláciu vakuol	36
3.3.3	Roztoky a gély pre SDS-PAGE	37
3.3.4	Komerčné gély:	38
3.3.5	Roztoky pre Western blotting	38
3.3.6	Roztoky a médiá pre prácu s baktériami	39
3.3.7	Roztoky pre výsev semien Arabidopsis	39
3.3.8	Roztoky pre tranzientnú transformáciu <i>Nicotiana benthamiana</i>	39
3.3.9	Roztoky pre stabilnú transformáciu Arabidopsis	40
3.3.10	Roztoky pre purifikáciu cytokinínov z vakuol a protoplastov	40
3.3.11	Komerčné kity	40
3.4	Primery	40

3.5	Vektory	42
3.6	Prístroje a pomôcky	43
3.7	Software	45
3.8	Metódy	45
3.8.1	Sterilizácia semien.....	45
3.8.2	Fenotypizácia nadzemnej časti T-DNA inzerčnej línie <i>ent1</i>	46
3.8.3	Fenotypizácia koreňovej časti T-DNA inzerčnej línie <i>ent1</i>	47
3.8.4	Izolácia celkovej RNA	47
3.8.5	Ošetrovanie celkovej RNA DNázou	48
3.8.6	Prečistenie RNA pomocou magnetických guľčiek Agencourt RNAClean XP	48
3.8.7	Reverzná transkripcia	49
3.8.8	Agarózová elektroforéza	49
3.8.9	Príprava <i>attB</i> PCR produktov.....	49
3.8.10	Purifikácia produktov z PCR reakčnej zmesi.....	50
3.8.11	Príprava Entry klonu (BP reakcia)	51
3.8.12	Transformácia baktérií <i>E. coli</i> TOP10 metódou teplotného šoku	52
3.8.13	Izolácia plazmidov a príprava glycerolových bakteriálnych zásobných kultúr.....	52
3.8.14	Príprava expresných konštruktov (LR reakcia).....	53
3.8.15	Transformácia <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 elektroporáciou.....	54
3.8.16	Tranzientná transformácia <i>Nicotiana benthamiana</i>	54
3.8.17	Stabilná transformácia <i>Arabidopsis thaliana</i> metódou floral dip.....	55
3.8.18	Izolácia vakuol a protoplastov z <i>ent1</i> a Col-0	55
3.8.19	Purifikácia cytokinínov z vakuolárnej a protoplastovej frakcie	57
3.8.20	UHPLC-MS/MS	58
3.8.21	SDS-PAGE.....	59
3.8.22	Western blotting	60
4	VÝSLEDKY	61
4.1	Fenotypizácia nadzemnej časti T-DNA inzerčnej línie <i>Arabidopsis thaliana ent1</i>	61
4.2	Fenotypizácia koreňovej časti T-DNA inzerčnej línie <i>Arabidopsis thaliana ent1</i>	64
4.2.1	Analýza dĺžky primárneho koreňa.....	64
4.2.2	Analýza počtu laterálnych koreňov	65
4.3	Príprava expresných ENT konštruktov s GFP značkou.....	66
4.4	Tranzientná transformácia <i>Nicotiana benthamiana</i>	70
4.5	Stabilná transformácia <i>Arabidopsis</i> metódou floral dip.....	71
4.6	Izolácia vakuol a protoplastov z <i>ent1</i> a Col-0.....	71
4.7	UHPLC-MS/MS analýza cytokinínov	73
4.8	Western blotting.....	82
4.8.1	Imunodetekcia fúzných proteínov ENT s GFP značkou	82
4.8.2	Overovanie čistoty vakuolárnej frakcie.....	83

5	DISKUSIA	85
6	ZÁVER	90
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	91
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	97

Ciele práce

- Vypracovanie literárnej rešerše na tému cytokinínový transport a lokalizácia cytokinínov v bunke
- Príprava a klonovanie vybraných foriem *ENT* (*ENT1*, *ENT3* a *ENT6*)
- Príprava expresných konštruktov pod *35S* promotorom s N-terminálnou a C-terminálnou GFP značkou a tranzientná transformácia *Nicotiana benthamiana*
- Stabilná transformácia *Arabidopsis*
- Konfokálna laserová skenovacia mikroskopia GFP značených *ENT* (*ENT1*, *ENT3* a *ENT6*)
- Izolácia vakuol z T-DNA inzerčnej línie *ent1* a Col-0 *Arabidopsis* a stanovenie obsahu vakuolárnych a bunkových cytokinínov

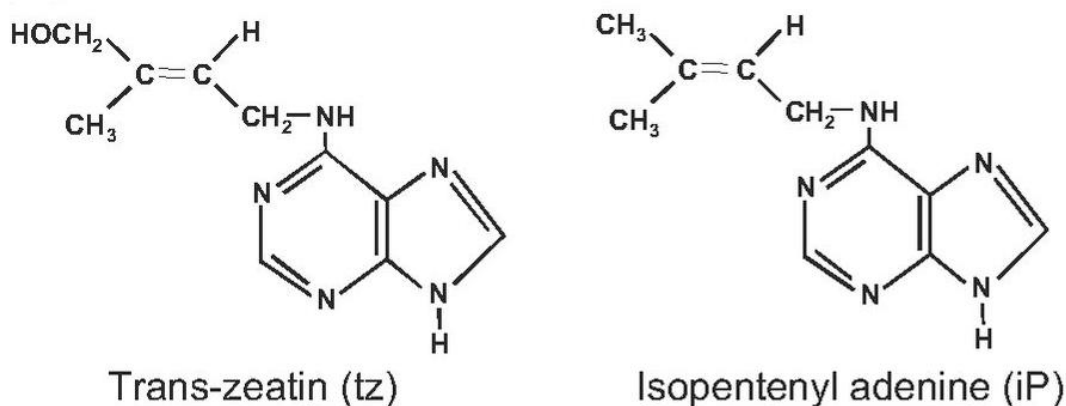
1 ÚVOD

Cytokiníny sú dôležité rastlinné hormóny hrajúce kľúčovú úlohu v rozmanitých procesoch rastlinného vývoja. Od objavu, izolácie a charakterizácie prvého cytokinínu, kinetínu, ubehlo veľa času. Dnes sme schopní charakterizovať pôsobenie cytokinínov na molekulárnej úrovni, avšak stále nepoznáme všetky detaily ohľadom cytokinínovej signalizácie ani biosyntézy cytokinínov. Niektoré aspekty cytokinínového pôsobenia sú pomerne dobre známe, ako napríklad biosyntéza cytokinínov izoprenoidného typu, prenos signálu a degradácia cytokinínov, iné však stále stoja na okraji pozornosti vedeckého výskumu a existuje o nich iba málo informácií. Takúto pomerne neznámu oblasť cytokinínovej hormonálnej signalizácie je ich samotný transport. Predkladaná diplomová práca je zameraná na proteínovú rodinu ekvilibratívnych nukleozidových transportérov (ENT), ktoré sú do veľkej miery preskúvané u človeka, kde sú využívané pre príjem rôznych liečiv pôsobiacich pri liečbe rakoviny alebo vírusových ochorení, o ich rastlinných homológoch existuje doposiaľ iba obmedzený počet publikácií. Pre účel tejto práce bola zvolená modelová rastlina *Arabidopsis thaliana*, v ktorej genóme sa nachádza osem členov ENT rodiny, ktoré už boli čiastočne charakterizované. Objasnenie transportnej funkcie vybraných členov ENT rodiny v modelovom organizme *Arabidopsis thaliana* by nám mohlo pomôcť bližšie pochopiť mechanizmus účinku a distribúciu cytokinínov a rozšíriť tak naše poznatky v oblasti rastlinnej hormonálnej regulácie.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Štruktúra a biologická aktivita cytokinínov

Cytokiníny (CK) sú nízkomolekulárne látky, patriace do skupiny fytohormónov, ktoré hrajú rôzne kľúčové úlohy počas celého života rastliny. Po štruktúrnej stránke sú CK N⁶ substituované adenínové deriváty. Najviac zastúpené sú CK s postranným reťazcom izoprenoidného typu, ale niekoľko rastlinných druhov obsahuje taktiež adenínové deriváty s aromatickými substituentmi. Okrem toho existujú syntetické CK, odvodené od difenylmočoviny (DPU), ktoré nie sú štruktúrne príbuzné k CK adenínového typu, ale sú vysoko biologicky aktívne. Najvýznamnejšími zástupcami CK sú izopentenyladenín (iP) s izoprenoidným postranným reťazcom a zeatín, ktorý má svoj izoprenoidný reťazec hydroxylovaný (Obrázok 1) (Haberer a Kieber, 2002). V závislosti na polohe hydroxylovej skupiny izoprenoidného postranného reťazca zeatínu rozlišujeme konfiguráciu *cis* a *trans* (Obrázok 2). Štruktúra a konformácia bočného reťazca sú kritické pre aktivitu príslušného CK. Napríklad jeden z najabundantnejších CK vo vyšších rastlinách, *trans*-zeatín (tZ), vykazuje vysokú CK aktivitu, avšak *cis*-zeatín (cZ) má výrazne nižšiu aktivitu v porovnaní s tZ (Haberer a Kieber, 2002) v *Arabidopsis*, ale naopak v jednoklíčnolistových rastlinách je cZ považovaný za aktívnu CK formu. Dvojitá väzba zeatínu je redukovaná v dihydrozeatíne (DHZ), ale redukovaný ekvivalent iP nebol v rastlinách dodnes detekovaný. Izoprenoidné CK sú v prírode veľmi rozšírené, zatiaľ čo aromatické CK boli po dlhú dobu považované za výlučne syntetické artefakty (Frébert *et al.*, 2011). Majú však iné spektrum aktivity, napríklad 6-benzylaminopurín (BAP) a jeho deriváty vykazujú významnú antisenescenčnú aktivitu (Doležal *et al.*, 2006)



Obrázok 1 – Najvýznamnejšie prirodzene sa vyskytujúce CK *trans*-zeatín (tZ) a izopentenyladenín (iP), upravené podľa El-Showk *et al.*, 2013

alebo izopentenyladenín ribozid 5'-trifosfátu (iPRTP) (Kakimoto, 2001). V tejto dráhe dochádza k hydroxylácii izopentenylového postranného reťazca cytochróm P450 monooxygenázou (CYP). Dve CYP v *Arabidopsis*, CYP735A1 a CYP735A2, konvertujú iP nukleotidy na tZ nukleotidy (Obrázok 3) (Takei *et al.*, 2004) a sú regulované viacerými hormónmi, naznačujúc tak, že CYP735A1/2 sú dôvodom „crosstalku“ viacerých hormonálnych signalizačných dráh. Napríklad CK sú zodpovedné za zvýšenú expresiu CYP735A1/2, zatiaľ čo kyselina indol-3-octová (IAA) a kyselina abscisová (ABA) redukovujú hladinu ich expície (Takei *et al.*, 2004).

Izopentenyltransferáza, kódovaná génom „*tumour morphology root*“ (*Tmr*) v bunkách infikovaných *Agrobacterium tumefaciens*, dokáže katalyzovať N-prenyláciu HMBDP s AMP, pričom dochádza k priamej tvorbe *trans*-zeatín ribozid 5'-monofosfátu (tZRMP), namiesto izopentenyladenín ribozid 5'-monofosfátu (iPRMP) (Obrázok 3). Táto dráha je nezávislá na CYP735A1/2 hydroxylácii (Obrázok 3) (Sakakibara *et al.*, 2005).

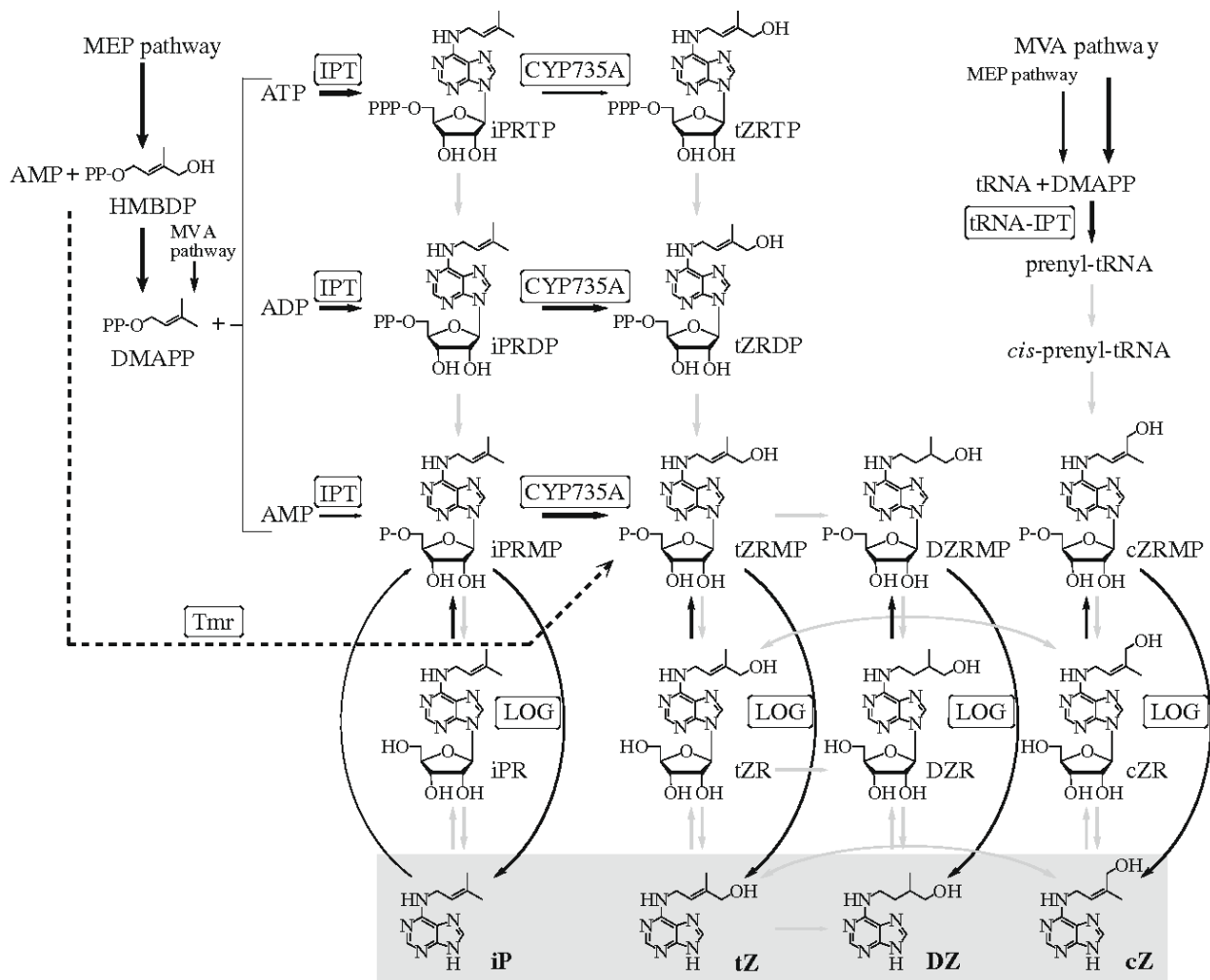
Mutácie v *IPT* génoch majú za následok fenotypy s pozmeneným vetvením, zvýšeným koreňovým rastom a redukovaným obsahom izopentenyladenín ribozidu (iPR) a tZ (Sun *et al.*, 2005; Miyawaki *et al.*, 2006). Vzorec expície *IPT* génov naznačuje, že hlavným miestom tvorby cytokinínov je koreňový apikálny meristém, ich biosyntéza prebieha tiež v embryách, mladých listoch, v pletive vajíčok, v plodoch a všade tam, kde dochádza k bunkovému deleniu (Miyawaki *et al.*, 2004).

CK sú biologicky aktívne iba vo forme voľných báz. Ďalším krokom teda musí byť premena z neaktívnej (ribozidovej) na aktívnu (voľnú) formu. Tvorba voľných báz môže prebiehať jedнокrokovým alebo dvojkrokovým mechanizmom. Jedнокrokový mechanizmus je katalyzovaný produktom génu *LONELY GUY (LOG)*, teda cytokinín 5'-monofosfát fosforibohydrolázy (Kuroha *et al.*, 2009). Dvojkrokový mechanizmus vyžaduje hydrolytické štiepenie fosfátu z ribotidu enzýmom fosfohydrolázou. Vytvára sa tak ribozidová forma, z ktorej je následnej samotný ribozid vyštiepený nukleozidázou (Obrázok 3) (Chen a Kristopeit, 1981a; Chen a Kristopeit, 1981b).

2.2.2 Nepriama biosyntetická dráha cytokinínov

Molekuly tRNA sú charakteristické pre svoje časté úpravy, je známych viac ako 50 rozlične modifikovaných nukleotidov v sekvenciách týchto nukleových kyselín. Krátko po objavení CK sa predpokladalo, že tRNA predstavujú hlavný zdroj CK, pretože

izoprenoidné cytokiníny boli identifikované v hydrolyzátoch tRNA (Skoog *et al.*, 1966). Pozície 34, kolísavá pozícia antikodónu a pozícia 37, susediaca s 3'-koncom antikodónu, sú najčastejšími miestami modifikácií. CK sa vyskytujú iba v tRNA rozpoznávajúcich kodóny, ktoré začínajú uridínom (U-skupina tRNA; nesúce cysteín, leucín, serín, fenylalanín, tryptofán alebo tyrozín) (Armstrong *et al.*, 1969). V prípade, že sú CK v tRNA prítomné, vyskytujú sa v jej molekule iba jedenkrát a to výhradne modifikáciou adenínu v pozícii 37 (A37). Prvý krok modifikácie A37 na CK nukleozid je katalyzovaný tRNA Δ^2 -isopentenylpyrofosfáttransferázou (tRNA-IPT), ktorá prenáša izopentenyllovú skupinu (DMAPP) na A37, produkujúc tak cZRMP (Obrázok 3) (Mok a Mok, 1994). V genóme *Arabidopsis thaliana* sa nachádzajú dva gény kódujúce tRNA-IPT (*IPT2* a *IPT9*), pričom ich expresia nie je pletivovo špecifická (Miyawaki *et al.*, 2006). Táto nepriama dráha následne zahŕňa uvoľňovanie CK rozpadom tRNA. Hoci málo aktívny cZ predstavuje hlavný CK tejto nepriamej dráhy, môže byť jednoducho premenený na vysoko aktívny tZ *cis-trans* izomerázou (Bassil *et al.*, 1993). Napriek tomu, že existencia tohto dôležitého enzýmu zapojeného do CK metabolizmu bola všeobecne akceptovaná rastlinnými biológmi, zodpovedajúci proteín a kódujúci gén neboli doteraz identifikované (Hluska *et al.*, 2017).



Obrázok 3 – Súčasný model izoprenoidných CK biosyntetických dráh vo vyšších rastlinách a v infikovaných bunkách *Agrobacterium tumefaciens*. Izoprenoidný postranný reťazec iP a tZ pochádza predovšetkým z MEP dráhy, zatiaľ čo postranný reťazec cZ pochádza z MVA dráhy. IPT vo vyšších rastlinách preferujú využitie izoprenoidných akceptorov ADP a ATP a katalyzujú N-prenyláciu za využitia DMAPP, produkujúc tak iPRTP a iPRDP. iP nukleotidy sú následne s vyššou afinitou pre iPRDP a iPRMP, ako iPRTP, konvertované CYP735A1/2 na odpovedajúce tZ nukleotidy. Defosforylácia fosfatázou môže byť katalyzovaná di- alebo trifosforylovaných CK nukleozidov. V bunkách infikovaných *Agrobacterium tumefaciens*, Tmr kódované baktériou sprostreduje N-prenyláciu AMP s HMBDP, produkujúc tZRMP (prerušovaná šípka). tRNA-IPT katalyzuje prenyláciu tRNA, ktorá vedie k produkcii cZRMP. CK-nukleozid 5'-monofosfáty môžu byť priamo premieňané na aktívne formy CK pomocou enzýmu LOG. cZ a tZ môžu byť medzi sebou enzymaticky konvertované zeatín *cis-trans* izomerázou. Gény enzýmov podieľajúcich sa na fosforylácii iPR a konjugácii fosforibozylových skupín na iP sú adenosínkináza (AK) a adenín fosforibozyltransferáza (APRT). APRT využíva nielen iP, ale aj iné CK nukleobázy. Šírka čiar indikuje silu metabolického toku. Šedé šípky ukazujú tok, v ktorom ešte neboli identifikované príbuzné enzýmy. V chemických vzorcoch je fosfát skrátene na P, prevzaté z Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009

2.3 Degradácia a inaktivácia cytokinínov

CK obsah v rastlinných tkanivách môže byť kontrolovaný ireverzibilnou degradáciou alebo inaktiváciou (Obrázok 4).

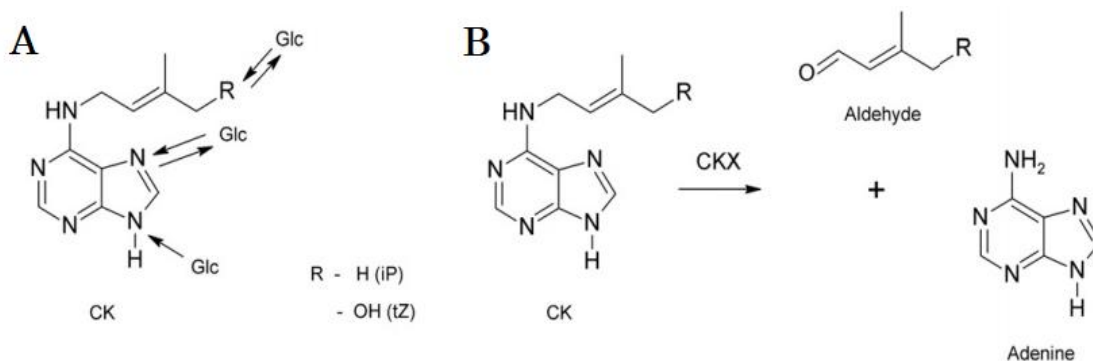
Enzým zodpovedný za CK degradáciu je cytokinín dehydrogenáza (CKX).

Degradácia CK je dosiahnutá oxidačným štiepením bočného reťazca N⁶, čo vedie k tvorbe adenínu (alebo jeho zodpovedajúceho derivátu pre N⁹-substituované cytokiníny) a aldehydu odvodeného z postranného reťazca (Frébort *et al.*, 2011). Predpokladalo sa, že tento enzým funguje výlučne ako oxidáza a bol nesprávne klasifikovaný ako med' obsahujúca amínoxidáza. Neskôr sa ukázalo, že CKX obsahuje kovalentne viazaný flavínadenín dinukleotid (FAD) ako kofaktor. Reakcia prebieha dehydrogenáciou CK na imínový medziprodukt, keď akceptor elektrónov odoberá dva elektróny z FAD kofaktoru. Po celé roky sa predpokladalo, že molekulárny kyslík je nevyhnutný pre aktivitu CKX, ale rôzne typy iných elektrónových akceptorov, najmä chinónové typy ako 2,3-dimetoxy-5-metyl-1,4-benzochinón (Q0), fungujú účinnejšie (Galuszka *et al.*, 2001). CKX sa skladajú z dvoch domén pre väzbu FAD a dvoch substrát väzbových domén. Približne jedna tretina všetkých aminokyselín je vysoko konzervovaná medzi rôznymi proteínmi CKX. FAD-väzbová doména obsahuje veľké množstvo konzervovaných oblastí, krátke vysoko konzervované sekvencie sú tiež umiestnené aj na N- a C-konci tohto motívu. Konzervovanosť aminokyselinových zvyškov naznačuje ich možný funkčný význam pri rozpoznávaní substrátu a pri elektrónovom transporte (Schmülling *et al.*, 2003; Frébort *et al.*, 2011).

Molekula CK môže byť deaktivovaná konjugáciou s cukrom v reakcii katalyzovanej UDP-glykozytransferázou (UGT). V tejto reakcii je uridíndifosfát (UDP) donorom cukru pre konjugáciu CK (Bowles *et al.*, 2006).

Konjugácia môže nastať v O- a N-polohe CK, čím sa vytvárajú rôzne typy glykozidov (Obrázok 4). Predpokladá sa, že cytokinín N⁷- a N⁹-glukozidy sú konečnými produktmi ireverzibilnej inaktívácie (Letham a Palni, 1983; Blagoeva *et al.*, 2004). Ireverzibilnosť N-glukozylácie je podporovaná rezistenciou na deglykozylačné enzýmy.

Ukázalo sa, že O-glukozidy sú reverzibilne deglykozylované β-glukozidázou (Brzobohatý *et al.*, 1993), a preto sa predpokladá, že slúžia ako neaktívne skladovacie CK formy. Všetky formy CK glukozidov môžu byť všeobecne rezistentné voči účinku CKX, hoci bolo zistené, že niektoré z N⁹-glukozidov sú metabolizované *in vitro* rekombinantnými proteínmi CKX a dva z nich dokonca uprednostňujú izopentenyladenín N⁹-glukozid (iP9G) ako substrát v kyslom prostredí (Galuszka *et al.*, 2007).



Obrázok 4 – Schéma znázorňujúca CK inaktiváciu (A) a degradáciu (B). CK môžu byť reverzibilne glykozylované (Glc) na N7-, N9- alebo O- (v prípade tZ) pozícii UDP-glykozyltransferázou (UGT), čo vedie k ich inaktivácii. Spätná aktivácia (deglykozylácia) je katalyzovaná CK-špecifickou beta-glukozidázou len v N7- a O- polohách. CK sú ireverzibilne degradované cytokinín-dehydrogenázou (CKX), upravené podľa Zalabák *et al.*, 2013

2.4 Transport cytokinínov

Cytokiníny (CK) sú distribuované prostredníctvom vaskulárneho systému a spúšťajú odpoveď cieľových buniek prostredníctvom signálnej transdukcie, sprostredkovanej receptorom (Hwang a Sheen, 2001). Signál je terminovaný účinkom extra- alebo intracelulárnych cytokinín oxidáz/dehydrogenáz (CKX) (Werner *et al.*, 2006). Zatiaľ čo všetky tieto aspekty pôsobenia CK v rastlinách už boli do značnej miery charakterizované, ich samotný transport predstavuje značne neprebádanú oblasť.

Nakoľko priama biosyntetická CK dráha katalyzovaná izopentenyltransferázami (IPT) je pletivovo a bunkovo špecifická, CK musia byť transportované do cieľových buniek difúziou a/alebo selektívnymi transportnými systémami. Vzory priestorovej expresie rôznych CK-príbuzných promotor-reportérových génov napovedajú, že CK môžu pôsobiť ako autokrinné, parakrinné alebo diaľkové signály (Hirose *et al.*, 2008). Keďže CK predstavujú mobilnú triedu fytohormónov, je pravdepodobné, že u vyšších rastlín musia zákonite existovať aj rôzne importné a exportné systémy pre ich translokáciu cez plazmatickú membránu (Cedzich *et al.*, 2008). Domnelé transportéry CK, ktoré boli doteraz identifikované, zahŕňajú ekvilibratívne nukleozidové transportéry (ENT), purínové permeázy (PUP) a „G subfamily ATP-binding cassette“ (ABCG) transportéry (Kudo *et al.*, 2010).

2.5 ABCG transportéry a diaľkový transport cytokinínov

ABCG patria do podrodiny „ATP-binding cassette“ (ABC) transportérov. ABC transportéry sa vyskytujú vo všetkých ríšach a uľahčujú transport veľkého množstva

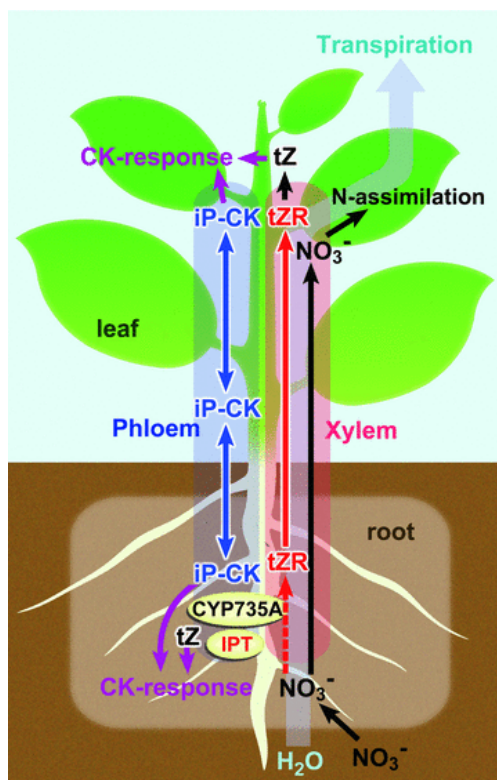
substrátov cez membrány pomocou hydrolyzy adenosíntrifosfátu (ATP) ako zdroja energie (Theodoulou, 2000). Skladajú sa z dvoch nukleotidových väzbových domén (NBD) a dvoch transmembránových domén (TMD). NBD obsahujú všetky sekvenčné motívy potrebné pre hydrolyzu ATP, zatiaľ čo TMD sú zložené zo 4-10 α -helixov, ktoré tvoria substrátovú translokačnú dráhu cez lipidovú dvojvrstvu. Domény ABC transportérov môžu byť kódované jedným génom („full size“), dvomi génmi („half size“), kedy sú jedna NBD a jedna TMD sfúzované na jednom géne a viacerými génmi, kedy sú všetky domény kódované oddelenými génmi (Schmitt a Tampé, 2002). ABC proteínová rodina je významne zastúpená v rastlinách. V genóme *Arabidopsis thaliana* sa nachádza približne 130 členov AtABC proteínovej rodiny (Verrier *et al.*, 2008).

AtABC proteíny sú klasifikované do ôsmich podrodín (AtABCA-AtABCG, AtABCI), pričom najväčšiu podrodinu predstavujú „G subfamily ATP-binding cassette“ (AtABCG) (Kang *et al.*, 2011). AtABCG majú reverznú orientáciu domén (N-terminálna NBD miesto TMD) v porovnaní s ostatnými AtABC podrodinami. Podrodina AtABCG sa skladá z 28 „half size“ a 15 „full size“ transportérov (Verrier *et al.*, 2008). Ich potenciálne úlohy zahŕňajú detoxikáciu ťažkých kovov (Lee *et al.*, 2005), odpoveď na patogénov (Bultreys *et al.*, 2009) a tvorbu fyzických bariér (Bessire *et al.*, 2011; Alejandro *et al.*, 2012). Členovia AtABCG podrodiny a predovšetkým „full size“ transportéry zohrávajú významnú úlohu pri transporte rôznych rastlinných hormónov (Ito a Gray, 2006; Kang *et al.*, 2010; Růžička *et al.*, 2010; Kretschmar *et al.*, 2012), vrátane CK (Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Ešte donedávna sa predpokladalo, že diaľkový transport CK u vyšších rastlín je sprostredkovaný xylémom (Beveridge *et al.*, 1997). Systémová translokácia CK bola skúmaná stopovacími „tracer“ experimentami. Napriek tomu, že rádioaktívne CK aplikované do listov boli silne zachované v mieste aplikácie, malá časť označených CK bola premiestnená aj do iných častí rastliny (Vonk a Davelaar, 1981). Dnešná predstava diaľkového transportu, založená na vrúbľovacích experimentoch, nastoluje myšlienku, že cytokiníny tZ typu sú transportované z koreňa do nadzemnej časti xylémom (akropetálny transport), zatiaľ čo cytokiníny iP typu sú transportované z nadzemnej časti do koreňa floémom (bazipetálny transport) (Borghini *et al.*, 2015). Merania hladín CK skutočne ukázali, že hlavnú formu CK v xylémovej šťave predstavuje tZR (Beveridge *et al.*, 1997), pričom vo floémovej šťave sú zastúpené prevažne cytokiníny iP typu, ako izopentenyladenín ribozid (iPR) a iP ribotidy (Corbesier *et al.*, 2003). Z toho môže vyplývať predstava, že rastliny využívajú *trans*-zeatín ribozid (tZR) ako

akropetálneho posla, zatiaľ čo cytokiníny iP typu ako bazipetálnych poslov (Obrázok 5) (Kudo *et al.*, 2010).

Transport CK na veľké vzdialenosti je kľúčovým krokom v regulácii rastu a vývoja rastlín. Mechanizmus diaľkového transportu CK v rastlinách však ostával po dlhú dobu neobjavený. V roku 2014 boli vydané dve publikácie, ktoré identifikovali AtABCG14 ako možný CK transportér (Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Obidve publikácie túto hypotézu potvrdili na sebe nezávislými experimentami. Bolo zistené, že umlčané mutantné línie *abcg14* majú menšie listy, kratšie a tenšie kvetné stopky v porovnaní s divým typom. Navyše počet, ako aj veľkosť xylémových a floémových buniek boli v mutantných líniách silne redukované. Mutantné línie *abcg14* predstavovali fenokópie mutantných línií s vyradenými génmi pre CK biosyntézu alebo CK receptory. Navyše ošetrovanie pomocou tZ malo za následok obnovenie fenotypu podobného divému typu, čo podporilo myšlienku, že AtABCG14 by mohol sprostredkovať diaľkový transport cytokinínov tZ typu z koreňa do nadzemných častí rastliny. Stanovenie obsahu CK v koreni a nadzemnej časti ukázalo, že hladiny cytokinínov tZ typu boli znížené v nadzemnej časti a naopak zvýšené v koreňoch mutantných rastlín. Experimenty so značenými cytokinínmi tZ typu aplikovanými do koreňov mutantných línií *abcg14* ukázali, že tieto CK boli transportované do nadzemnej časti v oveľa menšej miere oproti divému typu, čo potvrdzuje rolu AtABCG14 ako transportéra zodpovedného za translokáciu cytokinínov tZ typu z koreňa do nadzemnej časti (Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).



Obrázok 5 – Model transportu CK na veľké vzdialenosti v rastlinnom cievnom systéme. V xyléme (bledočervený stĺpec) je tZR hlavným transportovaným CK. Vo floéme (modrý stĺpec) sú iP-typy hlavnými transportovanými CK. Dusičnany indukujú expresiu *IPT3* (červené písmo), čo následne zvýši translokáciu tZR xylémom (červená prerušovaná šípka). Cytokinín hydroxylázy CYP735A1 a CYP735A2 sú zapojené do syntézy tZR. Xylémové CK (tZR) sú translokované akropetálne (červená šípka) transpiračným prúdom (azúrová šípka). Dusičnany sú taktiež transportované xylémom (čierna šípka), následne sú asimilované do aminokyselín v listoch. Floémové CK (cytokiníny iP typu) sú transportované systémovo alebo bazipetálne (modrá šípka). Biosyntéza CK a odpoveď (fialové šípky) sa objavujú na mnohých miestach v celej rastline. Prevzaté z Kudo *et al.*, 2010

Mnohé otázky týkajúce sa diaľkového transportu CK ešte čakajú na svoju odpoveď. AtABCG14 pravdepodobne predstavuje hlavného zástupcu diaľkových CK transportérov, nie je však vylúčené, že by sa na tomto procese mohlo zúčastňovať aj niekoľko ďalších transportérov z rodiny PUP (Borghini *et al.*, 2015).

2.6 Purínové permeázy (PUP)

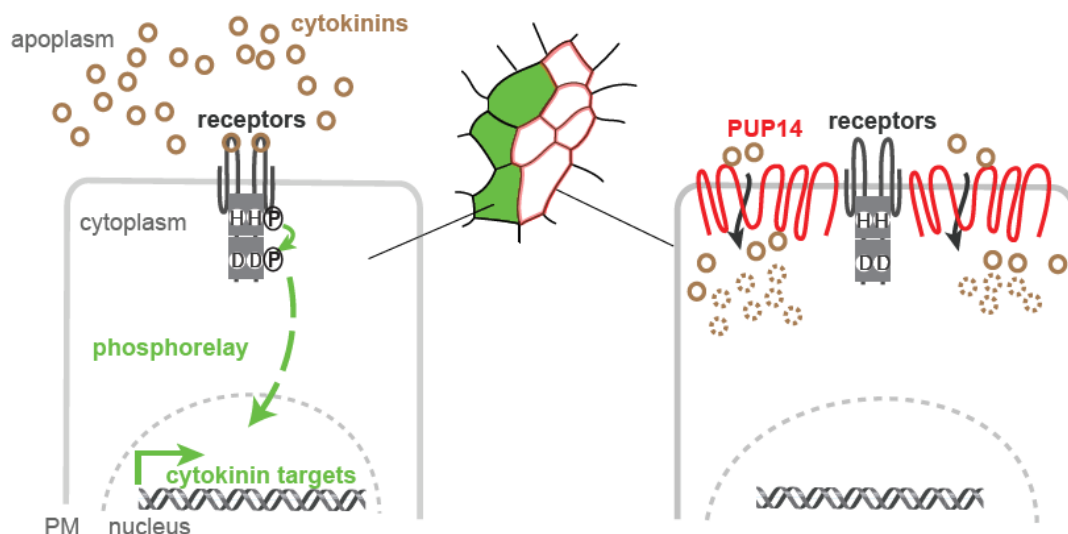
PUP predstavujú veľkú génovú rodinu, kódujúcu triedu malých integrálnych membránových proteínov. Homológy členov tejto rodiny boli identifikované vo viacerých rastlinných druhoch, ako napríklad banán, ryža, kukurica, tabak alebo rajčiak (Girke *et al.*, 2014), ako aj v baktériách a živočíchoch (Gillissen *et al.*, 2000). V *Arabidopsis* je známych 21 „PUP-like“ proteínov s 9-10 α -helixami (Schwacke *et al.*, 2003). Transport sprostredkovaný PUP pravdepodobne funguje na báze substrát-

protónového symportu (Obrázok 6) (Gillissen *et al.*, 2000). Prvý PUP transportér (AtPUP1) bol identifikovaný pomocou *Arabidopsis* cDNA komplementačného testu kvasinkovej mutantnej línie *fcy2*, deficientnej v príjme adenínu (Gillissen *et al.*, 2000). Kompetitívne testy ukázali, že okrem samotného adenínu je AtPUP1 schopný transportovať kinetín a zeatín, v menšej miere aj ich ribozidy (Gillissen *et al.*, 2000). Následné analýzy transportnej funkcie ďalších dvoch členov tejto rodiny, AtPUP2 a AtPUP3, ukázali, že zatiaľ čo v prípade AtPUP3 nebolo možné získať žiadne dôkazy o jeho transportnej funkcii, v prípade AtPUP2 bola zistená transportná funkcia pre rôzne CK, napríklad tZ, cZ, kinetín, BAP, iP a v menšej miere tiež tZR. *AtPUP1*, *AtPUP2* a *AtPUP3* sú exprimované v odlišných rastlinných pletivách. *AtPUP1* je vysoko exprimovaná predovšetkým v listoch, stonkách, kvetoch, epitéme hydátód a na povrchu stigmatických šesúl, čo naznačuje úlohu pri získavaní CK z xylémovej šťavy, aby sa zabránilo ich strate počas gutácie. *AtPUP2* je exprimovaná prevažne v cievnom systéme listu, kvetoch a koreňoch, pričom expresia je obmedzená na floém, čo poukazuje na úlohu pri diaľkovom transporte adenínu a CK. *AtPUP3* je exprimovaná výhradne v peli (Bürkle *et al.*, 2003). PUP sú prítomné iba v cievnatých rastlinách a sú schopné transportovať aj iné molekuly, ako napríklad kofeín, nikotín alebo pyridoxín (Gillissen *et al.*, 2000; Szydlowski *et al.*, 2013).

Identifikácia PUP transportérov v ryži odhalila možnú vývojovú úlohu OsPUP7. Spomedzi dvanástich identifikovaných PUP homológov v ryži, bola schopnosť selektívne transportovať CK doposiaľ preukázaná iba u OsPUP7, vďaka experimentom s *ospup7* T-DNA inzerčnou líniou, ktorá vykazovala jasné fenotypové zmeny a zvýšenú citlivosť na abiotické stresy (osmotický a soľný stres) a rastlinné hormóny (ABA a BAP). Autori naznačili, že podobné fenotypové zmeny ako u *ospup7* sú rovnako pozorované u rastlín s nadexpresiou *IPT*, *CKX* alebo CK receptorov (Yang *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2001; Galuszka *et al.*, 2004; Kurakawa *et al.*, 2007). Mutantná línia *ospup7* mala navyše pozmenené hladiny iP a iPR v nezrelých kláskoch, zatiaľ čo hladiny tZ a tZR neboli nijak ovplyvnené. Tieto výsledky naznačovali, že OsPUP7 má selektívnu transportnú aktivitu pre CK a ich deriváty (Qi a Xiong, 2013). Avšak to, ako pôsobenie PUP transportérov ovplyvňuje CK signalizačnú reakciu buniek počas rastlinného vývoja, nebolo odhalené.

Táto otázka bola zodpovedaná o tri roky neskôr na základe experimentov s embryami *Arabidopsis thaliana* v srdcovitom štádiu („heart stage embryo“) a fúznym proteínom dvojzložkového signálneho senzoru citlivého na CK so zeleným

fluorescenčným proteínom (*TCSn::GFP*) (Zürcher *et al.*, 2013). *TCSn* je syntetický reportér, ktorý odráža transkripčnú aktivitu *Arabidopsis* regulátorov odpovedi typu B (ARR-B). Po ošetrení BAP, GFP signál expandoval z prokambia do iných pletív. Nadbytok CK však neindukoval expresiu *TCSn::GFP* v bunkách budúcich kľúčnych listov, aj napriek tomu, že v nich dochádza k expresii *Arabidopsis histidínkinázy 4* (*AHK4*). Pre overenie funkčnosti signalizácie od receptora bola použitá nadepresia „*CYTOKININ INDEPENDENT 1*“ (*CKII*). *CKII* kóduje hybridnú kinázu s CK nezávislou konštitutívnou aktivitou (Deng *et al.*, 2010). Jej krátkodobá expresia spôsobila všadeprítomnú aktiváciu *TCSn::GFP*. Tieto výsledky spoločne naznačujú, že bunky budúcich kľúčnych listov nedokážu aktivovať CK signalizáciu napriek funkčnému signálnemu systému, dokonca ani po pridaní aktívneho ligandu. Preto autori predpokladali, že za nedostatok aktivácie *TCSn::GFP* môžu byť zodpovedné CK transportéry. Pre overenie, či niektorý z členov rodiny PUP môže byť zodpovedný za pozmenenú CK signalizačnú reakciu buniek budúcich kľúčnych listov, boli analyzované ich transkripčné profily. Expresia PUP14 prevládala vo všetkých analyzovaných orgánoch a štádiách, vrátane embryí. Pre stanovenie expresie *PUP14* boli analyzované transgénne rastliny *PUP14::PUP14:GFP*. V srdcovitom štádiu embrya bol PUP14-GFP lokalizovaný v bunkách, ktoré neodpovedali na CK, vrátane buniek budúcich kľúčnych listov. Umlčanie *PUP14* použitím umelej mikroRNA (*amirPUP14*) spôsobila ektopickú CK signalizáciu v bunkách budúcich kľúčnych listov, čo naznačuje, že PUP14 by skutočne mohol obmedzovať CK signalizáciu. Bol navrhnutý model pôsobenia PUP14, v ktorom PUP14 odčerpáva CK z apoplastu a znemožňuje im tak prístup k CK receptorom lokalizovaným na plazmatickej membráne a následný prenos signálu (Obrázok 6). Tento model predpokladá extracelulárne CK viažuce sa na väzbové domény receptorov lokalizovaných na plazmatickej membráne, ktoré sú dôležité pre iniciáciu signálnej odpovedi, zatiaľ čo cytoplazma predstavuje záchyt bioaktívnych ligandov. Na testovanie tejto hypotézy boli porovnávané účinky odlišne zacielených CKX enzýmov na cytokinínovú signalizačnú reakciu. Enzymatická degradácia CK pomocou CKX2 so sekrečným signálom, ako aj príjem CK z apoplastu do buniek sprostredkovaný PUP14, mali podobný účinok na CK signalizačnú odozvu. Oproti tomu varianta CKX2, s chýbajúcim N-terminálnym signálnym peptidom (Δ SP-CKX2) a ani CKX7, ktorá taktiež lokalizuje v cytoplazme, neovplyvnili CK odpoveď, čo naznačuje, že apoplastické CK, a nie cytoplazmatické CK, sú zodpovedné za iniciáciu CK signalizácie v *TCSn:GFP* línii (Zürcher *et al.*, 2016; Durán-Medina *et al.*, 2017).



Obrázok 6 – Model funkcie AtPUP14 v CK signalizácii. PUP (červená) spôsobuje translokáciu apoplastických do cytoplazmy, kde sú konvertované na inaktívne formy (bodkované kruhy). Následkom translokácie CK z apoplastu dovnútra bunky dochádza k umlčovaniu CK signalizácie, pretože väzba CK na CK receptory lokalizované na plazmatickej membráne je redukovaná a tým aj prenos CK signálu (zelenou je vyznačená CK signalizačná aktivita). PM: plazmatická membrána, prevzaté zo Zürcher *et al.*, 2016.

2.7 Ekvilibratívne nukleozidové transportéry (ENT)

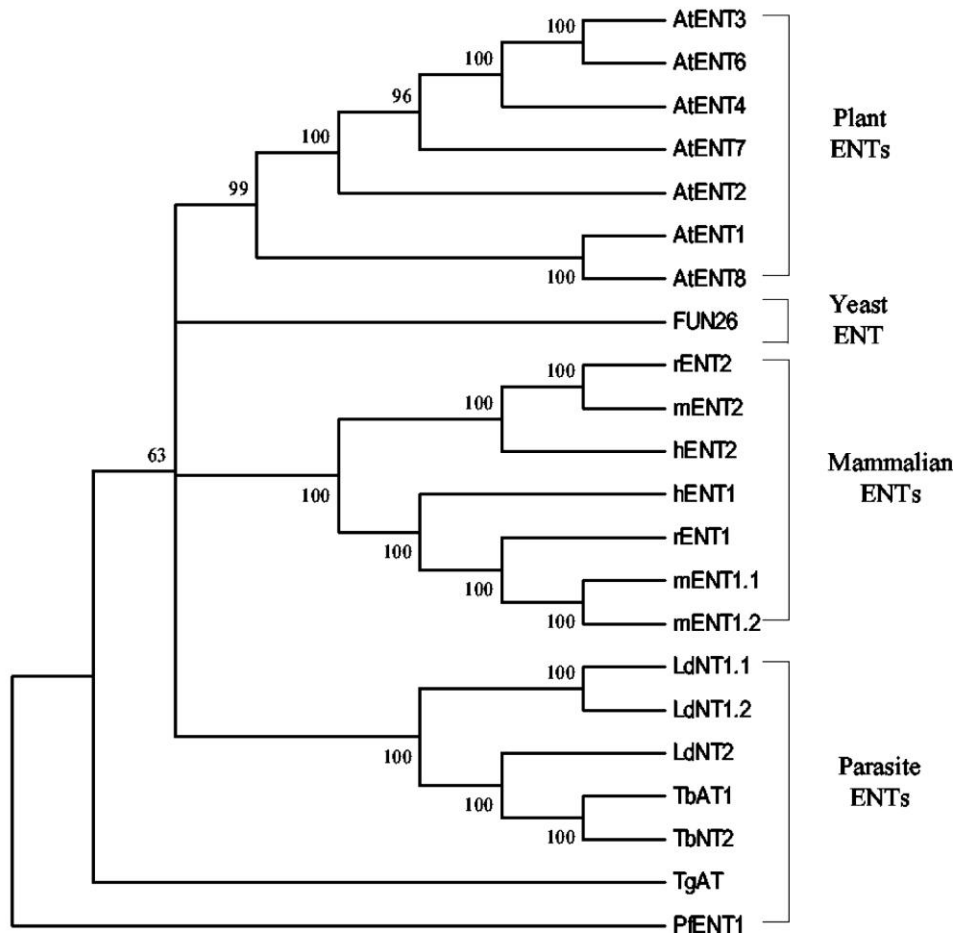
Nukleozidové a nukleobázové transportéry hrajú kľúčové úlohy v mnohých aspektoch fyziológie eukaryot. Nukleozidový a nukleobázový príjem je nevyhnutný pre recyklačnú „salvage“ dráhu syntézy nukleotidov v bunkách, ktoré nemajú *de novo* purínové biosyntetické dráhy (Hyde *et al.*, 2001). U eukaryot existujú dve génové rodiny nukleozidových transportérov: ekvilibratívne nukleozidové transportéry (ENT) a koncentračné nukleozidové transportéry (CNT). ENT proteíny sprostredkujú transport uľahčenou difúziou, zatiaľ čo CNT proteíny sú kationové symportéry (Hyde *et al.*, 2001). Napriek názvu rastlinných ENT, väčšina z nich katalyzuje protón-nukleozidový kotransport, čím sa funkčne podobajú CNT (Möhlmann *et al.*, 2001; Wormit *et al.*, 2004; Traub *et al.*, 2007).

AtENT predstavujú jedinečnú rodinu proteínov bez zjavnej sekvenčnej homológie k ostatným typom transportérov (Hyde *et al.*, 2001). Sprostredkujú distribúciu purínových a pyrimidínových nukleozidov a ich derivátov cez plazmatickú membránu (Griffith a Jarvis, 1996). Vo všeobecnosti majú ENT širokú substrátovú špecifickosť

(Hyde *et al.*, 2001; Cabrita *et al.*, 2002). Ich transportné procesy sú rozdielne inhibované nukleozidovými analógmi (napríklad nitrobenzylmerkaptopurín ribonukleozid; NBMPR) alebo vazodilatačnými liečivami (napríklad dipyridamol, dilazep, draflazín). ENT typu *es* sú citlivé na inhibíciu pomocou NBMPR, zatiaľ čo ENT typu *ei* túto citlivosť nevykazujú (Griffith a Jarvis, 1996).

ENT boli v rastlinách prvýkrát identifikované ako domnelé nukleozidové transportéry vykazujúce podobnosť s ľudskými transportérmi hENT1 a hENT2, s lokalizáciou na plazmatickej membráne (Li a Wang, 2000).

V genóme *Arabidopsis thaliana* sa nachádza 8 známych ENT izoforiem (AtENT1-8). AtENT môžu byť rozdelené do dvoch podskupín, pričom do prvej by patrili AtENT1 a 8, zatiaľ čo do druhej by mohli byť zaradené AtENT 2, 3, 4, 6 a 7 (Obrázok 7), čo naznačuje, že môže existovať genetická a/alebo funkčná diferenciácia medzi ENT pochádzajúcich z jedného rastlinného druhu (Li *et al.*, 2003). Členovia tejto rodiny majú typicky 11 predpokladaných transmembránových domén a sú evolučne príbuzní k prokaryotickým nukleozidovým transportérom (Acimovic a Coe, 2002). Niektoré nukleozidové transportéry prvokov, katalyzujúce adenosín-protónový symport, vykazujú štruktúrnu podobnosť s AtENT (Mäser *et al.*, 1999).



Obrázok 7 - Fylogenetické vzťahy siedmich AtENT k cicavčím, kvasinkovým a parazitným ENT, so známymi transportnými aktivitami, rENT – potkaní ENT, mENT - myší ENT, LdNT - *L. donovani* nukleozidový transportér, PfENT - *Plasmodium falciparum* ENT, TbAT – *Trypanosoma brucei brucei* adenozinový transportér, TbNT - *T. brucei brucei* nukleozidový transportér, TgAT - *Toxoplasma gondii* adenozinový transportér, FUN – „function unknown now“, prevzaté z Li *et al.*, 2003

Nakoľko ENT sprostredkujú taktiež transport nukleozidových derivátov, hypotéza o transporte neaktívnych (transportných) foriem CK u rastlín sa javila ako veľmi pravdepodobná. Zistenie, že mutácia génu *AtENT8* mala za následok potlačenie pozmeneného fenotypu CK-nadproduktujúcich rastlín, spolu s charakterizáciou *AtENT6* a *OsENT2* v kvasinkovom expresnom systéme, poskytli dôkaz o úlohe ENT pri transporte CK (Sun *et al.*, 2005).

2.7.1 AtENT1

ENT1 z *Arabidopsis thaliana* bol prvým identifikovaným členom ENT rodiny u rastlín (Li a Wang, 2000). 428 aminokyselín dlhá sekvencia predikovaná z *AtENT1* cDNA vykazovala významnú podobnosť hneď s niekoľkými ENT. *AtENT1* mal 24 % podobnosť s *hENT1*, 25 % s *hENT2*, 24 % s potkaniami *rENT1* a 26 % s *rENT2*, 22 %

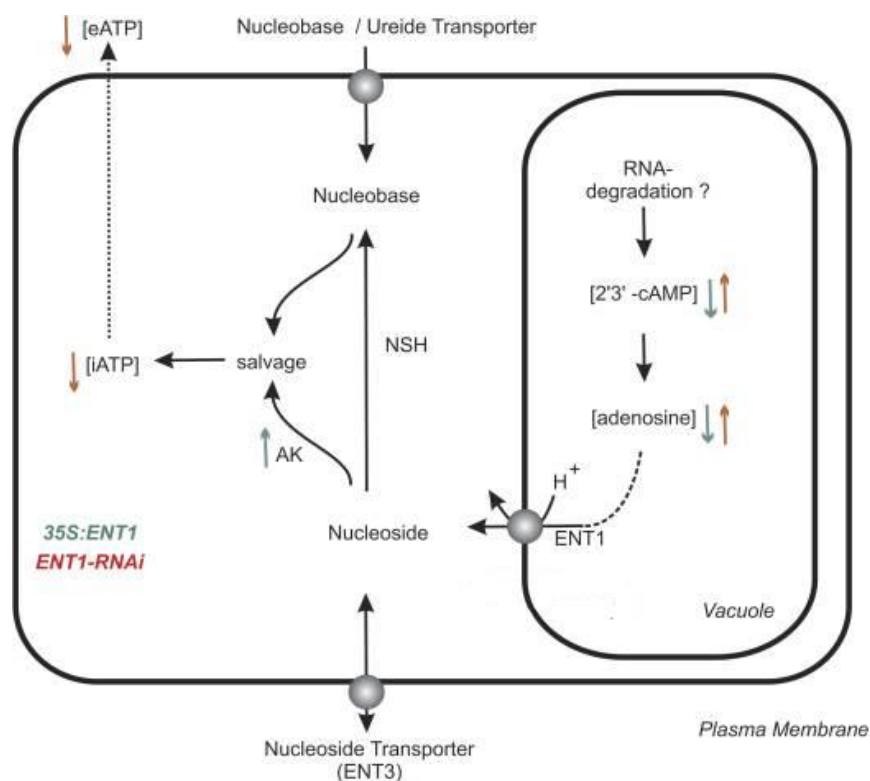
s *Leishmania donovani* nukleozidovým transportérom 1 (LdNT1), 21 % s *Trypanosoma brucei* nukleozidovým transportérom 2 (TbNT2) (Li a Wang, 2000). AtENT1 bol identifikovaný funkčnou komplementáciou kvasinkovej mutantnej línie W303 a predstavuje prvý rastlinný nukleozidový transportný proteín, ktorý bol popísaný na biochemickej úrovni. Vzhľadom k biochemickým analýzam katalyzuje nukleozid-protónový symport. AtENT1 vykazuje vysokú afinitu k adenzínu, ktorá je inhibovaná na 21 % – 76 % zvyškovú aktivitu purínovými a pyrimidínovými nukleozidmi, ako aj 2'-deoxyribonukleozidmi. Takže AtENT1 je s najväčšou pravdepodobnosťou transportný proteín so širokou substrátovou špecifickosťou (Möhlmann *et al.*, 2001). AtENT1 bol exprimovaný takmer vo všetkých rastlinných orgánoch, výrazne zvýšená expresia bola identifikovaná v peľi (Bernard *et al.*, 2011).

Analýza vakuolárneho proteómu ukázala, že AtENT1 sa pravdepodobne nachádza na tonoplaste (Jaquinod *et al.*, 2007), priamy dôkaz o lokalizácii pomocou GFP *in planta* však stále chýba.

Ako protónový symportér by AtENT1 mohol plniť exportnú funkciu nukleozidov z vakuoly do cytosolu, čo otvára ďalšie otázky ohľadom fyziologickej funkcie tohto nukleozidového transportéru (Bernard *et al.*, 2011).

Bernard *et al.*, 2011 rovnako predkladajú hypotézu, v ktorej by AtENT1 mohol plniť úlohu vakuolárneho exportéra adenzínu a ďalších nukleozidov, pochádzajúcich z vakuolárnej RNA degradácie. Tieto nukleozidy môžu byť následne recyklované účinkom nukleozidových kináz alebo zosúladeným účinkom nukleozidovej hydrolázy (NSH) a adenín-fosforibozyltransferázy (APRT). Recyklačné reakcie ovplyvňujú intra- a extracelulárne úrovne ATP. Extracelulárne hladiny ATP spoločne s účinkami cytosolického adenzínu negatívne pôsobia na S-adenozylmetionín-závislé (SAME) metylačné reakcie (Obrázok 8), vyvolávajú tak pozorované fenotypové zmeny ENT1 ulmčianých línií, ako napríklad redukovaný rast, redukované klíčenie peľu a tetrádový vzhľad zrelého peľu (Bernard *et al.*, 2011).

Je zaujímavé, že hoci AtENT1 nevykazuje významnú transportnú aktivitu iPR na úrovni buniek (Sun *et al.*, 2005), jeho transkripty sa v značnej miere nachádzajú vo vegetatívnych, ako aj reprodukčných orgánoch (Li *et al.*, 2003; Hirose *et al.*, 2005).



Obrázok 8 - Model akcie AtENT1 vysvetľujúci fenotypové zmeny *AtENT1* nadexprimujúcich a umlčaných línií, prevzaté z (Bernard *et al.*, 2011). Šípky indikujú zvýšenie a zníženie enzýmových aktivít (AK), *35S:ENT1* línia (zelená), *ENT1-RNAi* mutantné línie (červená). AK – adenzínkináza, NSH – nukleozidhydroláza, iATP – interný ATP, eATP – externý ATP, upravené podľa Bernard *et al.*, 2011

2.7.2 AtENT3

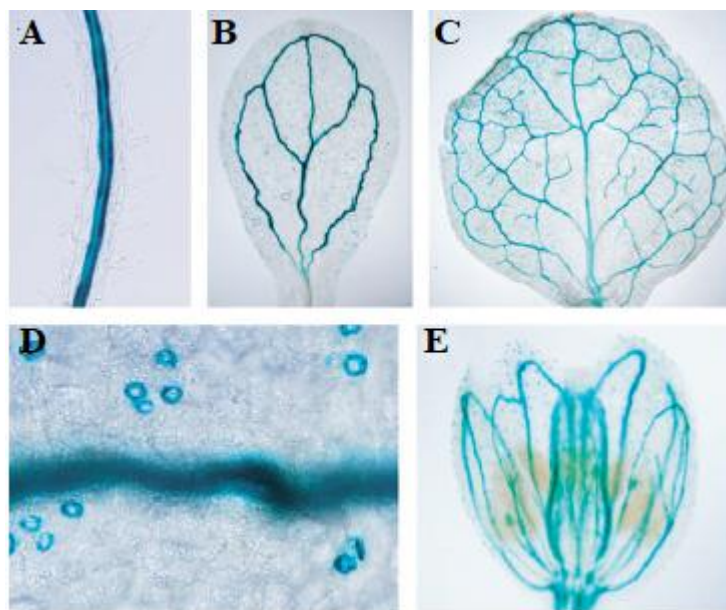
AtENT1 a *AtENT3* vykazujú spomedzi členov *AtENT* rodiny najvyššiu expresiu, predovšetkým v koreňoch. Zatiaľ čo *AtENT1* je exprimovaný predovšetkým v elongačnej zóne koreňov, koreňovej kôre, koreňových vláskoch a hydratódach plne vyvinutých listov (Li *et al.*, 2003), *AtENT3* v koreňových špičkách, cievach koreňov a listov, listovom primordiu, kvetoch a šešulách (Li *et al.*, 2003; Traub *et al.*, 2007; Cornelius *et al.*, 2012). Transportné procesy sprostredkované týmito dvomi transportérmi vykazujú rôzne odlišnosti. Protonofory karbonyl kyanid *m*-chlorofenylhydrazón (CCCP) a dinitrofenol (DNP) inhibovali adenzínový transport *AtENT1* takmer o 100 % (Möhlmann *et al.*, 2001), zatiaľ čo inhibícia adenzínového alebo uridínového transportu *AtENT3* bola len približne 10 % v prípade CCCP a 35 % v prípade DNP (Li *et al.*, 2003). Transport adenzínu *AtENT3* bol čiastočne inhibovaný nanomolárnymi koncentraciami dilazepu a dipyridamolu, pričom v prípade *AtENT1* tieto dve chemikálie adenzínový transport nijak významne neovplyvňovali (Li *et al.*, 2003). *AtENT3* je substrát-protónový symportér s lokalizáciou na plazmatickej

membráne (Traub *et al.*, 2007). Predstavuje taktiež hlavný transportér pre príjem uridínu koreňmi. Príjem nukleozidov semenáčikmi je takmer výlučne realizovaný činnosťou AtENT3 (Chen *et al.*, 2006).

Pre odhalenie fyziologických funkcií AtENT boli použité ich rôzne T-DNA inzerčné línie, ktoré klíčili v prítomnosti toxického uridínového analógu 5-fluoruridínu. Jedine *ent3-1* T-DNA inzerčná línia bola schopná rásť v prítomnosti tohto analógu, bez akéhokoľvek narušenia jej funkcií. Príjem 5-fluoruridínu je v tejto mutantnej línii účinne zablokovaný, z čoho vyplýva, že *ent3-1* je deficientná v pyrimidínovom nukleozidovom transporte a zároveň žiadny iný AtENT nie je schopný kompenzovať stratu funkčného AtENT3 proteínu (Traub *et al.*, 2007). Mutantná línia *ent3* vykazovala zníženú citlivosť na nukleozidové typy CK (iPR a tZR), čo naznačuje, že AtENT3 môže hrať úlohu pri transporte nukleozidových foriem CK do bunky (Sun *et al.*, 2005).

2.7.3 AtENT6

Transportér AtENT6 bol prvým členom rodiny AtENT, u ktorého bola preukázaná možnosť transportu CK nukleozidov. AtENT6 vykazuje až 91 % sekvenčnú homológiu s AtENT3 (Li *et al.*, 2003) a taktiež sa nachádza na plazmatickej membráne (Wormit *et al.*, 2004). V kompetitívnej eseji za použitia expresného systému *Saccharomyces cerevisiae* bola pozorovaná významná inhibícia adenzínového importu pomocou iPR. Tieto biochemické údaje naznačujú, že AtENT6 by sa, rovnako ako jeho homológ AtENT3, mohol podieľať na transporte iPR. Zároveň vyššia afinita AtENT6 pre iPR ako pre tZR môže byť objasňovať priestorovú distribúciu iP a tZ typov CK. AtENT6 je exprimovaný v koreňových, listových a kvetných cievach a v prieduchoch (Obrázok 9) (Hirose *et al.*, 2008).



Obrázok 9 – Pletivovo špecifická expresia AtENT6 znázornená pomocou β -glukuronidázového (GUS) reportérového systému. A - koreň, B - kotyledon, C - list ružice, D – list ružice zblízka, E - kvet, prevzaté z Hirose *et al.*, 2008.

2.7.4 AtENT7

AtENT7, narozdiel od ostatných doposiaľ charakterizovaných členov AtENT rodiny, transport sprostredkovaný AtENT7 je protón-nezávislý a predstavuje tak prvého zástupcu sprostredkujúceho klasický ekvilibratívny typ transportu v tejto rodine. Výsledky biochemických testov ukazujú, že Kd pre interakciu medzi AtENT7-eGFP a adenosínom bola $1,12 \pm 0,19 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $8,11 \pm 1,74 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre guanozín; $87,60 \pm 15,50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre cytidín a $16,60 \pm 2,20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre uridín. Navyše bola u AtENT7 prvýkrát preukázaná afinita pre voľné bázy, s hodnotami Kd = $18,8 \pm 0,92 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre adenín, $13,50 \pm 1,87 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre guanín, $18,9 \pm 4,55 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre cytozín a $13,60 \pm 3,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pre uracil. Navyše vďaka expresii *AtENT7-eGFP* v systéme *P. pastoris*, ktorá poskytla miligramové množstvá čistého proteínu, bolo zistené, že AtENT7 sa vyskytuje vo forme stabilného homodiméru (Girke *et al.*, 2015).

Existencia vysokej afinity AtENT7 pre adenosín a schopnosť tohto proteínu transportovať voľné bázy napovedá, že AtENT7 môže taktiež zohrávať dôležitú úlohu v CK transporte.

2.7.5 AtENT8

AtENT8 vykazuje 47,6 % aminokyselinovú sekvenčnú podobnosť s AtENT1. Zároveň sú AtENT 2, 4, 6 a 7 medzi sebou príbuzné viac, ako ktorýkoľvek z nich k AtENT1

a AtENT8, na základe toho radíme AtENT1 a AtENT8 do spoločnej poskupiny (Obrázok 10) (Li *et al.*, 2003). Experimenty s AtENT8 v kvasinkovom expresnom systéme ukázali, že AtENT8 nie je schopný transportu žiadneho z piatich testovaných nukleozidov - adenzín, guanozín, cytidín, uridín (Wormit *et al.*, 2004) a tymidín (Chen *et al.*, 2006). Neskoršie experimenty nakoniec našli chýbajúce dôkazy o transportnej funkcii AtENT8. Analýza T-DNA inzerčnej línie *SOI33/AtENT8* ukázala, že táto mutantná línia spôsobuje zníženú citlivosť na nukleozidové typy CK, iPR a tZR. Nadexpresia AtENT8, rovnako ako príbuzného AtENT3, má za následok hypersenzitivitu na iPR, ale nie na iP. Mutácie v génoch kódujúcich tieto dva transportéry spôsobujú podstatne znížený príjem iPR, čo dokazuje, že skutočne majú transportné aktivity špecifické pre CK (Sun *et al.*, 2005).

AtENT3 a AtENT8 majú odlišné expresné vzory (Li *et al.*, 2003), čo môže naznačovať rozdielne pôsobenie týchto dvoch transportérov počas rastu a vývoja rastlín (Sun *et al.*, 2005).

2.7.6 Ľudské nukleozidové transportéry

Transportné proteíny, sprostredkujúce prenos nukleozidov cez bunkové membrány, sú u ľudí klasifikované do dvoch skupín: prvú tvoria ekvilibratívne nukleozidové transportéry (hENT, rodina *SLC29*), umožňujúce uľahčenú difúziu pozdĺž koncentračného gradientu, zatiaľ čo členovia druhej skupiny koncentračných nukleozidových transportérov (hCNTs, rodina *SLC28*) sú schopní transportu nukleozidov proti koncentračnému gradientu (Baldwin *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 2004). Tieto dve rodiny sú štruktúrne nepríbuzné nukleozidové transportéry s prekrývajúcou sa substrátovou špecifickosťou. hCNTs sú evolučne konzervované substrát-protónové alebo substrát-sodíkové symportéry, pričom hENT predstavujú na sodíku nezávislé uniportéry (Young *et al.*, 2013).

V ľudskom genóme sa nachádzajú tri gény rodiny *SLC28* (*SLC28A1*, *SLC28A2* a *SLC28A3*), kódujúce tri hCNTs (hCNT1 - hCNT3) a štyri gény rodiny *SLC29* (*SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC29A3* a *SLC29A4*), kódujúce štyri odpovedajúce hENT proteíny (hENT1 – hENT4).

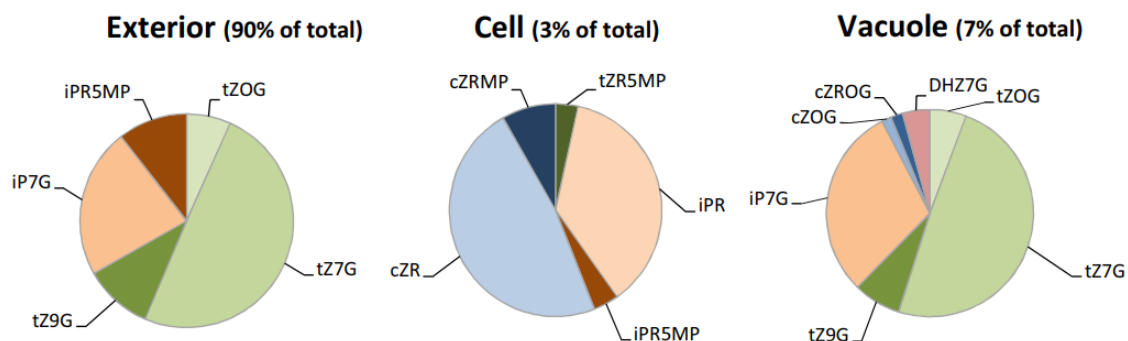
hCNTs sú typicky najviac abundantné v epitelochoch a iných špecializovaných bunkách, pričom katalyzujú transport nukleozidov a nukleozidových liečiv (Huang *et al.*, 1994). Všetky tri hCNTs transportujú uridín, ale majú rôzne preferencie pre iné substráty.

hCNT1 vykazuje selektivitu pre pyrimidínové nukleozidy, hCNT2 pre purínové nukleozidy a hCNT3 pre pyrimidínové, aj purínové nukleozidy. Medzi nukleozidy transportované pomocou hCNTs patria protirakovinové a antivírusové nukleozidové liečivá. Hoci neexistuje žiadny dôkaz, že by hCNTs boli zodpovedné za transport nukleobáz, niektoré štúdie spájajú zníženú expresiu hCNTs s rezistenciou na protirakovinné nukleobázové liečivá 5-fluorouracil, 6-merkaptopurín a 6-tioguanín (Gloeckner-Hofmann *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2008). hCNT3 má širšiu distribúciu v tkanivách v porovnaní s hCNT1 a hCNT2 (Ritzel *et al.*, 2001) a tiež možné úlohy vo vnútrobunkových kompartmentoch (Errasti-Murugarren *et al.*, 2008).

Ľudské ENT sú prítomné vo väčšine bunkových typov a tkanív. hENT1 a hENT2 transportujú široký rozsah purínových a pyrimidínových nukleozidov (Parkinson *et al.*, 2011). hENT3 je taktiež široko distribuovaný, s prevažne intracelulárnou funkciou, kde sa vo vyššej miere nachádza na lyzozomálnej membráne (Baldwin *et al.*, 2005). hENT4 sa nachádza na plazmatickej membráne mozgu a srdca a katalyzuje transport adenosínu a monoamínov (Barnes *et al.*, 2006). hENT1 a hENT2 transportujú mnohé terapeuticky významné antirakovinné nukleozidy a nukleobázové liečivá (Yao *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2011). hENT2 taktiež transportuje mnohé antivirálné nukleozidy (Baldwin *et al.*, 2005). hENT3 je selektívny pre purínové a pyrimidínové nukleozidy, taktiež adenosín a niektoré protirakovinné nukleozidové liečivá (Baldwin *et al.*, 2005). Narozdiel od hENT1 a hENT2, transport sprostredkovaný hENT3 je zvýšený pri nižšom pH, čo naznačuje, že tento transport by mohol byť sprážený s protónom. Podobne ako v prípade hENT3, aj transport sprostredkovaný hENT4 môže byť sprážený s protónom. hENT4 môže hrať úlohu pri regulácii extracelulárnych koncentrácií adenosínu v mozgu a srdci (Barnes *et al.*, 2006). Transport nukleozidových liečiv sprostredkovaný hENT4 stále čaká na svoje objasnenie (Young *et al.*, 2013).

2.8 Podiel a distribúcia cytokinínových foriem v bunke

Prírodné CK sa vyskytujú v štyroch základných formách: 1) nukleotidy, ktoré sú produkované počas *de novo* biosyntézy a následne sú konvertované na ostatné deriváty, 2) voľné bázy, ktoré majú najvyššiu aktivitu (Romanov *et al.*, 2006), 3) ribozidy, ktoré ako transportné formy (Hirose *et al.*, 2008) a 4) glukozidy, ktoré predstavujú zásobné (inaktivované) formy (Moore, 2012). Štruktúrne modifikácie CK priamo ovplyvňujú ich biologické aktivity a schopnosť väzby na receptory (Jiskrová *et al.*, 2016).



Obrázok 10 - Kompozícia hlavných CK foriem (95 % všetkých CK) v extracelulárnom priestore, intracelulárnom priestore (s výnimkou vakuol) a vakuolách listov divého typu *Arabidopsis*, upravené podľa Jiskrová *et al.*, 2016.

Hladiny aktívnych CK v bunke môžu byť znížené konjugáciou s glukózou alebo ireverzibilným štiepením, ktoré je katalyzované prostredníctvom CKXs. N-glykozylácia CK sa vyskytuje primárne na dusíkoch v polohách N^7 alebo N^9 purínového kruhu.

K O-glykozylácií dochádza na kyslíku postranných reťazcov zeatínu alebo dihydrozeatínu (DHZ). O-glykozylované formy môžu byť konvertované na aktívne CK pomocou β -glukozidáz (Brzobohatý *et al.*, 1993), preto sú O-glykozylované CK považované za stabilné skladovacie formy CK. Glukozylované konjugáty CK nie sú schopné väzby na cytokinínové receptory *Arabidopsis* histidínkinázy (AHKs) (Spíchal *et al.*, 2004).

Vďaka svojej biologickej stabilite sú glukozidy najviac zastúpenou zložkou CK derivátov. Predpokladá sa, že tieto glukozidy sú sekvestrované vo vakuole. Okrem toho ribozidácia a ribotidácia katalyzovaná enzýmami purínovej recyklačnej dráhy prispievajú k cyklovaniu CK prostredníctvom premeny aktívnych foriem späť na neaktívne prekurzory. Homeostáza CK aktivity je tak udržiavaná viacerými metabolickými systémami (Osugi a Sakakibara, 2015).

Hlavné typy CK sú distribuované v závislosti od svojej funkcie. Výsledky experimentu zameraného na kompartmentalizáciu najzastúpanejších typov CK ukazujú, že tZ a jeho deriváty sú lokalizované väčšinou extracelulárne, trans-zeatín O-glukozid (tZOG) a trans-zeatín N^7 -glukozid (tZ7G) sú prítomné vo vakuolách, iP a iPR sa vyskytujú prevažne intracelulárne, zatiaľ čo izopentenyladenín ribozid 5'-monofosfát (iPR5MP), izopentenyladenín N^7 -glukozid (iP7G) a izopentenyladenín N^9 -glukozid (iP9G) sú prítomné hlavne extracelulárne, iP7G sa vyskytuje taktiež aj vo vakuolách. cZ, cis-zeatín ribozid (cZR) a cis-zeatín ribozid 5'-monofosfát (cZRMP) sa vyskytovali intracelulárne, cis-zeatín O-glukozid (cZOG) a cis-zeatín ribozid-O-glukozid (cZROG)

hlavne extracelulárne a vo vakuolách. DHZ formy boli prítomné v relatívne malých množstvách, s výnimkou dihydrozeatín N7-glukozid (DHZ7G), ktorý bol distribuovaný vo vakuole. Glukózové konjugáty CK boli nájdené extracelulárne a vo vakuolách, nie však v bunke. Z celkového obsahu CK bolo približne 90 % distribuovaných v extracelulárnom priestore, 7 % vo vakuolách a iba 3 % CK sa vyskytovalo intracelulárne (Jiskrová *et al.*, 2016).

3 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

3.1 Biologický materiál

semená *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0)

semená *Arabidopsis thaliana*, T-DNA inzerčná línia *ent1* (SALK_025174)

semená *Nicotiana benthamiana*

chemokompetentné baktérie *Escherichia coli* TOP10

elektrokompetentné baktérie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

3.2 Chemikálie

10x Bolt Sample Reducing Agent – Thermo Fisher Scientific (USA)

2-(N-morfolín)etánsulfónová kyselina (MES) – Duchefa Biochemie (Holandsko)

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

3',5'-dimetoxy-4'-hydroxyacetofenón (acetosyringón) – Sigma-Aldrich (USA)

4x bolt – LDS sample buffer – Thermo Fisher Scientific (USA)

6-benzylaminopurín (BAP) – Sigma-Aldrich (USA)

Alfa Aesar Gellan Gum – Thermo Fisher Scientific (USA)

CaCl₂·2H₂O – Sigma-Aldrich

Deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTPs) – Sigma-Aldrich (USA)

Dimetylsulfoxid (DMSO) – New England Biolabs (UK)

D-manitol – Lachner (Česká republika)

Etanol – Lachner (Česká republika)

Etídium bromid – NeoLab (Nemecko)

Etyléndiaminotetraoctová kyselina (EDTA) – Penta (Česká republika)

Ficoll – Thermo Fisher Scientific (USA)

Glycín – Lachner (Česká republika)

Hydroxid draselný – Lachner (Česká republika)

Izopropanol – Lachner (Česká republika)

Kyselina chlorovodíková – Lachema (Česká republika)

Magnetické guľičky Agencourt RNAClean XP – Beckman coulter (USA)

Metanol – Lachner (Česká republika)

Murashige & Skoog including vitamins – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Na₂HPO₄·12H₂O – Lachner (Česká republika)

NaH₂PO₄·2H₂O – Lachema (Česká republika)

Neutral red – Sigma-Aldrich (USA)
Nuclease-free voda – Qiagen (Nemecko)
Oligo(dT) primer – Sigma-Aldrich (USA)
Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche Applied Science (Švajčiarsko)
Sacharóza – Lachner (Česká republika)
Sušené mlieko Laktino – Artifex (Česká republika)
trans-zeatín – Olchemim (Česká republika)
trans-zeatín ribozid – Olchemim (Česká republika)
Tween 20 – Sigma-Aldrich (USA)

3.2.1 Štandardy molekulovej hmotnosti

1 kb plus DNA ladder – Thermo Fisher Scientific (USA)
Novex Sharp Pre-stained Protein Standard – Thermo Fisher Scientific (USA)

3.2.2 Antibiotiká

Gentamycín – Duchefa Biochemie (Holandsko)
Kanamycín – Duchefa Biochemie (Holandsko)
Rifampicín – Duchefa Biochemie (Holandsko)

3.2.3 Enzýmy a enzýmové pufry

10x TURBO DNase buffer – Thermo Fisher Scientific (USA)
5x Green GoTaq Flexi buffer – Promega (USA)
5x Phusion HF buffer – New England Biolabs (UK)
5x RT Reaction Buffer – Thermo Fisher Scientific (USA)
Cellulase R-10 (>10 000 U/g) – Duchefa Biochemie (Holandsko)
Gateway BP Clonase II enzyme mix – Thermo Fisher Scientific (USA)
Gateway LR Clonase II enzyme mix – Thermo Fisher Scientific (USA)
GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (5 U/μl) – Promega (USA)
Macerozyme R-10 (>3 000 U/g) – Duchefa Biochemie (Holandsko)
Phusion HF (High-Fidelity) DNA polymerase (2 U/ml) – New England Biolabs (UK)
Proteinase K solution (2 μg/μl) – Thermo Fisher Scientific (USA)
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/μl) – Thermo Fisher Scientific (USA)

TURBO DNase (2 U/ μ l) – Thermo Fisher Scientific (USA)

3.2.4 Protilátky

Primárne protilátky:

Anti-GFP CHIP Grade – abcam (UK)

Anti-V-ATPase („Epsilon subunit of tonoplast H⁺ATPase“) – Agrisera (Švédsko)

Anti-Sar1 („secretion-associated and Ras-related protein 1“) – Agrisera (Švédsko)

Sekundárna protilátka:

Goat anti-rabbit IgG-HRP – Santa Cruz Biotechnology (USA)

3.3 Roztoky

3.3.1 Roztoky pre agarózovú elektroforézu

50x TAE pufor:

50 mol·l⁻¹ EDTA, 2 mol·l⁻¹ Tris, 1 mol·l⁻¹ kyselina octová

1 % (w/v) agarózový gél:

10 g agarózy na 1000 ml TAE puforu, uvarené v mikrovlnnej rúre

3.3.2 Roztoky pre izoláciu vakuol

0,5 mol·l⁻¹ EDTA (pH 8,0):

9,3 g EDTA v 50 ml Milli-Q H₂O, pH upravené pomocou 1M NaOH

1 mol·l⁻¹ D-manitol:

72,87 g D-manitol v 400 ml Milli-Q H₂O

50 mmol·l⁻¹ MES (pH 5,6):

2,132 g MES na 200 ml Milli-Q H₂O, pH upravené pomocou 1M KOH

0,1 % Neutral Red solution:

0,01 g neutrálna červená, 20 μ l 1 % kyselina octová, 5 μ l chloroform, Milli-Q H₂O do 10 ml

0,2 mol·l⁻¹ fosfátový pufo (pH 7,5):

Roztok A: 312,02 mg NaH₂PO₄·2H₂O na 10 ml Milli-Q H₂O

Roztok B: 716,28 mg Na₂HPO₄·12H₂O na 10 ml Milli-Q H₂O

0,8 ml roztoku A + 4,2 ml roztoku B

0,2 mol·l⁻¹ fosfátový pufo (pH 8,0):

Roztok A: 312,02 mg NaH₂PO₄·2H₂O na 10 ml Milli-Q H₂O

Roztok B: 716,28 mg Na₂HPO₄·12H₂O na 10 ml Milli-Q H₂O

265 µl roztoku A + 4735 µl roztoku B

Lyzačný pufo:

1,5 g Ficoll, 3 ml 1 mol·l⁻¹ D-manitol; 300 µl 0,5 mol·l⁻¹ EDTA (pH 8,0), 375 µl 0,2 mol·l⁻¹ fosfátový pufo (pH 8,0), 75 µl Neutral Red; Milli-Q H₂O do 15 ml; inkubované pri 37 °C

Vakuolárny pufo:

4,5 ml 1 mol·l⁻¹ manitol, 250 µl 0,2 fosfátový pufo (pH 7,5), 40 µl 0,5 mol·l⁻¹ EDTA (pH 8,0), Milli-Q H₂O do 10 ml; inkubované na ľade

4 % Ficoll

4,5 ml vakuolárny pufo, 3 ml lyzačný pufo, inkubované pri laboratórnej teplote

Premývací pufo:

40 ml 1 mol·l⁻¹ manitol, 20 ml 50 mmol·l⁻¹ MES (pH 5,6), 40 ml Milli-Q H₂O

Protoplastovací enzýmový roztok

30 mg celulóza, 55 mg macerozým, 120 mg CaCl₂·2H₂O; rozpustené v 30 ml premývacieho pufru; inkubované pri 37 °C

3.3.3 Roztoky a gély pre SDS-PAGE

Extrakčný pufo

4,4 g NaCl, 9 g Na₂HPO₄·12H₂O (pH 7,5), 75 µl triton X-100, 2,5 ml glycerol, ¼

tablety inhibítorov proteáz, Milli-Q H₂O do 250 ml

Komerčný vzorkovací pufo

4x Bolt LDS Sample Buffer – Bio-Rad (USA)

Komerčné redukčné činidlo

10x Bolt Sample Reducing Agent – Bio-Rad (USA)

3.3.4 Komerčné gély:

4–12 % Bolt Bis-Tris Plus gels – Bio-Rad (USA)

3.3.5 Roztoky pre Western blotting

10x prenosový pufo

30 g Tris, 144g glycín, Milli-Q H₂O do 1000 ml

1x prenosový pufo

100 ml 10x premývacieho pufru, 50 ml 100 % metanolu, Milli-Q H₂O do 1000 ml

10x TBS

24,22 g Tris, 87,66 g NaCl, Milli-Q H₂O do 800 ml, pH 7,2 – 7,4 (HCl), Milli-Q H₂O do 1000 ml

1x TBST

100 ml 10x TBS, 0,5 ml Tween 20, Milli-Q H₂O do 1000 ml

Blokovací pufo (5 % mlieko v 1x TBST)

7,5 g sušeného mlieka, 1x TBST do 250 ml

0,5 % mlieko v 1x TBST

200 µl 5 % mlieka v 1x TBST, 1x TBST do 2 ml

Protilátky v 0,5 % mlieku v 1x TBST:

Anti-GFP – 2 µl v 2 ml 0,5 % mlieka v 1x TBST (riedenie 1:1000)

Anti-V-atpase – 1 μ l v 2 ml 0,5 % mlieka v 1x TBST (riedenie 1:2000)

Anti-Sar1 – 4 μ l v 2 ml 0,5 % mlieka v 1x TBST (riedenie 1:500)

Komerčný chemiluminiscentný substrát pre HRP detekciu:

Clarity Western ECL Substrate – Peroxide solution a Luminol/enhancer solution – Bio-Rad (USA)

Komerčný elektroforetický pufor:

20x Bolt MES Running Buffer – Bio-Rad (USA)

3.3.6 Roztoky a médiá pre prácu s baktériami

Tekuté Luria Bertani (LB) médium:

10 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt, 10 g NaCl, Milli-Q H₂O do 1000 ml, sterilizované autoklávaním

LB agar:

1000 ml tekuté LB + 15 g agaru, sterilizované autoklávaním

SOC médium:

20 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt, 0,5 g NaCl, Milli-Q H₂O do 950 ml, 10 ml 250 mmol·l⁻¹ KCl (pH 7,0). Milli-Q H₂O do 1000 ml, sterilizované autoklávaním, 20 ml sterilnej 1 mol·l⁻¹ D-glukózy a 5 ml sterilného 2 mol·l⁻¹ MgCl₂

3.3.7 Roztoky pre výsev semien Arabidopsis

Murashige & Skoog (MS) médium:

4,3 g MS+vitamíny, 10 g sacharóza, 0,5 g MES, pH 5,7 (KOH), 8 g Gellan Gum, Milli-Q H₂O do 1000 ml, sterilizované autoklávaním

3.3.8 Roztoky pre tranzientnú transformáciu *Nicotiana benthamiana*

Infiltračné médium:

2,13 g MES, 2,03 g MgCl₂, 0,29 g acetosyringón, Milli-Q H₂O do 1000 ml

3.3.9 Roztoky pre stabilnú transformáciu Arabidopsis

Inokulačné médium:

2 g MgCl₂, 50 g sacharóza, 50 µl Silwet L-77, Milli-Q H₂O do 1000 ml

3.3.10 Roztoky pre purifikáciu cytokinínov z vakuol a protoplastov

Modifikovaný Bielecki roztok:

100 % metanol, H₂O, koncentrovaná kyselina mravčia, v pomere 15:4:1

Interný štandard

0,25 pmol CK báz (B), ribozidov (R), N7/N9-glukozidov (7G, 9G) a 0,5 pmol O-glukozidov (OG) a nukleotidov (NT)

3.3.11 Komerčné kity

Argentcourt RNAClean XP – Beckman Coulter (Nemecko)

Clarity Western ECL Substrate – Bio-Rad (USA)

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

QIAprep spin miniprep kit – Qiagen (Nemecko)

RNAqueous Total RNA Isolation Kit – Thermo Fisher Scientific (USA)

3.4 Primery

Lyofilizované primery – Sigma Aldrich (USA) boli podľa návodu rozpustené v uvedenom množstve nuclease-free vody pre získanie zásobnej koncentrácie 100 µmol·l⁻¹. Ďalej boli v čistej 1,5 ml mikroskúmavke 20x zriedené na pracovnú koncentráciu 5 µmol·l⁻¹.

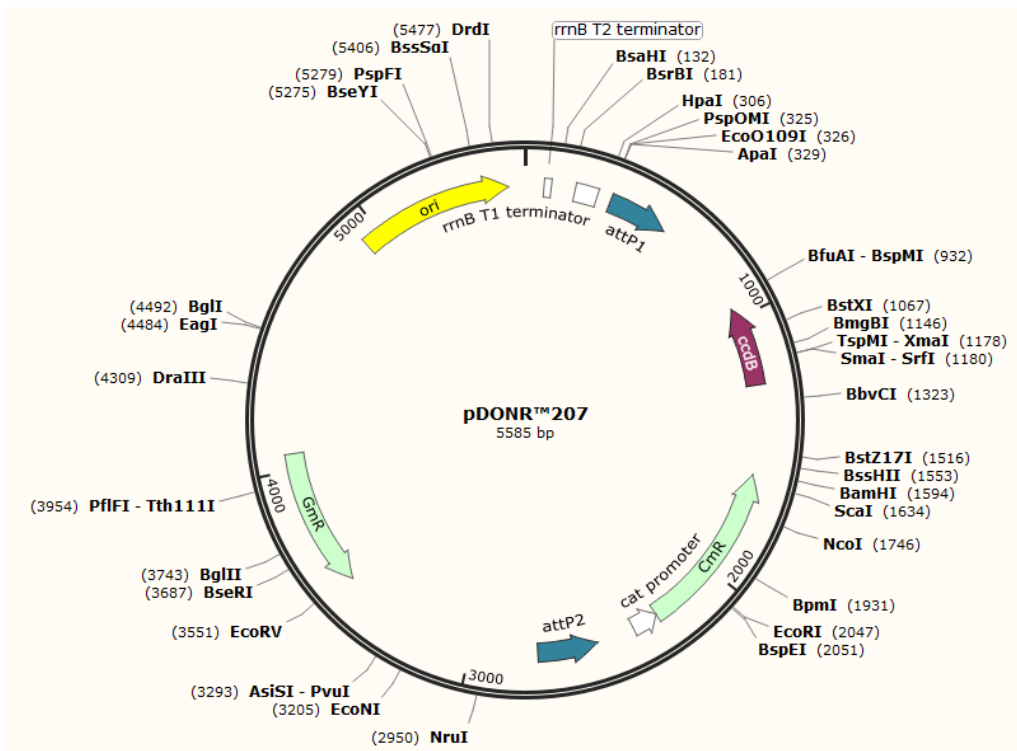
Všetky uvedené primery v Tabuľke 1 boli navrhnuté vedúcim práce na základe cDNA sekvencií jednotlivých génov *ENT* rodiny *A. thaliana*.

Tabuľka 1 - Zoznam použitých dvojíc primerov pre PCR amplifikáciu

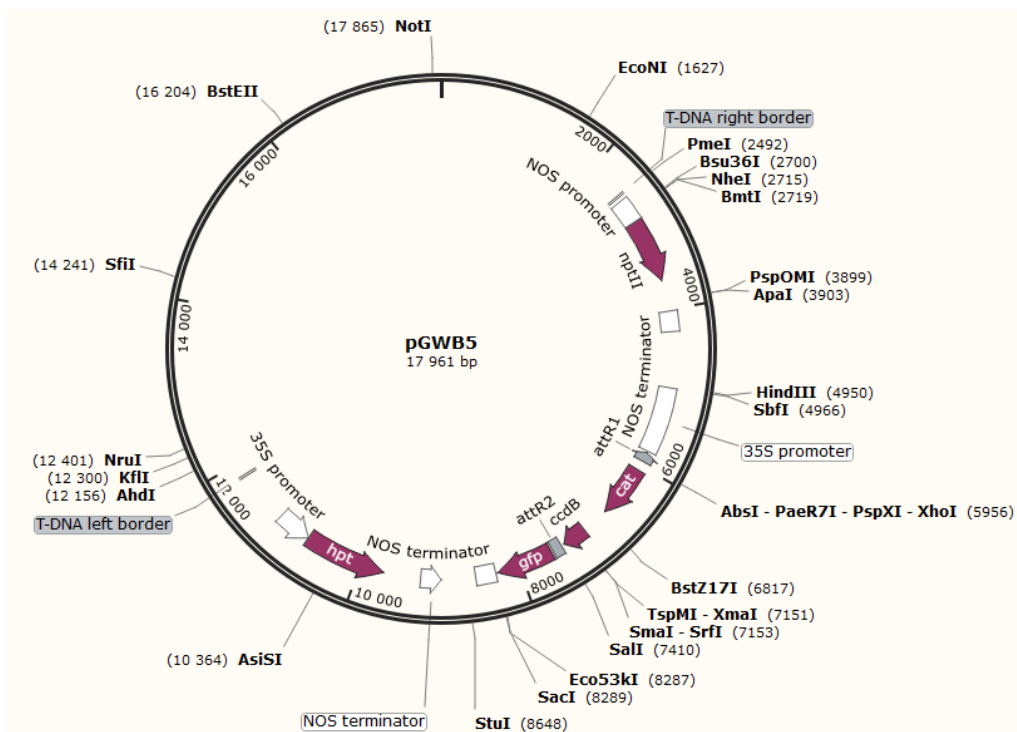
Názov primeru	Sekvencia
GWATTL1_FW	TTGTACAAAAAAGCAGGC
GWATTL2_RE	TTAGTACAAGAAAGCTGGG
ENT1_GWFW01	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAC TCCATTAGTCAACGAATTTC
ENT1_GWRE01	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAAT GACCCAGAACCAAGCAATG

Názov primeru	Sekvencia
ENT1_GWRE02	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAATGAC CCAGAACCAAGCAATG
ENT1_FW03	ATGACTCCCATTTAGTCAACGAATTTTC
ENT1_RE03	TCAAATGACCCAGAACCAAGCAATG
ENT1seqFW01	GACTAAAGCTGTGTATCCTCAAG
ENT1seqFW02	CTTGGTTGTTGGTTTGGCCTC
ENT1seqRE01	CATAACAACAATCCCCACAGC
ENT1seqRE02	GTGGTGGTCATTTGAATTTGTTTAG
ENT3_GWFW01	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGC GGATAGATATGAGAACCAAC
ENT3_GWRE01	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAAA GGCATTCTTCTTACCAATAAGC
ENT3_GWRE02	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAAGGC ATTCTTCTTACCAATAAGC
ENT3seqFW01	TCTGTGTGTTTCTATATGCTTATGTG
ENT3seqFW02	GGATATTTGCAGGAGTTGCTTTG
ENT3seqRE01	GATTTTGGATACCAGCAGCAG
ENT3seqRE02	CAAGAATACAGCAAACAACCATG
ENT6_GWFW01	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGC GGATATATACGAGCACC
ENT6_GWRE01	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAAA GGCATTCTTCTTACCAATAAGC
ENT6_GWRE02	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAAGGC ATTCTTCTTACCAATAAGC
ENT6seqFW01	AGGGGCAATGATGTTCTTAGC
ENT6seqFW02	AGGGATATTTGCAGGAGTTGC
ENT6seqRE01	CTGATTGATTTTGGATACCCGC
ENT6seqRE02	CCAAGAATACAGTAGACAATCATTG
pDONR201_207_FW	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
pDONR201_207_RE	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

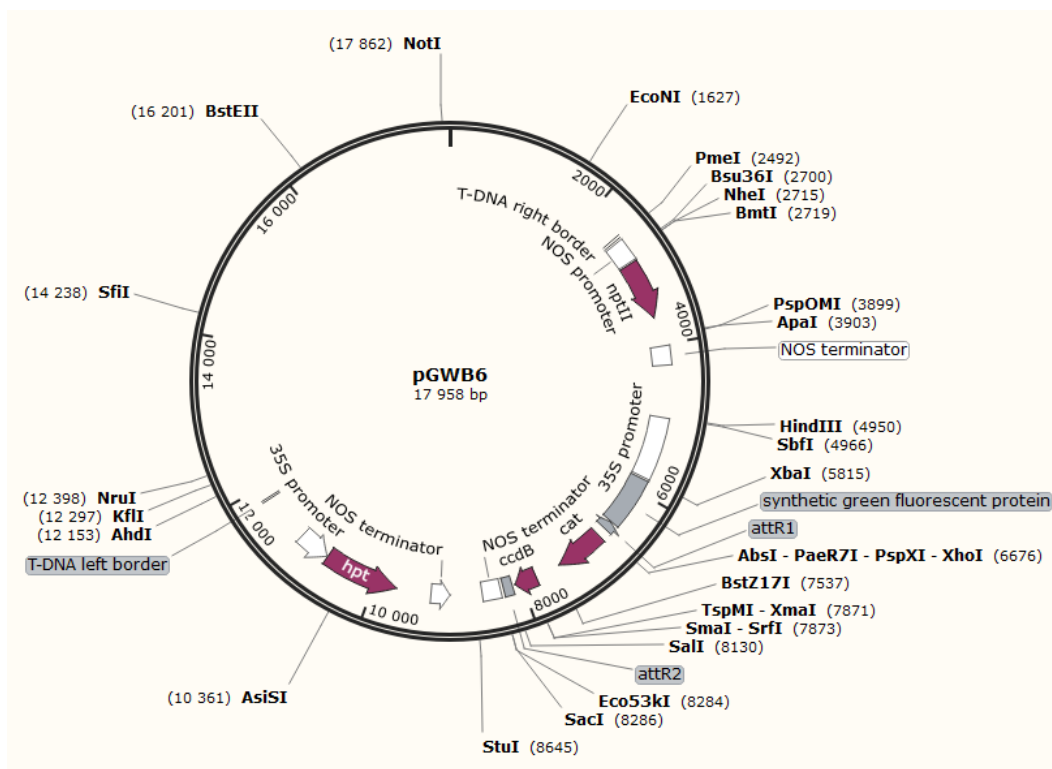
3.5 Vektory



Obrázok 11 – Mapa klonovacieho vektoru pDONR207 zobrazená pomocou programu SnapGene



Obrázok 12 – Mapa expresného vektoru pGWB5 zobrazená pomocou programu SnapGene



Obrázok 13 – Mapa expresného vektoru pGWB5 zobrazená pomocou programu SnapGene

3.6 Prístroje a pomôcky

Analytické váhy R 200 D – Sartorius (Nemecko)

Autokláv MLS 3020 – Sanyo (Nemecko)

Bunkový filter Falcon 100 µm cell strainer – Falcon (USA)

Bürkerova komôrka – Marienfeld (Nemecko)

Centrifúga Rotanta 460R – Hettich (Nemecko)

Centrifugačné filtry NanoSep (0,2 µm) – Pall Corporation (USA)

Digestor 1800/900M – Merci (Česká republika)

Elektroporátor ECM 399 – BTX (USA)

Fytotron – Weiss Technik (UK)

Horizontálna elektroforéza ENDURO Gel XL – Labnet (USA)

Chladená centrifúga Centrifuge 5427R – Eppendorf (Nemecko)

Chladená centrifúga ScanSpeed 1730R – Labogene (Dánsko)

Chladená centrifúga VWR Micro Star 17R – Avantor (USA)

Chladnička LCv 4010 – Liebherr (Švajčiarsko)

Chladnička ZT 155 AO TTI160C – Zanussi (Taliansko)

Inkubátor Incubat 85 – Melag (Nemecko)

Inkubovaná orbitálna trepačka Ecotron – Infors HT (Švajčiarsko)

Inkubovaná orbitálna trepačka SI600C – Stuart (UK)

Kolóna s reverznou fázou Acquity UPLC BEH C18, 1,7 µm, 150 × 2,1 mm – Waters (USA)

Konfokálny mikroskop LSM 710 – Zeiss (Nemecko)

Kvapalinová chromatografia Acquity UPLC I-class system – Waters (USA)

Magnetická miešačka RCT basic – IKA (Nemecko)

Magnetický stojan – Alpaqua (USA)

Micro Insert – Sigma-Aldrich (USA)

Mikroskop svetelný B-383PL – OPTIKA Italy (Taliansko)

Mikrovlnná rúra – Electrolux (Švédsko)

Mini Gel Tank – Thermo Fisher Scientific (USA)

Minicentrifúga/vortex CombiSpin FVL-2400N – Biosan (Lotyšsko)

Minitrepačka Thermomixer comfort – Eppendorf (Nemecko)

Mraznička GGU 1500 (143 LTR) – Liebherr (Švajčiarsko)

MS/MS Xevo TQ-S – Waters (USA)

NanoDrop One^C – Thermo Fisher Scientific (USA)

Orbitálna trepačka Orbit 1000 – Labnet (USA)

pH meter EDGE – Hanna Instruments (USA)

Pipety research 1000; 200; 20; 10µl; 2,5 µl – Eppendorf (Nemecko)

PlantScreenTM Robotic XYZ System – Photon Systems Instruments (Česká republika)

Predvážky Scout SKX 621 – OHAUS (USA)

Predvážky Scout SPX 6201 – OHAUS (USA)

Skener Epson Perfection V700 Photo – Epson (Japonsko)

SPE kolónky Oasis MCX Cartridges 1cc./30 mg, 100/PK – Waters (USA)

Spektrofotometer Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer – Agilent Technologies (USA)

Termoblok AccuBlockTM digital Dry Baths – Labnet (USA)

Termoblok TS-100C – Biosan (Lotyšsko)

Termocyklér Prime Full Size – Techne (UK)

Termocyklér TPersonal – Biometra (USA)

Termocyklér TProfessional – Biometra (USA)

Termocyklér Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler – Thermo Fisher Scientific (USA)

Transiluminátor ChemiDoc – Bio-Rad (USA)

Ultracentrifúga Micro Ultracentrifuge CS 150NX – Hitachi (Japonsko)

UV transiluminátor GBox – Syngene (Cambridge, UK)

Vákuové potrubie Supelco Visiprep SPE Vacuum Manifold – Sigma-Aldrich (USA)

Zdroj napätia pro elektroforézu – Biometra (Nemecko)

3.7 Software

ImageJ – National Institutes of Health (USA)

ImageLab – Bio-Rad (USA)

MassLynx – Waters (USA)

Microsoft Office Excel – Microsoft (USA)

SnapGene – GSL Biotech LLC (USA)

UV-Vis ChemStation Software – Agilent Technologies (USA)

WinRHIZO – Regent Instruments (Kanada)

ZEN blue/black – Zeiss (Nemecko)

3.8 Metódy

3.8.1 Sterilizácia semien

Pre výsev semien bolo pripravené Murashige a Skoog (MS) médium.

Výsevu semien Arabidopsis predchádzala ich sterilizácia. Semená boli vo flowboxe nasýpané do sterilnej 1,5 ml mikroskúmavky. Následne boli premývané roztokmi uvedenými v Tabuľke 2.

Tabuľka 2 - Postup sterilizácie semenien Arabidopsis

Zložka	Čas (min)
Etanol (70 %)	3
NaClO (16 %) + H ₂ O + Etanol (70 %) (5:4:1)	10
H ₂ O (3x premyť)	-

Do sterilnej 1,5 ml mikroskúmavky bol pridaný 70 % etanol a semená v ňom boli premývané po dobu troch minút. Následne bol etanol odpipetovaný a do 1,5 ml mikroskúmavky bol pridaný sterilizačný roztok 16 % NaClO + H₂O + 70 % etanol, v pomere 5:4:1. Sterilizačný roztok bol v 1,5 ml mikroskúmavke ponechaný po dobu 10 minút. Po uplynutí tejto doby bol sterilizačný roztok odpipetovaný a semená boli trikrát premyté sterilnou destilovanou H₂O.

3.8.2 Fenotypizácia nadzemnej časti T-DNA inzerčnej línie *ent1*

Pre fenotypizáciu nadzemnej časti T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) boli ako kontrola použité rastliny *Arabidopsis thaliana* Col-0. Semená a semenáčky *Arabidopsis* boli spracované a analyzované podľa (De Diego *et al.*, 2017). Sterilizované semená boli rovnomerne vysadené na Petriho misky s ½ MS médiom a ponechané 3 dni v tme, pri teplote 4 °C. Po troch dňoch boli Petriho misky s vysiatymi semenami umiestnené vertikálne do fytotronu (18 h svetlo/8 h tma) na dobu štyroch dní. Po štyroch dňoch boli semenáčky premiestnené na do multijamkových kultivačných doštičiek s čistým ½ MS médiom, ½ MS s prídavkom 10 nmol·l⁻¹ a ½ MS s prídavkom 100 nmol·l⁻¹. Pre prenos na kultivačné doštičky boli selektované semenáčky s približne rovnakou veľkosťou, pre získanie homogénnej populácie. Kultivačné doštičky so semenáčikmi boli na 24 h umiestnené do fytotronu s PlantScreen™ Robotic XYZ System pre aklimatizáciu. Štyri dni staré semenáčky *ent1* a Col-0 boli analyzované pomocou PlantScreen™ Robotic XYZ System po dobu 7 dní, každý deň vždy v rovnaký čas.

Fenotyp nadzemnej časti semenáčikov bol analyzovaný pomocou dvoch metód – meraním listovej plochy a relatívnej rýchlosti rastu (RGR).

RGR bola stanovená podľa vzorca:

$$RGR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$

ln – prirodzený logaritmus

t_1 – čas 1

t_2 – čas 2

W_1 – veľkosť v čase 1

W_2 – veľkosť v čase 2

Získané dáta boli štatisticky vyhodnotené pomocou dvojfaktorového ANOVA testu s opakovaním v programe MS Excel.

3.8.3 Fenotypizácia koreňovej časti T-DNA inzerčnej *ent1*

Pre fenotypizáciu koreňovej časti T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) *ent1* boli ako kontrola použité rastliny *Arabidopsis thaliana* Col-0. Sterilizované semená boli rovnomerne vysadené na Petriho misky s MS médiom a ponechané 3 dni v tme, pri teplote 4 °C. Po troch dňoch vernalizácie boli misky s vysadenými semenami umiestnené do fytotronu (16h svetlo/8h tma). Po týždni od umiestnenia do fytotronu boli tieto semenáčky presadené do jedného radu na štvorcové misky s čistým MS médiom ako aj na misky s obsahom cytokinínov (10 nmol·l⁻¹ BAP a 10 nmol·l⁻¹ tZR) vždy v počte troch semenáčikov Col-0 a troch *ent1* na jednu misku. Takto bolo pripravených 15 opakovaní. Štvorcové misky boli v oblasti koreňovej časti semenáčikov zakryté čiernou fóliou, aby došlo k eliminácii vplyvu svetla na rast koreňov. Korene boli približne po 14 dňoch snímané pomocou skeneru Epson Perfection V700 Photo a získané snímky boli analyzované pomocou programov WinRHIZO a ImageJ. Získané dáta boli štatisticky vyhodnotené metódou T-testu v programe MS Excel.

3.8.4 Izolácia celkovej RNA

Izolácia bola vykonaná pomocou RNAqueous izolačného kitu. Rastlinný materiál (celé semenáčky) bol rozdrvený v trecej miske pomocou tekutého dusíku. 100 mg rastlinného materiálu bolo navážených do 2 ml mikroskúmavky. K naváženému množstvu bolo pridaných 1000 µl Lysis/Binding Solution, vzorky boli zvortexované a umiestnené na dve minúty do termobloku (37 °C). Vzorky boli následne centrifugované (16 000×g, 4 °C), po dobu 10 minút. Následne bol supernatant odobraný do čistej 2 ml mikroskúmavky, kde bol k nemu pridaných 1000 µl 64 % etanolu. 700 µl vzniknutého lyzátu s etanolom bolo nanosených na kolónu, lyzát v kolonke bol centrifugovaný pri 4 °C a 10 000×g po dobu minimálne 15 s, zo zbernej skúmavky bola následne vyliata tekutina. Tento krok bol opakovaný až do nanesenia celého objemu lyzátu s etanolom na kolónu, vždy maximálne 700 µl. Tekutina pretečená kolónou bola zo zberných skúmaviek odliata. Následne bolo do kolóny napipetovaných 700 µl Wash

Solution 1, vzorky boli centrifugované (16 000×g, 4 °C) po dobu 15 s, tekutina pretečená kolónou bola zo zbernej skúmavky odliata. Do kolóny bolo následne napipetovaných 500 µl Wash Solution 2, s následnou centrifugáciou (16 000×g, 4 °C), po dobu 15 s, zo zberných skúmaviek bola vyliata tekutina pretečená kolónou. Tento krok bol opakovaný. Po vyliatí tekutiny pretečenej kolónou zo zberných skúmaviek boli vzorky znovu centrifugované (16 000×g, 4 °C), po dobu 30 s, aby došlo k odstráneniu reziduálneho etanolu. Kolóny boli následne umiestnené do čistých 1,5 ml mikroskúmaviek. Do stredu kolón bolo napipetovaných 60 µl predhriatej Elution Solution (80 °C), vzorky boli centrifugované (16 000×g, 21 °C), po dobu 30 s. Následne bolo do stredu kolóny pridaných ďalších 40 µl predhriatej Elution Solution a vzorky boli znovu centrifugované (16 000×g, 21 °C), po dobu 30 s. Koncentrácie izolovanej RNA boli premerané na spektrofotometre Nanodrop.

3.8.5 Ošetrovanie celkovej RNA DNázou

40 µl izolovanej RNA bolo odobraných do čistej 1,5 ml mikroskúmavky. K RNA bolo pridaných 5 µl 10x reakčného pufru pre DNázu a 3 µl DNázy, vzorky boli zvortexované alebo premiešané pipetovaním a inkubované pri teplote 37 °C, po dobu 45 minút. Po inkubácii boli pridané ďalšie 2 µl DNázy a vzorky boli inkubované ďalších 45 minút. Reakcia bola zastavená teplotnou inaktiváciou (75 °C, 10 minút). Následne bolo pridaných 5,5 µl 150 mmol·l⁻¹ EDTA.

3.8.6 Prečistenie RNA pomocou magnetických guličiek Agencourt RNAClean XP

Vzorky ošetrenej RNA boli prepipetované do 0,2 ml mikroskúmaviek, kde k nim bolo pridaných 25 µl magnetických guličiek a 20 µl 100 % RNase free izopropanolu, vzorky boli premiešané pipetovaním a inkubované pri laboratórnej teplote po dobu 10 minút. Následne boli vzorky umiestnené na magnetický stojan. Po 5 minútach bol vzniknutý supernatant opatrne odpipetovaný. Do mikroskúmavky bolo pridaných 200 µl 70 % RNase free etanolu, ktorý bol po 1 minúte odpipetovaný. Tento krok bol dvakrát opakovaný. Vzorky boli umiestnené na magnetický stojan, stojan bol následne umiestnený do digestoru na dobu minimálne 10 minút, aby došlo k odstráneniu reziduálneho etanolu. K vzorkám s dôkladne odstráneným etanolom bolo následne pridaných 15-30 µl nuclease-free H₂O a vzorky boli ponechané po dobu 10 minút na

PCR stojane. Následne boli vzorky znovu umiestnené na magnetický stojan a prečistená RNA bola prepipetovaná do čistých 1,5 ml mikroskúmaviek. Koncentrácie vzoriek prečistenej RNA boli premerané pomocou Nanodropu.

3.8.7 Reverzná transkripcia

Pre prepis RNA do cDNA bol program cykleru nastavený nasledovne:

- 1) 70 °C – 5 minút
- 2) 42 °C – 90 minút
- 3) 70 °C – 10 minút

Do 0,2 ml mikroskúmaviek bolo pridaných 5 µg celkovej RNA, v objeme 12 µl. Následne bol pridaný 1 µl oligo(dT) primeru ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a vzorky boli umiestnené do termocykleru s nastavenou teplotou 70 °C, po dobu 5 minút. Po piatich minútach boli vzorky vybrané a inkubované na ľade. Následne boli pridané ostatné zložky reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu: 4 µl 5x reakčného pufru, 2 µl dNTPs ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 1 µl reverznej transkriptázy RevertAid H Minus Reverse Transcriptase. Vzorky boli premiešané prepipetovaním a vložené do cykleru pre dokončenie prepisu. Po skončení programu boli vzorky vybrané a uložené do mraziaku (-80 °C).

3.8.8 Agarózová elektroforéza

Zo zásobného 50x TAE pufru bol pripravený pracovný 1x TAE pufr. 8 ml 50x TAE bolo doplnených do 400 ml destilovanou H₂O. Následne bola agaróza pripravená povarením štyroch gramov v 400 ml 1x TAE pufru. Pripravená 1 % agaróza bola naliata do elektroforetickej vaničky s hrebienkom, do agarózy bolo pridaných 10 µl EtBr. Po stuhnutí agarózy bol hrebienok vytiahnutý, vanička s gélom bola presunutá do elektroforetickej komory naplnenej 1x TAE pufrom. Po napipetovaní vzoriek do jamiek boli vzorky separované pri 100 V, po dobu 30 minút. Po skončení elektroforézy bol gél so vzorkami vizualizovaný pomocou UV transiluminátoru. Snímky gélov boli upravované pomocou programu ImageLab.

3.8.9 Príprava *attB* PCR produktov

Pre prípravu PCR produktov s ohraničujúcimi *attB* miestami, kľúčovými pre

rekombináciu, bola použitá Phusion High-Fidelity polymeráza s „proof-reading“ aktivitou. Reakcia bola pripravená podľa vzoru uvedeného v Tabuľke 3.

Tabuľka 3 - Zloženie reakčnej zmesi pre PCR

Zložka	Objem na jednu reakciu [μl]
cDNA <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
DMSO (100 %)	0,6
5x Phusion HF buffer	4
Phusion DNA polymerase	0,2
dNTPs ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,4
Forward primer ($5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	2
Reverse primer ($5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	2
H ₂ O	9,8
Celkový objem	20

Program termocykléru pre amplifikáciu Phusion HF polymerázou bol nastavený nasledovne:

- 1) 98 °C 30 sekúnd
- 2) 98 °C 10 sekúnd
- 59 °C 20 sekúnd
- 72 °C 30 sekúnd
- } 30 cyklov
- 3) 72 °C 10 minút

3.8.10 Purifikácia produktov z PCR reakčnej zmesi

Získané amplikony z PCR boli purifikované pomocou NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu. Po skončení PCR a overení produktov pomocou gélovej elektroforézy, boli vybrané PCR reakčné zmesi spojené v jednej 1,5 ml mikroskúmavky. Následne boli pridané dva diely NTI pufru na jeden diel vzorky. Takto pripravená zmes bola nanosená na NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kolónu (max 700 μl) s následnou centrifugáciou pri 11 000 \times g, 21 °C, po dobu 30 sekúnd. Tekutina pretečená kolónou bola zo zbernej skúmavky odliata. V prípade, že vzorky mali väčší objem ako 700 μl , bol tento krok opakovaný a na kolónu bol nanosený zvyšný objem vzorky, vždy maximálne po 700 μl . Po nanosení celého objemu vzorky bola kolóna následne premytá 700 μl pufru NT3 s následnou centrifugáciou pri 11 000 \times g, 21 °C, po dobu 30 sekúnd. Tekutina pretečená kolónou bola odliata a premývací krok bol zopakovaný pre získanie lepšieho pomeru DNA : proteín (pomer hodnôt A_{260}/A_{280}). Po odliatí tekutiny pretečenej kolónou bola skúmavka s kolónou centrifugovaná naprázdno (11 000 \times g, 21 °C, 1 minúta) a následne

dve minúty inkubovaná v termobloku pri 70 °C, pre kompletne odstránenie reziduálneho etanolu z NT3 pufru. Kolóna bola následne umiestnená do čistej 1,5 ml mikroskúmavky a DNA bola eluovaná v 15 µl predohriateho (70 °C) elučného pufru NE. Kolóny boli ponechané inkubácii po dobu jednej minúty pri laboratórnej teplote, s následnou centrifugáciou pri 11 000×g, 21 °C, po dobu 60 sekúnd. Koncentrácia získaných purifikovaných attB PCR amplikonov bola zmeraná na spektrofotometre NanoDrop.

3.8.11 Príprava Entry klonu (BP reakcia)

Príprava tzv. Entry klonu (PCR fragment v donorovom vektore) môže byť vykonaná celkovo štyrmi rôznymi spôsobmi. V tejto práci bola zvolená stratégia prípravy Entry klonu pomocou produktov PCR reakcie s primermi, ktoré okrem špecifickej sekvencie pre *ENT* gény obsahovali taktiež 5'-terminálne attB sekvencie. Boli zvlášť pripravené Entry klony so STOP kodónom a bez STOP kodónu. Po PCR amplifikácii a prečistení PCR produktov pomocou NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu bola nasadená BP reakcia podľa Tabuľky 4.

Tabuľka 4 – Zloženie reakčnej zmesi pre BP reakciu

Zložka	Objem (µl)
attB PCR produkt (15-150 ng)	1-7
pDONR207 (150 ng)	1
TE pufor, pH 8,0	do 8
BP Clonase™ II enzyme mix	2

Po napipetovaní všetkých zložiek BP reakcie podľa Tabuľky 4 bola táto zmes dvakrát zvortexovaná, vždy po dobu dvoch sekúnd s následnou krátkou mikrocentrifugáciou. Reakčná zmes bola inkubovaná cez noc pri laboratórnej teplote. Pre ukončenie rekombinačnej reakcie bol pridaný 1 µl proteínázy K a reakčná zmes bola inkubovaná pri teplote 37 °C, po dobu 10 minút.

3.8.12 Transformácia baktérií *E. coli* TOP10 metódou teplotného šoku

Pre transformáciu teplotným šokom boli použité chemokompetentné baktérie *E. coli* TOP10, ktoré boli vybrané z mraziaku (-80 °C) a pomaly roztopené na ľade, po dobu asi 10 minút. Následne k baktériám v 1,5 ml mikroskúmavke bolo pridaných 7 µl rekombinačnej zmesi (po BP reakcii) a baktérie spoločne s rekombinačnou zmesou boli inkubované na ľade približne 30 minút. Po uplynutí doby inkubácie boli mikroskúmavky na 50 sekúnd umiestnené do termobloku (42 °C). Po vystavení baktérií teplotnému šoku boli mikroskúmavky znovu umiestnené na ľad. Po dvoch minútach na ľade bolo do rekombinačnej zmesi s baktériami pridaných 500 µl SOC média a takto pripravená zmes bola umiestnená na stolnú trepačku, kde bola inkubovaná jednu hodinu pri 400 RPM a teplote 37 °C.

Po uplynutí inkubačnej doby boli baktérie centrifugované (3000 RPM, 3 minúty), 400 µl supernatantu bolo vo flowboxe odpipetovaných a transformované baktérie boli resuspendované vo zvyšnom objeme supernatantu. Následne boli baktérie napipetované na predom pripravené Petriho misky s LB agarom s obsahom gentamycínu a rozotrené pomocou sterilnej sklenenej hokejky. Takto pripravené misky s transformovanými baktériami boli inkubované pri teplote 37 °C cez noc.

3.8.13 Izolácia plazmidov a príprava glycerolových bakteriálnych zásobných kultúr

Vzniknuté kolónie na Petriho miskách s LB agarom s obsahom antibiotík boli sterilným špáratkom naočkované do 50 ml centrifugačných skúmaviek s obsahom 10 ml LB média a gentamycínu. Baktérie v tekutom médiu boli ponechané kultivácii cez noc pri teplote 37 °C a 180 RPM. Na ďalší deň bolo z každej bakteriálnej kultúry vo flowboxe odobraných 500 µl do sterilných 1,5 ml mikroskúmaviek. K 500 µl bakteriálnej kultúry bolo pridaných 500 µl 50 % glycerolu. Následne boli takto pripravené kultúry s glycerolom zmrazené v tekutom dusíku a umiestnené do mraziaku (-80 °C).

Zvyšný objem bakteriálnej kultúry bol centrifugovaný pri 21 °C, 4600×g, po dobu 20 minút. Po centrifugácii bol supernatant z centrifugačných skúmaviek odliaty a vzniknutý pelet bol rozsuspendovaný v 250 µl P1 pufru (s obsahom RNázy A a činidla Lyse Blue). Rozsuspendované baktérie boli prepipetované do čistých 2 ml mikroskúmaviek. Následne bolo pridaných 250 µl lyzačného P2 pufru a obsah mikroskúmaviek bol premiešaný otáčaním až do vzniku modrého sfarbenia. Následne

bolo pridaných 350 μl neutralizačného N3 pufru, po jeho pridaní bol obsah mikroskúmaviek ihneď premiešaný otáčaním až kým nedošlo k úplnému odfarbeniu vzoriek. Vzorky boli následne centrifugované (16 000 \times g, 21 °C), po dobu 10 minút. Po uplynutí doby centrifugácie bol vzniknutý supernatant (800 μl) odpipetovaný a nanosený na Qiaprep 2.0 spin kolónu s následnou centrifugáciou (13 000 RPM, 21 °C), po dobu 60 sekúnd. Tekutina pretečená kolónou bola vyliala. Na kolóny bolo nanosených 750 μl premývacieho PE pufru s následnou centrifugáciou (13 000 RPM, 21 °C, 60 sekúnd) a odliatím pretečenej tekutiny. Tento krok bol znovu opakovaný. Následne boli kolóny centrifugované pri maximálnych otáčkach, po dobu jednej minúty, aby došlo k odstráneniu reziduálneho PE pufru s obsahom etanolu. Po odstránení zvyškov PE pufru boli kolóny umiestnené do čistých 1,5 μl mikroskúmaviek, do stredu kolón bolo napipetovaných 20 μl elučného pufru EB. Vzorky boli po pridaní elučného pufru centrifugované (13 000 RPM, 21 °C, 60 sekúnd) a ich koncentrácie boli premerané pomocou NanoDropu.

3.8.14 Príprava expresných konštruktov (LR reakcia)

Po izolácii plazmidov bola nasadená LR reakcia podľa Tabuľky 5.

Tabuľka 5 – Zloženie reakčnej zmesi pre LR reakciu

Zložka	Objem (μl)
Entry klon (50-150 ng)	1-7
pGWB5/pGWB6 (150 ng)	1
TE pufor, pH 8,0	do 8
LR Clonase™ II enzyme mix	2

Po napipetovaní všetkých zložiek LR reakcie podľa Tabuľky 5 bola táto zmes dvakrát zvortexovaná, vždy po dobu dvoch sekúnd s následnou krátkou mikrocentrifugáciou. Reakčná zmes bola inkubovaná cez noc pri izbovej teplote. Pre ukončenie rekombinačnej reakcie bol pridaný 1 μl proteínázy K a reakčná zmes bola inkubovaná pri teplote 37 °C, po dobu 10 minút.

3.8.15 Transformácia *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 elektroporáciou

Pre transformáciu elektroporáciou boli použité chemokompetentné baktérie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, ktoré boli vybrané z mraziaku (-80 °C) a ponechané na ľade po dobu 10 minút. Následne k baktériám v 1,5 ml mikroskúmavke bol pridaný 1 µl rekombinačnej zmesi (po LR reakcii). Napätie elektroporátora bolo nastavené na 1800 V. Vzorky boli napipetované do predchladených kyviet a kyvety boli umiestnené do elektroporačnej komory. Na vzorky bolo aplikované napätie (1800 V, 5 ms). Po aplikovaní napätia bolo do kyviet rýchlo pridaných 200 µl predohriateho (28 °C) SOC média a vzorky boli ponechané inkubácii na stolnej minitrepačke (28 °C, 400 RPM, po dobu 1 hodiny). Po uplynutí doby inkubácie bolo vo flowboxe pridaných 25 µl na misky s LB agarom s obsahom gentamycínu, rifampicínu a kanamycínu. Misky boli inkubované pri 28 °C, po dobu dvoch dní.

3.8.16 Tranzientná transformácia *Nicotiana benthamiana*

Prvý deň boli pripravené štartovacie kultúry z glycerolových bakteriálnych zásobných kultúr. Do tekutého LB média s obsahom rifampicínu, gentamycínu a kanamycínu boli sterilnou špičkou vo flowboxe zaočkované kultúry *Agrobacterium tumefaciens*, nesúce konštrukty *35S::GFP:ENT1*, *35S:: ENT1:GFP*, *35S::GFP:ENT3*, *35S::ENT3:GFP*, *35S::GFP:ENT6*, *35S::ENT6:GFP* a kontrolný konštrukt *35S::GFP*. Bakteriálne kultúry boli kultivované (28 °C, 180 RPM) cez noc.

Druhý deň boli 6 týždňov staré rastliny *N. benthamiana* premiestnené z fytotronu do laboratória. Pred samotnou transformáciou boli zaliate vodou a zakryté plastovým obalom, aby došlo k otvoreniu prieduchov v epidermálnej časti listov. Pre pripravené bakteriálne kultúry bola zmeraná hodnota OD_{600} . Na základe hodnôt OD_{600} bol do 2 ml mikroskúmaviek pre každý konštrukt vypočítaný a napipetovaný určitý objem kultúry tak, aby po následnej centrifugácii (2 000×g, 4 °C, 10 minút) a resuspendovaní peletu v infiltračnom médiu, mala vzniknutá suspenzia hodnotu $OD_{600} = 0,5$. Resuspendované bakteriálne kultúry boli následne inkubované v tme, pri laboratórnej teplote, po dobu jednej hodiny.

Po uplynutí doby inkubácie boli do abaxiálnej strany listov aplikované 2 ml bakteriálnej suspenzie pomocou 1 ml striekačiek. Striekačka so suspenziou bola priložená k listu, ktorý bol podoprený prstom z druhej strany. Pomalým stláčaním piestu

bola suspenzia vpravená do listu. Po 72 hodinách od infiltrácie boli v okolí miesta infiltrácie pomocou nožníc a pinzety odobrané vzorky, ktoré boli uložené na podložné sklíčko do kvapky vody. Takto pripravené vzorky boli prikryté krycím sklíčkom a pozorované pomocou konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu.

3.8.17 Stabilná transformácia *Arabidopsis thaliana* metódou floral dip

Prvý deň bola pripravená štartovacia kultúra. Do 10 ml tekutého LB média, s obsahom rifampicínu, gentamycínu a kanamycínu, boli zo zmrazených glycerolových bakteriálnych zásobných kultúr (-80 °C) zaočkované transformované baktérie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, nesúce konštrukty *35S::GFP:ENT1*, *35S::ENT1:GFP*, *35S::GFP:ENT3*, *35S::ENT3:GFP*, *35S::GFP:ENT6* a *35S::ENT6:GFP*. Zaočkované kultúry boli inkubované cez noc pri 28 °C a 180 RPM.

Druhý deň boli pripravené sterilné Erlenmeyerove banky o objeme 2 l s 500 ml LB média. Následne boli vo flowboxe sterilne preliate štartovacie kultúry do 2 l Erlenmeyerových baniek a kultúry boli ponechané inkubácii cez noc (28 °C, 180 RPM).

Tretí deň boli rastliny, ktoré boli vybrané pre transformáciu, premiestnené z fytotronu do laboratória, aby došlo k ich aklimatizácii. Pred samotnou transformáciou boli ostrihané všetky vytvorené šesule a opelené kvety. Pre všetky bakteriálne kultúry bola zmeraná hodnota OD₆₀₀, kultúry boli centrifugované (12 000×g, 4 °C), po dobu 10 minút, supernatant bol odliaty a pelet bol resuspendovaný v 400 ml inokulačného média do OD₆₀₀ = 1 – 1,5. Pripravené rastliny boli na pár sekúnd ponorené do pripravených bakteriálnych kultúr. Následne boli osušené pomocou papierových obrúskov, zabalené do potravinárskej fólie a uložené do tmy do nasledujúceho dňa.

Štvrtý deň boli transformované rastliny odbalené, poliate vodou a umiestnené do fytotronu.

3.8.18 Izolácia vakuol a protoplastov z *ent1* a Col-0

Pre izoláciu vakuol boli použité 35 dní staré homozygotné T-DNA inzerčné línie *Arabidopsis ENT1* (SALK_025174) a Col-0. K izolácii boli odobrané 2 gramy „mokrej váhy“ listov. Po odobratí vhodných listov boli tieto listy narezané na približne 2 mm hrubé prúžky. Získané prúžky boli vložené do kryštalizačnej misky s predhriatym 30 ml protoplastovacím enzýmovým roztokom (37 °C).

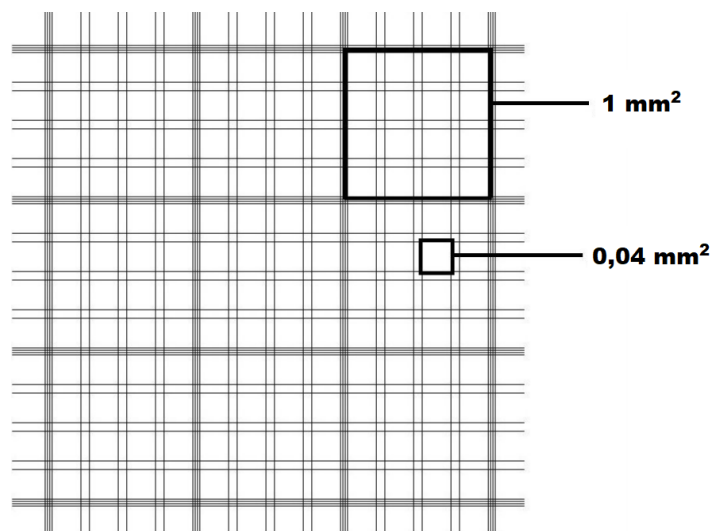
Protoplastovací enzýmový roztok (zloženie uvedené v kapitole 3.3.10) s listovými

prúžkami bol umiestnený do eksikátoru, kde naň bolo aplikované vákuum po dobu 10 minút. Následne bola zmes ponechaná na trepačke v tme, pri 50 RPM, po dobu štyroch hodín, kedy dochádzalo k postupnému uvoľňovaniu protoplastov. Po uplynutí doby protoplastovania bola protoplastová suspenzia prefiltrovaná pomocou bunkového filtru s otvormi o veľkosti 100 μm do 50 ml centrifugačnej skúmavky. Následne bol filtrát s protoplastmi centrifugovaný pri (55 \times g, 21 °C), po dobu 5 minút. Po centrifugácii bol supernatant odobraný, pelet opatrne rozsuspendovaný v 30 ml premývacieho pufri a získaná protoplastová suspenzia znova centrifugovaná (55 \times g, 21 °C), po dobu 5 minút. Následne bol supernatant odpipetovaný a pelet rozsuspendovaný v 10 ml premývacieho pufri. Z 10 ml protoplastovej suspenzie bolo odobraných 520 μl do 2 ml mikroskúmavky. Protoplastovacia suspenzia bola doplnená na 30 ml premývacím pufrom a následne centrifugovaná (55 \times g, 21 °C) po dobu 5 minút. Po centrifugácii bolo k protoplastovému peletu pridaných 10,5 ml lyzačného pufri (zloženie uvedené v kapitole 3.3.10), suspenzia bola päťkrát zhomogenizovaná prepipetovaním. Kvapka lyzačného pufri so zlyzovanými protoplastami bola aplikovaná na krycie sklíčko a pomocou svetelného mikroskopu boli pozorované uvoľnené vakuoly z protoplastov. Následne bolo 2,5 ml vakuol v lyzačnom pufri napipetovaných do ultracentrifugačných kyviet. Na vrstvu lyzačného pufri (zloženie uvedené v kapitole 3.3.23.3.10) s vakuolami bola nanosená 1,5 ml vrstva 4 % Ficollu. Na vrstvu 4 % Ficollu bola následne opatrne nanosená 0,5 ml vrstva vychladeného vakuolárneho pufri. Kyvety s takto napipetovaným hustotným gradientom boli centrifugované v ultracentrifúge pri 71 000 \times g, 10 °C, po dobu 50 minút. Po skončení ultracentrifugácie bolo z rozhrania 4 % Ficollu a vakuolárneho pufri odobraných 500 μl izolovaných vakuol z celkovo štyroch ultracentrifugačných kyviet. Konečný objem vzorky izolovaných vakuol predstavoval 2 ml. Vzorky izolovaných vakuol a protoplastov boli opatrne homogenizované a použité pre počítanie častíc na Bürkerovej komôrke.

3.8.18.1 Počítanie izolovaných protoplastov a vakuol na Bürkerovej komôrke

Pred samotnou purifikáciou a kvantifikáciou protoplastových a vakuolárnych CK musel byť stanovený počet izolovaných častíc (vakuol a protoplastov) na 1 μl . Pre tento účel bola použitá Bürkerova komôrka, na ktorú bolo ustrihnutou špičkou nanosených 15 μl vzorky. Napipetovaná vzorka bola následne opatrne prikrytá krycím sklíčkom. Častice (vakuoly alebo protoplasty) boli vizualizované pomocou svetelného mikroskopu a

počítané v deviatich veľkých, tromi čiarami ohraničených štvorcov komôrky o ploche 1 mm^2 (Obrázok 14). Do počítania boli zahrnuté častice, ktoré sa nachádzali vo vnútri veľkého štvorca komôrky alebo sa dotýkali dvoch predom stanovených strán. Tento spôsob predchádzal chybnému dvojitému započítaniu častíc na okrajoch štvorcov.



Obrázok 14 – Schéma Bürkerovej komôrky

Počet častíc v $1 \mu\text{l}$ bol stanovený podľa vzorca:

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

B = počet buniek v $1 \mu\text{l}$

n = celkový počet napočítaných častíc

c = počet započítaných štvorcov

V = plocha použitého štvorca

h = hĺbka komôrky

z = riedenie

Spočítané vakuoly boli zamrazené v tekutom dusíku a uložené do mraziaku ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.8.19 Purifikácia cytokinínov z vakuolárnej a protoplastovej frakcie

Pred samotnou LC-MS/MS analýzou boli purifikované CK z izolovaných vzoriek vakuol a protoplastov. Vzorky vakuol a protoplastov boli skokovo zamrazené v tekutom

dušiku a následne pomaly rozmrazené na ľade. Tento krok bol niekoľkokrát opakovaný, aby došlo k popraskaniu všetkých vakuol a protoplastov v jednotlivých vzorkách. Následne bol zmeraný objem vzoriek a vzorky boli rozpipetované podľa počtu protoplastov/vakuol na replikáty. K vzorkám bolo pridaných 0,5 ml modifikovaného Bieleškiho roztoku a tiež 14 µl interného štandardu. Vzorky boli následne inkubované na rotačnej trepačke, pri teplote 4 °C s následnou centrifugáciou pri 20 000 RPM, po dobu 15 minút. Supernatant bol odobraný do čistej 15 ml sklenenej skúmavky a jeho objem bol doplnený na 3 ml 1 mol·l⁻¹ roztokom kyseliny mravčej.

Purifikácia pomocou SPE (extrakcia na pevnej fáze) MCX (Mixed-mode, strong Cation-exchange) kolón prebehla celkovo v štyroch krokoch: aktivácia kolón, aplikácia vzorky, premývanie, elúcia. Kolóny boli aktivované premytím roztokmi v nasledujúcom poradí: 100 % metanol, H₂O, 50 % HNO₃, H₂O a 1 mol·l⁻¹ roztokom kyseliny mravčej, vždy v objeme 1 ml. Na aktivované SPE MCX kolóny boli nanosené vzorky (3 ml). Následne boli kolóny premývané 1 ml 1 mol·l⁻¹ roztokom kyseliny mravčej. Elúcia prebehla aplikovaním 2 ml 80 % MeOH pre elúciu auxínov (táto frakcia nebola odoberaná), 1 ml 0,35 mol·l⁻¹ NH₄OH pre elúciu NT a 2 ml 0,35 mol·l⁻¹ NH₄OH v 60 % metanole pre elúciu B a OG, pričom tieto CK frakcie boli odoberané do jednej sklenenej skúmavky.

Eluované vzorky boli následne odparené na odparke a resuspendované v 40 µl 5 % metanolu. Vzorky boli následne vortexované a 5 minút sonikované. Po sonikácii boli vzorky napipetované do skúmaviek s centrifugačnými filtrami NanoSep (0,2 µm) a následne boli centrifugované pri 7 500 RPM, po dobu 5 minút. Vzorky boli nakoniec napipetované do Micro Insert skúmaviek, ktoré boli uzavreté do vialiek. Takto pripravené purifikované vzorky boli ďalej analyzované pomocou hmotnostnej spektrometrie.

3.8.20 UHPLC-MS/MS

Purifikované vzorky v metanole boli použité k analýze obsahu CK pomocou metódy ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UHPLC) v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (MS/MS). Analyzované vzorky purifikovaných CK boli na kolónu Acquity UPLC BEH C18, 1,7 µm, 150 × 2,1 mm s reverznou fázou nastreknuté v objeme 10 µl. Kolónový termostat bol nastavený na teplotu 45 °C. Separácia vzoriek prebiehala 20 minút v gradiente metanolu (A) a 15 mM mravčane amónnom (pH 3,95 ,

B) pri rýchlosti 0,35 ml/min: 0 min – 10% A:B), 10 min – 23% A, 15 min – 36% A. Na konci elúcie bola kolóna premytá 100% A (2 min) a ekvilibrovaná na počiatočné podmienky (10:90, A:B) po dobu 3 minút.

Podmienky pre hmotnostnú spektrometriu boli nastavené nasledovne: napätie v kapiláre – 1 kV, teplota zdroja – 150 °C, desolvačná teplota – 600 °C, prietok desolvačného plynu (dusík) – 1000 l·h⁻¹, iontová energie 1/2 0,5/1,0 V, vstupné/výstupné napätie 0,5 V, kolízny prietok plynu – 0,2 ml min⁻¹, rozlíšenie LM/HM - 2,8/14,75, doba merania prechodu jednotlivého iónu (dwell time) – 0,01 s. Stanovenie endogénnej hladiny CK vo vzorkách izolovaných vakuol prebiehalo pomocou viacnásobného monitorovania reakcie (MRM) protónovaného prekursora a príslušných produkovaných iónov (Novák *et al.*, 2017). Purifikované vzorky CK z protoplastov a vakuol boli kvantifikované pomocou izotopovej zriedovacej metódy a programu MassLynx. Získané dáta boli štatisticky vyhodnotené metódou T-testu v programe MS Excel.

3.8.21 SDS-PAGE

Pomocou metód SDS-PAGE a Western blot bola analyzovaná prítomnosť GFP značených ENT proteínov v tranzientne transformovaných listoch *Nicotiana benthamiana* a tiež bola overovaná čistota izolovanej vakuolárnej frakcie izolovanej z *Arabidopsis thaliana* Col-0 a *ent1* mutantnej línie. Pre SDS PAGE boli vzorky tranzientne transformovaných listov *Nicotiana benthamiana* spracované pomocou tekutého dusíku na jemný prach. 200 mg takto spracovaného materiálu bolo navážených do 2 ml mikroskúmaviek. K naváženému materiálu v 2 ml mikroskúmavkách bolo pridaných 400 µl extrakčného pufru. Následne boli k vzorkám pridané 2–3 sklenené guľičky a vzorky boli umiestnené na trepačku (800 RPM, 4 °C, 30 minút). Vzorky boli následne centrifugované (20 000×g, 4 °C) po dobu 5 minút. Supernatant bol po centrifugácii odpipetovaný do čistých 1,5 ml mikroskúmaviek.

Vo vzorkách izolovaných vakuol a protoplastov boli proteíny extrahované zamrazením vzoriek v tekutom dusíku a následným pomalým roztopením vzoriek na ľade. Následne bolo do čistej 1,5 ml mikroskúmavky odobraných 19,5 µl vzoriek (proteínový extrakt transformovaných listov *Nicotiana benthamiana*, ako aj opakovane zamrazené a rozmrazené vzorky izolovaných vakuol a protoplastov *Arabidopsis*) a bolo k nim pridaných 7,5 µl 4x vzorkovacieho pufru (Bio-Rad) a 3 µl 10x redukčného

činidla (Bio-Rad). Takto pripravené vzorky boli inkubované v termobloku pri 70°C, po dobu 10 minút. Následne boli gély vybrané z obalov, hrebienok bol opatrne vytiahnutý a bola zostavená elektroforetická aparátúra. Do elektroforetickej komory bol naliaty 1x Bolt MES Running Buffer a celý objem vzoriek bol napipetovaný do určených jamiek polyakrylamidového gélu. Do vybraných jamiek gélu bol napipetovaný 1 µl štandardu molekulovej hmotnosti. Napätie bolo nastavené na 120 V a vzorky boli separované po dobu 35 minút.

3.8.22 Western blotting

Po skončení SDS-PAGE boli gély opatrne odobrané špachtľou a premyté v destilovanej H₂O. Následne boli premývané v 1x prenosovom pufrí po dobu desiatich minút. Pre prenos proteínov z gélu bola použitá polyvinylidifluoridová (PVDF) membrána. PVDF membrány boli aktivované v metanole a následne premývané v 1x prenosovom pufrí, po dobu 10 minút. S PVDF membránami bolo manipulované výhradne pomocou čistej pinzety. Následne boli poskladané sendviče (v poradí: penový vankúšik, 2x filtračný papier, gél, membrána, 2x filtračný papier, penový vankúšik), ktoré boli umiestnené do prenosovej komory. Do komory boli taktiež vložené chladítka a komora bola po okraj naplnená 1x prenosovým pufrom. Zložená prenosová aparátúra bola umiestnená do chladničky, konštantné napätie bolo nastavené na 100 V, po 1,5 h bolo znížené na 14 V a komory so sedvičmi boli takto ponechané do ďalšieho dňa.

Na druhý deň bola aparátúra odpojená od zdroja, sendvič bol rozložený a PVDF membrány boli opláchnuté v destilovanej H₂O. Následne boli premývané v blokovacím pufrí po dobu jednej hodiny. Po opláchnutí blokovacieho pufru destilovanou H₂O, boli membrány inkubované po dobu jednej hodiny v 2 ml roztoku primárnej protilátky na parafilme. Následne boli membrány premývané trikrát v 1x TBST, vždy po dobu 10 minút. Premyté membrány boli jednu hodinu inkubované v 2 ml roztoku sekundárnej protilátky značenej chrenovou peroxidázou, na parafilme. Po uplynutí doby inkubácie bola sekundárna protilátka z membrán odmyvaná trikrát v 1x TBST, vždy po dobu 10 minút. Pre vyvolanie HRP signálu bola použitá zmes komerčných roztokov Peroxide solution a Luminol/enhancer solution, v pomere 1:1. Membrány boli umiestnené do euroobalovej fólie, na membrány boli napipetované 2 ml zmesi komerčných roztokov. HRP signál bol vizualizovaný pomocou transiluminátoru ChemiDoc a programu BioLab.

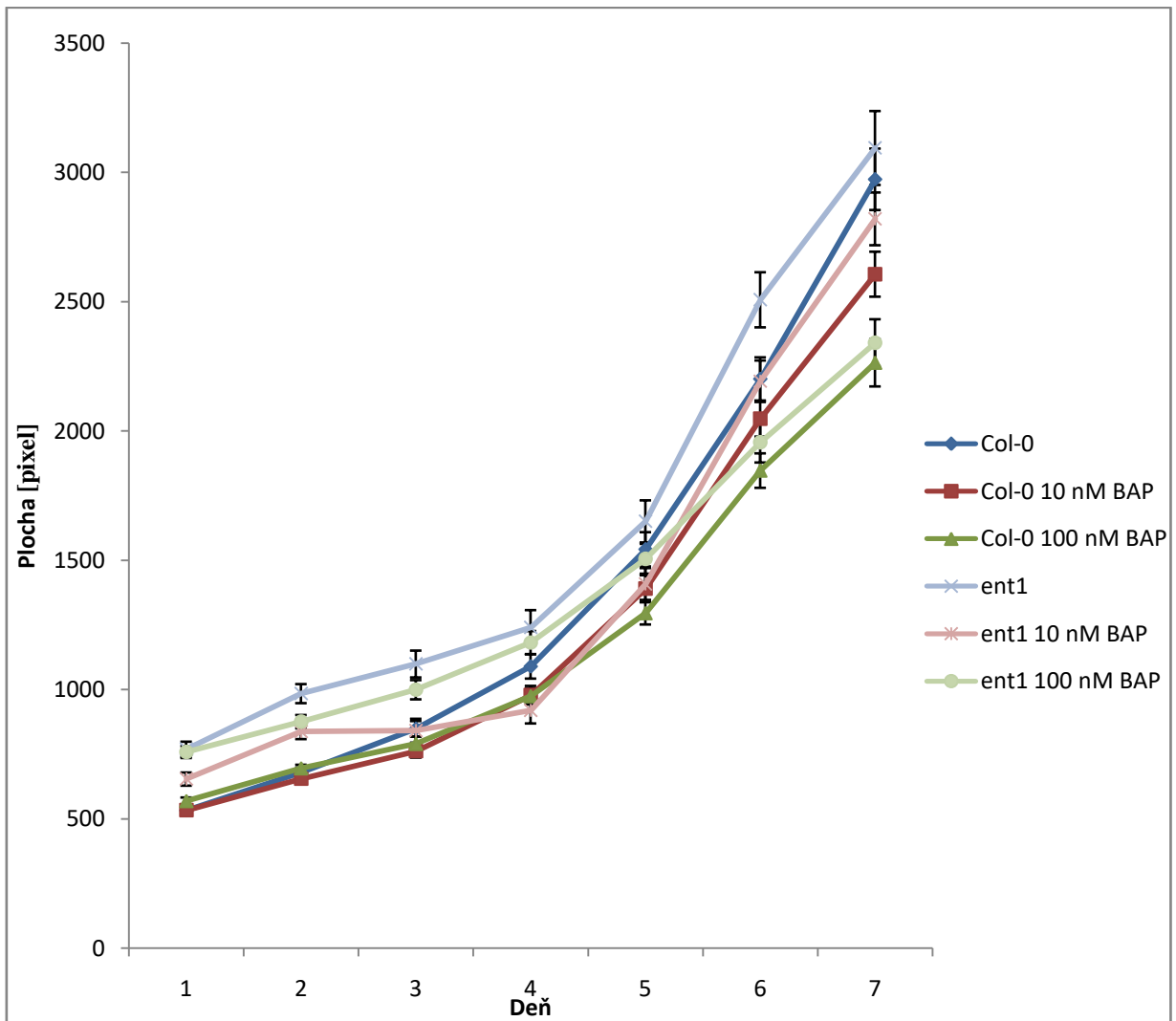
4 VÝSLEDKY

V tejto diplomovej práci sú získané výsledky prezentované v ôsmich podkapitolách. Prvá podkapitola sa zaoberá fenotypizáciou nadzemnej časti T-DNA inzerčnej línie *ent1*, druhá podkapitola sa zaoberá fenotypizáciou koreňovej časti tejto línie. Tretia a štvrtá podkapitola sa zaoberá prípravou expresných konštruktov *ENT* pod 35S promotorom s N-terminálnou a C-terminálnou GFP značkou, tranzientnou transformáciou *Nicotiana benthamiana* týmito konštruktmi a konfokálnou laserovou skenovaciou mikroskopiou GFP značených ENT (ENT1, ENT3 a ENT6). Piata podkapitola sa zaoberá stabilnou transformáciou *Arabidopsis*. V šiestej a siedmej podkapitole sú uvedené výsledky izolácií vakuol z T-DNA inzerčnej línie *ent1* a Col-0 a následnej ultra vysokoučinnnej kvapalinovej chromatografie v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (UHPLC-MS/MS), pomocou ktorej boli analyzované purifikované CK zo vzoriek izolovaných vakuol a protoplastov. V poslednej kapitole sú uvedené výsledky imunodetekcie fúznych proteínov ENT s GFP značkou a imunodetekcie vakuolárneho markeru a markeru endoplazmatického retikula (ER) vo vzorkách izolovaných vakuol a protoplastov, pre overenie čistoty vakuolárnej frakcie.

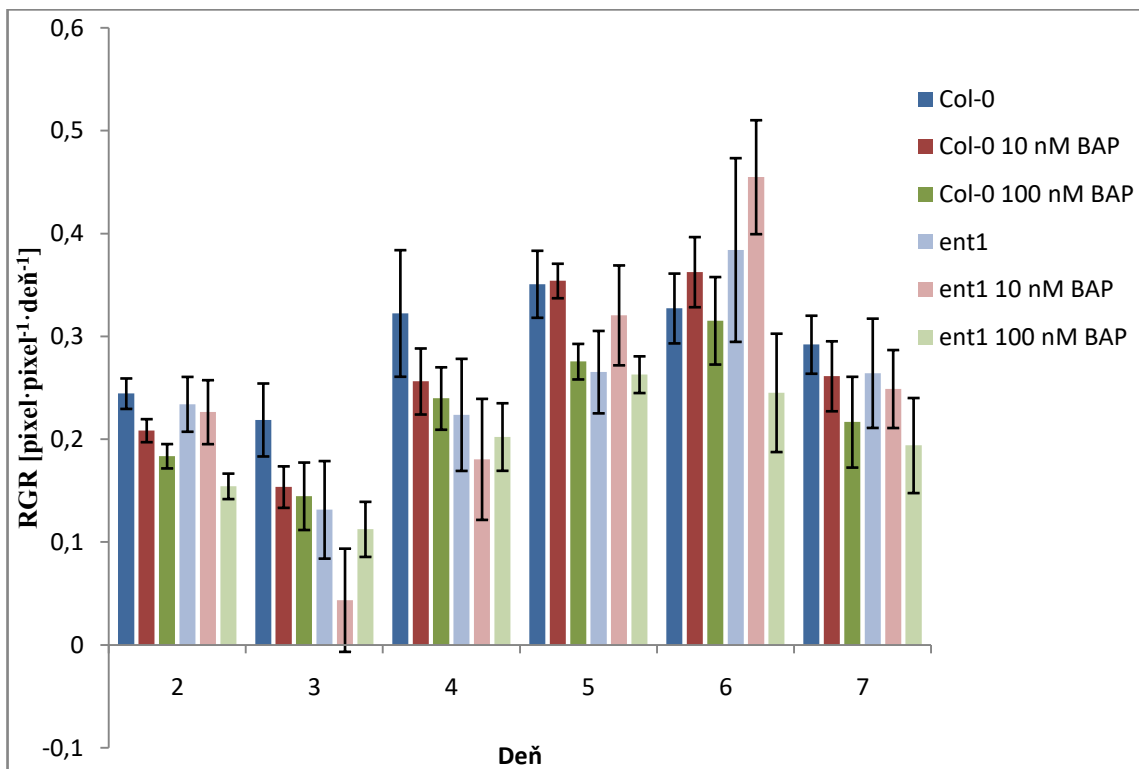
4.1 Fenotypizácia nadzemnej časti T-DNA inzerčnej línie *Arabidopsis thaliana ent1*

ENT1 predstavuje kandidátny proteín sprostredkujúci CK transport. Prvým cieľom tejto diplomovej práce bola preto charakterizácia fenotypu jeho T-DNA inzerčnej línie *ent1*(SALK_025174) pri štandardných podmienkach, ako aj po ošetroaní CK. Fenotypizácia nadzemnej časti bola vykonaná dvomi spôsobmi, pričom prvým bola analýza listovej plochy (Obrázok 15) a druhým analýza relatívnej rýchlosti rastu („relative growth rate“, RGR) (Obrázok 16). Oba parametre boli analyzované pomocou PlantScreen™ Robotic XYZ System počas siedmich dní, každý deň v rovnakom čase a získané dáta boli spracované a štatisticky vyhodnotené dvojfaktorovým ANOVA testom s opakovaním pomocou programu MS Excel. Všetky hodnoty uvedené na Obrázku 15 vykazovali signifikantne rozdielnu ($p < 0,05$) listovú plochu pri porovnaní *ent1* a Col-0 vo všetkých analyzovaných podmienkach (bez ošetrovania cytokinínmi, v prítomnosti $10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP a v prítomnosti $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP). V prípade RGR analýzy vykazovali signifikantne rozdielnu ($p < 0,05$) relatívnu rýchlosť rastu pri porovnaní *ent1* a Col-0 vo všetkých analyzovaných podmienkach (bez ošetrovania

cytokinínmi, v prítomnosti $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP a v prítomnosti $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP) iba hodnoty v treťom dni RGR analýzy.



Obrázok 15 – Graf porovnania listovej plochy T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, meraných počas siedmich dní pomocou PlantScreen™ Robotic XYZ System, každý deň v rovnakom čase (o 16 h), Col-0 – Col-0 v štandardných podmienkach bez ošetrovania cytokinínmi, Col-0 10 nM BAP – Col-0 v prítomnosti $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, Col-0 100 nM BAP – Col-0 v prítomnosti $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, *ent1* – *ent1* v štandardných podmienkach bez ošetrovania cytokinínmi, *ent1* 10 nM BAP – *ent1* v prítomnosti $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, *ent1* 100 nM BAP – *ent1* v prítomnosti $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP. Hodnoty v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm štandardná chyba (SE) plochy, vždy z 96 biologických vzoriek.



Obrázok 16 – Graf porovnania relatívnej rýchlosti rastu listovej plochy T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, vypočítanej z listovej plochy Col-0 a *ent1* meraných počas siedmich dní pomocou PlantScreen™ Robotic XYZ System, každý deň v rovnakom čase (o 16 h), Col-0 – Col-0 v štandardných podmienkach bez ošetrenia cytokinínmi, Col-0 10 nM BAP – Col-0 v prítomnosti 10 nmol·l⁻¹ BAP, Col-0 100 nM BAP – Col-0 v prítomnosti 100 nmol·l⁻¹ BAP, *ent1* – *ent1* v štandardných podmienkach bez ošetrenia cytokinínmi, *ent1* 10 nM BAP – *ent1* v prítomnosti 10 nmol·l⁻¹ BAP, *ent1* 100 nM BAP – *ent1* v prítomnosti 100 nmol·l⁻¹ BAP. Hodnoty v grafe predstavujú medián ± štandardná chyba (SE) RGR, vždy z 96 biologických vzoriek.

Výsledky analýzy listovej plochy T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0 naznačujú, že listová plocha dosahuje v priemere vyššie hodnoty u zástupcov T-DNA inzerčnej línie *ent1* v porovnaní s divým typom pri štandardných podmienkach bez aplikácie cytokinínu, pri aplikácii 10 nmol·l⁻¹ BAP a 100 nmol·l⁻¹ BAP rovnako pozorujeme štatisticky významný rozdiel zväčšenej listovej plochy medzi *ent1* ovplyvnenými rastlinami a kontrolou divého typu počas všetkých dní analýzy. V prítomnosti 10 nmol·l⁻¹ BAP boli hodnoty listovej plochy v priemere vyššie u *ent1* s výnimkou 4. dňa analýzy.

Medián relatívnej rýchlosti rastu analyzovaných semenáčikov dosahoval v tretí deň svoje minimum v prípade všetkých analyzovaných (ošetrených aj neošetrených) semenáčikov Col-0 a *ent1*. Svoje maximum dosahoval v piaty deň v prípade neošetrených Col-0 a *ent1* v podmienkach prítomnosti 100 nmol·l⁻¹ BAP a v šiesty deň

v prípade neošetrených *ent1*, Col-0 a *ent1* v podmienkach prítomnosti $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP a Col-0 v podmienkach prítomnosti $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP.

Medián celkovo najvyššej a najnižšej RGR spomedzi všetkých analyzovaných semenáčikov bol zaznamenaný v oboch prípadoch u semenáčikov *ent1* ošetrených $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP.

Pri porovnaní Col-0 a *ent1* v štandardných podmienkach je medián relatívnej rýchlosti rastu vyšší v prípade semenáčikov Col-0 od druhého po piaty deň analýzy a tiež v siedmy deň analýzy.

Pri porovnaní Col-0 a *ent1* v prítomnosti $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP je medián RGR vyšší v prípade semenáčikov Col-0 od tretieho po piaty deň analýzy a tiež v siedmy deň analýzy, pričom medián RGR semenáčikov *ent1* bol vyšší v druhý a šiesty deň analýzy.

Pri porovnaní Col-0 a *ent1* v prítomnosti $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP je medián RGR vyšší v prípade semenáčikov Col-0 vo všetky dni analýzy.

Z uvedených dát je zrejmé, že relatívna rýchlosť rastu sa dynamicky mení v priebehu sledovaného obdobia ako pre Col-0, tak aj pre *ent1*. *ent1* reaguje už na aplikáciu $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP citlivejšie ako kontrola – dochádza k oscilácii relatívnej rýchlosti rastu.

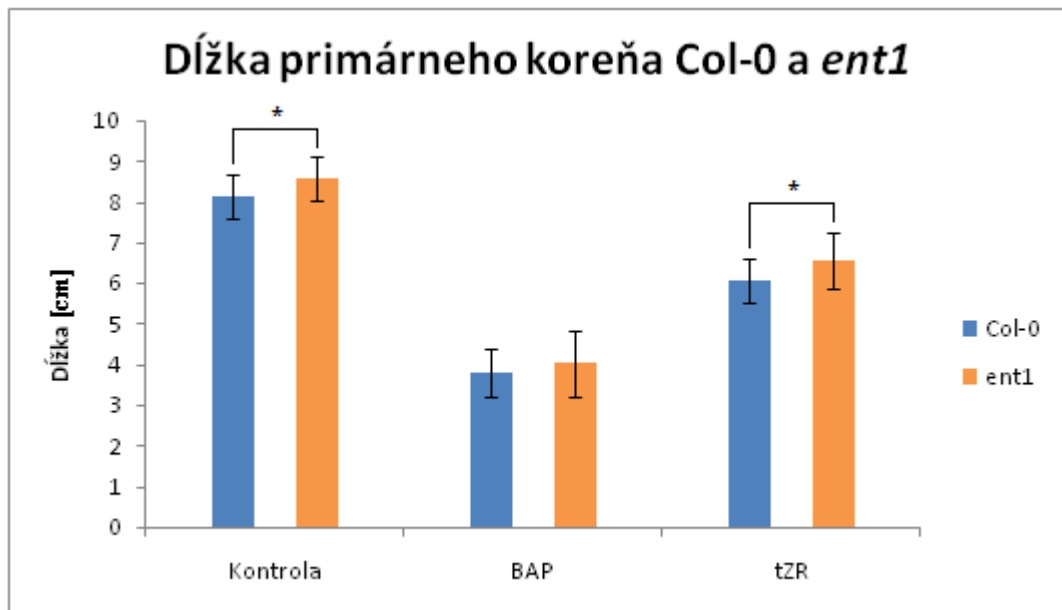
4.2 Fenotypizácia koreňovej časti T-DNA inzerčnej línie *Arabidopsis thaliana ent1*

Fenotypizácia koreňovej sústavy bola vykonaná postredníctvom analýzy dĺžky primárneho koreňa (Obrázok 17) a počtu laterálnych koreňov (Obrázok 18) 14 dní starých rastlín T-DNA inzerčnej línie v porovnaní s divým typom, pri štandardných podmienkach, ako aj po ošetrení BAP a tZR. Misky so semenáčikmi boli snímané pomocou skeneru a programu WinRhizo, oba parametre boli analyzované pomocou programu ImageJ a získané dáta boli spracované programom MS Excel so štatistickým vyhodnotením pomocou T-testu.

4.2.1 Analýza dĺžky primárneho koreňa

CK hrajú významnú úlohu v regulácii koreňového rastu. Dĺžka primárneho koreňa jednotlivých zástupcov bola analyzovaná pomocou programu ImageJ. Pomocou programu MS Excel bol z nameraných hodnôt dĺžok primárnych koreňov vypočítaný aritmetický priemer, smerodajná odchýlka a tiež p-hodnota pomocou T-testu, ktorý preukázal štatisticky významný rozdiel u neošetrených rastlín a rastlín ošetrených

10 nmol·l⁻¹ tZR (p < 0,05), avšak nie u rastlín ošetrených 10 nmol·l⁻¹ BAP.

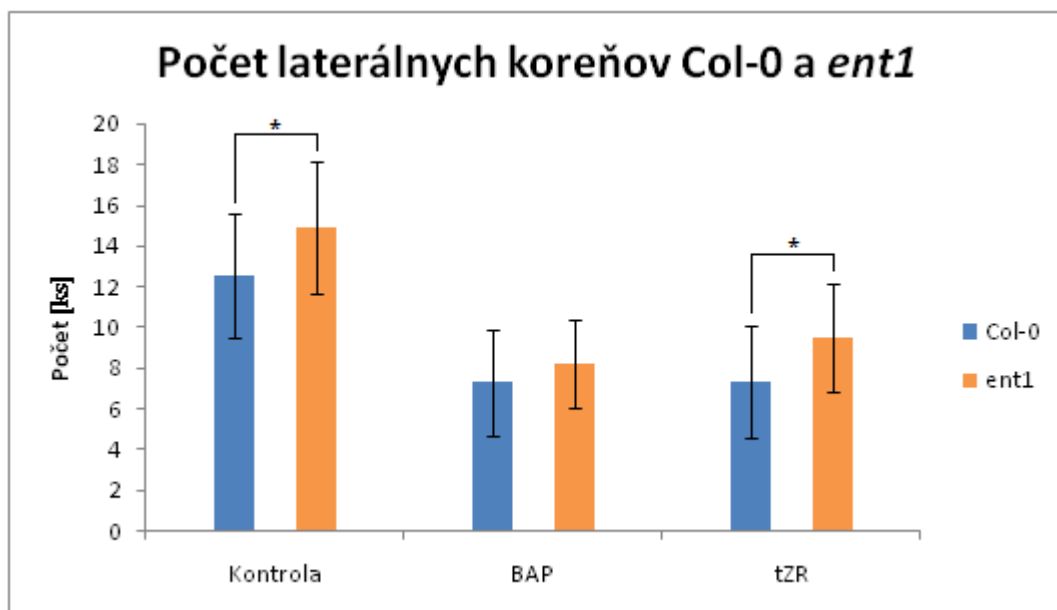


Obrázok 17 – Graf porovnania priemernej dĺžky primárneho koreňa 14 dní starých rastlín T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, kontrola – v štandardných podmienkach bez ošetrenia cytokinínmi, BAP – v prítomnosti 10 nmol·l⁻¹ BAP, tZR – v prítomnosti 10 nmol·l⁻¹ tZR. Hodnoty v grafe predstavujú aritmetický priemer ± SD, vždy zo 45 biologických vzoriek, uvedené hodnoty boli vyhodnotené pomocou T-testu v programe MS excel, zátvorky znázorňujú porovnané hodnoty v rámci T-testu, hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel (p < 0,05)

Analýzou dĺžky primárneho koreňa T-DNA inzerčnej línie *ent1* bolo zistené, že táto KO línia má v priemere o 0,4 cm dlhší primárny koreň v porovnaní s divým typom v štandardných podmienkach bez prítomnosti cytokinínov, v priemere o 0,2 cm dlhší primárny koreň v porovnaní s divým typom v podmienkach prítomnosti exogénne dodaného BAP (nesignifikantná hodnota) a v priemere o 0,5 cm dlhší primárny koreň v porovnaní s divým typom v podmienkach prítomnosti exogénne dodaného tZR.

4.2.2 Analýza počtu laterálnych koreňov

CK taktiež významne inhibujú tvorbu laterálnych koreňov. Počet laterálnych koreňov jednotlivých zástupcov bol analyzovaný pomocou programu ImageJ. Pomocou programu MS Excel bol z nameraného počtu laterálnych koreňov vypočítaný aritmetický priemer, smerodajná odchýlka a tiež p-hodnota pomocou T-testu, ktorý preukázal štatisticky významný rozdiel u neošetrených rastlín a rastlín ošetrených 10 nmol·l⁻¹ tZR (p < 0,05), avšak nie u rastlín ošetrených 10 nmol·l⁻¹ BAP.

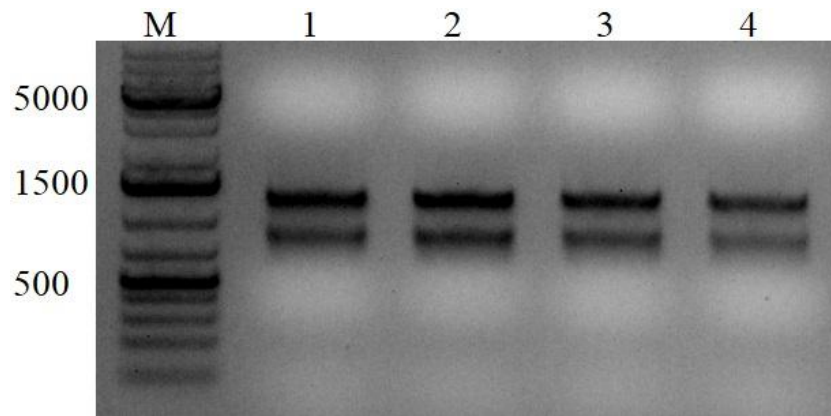


Obrázok 18 – Graf porovnania priemerného počtu laterálnych koreňov 14 dní starých rastlín T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, kontrola – v štandardných podmienkach bez ošetrenia cytokinínmi, BAP – v prítomnosti $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, tZR – v prítomnosti $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ tZR. Hodnoty v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SD, vždy zo 45 biologických vzoriek, uvedené hodnoty boli vyhodnotené pomocou T-testu v programe MS excel, zátvorky znázorňujú porovnávané hodnoty v rámci T-testu, hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$)

Analýzou počtu laterálnych koreňov T-DNA inzerčnej línie *ent* bolo zistené, že KO línia má v priemere o 2,4 laterálnych koreňov viac v porovnaní s divým typom v štandardných podmienkach bez prítomnosti cytokinínov, v priemere o 0,9 laterálnych koreňov viac v porovnaní s divým typom v podmienkach prítomnosti exogénne dodaného BAP (nesignifikantná hodnota) a v priemere o 2,2 laterálnych koreňov viac v porovnaní s divým typom v podmienkach prítomnosti exogénne dodaného tZR.

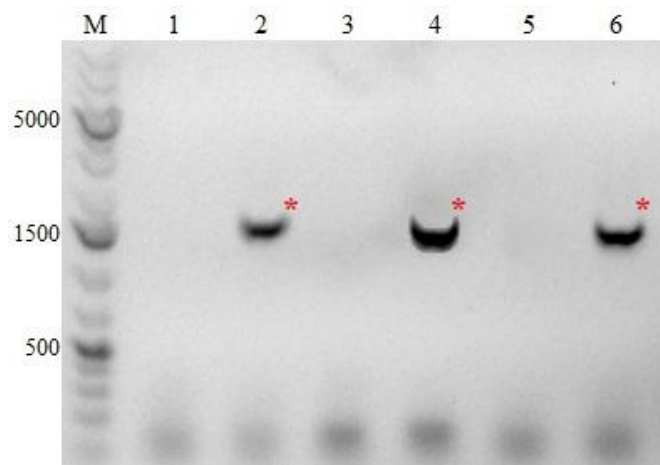
4.3 Príprava expresných ENT konštruktov s GFP značkou

Prvým krokom v príprave expresných *ENT* konštruktov s GFP značkou pod konštitutívnym *35S* promotorom bola izolácia celkovej RNA. Zo semenáčikov Col-0 boli pripravené štyri nezávislé vzorky a ich kvalita bola otestovaná pomocou agarózovej elektroforézy (Obrázok 19).



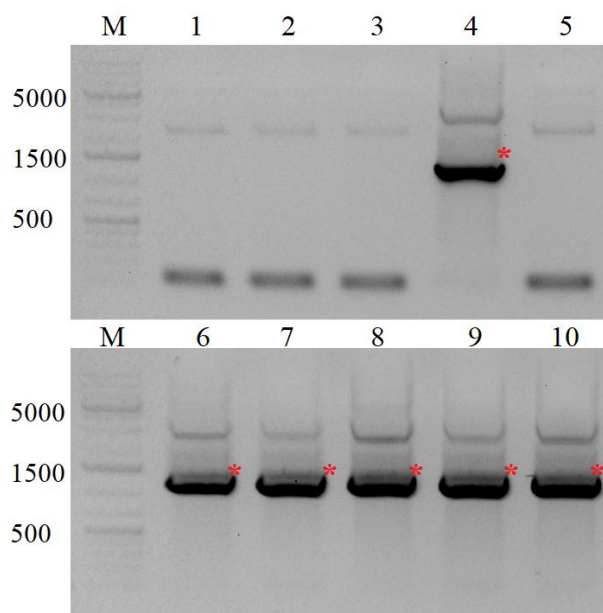
Obrázok 19 - Elektroforetogram kontroly integrity celkovej RNA. M – Štandard molekulovej hmotnosti, 1 – 4 – vzorky izolovanej celkovej RNA. Do jamiek bolo nanesených 1 μ l RNA odpovedajúcich približne 1 % z celkového pripraveného množstva.

Vzorky RNA boli ošetrené DNázou, prepísané do cDNA a použité pre PCR reakciu s GATEWAY primermi s *attB* sekvenciou (Obrázok 20). Primery ENT1_GWRE01, ENT3_GWRE01 a ENT6_GWRE01 boli navrhnuté so STOP kodónom pre následnú N-terminálnu GFP fúziu v expresnom vektore pGWB6, pričom primery ENT1_GWRE02, ENT3_GWRE02 a ENT6_GWRE02 boli navrhnuté bez STOP kodónu pre následnú C-terminálnu GFP fúziu v expresnom vektore pGWB5.



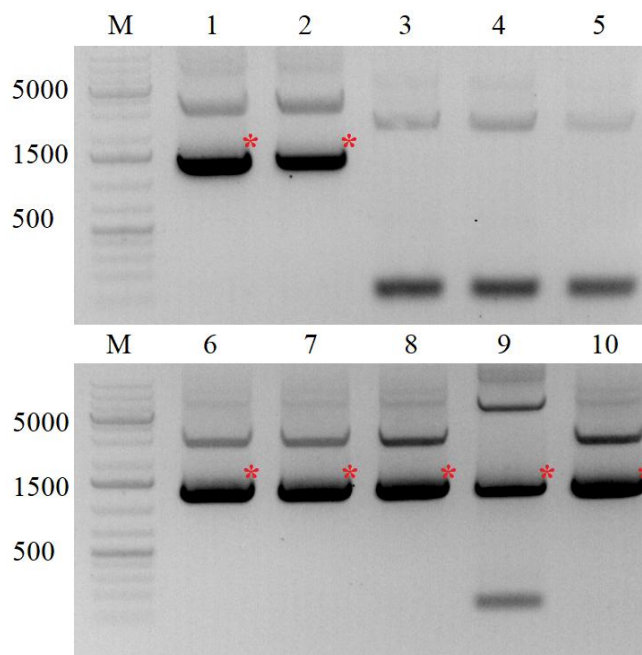
Obrázok 20 – Elektroforetogram *attB* PCR produktov pripravených pomocou primerov s *attB* oblasťami. M – štandard molekulovej hmotnosti, 1 – dráha ampliconu pripraveného pomocou primerov ENT1_GWFW01 + ENT1_GWRE01 bez pridania DMSO, 2 – dráha ampliconu pripraveného pomocou primerov ENT1_GWFW01 + ENT1_GWRE01 po pridání 3 % DMSO, 3 – dráha ampliconu pripraveného pomocou primerov ENT3_GWFW01 + ENT3_GWRE01 bez pridania DMSO, 4 – dráha ampliconu pripraveného pomocou primerov ENT3_GWFW01 + ENT1_GWRE01 po pridání 3 % DMSO, 5 – dráha ampliconu pripraveného pomocou primerov ENT6_GWFW01 + ENT6_GWRE01 bez pridania DMSO, 6 – dráha ampliconu pripraveného pomocou primerov ENT6_GWFW01 + ENT6_GWRE01 po pridání 3 % DMSO. Do jamiek bolo nanesených vždy 1 μ l PCR produktov, hviezdička označuje PCR produkty veľkosti odpovedajúce *ENT* kódujúcim sekvenciám s *attB* oblasťami

Jednotlivé amplikóny boli prečistené a použité pre BP reakciu s vektorom pDONR207. Po BP reakcii boli takto pripraveným vektorom transformované baktérie *E. coli* TOP10. Vzniknuté kolónie boli zaočkované do tekutého média a z takto pripravených kultúr boli izolované plazmidy. Tieto plazmidy boli overované pomocou PCR s dvojicou primerov, navrhnutou pre *att* oblasti, GWATTL1_FW + GWATTL1_RE (Obrázok 21).



Obrázok 21 – Elektroforetogram produktov kontrolnej PCR plazmidov izolovaných z kolónií *E.coli* TOP10, transformovaných vektorom pDONR207 po BP reakcii s *attB* ENT amplikónmi so STOP kodónom. M – štandard molekulovej hmotnosti, 1 až 5 – dráhy amplikónov z plazmidov izolovaných z piatich vybraných kolónií *ENT3*, 6 až 10 – dráhy amplikónov z plazmidov izolovaných z piatich vybraných kolónií *ENT6*, Pre kontrolnú PCR amplifikáciu boli použité primery GWATTL1_FW + GWATTL1_RE. Do jamiek bolo nanesených vždy 1 µl PCR produktov. Hviezdička označuje PCR produkty veľkostne odpovedajúce *ENT* kódujúcim sekvenciám s *attL* oblasťami

Po kontrolnej PCR boli plazmidy zaslané na kontrolné sekvenovanie, ktoré overilo správnosť získaných sekvencií. Pre sekvenovanie boli použité primery pDONR201_207_FW a pDONR201_207_RE. Po sekvenovaní boli vybrané vhodné plazmidy pre LR reakciu s vektorom pGWB6. Po LR reakcii boli takto pripraveným vektorom transformované baktérie *E. coli* TOP10. Vzniknuté kolónie boli zaočkované do tekutého média a z takto pripravených kultúr boli izolované plazmidy. Tieto plazmidy boli overované pomocou PCR s dvojicou primerov, navrhnutou pre *att* oblasti, GWATTL1_FW + GWATTL1_RE (Obrázok 22).



Obrázok 22 – Elektroforetogram produktov kontrolnej PCR plazmidov izolovaných z kolónií *E.coli* TOP10, transformovaných vektorom pGWB6 po LR reakcii s pDONR207 vektorom, obsahujúcim cDNA sekvencie génov *ENT3* alebo *ENT6*. M – štandard molekulovej hmotnosti, 1 až 5 – dráhy amplikónov z plazmidov izolovaných z piatich vybraných kolónií *ENT3*, 6 až 10 – dráhy amplikónov z plazmidov izolovaných z piatich vybraných kolónií *ENT6*. Pre kontrolnú PCR amplifikáciu boli použité primery GWATTTL1_FW + GWATTTL1_RE. Do jamiek bolo nanesených vždy 1 μ l PCR produktov. Hviezdička označuje PCR produkty veľkosti odpovedajúce *ENT* kódujúcim sekvenciám s *attB* oblasťami

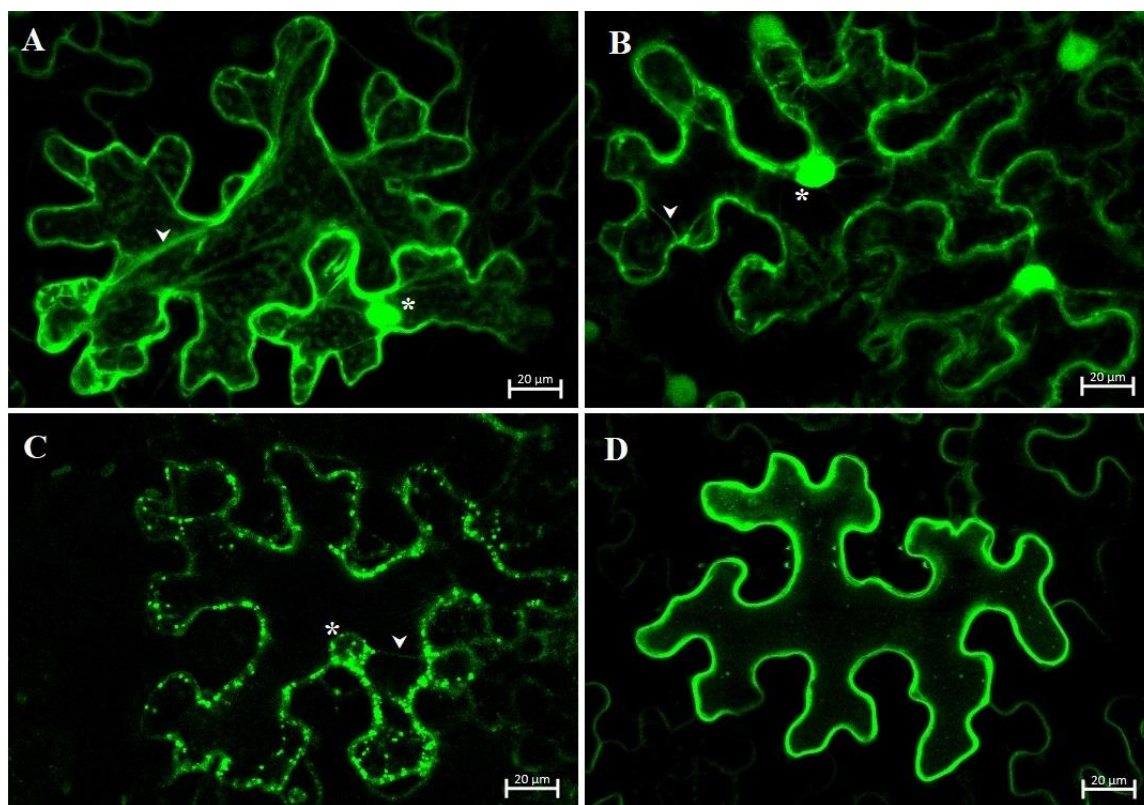
Po kontrolnej PCR boli plazmidy zaslané na kontrolné sekvenovanie, ktoré overilo správnosť získaných sekvencií. Pre sekvenovanie boli použité primery ENT3seqFW01, ENT3seqFW02 a ENT3seqRE01, ENT3seqRE02 v prípade pGWB6 plazmidov nesúcich *ENT3* a primery ENT6seqFW01, ENT6seqFW02 a ENT6seqRE01, ENT6seqRE02 v prípade pGWB6 plazmidov nesúcich *ENT6*. Po sekvenovaní boli vybrané vhodné plazmidy pre transformáciu *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Sekvenovaním overené plazmidy po BP reakcii (Obrázok 21) boli tiež použité pre PCR prípravu *attB* amplikónov *ENT3* a *ENT6*. Pre túto PCR reakciu boli použité dvojice primerov ENT3_GWFW01 + ENT3_GWFW02 a ENT6_GWFW01 + ENT6_GWRE02. Postup prípravy expresných konštruktov s N-terminálnou GFP značkou bol analogický s postupom prípravy expresných konštruktov s C-terminálnou GFP značkou. Pre C-terminálnu GFP fúziu bol použitý binárny vektor pGWB5.

Obe formy *ENT1* boli pripravené génovou syntézou vo vektore pMK-RQ. S takto pripravenými Entry klonmi boli priamou LR reakciou pripravené obe formy expresných konštruktov *ENT1* (pGWB5 i pGWB6). Takto pripravené *ENT1* expresné konštrukty boli zaslané na kontrolné sekvenovanie, ktoré overilo správnosť získaných sekvencií.

4.4 Tranzientná transformácia *Nicotiana benthamiana*

Listy rastlín *N. benthamiana* boli transformované pomocou infiltrácie baktérií *A. tumefaciens* GV3101, ktoré niesli konštrukty $35S::GFP:ENT1$ (N-terminálna GFP fúzia), $35S::ENT1:GFP$ (C-terminálna GFP fúzia), $35S::GFP:ENT3$ (N-terminálna GFP fúzia), $35S::ENT3:GFP$ (C-terminálna GFP fúzia), $35S::GFP:ENT6$ (N-terminálna GFP fúzia), $35S::ENT6:GFP$ (C-terminálna GFP fúzia) a kontrolný konštrukt $35S::GFP$. Fúzne ENT proteíny boli pozorované po 24-72 hodinách od infiltrácie. Pomocou konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu bol zelený fluorescenčný signál pozorovaný v čase 72 hodín od infiltrácie, zelený fluorescenčný signál bol však v tomto experimente pozorovaný iba v prípade konštruktov $35S::GFP:ENT1$ (N-terminálna GFP fúzia), $35S::GFP:ENT3$ (N-terminálna GFP fúzia) a $35S::ENT3:GFP$ (C-terminálna GFP fúzia) (Obrázok 23).



Obrázok 23 – Tranzientná expresia ENT proteínov s N- a C-terminálnymi značkami v listoch 6 týždňov starých *Nicotiana benthamiana*, pozorovaných 72 hodín od infiltrácie. A – pozitívna GFP kontrola, B – GFP-ENT1 exprimovaná z vektoru pGWB6, C – ENT3-GFP exprimovaná z vektoru pGWB5, D – GFP-ENT3 exprimovaná z vektoru pGWB6. Hviezdička – jadro, šípka – cytoplazmatické vlákno. Mierka – 20 μm

Fluorescenčný signál fúzneho proteínu GFP-ENT1 ukázal, že GFP-ENT1 je lokalizovaný v blízkosti plazmatickej membrány, v cytoplazme (viditeľné cytoplazmatické vlákna) a v jadre (Obrázok 23 B). Fúzny proteín GFP-ENT1 teda vykazoval podobnú lokalizáciu ako pozitívna GFP kontrola (Obrázok 1 A). Fúzny proteín ENT3-GFP bol pravdepodobne lokalizovaný na plazmatickej membráne alebo jej blízkosti, bolo pozorované veľké množstvo vačkovitých štruktúr (Obrázok 23 C). Naproti tomu u konštruktu GFP-ENT3 bol pozorovaný spojený fluorescenčný signál, ktorý pravdepodobne kolokalizuje s plazmatickou membránou, vačkovité štruktúry sa objavili iba ojedinele (Obrázok 23 D). Fúzny proteín GFP-ENT1 vykazoval podobnú lokalizáciu ako pozitívna kontrola. N-terminálna a C-terminálna GFP fúzia s proteínom ENT3 vykazovali odlišnú lokalizáciu. Fluorescenčný signál fúznych proteínov ENT6-GFP a GFP-ENT6 nebol pozorovaný. Tieto výsledky boli overované pomocou metódy western blot (kapitola 4.8.1).

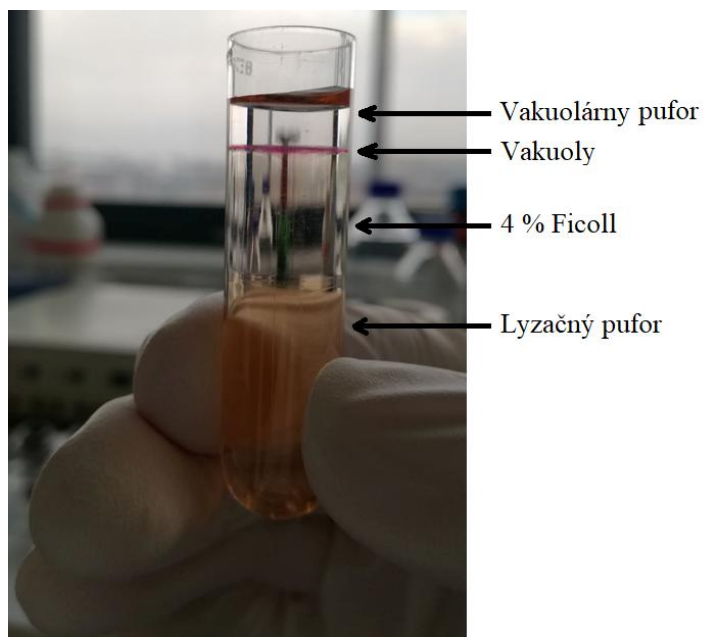
4.5 Stabilná transformácia Arabidopsis metódou floral dip

Vybrané 1 mesiac staré rastliny Arabidopsis boli transformované baktériami *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, ktoré obsahovali konštrukty *35S::GFP:ENT1* (N-terminálna GFP fúzia), *35S::ENT1:GFP* (C-terminálna GFP fúzia), *35S::GFP:ENT3* (N-terminálna GFP fúzia), *35S::ENT3:GFP* (C-terminálna GFP fúzia), *35S::GFP:ENT6* (N-terminálna GFP fúzia) a *35S::ENT6:GFP* (C-terminálna GFP fúzia).

Po približne 14 dňoch od transformácie boli zrelé semená z transformovaných rastlín zozbierané do papierových sáčkov a sú pripravené na selekciu a prípravu homozygotných nadexprimovaných ENT línií.

4.6 Izolácia vakuol a protoplastov z *ent1* a Col-0

Vakuoly a protoplasty boli izolované z listov 35 dní starých rastlín T-DNA inzerčnej línie *Arabidopsis thaliana ent1* (SALK_025174) a Col-0. Izolované vakuoly boli odoberané ustrihnutou špičkou z rozhrania 4 % Ficollu a vakuolárneho pufu (Obrázok 24).



Obrázok 24 – Prúžok izolovaných vakuol na rozhraní 4 % Ficollu a vakuolárneho pufru po ultracentrifugácii ($71\,000\times g$, 50 minút, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$) v hustotnom gradiente. Prúžok vakuol bol sfarbený doružova v dôsledku prítomnosti neutrálnej červene v lyzačnom pufore.

Izoláciou protoplastov a vakuol boli získané tri biologické replikáty v prípade T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a dva biologické replikáty v prípade Col-0. Pomocou Bürkerovej komôrky boli stanovené počty izolovaných protoplastov a vakuol v 1 ml. Pre následnú prácu (CK purifikácia, UHPLC-MS/MS) boli vzorky rozpočítané podľa Tabuľky 6. Boli pripravené dva technické replikáty z troch biologických vzoriek *ent1* (protoplasty a vakuoly) a tri technické replikáty z dvoch biologických vzoriek Col-0 (protoplasty a vakuoly), čo znamená, že pre UHPLC-MS/MS analýzu bolo pripravených 6 replikátov pre vzorky izolovaných vakuol a protoplastov od každého genotypu.

Tabuľka 6 – Počet izolovaných protoplastov a vakuol z T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0 a príprava replikátov

Biologický replikát	Genotyp	Vzorka	ks/ml	ks pre MS analýzu	V pre MS analýzu [ul]	Počet technických replikátov
1A	<i>ent1</i>	Protoplasty	661 111	165 278	250	2
		Vakuoly	154 444	154 444	1 000	2
1B	Col-0	Protoplasty	1 044 444	174 422	167	3
		Vakuoly	744 444	200 000	269	3
2A	<i>ent1</i>	Protoplasty	1 605 555	200 000	125	2
		Vakuoly	504 444	200 000	396	2
2B	Col-0	Protoplasty	950 000	158 650	167	3
		Vakuoly	717 778	200 000	279	3
3B	<i>ent1</i>	Protoplasty	872 222	200 000	229	2
		Vakuoly	291 111	200 000	687	2

4.7 UHPLC-MS/MS analýza cytokinínov

V rámci UHPLC-MS/MS boli analyzované vzorky protoplastov a vakuol izolovaných z listov T-DNA inzerčnej línie *ent1* a Col-0 Arabidopsis. Zistené koncentrácie cytokinínových profilov, ktoré boli stanovené v fmol hladinách boli prepočítané na 100 000 protoplastov/vakuol analyzovanej vzorky.

Pomocou programu MS Excel bol z nameraných hodnôt fmol/100 000 ks (vakuol, protoplastov) vypočítaný aritmetický priemer, smerodajná odchýlka a tiež p-hodnota pomocou T-testu, ktorý preukázal štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$).

Tabuľka 7 – Koncentrácia cytokinínov v protoplastoch a vakuolách Col-0 a *ent1*, koncentrácia (fmol/100 000 protoplastov/vakuol), hodnoty predstavujú aritmetický priemer \pm SD, vždy zo šiestich replikátov, uvedené hodnoty boli vyhodnotené pomocou T-testu v programe MS excel, * $p < 0,05$, pomlčka – nedetekované

Cytokiníny	Protoplasty		Vakuoly	
	Col-0	<i>ent1</i>	Col-0	<i>ent1</i>
Celkové CK	279,14 \pm 9,32	246,99 \pm 63,89	352,67 \pm 44,78	446,19 \pm 16,04*
Celkové CK bázy	4,61 \pm 0,85	3,38 \pm 0,50*	1,78 \pm 0,28	3,39 \pm 1,42*
Celkové CK ribozidy	10,09 \pm 1,33	10,78 \pm 0,35	1,04 \pm 0,22	1,20 \pm 0,06
Celkové CK nukleotidy	35 \pm 7,06	34,28 \pm 12,07	8,61 \pm 2,91	13,26 \pm 3,65
Celkové CK O-glukozidy	12,96 \pm 0,78	8,85 \pm 4,43*	23,56 \pm 2,35	26,72 \pm 2,49
Celkové CK N-glukozidy	216,49 \pm 6,06	187,36 \pm 48,76	320,55 \pm 37,69	401,62 \pm 15,02*
Celkové tZ-typy	106,32 \pm 2,56	82,78 \pm 22,50*	151,22 \pm 15,79	175,78 \pm 3,62*
tZ	0,81 \pm 0,38	0,48 \pm 0,05	-	-
tZR	0,53 \pm 0,16	0,33 \pm 0,09	0,13 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01
tZRMP	-	-	-	-
tZOG	3,72 \pm 0,63	3,57 \pm 1,47	8,23 \pm 0,74	7,44 \pm 1,02
tZROG	1,12 \pm 0,05	1,02 \pm 0,23	2,04 \pm 0,16	2,38 \pm 0,10*
tZ7G	75,84 \pm 1,78	57,96 \pm 14,23	103,30 \pm 11,81	122,90 \pm 4,14*
tZ9G	24,41 \pm 1,95	19,48 \pm 6,61	37,52 \pm 3,45	42,95 \pm 2,57*

Cytokiníny	Protoplasty		Vakuoly	
	Col-0	ent1	Col-0	ent1
cZ	2,31 ± 0,44	1,40 ± 0,22*	-	-
cZR	5,02 ± 0,68	5,78 ± 0,38	0,43 ± 0,04	0,40 ± 0,06
cZRMP	31,52 ± 6,29	31,37 ± 10,79	8,15 ± 2,97	12,86 ± 3,68
cZOG	2,89 ± 0,18	2,18 ± 0,49*	4,54 ± 0,78	6,75 ± 0,95*
cZROG	5,07 ± 0,36	4,31 ± 0,99	8,50 ± 0,72	9,86 ± 0,82*
cZ7G	40,55 ± 2,45	38,63 ± 8,67	67,11 ± 11,05	107,28 ± 22,98*
cZ9G	1,05 ± 0,12	0,99 ± 0,26	1,42 ± 0,23	1,70 ± 0,17*
Celkové iP-typy	1,60 ± 0,54	1,58 ± 0,47	1,78 ± 0,28	3,39 ± 1,42*
iP	1,60 ± 0,54	1,58 ± 0,47	1,78 ± 0,28	3,39 ± 1,42*
iPR	4,38 ± 0,50	4,49 ± 0,31	0,45 ± 0,19	0,64 ± 0,09
iPRMP	3,27 ± 0,87	2,60 ± 1,38	-	-
iP7G	55,80 ± 3,83	55,21 ± 14,31	84,67 ± 8,49	109,68 ± 6,42*
iP9G	4,00 ± 0,48	3,62 ± 1,36	6,16 ± 1,15	7,25 ± 0,98
Celkové DHZ-typy	15,35 ± 1,38	12,21 ± 3,52	21,16 ± 2,04	24,92 ± 0,63*
DHZ	-	-	-	-
DHZR	0,16 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,02
DHZRMP	0,35 ± 0,07	0,31 ± 0,11	0,52 ± 0,17	0,40 ± 0,05
DHZOG	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,29 ± 0,01*

Cytokiníny	Protoplasty		Vakuoly	
	Col-0	ent1	Col-0	ent1
DHZ7G	14,19 ± 1,34	11,03 ± 3,23*	19,47 ± 1,97	23,23 ± 0,70*
DHZ9G	0,64 ± 0,11	0,53 ± 0,15	0,90 ± 0,16	0,95 ± 0,09

Porovnaním distribúcie cytokinínových metabolitov vo vzorkách protoplastov a vakuol bolo zistené, že v protoplastoch a vakuolách Col-0 a *ent1* sú najviac zastúpené N-glukozidy (78 % v protoplastoch Col-0 a 77 % v protoplastoch *ent1*), pričom vo vakuolách je obsah N-glukozidov vyšší (90 % vo vakuolách Col-0 a *ent1*). Najmenej zastúpenou CK formou v protoplastoch sú bázy (1,65 % v Col-0 a 1,38 % v *ent1*) a vo vakuolách ribozidy (0,29 % v Col-0 a 0,27 % v *ent1*) (Obrázok 25).

Najviac zastúpeným CK typom v protoplastoch Col-0 sú tZ typy (38,09 %), pričom v protoplastoch *ent1* mierne prevládajú cZ typy (34,23 %). Vo vakuolách sú najviac zastúpené tZ typy (42,85 % v Col-0 a 39,01 % v *ent1*). Najmenej zastúpené v protoplastoch, rovnako ako aj vo vakuolách sú DHZ typy v Col-0 aj *ent1* (Obrázok 26).

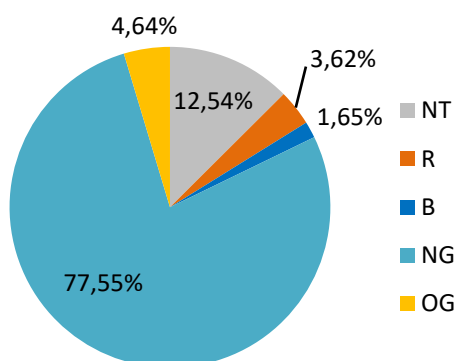
Celkový obsah CK bol signifikantne zvýšený vo vzorkách vakuol *ent1* (Obrázok 27), pričom signifikantné zvýšenie obsahu vo vzorkách vakuol *ent1* vykazovali všetky CK typy (Obrázok 28).

Vo vzorkách vakuol *ent1* bol signifikantne zvýšený obsah CK báz (Obrázok 29), najviac v prípade iP.

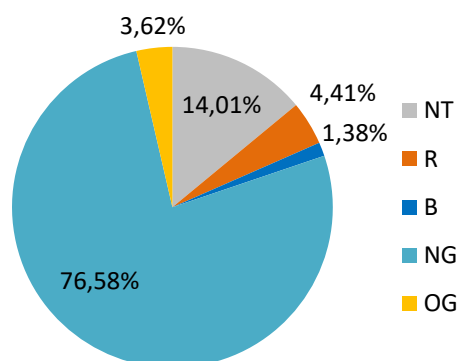
Spomedzi O-glukozidových CK metabolitov bolo signifikantné zvýšenie vo vzorkách vakuol *ent1* zistené v prípade cZOG a DHZOG (Obrázok 30) a rovnako aj v prípade ich ribozidových foriem cZROG a DHZROG (Obrázok 31).

N-glukozidy, ktoré predstavujú najviac zastúpenú formu CK vo vakuolách, vykazovali taktiež signifikantné zvýšenie obsahu vo vzorkách vakuol *ent1*, pričom signifikantne zvýšené boli všetky typy N⁷-glukozidov (Obrázok 32) a v prípade N⁹ glukozidov došlo k signifikantnému zvýšeniu obsahu tZ9G a cZ9G (Obrázok 33) vo vzorkách vakuol *ent1*.

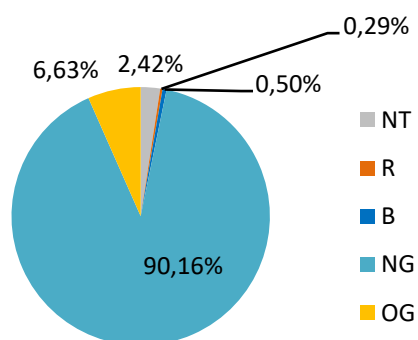
Protoplasty Col-0



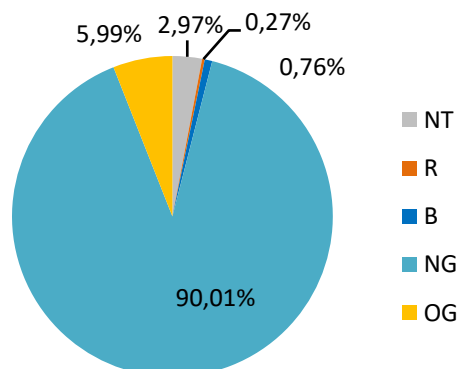
Protoplasty *ent1*



Vakuoly Col-0

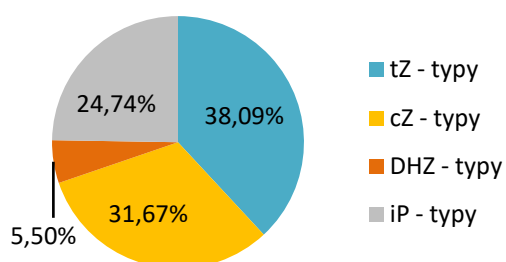


Vakuoly *ent1*

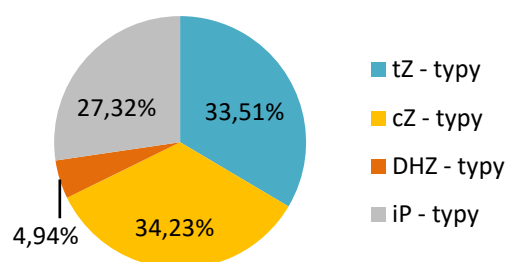


Obrázok 25 - Graf porovnania percentuálneho zastúpenia jednotlivých foriem cytokinínov vo vzorkách protoplastov a vakuol izolovaných z 35 dní starých listov T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, analyzovaných pomocou UHPLC-MS/MS.

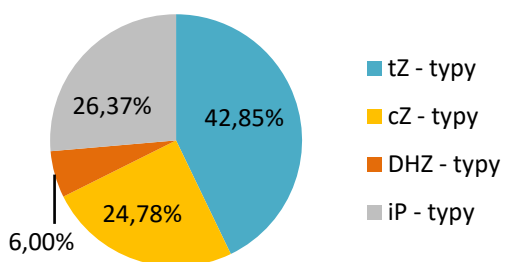
Protoplasty Col-0



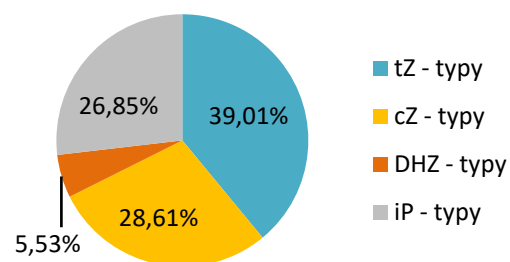
Protoplasty *ent1*



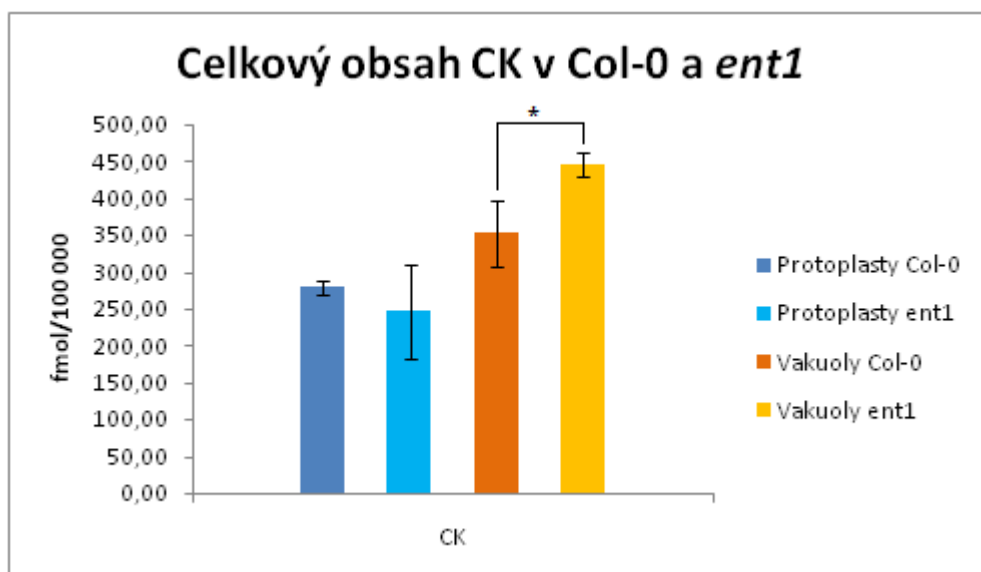
Vakuoly Col-0



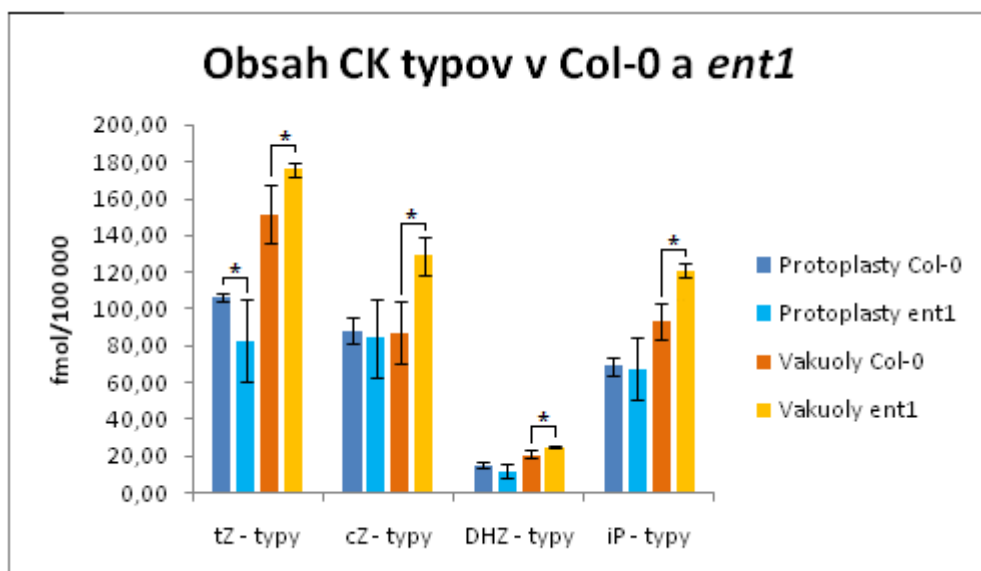
Vakuoly *ent1*



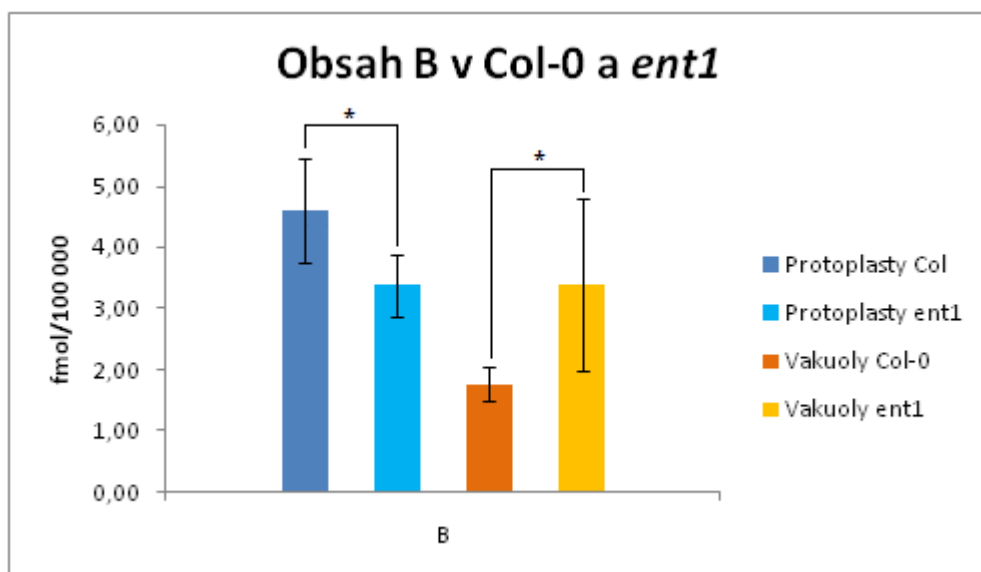
Obrázok 26 - Graf porovnania percentuálneho zastúpenia jednotlivých typov cytokinínov vo vzorkách protoplastov a vakuol izolovaných z 35 dní starých listov T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, analyzovaných pomocou UHPLC-MS/MS



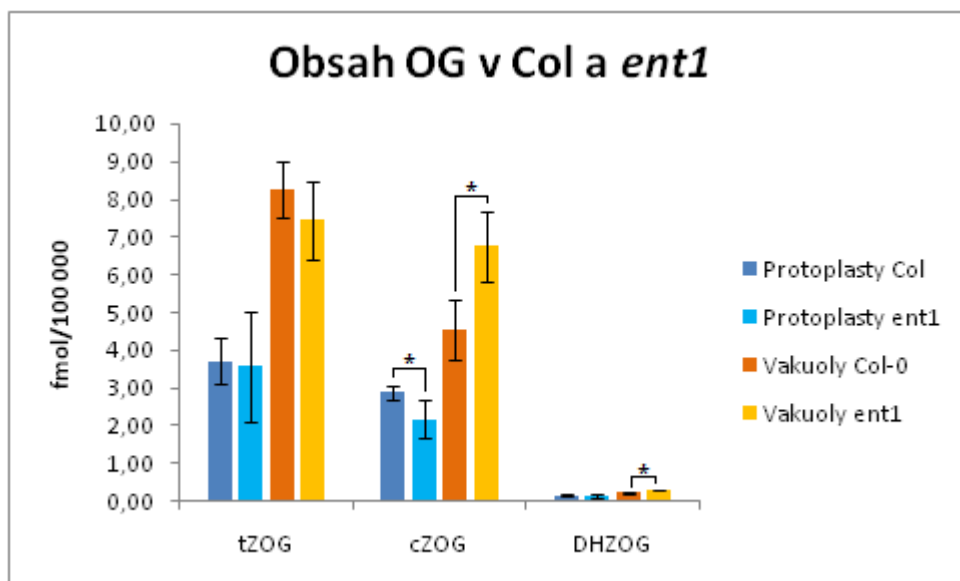
Obrázok 27 – Graf porovnania celkového obsahu cytokinínov vo vzorkách protoplastov a vakuol izolovaných z 35 dní starých listov T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, analyzovaných pomocou UHPLC-MS/MS. Hodnoty v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SD koncentrácie cytokinínov (fmol) na 100 000 protoplastov/vakuol, uvedené hodnoty boli vyhodnotené pomocou T-testu v programe MS excel, zátvorky znázorňujú porovnané hodnoty v rámci T-testu, hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$)



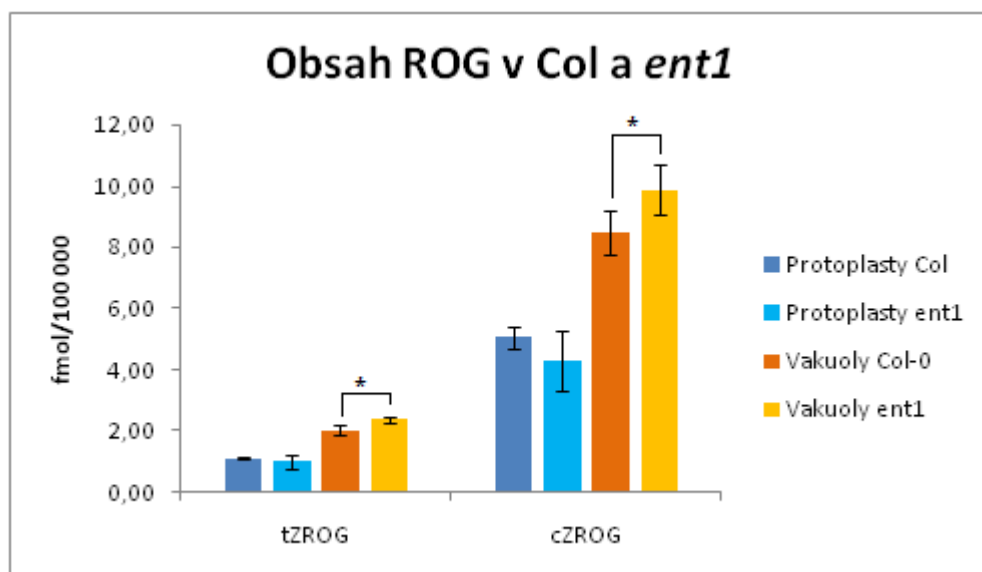
Obrázok 28 – Graf porovnania celkového obsahu jednotlivých cytokinínových typov vo vzorkách protoplastov a vakuol izolovaných z 35 dní starých listov T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, analyzovaných pomocou UHPLC-MS/MS. Hodnoty v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SD koncentrácie cytokinínov (fmol) na 100 000 protoplastov/vakuol, uvedené hodnoty boli vyhodnotené pomocou T-testu v programe MS excel, zátvorky znázorňujú porovnané hodnoty v rámci T-testu, hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$)



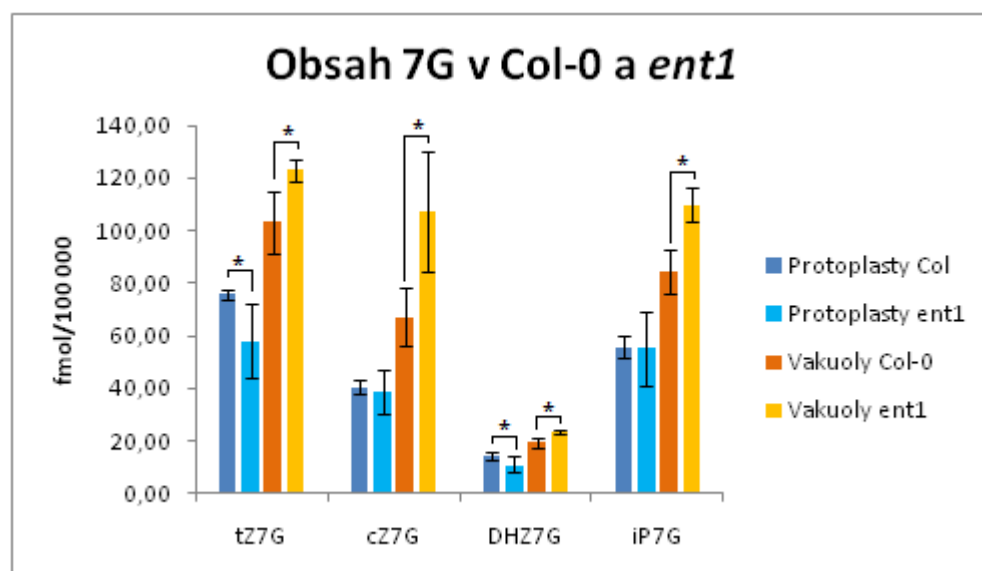
Obrázok 29 – Graf porovnania celkového obsahu cytokinínových báz vo vzorkách protoplastov a vakuol izolovaných z 35 dní starých listov T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, analyzovaných pomocou UHPLC-MS/MS. Hodnoty v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SD koncentrácie cytokinínov (fmol) na 100 000 protoplastov/vakuol, uvedené hodnoty boli vyhodnotené pomocou T-testu v programe MS excel, zátvorky znázorňujú porovnávané hodnoty v rámci T-testu, hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$)



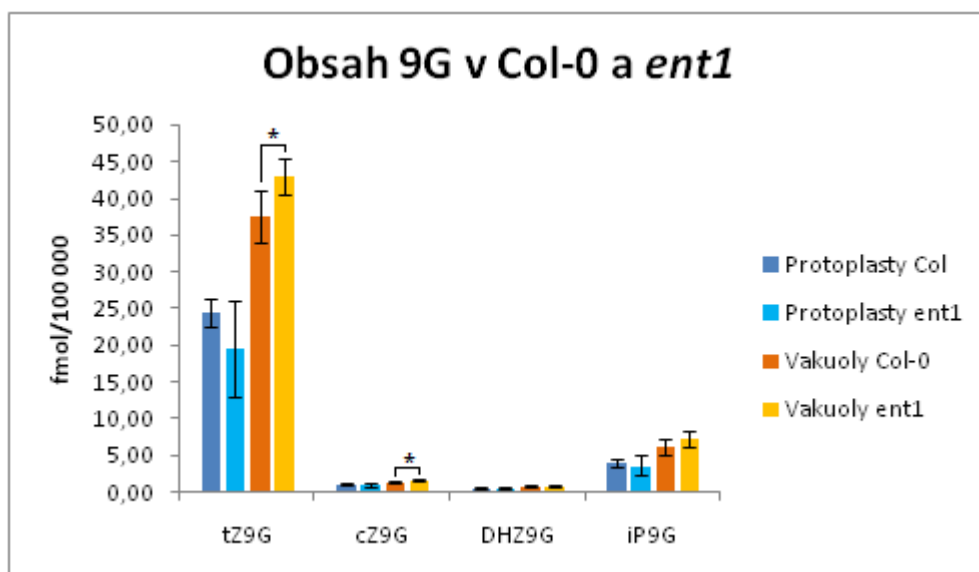
Obrázok 30 – Graf porovnania celkového obsahu jednotlivých cytokinínových O-glukozidov vo vzorkách protoplastov a vakuol izolovaných z 35 dní starých listov T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, analyzovaných pomocou UHPLC-MS/MS. Hodnoty v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SD koncentrácie cytokinínov (fmol) na 100 000 protoplastov/vakuol, uvedené hodnoty boli vyhodnotené pomocou T-testu v programe MS excel, zátvorky znázorňujú porovnávané hodnoty v rámci T-testu, hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$)



Obrázok 31 – Graf porovnania celkového obsahu jednotlivých cytokinínových ribozid-O-glukozidov vo vzorkách protoplastov a vakuol izolovaných z 35 dní starých listov T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, analyzovaných pomocou UHPLC-MS/MS. Hodnoty v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SD koncentrácie cytokinínov (fmol) na 100 000 protoplastov/vakuol, uvedené hodnoty boli vyhodnotené pomocou T-testu v programe MS excel, zátvorky znázorňujú porovnávané hodnoty v rámci T-testu, hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$)



Obrázok 32 – Graf porovnania celkového obsahu jednotlivých cytokinínových N⁷-glukozidov vo vzorkách protoplastov a vakuol izolovaných z 35 dní starých listov T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, analyzovaných pomocou UHPLC-MS/MS. Hodnoty v grafe predstavujú aritmetický priemer \pm SD koncentrácie cytokinínov (fmol) na 100 000 protoplastov/vakuol, uvedené hodnoty boli vyhodnotené pomocou T-testu v programe MS excel, zátvorky znázorňujú porovnávané hodnoty v rámci T-testu, hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$)



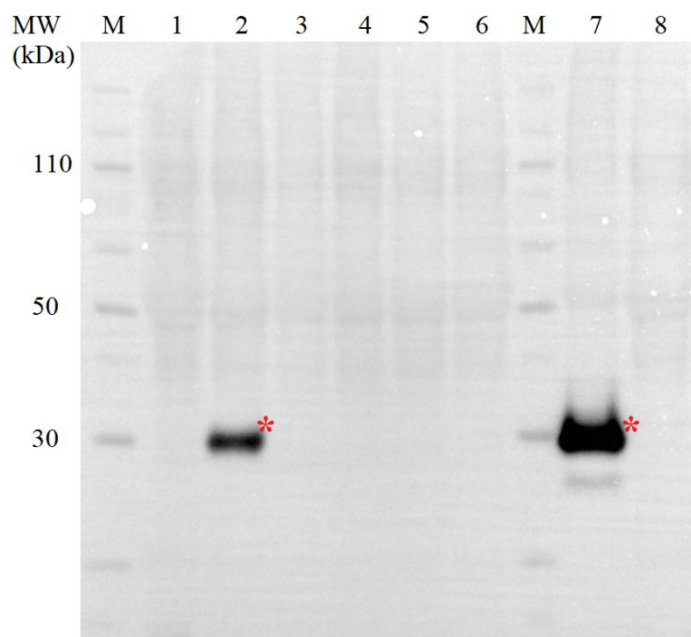
Obrázok 33 – Graf porovnania celkového obsahu jednotlivých cytokinínových N⁹-glukozidov vo vzorkách protoplastov a vakuol izolovaných z 35 dní starých listov T-DNA inzerčnej línie *ent1* (SALK_025174) a Col-0, analyzovaných pomocou UHPLC-MS/MS. Hodnoty v grafe predstavujú aritmetický priemer ± SD koncentrácie cytokinínov (fmol) na 100 000 protoplastov/vakuol, uvedené hodnoty boli vyhodnotené pomocou T-testu v programe MS excel, zátvorky znázorňujú porovnávané hodnoty v rámci T-testu, hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$)

4.8 Western blotting

Metóda blot bola v tejto práci využitá pre dva účely: imunodetekciu fúznych proteínov ENT s GFP značkou z listov tranzientne transformovaných *Nicotiana benthamiana* (kapitola 3.8.16) a overenie čistoty izolovanej vakuolárnej frakcie (kapitola 3.8.18) pre následnú purifikáciu CK a UHPLC-MS/MS analýzu.

4.8.1 Imunodetekcia fúznych proteínov ENT s GFP značkou

Z dôvodu podobnosti lokalizácie N-terminálnej GFP formy ENT1 s lokalizáciou pozitívnej kontroly (voľné GFP), spornej lokalizácie medzi N- a C-terminálnou GFP formou ENT3, ako aj z dôvodu absencie fluorescenčného signálu ostatných pripravených fúznych ENT foriem, bola zvolená metóda blot pre detekciu prítomnosti fúznych ENT proteínov pomocou GFP primárnej protilátky (Obrázok 34).

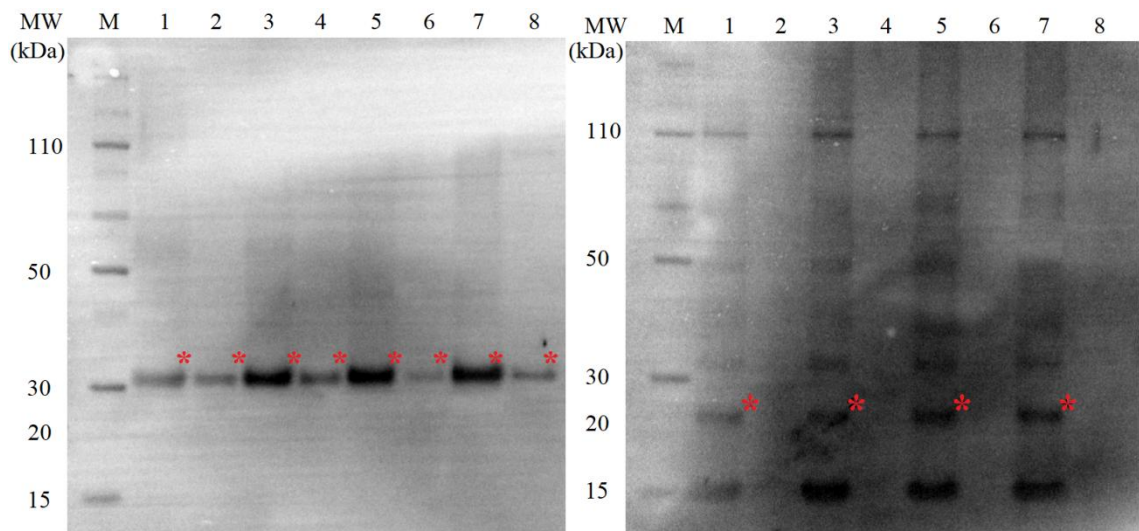


Obrázok 34 – Membrána inkubovaná s GFP primárnou protilátkou o riedení 1:1000 . MW – štandard molekulovej hmotnosti, 1 – ENT1-GFP, 2 – GFP-ENT1, 3 – ENT3-GFP, 4 – GFP-ENT3, 5 – ENT6-GFP, 6 – GFP-ENT6, 7 – pozitívna kontrola (voľné GFP), 8 – negatívna kontrola (listy infiltrované čistým infiltračným médiom), hviezdička označuje prúžok detekovaných proteínov veľkostne odpovedajúcich GFP

Výsledky imunodetekcie ukázali prítomnosť produktu o veľkosti približne 30 kDa, rovnako v prípade pozitívnej kontroly. Detekovaný proteín v dráhe so vzorkou proteínov extrahovaných z tranzientne transformovaných listov *Nicotiana benthamiana* konštruktom *35S::GFP:ENT1* bol pravdepodobne voľný GFP o veľkosti 27 kDa. Nebol však detekovaný fúzny proteín GFP-ENT1 a rovnako nebol detekovaný ani žiadny iný fúzny ENT proteín v analyzovaných vzorkách a to ani po prenose a vyvolaní signálu na svetlomitlivej membráne.

4.8.2 Overovanie čistoty vakuolárnej frakcie

Čistota frakcie izolovaných vakuol bola dôležitá pre následnú UHPLC-MS/MS analýzu, kde by kontaminácia vzoriek izolovaných vakuol inými organelami značne skresľovala výsledky analýzy. Pre overenie čistoty izolovanej vakuolárnej frakcie bola použitá protilátka proti proteínu secretion-associated and Ras-related protein 1 (Sar1), ktorý predstavuje marker ER. Western blot analýza bola vykonaná pre vzorky vakuol, ako aj protoplastov (Obrázok 35)



Obrázok 35 – Overenie čistoty vakuolárnej frakcie metódou western blot. Vľavo – membrána inkubovaná s V-ATPase (vakuolárny marker) primárnou protilátkou o riedení 1:2000, vpravo – membrána inkubovaná so Sar1 (marker ER) primárnou protilátkou o riedení 1:500. MW – štandard molekulovej hmotnosti; 1, 5 – vzorky *ent1* protoplastov; 7, 9 – vzorky Col-0 protoplastov; 2, 6 – vzorky *ent1* vakuol; 4, 8 – vzorky Col-0 vakuol, hviezdičky označujú prúžok detekovaných proteínov veľkosti odpovedajúcich ϵ -podjednotke V-ATPázy (31 kDa) a Sar1 (21 kDa). Proteínové nanášky boli v prípade pravej i ľavej membrány identické (19,5 μ l).

Výsledky overenia čistoty vakuolárnej frakcie pomocou blotu ukazujú, že vo všetkých analyzovaných vzorkách bol detekovaný vakuolárny marker V-ATPáza (31 kDa), zatiaľ čo marker ER, Sar1 (21 kDa), bol detekovaný výlučne iba v dráhach vzoriek protoplastov.

5 DISKUSIA

Predkladaná diplomová práca sa zaoberá klonovaním pravdepodobných cytokinínových transportérov AtENT1, AtENT3 a AtENT6 a prípravou N-terminálnych a C-terminálnych GFP fúzií pre lokalizáciu transportérov na subcelulárnej úrovni. Bola vykonaná tranzientná expresia v listoch *Nicotiana benthamiana* a ďalej bolo v rámci tejto diplomovej práce započaté odvodenie stabilných nadexprimujúcich línií *Arabidopsis thaliana*. Ďalej som sa v rámci diplomovej práce venoval charakterizáciou charakterizáciou transportnej funkcie AtENT1, meraním obsahu cytokinínov vo vakuole a v protoplastoch a fenotypizáciou jeho T-DNA inzerčnej línie, v rámci ktorej bola charakterizovaná zvlášť nadzemná časť a koreňová časť rastliny. Doposiaľ bolo publikovaných niekoľko prác, ktoré naznačujú účasť AtENT proteínov pri transporte rôznych foriem cytokinínov (Sun *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2008) a táto diplomová práca mala za cieľ rozšíriť tieto informácie.

Prvým krokom k lokalizácii vybraných ENT foriem bolo ich samotné klonovanie. Pre tento účel bola využitá jednokomponentová GATEWAY technológia. Príprava samotných *attB* ENT foriem, určených pre následnú BP reakciu priniesla značné komplikácie. Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie pracovného roztoku GATEWAY primerov malo pravdepodobne za následok nízku koncentráciu PCR produktov. Podmienky PCR reakcie bolo nutné optimalizovať – špecifický PCR produkt bol detekovaný až po pridaní DMSO do reakčnej zmesi. Tieto problémy sú pravdepodobne zapríčinené nadmernou dĺžkou navrhnutých GATEWAY primerov (>50 bp), ktoré tak vytvárali primer-diméry.

V následnej BP reakcii sa opakovane nepodarilo pripraviť ENT1 Entry klon. Z časových dôvodov bol ENT1 Entry klon pripravený génovou syntézou. Naproti tomu všetky Entry klony boli v LR reakcii rekombinované s vysokou efektivitou. ENT1, 3 a 6 formy bez a so STOP kodónom boli rekombinované do vektorov pGWB5 a pGWB6 (v tomto poradí). Týmto spôsobom boli pripravené expresné ENT konštrukty s N- a C-terminálnou GFP značkou pod konštitutívnym 35S promotorom. Konštruktmi boli transformované baktérie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 a nimi boli následne tranzientne transformované rastliny *Nicotiana benthamiana* a stabilne transformované *Arabidopsis thaliana* Col-0.

Mikroskopické pozorovania tranzientne transformovaných rastlín *Nicotiana benthamiana* pomocou konfokálnej laserovej skenovacej mikroskopie ukazujú, že

dochádza k silnej expresii oboch ENT3 foriem a naznačujú, že fúzny proteín GFP-ENT3 (N-terminálna GFP fúzia) sa nachádza na plazmatickej membráne, čo je v súlade s doterajšími publikovanými výsledkami pre tento proteín (Li *et al.*, 2003; Traub *et al.*, 2007). Tieto pozorovania bude nutné ďalej overiť kolokalizačnými experimentami s vhodnými markermi pre plazmatickú membránu (napr. FM4-64). Oproti tomu fúzny proteín ENT3-GFP (C-terminálna GFP fúzia) vykazuje okrem lokalizácie na plazmatickej membráne aj lokalizáciu v cytoplazme v podobe vačkovitých štruktúr, ktoré boli čiastočne pozorované aj u predošlého konštruktú GFP-ENT3 (N-terminálna GFP fúzia). Mohlo by sa jednať o agregáciu tohto proteínu alebo o transportovanú formu tohto proteínu. Odlišná lokalizácia fúznych proteínov GFP-ENT3 (N-terminálna GFP fúzia) a ENT3-GFP (C-terminálna GFP fúzia) môže byť zapríčinená interferenciou C-terminálnej GFP značky s C-terminálnou signálnou sekvenciou pre lokalizáciu na plazmatickej membráne. Pre overenie bude nutné získať dáta zo stabilnej homológnej expresie v *Arabidopsis*.

V prípade GFP-ENT1 (N-terminálna GFP fúzia) bola pozorovaná lokalizácia podobná lokalizácii pozitívnej kontroly samotného GFP pod konštitutívnym 35S promotorom. Na základe predpokladu, že lokalizovaný signál je pravdepodobne voľný GFP proteín, namiesto fúzneho ENT1 proteínu s N-terminálnou GFP značkou, bola do práce začlenená imunodetekcia fúznych ENT proteínov pomocou metódy Western blot. Výsledky imunodetekcie ukazujú, že v prípade pozorovaného GFP signálu v konfokálnom mikroskope sa naozaj jedná o voľný GFP proteín. Detekcia voľného GFP proteínu namiesto fúzneho GFP-ENT1 (N-terminálna GFP fúzia) a nemožnosť detekcie formy ENT1-GFP (C-terminálna GFP fúzia) môžu byť príčinou, prečo nám o lokalizácii tohto transportéru zatiaľ napovedajú iba výsledky proteomických analýz. Štiepenie GFP môže nastať buď počas fyziologickej degradácie alebo vrámci umelého proteínového GFP linkeru. V tomto prípade sa jedná o linker odvodený z *attB* sekvencie. Riešením by mohlo byť nahradenie *attB* linkeru nejakou vhodnejšou sekvenciou (Dubin *et al.*, 2008) alebo vloženie GFP do stredu hostiteľského proteínu (Sheridan *et al.*, 2002).

Nezrovnalosti v detekcii ENT3 foriem metódami konfokálnej mikroskopie a Western blot môžu byť spôsobené v dôsledku použitia neidentických transformovaných rastlín *Nicotiana benthamiana*. Pre túto transformáciu boli použité čerstvé kultúry *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, s odpovedajúcimi expresnými konštruktami, ktoré však po ceznočnej kultivácii nevykazovali ideálne hodnoty OD₆₀₀. Ostatné formy

fúzných ENT proteínov s GFP značkou (ENT1-GFP, GFP-ENT6 a ENT6-GFP), sa žiaľ nepodarilo detekovať ani pomocou konfokálnej mikroskopie a ani pomocou metódy Western blot. Na základe týchto dát sa domnievame, že expresia pripravených konštruktov v *Nicotiana benthamiana* nie je ideálna a pre ďalšiu prácu je nutné pracovať s homológou expresiou priamo v rastlinách *Arabidopsis thaliana*.

Ďalšia časť práce bola zameraná na detailnejšiu charakteristiku transportnej funkcie proteínu AtENT1. Doterajšie poznatky napovedajú, že AtENT1 sa nachádza na tonoplaste (Jaquinod *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2011).

Pre charakterizáciu fenotypu T-DNA inzerčnej línie *ent1* bola analyzovaná zvlášť nadzemná a koreňová časť. Nadzemná časť bola charakterizovaná pomocou PlantScreen™ Robotic XYZ System metódami merania plochy listov a relatívnej rýchlosti rastu. Rastliny boli analyzované v štandardných podmienkach, ako aj v prítomnosti 10 nmol·l⁻¹ a 100 nmol·l⁻¹ BAP. Je zaujímavé, že semenáčky *ent1* si zachovali v priemere väčšiu listovú plochu po celú dobu analýzy, čo je zrejme už v prvý deň analýzy, kedy je plocha o 31 % vyššia u neošetrených rastlín *ent1* v porovnaní s kontrolou. Avšak relatívna rýchlosť rastu nebola počas všetkých sledovaných dní vyššia v prípade semenáčikov *ent1* oproti kontrolným rastlinám. Naopak dochádzalo k dynamickým zmenám rýchlosti rastu u *ent1*, oscilácie hodnôt boli najvyššie v prípade semenáčikov *ent1* ošetrených 10 nmol·l⁻¹ BAP. Tieto výsledky naznačujú, že *ent1* je citlivejšia na aplikáciu exogénnych cytokinínov, ktoré výraznejšie menia cytokinínovú rovnováhu. Smerodajnejšie výsledky by mohli byť dosiahnuté napríklad exogénnou aplikáciou ribozidových foriem cytokinínov.

Pri fenotypizácii koreňovej časti mali analyzované semenáčky *ent1* dlhší primárny koreň, ako aj väčší počet laterálnych koreňov, a to ako v neošetrených rastlinách, tak aj po aplikácii predpokladanej transportnej cytokinínovej formy tohto transportéru, tZR. Pozorujeme teda cytokinín hyposenzitívne správanie, kedy zvýšená cytokinínová koncentrácia má nižší negatívny efekt v porovnaní s kontrolou divého typu. V prípade aromatického cytokinínu BAP nebola prekvapivo pozorovaná žiadna významná zmena. Pozorovaná zmena je však pomerne nízka (7 %) a pre získanie výraznejšieho efektu bude v budúcnosti potrebné pripraviť viacnásobné *ent* mutantné línie, nakoľko je možné očakávať, že jednotlivé ENT formy sa v transporte cytokinínov dopĺňajú.

Izoláciou vakuol z listov *Arabidopsis* T-DNA inzerčnej línie *ent1* a Col-0 a následnou kvantifikáciou obsahu jednotlivých cytokinínov vo vakuolárnej

a protoplastovej frakcii *ent1* a Col-0 bola objavená možná transportná funkcia ENT1 pre CK. Výsledky distribúcie cytokinínových metabolitov vo vakuolách sú podobné s výsledkami publikovanými v Jiskrová *et al.*, 2016. Vakuoly T-DNA inzerčnej línie *ent1* majú väčší obsah rôznych cytokinínových metabolitov v porovnaní s divým typom, čo naznačuje, že ENT1 proteín by naozaj mohol hrať významnú úlohu v cytokinínovom transporte. Na základe získaných výsledkov je možné predpokladať, že AtENT1 by mohol fungovať ako vakuolárny cytokinínový exportér. Hypotéza o exportnej funkcii AtENT1 je po prvýkrát popísaná aj v Bernard *et al.*, 2011, kde autori opisujú AtENT1 ako adenosínový exportér z vakuoly do cytoplazmy. Zdá sa, že vakuoly T-DNA inzerčnej línie v dôsledku nefunkčného ENT1 transportéru nie sú schopné exportovať cytokiníny z vakuoly a cytokiníny sú tak vo väčšom množstve nahromadené vo vakuolách. Toto korešponduje aj s pozorovaným hyposenzitívnym správaním koreňom *ent1*. Z výsledkov samozrejme nie je možné určiť, ktoré cytokiníny sú špecificky transportované AtENT1. Vo vakuolách *ent1* bol detekovaný zvýšený obsah všetkých cytokinínových typov. Výsledky Sun *et al.*, 2005 čiastočne naznačujú, že AtENT1 by mohol transportovať tZR, nie však iPR a iP. V prípade našich výsledkov nebolo zistené významné zvýšenie obsahu ribozidových foriem cytokinínov vo vakuolách *ent1*, ribozidové formy cytokinínov tvorili < 1 % z celkových cytokinínových foriem, čo odpovedá štandardnému obsahu cytokinínových foriem v rastlinách v tomto vývojovom štádiu. Navyše konkrétne v prípade tZR bol detekovaný nižší obsah vo vakuolách *ent1*, zatiaľ čo obsah jeho O-glukozidovej formy bol vo vakuolách *ent1* významne zvýšený, čo môže svedčiť o metabolických premenách aj vo vnútri vakuol.

Zaujímavosťou je zvýšený obsah aktívnej cytokinínovej formy iP vo vakuolách *ent1*, nakoľko z doterajších výsledkov vyplýva, že AtENT1 nemá afinitu pre voľné bázy (Möhlmann *et al.*, 2001). Zvýšenie obsahu bolo zistené aj v prípade najabundantnejších glukozidových foriem cytokinínov, ktoré predstavujú inaktivované cytokinínové formy. Zo získaných výsledkov je ťažké usúdiť ktoré cytokiníny sú prenášané pomocou AtENT1, nakoľko z doterajších poznatkov nie je jasné, kde v rastlinnej bunke dochádza ku glukozidácii cytokinínov. Pre získanie jednoznačných dát bude nutné pripraviť rádioaktívne značené formy jednotlivých cytokinínových foriem a znovu zopakovať analýzu ich obsahu v protoplastoch a vakuolách. Na rozdiel od špekulatívnej lokalizácie cytokinín-špecifických UGT vo vakuolách (Meek *et al.*, 2008; Pineda Rodó *et al.*, 2008; Bajguz a Piotrowska, 2009), enzým trans-zeatín O-glykozytransferáza zo *Zea mays* a

Phaseolus vulgaris bol imunodetekovaný v jadre, cytozole, bol úzko spojený s plazmatickou membránou a nachádzal sa taktiež v bunkovej stene koreňových buniek *Z. mays* (Li *et al.*, 2001). Navyše fúzny proteín UGT85A1 s GFP značkou z *Arabidopsis* bol doteraz detekovaný v cytozole a jadre (Jin *et al.*, 2013). Stále však existuje málo informácií o lokalizácii CK glukozidov na subcelulárnej úrovni. Hoci sa zistilo, že cytokinín-O-glukozidy sú prítomné vo vakuolách *Chenopodium rubrum* (Fusseder a Ziegler, 1988), nedávne práce ukazujú prevládajúcu lokalizáciu oboch typov cytokinín glukozidov v extracelulárnom priestore (Jiskrová *et al.*, 2016; Šmehilová *et al.*, 2016). To, ktoré cytokiníny sú špecificky prenášané AtENT1 bude predmetom ďalších prác.

Overením čistoty pomocou metódy western blot nebola zistená žiadna významná kontaminácia inými organelami.

Použitá metóda izolácie vakuol je však značne limitovaná, nakoľko takto izolované a analyzované môžu byť iba vakuoly z listovej ružice dospelých rastlín. Táto skutočnosť znemožňuje analýzu iných štádií vývoja rastliny. Druhou limitáciou je nemožnosť izolácie vakuol z koreňovej časti, kde je AtENT1 exprimovaný vo vyššej miere.

Na základe vyššie prezentovaných výsledkov bol preukázaný fenotyp T-DNA inzerčnej línie *ent1* reagujúci na cytokiníny, predovšetkým tZR. Boli úspešne pripravené expresné konštrukty ENT a bola určená subcelulárna lokalizácia AtENT3. Ďalšie pripravené konštrukty budú testované v *Arabidopsis*. Vakuoly *ent1* ukázali signifikantný rozdiel v obsahu cytokinínových foriem. Nie je však možné preukázať, aké konkrétne formy sú z vakuoly prostredníctvom AtENT1 exportované, bližšia špecifikácia bude predmetom ďalších štúdií.

6 ZÁVER

V teoretickej časti diplomovej práce bola vypracovaná literárna rešerš na tému cytokiníny so zameraním na biosyntézu, inaktiváciu a degradáciu, cytokinínový transport a distribúciu cytokinínov vo vakuolách.

V praktickej časti boli pomocou GATEWAY technológie úspešne pripravené *ENT* expresné konštrukty (*35S::GFP:ENT1*, *35S::ENT1:GFP*, *35S::GFP:ENT3*, *35S::ENT3:GFP*, *35S::GFP:ENT6* a *35S::ENT6:GFP*).

Pomocou *Agrobacterium tumefaciens*, nesúceho príslušné konštrukty, boli tranzientne transformované rastliny *Nicotiana benthamiana* a bola pozorovaná subcelulárna lokalizácia fúznych proteínov *ENT* pomocou konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu. Po 72 hodinách od transformácie boli exprimované niektoré fúzne proteíny s GFP značkou. Bola určená subcelulárna lokalizácia fúzneho proteínu GFP-*ENT3* (N-terminálna GFP fúzia) v blízkosti plazmatickej membrány. Lokalizáciu ostatných fúznych proteínov *ENT* sa nepodarilo určiť, pripravené expresné konštrukty budú však testované v stabilných nadexprimujúcich líniiach *Arabidopsis thaliana*, ktorých odvodenie bolo započaté v rámci tejto diplomovej práce.

V tejto práci bol taktiež charakterizovaný fenotyp T-DNA inzerčnej línie *ent1*. Analýzou nadzemnej časti línie *ent1* bolo preukázané významné zvýšenie listovej plochy *ent1* línie v porovnaní s divým typom. Analýzou rýchlosti rastu bolo zistené, že v *ent1* línii dochádza k dynamickým zmenám rýchlosti rastu.

Analýzou koreňovej časti bol preukázaný fenotyp T-DNA inzerčnej línie *ent1* reagujúci na cytokiníny, predovšetkým tZR.

Taktiež boli v rámci diplomovej práce izolované protoplasty a vakuoly z T-DNA inzerčnej línie *ent1* a divého typu. Z izolovaných protoplastov a vakuol boli purifikované cytokiníny. Následne bol UHPLC-MS/MS analýzou zistený vyšší obsah rôznych cytokinínov, predovšetkým ich inaktívnych glukozidových foriem. Spomedzi glukozidových foriem cytokinínov bol významne zvýšený obsah všetkých N⁷-glukozidových foriem vo vakuolách *ent1* línie.

Prvýkrát tak bola objavená transportná funkcia AtENT1 pre cytokinínové formy a bolo tiež zistené, že AtENT1 funguje ako vakuolárny cytokinínový exportér. Nebolo však možné preukázať, ktoré cytokinínové formy sú z vakuoly prostredníctvom AtENT1 exportované a preto a táto charakterizácia bude predmetom ďalších štúdií.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Acimovic Y, Coe IR (2002) Molecular Evolution of the Equilibrative Nucleoside Transporter Family: Identification of Novel Family Members in Prokaryotes and Eukaryotes. *Mol Biol Evol* **19**: 2199–2210
- Alejandro S, Lee Y, Tohge T, Sudre D, Osorio S, Park J, Bovet L, Lee Y, Geldner N, Fernie AR (2012) AtABCG29 Is a Monolignol Transporter Involved in Lignin Biosynthesis. *Curr Biol* **22**: 1207–1212
- Armstrong DJ, Burrows WJ, Skoog F, Roy KL, Söll D (1969) Cytokinins: distribution in transfer rna species of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **63**: 834–841
- Bajguz A, Piotrowska A (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**: 957–969
- Baldwin SA, Beal PR, Yao SYM, King AE, Cass CE, Young JD (2004) The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflüg Arch* **447**: 735–743
- Baldwin SA, Yao SYM, Hyde RJ, Ng AML, Foppolo S, Barnes K, Ritzel MWL, Cass CE, Young JD (2005) Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J Biol Chem* **280**: 15880–15887
- Barnes K, Dobrzynski H, Foppolo S, Beal PR, Ismat F, Scullion ER, Sun L, Tellez J, Ritzel MWL, Claycomb WC (2006) Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ Res* **99**: 510–519
- Bassil NV, Mok D, Mok MC (1993) Partial Purification of a cis-trans-Isomerase of Zeatin from Immature Seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* **102**: 867–872
- Bernard C, Traub M, Kunz H-H, Hach S, Trentmann O, Möhlmann T (2011) Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **62**: 4627–4637
- Bessire M, Borel S, Fabre G, Carraça L, Efremova N, Yephremov A, Cao Y, Jetter R, Jacquat A-C, Métraux J-P (2011) A Member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE Family of ATP Binding Cassette Transporters Is Required for the Formation of a Functional Cuticle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1958–1970
- Beveridge CA, Symons GM, Murfet IC, Ross JJ, Rameau C (1997) The rms1 Mutant of Pea Has Elevated Indole-3-Acetic Acid Levels and Reduced Root-Sap Zeatin Riboside Content but Increased Branching Controlled by Graft-Transmissible Signal(s). *Plant Physiol* **115**: 1251–1258
- Blagoeva E, Dobrev PI, Malbeck J, Motyka V, Strnad M, Hanus J, Vanková R (2004) Cytokinin N-glucosylation inhibitors suppress deactivation of exogenous cytokinins in radish, but their effect on active endogenous cytokinins is counteracted by other regulatory mechanisms. *Physiol Plant* **121**: 215–222
- Borghi L, Kang J, Ko D, Lee Y, Martinoia E (2015) The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochem Soc Trans* **43**: 924–930
- Bowles D, Lim E-K, Poppenberger B, Vaistij FE (2006) Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu Rev Plant Biol* **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
- Bultreys A, Trombik T, Drozak A, Boutry M (2009) *Nicotiana plumbaginifolia* plants silenced for the ATP-binding cassette transporter gene NpPDR1 show increased susceptibility to a group of fungal and oomycete pathogens. *Mol Plant Pathol* **10**: 651–663
- Bürkle L, Cedzich A, Döpke C, Stransky H, Okumoto S, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J* **34**: 13–26

- Cabrita MA, Baldwin SA, Young JD, Cass CE (2002) Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochem Cell Biol* **80**: 623–638
- Cedzich A, Stransky H, Schulz B, Frommer WB (2008) Characterization of Cytokinin and Adenine Transport in Arabidopsis Cell Cultures. *Plant Physiol* **148**: 1857–1867
- Chen C-M, Kristopeit SM (1981a) Metabolism of Cytokinin: Dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiol* **67**: 494–498
- Chen C-M, Kristopeit SM (1981b) Metabolism of Cytokinin: Deribosylation of Cytokinin Ribonucleoside by Adenosine Nucleosidase from Wheat Germ Cells. *Plant Physiol* **68**: 1020–1023
- Chen KL, Xu MX, Li GY, Liang H, Xia ZL, Liu X, Zhang JS, Zhang AM, Wang DW (2006) Identification of AtENT3 as the main transporter for uridine uptake in Arabidopsis roots. *Cell Res* **16**: 377–388
- Corbesier L, Prinsen E, Jacquard A, Lejeune PJ, Onckelen HV, Périlleux C, Bernier G (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of Arabidopsis thaliana during floral transition. *J Exp Bot* **54**: 2511–2517
- Cornelius S, Traub M, Bernard C, Salzig C, Lang P, Möhlmann T (2012) Nucleoside transport across the plasma membrane mediated by equilibrative nucleoside transporter 3 influences metabolism of Arabidopsis seedlings. *Plant Biol Stuttg Ger* **14**: 696–705
- De Diego N, Fürst T, Humplík JF, Ugena L, Podlešáková K, Spíchal L (2017) An Automated Method for High-Throughput Screening of Arabidopsis Rosette Growth in Multi-Well Plates and Its Validation in Stress Conditions. *Front Plant Sci* **8**: 1702
- Deng Y, Dong H, Mu J, Ren B, Zheng B, Ji Z, Yang W-C, Liang Y, Zuo J (2010) Arabidopsis histidine kinase CKII acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *Plant Cell* **22**: 1232–1248
- Doležal K, Popa I, Kryštof V, Spíchal L, Fojtíková M, Holub J, Lenobel R, Schmülling T, Strnad M (2006) Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorg Med Chem* **14**: 875–884
- Dubin MJ, Bowler C, Benvenuto G (2008) A modified Gateway cloning strategy for overexpressing tagged proteins in plants. *Plant Methods* **4**: 3
- Durán-Medina Y, Díaz-Ramírez D, Marsch-Martínez N (2017) Cytokinins on the Move. *Front Plant Sci* **8**: 146
- El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**: 1373–1383
- Errasti-Murugarren E, Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2008) A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum. *FASEB J* **23**: 172–182
- Frébort I, Kowalska M, Hluska T, Frébortová J, Galuszka P (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot* **62**: 2431–2452
- Fusseder A, Ziegler P (1988) Metabolism and compartmentation of dihydrozeatin exogenously supplied to photoautotrophic suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Planta* **173**: 104–109
- Galuszka P, Frébort I, Šebela M, Sauer P, Jacobsen S, Peč P (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? *Eur J Biochem* **268**: 450–461
- Galuszka P, Frébortová J, Werner T, Yamada M, Strnad M, Schmülling T, Frébort I (2004) Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat: cloning and heterologous expression. *Eur J Biochem* **271**: 3990–4002
- Galuszka P, Popelková H, Werner T, Frébortová J, Pospíšilová H, Mik V, Köllmer I, Schmülling T, Frébort I (2007) Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from Arabidopsis thaliana Expressed in Nicotiana tabacum L. *J Plant Growth Regul* **26**: 255–267
- Gillissen B, Bürkle L, André B, Kühn C, Rentsch D, Brandl B, Frommer WB (2000) A New Family of High-Affinity Transporters for Adenine, Cytosine, and Purine Derivatives in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 291–300

- Girke C, Arutyunova E, Syed M, Traub M, Möhlmann T, Lemieux MJ (2015) High yield expression and purification of equilibrative nucleoside transporter 7 (ENT7) from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* **1850**: 1921–1929
- Girke C, Daumann M, Niopek-Witz S, Möhlmann T (2014) Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Front Plant Sci* **5**: 433
- Gloeckner-Hofmann K, Guillén-Gómez E, Schmidtgen C, Porstmann R, Ziegler R, Stoss O, Casado FJ, Rüschoff J, Pastor-Anglada M (2006) Expression of the High-Affinity Fluoropyrimidine-Preferring Nucleoside Transporter hCNT1 Correlates with Decreased Disease-Free Survival in Breast Cancer. *Oncology* **70**: 238–244
- Golovko A, Sitbon F, Tillberg E, Nicander B (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **49**: 161–169
- Gray JH, Owen RP, Giacomini KM (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflug Arch* **447**: 728–734
- Griffith DA, Jarvis SM (1996) Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Biomembr* **1286**: 153–181
- Haberer G, Kieber JJ (2002) Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol* **128**: 354–362
- Han X, Zeng H, Bartocci P, Fantozzi F, Yan Y (2018) Phytohormones and Effects on Growth and Metabolites of Microalgae: A Review. *Fermentation* **4**: 25
- Hecht S, Eisenreich W, Adam P, Amslinger S, Kis K, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F (2001) Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 14837–14842
- 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 Physiol* **138**: 196–206
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* **59**: 75–83
- Hluska T, Šebela M, Lenobel R, Frébort I, Galuszka P (2017) Purification of Maize Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Casts Doubt on the Existence of Zeatin Cis-Trans Isomerase in Plants. *Front Plant Sci* **8**: 1473
- Huang QQ, Yao SY, Ritzel MW, Paterson AR, Cass CE, Young JD (1994) Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein. *J Biol Chem* **269**: 17757–17760
- Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**: 383–389
- Hyde RJ, Cass CE, Young JD, Baldwin SA (2001) The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol* **18**: 53–63
- Ito H, Gray WM (2006) A gain-of-function mutation in the *Arabidopsis* pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. *Plant Physiol* **142**: 63–74
- Jaquinod M, Villiers F, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, Garin J, Bourguignon J (2007) A Proteomics Dissection of *Arabidopsis thaliana* Vacuoles Isolated from Cell Culture. *Mol Cell Proteomics* **6**: 394–412
- 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 responses likely through O-glucosylation. *Planta* **237**: 991–999
- Jiskrová E, Novák O, Pospíšilová H, Holubová K, Karády M, Galuszka P, Robert S, Frébort I (2016) Extra- and intracellular distribution of cytokinins in the leaves of monocots and dicots. *New Biotechnol* **33**: 735–742
- Kakimoto T (2001) Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate:ATP/ADP Isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* **42**: 677–685
- Kamada-Nobusada T, Sakakibara H (2009) Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70**: 444–449

- Kang J, Hwang J-U, Lee M, Kim Y-Y, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 2355–2360
- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretzschmar T, Lee Y, Martinoia E (2011) Plant ABC Transporters. *Arab Book* **9**: e0153
- Ko D, Kang J, Kiba T, Park J, Kojima M, Do J, Kim KY, Kwon M, Endler A, Song W-Y (2014) Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 7150–7155
- Kretzschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ, Martinoia E (2012) A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* **483**: 341–344
- Kudo T, Kiba T, Sakakibara H (2010) Metabolism and Long-distance Translocation of Cytokinins. *J Integr Plant Biol* **52**: 53–60
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**: 652–655
- Kuroha T, Tokunaga H, Kojima M, Ueda N, Ishida T, Nagawa S, Fukuda H, Sugimoto K, Sakakibara H (2009) Functional Analyses of LONELY GUY Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 3152–3169
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y (2005) AtPDR12 Contributes to Lead Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **138**: 827–836
- Letham DS, Palni LMS (1983) The Biosynthesis and Metabolism of Cytokinins. *Annu Rev Plant Physiol* **34**: 163–197
- Li G, Liu K, Baldwin SA, Wang D (2003) Equilibrative nucleoside transporters of Arabidopsis thaliana. cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *J Biol Chem* **278**: 35732–35742
- Li J, Wang D (2000) Cloning and in vitro expression of the cDNA encoding a putative nucleoside transporter from Arabidopsis thaliana. *Plant Sci* **157**: 23–32
- Li Y, Baldauf S, Lim EK, Bowles DJ (2001) Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **276**: 4338–4343
- Lichtenthaler HK (1999) The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 47–65
- Mäser P, Sütterlin C, Kralli A, Kaminsky R (1999) A nucleoside transporter from Trypanosoma brucei involved in drug resistance. *Science* **285**: 242–244
- Meek L, Martin RC, Shan X, Karplus PA, Mok DWS, Mok MC (2008) Isolation of Legume Glycosyltransferases and Active Site Mapping of the Phaseolus lunatus Zeatin O-glucosyltransferase ZOG1. *J Plant Growth Regul* **27**: 192–201
- 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 J* **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. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 16598–16603
- Möhlmann T, Mezher Z, Schwerdtfeger G, Neuhaus HE (2001) Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from Arabidopsis thaliana (ENT1,At). *FEBS Lett* **509**: 370–374
- Mok DWS, Mok MC (1994) Cytokinins Chemistry, Activity, and Function. CRC Press
- Moore TC (2012) Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer Science & Business Media
- Novák O, Antoniadou I, Ljung K (2017) High-Resolution Cell-Type Specific Analysis of Cytokinins in Sorted Root Cell Populations of Arabidopsis thaliana. *In* J Kleine-Vehn, M Sauer, eds, Plant Horm. Methods Protoc. Springer New York, New York, NY, pp 231–248

- Osugi A, Sakakibara H (2015) Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *BMC Biol* **13**: 102
- Parkinson FE, Damaraju VL, Graham K, Yao SYM, Baldwin SA, Cass CE, Young JD (2011) Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain. *Curr Top Med Chem* **11**: 948–972
- Peng X-X, Shi Z, Damaraju VL, Huang X-C, Kruh GD, Wu H-C, Zhou Y, Tiwari A, Fu L, Cass CE (2008) Up-regulation of MRP4 and down-regulation of influx transporters in human leukemic cells with acquired resistance to 6-mercaptopurine. *Leuk Res* **32**: 799–809
- Pineda Rodó A, Brugière N, Vankova R, Malbeck J, Olson JM, Haines SC, Martin RC, Habben JE, Mok DWS, Mok MC (2008) Over-expression of a zeatin O-glucosylation gene in maize leads to growth retardation and tasselseed formation. *J Exp Bot* **59**: 2673–2686
- Qi Z, Xiong L (2013) Characterization of a Purine Permease Family Gene OsPUP7 Involved in Growth and Development Control in Rice. *J Integr Plant Biol* **55**: 1119–1135
- Ritzel MWL, Ng AML, Yao SYM, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Ritzel RG, Mowles DA, Carpenter P, Chen X-Z (2001) Molecular Identification and Characterization of Novel Human and Mouse Concentrative Na⁺-Nucleoside Cotransporter Proteins (hCNT3 and mCNT3) Broadly Selective for Purine and Pyrimidine Nucleosides (System cib). *J Biol Chem* **276**: 2914–2927
- Romanov GA, Lomin SN, Schmölling T (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot* **57**: 4051–4058
- Růžička K, Strader LC, Bailly A, Yang H, Blakeslee J, Łangowski Ł, Nejedlá E, Fujita H, Itoh H, Syōno K (2010) Arabidopsis PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 10749–10753
- Sakakibara H, Kasahara H, Ueda N, Kojima M, Takei K, Hishiyama S, Asami T, Okada K, Kamiya Y, Yamaya T (2005) Agrobacterium tumefaciens increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 9972–9977
- Schmitt L, Tampé R (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 754–760
- Schmölling T, Werner T, Riefler M, Krupková E, Bartrina y Manns I (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *J Plant Res* **116**: 241–252
- Schwacke R, Schneider A, Graaff E van der, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flügge U-I, Kunze R (2003) ARAMEMNON, a Novel Database for Arabidopsis Integral Membrane Proteins. *Plant Physiol* **131**: 16–26
- Sheridan DL, Berlot CH, Robert A, Inglis FM, Jakobsdottir KB, Howe JR, Hughes TE (2002) A new way to rapidly create functional, fluorescent fusion proteins: random insertion of GFP with an in vitro transposition reaction. *BMC Neurosci* **3**: 7
- Skoog F, Armstrong DJ, Cherayil JD, Hampel AE, Bock RM (1966) Cytokinin Activity: Localization in Transfer RNA Preparations. *Science* **154**: 1354–1356
- Šmečilová M, Dobrušková J, Novák O, Takáč T, Galuszka P (2016) Cytokinin-Specific Glycosyltransferases Possess Different Roles in Cytokinin Homeostasis Maintenance. *Front Plant Sci* **7**: 1264
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA, Strnad M, Schmölling T (2004) Two cytokinin receptors of Arabidopsis thaliana, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol* **45**: 1299–1305
- Sun J, Hirose N, Wang X, Wen P, Xue L, Sakakibara H, Zuo J (2005) Arabidopsis SOI33/AtENT8 Gene Encodes a Putative Equilibrative Nucleoside Transporter That Is Involved in Cytokinin Transport In Planta. *J Integr Plant Biol* **47**: 588–603
- Szydlowski N, Bürkle L, Pourcel L, Moulin M, Stolz J, Fitzpatrick TB (2013) Recycling of pyridoxine (vitamin B6) by PUP1 in Arabidopsis. *Plant J* **75**: 40–52

- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T (2001) Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**: 26405–26410
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H (2004) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyze the Biosynthesis of trans-Zeatin. *J Biol Chem* **279**: 41866–41872
- Theodoulou FL (2000) Plant ABC transporters. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1465**: 79–103
- Traub M, Flörchinger M, Piecuch J, Kunz H-H, Weise-Steinmetz A, Deitmer JW, Neuhaus HE, Möhlmann T (2007) The fluorouridine insensitive 1 (*fur1*) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (*ENT3*), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **49**: 855–864
- Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu Ü, Lee Y, Martinoia E (2008) Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* **13**: 151–159
- Vonk CR, Davelaar E (1981) 8-14C-Zeatin metabolites and their transport from leaf to phloem exudate of *Yucca*. *Physiol Plant* **52**: 101–107
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmülling T (2006) New Insights into the Biology of Cytokinin Degradation. *Plant Biol* **8**: 371–381
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10487–10492
- Wormit A, Traub M, Flörchinger M, Neuhaus HE, Möhlmann T (2004) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (*ENT*) family. *Biochem J* **383**: 19–26
- Yang J, Peng S, Visperas RM, Sanico AL, Zhu Q, Gu S (2000) Grain filling pattern and cytokinin content in the grains and roots of rice plants. *Plant Growth Regul* **30**: 261–270
- Yao SYM, Ng AML, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (2011) Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (*hENT1*). *J Biol Chem* **286**: 32552–32562
- Yao SYM, Ng AML, Vickers MF, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (2002) Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the *ENT2* helix 5-6 region in nucleobase translocation. *J Biol Chem* **277**: 24938–24948
- Young JD, Yao SYM, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA (2013) The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, *SLC28* and *SLC29*. *Mol Aspects Med* **34**: 529–547
- Zalabák D, Pospíšilová H, Šmehilová M, Mrízová K, Frébort I, Galuszka P (2013) Genetic engineering of cytokinin metabolism: prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnol Adv* **31**: 97–117
- Zhang K, Novak O, Wei Z, Gou M, Zhang X, Yu Y, Yang H, Cai Y, Strnad M, Liu C-J (2014) *Arabidopsis* *ABCG14* protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat Commun* **5**: 3274
- Zürcher E, Liu J, di Donato M, Geisler M, Müller B (2016) Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science* **353**: 1027–1030
- Zürcher E, Tavor-Deslex D, Lituiev D, Enkerli K, Tarr PT, Müller B (2013) A Robust and Sensitive Synthetic Sensor to Monitor the Transcriptional Output of the Cytokinin Signaling Network in *Planta*. *Plant Physiol* **161**: 1066–1075

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

7G – N7 glukozidy
9G – N9-glukozidy
A37 – adenosín na pozícii 37
ABA – kyselina abscisová
ABC – z angličtiny „ATP-binding cassette“
ABCG – z angličtiny G subfamily ATP-binding cassette
AHK – Arabidopsis histidínkináza
AHP – Arabidopsis histidínfosfotransferáza
AK – adenosínkináza
APRT – adenín-fosforibozyltransferáza
ARR – Arabidopsis response regulator
B – bázy
BAP – 6-benzylaminopurín
CCCP – *m*-chlorofenyl-hydrazón
CK – cytokinín
CKI1 – z angličtiny „CYTOKININ INDEPENDENT 1“
CKX – cytokinín oxidáza/dehydrogenáza
CNT – koncentratívny nukleozidový transportér
CYP – cytochróm P450
cZ – cis-zeatín
cZOG – cis-zeatín-O-glukozid
cZR – cis-zeatín ribozid
cZRMP – cis-zeatín ribozid 5'-monofosfát
cZROG – cis-zeatín ribozid-O-glukozid
DHZ – dihydrozeatín
DHZ7G – dihydrozeatín N7-glukozid
DMAPP – dimetylallyldifosfát
DMSO – dimethylsulfoxid
DPU – difenylmočovina
eATP – externý ATP
EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
ENT – ekvilibratívny nukleozidový transportér
ER – endoplazmatické retikulum
FAD – flavínadenín dinukleotid
GFP – zelený fluorescenčný proteín
GUS – β -glukuronidáza
HMBDP – 1-hydroxy-2-metyl-2-butenyl 4-difosfát
iATP – interné ATP
iP – N^6 -(Δ^2 -izopentenyl)adenín
iP7G – izopentenyladenín N7-glukozid
iP9G – izopentenyladenín N9-glukozid
iPR – izopentenyladenín ribozid
iPR5MP – izopentenyladenín ribozid 5'-monofosfát
IPT – izopentenyltransferáza
KO – „knock-out“ mutantná línia
LOG – z angličtiny „LONELY GUY“
MCX – z angličtiny „Mixed-mode, strong Cation-exchange“

MEP – metylén erytritolfosfátová dráha
MS – hmotnostná spektrometria
MVA – mevalonátová dráha
NBMPR – nitrobenzylmerkaptopurín ribonukleozid
NSH – nukleozidhydroláza
NT – nukleotidy
OG – *O*-glukozidy
PCR – polymerázová reťazová reakcia
PUP – purínová permeáza
Q0 – 2,3-dimetoxy-5-metyl-1,4-benzochinón
R – ribozidy
RGR – relatívna rýchlosť rastu
SAME – S-adenozylmetionín
Sar1 – z angličtiny „secretion-associated and Ras-related protein 1“
SD – smerodajná odchýlka
SLC – z angličtiny „SoLute Carrier“
SPE – extrakcia na pevnej fáze
TAE – tris-acetát-EDTA
TCSn – z angličtiny „two component signalling sensor new“
tRNA-IPT – tRNA Δ^2 -isopentenylpyrofosfáttransferáza
tZ – trans-zeatín
tZ7G – trans-zeatín N7-glukozid
tZOG – trans-zeatín *O*-glukozid
tZR – trans-zeatín ribozid
UDP – uridíndifosfát
UGT – UDP-glykozyltransferáza
UHPLC – ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia