

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie



HETEROLOGNÍ EXPRESE ABC TRANSPORTÉRU  
V *CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON

**Dizertační práce**

Autor: Mgr. Barbora Pomahačová

Školitel: Doc. RNDr. Jiřina Dušková, CSc.

Vědní obor: Farmakognozie

Hradec Králové 2009

Na tomto místě bych ráda vyjádřila poděkování všem, kteří se jakkoli podíleli na zdárném dokončení předkládané dizertační práce. Především bych chtěla poděkovat paní Docence RNDr. Jiřině Duškové, CSc. za cenné profesní rady, celkovou podporu během celého studia a vytvoření unikátních studijních podmínek. Poděkování patří i Prof. Dr. Robertu Verpoortovi z nizozemské Leidenské univerzity za to, že mě přijal na své katedře farmakognozie a svými připomínkami a náměty výrazně přispěl ke zpracování dané problematiky. Dále bych ráda poděkovala také Prof. Dr. Kazufumi Yazaki z Kjótské univerzity v Japonsku za poskytnutí CjMDR1 genu a protilátek a za cenné diskuse. Poděkování patří také mým kolegům na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, stejně jako všem mezinárodním kolegům na Leidenské univerzitě za spolupráci a příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině za všestrannou pomoc a podporu.

Předkládaná disertační práce vznikla za přispění finančních zdrojů Výzkumného záměru MSM 0021620822, Organizace Nuffic v podobě Huygenova stipendia a sponzorského daru firmy Zentiva, a.s.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

## OBSAH

1. Úvod.....	9
2. Řešená problematika .....	11
3. Teoretický úvod .....	13
3.1. <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. ....	14
3.1.1. Obsahové látky.....	15
3.1.2. Použití alkaloidů.....	16
3.1.3. Mechanismus účinku onkolytické aktivity .....	16
3.1.4. Používané látky .....	17
3.2. Primární a sekundární metabolity .....	20
3.3. Biosyntéza terpenových indolových alkaloidů v <i>C. roseus</i> .....	21
3.4. Kompartmentace biosyntézy v rostlinných buňkách <i>C. roseus</i> .....	34
3.4.1. Intracelulární kompartmentace.....	34
3.4.2. Intercelulární kompartmentace.....	36
3.5. Transport.....	38
3.5.1.1. PDR (pleiotropic drug resistance) podskupina ABC transportérů .....	51
3.5.1.2. MRP (multidrug resistance-associated protein) podskupina ABC transportérů .....	51
3.5.1.3. MDR (multidrug resistance) podskupina ABC transportérů.....	53
3.6. Strategie zvýšení produkce sekundárních metabolitů .....	56
3.7. Genové inženýrství.....	57
3.7.1. Transgenoze rostlin.....	60
4. Materiál a metody .....	65
4.1. Rostlinný materiál .....	66
4.2. Chemikálie .....	68

4.3. Přístroje.....	71
4.4. Metody.....	71
4.4.1. Test na toxicitu berberinu pro suspenzní tkáňové kultury <i>C. roseus</i> .....	71
4.4.2. Izolace protoplastů a vakuol.....	72
4.4.3. Vakuolový transportní experiment.....	73
4.4.4. Buněčný transportní experiment.....	74
4.4.5. Stanovení alkaloidů.....	74
4.4.6. Binární konstrukty CjMDR1.....	75
4.4.7. Transformace buněk <i>Catharanthus roseus</i> technikou mikroprojektilového bombarování.....	84
4.4.8. Izolace genomové DNA.....	88
4.3.9. Izolace celkové RNA.....	89
4.4.10. Elektroforéza RNA formaldehydovým gelem.....	91
4.4.11. Northern blotting.....	92
4.4.12. Hybridizace s radioaktivně značenou sondou.....	93
4.4.13. Western blotting.....	95
4.4.14. Reverzní transkribce a design primerů pro PCR.....	99
5. Výsledky a diskuse.....	101
5.1. Charakteristika mechanismu pohybu berberinu v buňkách katarantu růžového.....	102
5.1.1. Vliv berberinu na vitalitu suspenzní tkáňové kultury katarantu růžového.....	102
5.1.2. Transport berberinu v suspenzním tkáňovém systému katarantu růžového; buněčná úroveň.....	104
5.1.3. Transport berberinu v suspenzním tkáňovém systému katarantu růžového; vakuolární úroveň.....	112
5.2. Transgenóza suspenzní tkáňové kultury katarantu růžového.....	118

5.2.1. Klonování binárních vektorů.....	118
5.2.2 Optimalizace bombardování buněk částicemi kovu .....	123
5.3. Ověření exprese transgenu.....	124
5.3.1. Northern blotting .....	125
5.3.2. Western blotting .....	127
5.3.3. PCR, RT-PCR .....	128
5.3.4. Test lokalizace transportéru .....	131
5.4. Vliv CjMDR1 transportéru na transportní charakteristiky vybraných substrátů. Buněčná úroveň .....	134
5.4.1. Berberin.....	136
5.4.2. Ajmalicin.....	137
5.4.3. Katarantin.....	138
5.4.4. Serpentin .....	140
5.4.5. Tetrahydroalstonin.....	141
6. Souhrn .....	144
7. Summary .....	147
8. Literatura .....	150

## SEZNAM VYBRANÝCH POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC	ATP-Binding Cassette transportér
AMP	adenosin 5'-monofosfát
APS	amonium persulfát
ATP	adenosin 5'-trifosfát
bp	páry bazí (jednotky DNA)
BSA	bovine serum albumine, hovězí bílkoviny krevní plasmy, standard proteinového testu
CCCP	karbonyl kyanid <i>m</i> -chlorofenylhydrazon
CRPRXI-AVBLS	$\alpha$ -3',4'-anhydrovinblastin syntáza, enzym spojující katarantin s vindolinem za vzniku vinblastinu
CTP	cytidin trifosfát
D4H	desacetoxyvindolin-4-hydroxyláza
DAT	deacetylvindolin-4- <i>O</i> -acetyltransferáza
DCCD	<i>N,N'</i> -dicyklohexyl karbodiimid
DMSO	dimetyl sulfoxid
dNTPs	deoxy nukleotid trifosfát(y)
DSC	destroyed stop codon, porušený=nefunkční stop kodon
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
Fw	forward primer = přímý primer
G10H	Geraniol-10-hydroxyláza
GSH	redukovaný glutation
GS-X	glutationové konjugáty
GS-X pumpa	glutation- <i>S</i> -konjugátová pumpa
GTP	guanidin trifosfát
HEPES	4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HMG-CoA	hydroxyl methyl glutaryl koenzym A
HTOM	<i>O</i> -metyltransferázy
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl- $\beta$ - <i>D</i> -1-thiogalactopyranosid, induktor aktivity $\beta$ -galaktosidázy
Kb	1000 párů bazí (jednotky DNA); kilo-párů bazí

KR	kathenamin reduktáza
MDR	multidrug resistance (protein)
MEP	2-C-metyl-D-erytritol 4-fosfátová cesta
MgATP	adenosin 5'-trifosfát (Mg <sup>2+</sup> sůl)
MRP	multidrug-resistance-related protein
MCS	(Multiple Cloning Site) mnohočetné klonovací místo (plasmidu)
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukována forma)
NBF	nucleotide binding fold, nukleotidová doména ABC transportéru
NMR	nukleární magnetická resonance
NMT	(desacetoxyvindolin) <i>N</i> -metyl transferáza
PCR	polymerase chain reaction
PDA	photodiode array detektor
PDR	pleiotropic drug resistance protein
PEG	polyetylen glycol
PP	anorganický pyrofosfát
PX	peroxidáza
Rev	reverse primer = zpětný primer
rpm	otáčky za minutu
RT-PCR	reverse transcription- polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfát
SLS	sekologanin syntáza
STR	striktosidin syntáza
T <sub>10</sub> E <sub>1</sub>	pufr o složení 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5
T16H	tabersonin-16-hydroxyláza
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> , (polymeráza)
TDC	tryptofan dekarboxyláza
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyl etylen diamin
TFA	trifluor octová kyselina
THAS	tetrahydroalstonin syntáza
TIA	terpenoidní indolové alkaloidy
TMD	trans membrane domain, membránová doména transportéru
TTP	thymidin trifosfát

U	„activity unit“, mezinárodní jednotka aktivity enzymů; množství enzymu katalyzující přeměnu 1 mikromolu substrátu na produkt za minutu, za standardních podmínek
UTP	uridin trifosfát
WT	wild type, divoká kultura
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactopyranosid, substrát pro enzym $\beta$ -galactosidázu kódovanou lacZ genem (modrobílý bakteriální test)



## **1. Úvod**

Dnešní tak zvaná západní civilizace již nežije v takové součinnosti s přírodou, jako žili naši předkové. Jejich schopnost najít v nepřeberném množství rostlin, které je obklopovaly, ty, které mají jakýkoli efekt na lidský organismus – a to za použití jednoduchých nástrojů jako jsou jejich smysly, je hodné obdivu. Ještě dnes o spoustě tradičně užívaných rostlin, jejich obsahových látkách a mechanismech účinku bádají nejrůznější laboratoře po celém světě.

Aby dnes lékař předepsal nasušit například heřmánek a pít odvar, je nemyslitelné. Takový přístup by okamžitě zařadil všechny léčivé byliny na seznam ohrožených druhů. Místo toho máme semisyntézy a syntézy hlavních účinných látek z rostlin a struktur od nich odvozených. Ovšem rostliny mají unikátní set biochemického aparátu, který mnohdy nejde laboratorně napodobit, nebo ještě není detailně prostudovaný, anebo je příliš finančně nákladný. To, co zvládne v rostlině například jeden specifický enzym, je třeba dělat několika krokovou syntézou, která má mnohdy další vedlejší produkty a nízký výtěžek. Tento příklad je odraz situace v katarantu růžovém, rostlině produkující chemicky složité bisindolové alkaloidy používané v terapii rakovin mnoha druhů. Již po několik desetiletí se vědci různých specializací snaží tyto vzácné alkaloidy získat v takovém množství, aby byly materiálně i finančně dostupné pro všechny kdo je potřebují. Studují se chemické syntézy a obměny účinných struktur, metabolické cesty v rostlině, biosyntetické cesty hlavních obsahových látek včetně molekulárních charakteristik klíčových enzymů, regulace biosyntézy atd. Tkáňové kultury katarantu představují optimální materiál na takové studie. Bohužel i proto, že se zatím nepodařilo produkovat jimi žádné bisindolové alkaloidy. Důvodem může být nedostatečná diferenciace buněk pěstovaných *in vitro*. Bylo zjištěno, že jednotlivé intermediáty jsou v intaktní rostlině syntetizovány v různých organelách, tkáních či orgánech po celé rostlině. Jedním ze společných jmenovatelů úspěšné biosyntézy je tak vedle dostupnosti základních stavebních kamenů také efektivnost transportu látek na potřebné místo v potřebném čase. Tato myšlenka je podrobně studována v předkládané práci.

## **2. Řešená problematika**

Hodnoty produkovaných sekundárních metabolitů v *Catharanthus roseus* jsou minimální. Lépe kontrolovatelné tkáňové kultury zatím neprodukují žádný z bisindolových alkaloidů, které jsou díky svým specifickým terapeutickým efektům vysoce komerčně zajímavé. Podle posledních poznatků hraje transport látek jednu z klíčových rolí v biosyntéze sekundárních metabolitů. Bylo zjištěno, že ABC transportéry se v katarantu významně podílejí na transpotech vybraných indolových alkaloidů a jejich intermediátů. Optimalizace transportu na mezibuněčné či vnitrobuněčné úrovni může teoreticky vést ke zvýšení produkce indolových alkaloidů v *Catharanthus roseus*.

Cílem této práce bylo:

1. Studium transportních charakteristik berberinu v *Catharanthus roseus* na vakuolární i buněčné úrovni. Tento benzylochinolinový alkaloid vlastní druhům čeledi *Ranunculaceae* je specifickým substrátem ABC transportéru identifikovaného v *Coptis japonica*. Z dosud popsaných, tento ABC transportér je jedinný, který nemá širokou substrátovou specifitu a je schopen transportovat alkaloidy. Charakterizovaná cDNA tohoto transportéru je dostupná.
2. Příprava transgenní tkáňové kultury *Catharanthus roseus*. Použitý transgen je CjMDR1, ABC transportér izolovaný z berberin produkčních linií *Coptis japonica*.
3. Ověření exprese transgenu.
4. Analýza změn transportních charakteristik vybraných terpenových indolových alkaloidů a jejich prekurzorů v transgenních liniích *C. roseus*.

### **3. Teoretický úvod**

### 3.1. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don., *Vinca rosea* L., Madagascar periwinkle, katarant růžový, to vše jsou názvy jednoho rostlinného druhu čeledi Apocynaceae (toješťovitě), který je původní v tropických oblastech Asie a zejména pak Madagaskaru, jak jeden z názvů napovídá. Rod *Catharanthus* obsahuje osm druhů, z čehož sedm je původním madagaskarským endemitem, osmý (*C. pusillus*) roste na Srí Lance a v Indii. V dnešní době je *C. roseus* rozšířený po celém světě a pěstuje se i jako dekorativní rostlina. Pro komerční účely, jako zdroj léčiv, je získáván z divokých či pěstovaných kultur rostoucích například v Africe, Indii, Thajsku, na Taiwanu, ve východní Evropě, Španělsku, USA nebo Austrálii.

Doslovně [katharos-] znamená ryzí a [-anthos] rostlina. Tato vytrvalá rostlina se zdřevnatělým stonkem je asi 0,5 m vysoká s četnými dlouhými rozvětvenými kořeny. Má protistojné, dlanitožilné, tmavě zelené, lesklé, kožovité, elipsovité listy s hrubým zaoblením ve vrcholové části. Listy jsou asi 2,5 až 5 cm dlouhé. Mají patrné světlejší žilky, zejména střední žilka je výrazná a od ní se pak větví postraní žilky pod úhlem 35-45 °. Kvete drobnějšími květy růžové, purpurové, bílé barvy (varieta albus) nebo bílé s červeným očkem (varieta ocellatus), organizované podle čísla 5. Plodem je měchýřek (Bruneton, 1999; Evans, 2002) .

Obr. 1. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

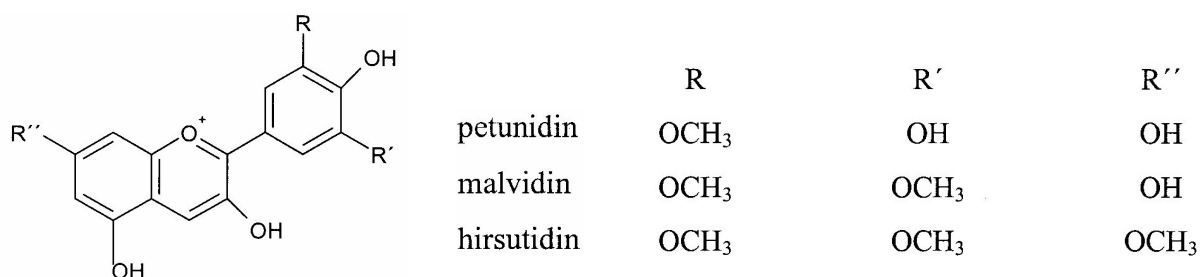


### 3.1.1. Obsahové látky

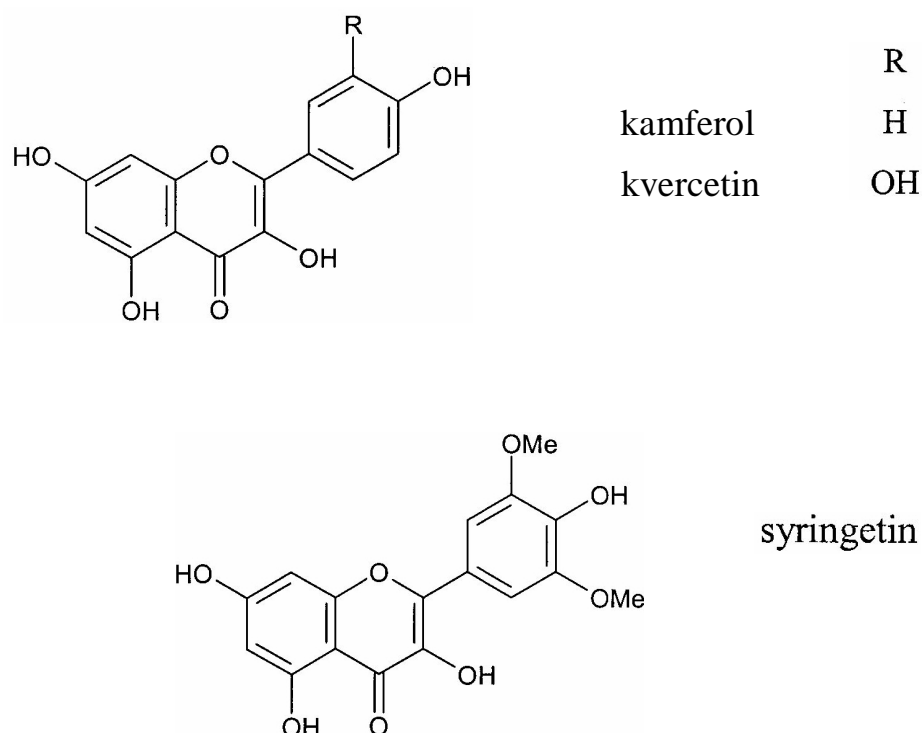
Nadzemní část katarantu obsahuje 0,2 až 1 % alkaloidů indolové nebo dihydroindolové struktury. Počet identifikovaných alkaloidů se pořád zvyšuje, současně je to okolo 150 alkaloidů, z nichž některé jsou vlastní i jiným druhům této čeledi, například ajmalicin a serpentin. Mezi důležité alkaloidy druhu *Catharanthus roseus* patří katarantin, vindolin, ajmalicin, akumin, lochnerin a tetrahydroalstonin. Největší pozornost však zasluhuje skupina asi 20 bisindolových alkaloidů s antineoplastickou aktivitou (Evans, 2002; Bruneton, 1999). Mezi ně patří zejména vinblastin (vinkaleukoblastin), který vzniká spojením alkaloidů katarantinu a vindolinu, dále vinkristin (leukokristin), vinleurosin (leurosin) a vinrosidin (leurosidin) (Tyler *et al.*, 1988). Předpona vin- je pozůstatkem staré botanické nomenklatury kdy byl *Catharanthus* jmenován *Vinca rosea*. Díky své struktuře jsou tyto alkaloidy pojmenovávány jako dimerní nebo „bisindolové“, ale jelikož chemicky se o dimery nejedná, je výstižnější nazývat je binárními alkaloidy (Bruneton, 1999). Indolový (katarantin) a dihydroindolový = indolinový (vindolin) monomer se *in vivo* pojí za přítomnosti specifického enzymu anhydrovinblastinsyntázy, vindolin ale může vznikat z těchto monomerů i působením komerční peroxidázy *in vitro* (Goodbody *et al.*, 1988). Vinblastin a vinkristin jsou akumulovány v rostlině v koncentracích pouze okolo 0.001 % (O’Keefe *et al.*, 1997).

Kromě alkaloidů byly v katarantu dokázány flavonoidy kamferol, kvercetin a syringenin (Brun *et al.*, 1999), a antokyaniny hirsutidin, malvidin a petuidin (Forsyth a Simmonds, 1957; Piovan a Filippiny, 2007) vyskytující se jako glykosidy.

Obr. 2. Antokyaniny z *C. roseus*



Obr. 3. Flavonoly z *C. roseus*



### 3.1.2. Použití alkaloidů

V lidové medicíně se *Catharanthus* využíval pro své antidiabetické účinky a dodnes tato indikace neupadla v zapomění (Lans, 2006). Méně se používal na hemostázu, jako trankvilizér, na snížení krevního tlaku nebo jako desinficiens. Objevem onkolytické aktivity extraktu z katarantu kanadskými vědci (zhruba v letech 1955-1960) se však pozornost obrátila na jeho možné využití při léčbě rakoviny. Šest alkaloidů získaných z tohoto extraktu vykazuje protirakovinovou aktivitu z čehož dva jsou komerčně dostupné v současné době (Evans, 2002).

### 3.1.3. Mechanismus účinku onkolytické aktivity

Stejně jako například alkaloidy kolchicin nebo podofylotoxin, se vinkristin a vinblastin řadí mezi antimitotika (Attard *et al.*, 2006). To znamená, že při dělení buněk se váží na strukturní protein tubulin čímž zabraňují jeho polymeraci a tvorbě mikrotubulů nezbytných pro tvorbu



mitotického vřeténka. Mitóza se zastavuje na úrovni metafáze. Rapidně se snižuje dělení buněk rakovinových, ale i buněk střevního epitelu a kostní dřeně. Mikrotubuly hrají důležitou roli i na jiných úrovních metabolismu, zejména v neurotransmisi, z čehož vyplývá vedlejší nežádoucí efekt léčby těmito alkaloidy, neurotoxicita. *In vitro* dále inhibují proteosyntézu a syntézu nukleových kyselin.

#### 3.1.4. Používané látky

**Vinblastin** se používá zejména na léčbu generalizované Hodgkinovy choroby a non-Hodgkinových lymfomů. Dále u pokročilých nádorů varlat, epitelomů prsu a vaječníků, Kaposiho sarkomu, choriokarcinomů a některých histiocytóz. Vedlejším efektem je gastrointestinální distres (nauzea, zvracení či zácpa), neurologické projevy (bolesti hlavy, záněty nervů, ztráta šlachových reflexů a deprese). Mohou se projevit i respirační obtíže a ztráta vlasů.

**Vinkristin** má největší využití při léčbě akutních lymfocytických leukemií u dětí. Je účinný na některé typy lymfomů, sarkomů, rakovinu plic, prsu a děložního krčku. Vinkristin má větší antineoplastický potenciál než vinblastin, ale také vyšší neurotoxicitu. Mezi nejvýznamnější neurotoxické účinky vinkristinu patří křečové příhody, neuralgie, myalgie, parestesie a bolesti hlavy. Efekt na zažívací ústrojí se projevuje zácpou až paralytickým ileem. Dále může způsobovat dušnost až bronchospasmus, vředy v obličejové části, částečnou slepotu, amenorrhoeu, azoospermii, alopecii a další. O snížení těchto vedlejších nežádoucích účinků při uchování nebo dokonce rozšíření protirakovinného účinku se snaží semi-syntetické deriváty vinorelbin a vindesin.

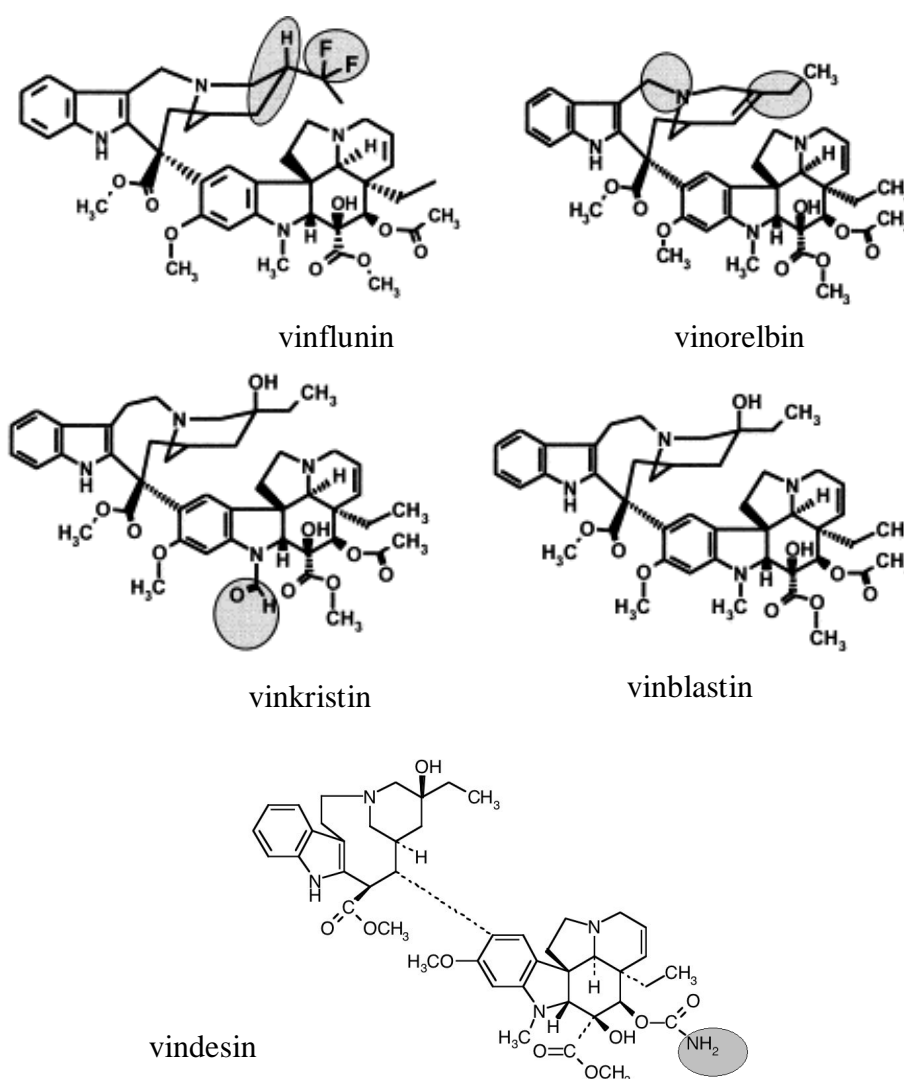
**Vindesin** je semisyntetický derivát vindolinu a s úspěchem je indikován u akutní lymfoidní leukemie u dětí.

**Vinorelbin**, anhydroderivát 8'-norvinblastinu, je novější modifikací. Podává se orálně, má širší protirakovinné spektrum a jeho neurotoxický vedlejší účinek je nižší než u vinkristinu i vinblastinu. Nově je znám i další derivát *Vinca* alkaloidů, **vinflunine**, který je ve fázi klinického testování (Shnyder, 2004; Kruczynski a Hill, 2001).

Vinkristin sulfát, vinblastin sulfát, vindesin sulfát a vinorelbin tartarát mají své lékopisné monografie (European Pharmacopoeia 5.0).

Užívání alkaloidů musí být pod přísným dozorem lékaře. Dávkuji se injekčně (výjimkou je vinorelbin) jednou za týden (vinblastin) nebo jednou za měsíc (vinkristin), v jednotkách mg na m<sup>2</sup> dospělého člověka. Většinou bývají spolu s dalšími onkolytiky součástí celkové chemoterapie.

Obr. 4. Struktury derivátů vinblastinu



**Ajmalicin** (raubasin) je alkaloid, který se kromě katarantu vyskytuje také v kořenech *Rauwolfia serpentina*. Na organismus působí  $\alpha$ -sympatolyticky. Snižuje vysoký krevní tlak a je používán v kombinované léčbě srdečních arytmií. Předávkování vede k bradykardii, ataxii a křečovým stavům.

**Reserpin** je dalším zástupcem indolových alkaloidů, který byl původně identifikován v *Rauwolfia serpentina*. V historii byl hodně využíván pro své neuroleptické a antihypertenzní vlastnosti. Pro své vedlejší účinky je dnes používán v kombinacích jako lék druhé volby. Mechanismem účinku je téměř ireversibilní blokáda zpětného vychytávání noradrenalinu, serotoninu a dopaminu do synaptických vezikulů. Následkem je nedostatek periferních monoaminů, což se projevuje hlavně jako pokles krevního tlaku a srdečního tempa. Sedativní a neuroleptická aktivita reserpinu je pravděpodobně důsledkem vyčerpání centrálních katecholaminů.

Nejzávažnějším vedlejším účinkem reserpinu je deprese gradující až k sebevražedným sklonům, dále peptidické vředy, hypersenzitivita, malátnost atd.

**Serpentin** vykazuje sedativní účinky.

## 3.2. Primární a sekundární metabolity

Nejdůležitější základní molekuly každého organismu jsou sacharidy, proteiny, mastné kyseliny a nukleové kyseliny. Až na mastné kyseliny se jedná o polymerní látky. Sacharidy jsou složeny z jednotek cukrů, proteiny z aminokyselin a nukleové kyseliny jsou tvořeny jednotlivými nukleotidy. Navzdory obrovské různorodosti živých organismů, chemické cesty modifikující a syntetizující sacharidy, proteiny, mastné a nukleové kyseliny jsou ve své podstatě stejné u všech organismů a kolektivně se nazývají **primární metabolismus**. Tyto procesy dokazují fundamentální jednotu živé hmoty. Degradace sacharidů se tak uskutečňuje známými cestami nazývanými glykolýza a Krebsův cyklus či cyklus kyseliny citronové, při kterém se uvolňuje energie z organických sloučenin pomocí oxidačních procesů. Další obecně známý zdroj energie je  $\beta$ -oxidace mastných kyselin. Proteiny přijímané z okolí slouží buď jako takové, nebo jsou rozloženy na aminokyseliny, které jsou následně využity při syntéze jiných proteinů, nebo jsou totálně degradovány za zisku energie. Většina organismů dokáže syntetizovat jenom určité množství aminokyselin, ty zbylé jsou přijímané z okolí a nazývají se esenciálními aminokyselinami (Alberts *et al.*, 1998).

Oproti primárním metabolitům, které se obecně nacházejí ve všech živých organismech, existuje množství látek, které vyjadřují individualitu jednotlivého druhu a nacházejí se jenom ve specifických organismech nebo jejich skupinách. Těmto látkám se říká **sekundární metabolity** a biochemickým procesům k nim vedoucím, sekundární metabolismus. Sekundární metabolity nejsou nutně syntetizovány za každých podmínek a dodnes jejich funkce pro organismy není plně objasněna. Každopádně slouží k lepší prosperitě matečného organismu (Devic, 2002).

Rostlinné sekundární metabolity zastávají během životního cyklu rostliny mnohočetnou funkci. Tyto funkce mohou být zařazeny do kategorií mediátorů interakce mezi rostlinou

a životním prostředím na úrovni rostlina-hmyz, rostlina-mikroorganismus, rostlina-rostlina. (Harborne, 2001; Dixon, 2001). Sekundární metabolity hrají důležitou roli i v reprodukci rostliny, např. atrakcí opylovačů. Nezanedbatelná je jejich role i v lidském světě, například pro kvalitu potravin (vůně, barva, chuť) či důležitost pigmentů dekorativních rostlin a květin. Některé sekundární metabolity jsou navíc používány jako léčiva, barviva, insekticidy, chuťové látky a aromata. Sekundární metabolity jsou tudíž velice důležitým aspektem ve šlechtitelství jednotlivých zájmových rostlin. Jsou mapovány biosyntetické cesty sekundárních metabolitů včetně identifikace klíčových enzymů (Verpoorte a Memelink, 2002).

### 3.3. Biosyntéza terpenových indolových alkaloidů v *C. roseus*

Mapování biosyntetických cest v rostlinách začalo zhruba před 30 lety a trvá dodnes (Kutchan, 1993). Dříve se k biosyntetickým studiím používaly látky značené různými radioaktivními prvky. V současné době jsou z ekologicko bezpečnostních důvodů stále častěji používány izotopy  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  s následnou NMR analýzou (Fox *et al.*, 1995; Prabhu *et al.*, 1996; Schleucher *et al.*, 1998). Takto se dělají i tzv. retrobiosyntetické studie, které ověřují již dlouho objevené biosyntetické cesty. Tyto jsou buď plně potvrzeny nebo nové poznatky inspirují k dalšímu studiu.

S rozvojem biotechnologických postupů v oblasti rostlinných tkáňových kultur se vědcům dostal do rukou vhodný materiál ke studiu biosyntetických cest. A to následně i proto, že tkáňové systémy se zatím nepodařilo (až na výjimky) stimulovat k uspokojivé produkci sekundárních metabolitů *in vitro*. Disciplíny souhrnně nazývané *-omic* (genomic, transcriptomic, proteomic, fluxomic a metabolomic) se snaží objasnit složitý způsob regulace biosyntetických pochodů v rostlinách.

V katarantu je známo a obecně akceptováno, že terpenové indolové alkaloidy (TIA) jsou odvozovány z prekursoru striktosidinu, jež vzniká reakcí tryptaminu a iridoidního terpenu sekologaninu za působení enzymu striktosidin syntázy (STR). Tento enzym katalyzuje stereospecifickou Pictet-Spenglerovu kondenzaci tryptaminu se sekologaninem (Cox a Cook, 1995) za vzniku striktosidinu. Striktosidin syntáza byla izolována a klonována z rostlin *Catharanthus roseus* (Mizukami *et al.*, 1979; Pfitzner a Zenk, 1989; McKnight *et al.*, 1990; de Waal *et al.*, 1995; Roessner *et al.*, 1992; Geerlings *et al.*, 2001), *Rauwolfia serpentina* (Treimer a Zenk, 1979a; Treimer a Zenk, 1979b; Pfitzner a Zenk 1987; Kutchan *et al.*, 1988; Kutchan, 1989; Pennings *et al.*, 1989, Bracher a Kutchan, 1992; Kutchan *et al.*, 1994) a nedávno také z *Ophiorrhiza pumila* (Yamazaki *et al.*, 2003).

Za konverzi tryptofanu pocházejícího z šikimátové biosyntetické cesty (obr. 7) na tryptamin je zodpovědný enzym tryptofan dekarboxyláza (TDC), pyridoxal dependentní enzym (Leete, 1961). Dlouho se věřilo, že prekursor sekologanin pochází exklusivně z mevalonátové biosyntetické cesty (viz obr. 8). Tato teorie je však poslední dobou diskutována a jsou důkazy i o jiné cestě v biosyntéze sekologaninu, non mevalonátové, tzv. cestě triosa-fosfát/pyruvátové (Contin *et al.*, 1998; Eisenreich *et al.*, 2004) (Obr.6). Podle této studie se na vzniku isopentenylidifosfátu podílí vedle/místo mevalonátu prekursor 1-deoxy-D-xylulóza. Tato alternativní cesta byla objevena a objasněna v bakteriích (Rohmer, 1993; Rohmer, 1996) a dokázána v některých druzích vyšších rostlin (Lichtenthaler, 1997). Sekologanin je nejenom limitujícím prekurzorem při syntéze TIA (Verpoorte *et al.*, 1997), ale také se samotný izoluje (např. z druhů *Lonicera* nebo *Symphoricarpos*) a dále využívá při syntéze farmaceuticky významných látek (Tietze, 1983).

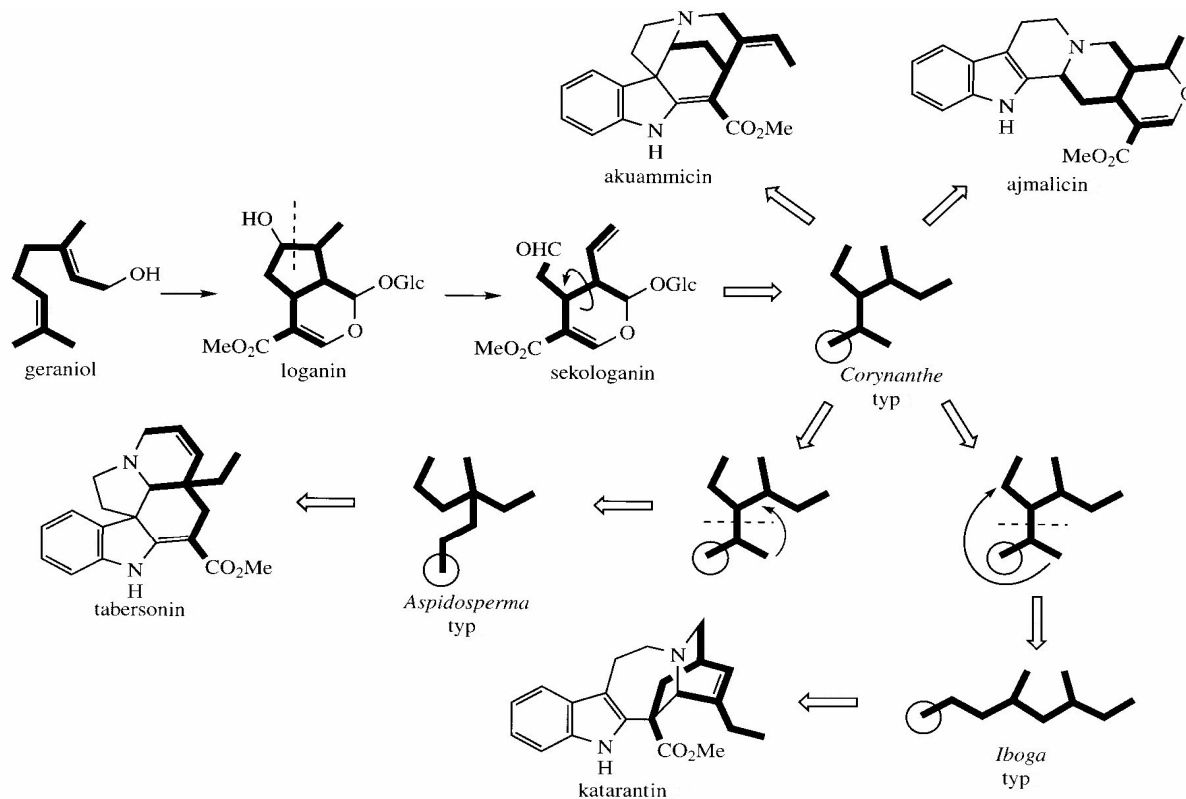
### **Biosyntéza sekologaninu, obr. 9**

Bylo klonováno několik enzymů zapojených do kroků biosyntézy isopentenyl difosfátu z 1-deoxy-D-xylulózy-5-fosfátu (Chahed, 2000; Veau *et al.*, 2000). Geraniol-10-hydroxyláza (G10H), enzym katalyzující hydroxylaci geraniolu, byl heterologně expresován v kvasinkách a vykazuje tuto aktivitu i *in vitro* (Collu *et al.*, 2002; Collu *et al.*, 2001). Experimenty s <sup>3</sup>H-značenými intermediáty potvrzují 10-hydroxygeraniol, iridodial a iridotrial jako prekurzory biosyntézy sekologaninu (Uesato *et al.*, 1986). Oxidací iridotrialového aldehydu na karboxylovou kyselinu, následnou esterifikací a glukosylací vzniká deoxyloganin, jež je dále hydroxylován na loganin. Sekologanin je získáván z loganinu oxidativním štěpením za katalýzy sekologanin syntázy (SLS). Tato NADPH dependentní P450 oxidáza byla izolována z cDNA knihovny *C. roseus* kultur (Irmeler *et al.*, 2000), a *in vitro* konvertuje loganin na sekologanin. Reakční mechanismus je pravděpodobně radikálově zprostředkovaný (Yamamoto *et al.*, 2000). Z experimentů, ve kterých jsou tkáňovým kulturám podávány spolu s růstovým médiem prekurzory, vyplývá, že biosyntéza sekologaninu (Morgan a Shanks, 2000; Whitmer *et al.*, 1998) a pravděpodobně také konverze loganinu na sekologanin (Contin *et al.*, 1999a) by mohly být faktory limitující biosyntézu terpenových indolových alkaloidů.

### **Biosyntéza od striktosidinu k bisindolovým alkaloidům, obr. 10**

Stejně jako u *Rauwolfia*, striktosidin je deglykosylován enzymem striktosidin glukosidázou (SGD). Tato byla izolována a klonována z *C. roseus* (Geerlings *et al.*, 2000; Hemscheidt a Zenk, 1980; Scott *et al.*, 1977; Luijendijk *et al.*, 1998) a vykazuje vysokou úroveň sekvenční shody s glukosidázou z *Rauwolfia*. Obě tyto striktosidin glukosidázy katalyzují vznik katheraminu *in vitro*, což indikuje, že následná diferenciaci do různých sekundárních metabolitů v *Catharanthus* a *Rauwolfia* není závislá na striktosidin glukosidáze (Geerlings *et al.*, 2000; Gerasimenko *et al.*, 2002).

Obr. 5. Schéma základních typů struktur terpenových alkaloidů (Dewick, 2002).



Částečně purifikovaná NADPH dependentní reduktáza, izolovaná z tetrahydroalstonin produkujících linií *C. Roseus*, katalyzuje konverzi katheraminu na tetrahydroalstonin *in vitro* (Hemscheidt a Zenk, 1985). Jedná se o tetrahydroalstonin syntázu. Jiná linie *C. Roseus* obsahovala další reduktázu, která umožňuje produkci ajmalicinu a 19-epi-ajmalicinu z katheraminu. Studie se značenými látkami naznačují, že mechanismus účinku reduktázy je přes iminiovou formu katheraminu (Stöckigt *et al.*, 1983). Ačkoli dřívější studie poukazovaly na geissoschizin, redukovanou formu 4,21-dehydrogeissoschizinu, jako přímý prekurzor biosyntézy alkaloidů typu corynanthe, novější studie se přiklánějí spíše k dehydrogeissoschizinu jako centrálnímu intermediátu (Stöckigt *et al.*, 1980; Stöckigt, 1978). Z katarantu byla izolována dehydrogenáza umožňující oxidaci geissoschizinu na dehydro-



geissoschizin *in vivo* (Pfitzner a Stöcking, 1982). Ajmalicin je dále oxidován na serpentin, k čemuž přispívají vakuolární peroxidázy (Sottomayor *et al.*, 2004; Bloom *et al.*, 1991)

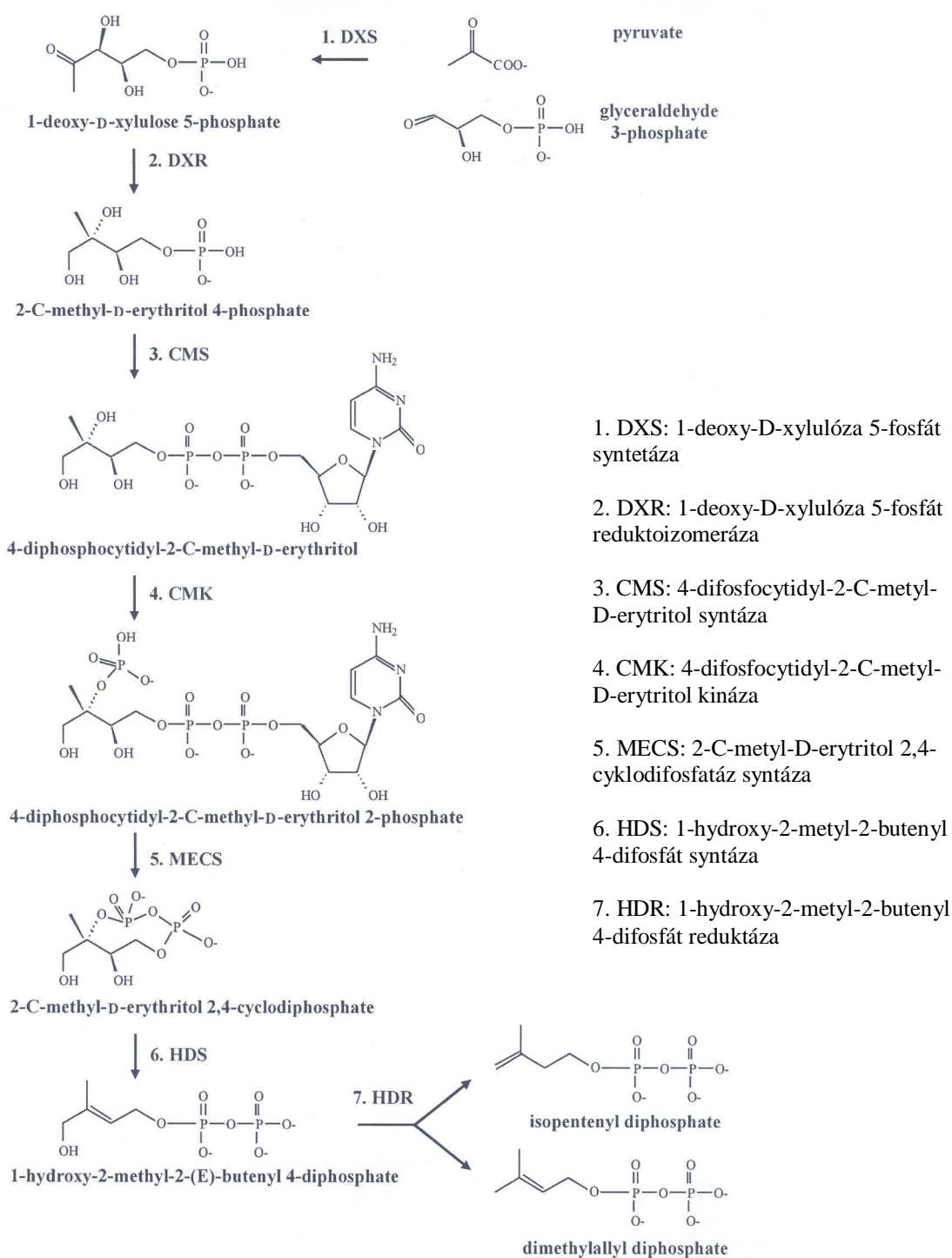
Derivát striktosidinu, preakummicin, je prekurzor stemadeninu, ale díky jeho labilitě ještě nebyl izolován z rostlinných materiálů a ani mechanismus jakým vzniká není plně objasněn (Scott a Qureshi, 1969). Redukcí preakummicinu vzniká stemadenin, důležitý biosyntetický intermediát. Předpokládá se, že jak iboga alkaloid katharanthin, tak aspidosperma alkaloid tabersonin jsou formovány Diels-Alderovou reakcí z dehydrosekodinu, není však pro to v rostlinné říši žádný důkaz (Laschat, 1996). Více detailů je známo o zhruba šesti krocích katalyzujících přeměnu tabersoninu na vindolin (Hashimoto a Yamada, 2003; Zenk, 1980). Byla klonována cytochrom P450 monooxygenáza, tabersonin-16-hydroxyláza (T16H), zodpovědná za hydroxylaci tabersoninu (St-Pierre a De Luca, 1995; Schröder, 1999). Metylace této hydroxyl skupiny se děje pomocí *O*-methyltransferázy (HTOM), která byla purifikována, ale zatím nebyla klonovaná (Cacace *et al.*, 2003). V dalším kroku dochází k hydrataci dvojné vazby zatím blíže nespecifikovaným enzymem za vzniku 16-methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersoninu. Transferem metylové skupiny na indolový dusík pomocí *N*-methyl transferázy (NMT) vzniká desacetoxyvindolin. Aktivita tohoto enzymu byla detekovaná pouze u diferencovaných rostlin, ne u buněčných či tkáňových kultur (Dethier a De Luca, 1993). Předposlední intermediát, deacetylvindolin, je produkován za přítomnosti enzymu 2-oxoglutarát-dependentní dioxygenáz-desacetoxyvindolin-4-hydroxylázy (D4H). Tento enzym byl klonován a taktéž se nevyskytuje u tkáňových kultur (Vazquez-Flota *et al.*, 1997). V posledním kroku je deacetylvindolin acetylován enzymem deacetylvindolin-*O*-acetyltransferázou (DAT) za vzniku vindolinu. I tento enzym byl úspěšně klonován a nevyskytuje se u nediferencovaného rostlinného materiálu (St-Pierre *et al.*, 1998).

Dávné studie s isotopicky značeným loganinem indikují, že bisindolové alkaloidy patří do skupiny terpenových indolových alkaloidů (Daddona a Hutchinson, 1974). Jsou zřejmě

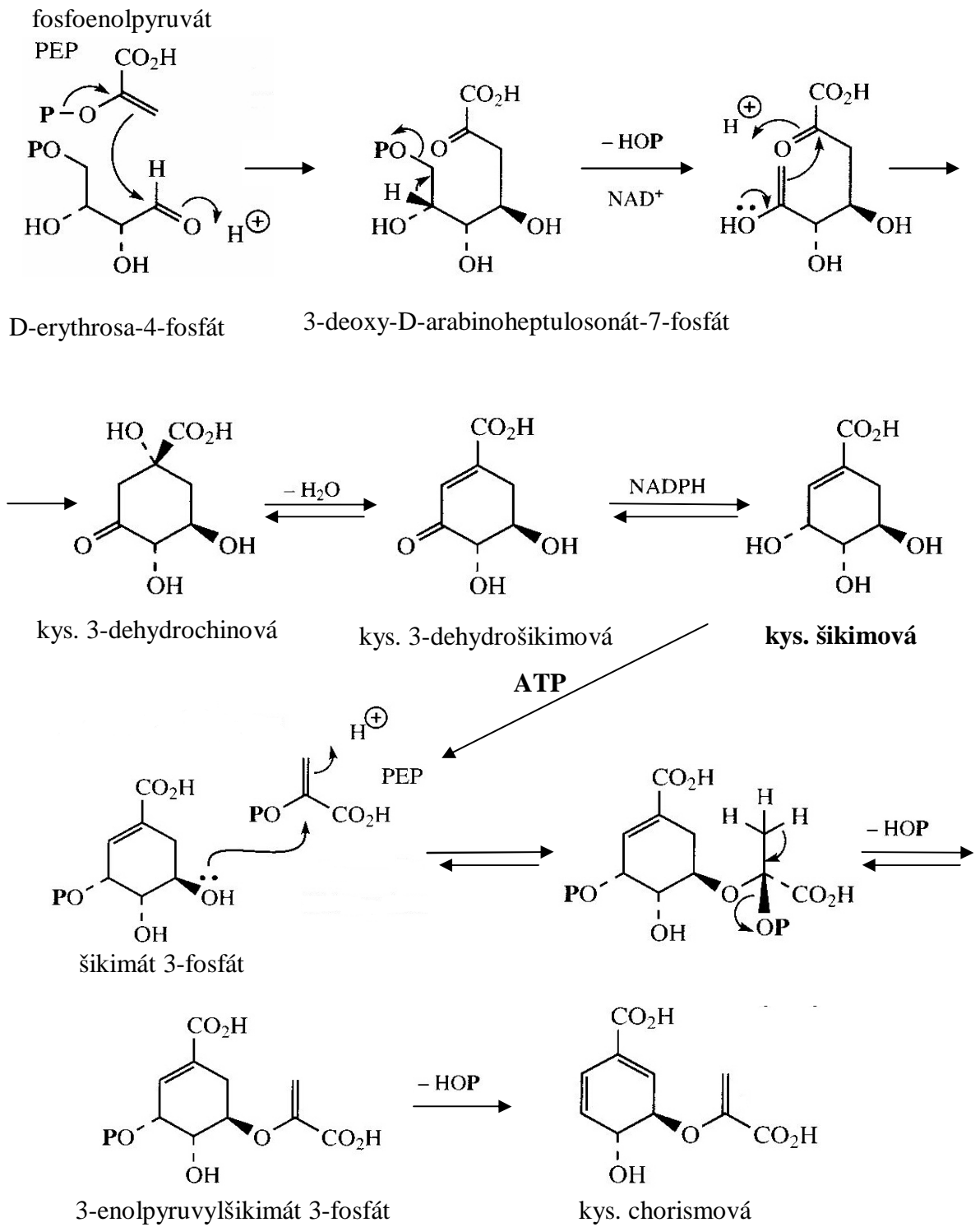
odvozené od dimerizace či přesněji binarizace vindolinu a katarantinu. Toto se pravděpodobně děje díky interakci katarantinu oxidovaného do iminiové formy, která pak snadněji reaguje, s relativně nukleofilním vindolinem (Sottomayor *et al.*, 1997). Iminiový „dimer“ je pak redukován za vzniku anhydrovinblastinu, látky vyskytující se běžně v *C. roseus* (Scott *et al.*, 1978). Tuto hypotézu podporují studie dokazující inkorporaci anhydrovinblastinu do vinblastinu a vinkristinu v extraktu z *C. roseus* (Sottomayor *et al.*, 2004; Stuart *et al.*, 1978; Baxter *et al.*, 1979; Guéritte *et al.*, 1980). Z listů *C. roseus* byla purifikovaná a klonovaná peroxidáza CRPRX1 ( $\alpha$ -3',4'-anhydrovinblastin syntáza, AVBLS), která konvertuje vindolin a kataranthin na anhydrovinblastin *in vitro* (Goodbody, 1988; Sottomayor *et al.*, 1998). Přestože tento enzym není vysoce substrátově specifický, lokalizační studie dokázaly, že CRPRX1 je nezbytným enzymem pro bisindolovou formaci (Sottomayor *et al.*, 2004; Sottomayor *et al.*, 1998; Sottomayor *et al.*, 1997). Konečně hydroxylací dvojně vazby dehydrovinblastinu vzniká vinblastin a oxidace *N*-metyl skupiny vinblastinu dává vzniknout vinkristinu.

Více o biosyntéze a regulaci biosyntézy terpenových indolových alkaloidů v katarantu může být nalezeno v review O'Connor a Maresh (2005), Loyola-Vargas *et al.* (2007), Hernández-Domínguez *et al.* (2004), Zhao a Verpoorte (2007), El-Sayed a Verpoorte (2007), Memelink a Gantet (2007), Oudin *et al.* (2007), Hedhili S *et al.* (2007), Misra *et al.* (1996).

Obr. 6. MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-fosfát) biosyntetická cesta. Převzato z Oudin *et al.* (2007)

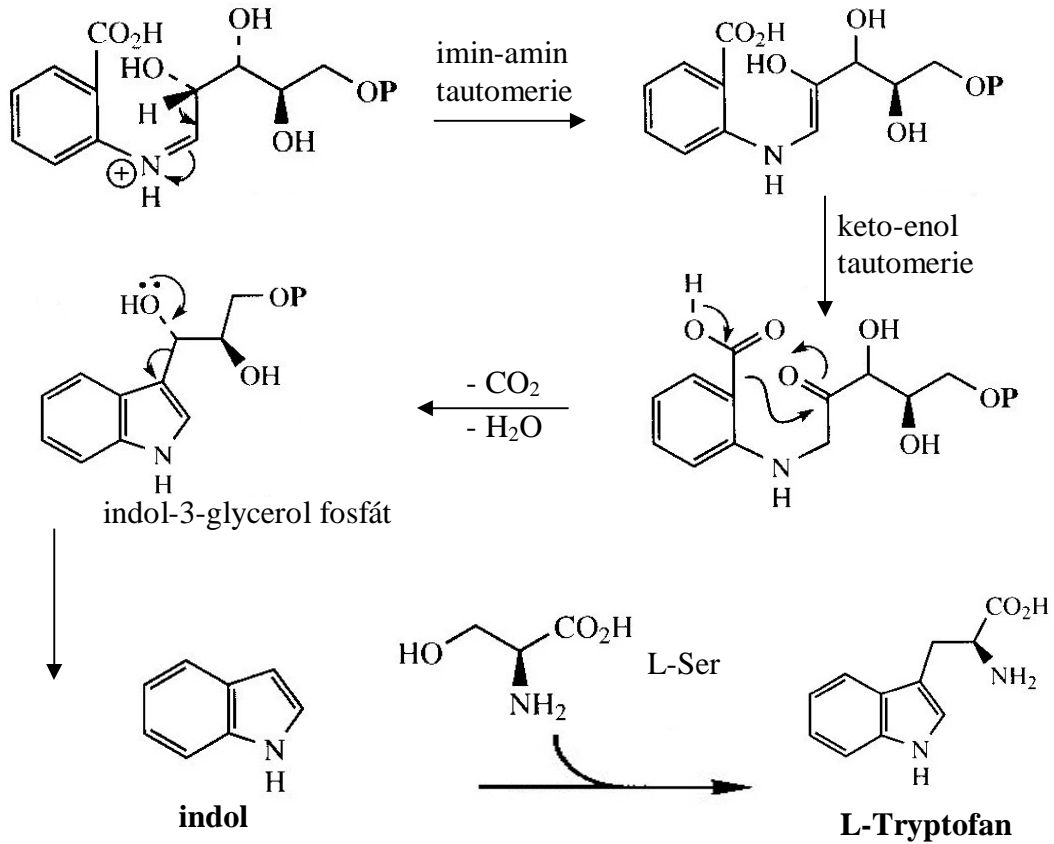
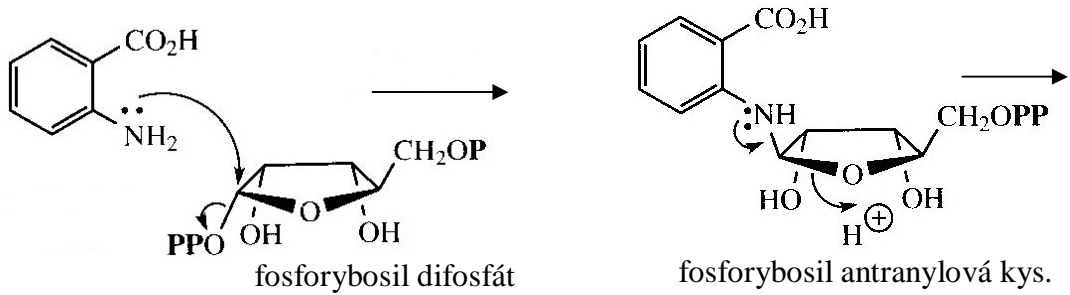
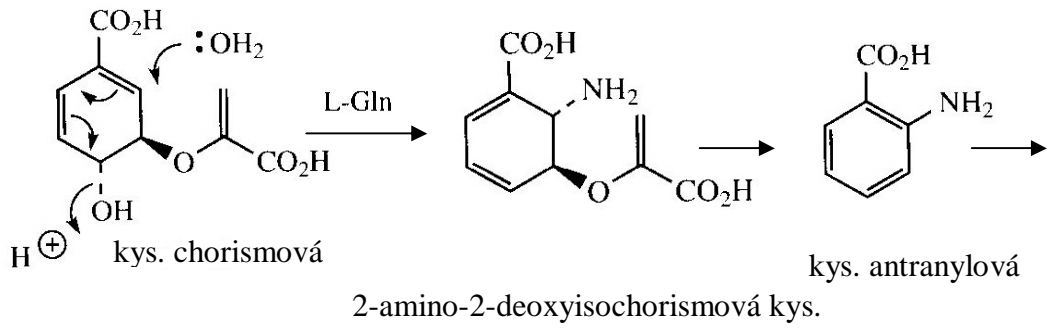


Obr. 7. Šikimátová biosyntetická cesta (tryptofanová biosyntetická větev)

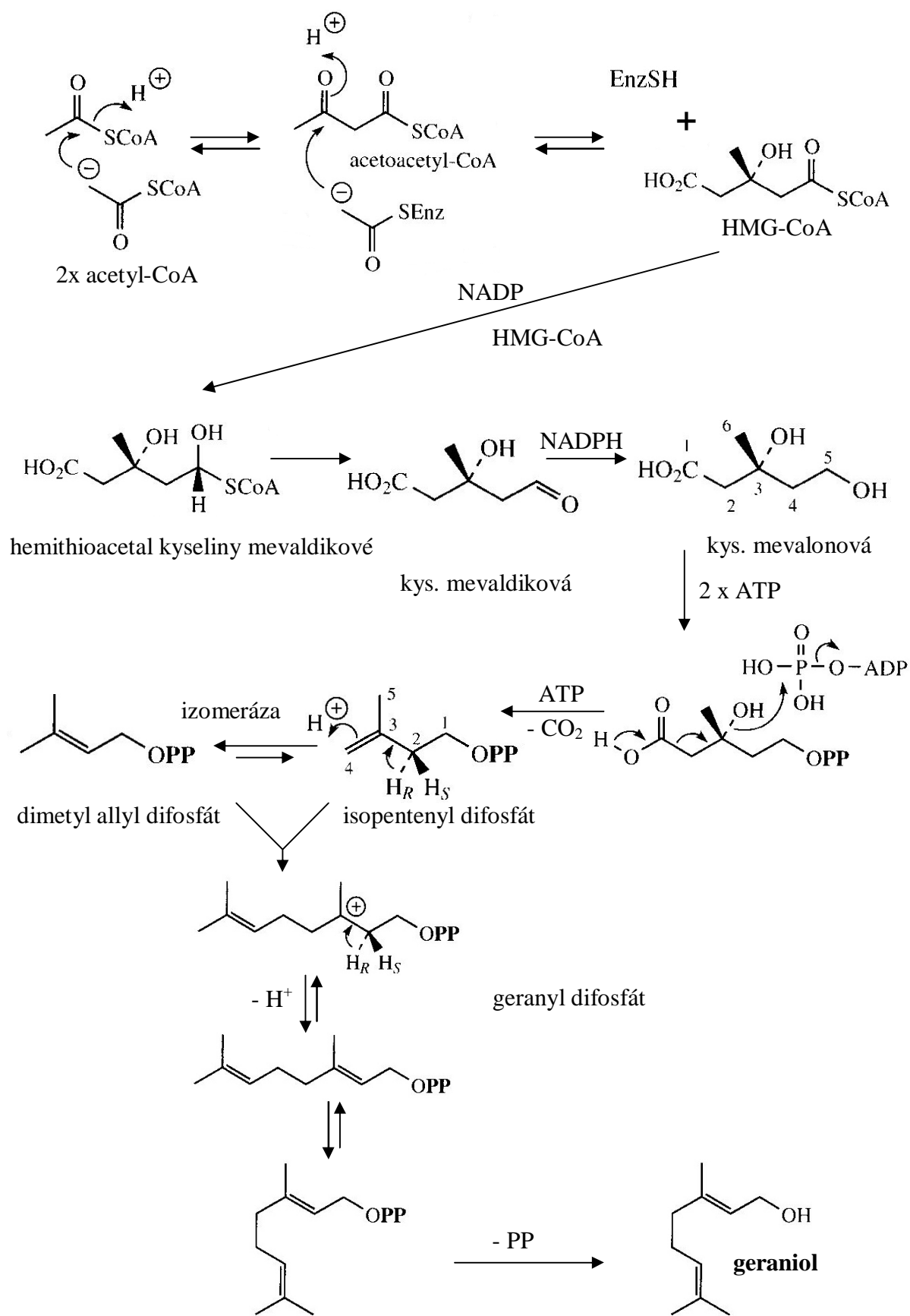


(pokračování)

(pokračování)

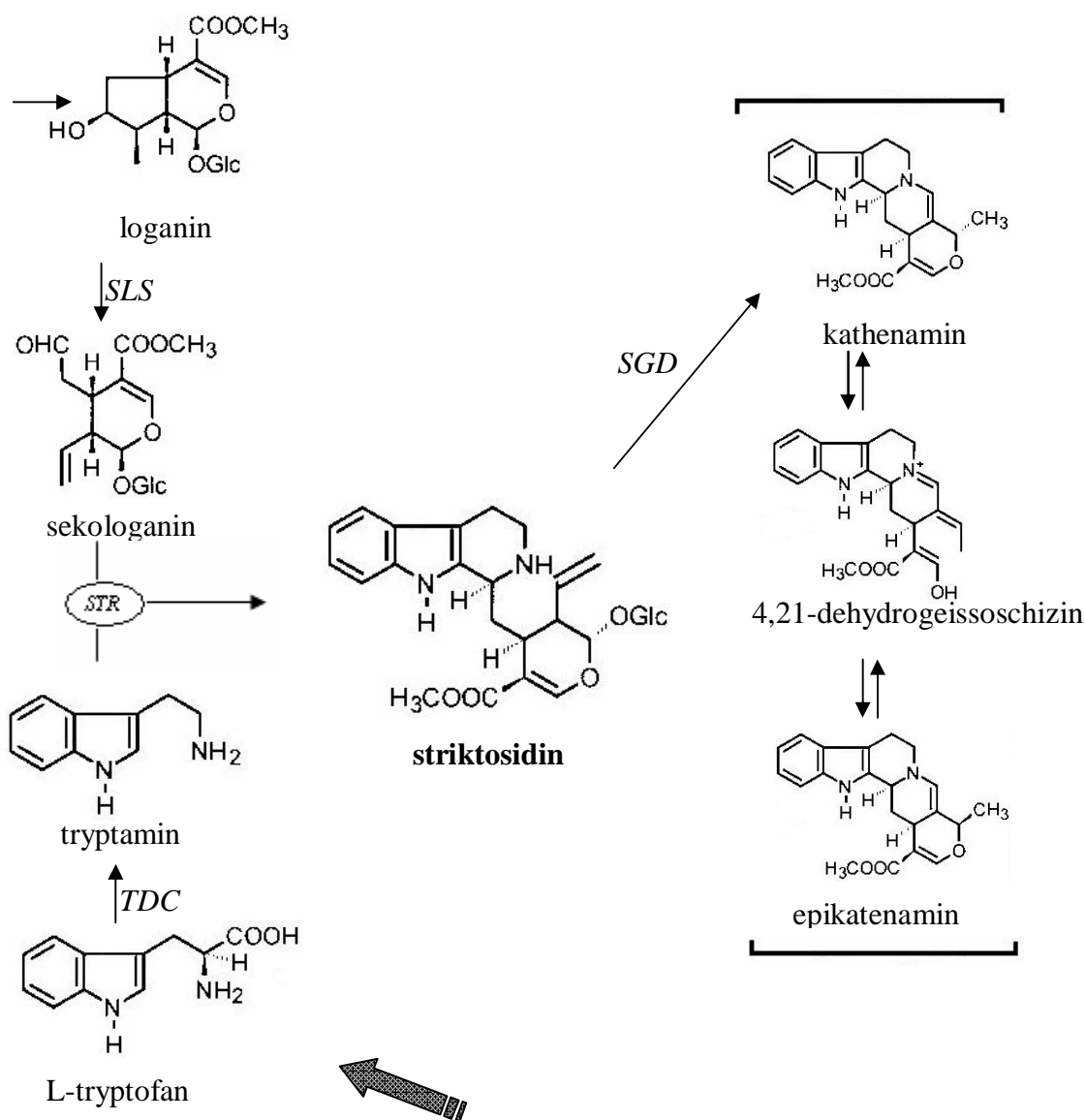
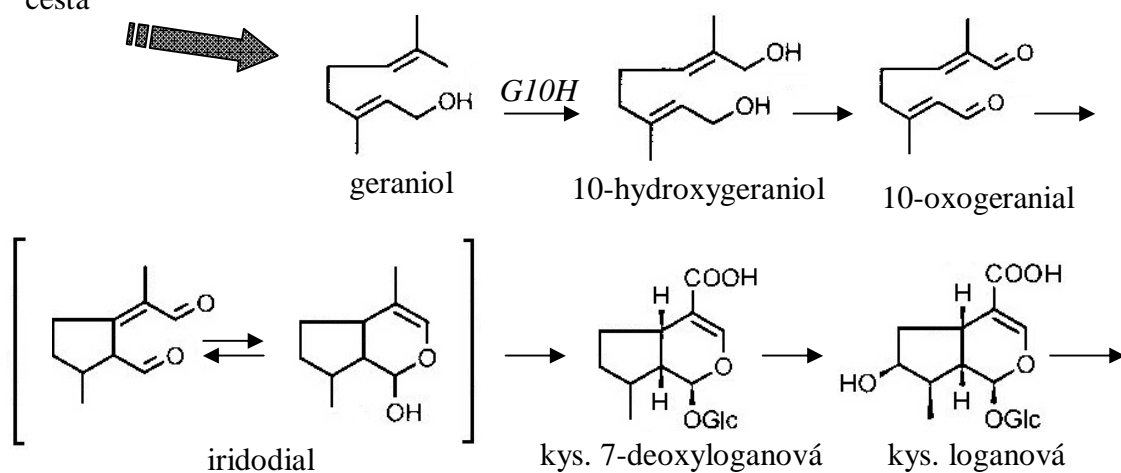


Obr. 8. Mevalonátová biosyntetická cesta (terpenová biosyntetická větev)



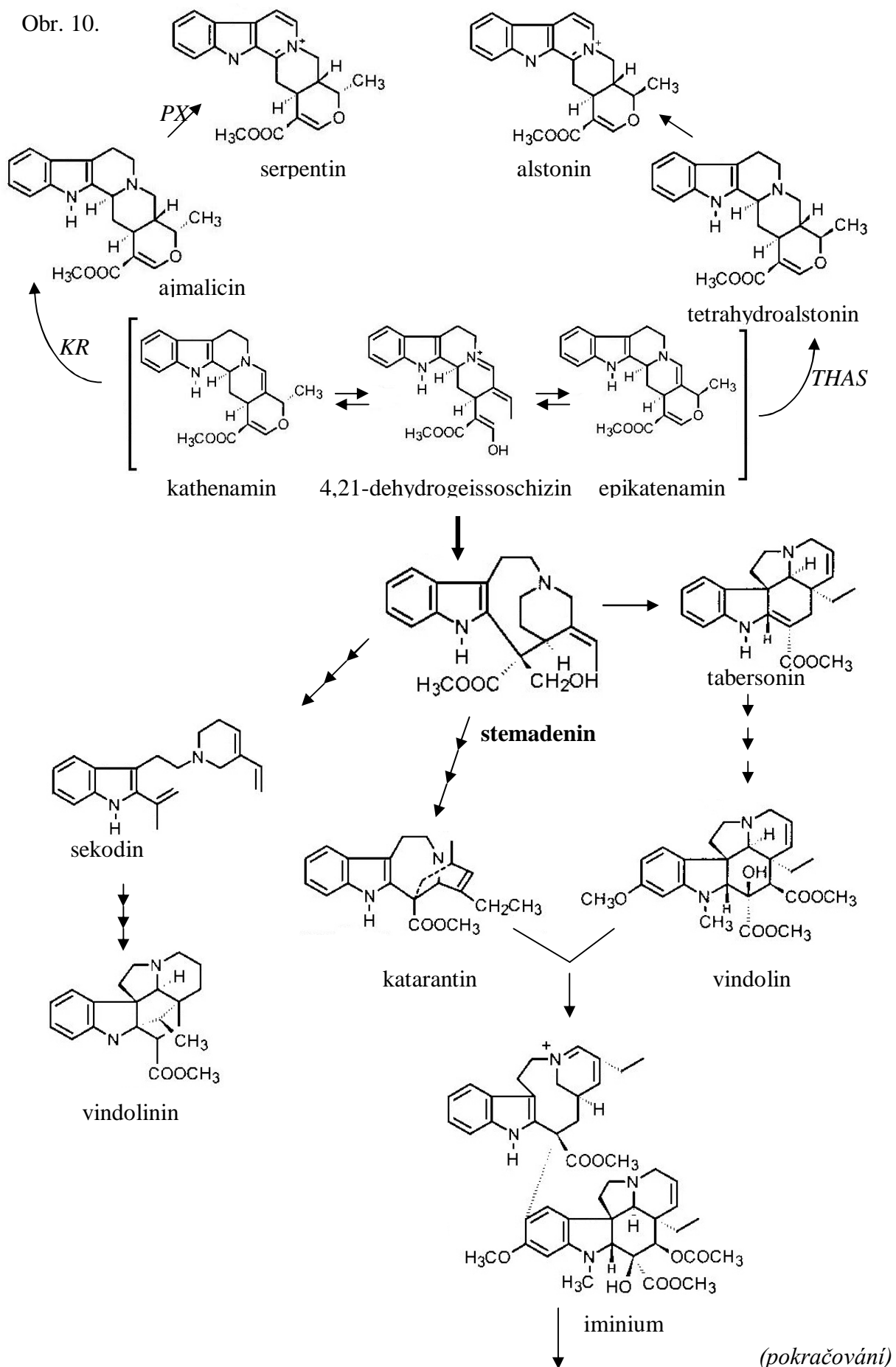
Mevalonátová biosyntetická  
cesta

Obr. 9. Syntéza striktosidinu



Šikimátová biosyntetická cesta

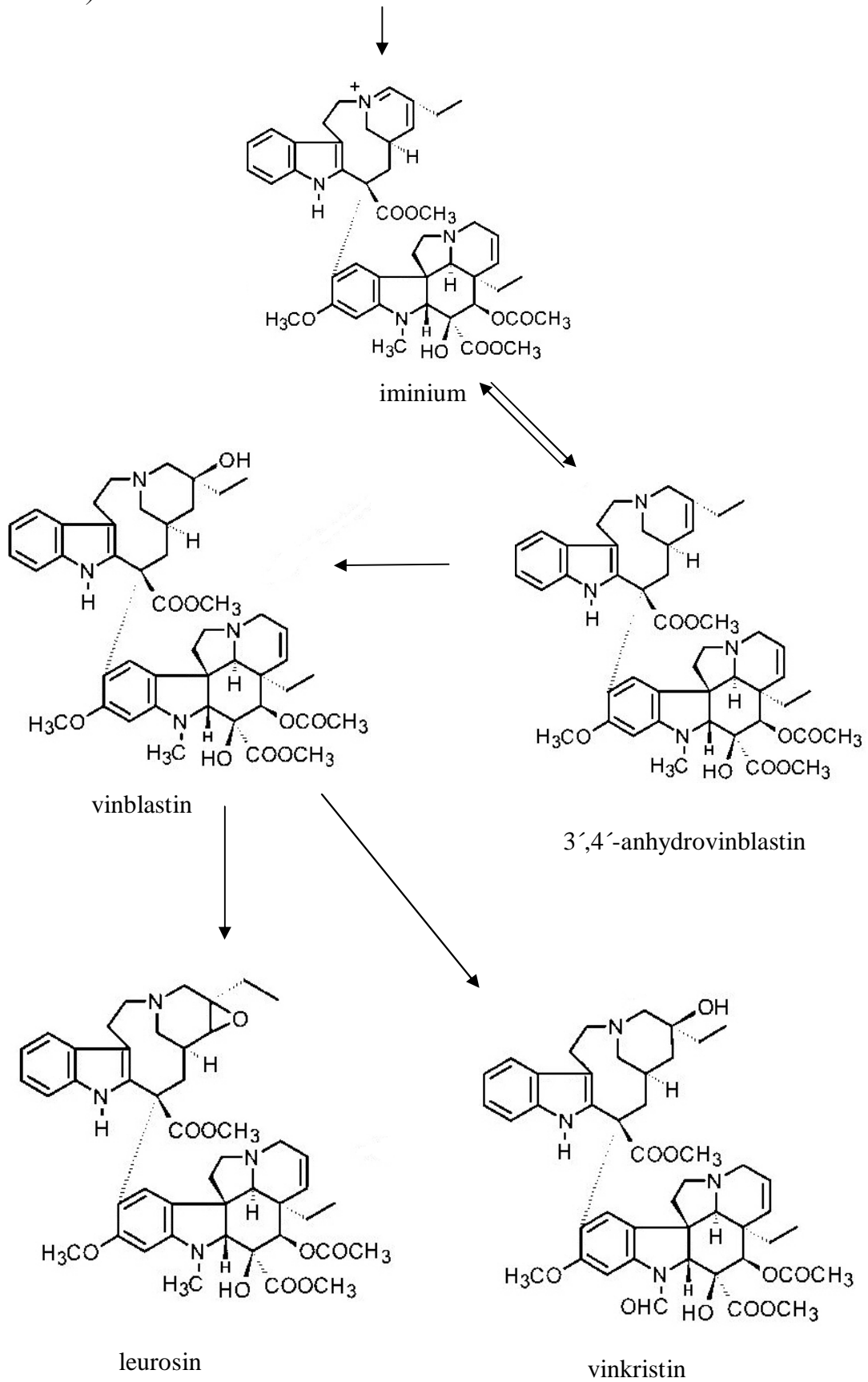
Obr. 10.



(pokračování)



(pokračování)



### 3.4. Kompartimentace biosyntézy v rostlinných buňkách *C. roseus*

V buňkách dochází souběžně ke spoustě biochemických dějů, které jsou mnohdy protichůdné povahy jako např. syntéza glukózy a současně glykolýza. Oddělení jednotlivých dějů pomocí membrán do tak zvaných kompartmentů zabraňuje chaosu a umožňuje regulaci dějů. Jedno z důležitých míst regulace všech metabolických pochodů je na vstupu a výstupu metabolitů z kompartmentu (Kunze *et al.*, 2002; Johansen *et al.*, 2006). Transport látek mezi kompartmenty se uskutečňuje jak uvnitř jednotlivých buněk, tak intercelulárně (Kutchan, 2005a; Mahroug, 2007).

#### 3.4.1. Intracelulární kompartimentace

*Catharanthus roseus* je evidentně dobrým příkladem intracelulární kompartimentace biosyntetických pochodů (Facchini, 2001). Důvody pro oddělení metabolických cest do různých subcelulárních kompartmentů mohou být (Pasqualy *et al.*, 2006):

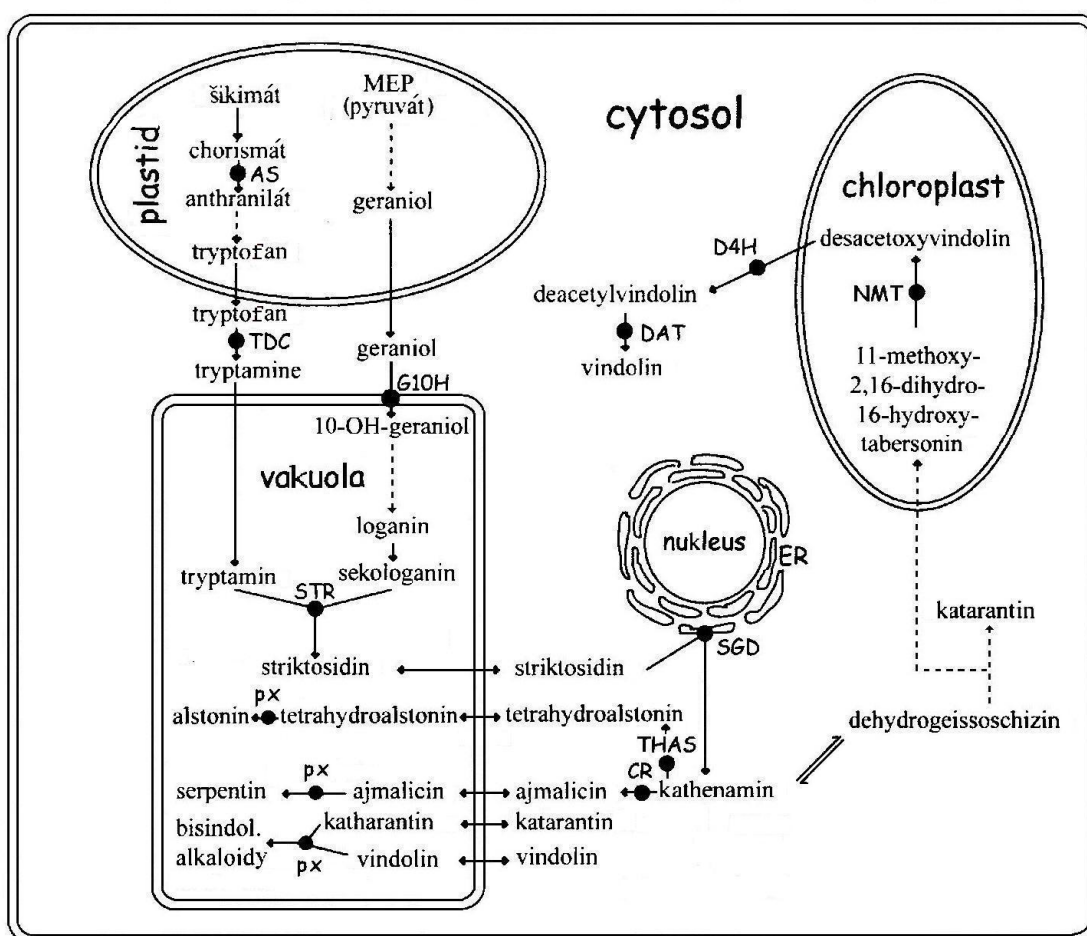
- ochrana proti autotoxicitě způsobené alkaloidy a jejich intermediáty,
- lepší kontrola fluxů (toku) metabolitů (důležitý bod regulace, redukce negativní zpětné vazby atd.),
- optimalizace podmínek pro aktivitu enzymů v rámci mikroklimatu kompartmentu.

Příčinou neúspěchů při získávání sekundárních metabolitů z kultur *C. roseus* může být nedostatečná diferenciací subcelulárních kompartmentů (například nedostatečně vyvinuté vakuoly nebo plastidy) u rychle rostoucích kultur. Dalším aspektem by mohlo být potlačení vývoje plastidů nebo exprese genů zapojených do fotoautotrofního metabolismu (a případných počátečních kroků biosyntézy prekurzorů sekundárních metabolitů) při *in vitro* suplementaci systému vnějším zdrojem sacharidů (Pasqualy *et al.*, 2006).

Syntéza prekurzorů terpenové biosyntetické cesty (až ke geraniolu) a tryptofanová větev se předpokládá v plastidech (Chappell, 1995; Poulsen a Verpoorte, 1991; Zhang *et al.*, 2001). Konverze tryptaminu na tryptofan se děje v cytosolu za katalýzy tryptofandekarboxylázy (De Luca and Cutler, 1987; Stevens *et al.*, 1993). Nedávno se ukázalo, že dva enzymy vedoucí k biosyntéze sekologaninu jsou lokalizované v mikrosomech buněk *C. roseus* (Irmeler *et al.*, 2000). Contin *et al.* (1999b, 1999c) předpokládají konverzi loganinu na sekologanin ve vakuolách nebo v souvislosti s vakuolární membránou. Jelikož striktosidin syntáza je lokalizovaná ve vakuolách, tryptamin musí být transportován přes tonoplast aby mohl být pomocí tohoto enzymu spojen se sekologaninem (McKnight *et al.*, 1991). Geraniol-10-hydroxyláza, enzym katalyzující počáteční kroky v syntéze sekologaninu je spojovaný s provakuolární membránou (Collu *et al.*, 2001; Madyastha *et al.*, 1977). Předpokládá se, že striktosidin glukosidáza, enzym katalyzující deglukosylaci striktosidinu, je vázána k vnější části tonoplastu (Stevens *et al.*, 1993). Avšak *in vitro* studie prokázaly asociaci tohoto enzymu s endoplasmatickým retikulem (Geerlings *et al.*, 2000). Tabersonin-16-hydroxyláza (T16H), enzym zapojující se do C-16 hydroxylace tabersoninu, se také zdá být asociovaný s mikrosomy (Schröder *et al.*, 1999). *N*-metyltransferáza, která katalyzuje třetí až poslední článek v řetězci biosyntézy vindolinu, je asociovaná s thylakoidální membránou (De Luca a Cutler, 1987; Dethier a De Luca, 1993). Nicméně vývoj chloroplastů zřejmě není nezbytný pro aktivitu *N*-metyltransferázy, která byla detekovaná i v transparentních semenáčcích. Poslední dva kroky v biosyntéze vindolinu jsou katalyzované enzymy desacetoxyvindolin-4-hydroxylázou (D4H) a deacetylvindolin-4-*O*-acetyltransferázou (DAT), které se nacházejí v cytosolu (De Luca *et al.*, 1988; St-Pierre *et al.*, 1998; Vazquez-Flota *et al.*, 1997). Vindolin je pak transportován zpět do vakuol kde se setkává s katarantinem a je s ním vázán za přítomnosti 3',4'-anhydrovinblastin syntázy (AVLBS) (Sottomayor *et al.*, 1998). Tím, že enzymy katalyzující biosyntézu alkaloidů jsou lokalizované v cytosolu, vakuolách,

provakuolách, na tonoplastu, membránách, endoplasmatickém retikulu, stromatu chloroplastů, thylakoidální membráně a ve speciálních vezikulech, se stává celý celulární biosyntetický systém velice komplexním (Facchini, 2001).

Obr. 11. Intracelulární kompartmentace biosyntézy terpenových indolových alkaloidů v *C. roseus*. Pro zjednodušení je zanedbána skutečnost, že jednotlivé části biosyntetického řetězce jsou lokalizované v různých buňkách/tkáních.



### 3.4.2. Intercelulární kompartmentace

Komplexitu celého buněčného biosyntetického systému ještě umocňují poznatky o tkáňové nebo orgánové biosyntetické specializaci. Z toho vyplývá i nezbytnost výměny intermediátů

na intercelulární úrovni. Studie transgenních rostlin *Catharanthus roseus* (TDC, STR1, D4, DAT) dokazují, že intermediáty metabolických cest procházejí nejméně dvěma různými typy buněk (St-Pierre *et al.*, 1999). TDC a STR1 se ve větší míře nacházejí v epidermis stonku, listů a květních pupenů, v protodermis a buňkách okolo apikálního meristému kořenových špiček. D4H a DAT, enzymy zapojené do posledních kroků biosyntézy vindolinu, se kumulují v mléčnicích a idioblastech listů, stonků a květních pupenů. Stejně studie také odhalily basipetální gradient exprese těchto čtyř genů technikou *in situ* RNA hybridizace v dospívajících listech, což indikuje transientní neboli přechodnou expresi vindolinové biosyntetické cesty v počátečních stádiích vývoje listu. Tato data mohou objasňovat neúspěchy produkce vindolinu kulturami *in vitro*. Imunocytochemická lokalizace proteinů TDC, STR1, D4H a DAT potvrdila *in situ* RNA hybridizace (St-Pierre *et al.*, 1999). SLS byla také nalezena v epidermis listů (Irmeler *et al.*, 2000). Bylo dokázáno, že sekologanin je v *C. roseus* syntetizován z IPP (MEP biosyntetická cesta) (Contin *et al.*, 1998). Transkripty korespondující G10H, 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfát syntáze, 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfát reduktoisomeráze a 2-C-metyl-D-erytrytol-2,4-cyklodifosfát syntáze byly nalezeny výhradně ve floému mladých nadzemních částí katarantu (Burlat *et al.*, 2004). I v tomto případě byl zaznamenán basipetální gradient exprese u mladých listů, klesající u starších listů. Mahroug *et al.* (2006) dokládají ústřední roli epidermis nejméně ve čtyřech biosyntetických cestách. Všechna tato data silně podporují nezbytnost transportu intermediátů od vnitřního lýkového parenchymu do epidermis, a eventuelně následného pozdějšího transportu do idioblastů a mléčnic.

Studie dělané na *Camptotheca acuminata* a *Ophiorrhiza pumilla*, kde TDC není kódovaná jedním genem nýbrž malou skupinou genů, poukazují na přísnou regulaci exprese TDC ovlivňovanou ontogenezí a obranným systémem rostliny proti patogenům (Lorence a Nessler, 2004).

Shrnuto v Pasqualy *et al.* (2006), jak *Papaver somniferum* (Bird *et al.*, 2003) tak *Thalictrum flavum* (Samanani *et al.*, 2005) mají tkáňově oddělenou biosyntézu a akumulaci alkaloidů, ale blízce příbuzné biosyntetické enzymy mohou být přítomné v *T. flavum* v jiných typech buněk než v *P. somniferum*. Nelze tedy vyvodit obecný vzorec lokalizace enzymů a vztáhnout ho na různé rostlinné systémy. Je zmíněn i vliv evoluce v biosyntéze alkaloidů a tudíž relokalizace prokázané biosyntetické cesty do odlišných typů buněk.

### 3.5. Transport

Výměna látek mezi organismy a okolím je jedním z důležitých projevů života. Bez této výměny by neměly organismy dostatek energie ani stavebních kamenů k růstu a reprodukci. Transport látek se uskutečňuje jak mezi buňkami a vnějším prostředím, jednotlivými buňkami uvnitř systému, tak mezi vnitrobuněčnými organelami. Jakákoli látka vyměňovaná mezi kompartmenty musí překonat polopropustnou přepážku, která slouží k oddělování a tudíž i formování jednotlivých buněk a subcelulárních organel. Membrány mají různý průměr v závislosti na charakteru kompartmentu, který oddělují. Nejsilnějšími membránami jsou plasmatická membrána ( $10,5 \pm 0,3$  nm), vakuolární membrána ( $8,1 \pm 0,9$  nm) a vyvinutý Golgiho aparát ( $6,6 \pm 1,8$  nm). Ostatní buněčné membrány měří 5-6 nm (Morre *et al.*, 1987). Co mají ovšem všechny membrány společné, je obecná struktura. Jsou složeny z bimolekulární vrstvy lipidů. Nejčastěji zastoupené lipidy v membránách jsou fosfatidy, konkrétně fosfatidylcholin, který obsahuje hydrofilní hlavičku složenou z cholinu, fosfátu a glycerolu a nepolární (lipofilní) část složenou z uhlovodíkového řetězce. Vykazuje tedy amfipatický charakter. Většina membrán eukaryotických buněk je syntetizována v endoplasmatickém retikulu. Už při syntéze je určeno, která vrstva lipidů bude orientována do cytosolu a která dovnitř organel či do vnějšího prostředí. Lipidová vrstva tedy není

symetrická. Četné proteiny jsou zanořovány do membrán ve specifické orientaci, která je důležitá pro jejich další funkci. Membrána má flexibilní vlastnosti, je schopna se ohýbat, vytvářet záhyby atd. a také vytvářet vezikuly např. pro transport látek (minimální velikost váčku daná flexibilitou membrány je 25 nm). Další vlastností membrány ovlivňující její funkci je pohyb lipidů uvnitř dvojvstvy. Membrána se tak chová jako dvojrozměrná tekutina. (Alberts *et al.*, 1998)

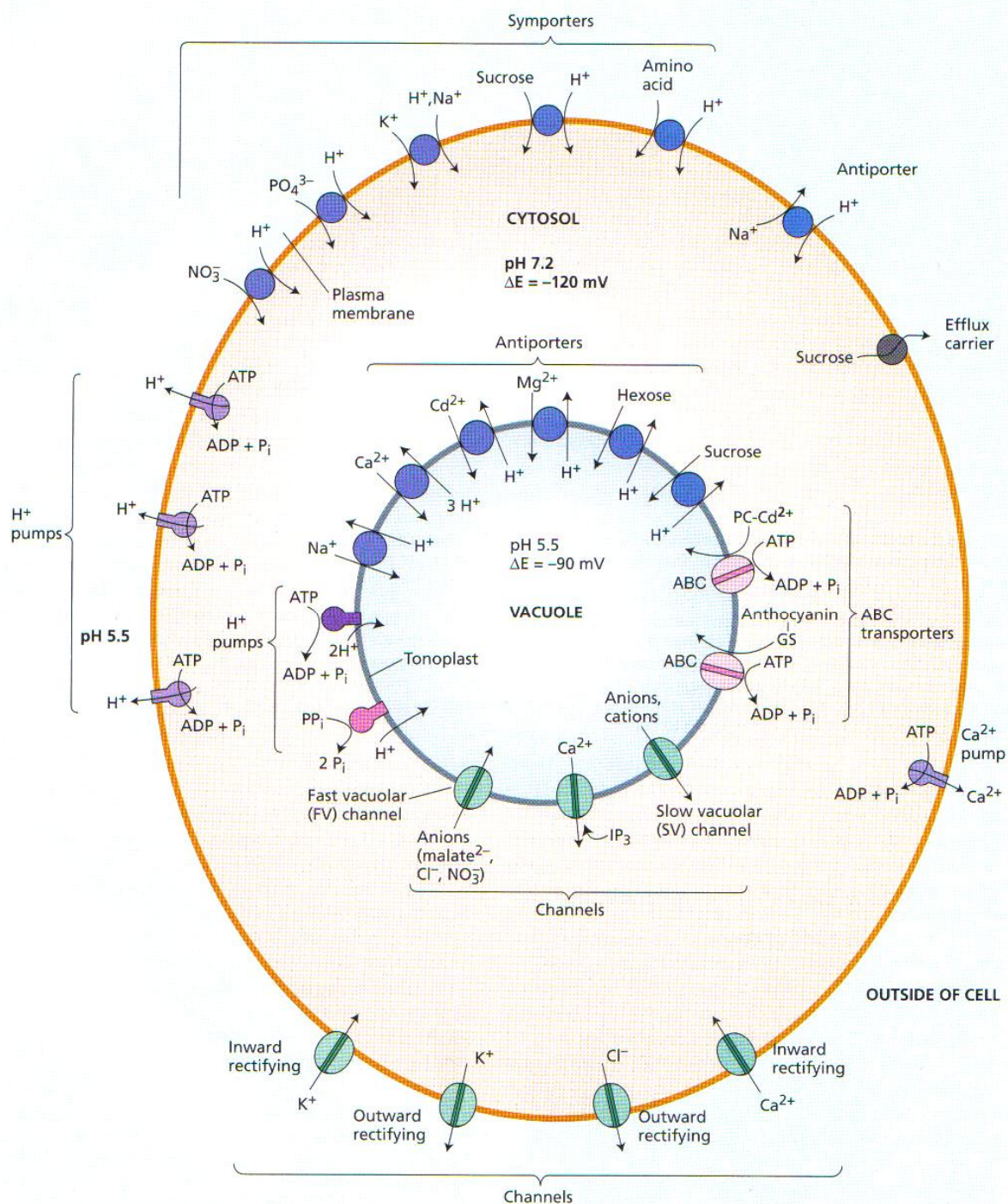
Proteiny, které jsou integrovány v membránách, mají různé funkce, např. přenášejí informace o vnějším okolí (teplota, vlhkost, tlak, živiny atd.), umožňují molekulární signalizaci sousedních buněk např. o útoku patogena a v neposlední řadě zprostředkovávají pohyb molekul a iontů přes membránu.

Lipidová dvojvrstva je sama o sobě pro ionty a nabitě molekuly bez ohledu na jejich velikost téměř nepropustná. (Samotná propustnost není nemožná, pouze rychlost difuze a tím i celá efektivita difuze je velice nízká; např. voda difunduje přes membránu miliardkrát rychleji než malé ionty jako  $\text{Na}^+$  či  $\text{K}^+$ ). Membrána funguje jako přepážka, přes kterou mohou samovolně a snadno difundovat pouze molekuly

- malé a nepolární (např. molekuly kyslíku a oxidu uhličitého),
- nenabitě polární molekuly (s rovnoměrným rozdělením elektrického náboje, např. voda a ethanol).

Tato prostá difuze, nebo přesněji nespecifická permeace patří do kategorie **transportu pasivního**. Podle Fickova prvního zákona se molekuly pohybují spontánně ve směru gradientu koncentrace nebo chemického potenciálu dokud není dosaženo rovnováhy. Po dosažení rovnováhy k pohybu nedochází aniž by byla použita hnací síla (Taiz & Zeiger, 2002).

Obr. 12. Schéma buněčných transportních procesů (Taiz & Zeiger, 2002)



Vedle prosté difuze mohou být látky pasivně transportovány (na základě koncentračního nebo elektrochemického potenciálu) pomocí přenašečových nebo kanálových proteinů. Jedná se o integrální membránové proteiny, jejichž dlouhý peptidový řetězec mnohanásobně protíná



lipidovou dvojvrstvou a vytváří tak jakýsi tunel v membráně. Malé hydrofilní molekuly tak mohou procházet aniž by se dostaly do kontaktu s hydrofobním prostředím lipidové dvojvrstvy. Rozdíl mezi přenašečem a kanálem je ve strategii výběru přenášené látky. Kanálem může projít jakákoli molekula optimální velikosti a náboje. Oproti tomu přenašečové proteiny umožní průchod pouze látkám, které se hodí do vazebného místa proteinu. Po navázání látky se změní konformace proteinu a látka je jako turniketem přenesena na druhou stranu membrány. Nutnost pozitivní interakce látky s vazebným místem činí tento transport selektivním.

Jako **aktivní transport** je popisována situace, kdy je látka přemísťována proti svému chemickému či elektrochemickému potenciálu z místa nižší koncentrace do prostředí s vyšší koncentrací látky za spotřeby určité energie. Aktivní transport je v buňkách uskutečňován následujícími způsoby:

- A. pomocí spřažených přenašečů, kdy jeden solut je přenášen ve směru koncentračního gradientu a elektrochemického potenciálu za současného přenosu jiného solutu proti gradientům. Může se jednat o:
  - a. symport, kdy obě látky přecházejí na stejnou stranu membrány, např.  $H^+$ /sacharóza symport
  - b. antiport, kdy jsou látky transportovány na opačné strany membrány, např.  $Na^+/H^+$  antiport,
- B. pomocí pump, které hydrolyzují ATP a energii využívají pro transport solutu proti gradientům. Například protonová pumpa ( $H^+$ -ATPáza) a vápenatá pumpa ( $Ca^{2+}$ -ATPáza),
- C. pomocí specifických transportérů, tzv. ABC (ATP-Binding Cassette) transportérů, které přenáší určité látky přes membrány za použití energie získané hydrolýzou ATP.

Celý systém je přísně organizovaný a kontrolovaný a jednotlivé transportní mechanismy na sebe vzájemně navazují, jsou na sobě závislé. Udržování stálého pH, vnitřního elektrochemického potenciálu a turgoru je jedním ze základních prvků homeostázy buňky (Alberts *et al.*, 1998; Hedrich a Marten, 2006).

### 3.5.1. ABC transportéry

ABC (ATP-Binding Cassette) transportéry tvoří obrovskou skupinu transmembránových proteinů vyskytujících se od bakterií a kvasinek přes rostlinnou říši až po lidské buňky (Higgins, 1992). Od doby jejich objevení v živočišných buňkách počátkem sedmdesátých let se podařilo nashromáždit množství údajů (Gottesman a Ling, 2006), které se vzhledem k charakteristickým vlastnostem ABC transportérů a zejména jejich dopadu na onkolytickou terapii neustále zvětšuje. První ABC transportér, P-glykoprotein = MDR1 = ABCB1, byl nalezen v tzv. MDR (MultiDrug Resistant) buněčných kulturách (Juliano a Ling, 1976) při bádání nad důvodem resistance těchto kultur k různým druhům podaných cytotoxických léčiv. Bez ohledu na mechanismus účinku nebo chemickou strukturu chemoterapeutik je effluxní membránový protein rozpozná a vyloučí ven z buňky dříve než se stačí plně rozvinout jejich cytotoxický efekt. Mezi léčiva, která jsou snadno vylučována z rakovinových buněk patří např. kolchicin, doxorubicin, adriamicin, vincristin a vinblastin, digoxin a paklitaxel (Dean *et al.*, 2001). Dodnes je MDR fenomén hlavním důvodem neuspokojivé léčby rakovin mnoha druhů (Gottesman *et al.*, 2002; Ambudkar *et al.*, 1999). Vědci se snaží řešit resistenci rakovinových buněk k chemoterapeutikům těmito způsoby (Szakács, 2006; Ozben, 2006; Nobili *et al.*, 2006):

- zvyšování dávky chemoterapeutik, což je většinou neefektivní pro zvýšenou celkovou toxicitu a další stimulaci resistance,

- upřednostňovat v terapii léčiva, která nejsou dobrými ABC substráty, např. 5-fluorouracil a cyklofosfamid,
- současně s onkolytiky podávat inhibitory ABC transportéru. Nevýhodou je, že tyto tzv. inhibitory, modulátory nebo „chemosensitizers“ ovlivňují i jiné transportní mechanismy buňky. Proto jsou intenzivně studovány a nyní jsou k dispozici již třetí generace MDR modulátorů s vylepšenými vlastnostmi (Thomas a Coley, 2003). Zatím žádný ale nenašel uplatnění v klinické praxi. Některé rostlinné látky také vykazují inhibiční efekt na ABC transportéry, např. schizandrin-B (Qiangrong, 2005), některé flavonoidy (Morris, 2006) nebo extrakt ze zeleného čaje (Netsch, 2005),
- nejnovějším přístupem je jednak zabránění vzniku resistance na úrovni exprese genů (Bouffard *et al.*, 1996) (technologie down regulace ABC proteinů a enzymů zodpovědných za MDR pomocí antisense oligonukleotidů) nebo obejití MDR mechanismu studiem nových struktur chemoterapeutik, které nebudou dobrými substráty pro ABC transportéry (Liscovitch a Lavie, 2002). Tento přístup vychází z teorie, že živé buňky potřebují MDR mechanismus pro svou normální fyziologii (Pidcock, 2006). Dalším studovaným tématem jsou látky zabraňující angiogenezi, tzn. tvorbě cév pro zásobování nádoru krví a živinami.

Projekt mapování lidského genomu (HUGO) potvrdil domněnku celé velké skupiny genů patřící do rodiny ABC transportérů a pro lepší orientaci v nich zavedl novou nomenklaturu. Nicméně překvapující je fakt, že rostlinné genomy obsahují téměř o polovinu více genů kódujících ABC transportéry než lidský genom (Sánchez-Fernández *et al.*, 2001b), aniž bychom zatím mnoho tušili o jejich funkci v rostlinách. Sánchez-Fernández *et al.*, 2001a spekuluje nad imobilním způsobem rostlinného života a nepřítomností exkretčních orgánů jako činitelů v boji proti nepříznivému vnějšimu a *de facto* i vnitřnímu prostředí. Objasnění

významu ABC transportérů pro rostliny je výzvou, které se v posledních letech chopila řada vědců (Theodoulou, 2000; Rea, 1999; Sánchez-Fernández, 2001a; Klein, 2006; Garcia, 2004; Crouzet, 2006; van den Brûle a Smart, 2002; Kolukisaoglu *et al.*, 2002; Shitan a Yazaki, 2007; Verrier *et al.*, 2008). Zatím je známo, že ABC transportéry jsou schopné translokovat různé druhy chemicky odlišných substrátů mezi které patří například peptidy, cukry, lipidy, cheláty těžkých kovů, polysacharidy, alkaloidy, steroidy, anorganické kyseliny a konjugáty glutathionu (Higgins, 1992; Rea *et al.*, 1998).

Příklady některých rostlinných ABC transportérů, jejich lokalizace a funkce jsou v tabulce č. 1. O skutečnosti, že studium rostlinných ABC transportérů je dynamický proces, svědčí fakt, že v roce 1992 byl identifikován teprve jediný rostlinný ABC transportér (v review Higgins, 1992). Jednalo se o *AtPGP1* (*AtMDR1*), homolog lidského P-glykoproteinu, identifikovaný v *Arabidopsis thaliana* (Dudler a Hertig, 1992). Nyní je v *Arabidopsis* známo okolo 130 ABC proteinů rozdělených do 12 kategorií podle jejich velikosti, orientace, doménové organizace a podobnosti s ABC proteiny jiných organismů (Sánchez-Fernández, 2001a; Matinoia *et al.*, 2002).

Obecná struktura ABC transportéru je následující (Theodoulou, 2000):

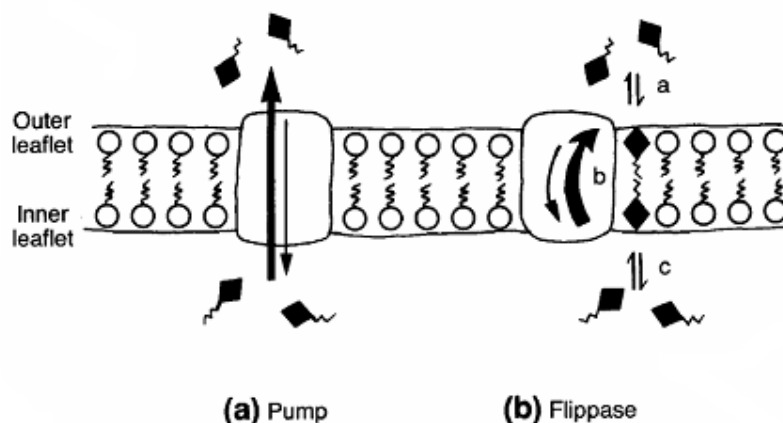
- vysoce hydrofobní transmembránová doména (TMD) neboli polypeptidový řetězec, který několikrát protíná membránu (např. MRP zástupce má 11 transmembránových smyček v N-terminální části proteinu a 4 až 6 v C terminální části (Bakos *et al.*, 1996; Hipfner *et al.*, 1997). Transmembránová doména tvoří cestu, kterou substrát prochází membránou a má i vliv na substrátovou specifitu,
- NBF („nucleotide binding fold“), nukleotidová doména, což je polypeptidový řetězec zasahující do cytosolu. Tento řetězec obsahuje místo kde se váže a hydrolyzuje ATP a pravděpodobně vazebné místo(a) pro přenášený substrát. Obsahuje dva úseky zvané

Walker box A a B, které jsou oddělené přibližně 120 aminokyselinami (Walker *et al.*, 1982). Lysin ve Walker boxu A je zodpovědný za vazbu  $\beta$ -fosfátu ATP, zatímco kyselina asparagová v B boxu váže  $Mg^{2+}$  (Sharom *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 1998). Mezi těmito boxy leží vysoce konzervativní sekvence 14 aminokyselin zvaná „ABC signature motif“ nebo také C motiv (Bairoch, 1992). Tento „signature motif“ je specifický pro ABC transportéry (Higgins, 1992) a odlišuje je tak např. od kináz, které také obsahují Walker sekvence (Walker *et al.*, 1982; Higgins *et al.*, 1986).

Za plnohodnotný (full molecule) transportér se považuje zdvojená sada TMD a NBF. Kombinace (TMD-NBF)<sup>2</sup> tvoří P-gp (MDR) a MRP zástupce, kombinace (NBF-TMD)<sup>2</sup> se vyskytuje u PDR členů ABC skupiny. Funkční jsou i tzv. poloviční transportéry obsahující pouze jednu sadu domén v obou pořadích nebo pouze dvě sady NBF či dokonce pouze jednotlivé TMD a NBF (Theodoulou, 2000).

### Mechanismus transportu ABC transportéry

V roce 1992 Higgins a Gottesman vyslovili názor, že P-glykoprotein by mohl fungovat jako membránová flipáza, viz obr. č. 13:



Hydrofobní substrát interaguje nejprve s membránou, interkaluje do vnější části dvojvrstvy a vytvoří rovnováhu (a) mezi vnějším prostředím a vnější vrstvou membrány. Další

rovnováha se ustanovuje mezi vnitřní a vnější stranou dvojvrstvy (b). Podle této teorie může právě tuto rovnováhu ovlivnit P-glykoprotein ve prospěch větší koncentrace substrátu ve vnější vrstvě membrány a tudíž je tendence k vylučování substrátu ven z buňky. Další rovnováha je ustanovena mezi vnitřní membránou a vnitřním prostředím (c). Tato hypotéza měla objasňovat širokou substrátovou specifitu P-glykoproteinu.

V dnešní době se zdá pravděpodobnější následující transportní model (Higgins a Linton, 2004; Dawson a Locher, 2006; Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006) (obr. 14.):

1. Iniciace transportu **interakcí substrátu s transmembránovou doménou (TMD)**. Vazbou substrátu na TMD dochází ke konformačním změnám v NBF. Zdá se, že substrátem indukovaná zvýšená ATP-asová aktivita v NBF je vyvolaná spíše lepší vazností ATP na NBF než samotnou stimulací hydrolýzy. Např. vinblastin zvyšuje afinitu NBD P-glykoproteinu k ATP až 60 krát. Snižuje se aktivační energie pro dimerizaci jednotlivých NBF.
2. Vazba ATP indukuje **dimerní formaci NBF**. C motiv jedné NBF interaguje s Walker A a B sekvencemi druhé NBF a tvoří tak dvě kompletní ATP vazebná místa. Nejméně dvě sady interakcí pravděpodobně zajišťují energizaci konformačních změn: interakce  $\gamma$ -fosfátu ATP s glutaminem v C motivu druhé NBF a interakce konzervativního glutaminu v Q smyčce s vázaným nukleotidem a hydrolyzovanou vodou. Zdá se, že pro konformační změny v TMD, které jsou zodpovědné za samotný transport substrátu, je důležitější vazba ATP a dimerizace NBF než samotná hydrolýza ATP.
3. **Hydrolýza ATP**. Co je spouštěcím faktorem hydrolýzy ATP ještě není známo.
4. Jisté je, že  **$\gamma$ -fosfát z ATP se uvolňuje jako první, poté ADP**. Pokud dojde k nahrazení odštěpeného fosfátu inhibitorem dříve než se ADP uvolní z NBF (jako v případě inhibitoru *o*-vanadátu), ABC transportér se nenavrací ke své původní

Tabulka č. 1

Přehled vybraných rostlinných ABC transportérů. Tabulka zahrnuje rostliny kde byly transportéry identifikovány, jejich vnitrobuněčnou lokalizaci, předpokládanou či dokázanou funkci a GenBank číslo příslušného genu (pokud je dostupné).

Geny ABC transportérů	Rostlinné druhy	GenBank číslo	Lokalizace	Transportované molekuly	Reference
<b>MDR podskupina</b>					
AtMDR1 (AtPgp1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AC006922	Plasmatická membrána	Xenobiotika, auxin	Sanchez-Fernandez <i>et al.</i> , 2001a
AtPGP4	<i>Arabidopsis thaliana</i>		Plasmatická membrána	auxin	Santelia <i>et al.</i> , 2005
AtMDR2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AL161564	Plasmatická membrána	Xenobiotika	Dudler a Sidler, 1998
CjMDR1	<i>Coptis japonica</i>	AB043999	Plasmatická membrána	Berberin	Yazaki <i>et al.</i> , 2001
HvMDR2	<i>Hordeum vulgare</i>	?	?	?	Davies <i>et al.</i> , 1997
TaMDR1	<i>Triticum aestivum</i>	AB055077	Plasmatická membrána	Aluminium	Sasaki <i>et al.</i> , 2002
PMDR1	<i>Solanum tuberosum</i>	U52079	Plasmatická membrána	?	Wang <i>et al.</i> , 1996
<b>MRP podskupina</b>					
AtMRP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AC025295	Tonoplast	GS-X	Lu <i>et al.</i> , 1997
AtMRP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AC003096	Tonoplast	GS-X, glukuronidy, katabolity chlorofylu	Lu <i>et al.</i> , 1998 Liu <i>et al.</i> , 2001
AtMRP3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AP000375	Tonoplast	GS-X, glukuronidy, katabolity chlorofylu	Tommasini <i>et al.</i> , 1998
AtMRP4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AC005309	Tonoplast Plasmatická membrána	Xenobiotika	Sanchez-Fernandez <i>et al.</i> , 1998 Klein <i>et al.</i> , 2003
AtMRP5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AC002411	Tonoplast	GS-X, glukuronidy	Gaedek <i>et al.</i> , 2001
TaMRP1	<i>Triticum aestivum</i>	AY064479	Tonoplast	Xenobiotika	Theodoulou <i>et al.</i> , 2003
ZmMRP1	<i>Zea mays</i>	AY186244	?	Xenobiotika	Swarbreck <i>et al.</i> , 2003

Geny ABC transportérů	Rostlinné druhy	GenBank číslo	Lokalizace	Transportované molekuly	Reference
<b>PDR podskupina</b>					
SpTUR2	<i>Spirodela polyrrhiza</i>	CAA94437	Plasmatická membrána	Obranné molekuly rostlin	Smart a Fleming, 1996
NpABC1 (NpPDR1)	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	AJ404328	Plasmatická membrána	Obranné molekuly rostlin	Jasinski <i>et al.</i> , 2001 Stukkens <i>et al.</i> , 2005
NpPDR3	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>		Plasmatická membrána	Obranné molekuly rostlin,	Ducos <i>et al.</i> , 2005
NtPDR1	<i>Nicotiana tabacum</i>	AB075550	Plasmatická membrána	Obranné molekuly rostlin	Sasabe, 2002
NtPDR3	<i>Nicotiana tabacum</i>	AJ831379	Plasmatická membrána	Role v transportu železa	Ducos <i>et al.</i> , 2005
AtPDR12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAF71978	Plasmatická membrána	Transport olova	Lee <i>et al.</i> , 2005
OsPDR3	<i>Oryza sativa</i>	BAB21276/1	Plasmatická membrána	Obranné molekuly rostlin	van den Brûle a Smart, 2002
OsPDR4	<i>Oryza sativa</i>	BAB21279/1	Plasmatická membrána	Obranné molekuly rostlin	van den Brûle a Smart, 2002
<b>WBC podskupina</b>					
AtWBC12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	?	Plasmatická membrána	Transport vosku do kutikuly	Pighin, 2004
AtWBC19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	?	Plasmatická membrána	Resistence ke kanamycinu	Mentewab a Stewart, 2005
GhWBC1	<i>Gossypium hirsutum</i>	AY255521	Plasmatická membrána	?, role ve vývoji vláken	Zhu <i>et al.</i> , 2003
NtWBC1	<i>Nicotiana tabacum</i>	AY341251	Plasmatická membrána	?, role ve fertilizaci	Otsu <i>et al.</i> , 2004



konformaci a je dále inaktivní. Uvolnění ADP je tudíž považováno za limitující krok v transportním cyklu. Je možné, že vazba substrátu na afinní místo TMD stimuluje uvolnění ADP stejně tak jako vazbu ATP pro nový transportní cyklus.

Celý transport je uskutečňován díky konformačním změnám o určité aktivační energii, která je pravděpodobně vyrovnána (i) vazbou substrátu na TMD, (ii) ATP vazbou na NBF, (iii) ATP hydrolýzou a (iv)  $P_i$  a ADP uvolněním. Hydrolýza ATP není tedy absolutním zdrojem energie, ale jedním ze zdrojů.

Stechiometrie transportu ještě není plně objasněna. Zatím je známo, že pro transport je dostačující hydrolýza jedné molekuly ATP. Nicméně většina ABC transportérů váže a hydrolyzuje dvě molekuly ATP během každého cyklu (Patzlaff *et al.*, 2003; Sauna a Ambudkar, 2000). Také jsou známa data o dvou různých vazebných místech pro různé substráty na TMD (Loe *et al.*, 1998; Rius *et al.*, 2003; Shapiro a Ling, 1997). Většinou se ale uvažuje, že je transportována jedna molekula substrátu každý cyklus.

Základními fyziologickými charakteristikami ABC transportéru jsou (Ishikawa *et al.*, 1997):

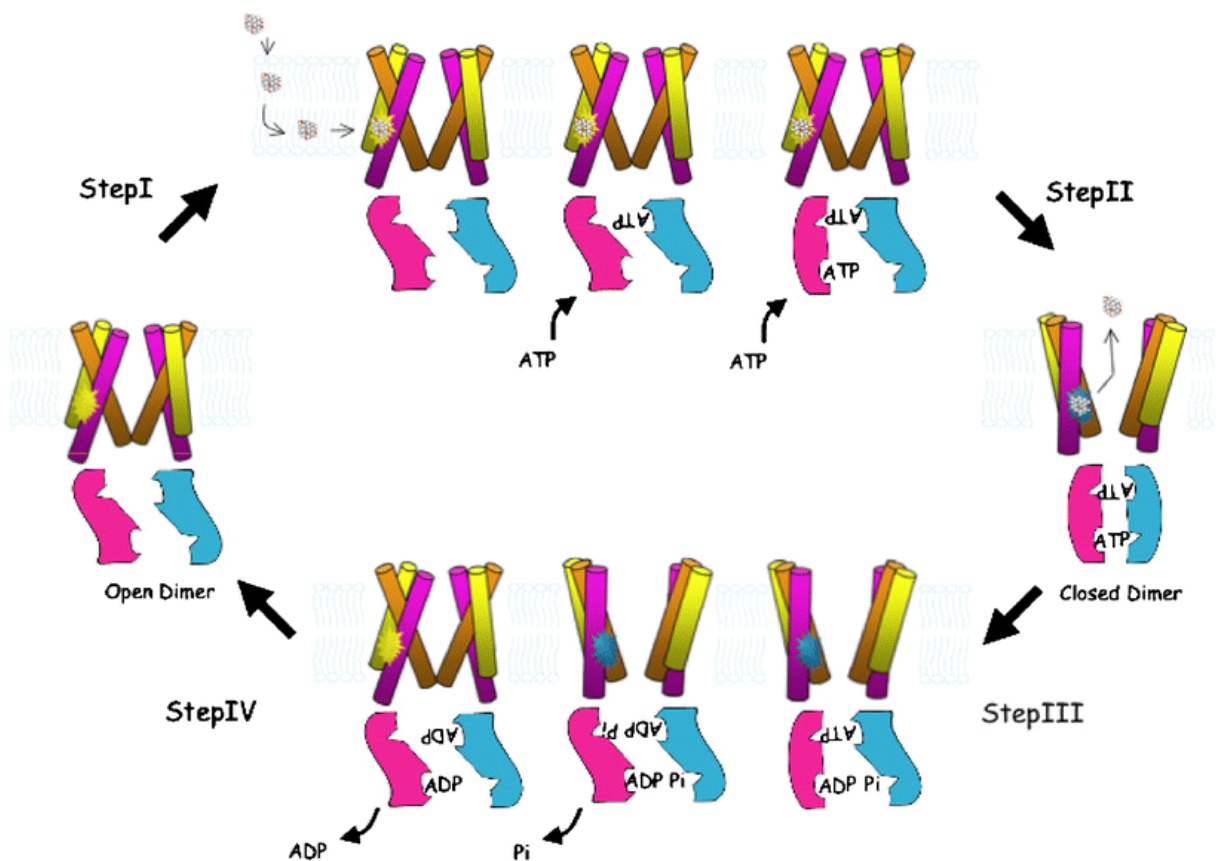
(jako modelový ABC transportér je demonstrována GS-X pumpa)

1. Preferování Mg-ATP jako substrátu pro hydrolýzu a následnou energizaci transportu. Ne volný ATP nebo nehydrolyzovatelný ATP analog jako je 5-( $\beta,\gamma$ -imido)trifosfát (AMP-PNP). Další nukleotidové trifosfáty GTP nebo UTP mohou Mg-ATP částečně nahradit, ne však anorganický pyrofosfát (PP).
2. Nezávislost na pH gradientu mezi vakuolou a cytolem ( $\Delta pH$ ) nebo rozdílu membránových potenciálů ( $\Delta \psi$ ), obojí udržované pomocí V-ATPase a/nebo V-PPase. Přidání protonoforových, ionoforových nebo  $H^+$ -fosfohydrolázových inhibitorů neovlivňuje transportní charakteristiky GS-X pump.

3. Vysoká sensitivita k inhibitoru *ortho*-vanadátu již v mikromolárních koncentracích. Mezi nukleotidovou doménou a *ortho*-vanadátem se vytváří ireversibilní kovalentní vazba.

MDR, MRP a PDR jsou tři nejvíce studované podskupiny transportérů, z celkových dvanácti skupin. Jenom v *Arabidopsis* tvoří tyto plnohodnotné transportéry 40 % všech ABC proteinů (Schulz a Kolukisaoglu, 2006).

Obr. 14. Schéma mechanismu transportu ABC transportérem. (Linton a Higgins, 2006)



### 3.5.1.1. PDR (pleiotropic drug resistance) podskupina ABC transportérů

PDR ABC transportéry jsou zvláštní tím, že se nacházejí pouze v rostlinách a houbách (Crouzet *et al.*, 2006). *Arabidopsis* obsahuje 15 PDR členů (Sánchez-Fernández *et al.*, 2001a; Martinoia *et al.*, 2002; van den Brûle a Smart 2002), zatímco *Oryza* 23 členů (Garcia *et al.*, 2004), což je zajímavé vzhledem k přibližně stejnému celkovému počtu ABC transportérů (128 v rýži a 127 v *Arabidopsis*) (Garcia *et al.*, 2004). První PDR transportér byl identifikován v *Sacharomyces cerevisiae* (Decottignies a Goffeau, 1997; Bauer *et al.*, 1999) a je zodpovědný za transport celé řady látek, např. antifungálních a protirakovinných (Rogers *et al.*, 2001). První rostlinný PDR transportér, SpTUR2, byl izolován ze *Spirodella polyrrhiza*. Exprese tohoto genu je indukována kyselinou abscisovou a solným nebo chladovým stresem (Smart a Fleming, 1996; van den Brûle a Smart, 2002). Abiotickým stresem je indukován i OsPDR9 izolovaný z rýže (Moons, 2003). *Arabidopsis* AtPDR12 se podílí na resistenci rostliny k olovu (Lee *et al.*, 2005). Mechanismus této detoxifikace se zdá být nezávislý na glutathionu. NpABC1 izolovaný z *Nicotiana plumbaginifolia* transportuje zejména antimikrobní diterpen sclareol (Jasinski *et al.*, 2001). Všechny zmíněné příklady rostlinných PDR transportérů naznačují, že plasmatický PDR transportér se v rostlinách může uplatňovat jako exkretor sekundárních metabolitů ve smyslu detoxifikace systému a mobilizace obranných mechanismů.

### 3.5.1.2. MRP (multidrug resistance-associated protein) podskupina ABC transportérů

V *Arabidopsis* je známo 15 MRP transportérů z nichž AtMRP1-5 jsou nejvíce prostudovány. Je známa jejich genomová i cDNA, byly mapovány na chromosomech a funkčně expresovány v kvasinkách (Rea, 1999). AtMRP5 hraje roli v transportu auxinu a podílí se tak na vývoji

rostliny (Lee, 2004), dále v otvírání stomatálních průduchů (Klein *et al.*, 2003) a je regulátorem iontových kanálů (Gaedeke *et al.*, 2001). Významně se podílí na toleranci k solnému stresu a na inhibici růstu kořenů v důsledku tohoto stresu. (Lee, 2004). Vyřazení AtMRP4 z funkce disreguluje stomatální transpiraci a zvyšuje tak odolnost k suchu (Klein, 2004). AtMRP2 transportuje glutathionové konjugáty (GS-X), katabolity chlorofylu (Lu, 1998) a glukuronidové konjugáty (Liu, 2001). Bylo dokázáno, že glutathionové konjugáty (Li *et al.*, 1995a; Matinoia *et al.*, 1993), kyselina žlučová (Hörtensteiner *et al.*, 1993), katabolity chlorofylu (Hinder *et al.*, 1996) a herbicidy konjugované s glukózou (Klein, 1996) jsou transportovány přes tonoplast specifickým energeticky závislým mechanismem. Rea ve svém review 1999 vyvozuje závěr, že vakuolární glutathion-konjugátová pumpa (GS-X pumpa) patří do skupiny ABC transportérů. Díky svým funkčním charakteristikám a příbuznosti se skupinou lidských transportérů (Ishikawa, 1992) se pravděpodobně řadí do MRP podskupiny. GS-X pumpa je lokalizována převážně v tonoplastu (Coleman *et al.*, 1997; Swanson *et al.*, 1998; Theodoulou *et al.*, 1998) a transportuje (cytotoxické) látky z cytosolu do vakuol buď jako takové nebo častěji po konjugaci. Tento detoxifikační proces má čtyři fáze (Ishikawa, 1992; Kreuz *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1997):

- **I/ Aktivace;** kdy dochází k vystavení funkčních skupin cytotoxických látek nebo k oxidačním, hydroxylačním aj. reakcím způsobujícím aktivaci látky pro fázi II,
- **II/ Konjugace;** při které dochází k reakci aktivovaného derivátu s glutathionem (u rostlin a živočichů), glukózou (rostliny), glukuronovou kyselinou (živočichové a pravděpodobně některé rostliny) a sulfáty (živočichové) pomocí specifických enzymů glutathion-S-transferázy, UDP: glukosyltransferázy, UDP: glukuronyltransferázy a sulfotransferázy,
- **III/ Eliminace;** transport konjugátu do intracelulárního kompartmentu a/nebo do extracelulárního prostoru,

- **IV/ Transformace;** proces zodpovědný za další substituce, degradace nebo přetvoření látek do netransportovatelné podoby.

Konkrétní příklady látek transportovaných ABC (MRP) transportéry přes tonoplast jsou: glutathionované antokyany a isoflavonoidy (Marrs, 1995; Li *et al.*, 1997), glukuronidované flavony (Klein *et al.*, 2001, 2000), 17- $\beta$ - estradiol glukuronid (Klein *et al.*, 1998), kyselina žlučová (taurocholát) (Hörtensteiner *et al.*, 1993), katabolit chlorofylu z *Brassica napus* (Lu *et al.*, 1998), flavonoid saponarin (Frangne *et al.*, 2002), fytoalexin medicarpin (Li *et al.*, 1997), sulfonované látky (Klein *et al.*, 1997), glutathion-*trans*-skořicová kyselina (Heather *et al.*, 2000) a další glutathionované látky (Martinoia, 1993; Li *et al.*, 1995a, b; Blake-Kalff a Coleman, 1996; Tommasini *et al.*, 1998).

### 3.5.1.3. MDR (multidrug resistance) podskupina ABC transportérů

Rostlinné MDR ABC transportéry vykazují homologii s živočišnými P-glykoproteiny v primární sekvenci, odhadované topologii a doménové organizaci. Vzhledem ke skutečnosti, že rostlinné látky jako je vinkristin a taxol jsou výtečnými substráty pro živočišné MDR proteiny, předpokládá se význam MDR transportérů pro rostliny při syntéze a kompartmentizaci sekundárních metabolitů. Nicméně odhady substrátové specifity jsou mnohdy zavádějící, jelikož bylo dokázáno, že změnou pouze jedné aminokyseliny v polypeptidovém řetězci se radikálně změní substrátové preference transportéru (Teodoulou, 2000). Takto lidský MDR1 transportuje cytotoxické látky z buněk a funguje jako kanálový regulátor (Higgins, 1995), zatímco MDR2 translokuje fosfolipidy (Smit *et al.*, 1993; Ruetz a Gros, 1994). Vůbec první ABC transportér nalezený v rostlinách, AtMDR1 z *Arabidopsis*, je zapojen do prodlužování buněk hypokotylu v závislosti na světle, transportu auxinu a pravděpodobně transportuje peptidové hormony z růstových vrcholů (Sidler *et al.*, 1998).

AtPGP4 se také podílí na vývoji rostliny prostřednictvím transportu auxinu (Santelia *et al.*, 2005). V pšenici se nachází typ MDR transportéru, jehož exprese v kořenech je indukována hliníkem (Sasaki *et al.*, 2002). V *Coptis japonica* byl nalezen MDR homolog k AtMDR11 z *Arabidopsis* schopný transportovat alkaloid berberin.

## CjMDR1

CjMDR1 byl izolován z produkčních buněčných linií *Coptis japonica* (Yazaki, 2001) a je zatím prvním popsáným členem ABC transportérů, který translokují alkaloidy. Navíc nemá širokou substrátovou specifitu jako jiné ABC transportéry, ale rozpoznává pouze alkaloid berberin, jeho prekurzor retikulin a blízký derivát 4-nitrochinolin N-oxid (Shitan *et al.*, 2003). *C. japonica* je poměrně hodně studovaná asijská rostlina z čeledi *Ranunculaceae*. V dnešní době tvoří vedle buněčných kultur tisu druhý *in vitro* systém schopný produkovat alkaloid(y) v průmyslovém měřítku (Ketchum *et al.*, 1999; Kutchan, 1995; Verpoorte *et al.*, 1991, 1999; Zenk *et al.*, 1988). Hlavním alkaloidem produkovaným rostlinou *Coptis japonica* je intenzivně žlutý benzylochinolinový alkaloid berberin. V roce 1995 měl berberin jako první alkaloid plně popsanou biosyntetickou cestu na enzymové úrovni (Zenk, 1995). Berberin se používá od nepaměti v čínské medicíně a indické ajurvédě (Santhyavanti *et al.*, 1987). Tradičně je používán jako antimalarikum a antibakteriologikum (Yamamoto *et al.*, 1993; Iwsa *et al.*, 1998). V poslední době byly objeveny i další farmakologické efekty berberinu jako je protiprůjmový (Taylor a Baird, 1995; Yamamoto *et al.*, 1993), protizánětlivý (Iizuka *et al.*, 2000), antiarytmický (Lau *et al.*, 2001), cholesterol snižující (Doggrell, 2005), expektorační (Lee *et al.*, 2003) a protirakovinový. Lin *et al.* (2004) předpokládají, že berberin vykazuje aktivitu proti leukémii a hepatocelulárnímu karcinomu, zatímco Wang *et al.* (2004) poukazují na negativní efekt berberinu na angiogenezi. *In vitro* vykazuje berberin silný cytotoxický efekt na prokaryotní i eukaryotní buňky inhibicí proteosyntézy a syntézy DNA (Ghosh *et al.*,

1985). Experimenty s *Lithospermum erythrorhizon* a *Nicotiana tabacum* naznačují toxicitu berberinu k jiným rostlinným druhům, zatímco u berberin produkujících druhů nemá tento alkaloid žádný cytotoxický efekt (Sakai, 2002).

Zajímavým poznatkem je, že samostatně podaný berberin je v bakteriích rozpoznán membránovým MDR transportérem a vylučován, což snižuje jeho celkovou účinnost. Pokud je však podán extrakt z berberin produkující rostliny, účinnost alkaloidu se rapidně zvyšuje. Stermitz *et al.* (2000) dokazují, že berberin produkující druhy (např. *Berberis fremontii*) syntetizují vedle berberinu i MDR inhibitor, 5'-methoxyhydnocarpin, který zvyšuje efektivitu tohoto alkaloidu.

CjMDR1 je lokalizovaný v plasmatické membráně *C. japonica* a funguje jako influxní transportér (Shitan *et al.*, 2003). To je u eukaryot novinka, dosud byl influx substrátu ABC transportéry rozpoznán pouze u prokaryot (Higgins, 2001). Překvapivě v *Thalictrum minus* byl nalezen plasmatický MDR transportér vykazující vysokou úroveň shody s CjMDR1, který je také schopen translokovat berberin, ale v opačném směru, tj. ven z buňky (Terasaka *et al.*, 2003). Jelikož syntéza berberinu v *Coptis japonica* se uskutečňuje v kořenech a produkt je uskladněn v oddencích, podílí se CjMDR1 zejména na transportu berberinu mezi těmito tkáněmi (Shitan *et al.*, 2003). Subcelulárně se berberin ukládá do vakuol. V transportu přes *Coptis* tonoplast ovšem berberin místo ABC transportéru upřednostňuje H<sup>+</sup>-berberin antiporter (Otani *et al.*, 2005). Tato skutečnost by byla v souladu s jednou z teorií, že ABC transportéry v tonoplastu (glutathionové pumpy) detoxifikují cytoplasmu transportem (konjugovaných) toxických látek do „odpadních“ vakuol. Pro *Coptis* však berberin není ani cizí látkou ani nepůsobí toxicky, tudíž tonoplastové ABC transportéry nejsou k jeho transportu do vakuol zapojeny.

V lidských buňkách berberin interaguje s P-glykoproteinem, kompetuje o tento transportér s jinými léčivy, např. paclitaxelem, up-reguluje expresi MDR1 a moduluje jeho funkci (Lin *et*

*al.*, 1999). Lidský MDR1 stejně jako MRP1 rozpoznává berberin jako svůj substrát (Shitan *et al.*, 2007).

Z uvedených dat vyplývá, že berberin je příkladem látky rozpoznávané ABC transportéry u lidí, rostlin i bakterií. Navíc byla z *Coptis japonica* izolovaná cDNA ABC transportéru, kterému je berberin exklusivním substrátem. Tyto skutečnosti jsou výzvou pro modelové studie transportu v rostlinných systémech.

### 3.6. Strategie zvýšení produkce sekundárních metabolitů

Alkaloidy izolované z rostlinných zdrojů představují zdroj farmakologicky aktivních látek. Biologické účinky vyvolané alkaloidy vedly k jejich využití jako jedů, stimulantů, léčiv a narkotik. Významnými léčivy rostlinného původu jsou např. analgetikum morfin, myorelaxans tubocurarin, antiarytmikum ajmalicin nebo chemoterapeutika vinblastin a taxol (Facchini, 2001). Obecným problémem v získávání sekundárních metabolitů je jejich nízký obsah v matečných rostlinách což prodražuje komerční produkci. Alternativní metody produkce sekundárních metabolitů zůstávají až na výjimky prakticky nevyužitelné. Chemická syntéza sekundárních metabolitů je díky mnohonásobným chirálním centřům prohibičně drahá a semisyntéza za použití alternativních systémů jako jsou mikroorganismy skoro nemožná kvůli velkému počtu biosyntetických kroků včetně těch co ještě nejsou v rostlinách dostatečně popsány nebo vůbec odhaleny (Verpoorte *et al.*, 1991). Veliké naděje byly vkládány do buněčných nebo tkáňových rostlinných kultur. Tyto systémy využívají skutečnosti, že každá jednotlivá rostlinná buňka má potenciál regenerovat plnohodnotnou diferencovanou rostlinu. Tomuto jevu se říká totipotence a je jak morfologická (Steward *et al.*, 1964; Takebe *et al.*, 1971), tak chemická (Zenk *et al.*, 1975). Rostlinný tkáňový systém *in vitro* je imunní vůči vnějším vlivům jako je např. klima, patogeny, predátoři, limitace



přirozeným prostředím a pomalý růst v plošně pěstovaných kulturách. V praxi se však ukázalo, že i přes snahu vědců optimalizovat podmínky pro pěstování tkáňových kultur, převádět kultury do průmyslových měřitek a studovat elicitací procesy, hladiny sledovaných alkaloidů jsou ve většině případů nižší, nebo vůbec nedetekovatelné oproti kontrolním intaktním rostlinám (Hughes a Shanks, 2002). Za zmínku stojí dvě úspěšné výjimky: produkce alkaloidů berberinu kulturou *Coptis japonica* a paklitaxelu buňkami rodu *Taxus* (Ketchum *et al.*, 1999; Kutchan, 1995; Verpoorte *et al.*, 1991, 1999; Zenk *et al.*, 1988).

Metabolické inženýrství zacílené na ovlivnění produkce zejména alkaloidů, ale i dalších sekundárních metabolitů, je velice dynamickou disciplínou (Kutchan, 2005; Sato *et al.*, 2001; Hughes a Shanks, 2002; Kunze *et al.*, 2002; Yazaki, 2005; Memelink, 2005; Gantet a Memelink, 2002; Memelink *et al.*, 2001). V poslední době bylo dosaženo mnoha úspěchů při charakterizaci biosyntetických cest vedoucích k různým alkaloidům a některé klíčové geny byly klonovány. Díky technologiím genového inženýrství můžeme tyto izolované geny využít ke studiu zlepšení produkce sekundárních metabolitů buněčnými či tkáňovými kulturami nebo celou intaktní rostlinou.

### 3.7. Genové inženýrství

Život závisí na schopnosti buněk uchovávat, třídit a překládat genetickou informaci, která je potřebná k vytvoření a udržení živého organismu. Při buněčném dělení přechází tato dědičná informace z mateřské buňky do dceřiné a u organismů je přenášena z generace na generaci pohlavními buňkami (gametami). Tato informace je uložena v každé živé buňce v podobě genů-základních jednotek, které určují vlastnosti jak jednotlivce, tak celého druhu.

První důkazy, že geny jsou tvořeny **DNA**, pocházejí z roku 1944. Přesto biologové považovali DNA za genetický materiál s velikými výhradami a to zejména kvůli její chemické

jednoduchosti. Jedná se totiž o polymer složený z jednotek fosfátovaného cukru deoxyribózy s navázanými dusíkatými bázemi (adenin, cytosin, guanin, thymin). Pochybnosti utichly v roce 1953 kdy Watson a Crick sestavili model dvouvláknové struktury DNA stočené do šroubovice (Alberts *et al.*, 1998).

Dalším objevem, který byl spolu s rozvojem bakteriální genetiky nutným stavebním blokem vědní disciplíny nazývané genové inženýrství, je rozluštění genetického kódu v šedesátých letech. **Genetický kód** je soubor pravidel podle kterých tři po sobě jdoucí nukleotidy v řetězci nukleové kyseliny určují jednu aminokyselinu, která je poté zabudována do vznikajícího polypeptidového řetězce.

Jedním z nejpodstatnějších objevů molekulární biologie byl objev restričních enzymů následovaný objevem celé řady dalších enzymů umožňujících nový typ práce s DNA. Příkladem je třeba uvést ligázy, které jsou schopné spojovat úseky DNA, dále DNA-polymerázy, DNázy, které degradují DNA, reverzní transkriptázy, které syntetizují DNA podle vlákna RNA a již zmiňované restriční endonukleázy. **Restriční endonukleázy** jsou bakteriální obranné enzymy, které chrání bakterii před cizorodou DNA, *de facto* před bakteriofágy. Za normálních okolností je vlastní bakteriální DNA „označena“ metylacemi některých bazí v přesně definovaných místech. Za toto značení je zodpovědný enzym modifikační metyláza. Druhý enzym, restriční endonukleáza, kontroluje přesně definované sekvence DNA a pokud není metylována báze která má být, způsobí tento enzym dvojvláknový zlom. Tento zlom se děje mezi konkrétními pořadími bazí. Každý bakteriální kmen má svůj vlastní modifikačně-restriční systém odlišný od systémů ostatních bakterií. Restriční endonukleázy jednotlivých kmenů lze izolovat a používat ke štěpení libovolné izolované DNA na specifických místech (Ondřej a Drobník, 2002). Restriční enzymy používané v molekulární biologii obvykle rozpoznávají krátké sekvence DNA (4-8 nukleotidových párů), což zaručuje vysokou pravděpodobnost, že se taková místa náhodně

vyskytnou v každé delší molekule DNA. Po štěpení získáme tedy sadu fragmentů, které lze dále analyzovat např. pomocí **gelové elektroforézy** v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Principem gelové elektroforézy je migrace fragmentů gelem ke kladné elektrodě a jejich separace na základě velikosti-délky fragmentu. Tu lze stanovit porovnáním s vhodným standardem. Rozdělené fragmenty je možno vizualizovat (např. pomocí ethidium bromidu) a jednotlivě eluovat z gelu.

Dalším pilířem rozvoje genového inženýrství je studium a následné využití potenciálu plasmidů. **Plasmid** je malá dvojvláknová molekula bakteriální DNA, která je oddělená od velkého bakteriálního chromosomu. Má svůj vlastní replikační počátek a může se tedy replikovat nezávisle na bakteriálním chromosomu. Plasmidů existuje mnoho různých druhů a vyskytují se u mnoha různých bakteriálních druhů. Pro potřeby genového inženýrství bylo nutno přírodní plasmidy upravit tak, aby byly co nejmenší, aby měly více genů pro resistenci k antibiotikům a aby měly tzv. unikátní, tj. v celém plasmidu jen jednou přítomná restrikční místa. Naštěpením plasmidu v unikátním místě je možno do něj včlenit další úsek DNA ukončený stejnými restrikčními místy a kruhovou strukturu obnovit pomocí enzymu ligázy.

Díky nalezení účinné techniky transformace bakterie *E. coli* počátkem sedmdesátých let je možné uměle vytvořené plasmidy vnášet do bakterií, tam namnožit v libovolném počtu kopií a poté dále využívat.

Významnou zbraní v rukou molekulárních biologů je metoda **PCR** (Polymerase Chain Reaction). Touto metodou lze amlifikovat libovolné úseky DNA na principu denaturace a renaturace DNA v kombinaci se syntézou DNA katalyzovanou specifickou DNA-polymerázou (*Taq*-polymerázou izolovanou z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, tudíž odolnou k vysoké teplotě). Amplifikace se děje ve zhruba 30-50 cyklech, kdy se rychle opakují teploty 92 °C (denaturace), 42 °C (navázání primerů) a 72 °C (optimální teplota pro aktivitu *Taq*-polymerázy, syntéza nové DNA).

K rapidnímu rozvoji genetických věd přispívají i další významné techniky jako je například Southernův a Northernův přenos, metodika konstrukce genomových knihoven, metody transgenozy a jiné. Genetické inženýrství je velice živá a rychle se rozvíjející disciplína přesahující svým významem z biologických do politicko etických rozměrů - viz vášnivě debatované geneticky modifikované organismy (<http://www.greenpeace.org/international/>, Uher, 1999; Ondřej a Drobník, 2002; ).

### 3.7.1. Transgenozy rostlin

První informace o vnášení cizorodé DNA do buněk eukaryot se začínají v literatuře objevovat od šedesátých let. Určit první studii o transgenozě je však obtížné jelikož tehdejší techniky molekulární genetiky neumožňovaly s jistotou určit, zda se jedná o integraci cizorodé DNA. V roce 1977 bylo jednoznačně prokázáno, že půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* vnáší svou DNA do rostlinného genomu (Chilton *et al.*, 1977). Cílené dědičné změny eukaryotních buněk, ke kterým dochází při působení exogenní DNA, bylo nutné nazývat jiným termínem než transformace, který byl vyhrazený pro vnášení DNA do bakterií. Navíc při transformaci bakterií jsou mechanismy pronikání do buněk a integrace do chromosomů jiné než u eukaryot. Nicméně mnohá literatura termíny transformace a transgenozy zaměňuje.

**Transientní** neboli dočasná **exprese** je exprese signálního transgeny vzniklá v důsledku většího proniknutí T-DNA do buněčných jader. Dříve, než se T-DNA stačí integrovat do genomu nebo je degradována nukleázami, dochází k expresi. Tato trvá většinou krátce - několik následujících dní. Obvykle je používáno reportérového genu GUS (pro  $\beta$ -glukuronidázu) nebo GFP (Green Florescent Protein).

Výhodou transientní exprese je, mimo jiných, že výsledek informující o účinnosti metody transgenozy je dostupný během několika hodin až dní. Z pokusů vyplynulo, že transientní

exprese je mnohem intenzivnější než exprese běžně dosahována po integraci transgenů (Ondřej a Drobník, 2002).

Přehled technik transgenozie a jejich výhody i nevýhody jsou v tabulce č. 2, inspirované z Hallard (2000).

### **Bombardování mikroprojektily. Biolistická metoda.**

Biolistická metoda – (biologie + balistika). Metodika doručení cizorodé DNA do jádra buňky ve formě mikročástic kovu na jehož povrchu je navázána DNA je poměrně mladou technikou (Klein *et al.*, 1987). Částičky zlata nebo wolframu o průměru okolo 4  $\mu\text{m}$ , s navázanou DNA, jsou akcelerovány do vakua za pulsového přetlaku helia, směrem k cílovému materiálu - vrstvě buněčné kultury nebo jinému buněčnému materiálu (Sanford *et al.*, 1987). Technika mikroprojektilového bombardování je relativně dobře definovaná, široce použitelná, má své výhody oproti ostatním metodám transgenozie (Klein *et al.*, 1987; Maliga 2001; Ye *et al.*, 1990) a v literatuře se vyskytuje mnoho zpráv o úspěšné transgenozii touto technikou. A to i přesto, že bylo zjištěno, že u zasažených buněk pouhých 5 % mikroprojektilů pronikne do buněčného jádra z nichž většina (98-99 %) do 48 hodin umírá. Pokud jsou splněny obě podmínky, tj. mikroprojektil zasáhne buněčné jádro a buňka zásah přežije, frekvence integrací je vysoká. Například u tabáku je to 10-100 kalusů resistantních ke kanamycinu na výstřel. U jiných objektů bývá menší (Ondřej a Drobník, 2002).

Vedle důležitých cílů transgenozie rostlin jako jsou zvýšení odolnosti rostlin proti škůdcům a nákazám, nebo zlepšení kvality potravin či krmiv, stojí neméně podstatný význam transgenozie v ovlivnění produkce metabolitů. „**Metabolic engineering**“ je podle Bailey (1991) „zlepšení buněčných aktivit díky manipulaci enzymů, transportu a regulačních funkcí

buňky za použití rekombinantních DNA technologií“. Zlepšení produkce metabolitů využitelných jako léčiva, barviva, aromata nebo chuťová korigencia je v centru ekonomického zájmu. Například v *Hyoscyamus muticus* expresována hyoscyamin-6- $\beta$ -hydroxyláza vedla k 100násobně vyšší produkci skopolaminu oproti kontrolní kultuře (Jouhikainen *et al.*, 1999). Díky expresi striktosidin syntázy v katarantu růžovém se zvedla produkce terpenových indolových alkaloidů na 200 mg.l<sup>-1</sup> (Canel *et al.*, 1998). Stejně tak heterologní exprese tryptofan dekarboxylázy v tabáku způsobovala zvýšenou produkci tryptaminu (Songstad *et al.*, 1990). Tryptamin může fungovat jako látka snižující reproduktivitu hmyzu u transgenního tabáku (Thomas *et al.*, 1995) nebo petunií (Thomas *et al.*, 1999).

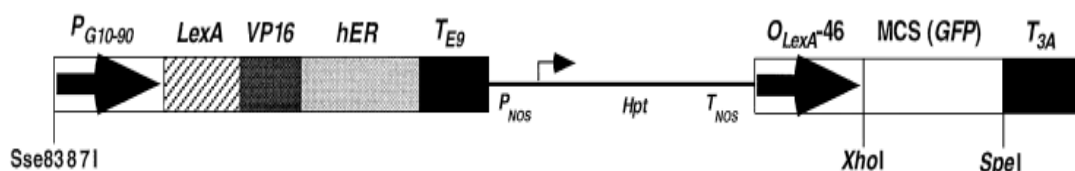
Problémem stability či spíše nestability transgenních systémů se zabývá Meyer (1998), efekt utichání signálu je řešen v Lessard *et al.* (2002). U geneticky modifikovaných rostlin často dochází k následujícím jevům

- Transgeny nejsou expresovány a/nebo exprese postupně utichá.
- Transgeny mohou způsobit „silencing“ (utichání) exprese příbuzných endogenních genů.
- Transgeny mohou stimulovat expresi dalšího či dalších genů (prostřednictvím svého produktu, proteinu).

Plasmid pER8 (XVE systém) patří do skupiny plasmidů s **chemicky kontrolovatelnou expresí transgenů**. Tím, že k expresi transgenů dochází pouze po indukci transgenního systému danou látkou (v tomto případě estradiolem), předchází se výše zmiňovaným negativním jevům projevujícím se u **konstitutivní exprese** transgenů. Další výhodou je možnost studia funkce transgenů jejichž exprese je za normálních okolností vývojově nebo tkáňově regulovaná. Také geny jejichž produkty jsou pro buňku toxické až letální je možné studovat díky inducibilním systémům.

V praxi to znamená, že transgenní rostlinný systém se fenotypově chová jako netransgenní, divoká kultura, a teprve když je exprese žádoucí, spustí se přidáním mikromolárního množství estradiolu (Zuo *et al.*, 2000). Estradiol spolu s transkripčním faktorem (X) a transkripční aktivační doménou (V) vytvoří komplex, který funguje jako promotorový regulátor, spouštěč transkripce (viz obr. 15). Výhodou je také řízená exprese v určitém stádiu vývoje rostliny, a/nebo po volitelnou dobu. Potenciál a výhody chemicky indukovatelných promoterů oproti konstitutivním promoterům jsou shrnuty například v review Gatz (1997), Gatz a Lenk (1998), Zuo a Chua (2000) a Moore *et al.* (2006).

Obr. 15. Schématický diagram XVE vektoru (Zuo *et al.*, 2000)



$P_{G10-90}$ , synthetický promoter (Ishige *et al.*, 1999) kontrolující XVE; XVE, DNA sekvence kodující chimerní transkripční faktor obsahující “DNA-binding” doménu z bakteriálního represoru LexA (residua 1-87), transkripční aktivační doména VP16 (residua 403-479) a regulační oblast lidského estrogenního receptoru (residua 282-595);  $T_{E9}$ , rbcS E9 poly (A) addition sequence;  $P_{nos}$ , nopalín syntázový promoter; *Hpt*, hygromycin fosfotransferáza II kódující sekvence;  $T_{nos}$ , nopalín syntáza poly (A) addition sequence;  $O_{LexA}$ , osm kopií LexA operátorové sekvence; -46, -46 35S minimální promoter; MCS, multiple cloning sites pro cílový gen;  $T_{3A}$ , rbcS3A poly (A) addition sequence. Šipky indikují směr transkripce.

Tab. č. 2

	<b>Princip</b>	<b>Nevýhody</b>	<b>Výhody</b>
<i>A. tumefaciens</i>	Přenos modifikované DNA do rostlinného genomu kokultivací	-příprava konstruktů -limitovaná citlivost -hypersensitivity (tkáňové nekrózy...)	-nízký počet kopií -stabilní integrace -intaktní DNA -jednoduché pro mnohanásobné (neselektovatelné) geny
<i>A. rhizogenes</i>	Přenos modifikované DNA do rostlinného genomu kokultivací	Jako <i>A. tumefaciens</i>	Jako <i>A. tumefaciens</i> -vlasové kořínky -regenerace
(vakuová) infiltrace	Namáčení květů v bakteriální suspenzi	Jako <i>A. tumefaciens</i> -úspěšnost 1-6 % -vysoký počet semen	Jako <i>A. tumefaciens</i> -transgenní semena
SAAT	Tvoří malé uniformní trhlinky a kanálky v tkáni	Jako <i>A. tumefaciens</i> -optimalizace procedury	Jako <i>A. tumefaciens</i> -meristematické tkáně -zvýšená úspěšnost
Bombardování mikroprojektily	Přenos DNA pomocí vysokorychlostních mikroprojektílů	-nestabilita (organizace transgenů a efekt pozice ovlivňující okolí) -několik kopií genu -geny nejsou intaktní -složitě pro mnohanásobné geny (vyžaduje selekci a má nízkou úspěšnost)	-zacílení do genomu plastidů a mitochondrií -žádná limitace matečného materiálu -žádná hypersensitivita -regenerace -odstranění vnášení plasmidu -transientní exprese
PEG	Zvýšení propustnosti membrány díky změnám povrchového napětí	-potřeba protoplastů -5 % úspěšnost -optimalizace (molekulární hmotnost a koncentrace PEG, doba expozice)	-žádná limitace matečného materiálu -plastomové transformace
Elektroporace	Dočasné póry v plasmatické membráně díky elektrickému poli	-(protoplast) -0,5 – 1 % úspěšnost -optimalizace procedury	-při studii transientní exprese -žádná limitace matečného materiálu
Mikroinjekce	Přímo do cytoplasmy mikrojehlou	-20 % úspěšnost -individuální protoplast -laboratorní metoda	
Makroinjekce	Přímo do cytoplasmy jehlou	-individuální rostlina	-rychlá a levná metoda
Vlákna křemíkového karbidu	Míchání rostlinných buněk se silikonovými karbidy a DNA	-optimalizace procedury -bezpečnost práce	-rychlá a levná metoda

SAAT - sonicated-associated *Agrobacterium*-mediated transformation

PEG - polyetylen glykol



## **4. Materiál a metody**

#### 4.1. Rostlinný materiál

Pro transportní experimenty byla používána dlouhodobě udržovaná suspenzní tkáňová kultura *Catharanthus roseus*, linie CRPM. Tato linie neprodukuje žádné sekundární metabolity *in vitro*, zato vykazuje masivní nárůst biomasy během jednoho pasážovacího cyklu a ukázala se jako nejefektivnější linie pro izolaci vakuol (Restrepo, 2004). Tato tkáňová kultura byla udržovaná v 250 ml Erlenmayerových baňkách. Každý sedmý bylo den inokulováno 100 ml suspenzní kultury do 100 ml čerstvého živného media MS 58. Kultivace probíhala za stálého osvětlení o intenzitě 2800 Luxů a teplotě  $25 \pm 1$  °C na stolové třepačce (105 rpm).

Živné medium MS-58 podle Murashigeho a Skooga (Murashige a Skoog, 1962):

KNO <sub>3</sub> (Merck, Německo)	1 900,00 mg.l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (OPG Farma, Nizozemí)	370,00 mg.l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (Sigma, Německo)	440,00 mg.l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Merck, Německo)	1 650,00 mg.l <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, Německo)	170,00 mg.l <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck, Německo)	16,90 mg.l <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Merck, Německo)	6,20 mg.l <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck, Německo)	8,60 mg.l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA (Duchefa, Nizozemí)	37,30 mg.l <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Acros Organic, Belgie)	27,80 mg.l <sup>-1</sup>
KI (Duchefa, Nizozemí)	4,15 mg.l <sup>-1</sup>
NaMoO <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O (Merck, Německo)	1,25 mg.l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (Merck, Německo)	0,125 mg.l <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (Acros Organic, Belgie)	0,125 mg.l <sup>-1</sup>
Myoinositol (Duchefa, Nizozemí)	100,00 mg.l <sup>-1</sup>

Thiamin hydrochlorid (Acros organic, Belgie)	0,40 mg.l <sup>-1</sup>
NAA (Duchefa, Nizozemí)	2,00 mg.l <sup>-1</sup>
Kinetin (Duchefa, Nizozemí)	0,20 mg.l <sup>-1</sup>
Glukóza (Fluka, Německo)	20 000,00 mg.l <sup>-1</sup>
pH	5,75-5,85

Pro transgenní experimenty byla použita linie CATL *Catharanthus roseus*, která je každým rokem regenerována technikem ze zásobního zdroje kalusu *Catharanthus roseus*. První část experimentu je vypracována na CATL04 linii a poslední na CATL06 linii. Byla snaha pracovat pořád s linií CATL04, ale tato postupem času ztrácí ochotu regenerace (viz dále), která je hlavním bodem selekce transgenních linií po bombardování mikroprojektily.

Linie CATL je udržována v 250 ml Erlenmayerových baňkách s 50 ml živného média LS-13 do kterého je každý sedmý den inokulováno 7-10 ml tkáňové kultury. Kultivace probíhá na stolových třepačkách (120 rpm) za fotoperiody 16 hod světlo o intenzitě 2800 Luxů, 8 hod tma, teplotě 25 ±1 °C a relativní vlhkosti 50 %.

Živné medium LS-13 podle Linsmaiera a Skooga (Linsmaier a Skoog, 1965), dodavatelé viz medium MS-58:

KNO <sub>3</sub>	1 900,00 mg.l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,00 mg.l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,00 mg.l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650,00 mg.l <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	16,90 mg.l <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20 mg.l <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60 mg.l <sup>-1</sup>

NaFeEDTA.H <sub>2</sub> O	38,50 mg.l <sup>-1</sup>
KI	0,83 mg.l <sup>-1</sup>
NaMoO <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25 mg.l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025 mg.l <sup>-1</sup>
CoCl.6H <sub>2</sub> O	0,025 mg.l <sup>-1</sup>
Myoinositol	100,00 mg.l <sup>-1</sup>
Thiamin hydrochlorid	0,40 mg.l <sup>-1</sup>
NAA	2,00 mg.l <sup>-1</sup>
Kinetin	0,20 mg.l <sup>-1</sup>
Sacharóza	30 000,00 mg.l <sup>-1</sup>
pH	5,80-5,85

LS-13 medium zpevněné agarem obsahuje 7 g agaru na litr media.

Media byla autoklavována při 120 °C a tlaku 0,1 MPa po dobu 20 min. Zásobní medium bylo uchováváno v temnu při 4 °C.

## 4.2. Chemikálie

berberin chlorid, Fluka (Švýcarsko)

sekologanin, Phytoconsult (Nizozemsko)

katarantin, serpentin, tetrahydroalstonin (připraveny na katedře farmakognosie, Leidenská univerzita, Nizozemsko)

ajmalicin hydrochlorid, mannitol, bafilomycin A1 ze *Streptomyces griseus*, carbonyl kyanid *m*-chlorofenylhydrazone (CCCP), *N,N'*-dicyklohexyl karbodiimid (DCCD), Ficoll 400, glukóza, Fluka Buchs (Německo)

probenecid, 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina (HEPES), verapamil, valinomycin, *ortho*-vanadát, cyclosporin A, gramicidin, adenosin 5'-trifosfát hořečnatá sůl (Mg-ATP), redukovaný glutation (GSH), ethidium bromát, bromfenolová modř,  $\beta$ -merkaptoetanol, Sigma St.Louis, MO (USA)

silikonový olej AR-200, Wacker Burghausen (Německo)

celuláza "Onozuka R-10" z *Trichoderma viridae*, Serva Heidelberg (Německo)

macerozyme R-10, Yakult Tokyo (Japonsko)

kyanid draselný, chlorid amonný, chlorid sodný, chlorid draselný, fenol, kyselina boritá, glycin, acetát sodný, EDTA Titriplex, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, LiCl, NaOH, Formamid, chloroform, Formaldehyd 37 %, glycerin, sorbitol, HNO<sub>3</sub>, Merck Darmstadt (Německo)

glipizid, Acros Organic, New Jersey (USA)

glibenclamid, Tocris Bristol (Velká Británie)

filtrační tkanina Miracloth, Calbiochem (USA)

etanol, metanol, *n*-butanol, acetonitril, Biosolve (Nizozemí)

plastikové zkumavky-, eppendorfy (1,5 a 2 ml), plastikové zkumavky (14 ml a 50 ml), jednorázové nástavce na mikropipety, Sarstedt Nümbrecht (Německo)

sterilní reakční jamky (objem 5 ml, velikost 12 jamek), sterilní jednorázové pipety a petriho misky, Corning Incorporated, NY (USA)

agar, manitol, močovina, kanamycin, gentamycin, spektinomycin, hygromycin, carbenicillin, IPTG, X-Gal, Duchefa (Nizozemí)

Restrikční enzymy, reakční pufry, pGEM-T Easy a další molekulárně biologická reagentia, dATP, dTTP, dGTP, Promega (USA)

„Anti-rabbit IgG antibodies linked to peroxidase“, náhodně značené hexamerové primery, RNáza, DNáza, Roche (Francie)

Oligonukleotidy (primery), Operon (Německo)

$\alpha$ -dCTP ( $^{32}\text{P}$ ), GE Healthcare (UK)

skelná vata silanizovaná, Serva (Německo)

Gel extraction kit, Plasmid midiprep kit, Qiagen GmbH (Německo)

Medical X-ray film, Fuji (Japonsko)

Gene Screen nylon membrane, Perkin-Elmer Life Science Boston (USA)

Protein nitrocellulose membrane, Schleicher&Schuell (Německo)

Developer/Replenisher G150, Agfa (Belgie)

Manual fixing bath G354, Agfa (Belgie)

TEMED, KODAK (USA)

Sephadex G-75, Amersham Biosciences (Švédsko)

Akrylamid, BioRad (USA)

Evansova modř, xylenolová modř, trifluorooctová kyselina,  $\beta$ -estradiol, *p*-hydroxy kumarová kyselina, pektináza, APS, chlorid vápenatý,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , isoamylalkohol, sarkosyl, Sigma (Německo)

Agaróza (pronarosa D-1), Burgos (Španělsko)

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), MOPS, SDS (sodium dodecylsulfát), Tris, MP Biomedicals (Francie)

Bacto-tryptone=Trytone peptone, Bacto peptone, Bacto agar, Beton Dickinson (Francie)

Ficoll 400, Pharmacia (Švédsko)

DNA lososího sperma, Pharmacia Biotech (USA)

Alkalická fosfatáza, Boehring (Německo)

Coomassie Brilliant Blue R-250, Piercenet (USA)

### 4.3. Přístroje

centrifuga Varifuge 3.0R, Heraeus Sepatech, (Německo)  
centrifuga Härmle Minifuge Z 231 M, Härmle GmbH & Co. (Německo)  
HPLC s PDA detektorem Waters 991 a pumpou Waters 600E, Waters (USA)  
analytická kolona (250 x 4,6 mm) Vydac C<sub>18</sub> o velikosti částic 5 μM, Vydac (USA)  
stolová třepačka 500 LX, Philips TL33, Philips (Nizozemí)  
spektrofotometr UV mini 1240, Shimadzu (Čína)  
RNA/DNA calculator Gene Quant pro, Biochrom Ltd. Cambridge (Velká Británie)  
Termoshaker Gerhardt THO 500 (Německo)  
Oven VWR (USA)  
Kamera Bio rad, (Itálie)  
Geigerův počítač, Counter Mini monitor Series 900 (Nizozemí)  
Řezačka IDEAL 1071 (Německo)  
PCR MWG AG Biotech Primus HT (Německo)  
Eppendorf centrifuga 5402, TUV (Německo)  
Centrifuga Multifuge 3 S-R, Kendro (Německo)  
Výřivá míchačka, Fison Scientific Apparatus Limited (Velká Británie)  
Autokláv, Getinge, typ 50/90E (Švédsko)  
Laminární box, Clean Air, typ CLF 690 (Nizozemí)  
Ultrazvuková lázeň, Branson, typ 5510E-MT (Velká Británie)

### 4.4. Metody

#### 4.4.1. Test na toxicitu berberinu pro suspenzní tkáňové kultury *C. roseus*

*Krátkodobá expozice*

Suspenní kultury byly po dobu 30 min vystaveny přítomnosti berberinu v různých koncentracích a přítomnosti samotného rozpouštědla-DMSO, stejně jako dalšího možného rozpouštědla, etanolu 95 %. Spektrofotometrický test byl prováděn podle metody popsané v Turner a Novacky (1974) s lehkými modifikacemi podle Andayani (2001). Jeden gram buněk suspenze byl inkubován 30 min se 3 ml 0,05 % Evansovy modři, zfiltrován, promyt vodou (500 ml) a přenesen do 3 ml roztoku 1:1 metanol:voda, 1 % SDS. Vzorek se 30 min inkuboval na vodní lázni 50 °C a poté byl homogenizován ultra-turax mixérem (150 rpm, 15 sec). Ihned po homogenizaci byl centrifugován (10000 rpm, 5 min) a měřena absorbance supernatantu (600 nm). Vyšší absorbance odpovídá většímu počtu mrtvých buněk ve vzorku (Turner a Novacky, 1974).

#### *Dlouhodobá expozice*

Berberin v různých finálních koncentracích (150 mM, 250 mM, 350 mM) byl přítomen celou růstovou periodu (7 dní). Buňky byly filtrovány, zváženy a jejich nárůst vyjádřen v procentech vztažených na původní navážku. DMSO ve stejném objemu jako zásobní roztok berberinu (1 ml), byl přidán pro kontrolní účely.

#### 4.4.2. Izolace protoplastů a vakuol

Protoplast a následně vakuoly byly izolovány podle metody publikované Blomem (1991b) s lehkými obměnami popsány Roytrakulem (2004). Tkáňová suspenze na konci růstové křivky (sedmý den po pasážování) byla zfiltrována a buňky promyty roztokem 0,5 M manitolu. Buněčná stěna byla enzymaticky rozštěpená roztokem 0,1 % celulózy (w/v), 0,05 % pektinázy (w/v) v 0,5 M roztoku manitolu. Po 3 hodinách inkubace při 25 °C a lehkém třepání se směs zfiltrovala přes vrstvu tkaniny Miracloth. Po centrifugaci (1100 otáček, 10 min, 4 °C) se supernatant dekantoval a protoplast resuspendoval v protoplastovém pufru ( $\pm 200 \mu\text{l}$ ). Samotná izolace vakuol spočívá v jemném promísení protoplastu s roztokem „Ficoll 6,25 %“



(asi 9 ml) a velice opatrném postupném nanesení roztoků „Ficoll 4 % a Ficoll 0 %“ (každého 1 ml). Díky koncentračnímu gradientu se během centrifugace (2000 otáček, 15 min, 4 °C) vakuoly shromáždí ve formě „mraku“ v nejvrchnější vrstvě. Kvalita i kvantita vakuol byla kontrolována pod mikroskopem. Stupeň kontaminace takto získané vakuolové frakce jinými buněčnými organelami byl testován (Roytrakul, 2004), a nevykazuje více než 10 %.

Roztoky:

*Protoplastový pufr* 10 mM HEPES, 0,5 M manitol pH 7,4

*Ficoll 6,25 %* 10 mM HEPES pH 7,4

0,125 M manitol

0,03 % PEG-4000

10 mM EDTA

6,25 % Ficoll 400

*Ficoll 0 %*

10 mM HEPES pH 7,4

150 mM manitol

0,0375 % PEG-4000

5 mM MgCl<sub>2</sub>

*Ficoll 4 %* obsahuje navíc 4 % Ficollu 400

#### 4.4.3. Vakuolový transportní experiment

Transportní experiment byl prováděn olejovou centrifugační technikou popsanou v Kaiser *et al.* (1984) s drobnými obměnami. Alkaloid zájmu (a eventuelní kofaktory transportu) byl v určité koncentraci rozpuštěn v 60ti µl transportního media a inkubován se 40ti µl čerstvě izolovaných vakuol. Tato směs byla ihned překryta 300 µl silikonového oleje AR 200. Jako poslední byla nanesena vrstva 60 µl 0,1 % TFA. Inkubace byla ukončena krátkou centrifugací (30 s) při které se vakuoly díky své nízké hustotě koncentrují ve vrchní vrstvě TFA, kde lyzují a uvolní svůj obsah. Po centrifugaci této odebrané vrstvy (5 min 13 000 rpm) je vzorek připraven na HPLC analýzu. Každý experiment byl prováděn ve třech opakováních, výsledná hodnota je pak průměrem ± S.D.

*Transportní medium:* 23 % (v/v) Ficoll 400  
0,4 M sorbitol  
30 mM KCl  
20 mM Mes/Tris pH 7,2

#### 4.4.4. Buněčný transportní experiment

Suspenzní kultura v polovině růstové křivky (třetí až čtvrtý den po pasážování) byla rozdělena do sterilních reakčních jamek po 3 ml. Suspenze byla důkladně promíchána před každým pipetováním. Po přidání alkaloidu, inhibitorů nebo kofaktorů transportu byla směs inkubována za kultivačních podmínek. Transportní experiment byl ukončen vakuovou filtrací buněk přes tkaninu miracloth a důkladným promytím buněk destilovanou vodou. Do extrakce byly vzorky uchovávány při -80 °C. 100 mg buněk bylo mechanicky rozrušeno speciální kopistkou a alkaloidy extrahovány do 500 µl 0,1 % TFA v ultrazvukové lázni (30 min). Směs se dvakrát centrifuguje při 13 000 otáčkách 10 min a čistý supernatant analyzuje pomocí HPLC. Každý experiment byl prováděn ve třech opakováních, výsledná hodnota je pak průměrem ± S.D.

#### 4.4.5. Stanovení alkaloidů

Alkaloidová frakce získaná transportními experimenty na vakuolární a buněčné úrovni byla analyzována chromatograficky. Jednalo se o HPLC systém Waters (Milford, MA, USA), pumpa Waters 600E, PDR detektor Waters 991. Vzorky byly analyzovány na koloně Vydac C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm i.d.) s velikostí částic 5 µm, doplněné o předkolonu doporučenou výrobcem (Vydac, Hesperia CA, USA). Byly používány isokratické mobilní fáze, pro berberin 26 % (v/v) acetonitril, 0,1 % TFA, pro ajmalicin a sekologanin 19 % (v/v) acetonitril, 0,1 % TFA, pro katarantin, serpentin a tetrahydroalstonin 21 % (v/v) acetonitril, 0,1 % TFA. Kyselina skořicová byla eluována 20 % metanolem (v/v), 0,2 M kyselinou octovou (pH 5,5

upraveno pomocí hydroxidu amonného). Ve všech případech bylo injikováno 50 µl vzorku a rychlost eluce byla 1 ml/min.

#### 4.4.6. Binární konstrukty CjMDR1

CjMDR1 cDNA v plasmidu pENTR 3C (Invitrogen) získaná z univerzity v Kjóto (Japonsko), byla nejprve eluována z Whatmanova papíru 1 ml purifikované vody a tímto roztokem byly transformovány kompetentní bakterie *Escherichia coli* (XL1 kmen). Kolonie bakterií resistantních ke kamarycinu byla podrobena plasmid midi-preparaci pomocí kitu Quiagen a koncentrace získané DNA stanovena spektrofotometricky (RNA/DNA calculator Gene Quant pro, Biochrom Ltd. Cambridge (Velká Británie)). Kvalita DNA byla ověřena kontrolním štěpením s restrikčními enzymy NotI a BamHI+XhoI.

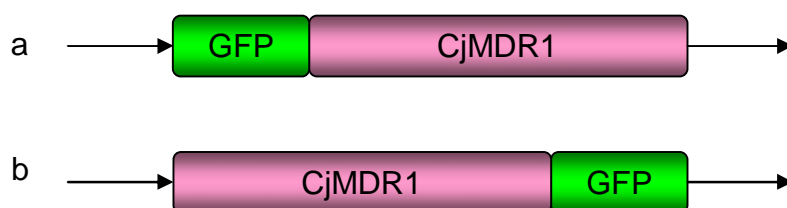
**A)** CjMDR1 cDNA je klonovaná do rostlinných transformačních plasmidů pRT101 (Töpfer *et al.*, 1987) a pER8 (Zuo *et al.*, 2000). Insert je štěpen enzymem XhoI a Sall, vektorové plasmidy enzymem XhoI. Štěpení restrikčními enzymy, příprava vektoru, ligace, transformace bakterií *E.coli* a izolace plasmidu je prováděna podle protokolů níže uvedených. Orientace insertu v plasmidu a kvalita konstruktů je ověřena štěpením restrikčními enzymy v různých kombinacích a slibný klon kontrolně sekvenován (Service XS, Leiden, Nizozemí).

**B)** Fúze CjMDR1 s GFP, N-terminální a C-terminální.

Pro určení lokalizace proteinu v buňce je nutné tento fúzovat se „svítivým“ proteinem, v našem případě se jednalo o zeleně fluoreskující protein, Green Fluorescent Protein (GFP). Doporučuje se provést fúzi jak v N-terminální tak v C-terminální části proteinu (obr. 16), k čemuž jsou k dispozici konstrukty plasmidů pTH2 (Niwa *et al.*, 1999; Chiu *et al.*, 1996) a jeho derivát pTH2BN (Kuijt *et al.*, 2004). Rozdíl mezi konstrukty pTH2 a pTH2BN je

v pozici MCS (klonovacích míst) a GFP, gen zájmu se tudíž klonuje před nebo za GFP ve smyslu směru přepisu DNA. Pro usnadnění klonování je vhodné vložit na CjMDR1 konce XhoI restrikční místa, a je nezbytné odstranit v případě C-terminální fúze (pTH2) STOP kodon z CjMDR1, aby mohlo docházet k nepřetržité transkripci až do DNA GFP.

Obr. 16. Schéma fúze CjMDR1 s GFP. a/ N-terminální fúze, použitý konstrukt pTH2BN, b/ C-terminální fúze, použitý konstrukt pTH2. Šipky naznačují směr přepisu DNA.



Následující primery byly designovány:

Rev (Zpětný primer): CTC GAG TCA TCA TGA AGC ACT TGT GTG AA

RevDSC (Zpětný primer bez stop kodonu):

CTC GAG TTC TTC TGA AGC ACT TGT GTG AA

Fw (Přímý primer): CTC GAG ATG GCC GAA GAA AAT GGC

PCR podmínky byly experimentálně stanoveny na:

#### MIX pro 3 vzorky

- 15 µl.....10x Pwo pufr
- 3 µl.....dNTPs (10 mM)
- 3 µl.....primer Fw (20 pmol/µl)
- 3 µl.....primer Rv (20 pmol/µl)
- 1,2 µl.....Pwo polymeráza (2 U/vzorek)
- 9 µl.....MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 109,8 µl....H<sub>2</sub>O

Jako templát byl použit plasmid pENTR3C+CjMDR1 v koncentraci 50 ng

#### Nastavení termocyklu:

Počáteční denaturace	95 °C	5 min	} Tyto kroky se opakují ve 35 cyklech
Denaturace DNA	95 °C	30 sec	
Hybridizace primerů	57 °C	1 min	
Syntéza řetězce DNA	72 °C	6 min	
Dokončení syntézy	72 °C	7 min	

Získaný PCR produkt po 1% agarózové gelové elektroforéze byl extrahovaný z gelu, přečištěný pomocí Quiagen kitu a koncentrace ověřena. Pro vložení tohoto produktu do pomocného plasmidu pGEMT-Easy je třeba syntetizovat k PCR produktu tzv. A-konec (A-tailing).

#### A-Tailing

6 µl.....PCR produkt (30 ng/µl)

1 µl.....MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

1 µl.....10x pufr Taq polymerázy

1 µl.....dATP (2 mM)

1 µl.....Taq polymeráza (5 U)

Inkubuje se při 70 °C po dobu 30 min.

Ligace s plasmidem pGEMT-Easy probíhala podle doporučení výrobce (Promega, USA). Posledním krokem bylo vyštěpit z pGEMT-Easy CjMDR1 fragmenty a vložit je do pTH2 a pTH2BN. Detaily a výsledky klonování jsou popsány ve výsledcích.

Získanými konstrukty byly bombardovány buňky katarantu a druhý den sledovaná fluorescence pod konfokálním mikroskopem. Mikroskopie vzorků začínala vložením bombardovaných buněk do Lab-Tek II skleněné komůrky (Nalge Nunc, International).

Vzorky byly sledovány pod invertním mikroskopem Leica (IRBE) doplněném konfokálním scannerem Leica SP1 s argonovým laserem.

Pro vizualizaci GFP byla použita excitační vlnová délka 488 nm, zatímco emitované záření bylo snímáno při 500-550 nm. Zachycený signál byl zesílen, digitalizován a znázorněn pomocí Leica softwaru.

Následující protokoly mohou být podrobně nalezeny v knize Plant Molecular Biology Manual (Memelink *et al.*, 1994). Vybrané použité kapitoly jsou popsány.

## I. Protokol na štěpení restrikčními enzymy

### Obecné schéma

1  $\mu$ l plasmidové DNA získané plasmid minipreparací (okolo 1  $\mu$ g DNA)

1  $\mu$ l zásobní roztoku (10x) pufru odpovídajícího restrikčnímu enzymu

1  $\mu$ l povážené RNázy (500  $\mu$ g/ $\mu$ l)

0,15  $\mu$ l restrikčního enzymu o koncentraci 20 U/ $\mu$ l (tzn. +/- 3 U/1  $\mu$ g DNA)

Promíchat, krátce centrifugovat a inkubovat při optimální teplotě (ve většině případů 37 °C) minimálně 1 hod.

Pro stanovení restrikčních míst a délky restrikčních fragmentů se dá použít volně dostupný software firmy New England Biolabs: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

Doporučený postup:

Pracovat s restrikčními enzymy umístěnými v chladícím kovovém bloku a vrátit do -20 °C okamžitě po použití. Předcházet kontaminaci enzymů cizorodou DNA (sterilní pipety, správná laboratorní praxe). Celkový objem restrikčního enzymu v reakční směsi by neměl přesahovat 10 % (tudíž koncentrace glycerolu bude nižší než 5 %). Vždy ověřit vhodnost pufru k danému enzymu nebo směsi enzymů. Pro několikanásobné štěpení připravit n+1

zásobní mix restrikčního enzymu. Po štěpení přidat ¼ objemu 5x nanášecího pufru (loading buffer), smísit a aplikovat do elektroforetického gelu vedle vhodného markeru (pro rozsah 20-0,5 kb  $\gamma$  DNA x *EcoRI* x *HindIII*, pro rozsah 600-50 bp SK x *HaeIII*). Pro DNA fragmenty větší než 600 bp se používá agarózový gel (1 % agarózy v 1x TBE roztoku, 60  $\mu$ g/l ethidium bromidu), elektroforetický pufr je 1xTBE. Napětí v elektroforetickém tanku a doba optimální migrace fragmentů se řídí velikostí gelu (závisí na počtu současně nanesených vzorků) a předpokládanou velikostí fragmentů. „Malý“ gel, 10 cm migrační dráha, 10 slotů, fragmenty zájmu větší než 2 Kb – se vyvíjí po dobu minimálně 40 min při 100 mA.

Elektroforetický agarózový gel je sterilizován (20 min 120 °C) a při teplotě >60 °C je nalit do elektroforetického tanku s hřebenem. Po zatuhnutí (30 min až hodina, podle velikosti gelu), se hřeben odstraní a do vzniklých jamek se aplikují vzorky DNA s nanášecím pufrem.

Roztoky:

**5x nanášecí pufr**      12,5 % Ficoll 400  
(loading buffer)      2 mM EDTA pH 8  
                                 0,25 % bromofenolová modř  
                                 0,25 % xylenolová modř

**10x TBE pufr**      108 g Tris  
                                 55 g kyseliny borité  
                                 40 ml 0,5 M roztoku EDTA pH 8 (NaOH)

**RNáza**      10 mg/ml zásobní roztok se 10 min povaří a naředí do pracovního roztoku (500  $\mu$ g/ $\mu$ l).

## II. Příprava plasmidového vektoru

**Enzymatické štěpení**      2 µg plasmidové DNA  
5-10 U/µg DNA restrikčního enzymu/ů  
příslušný pufr, zásóní roztok 10x  
H<sub>2</sub>O do celkového objemu 20-30 µl  
inkubovat při optimální teplotě minimálně 1,5 hod, nejlépe přes noc.

### Defosforylace

k reakční směsi přidat      10 µl 1 M Tris-HCl pH 8  
3 U alkalické fosfatázy  
H<sub>2</sub>O do celkového objemu 200 µl  
inkubovat při 37 °C alespoň hodinu

Defosforylace nefunguje u tupých konců DNA (štěpeno např. SmaI nebo EcoRV) nebo u 3' přesahujících vláken DNA.

### Fenol/chloroformová extrakce

k reakční směsi přidat      100 µl fenolu (nasyceného 0,1 M Tris-HCl pH 8)  
100 µl chloroformu  
Promíchat 30 s, centrifugovat 2 min a horní vrstvu přenést do nové zkumavky. Postup opakovat.

### Chloroformová extrakce

200 µl chloroformu  
Promíchat 15 s, centrifugovat 1 min a horní vrstvu přenést do nové zkumavky.

### Srážení DNA pomocí

20 µl 3 M Na-acetátu  
550 µl etanolu



Smísit a centrifugovat 5 min.

Dekantovat a k sedimentu přidat 400 µl 70 % etanolu, smísit a centrifugovat 5 min.

Sediment kompletně vysušit při 60 °C nebo ve vakuu a rozpustit ve 20 µl pufru T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5).

Zkontrolovat elektroforeticky koncentraci DNA.

### III. Ligace

#### Spojení dvou vláken DNA za přítomnosti enzymu DNA-ligázy

##### Ligační směs:

50 ng plasmidového vektoru, naštěpeného příslušným enzymem

5ti násobně větší množství fragmentu (viz níže), naštěpeného příslušným enzymem

2 µl 10x pufru pro ligaci (může být precipitovaný po vyjmutí z -20 °C, rozpustit!)

1 µl T4 DNA ligázy (1 U)

H<sub>2</sub>O do finálního objemu 20 µl

Inkubovat 2-20 hod při pokojové teplotě. Použít část nebo vše k transformaci kompetentních bakterií *Escherichia coli*.

Pro zvýšení pravděpodobnost ligace fragmentu o větším počtu párů bazí se používá

optimalizační vzorec pro výpočet množství fragmentu:

$$\frac{\text{ng Vektoru} \times \text{Kb Fragmentu}}{\text{Kb Vektoru}} \times 5 = \text{ng Fragmentu}$$

Teoreticky by měl být dostačující poměr lepivých konců 1:1, v praxi se však doporučuje 2-5ti násobný nadbytek fragmentu.

### IV. Transformace kompetentních bakterií *E. coli*

Pomalejší metoda se zhruba 10ti násobnou efektivitou transformace oproti „rychlé metodě“

1. Přidání DNA (ligační směsi nebo samotného plasmidu) ke 100  $\mu\text{l}$  kompetentních bakterií uchovávaných při  $-80^\circ\text{C}$ . Jemně se smísí a ponechá 5 min v ledu.
2. Směs se vystaví po 30 s teplotnímu šoku ( $42^\circ\text{C}$ ) a vrátí na led.
3. Přidá se 1 ml LC media a inkubuje se hodinu při  $37^\circ\text{C}$
4. Po krátké sedimentaci (20 s), dekantaci čistého media a resuspendování směsi se část nebo celá směs (v závislosti na předpokládaném počtu kolonií) kultivuje na připravených agarových plotnách. LC medium zpevněné agarem a obohacené o selekční antibiotikum se po ztuhnutí na sterilní Petriho misce nechá obrácené dnem vzhůru vysušit při  $60^\circ\text{C}$  40 min a alespoň 10 min před aplikací bakterií temperovat při pokojové teplotě. Bacterie se kultivují zpravidla přes noc při  $37^\circ\text{C}$ .

**Kultivační bakteriální „LC medium“**      10  $\text{g.l}^{-1}$  bakto-trypton  
   5  $\text{g.l}^{-1}$  bakto-kvasinkový extrakt  
   8  $\text{g.l}^{-1}$  NaCl

Pro zpevnění    16  $\text{g.l}^{-1}$  agaru

Sterilizuje se 20 min  $120^\circ\text{C}$ , před použitím se nechá zchladit na  $60^\circ\text{C}$  a smísí s antibiotiky podle potřeby.

### **Finální koncentrace vybraných selekčních antibiotik a markerů v bakteriálním**

#### **růstovém médiu:**

Carbenicillin, Cb – 200  $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Kanamycin, Km – 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Gentamycin, Gm – 40  $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Spektinomycin, Spe – 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$

X-GAL - 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactopyranosid, substrát pro enzym  $\beta$ -galactosidázu kódovanou lacZ genem)

IPTG - 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid, induktor aktivity  $\beta$ -galaktosidázy). Obě posledně zmiňované látky se používají pro tzv. modrobílý test, kdy je během úspěšného klonování lacZ gen nahrazen genem zájmu a bakterie poté neštěpí substrát X-GAL na barevný (modrý) produkt, ale zůstávají bílé. Komerční plasmidy s touto selekční výhodou jsou například pGem-T vektory.

Velmi kompetentní bakterie *Escherichia coli* kmen XL-1 se připravovaly podle metody popsané v Inoue *et al.*, 1990.

## V. Mini-preparace plasmidů

Podle stupně čistoty získané DNA a její koncentrace se rozlišuje tzv. mini, midi a maxi preparace plazmidové DNA. Mini preparace plasmidů z bakterií používáme za účelem rychlé selekce úspěšného klonu, protože je časově i materiálně nejméně náročná. Izolace plasmidu k dalšímu klonování nebo PCR se doporučuje provádět alespoň midi preparací.

### ***Plasmid mini-preparace:***

Sterilním párátkem nabrat kolonii bakterií na agarové plotně a kultivovat přes noc ve sterilní plastikové zkumavce (14 ml) s LC médiem (1,5 ml) a příslušným selekčním antibiotikem. Kultivace probíhá na třepače se 150 otáčkami za minutu a při 37 °C.

Druhý den se kultura přenesse do zkumavky (1,5 ml) a sedimentuje 1 min při 13000 otáčkách.

Čisté médium se dekantuje.

- Sediment se kompletně resuspenduje ve 100  $\mu\text{l}$  pufru pro lyzování bakterií.

(25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM glukózy)

- Na ledu se dále přidá 200  $\mu\text{l}$  roztoku 0,2 M NaOH a 1 % SDS. Promísí.

150  $\mu\text{l}$  3M Na-acetátu pH 4,8.

Promíchat a inkubovat v ledu 10 min

- 5 min se centrifuguje (13000 otáček) a supernatant dekantuje do zkumavky obsahující 1 ml etanolu. Promísí se 3x otočením zkumavky dnem vzhůru.
- 5 min se centrifuguje (13000 otáček), dekantuje a smísí s 500  $\mu$ l 70 % etanolu.
- 5 min se centrifuguje (13000 otáček), dekantuje a sediment suší při 60 °C nebo pod vakuem. DNA by měla být dokonale vysušená, jelikož zbytky etanolu ztěžují aplikaci vzorku do gelu při elektroforéze, ale ne přesušená, což ztěžuje resuspendaci sedimentu.
- Rozpustit sediment ve 20  $\mu$ l pufu T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5), promísit a 10 min inkubovat při 60 °C. Promísit. Uchovávat při -20 °C.

Ve vybraných případech byly používány jednotlivé kity od firmy Quiagen. Konkrétně na 1) plasmid midi preparaci (DNA využita jako zdroj pro přípravu insertu a vektoru pro klonování), 2) čištění DNA po izolaci z agarózového gelu (příprava kvalitního insertu a vektoru prostého reakčních komponent a zbytků DNA po štěpení plasmidů restričními enzymy).

#### 4.4.7. Transformace buněk *Catharanthus roseus* technikou mikroprojektilového bombardování

##### **Příprava rostlinného materiálu**

- § Připraví se Petriho misky (60x15 mm) s 6-8 ml pevného LS-13 media.
- § Linie CATL *Catharanthus roseus* uprostřed růstové křivky (4. den po pasážování) se naředí v poměru 1:1 s novým médiem LS-13.
- § V závislosti na hustotě buněk se filtruje 3-6 ml suspenze na Whatmanův filtrační papír (42,5 mm průměr) za použití sterilní Buchnerovy nálevky. Papír se před fitrací navlhčí vodou. Buňky by měly tvořit souvislou vrstvu optimální výšky

a vlhkosti. Příliš suché buňky jsou zbytečně stresované a mají nižší schopnost regenerace, příliš vlhké buňky jsou při bombardování ve vakuu rozptylovány do okolí.

- § Filtr s vrstvou buněk se opatrně přenesse na připravené Petriho misky se zpevněným LS-13 mediem.

### **Příprava wolframových částecek**

- § Ke 375 mg wolframových částic se přidají 2 ml 0,1 M HNO<sub>3</sub>.
- § Čistí se 20 min v ultrazvukové lázni led/voda.
- § Částice se minutu centrifugují při 2000 otáčkách.
- § HNO<sub>3</sub> se dekantuje a částice resuspendují ve 2 ml sterilní vody. Centrifugace.
- § Odstraní se voda a přidají se 2 ml etanolu.
- § Opět ultrazvuková lázeň, centrifuguje se a etanol odstraní.
- § Poslední krok se opakuje, poté se směs rozdělí do zkumavek po 25 µl suspenze. Před každým odebráním ze zásobního roztoku je třeba promíchat, suspenze rychle sedimentuje.
- § Ve sterilním boxu se nechají zkumavky se suspenzí odpařit do sucha (přes noc) a po uzavření se uchovávají při pokojové teplotě.

### **Potahování/obalování kovových částecek DNA**

- § 10 µg plasmidové DNA v celkovém objemu 10 µl T10E1 pufru se přidá k částecům a promísí jemným poklepáním na zkumavku.
- § Přidá se 25 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> a promísí.
- § Přidá se 10 µl 0,1 M spermidinu a promísí.

- § Částičky se nechají volně sedimentovat alespoň 15 min, poté se odstraní 15  $\mu$ l supernatantu.

### **Bombardování rostlinných buněk**

- § Přístroj (particle gun), umístěný ve sterilním boxu, je důkladně očištěn etanolem. Drobné kovové součásti jsou sterilizovány ponořením do etanolu. Aparatura je zkompletována, nastaven tlak helia 2,5 Bar.
- § Wolframové částičky s nabalenou DNA se ponoří na 2 s do ultrazvukové lázně a okamžitě se odpipetují 2  $\mu$ l suspenze na kovovou síťku v aplikátoru. Ten se poté umístí do samotného přístroje.
- § Petriho miska s vrstvou buněk určených k bombardování se umístí do spodní pozice pod aplikátorem, nad ní se v určité vzdálenosti umístí disperzní kovová mřížka.
- § Systém se uzavře a po dosažení vakua ( $\leq 50$  mBar) se tlakem helia 2,5 Bar částičky vystřelí směrem k vrstvě buněk. Pro větší efektivitu transformace je možno bombardování 2-3x opakovat se stejnými buňkami.
- § Vakuum se uvolní a Petriho misky se uzavřou a utěsní parafilmem.
- § Pro každý konstrukt se bombardují 3 Petriho misky.
- § Bombardované buňky se inkubují 24 hodin při lehkém osvětlení (překryté filtračním papírem), 25 °C a fotoperiody 16 hod světlo, 8 hod tma.
- § Filtrační papír s vrstvou bombardovaných buněk je po 24 hod přenesen na stejné LS-13 medium zpevněné agarem a navíc obohacené o hygromycin-selektivní antibiotikum o finální koncentraci 50 mg/ml.
- § Bombardované buňky jsou kultivovány za fotoperiody 16 hod světlo o intenzitě 2800 Luxů, 8 hod tma, teplotě 25  $\pm$ 1 °C a relativní vlhkosti 50 % do objevení kalusů (4-6 týdnů).

## **Resistentní kalusy a jejich konverze na suspenzní kulturu**

Izolovaný hygromycin resistantní kalus o průměru 1-2 mm je přenesen na nové LS-13 medium s hygromycinem a kultivován další 2-4 týdny. Takto objemný kalus už může být podroben analýze, nebo je převeden do suspenzní kultury.

Pro založení suspenzní kultury je nejprve třeba získat dostatečné množství buněk kalusu (přibližně 3 týdny další kultivace). Malá část buněk každého kalusu (označeného) se přenesou opět na pevné medium jako záloha, zbytek buněk se přenesou do 100 ml Erlenmayerovy baňky s 5ti ml tekutého LS-13 media s hygromycinem. Pomocí pinzety se shluk buněk mechanicky rozruší do suspenzní podoby. Směs se inkubuje na třepačce za stejných podmínek jako matečná suspenzní kultura. Pokaždé když suspenzní směs začne houstnout, přidává se dalších 5 ml čerstvého media, až do dosažení objemu směsi 20 ml (zpravidla 2-3 týdny). Relativní hustota směsi je třeba pro rapidní dělení buněk. Proto musí být každá suspenzní kultura hodnocena individuálně.

20 ml husté suspenze se pipetou přemístí do 250 ml Erlenmayerovy baňky s 50 ml selekčního media. Pasážuje se každých sedm dní, ze začátku inokulací 20ti ml suspenze, v průběhu týdnů se snižuje až k 7,5 ml. Suspenzní kultura se stabilizuje přibližně za 3-4 týdny.

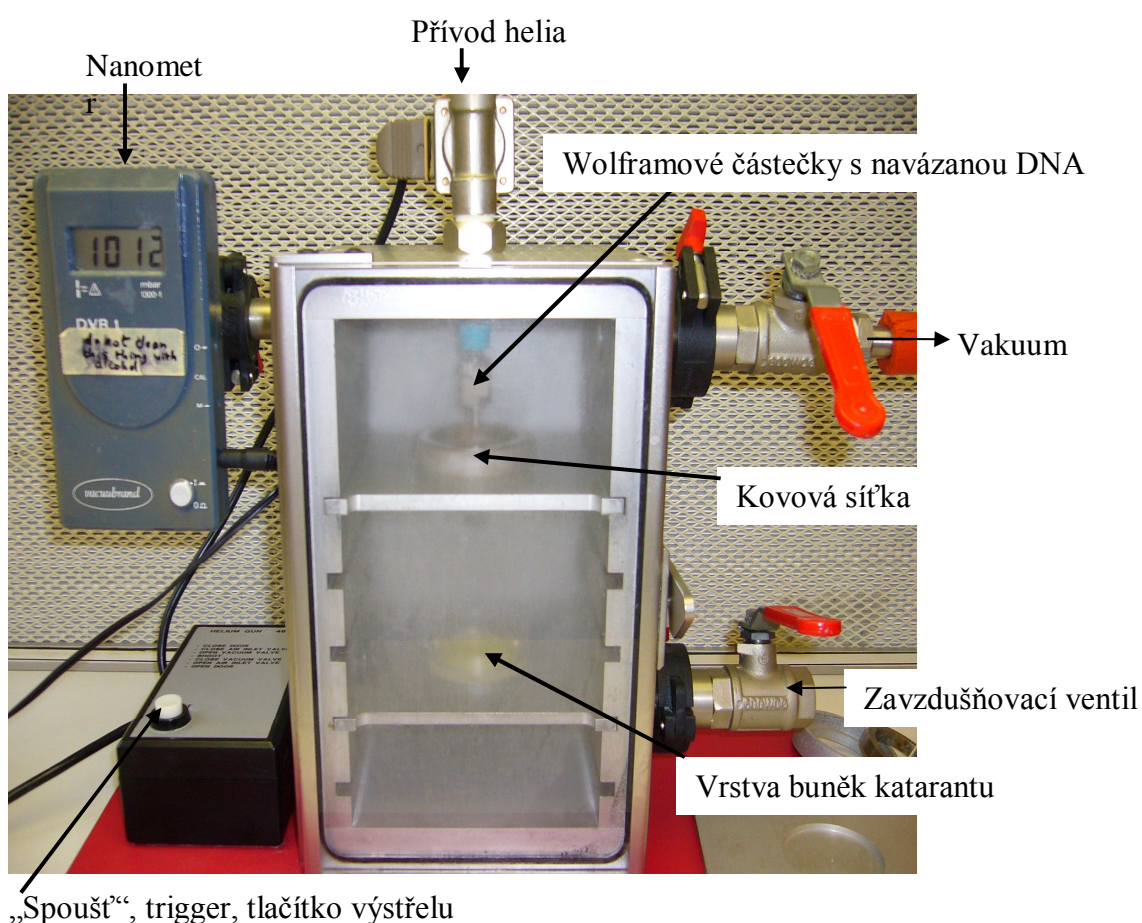
Doporučený postup, poznámky:

V případě, že plasmid neobsahuje gen pro resistenci k hygromycinu, ko-bombardují se buňky současně dvěma plasmidy-jedním nesoucím gen zájmu (8  $\mu$ g) a druhým nesoucím resistenci k antibiotiku (2  $\mu$ g plasmidu pSDM1501). Celkový objem 10  $\mu$ l T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> je dodržen.

V případě transientní exprese, druhý den po bombardování buněk plasmidem s efektoem pro transientní expresi (GUS) je třeba inkubovat buněčnou suspenzi s příslušným roztokem: 1 mg/ml X-Glukozy (5-brom 4-chlor 3-indolyl glucuronid), 50 mM sodného fosfátového

pufri pH 7, 5 mM EDTA, 0,5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 0,5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ . Petriho misky s bombardovanými buňkami jsou pokropeny asi 350  $\mu$ l reakčního roztoku, ponechány přibližně 30 min při pokojové teplotě (než se roztok vsákne do buněčné vrstvy) a poté inkubovány při 37 °C dokud není viditelná barevná reakce (1 hodinu až přes noc).

Obr. 17. „Particle gun“, přístroj na bombardování buněčného materiálu kovovými mikroprojektily. Umístěno v boxu s laminárním prouděním vzduchu a kontrolovanou čistotou



#### 4.4.8. Izolace genomové DNA

Malé množství zmrazeného upráškováného rostlinného materiálu (viz Izolace celkové RNA) se smísí se 400  $\mu$ l extrakčního pufri a důkladně promísí. Krátce se centrifuguje pro odstranění vzduchových bublin. Přidá se 400  $\mu$ l směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol (25:24:1)



a promísí. Poté se 20 min centrifuguje při 6000 otáčkách a supernatant přenesse do nové zkumavky. Sráží se 0,8 objemem isopropanolu při 10000 otáčkách, 10 minut. Isopropanol se odstraní a DNA promyje 70 % etanolem (10 min sedimentace/10000 otáčkách). Sediment se vysuší a resuspenduje v 50  $\mu$ l T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> pufru pH 8 s přidavkem 10  $\mu$ g.l<sup>-1</sup> RNázy. Pro eliminaci RNA se inkubuje 30 min při 37 °C. Koncentrace je ověřena spektrofotometricky. Uchovává se při -20 °C.

***Extrakční pufr:***

1 objem pufru A (0,6 M NaCl, 0,1 M Tris pH 7,5, 40 mM EDTA pH 8,0, 4 % sarkosyl, 1 % SDS)

1 objem 10 M roztoku močoviny

5 % fenolový roztok (fenol nasycený 0,1 M Tris-HCl pH 8)

#### 4.3.9. Izolace celkové RNA

Odebrané rostlinné vzorky (zfiltrované buňky suspenzní tkáňové kultury) se zabalí do aluminiové folie, označí a zmrazí v tekutém dusíku. Do samotné extrakce se uchovávají při -80 °C.

Porcelánová třenka s těrkou se zchladí tekutým dusíkem a poté se v ní za přítomnosti tekutého dusíku rozmělní rostlinný materiál na jemný zmrzlý prášek. Ten je přenesen do předchlazené plastické uzavíratelné zkumavky a uchováván v kontejneru s tekutým dusíkem do dalšího kroku extrakce.

Fenolová směs se ve vodní lázni zahřeje na 80 °C (při této teplotě fenol a pufr tvoří jednu fázi). Ke gramu práškové buněčné kultury (přibližně polovina 14 ml plastické zkumavky) se přidá 2,5 ml fenolové směsi a 1,25 ml chloroformu. Okamžitě se protřepe a v třepání pokračuje dalších 5 min.

Centrifuguje se 30 min při 4500 až 10000 otáčkách. Horní vodná vrstva (přibližně 1,5-2,5 ml) se přenesse do nové zkumavky, přidá se stejný objem chloroformu a opět 5 min protřepává.

Centrifuguje se 15 min při 4500 až 10000 otáčkách. Horní vodní vrstva se přenesse do 2 ml zkumavky (přibližně 1,5 ml) a přidá se třetina objemu (0,55 ml) 8 M LiCl (finální koncentrace LiCl 2 M). Promísí se a nechá srážet přes noc ve 4 °C.

Centrifuguje se 30 min při 10000 otáčkách a 4 °C. Supernatant se dekantuje a sediment promývá dvakrát 70 % etanolem. Centrifugace 15 min, 10000 otáček, 4 °C.

Opatrně se dekantuje (sediment má tendenci následovat etanolvý supernatant). RNA sediment se vysuší pod vakuem a resuspenduje ve 100 µl sterilní vody, promísí, nechá 30 min na ledu a znovu promísí. Rozpuštěná RNA se centrifuguje 10 min při 4 °C a supernatant opatrně přenáší do nové zkumavky (někdy se tvoří sraženina polysacharidů). Koncentrace se ověří spektrofotometricky při ředění 200-500x.

### ***Fenolová směs***

Pevný fenol se rozpustí při 60 °C a smísí se stejným objemem roztoku: 0,1 M LiCl, 0,01 M Na<sub>2</sub>-EDTA, 1 % SDS, 0,1 M Tris (upravit pomocí HCl na pH 9). Přidá se 1 g 8-hydroxychinolinu na litr kapalného fenolu. Tento antioxidant se rozpustí ve fenolové vrstvě a propůjčí jí sytě žlutou barvu. Směs se uchovává ve 4 °C a v temnu.

### **Doporučený postup:**

Všechny nástroje, roztoky a použité náčiní musí být zbaveno RNázy. K tomu postačuje autoklávování při 120 °C 20 min, u termolabilních pomůcek a nástrojů sterilizace aktivním chlorem (Savo ve finální koncentraci 0,1 % aktivního chloru) minimálně 2 hod, optimálně přes noc. Po působení aktivního chloru se sterilní materiál alespoň třikrát proplachuje sterilní vodou.

Pro stabilitu RNA a optimální výtěžek extrakce je velice důležité udržovat práškovany rostlinný materiál ve zmrzlém stavu (na tekutém dusíku) až do přidání horké fenolové směsi.

#### 4.4.10. Elektroforéza RNA formaldehydovým gelem

Na přípravu 250 ml agarózového formaldehydového gelu (20x20 cm gel) je třeba sterilizovat směs:

směs:	220 ml vody
	25 ml 10x MOPS pufr
	3,75 g agarózy (pronarosy)
	2 $\mu$ l roztoku ethidium bromidu (10 mg/ml)

Směs se zchladí na 65 °C, obohatí o 7,5 ml 35 % formaldehydu a aplikuje do bez-RNázového tanku (přes noc vystaveného aktivnímu chloru a třikrát promytého sterilní vodou). Snažíme se redukovat množství vzduchových bublin, popřípadě odstraňujeme sterilní kapilárou. Nechá se hodinu tuhnout.

Příprava RNA vzorků:

Pod vakuem se do sucha vysuší 10  $\mu$ g celkové RNA a následně rozpustí ve 20  $\mu$ l „vzorkového pufru“. Těsně před aplikací vzorků do gelu se směs 10 min zahřívá při 60 °C.

Gelová elektroforéza probíhá v roztoku 1xMOPS po dobu zhruba 2,5 hod (100 V). Poté se gel inkubuje hodinu v roztoku 1x blotting pufru. Kvalita gelu se kontroluje pomocí UV transiluminátoru.

Roztoky:

<i>10x MOPS pufr</i>	46,2 MOPS (0,2 M)
	3,72 g EDTA (0,01 M)
	6,8 g Na-acetát (0,05 M)
	pH 7 upraveno pomocí NaOH
	Po autoklavování se roztok intenzivně žlutě zabarví.

#### *1 ml RNA vzorkového pufru*

225  $\mu$ l směsi Ficollu a barviva  
100  $\mu$ l 10x MOPS pufru  
175  $\mu$ l 35 % formaldehydu  
500  $\mu$ l formamidu

#### *Ficollové barvivo*

12,5 % Ficoll 400  
2 mM EDTA  
0,25 % bromofenolová modř  
0,25 % xylenolová modř

#### *10x blotting pufr*

69 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,5 M)  
18,6 g EDTA (50 mM)  
pH 6,5 upraveno pomocí 5 M NaOH

### 4.4.11. Northern blotting

Principem je přenesení RNA na nylonovou membránu kapilárními silami (vzlínající kapalinou).

V tanku po elektroforéze se ponechá trochu 1x blotting pufru a povrch, na kterém byl umístěn gel, se pokryje filtračním papírem (Whatman 3 mm nařezaný na takovou velikost, aby z obou stran přesahoval plošinu pro gel a zasahoval tak do rezervoáru pufru pod touto plošinou). Papír se navlhčí pufrům aby dokonale přilnul k povrchu, případné vzduchové bubliny se musí odstranit (například jemným rolováním sterilní plastikové zkumavky po povrchu). RNA gel s odstraněnými okrajovými částmi gelu se umístí na filtrační papír v tanku. Gel se překryje nylonovou membránou (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA) a alespoň dvěma vlhkými filtračními papíry předem nařezanými na optimální velikost. Neustále se musí dbát na předcházení vzniku a odstraňování vzduchových bublin, které snižují kvalitu přenosu RNA na

membránu. Poté se na gel navrší pyramida suchých nařezaných filtračních papírů a papírových utěrek zhruba do výše 10 cm. Celý systém se zatíží (například 1 l kapaliny) a ponechá pracovat přes noc.

Druhý den se pyramida opatrně odstraní a membrána nechá uschnout při pokojové teplotě. Kvalita transferu je kontrolována UV transiluminátorem. Orientace gelu a hlavně membrány by měla být označena, například odstřížením jednoho z rohů membrány. Pro fixaci RNA na membráně se membrána 2-4 hodiny suší při 80 °C.

#### 4.4.12. Hybridizace s radioaktivně značenou sondou

##### **Příprava značené sondy**

50-100 ng purifikovaného fragmentu DNA (sonda odpovídající hledané mRNA) se smísí s 5 µl 5x značícího (labeling) pufru, 5 min povaří a umístí na led.

Ke směsi se přidá	0,5 µl 5 U/µl Klenowův fragment DNA polymerázy I z <i>E. coli</i>
	2 µl $\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml)
	H <sub>2</sub> O do finálního objemu 25 µl

Inkubuje se 1-2 hodiny při pokojové teplotě.

Separace značené sondy od volných nukleotidů se provádí na sephadexové koloně v Pasteurově pipetě. Příprava kolony spočívá v umístění silanizované skelné vaty na dno pipety, která se naplní směsí sephadexu G75 suspendovaného v roztoku 0,1x SSPE a 0,1 % SDS. Značená směs je po aplikování do kolony vymývána roztokem 0,1x SSPE a 0,1 % SDS. Frakce přibližně 10ti kapek ( $\pm 200$  µl) jsou sbírány do zkumavek a jejich aktivita je ověřována pomocí Geigerova počítače (counter). Značená sonda je většinou eluována ve 4-6té zkumavce, neinkorporované nukleotidy později (v 16-18té zkumavce). Optimální inkorporace je okolo 70 %.

## Hybridizace

Membrána se nejprve připraví na hybridizaci inkubováním ve směsi 1 M NaCl, 10 % dextran sulfát, 1 % SDS a 50 µg/ml denaturované DNA lososího sperma. Tato směs není za obvyčejné teploty homogenní, proto je třeba směs zahřát na 65 °C a roztok aplikovat do hybridizační trubice s membránou temperovanou také na tuto teplotu. Pre-hybridizuje se hodinu až přes noc při 65 °C za konstatního promíchávání.

Přečištěná značená sonda se denaturuje 5-10 min na vodní lázni (100 °C). Poté se přidá k pre-hybridizační směsi v trubici s membránou a hybridizuje se přibližně 16 h při 65 °C za konstatního promíchávání. Hybridizační směs se poté dekantuje a membrána se krátce promyje 50-100 ml roztoku 0,1x SSPE, 0,5 % SDS při pokojové teplotě. Promývací roztok se dekantuje. Stejný roztok i objem se aplikuje zahřátý na 42 °C a při této teplotě se nechá promývat 30 min na třepačce. Tento krok se opakuje.

Naposledy se membrána promyje roztokem 0,1x SSPE při pokojové teplotě a vysuší mezi filtračními papíry. Membrána se zataví nebo zabalí do plastické folie. Při úplném vysušení membrány dojde k ireversibilní vazbě sondy na membránu, což může komplikovat možné následné re-hybridizace.

Aktivita membrány je kontrolována Geigerovým počítačem a autoradiograficky. X-ray film (Fuji, Tokyo, Japonsko) je exponován v závislosti na intenzitě radioaktivity několik hodin až dní membráně. Celý systém je v odstíněných deskách a v prostředí -80 °C. Film se poté vyvíjí v tmavé komoře pomocí roztoků dodávaných firmou Agfa.

Roztoky:

*DNA lososího sperma.* Materiál se rozpustí ve vodě v koncentraci 10 mg.ml<sup>-1</sup> a naštěpí na průměrnou velikost 1000 bp v ultrazvukové lázni. Denaturuje se 10 min při 100 °C, zchladí v ledu a dále uchovává při -20 °C.

20x SSPE (Standardní Sůl – Fosfát EDTA pufr)

3,6 M NaCl

0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

20 mM EDTA

pH 6,5 upraveno pomocí 5 M NaOH

Značící (*labeling*) pufr: komponenty A, B a C jsou smíchány v poměru 10:25:15

A: 1,25 M Tris-HCl pH 8

125 mM MgCl<sub>2</sub>

250 mM β-merkaptoetanol

500 μM dATP

500 μM dTTP

500 μM dGTP

B: 2 M HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonová kyselina) -NaOH  
pH 6,6

C: 90 OD jednotek/ml (1,8 mg/ml) náhodných hexamerových primerů rozpuštěných  
ve vodě

#### 4.4.13. Western blotting

##### **Izolace proteinů ze suspenzní kultury *C. roseus***

Ze suspenzní kultury se odebere vzorek 0,5 ml, centrifuguje se 5 min při 13000 otáčkách. Supernatant se odstraní a buňky se zmrazí tekutým dusíkem. Do extrakce se uchovává při - 80 °C. Při extrakci se buňky smísí se 150 μl roztoku 1xTBS pufr, 1x koktejlu kompletního proteázového inhibitoru, 1 % Triton. Směs se promísí a centrifuguje při (4°C, 13000 otáček, 10 min). Supernatant se přenesse do nové zkumavky.

Pro měření koncentrace proteinu (Bradfordův test, BSA použitý jako standard) se odebere 10 μl extraktu.

### **Akrylamidový diskontinuální proteinový gel**

Jelikož náš protein zájmu má velikost okolo 140 kDa, je třeba snížit koncentraci akrylamidu ze standardních 10 %. Postupným experimentálním snižováním koncentrace jsme zvolili 6 % *akrylamidový gel* jako vyhovující.

1,5 ml 20 % roztoku akrylamidu

1,25 ml 4x „resolving“ pufru

2 ml H<sub>2</sub>O

50 µl APS 10 %

2,2 µl TEMED

„*Stacking*“ *gel*, gel pro aplikaci vzorku

0,5 ml 20 % roztoku akrylamidu

0,625 ml 4x „stacking“ pufr

1,35 ml H<sub>2</sub>O

2,5 ml TEMED

Tank pro proteinový gel se dokonale omyje detergentem, opláchne několikrát vodou a osuší. Je nutné zabránit kontaminaci tanku cizími proteiny (ochranné rukavice). Sklíčka pro aplikaci gelu se sestrojí do držáku, případné štěrby se mohou vymezit 1 % agarózovým gelem. Akrylamidová směs se kapilárou aplikuje mezi sklíčka. Je snaha zabránit vzniku vzduchových bublin. Na povrch se ihned kapilárou nanese několik ml *n*-butanolu (pro lepší polymerizaci a menší interakci gelu se vzdušným kyslíkem). Zbytek akrylamidové směsi po aplikaci slouží jako indikátor stupně polymerizace. Při pokojové teplotě trvá polymerizace přibližně 2 hodiny.

Poté se aplikuje směs „stacking“ gel. Do ní se umístí hřeben s aplikačními jamkami. Opět se snažíme vyvarovat vzduchovým bublinám. Gel se nechá polymerizovat při pokojové teplotě ( $\pm 30$  min).



Ze ztuhlého gelu se opatrně odstraní hřeben a systém se umístí do tanku s pufrem pro elektroforézu. Aplikují se proteinové vzorky a proteinový standard a vyvíjí se při 20 mA přibližně 2 hodiny (v závislosti na předpokládané velikosti zájmového proteinu).

Příprava vzorků:

20 µg celkových proteinů každého vzorku se denaturuje ve 2x SDS vzorkového pufru 5 min povařením.

<i>2x SDS vzorkový pufr</i>	0,125 M Tris-HCl pH 6,8 4 % SDS 20 % glycerol 0,3 M β-merkaptoetanol 0,05 % bromofenolová modř
<i>5x pufr pro elektroforézu</i>	0,125 M Tris 0,96 M Glycin 0,5 % SDS
<i>10x TBS pufr</i>	24,2 g Tris 80 g NaCl pH 7,6 upraveno pomocí HCl
<i>1x TBST pufr</i>	přidáno 0,5 ml Tweenu-20 k 1x TBS pufru
<i>Coomassie barvivo</i>	0,1 % Coomassie brilliant blue R-250 40 % metanol 10 % kyselina octová
<i>4x „resolving“ pufr</i>	<i>4x „stacking“ pufr</i>
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
0,4 % SDS	0,4 % SDS

Oba pufrы se musí zfiltrovat na filtru o pórech 0,45 µm

„Anoda I“ pufř:	0,3 M Tris	„Katoda“ pufř:	0,025 M Tris
	20 % metanol		0,04 M Glycin
„Anoda II“ pufř:	0,025 M Tris		20 % metanol
	20 % metanol		

## Blotting

Připraví se filtrační papíry velikosti gelu. V přístroji pro proteinovou elektroforézu (electrophoresis unit) se nejprve navlhčí dno přístroje pufrem „anoda I“. Stejným pufrem se navlhčí 3 filtrační papíry skládané na sebe. Dále se pokračuje třemi filtračními papíry namočenými v pufřu „anoda II“. Nitrocelulózová membrána se navlhčí také v „anoda II“ pufřu. Opatřně se ze sklíček vyjme gel a položí na membránu. Naposledy se navřší tři papíry namočené v „katoda“ pufřu. Vždy se dbá o prevenci/odstranění vzduchových bublin (napřříklad rolováním sterilní plastikové zkumavky po povrchu). Přístroj se uzavře, nastaví se 300 mA a inkubuje se 15 min.

Membrána po blottingu se umístí do vaničky na třepačku a

- § 5 min se promývá v 1x TBST sušeného mléka (5%)
- § promývá se 5 min 1x TBST
- § přes noc se inkubuje při 4 °C v roztoku 1x TBST, 3 % BSA, první protilátky (proti CjMDR1, 1000x ředění)

Druhý den

- membrána se inkubuje hodinu při pokojové teplotě ve stejné směsi jako přes noc (1x TBST, 3 % BSA, první protilátky-proti CjMDR1)
- promývá se 4x 5 min v roztoku 1x TBST
- inkubuje se hodinu při pokojové teplotě v roztoku 1X TBST, druhé protilátky (antirabbit, 20000x ředění)
- promývá se 4x 5 min v roztoku 1x TBT

### **Vizualizace proteinů, luminiscentní reakce:**

Membrána se minutu inkubuje ve směsi 6 ml luminolu, 60  $\mu$ l „enhancer solution“. Poté se zavine do folie a vystaví X-ray filmu (v temnu). Expozice v řádu min je obvykle dostačující.

*Luminol*: (každých 6 měsíců připravit nový roztok)

200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 6,8

50 mg Luminolu sodného (1,25 mM)

62  $\mu$ l 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Uchovává se v temnu a chladu (4 °C)

-----  
„Enhacer solution“: 11 mg *p*-hydroxykumarová kyselina v 10 ml DMSO.

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)

APS (amonium persulfát)

#### 4.4.14. Reverzní transkribce a design primerů pro PCR

Na ledu byla celková RNA (2  $\mu$ g) smísena s 1  $\mu$ l DNÁzového pufru a 0,5  $\mu$ l DNÁzy turbo a směs doplněno na 10  $\mu$ l čištěnou vodou. Inkubováno 30 min při 37 °C. Poté se ke směsi přidají 2  $\mu$ l DNAza-deaktivačního činidla a centrifuguje se (10 000 otáček, 2 min). Čistý supernatant se odebere do nové zkumavky (přibližně 10  $\mu$ l) a smísí s 1  $\mu$ l oligo (dT)<sub>18</sub> primeru (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l), doplní se na 12  $\mu$ l čištěnou vodou. Po 5ti minutách inkubace při 70 °C se zchladí v ledu a krátce centrifuguje. Zkumavka se dále udržuje na ledu. K reakční směsi se přidají 4  $\mu$ l 5x reakčního pufru, 1  $\mu$ l ribonukleázového inhibitoru (20 U/ $\mu$ l) a 2  $\mu$ l dNTP směsi (10 mM). Inkubuje se 5 min při 37 °C. Posledním krokem je přidání 1  $\mu$ l enzymu Revert Aid H Minus M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ l) a doplnění na finální objem 20  $\mu$ l čištěnou vodou. Po 60 min zahřívání na 42 °C se reakce ukončí 10ti minutami při 70 °C a dále uchovává při -20 °C.

Principem tohoto testu je reverzní transkripce izolované celkové RNA na cDNA (viz výše) a následná PCR se specifickými primery. Následující primery byly designovány:

Pro kontrolní, tzv. provozní „housekeeping“ ribosomální protein Rps9 izolovaný z katarantu (Menke *et al.*, 1999), číslo genové banky AJ 749993.

FwRps9 5'- GGACCCACGTCGTATCTTTGAGG -3'

RvRps9 5'- CCACCACCGAAGGGACTTG -3'

Pro CjMDR1;

FwSCj 5'- GGAGCGTCCATGCCTGTTATG -3' na začátku genu ( AA 371 bp)

Fw35S 5'- GTGGAGCACGACACTCTCGTCTAC -3' v promoteru 35S

FwBfC 5'- CCTAGTGGCACAACATCCGC -3' před C doménou (AA 1385 bp)

RvCdom 5'- CTGTTTTTCCCCCCCAGAGAG -3' v C doméně (AA 1738 bp)

Předpokládaná velikost fragmentů je tedy

FwSCj - RvCdom	1367 bp
Fw35S - RvCdom	353 bp
FwBfC - RvCdom	2180 bp
FwRps9 - RvRps9	246 bp

Kriteriem designu primerů byly shodné body tání primerů, poměr G a C ve vzniklém oligonukleotidu a specifita sekvence - minimální interakce se zbytkem DNA. Primery byly designovány za pomoci volně dostupného softwaru

<http://www.cnr.berkeley.edu/~zimmer/oligoTMcalc.html>

## **5. Výsledky a diskuse**

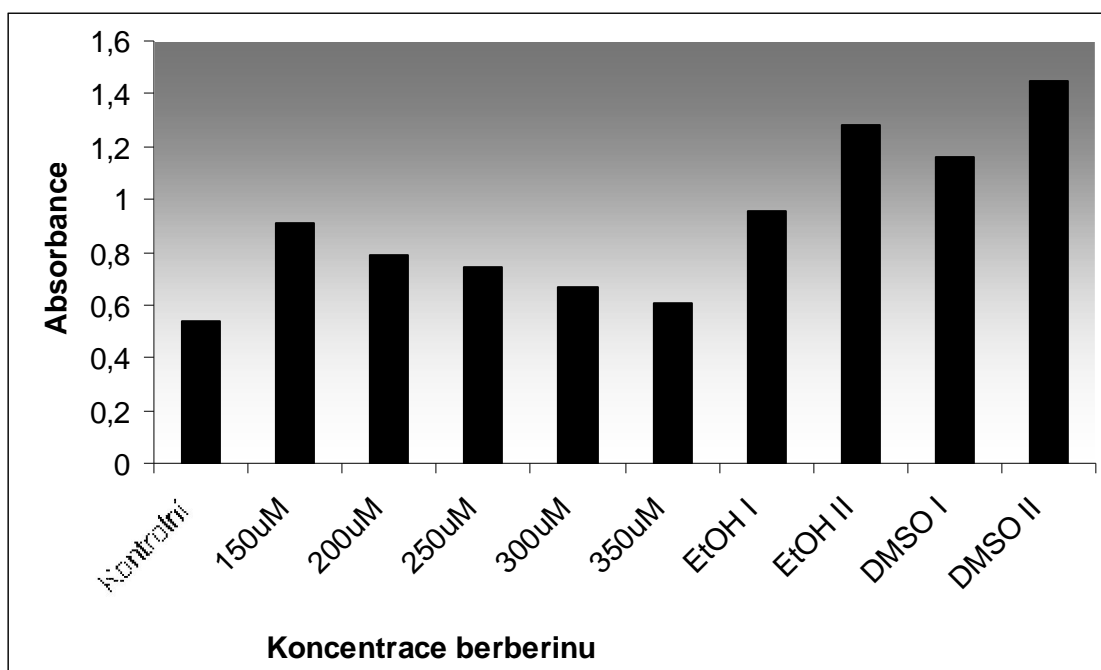
## 5.1. Charakteristika mechanismu pohybu berberinu v buňkách katarantu růžového

### 5.1.1. Vliv berberinu na vitalitu suspenzní tkáňové kultury katarantu růžového

Benzylisochinolinový alkaloid berberin není vlastní druhu *Catharanthus*. Lze ho tudíž pokládat za xenobiotikum. Berberin přidaný k *Nicotiana tabacum* a *Lithospermum erythrorhizon* vyvolával stres a inhiboval růst (Sakai *et al.*, 2002). Pro úspěšnost dalších experimentů bylo nutné testovat míru cytotoxického účinku berberinu v tkáňovém systému katarantu růžového.

Jelikož většina našich transportních experimentů probíhá maximálně v řádu desítek minut, byl vybrán krátkodobý test s barvivem Evansovou modří (viz materiál a metody). Test probíhá 30 minut a principem je větší akumulace barviva v neživých buňkách, tudíž zvýšená absorbance extraktu z takovýchto buněk.

Obr. 18. Krátkodobá expozice (30 min) berberinu buňkám kultury katarantu.



Pokus byl proveden u nativní suspenzní kultury katarantu, linie CRPM v polovině růstové křivky (čtvrtý den po pasážování). Deset ml suspenzní kultury bylo vystavené působení roztoku berberinu v DMSO o finálních koncentracích 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  a 350  $\mu\text{M}$  a inkubováno po 30 minut při kultivačních podmínkách. Ke kulturám bylo pipetováno ještě samotné rozpouštědlo (DMSO) a další možné rozpouštědlo, etanol 95 %. Objemy těchto byly 500  $\mu\text{l}$  (I) a 1000  $\mu\text{l}$  (II). Po uplynutí inkubace byly buňky odfiltrovány, promyty od kultivačního media destilovanou vodou a podrobeny testu s Evansovou modří.

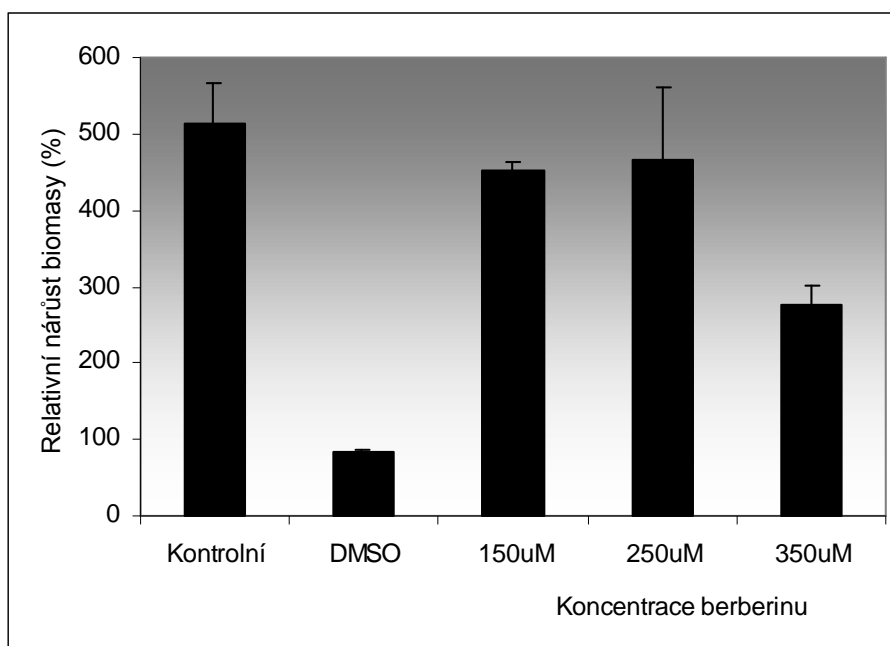
Z grafu vyplývá, že letální efekt berberinu na buňky katarantu není větší než u samostatně použitých rozpouštědel. Překvapivě ovšem absorbance extraktů z buněk nepřímo úměrně odpovídá koncentraci berberinu. Zdá se nepravděpodobné, že by vyšší koncentrace cytotoxického alkaloidu měly menší letální efekt na buňky než nižší použité koncentrace. Vysvětlením může být barevná interference mezi intenzivně žlutým berberinem a Evansovou modří během analýzy. Výsledek tohoto pokusu byl ověřen následujícím testem, barevně nezávislým. Dalším faktorem, který mohl zkreslovat výsledek testu byl různý objem zásobního roztoku berberinu k dosažení definovaných finálních koncentrací berberinu v systému.

Ke 100 ml suspenzní kultury byl přidán ve stejném objemu (1 ml) zásobní roztok berberinu a samotné rozpouštědlo. Berberin byl přítomen v systému ve finálních koncentracích 150  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 350  $\mu\text{M}$ . Kultura byla kultivována za kultivačních podmínek jednu pasážovací periodu (7 dní) a poté vyhodnocen přírůstek, který byl vyjádřen jako % vztahované k původní navážce. Každý experiment byl prováděn ve třech opakováních, výsledná hodnota je pak průměrem  $\pm$  S.D.

Úbytek biomasy ve vzorcích obsahujících 150  $\mu\text{M}$  a 250  $\mu\text{M}$  berberinu není statisticky signifikantní, zatímco koncentrace 350  $\mu\text{M}$  vykazuje statisticky významný pokles nárůstu biomasy ( $P < 0,05$ ). Letální účinek může být způsoben z části samotným berberinem a z části

použitým rozpouštědlem. Avšak po přidání samotného rozpouštědla kultura stagnovala a její nárůst byl zcela zastaven. Vysoká toxicita samotného rozpouštědla by byla v souladu s předchozím experimentem. Ovšem proč nestagnovala v růstu i kultura obsahující v DMSO rozpuštěný berberin zůstává otázkou nad rámec našich experimentů. Nicméně v následujících experimentech byl použit co nejmenší možný objem zásobního roztoku berberinu (kvůli toxicitě rozpouštědla) a finální koncentrace berberinu v systému nepřesahovala 200  $\mu\text{M}$ .

Obr. 19. Růstový graf katarantu během jednoho pasážovacího cyklu (7 dní), závislost berberinu o různých koncentracích a rozpouštědla DMSO na nárůst biomasy



### 5.1.2. Transport berberinu v suspenzním tkáňovém systému katarantu růžového; buněčná úroveň

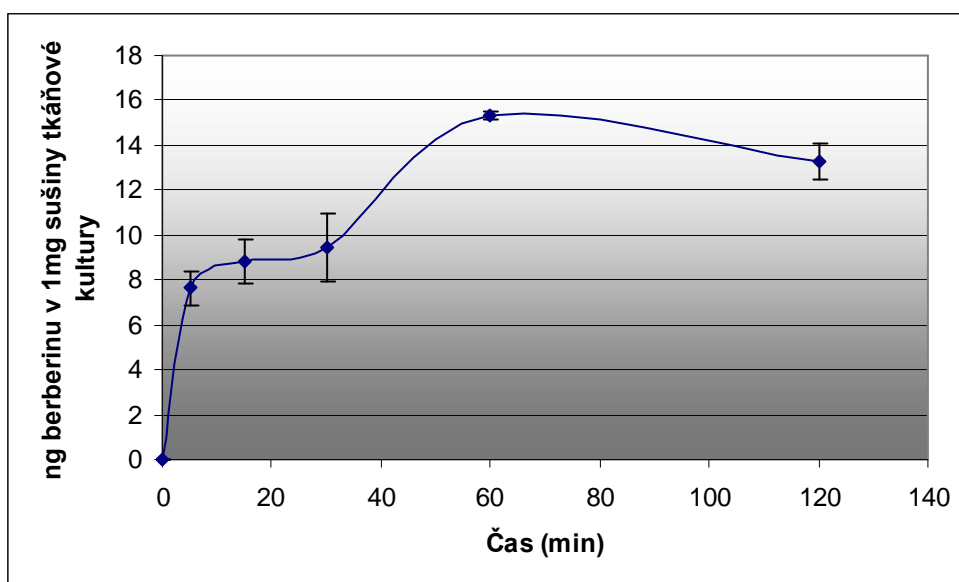
Transport je výsledkem ustavení rovnováhy mezi pohybem substrátu do buňky a z buňky ven (nebo opačně) v reálném čase. Pohyb substrátu může být zprostředkován různými



mechanismy, a to nejen na mezitkáňových nebo intracelulárních úrovních, ale i v rámci jedné membrány oddělující dva kompartmenty – důležitý je směr toku substrátu.

Časový obrázek pohybu berberinu do buněk katarantu je znázorněn v grafu 20. První fáze, kdy se koncentrace berberinu v buňkách dramaticky zvyšuje, trvá přibližně 10 minut. Poté se začnou zapojovat do činnosti vylučovací mechanismy a výsledná koncentrace berberinu v buňkách stagnuje. Přibližně po půl hodině od přidání berberinu k buňkám se rovnováha mezi přijímaným a vylučovaným berberinem posune ve prospěch příjmu. Nicméně ten je limitovaný a dosáhne maxima zhruba po hodině od přidání berberinu k buňkám. Tento časový úsek (60 min) je proto používán v následných experimentech jako standardní doba transportu. Nepřímou metodou, pomocí škály kofaktorů/inhibitorů/modulátorů transportu jsme se snažili odhalit transportní systém berberinu v katarantu růžovém.

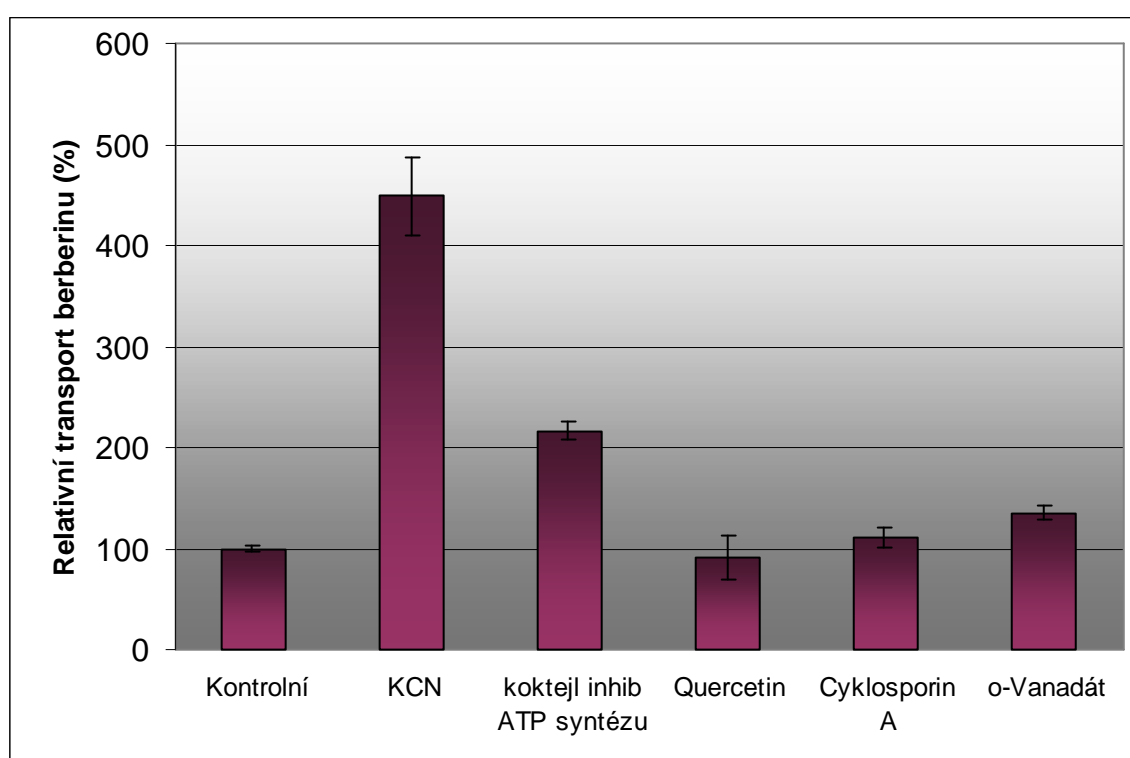
Obr. 20. Akumulace berberinu v buňkách katarantu v závislosti na čase



Jelikož vybraný alkaloid berberin je v matečné rostlině *Coptis japonica* transportován na buněčné úrovni pomocí ABC transportéru (CjMDR1) (Shitan *et al.*, 2003), volili jsme nejprve modulatory zaměřené na ovlivnění hladiny ATP jako hlavního zdroje energie pro přenos.

Takovým inhibítozem je například KCN (10 mM), dále specifický inhibítoz ABC transportérů *ortho*-vanadát (1 mM) a směs NaF (5 mM)+NaN<sub>3</sub> (2 mM)+CCCP (1 mM), která inhibuje syntézu ATP. Přehled všech modulátorů a inhibítozů transportu včetně jejich koncentrací je uveden v tabulce č. 3.

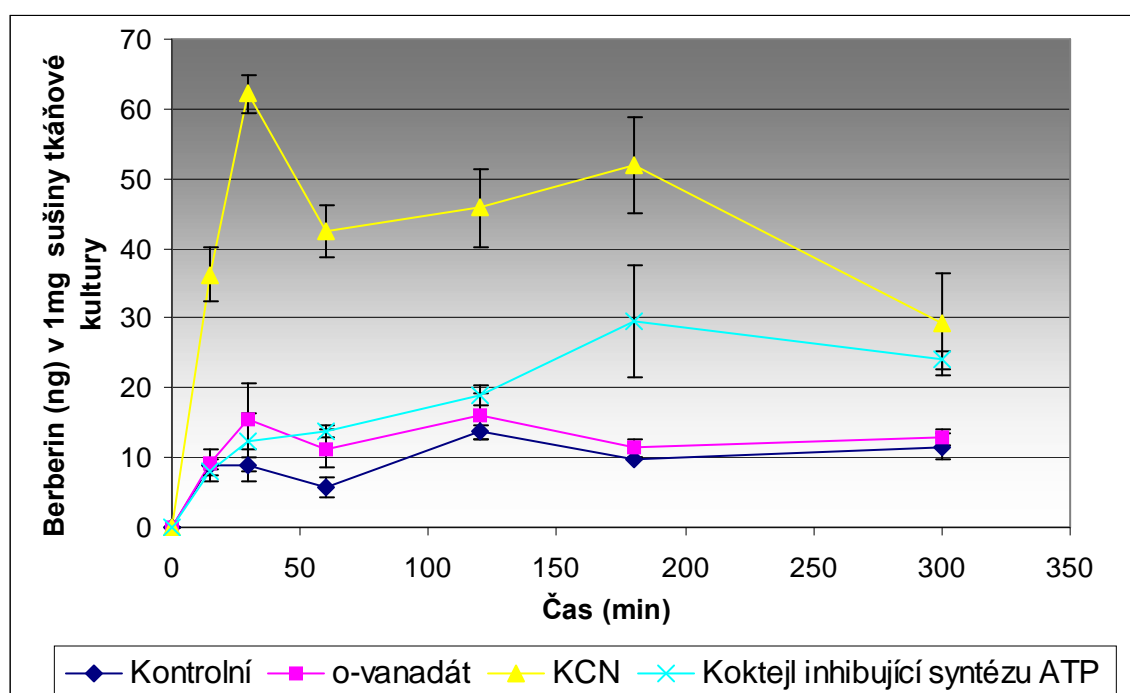
Obr. 21. Efekt ABC inhibítozu na akumulaci berberinu v buňkách katarantu. Za kontrolní je považován transport samotného berberinu, bez přítomnosti modulátorů transportu.



Transport berberinu do buněk katarantu se nezdá být inhibovaný žádným z použitých modulátorů transportu. Jak vyplývá z prvního pokusu zaměřeného na inhibici ABC transportérů a speciálně pak na podtyp MDR (obr. 21) a z druhého rozšířeného pokusu s celou škálou „inhibítozů“ transportu (Tab. 3.), některé látky naopak stimuluji koncentrace berberinu v buňkách. Hlavním „stimulátorem“ způsobujícím několikanásobně převyšující množství berberinu akumulovaného v buňkách v porovnání s kontrolní skupinou, je KCN. Působení

kyanidu draselného na živé buňky je všeobecně známé: inhibuje prostřednictvím reakce s cytochromoxidázovým systémem mitochondrií buněčné dýchání čímž blokuje produkci ATP a celkově tak ovlivňuje energetickou bilanci buňky. Přestože jeho nástup účinku (deplece ATP) je diskutovatelný, je tento inhibitor používán vědci v transportních studiích. Mechanismus účinku druhého inhibitoru se stimulačním účinkem na kumulaci berberinu v buňkách, tzv. koktejlu inhibujícího syntézu ATP, je kombinovaný (Roytrakul, 2004).

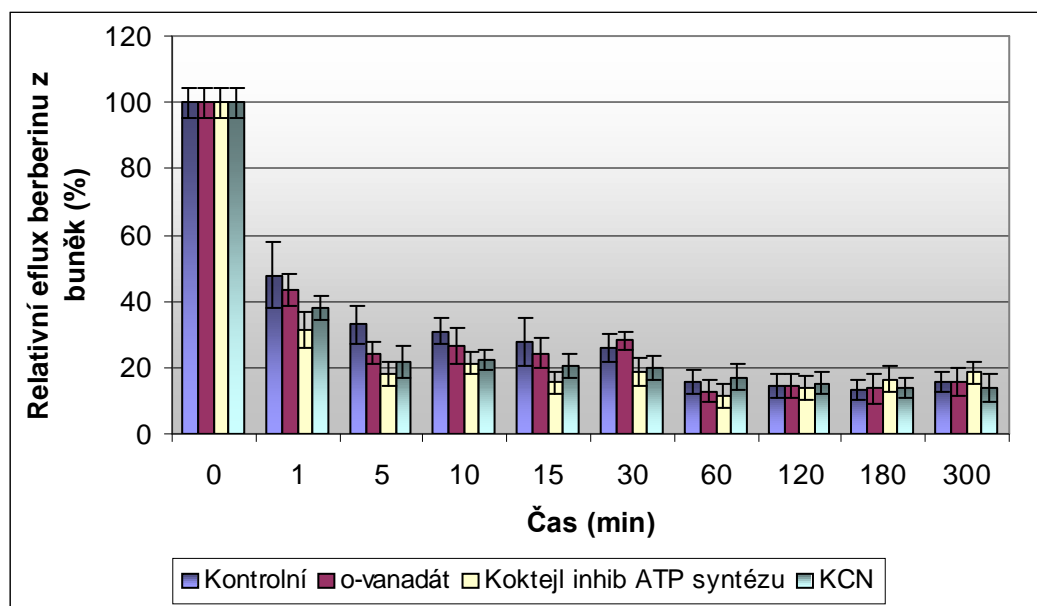
Obr. 22. Transport berberinu do buněk katarantu. Časová závislost, vliv vybraných inhibitorů



Pokud tyto dva modulátory transportu skutečně účinně snižují hladinu ATP v cytosolu našeho systému a přesto dochází, zejména v případě KCN, k masivnímu nárůstu koncentrace berberinu uvnitř buněk, pravděpodobně je ovlivněn ATP-závislý export berberinu z buněk. To by bylo v souladu s teorií, že ABC transportéry mají v buňkách hlavně detoxikační funkci, vylučují xenobiotika a/nebo toxické produkty metabolismu do extracelulárního prostoru či do „odpadních“ vakuol. Tato hypotéza byla zkoumána dalšími testy, časově závislým

transportem berberinu pod vlivem vybraných inhibitorů (obr. 22) a efluxním experimentem (obr. 23). Efluxní test probíhal tak, že buňky byly nejprve nasyceny berberinem (30 min), a poté umístěny do nového, efluxního media s inhibitory. Nasycovacího media s berberinem byly buňky zbaveny urychlenou filtrací přes tkaninu Miracloth a promytím destilovanou vodou (tento krok netrval déle než 30 sekund). Hypotéza blokády exportu berberinu z buněk se však nepotvrdila, použité inhibitory nevykazují žádný statisticky významný efekt oproti kontrolní skupině. Pokus byl opakován s použitím efluxního media kondicionovaného, tzn. nebylo použito pro eflux nové medium, ale medium získané filtrací 3-4 dny kultivovaných buněk. Jiné koncentrace cukrů, hormonů a ostatních látek v efluxním mediu však neměly žádný vliv na charakter vylučování berberinu z buněk katarantu.

Obr. 23. Eflux berberinu z buněk katarantu



Z uvedených skutečností vyplývá, že mechanismus účinku zejména koktejlu inhibujícího syntézu ATP i kyanidu draselného a možných dalších modulátorů transportu je kombinovaný a ovlivňuje transport nejen dříve popsáním způsobem.

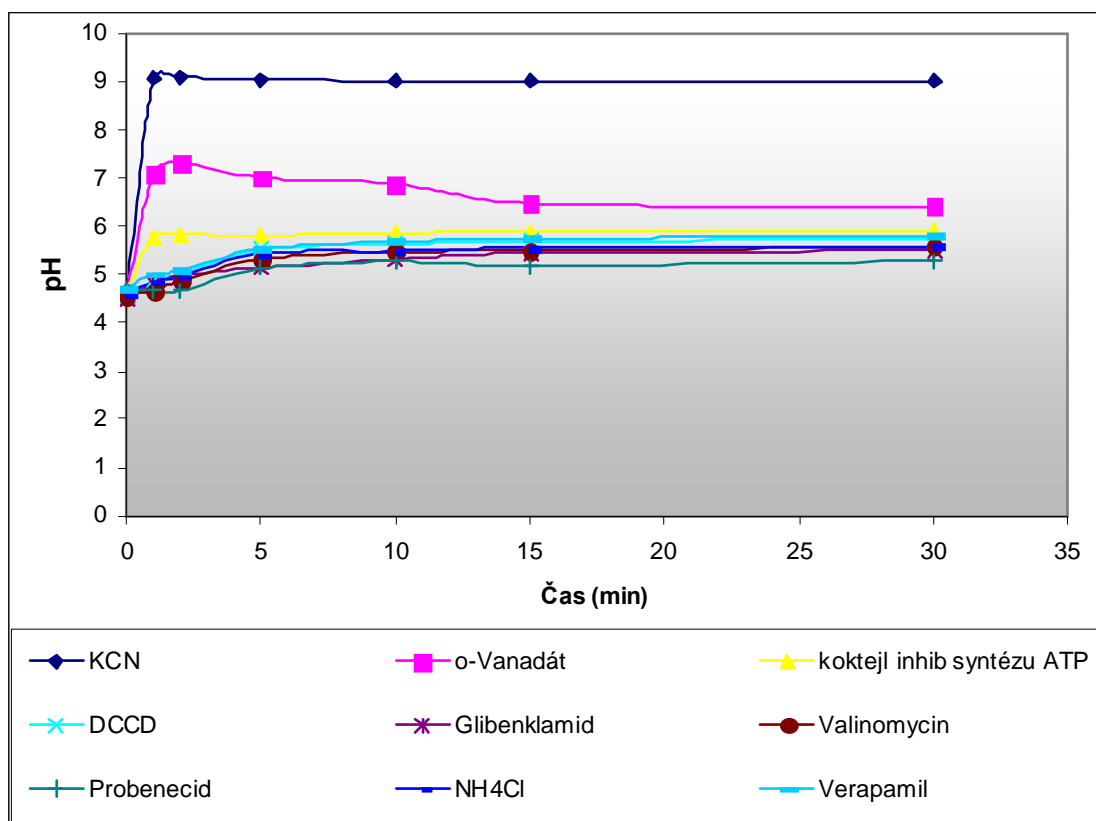
V transportu látek přes membrány hraje nejdůležitější roli pH ( $DpH$ ) a elektrický potenciál na rozhraní ( $Dy$ ). Tyto dvě veličiny ovlivňují činnost pH dependentních pump, iontových kanálů i prostou difúzi. Relativně nezávisle na těchto veličinách fungují ATP dependentní přenašeče. Podle našich výsledků buňka katarantu nevykládá ATP pro transport berberinu a to jak do buněk tak z buněk katarantu. Stejně tak modulátory transportu rozrušující  $DpH$  ( $NH_4Cl$ , CCCP) a  $Dy$  (valinomycin) na membránovém rozhraní nemají na pohyb berberinu do buněk žádný statisticky významný efekt (tab. 3). Přesto berberin v buňkách katarantu akumulován je a dokonce vlivem vybraných látek se jeho transport výrazně zvyšuje. Ve snaze odhalit mechanismus účinku aktivních modulátorů transportu byl naplánovaný test, který se týkal změny pH v růstovém mediu po přidání inhibitorů v používaných koncentracích. Překvapivě některé modulátory transportů vyvolávají masivní změny v pH media (obr. 24). Kyanid draselný, jehož přítomnost v mediu způsobuje dramatickou změnu pH má také dramatický vliv na přesun berberinu do buněk. Po zhodnocení tohoto výsledku se nabízí otázka, zdali není přesun berberinu do buněk závislý čistě na hodnotě pH. Tato hypotéza byla testována a výsledek experimentu je vidět v grafu 24. Vliv pH na poměr mezi disociovanou a nedisociovanou formou látek a tudíž i na kvalitu jakéhokoli transportu je zřejmý. Při akumulaci berberinu v buňkách katarantu pH hraje určitou roli, ovšem při pH 9, což je hodnota, které dosahuje kyanid draselný po přidání do media, nevykazuje úroveň transportu stejných vysokých hodnot jako vlivem vlastního kyanidu draselného. *Ortho*-vanadát v našem testu způsoboval druhou největší změnu pH media, zatímco jeho efekt na akumulaci berberinu byl minoritní.

Z výše uvedených dat vyvozujeme, že transport berberinu do buněk katarantu pravděpodobně neprobíhá jediným výhradním mechanismem či jedním typem transportéru, ale zapojeno je více transportních způsobů. V literatuře se vyskytují důkazy transportu berberinu v různých rostlinách pomocí  $H^+$ -antiportu (Yazaki, 2005). V našem případě je nutno zohlednit vliv pH

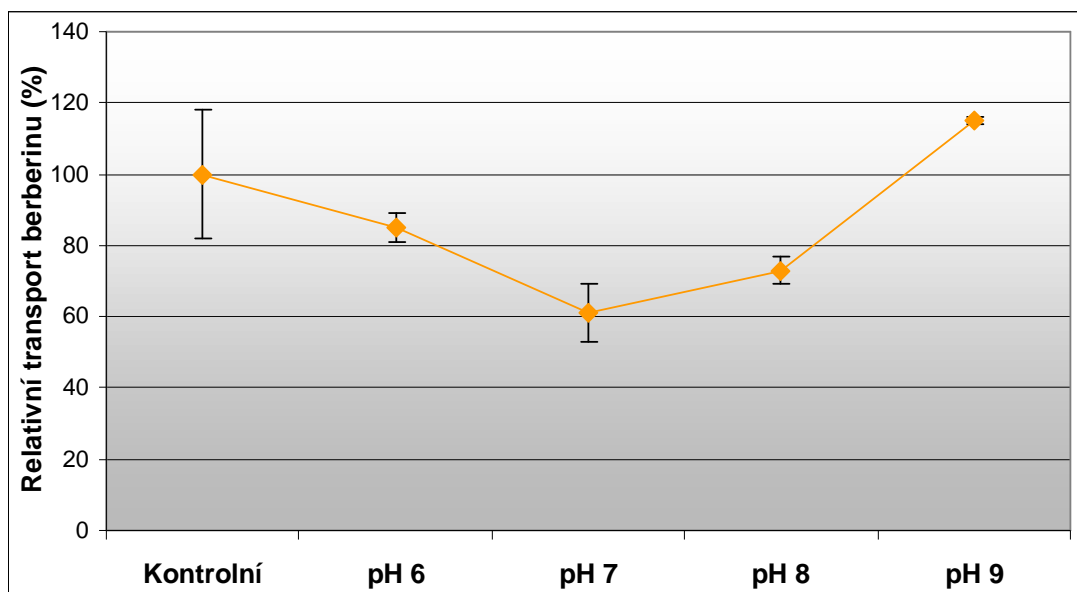
a elektrického potenciálu, ačkoli naše modelové inhibitory těchto veličin neměly na transport berberinu zásadnější vliv. Důvod masivního transportu berberinu do buněk katarantu po přidání kyanidu draselného je diskutabilní, může se částečně jednat o snížení cytosolického ATP, změnu pH v mediu a tím ovlivnění pH-závislých transportů, nebo porušení membrány v důsledku vyššího pH a tím usnadnění penetrace berberinu. Poslední zmiňovaný mechanismus ale odporuje grafu 25, který neukazuje přímo úměrnou závislost mezi zvyšujícím se pH a mírou transportu berberinu.

Účast ABC transportéru na transportu berberinu na buněčné úrovni katarantu růžového nebyla dokázána.

Obr. 24. Vliv inhibitorů na změnu pH v růstovém mediu suspenzní kultury katarantu



Obr. 25. Závislost množství akumulovaného berberinu v buňkách katarantu na změně pH media



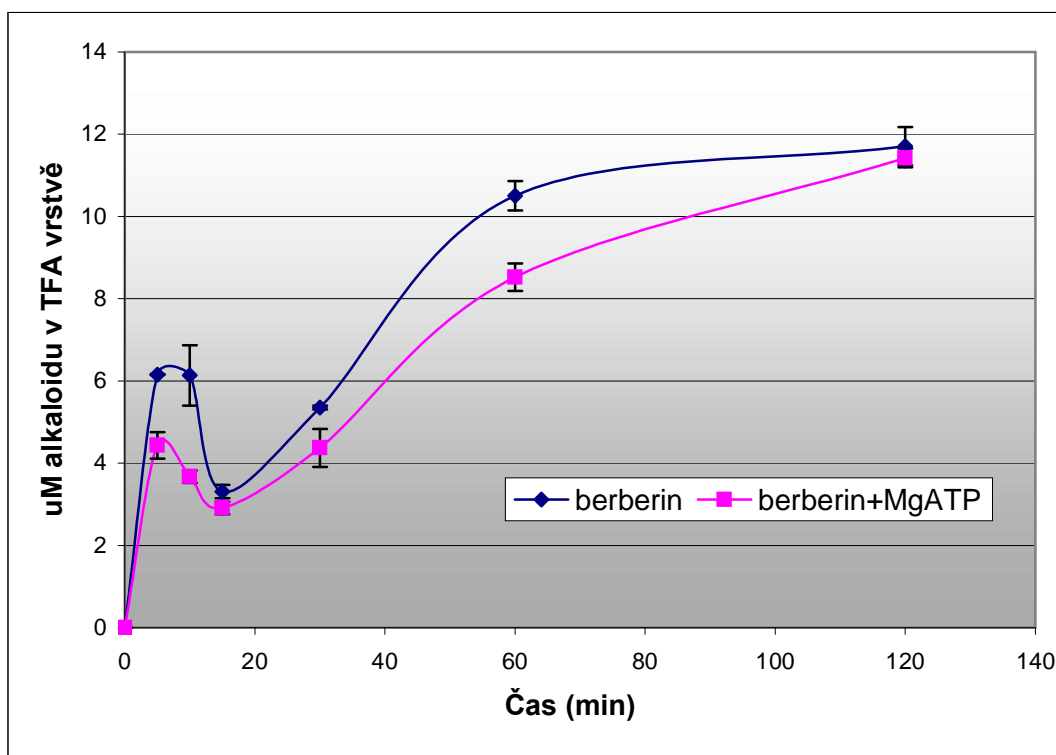
Tabulka 3. Akumulace berberinu v buňkách katarantu za působení různých inhibitorů

Modulátor	Koncentrace	Mechanismus účinku	Berberin (% ke kontrolní skupině)
Kontrolní			100 ±3,31
<i>Ortho</i> -vanadát	1 mM	ABC inhibitor	104,16 ±15,21
Glibenklamid	150 mM	MRP inhibitor	101,24 ±7,51
Verapamil	1 mM	MDR inhibitor, blokátor Ca <sup>2+</sup> kanálu	91,69 ±5,71
NaF	5 mM		
NaN <sub>3</sub>	2 mM	Koktejl inhibující syntézu ATP	145,19 ±11,73
CCCP	1 mM		
NH <sub>4</sub> Cl	10 mM	DpH inhibitor	113,55 ±4,07
KCN	10 mM	Inhibitor syntézy ATP	174,85 ±17,59
Probenecid	1 mM	Blokátor aniontového kanálu	124,74 ±4,97
DCCD	2 mM	Blokátor protonového kanálu	116,66 ±3,23
Valinomycin	5 mM	Dy inhibitor	95,95 ±8,53

### 5.1.3. Transport berberinu v suspenzním tkáňovém systému katarantu růžového; vakuolární úroveň

Membrána oddělující a formující vakuoly, tonoplast, se od plasmatické membrány liší v síle ( $8,1 \pm 0,9$  nm oproti  $10,5 \pm 0,3$  nm plasmatické membrány) (Morre *et al.*, 1987) a v charakteru kompartmentů, které oddělují. Vakuola má specifický biochemický aparát a relativně nízké pH v porovnání s cytosolem (5,5 oproti 7,2 cytosolu). Vybrané enzymy biosyntetické cesty terpenových indolových alkaloidů se nacházejí exklusivně právě ve vakuolách. Základní principy translokace látek jsou stejné na všech membránách, ovšem některé přenašeče jsou pro tonoplast typické.

Obr. 26. Časová křivka akumulace berberinu v izolovaných vakuolách katarantu



V tonoplastu katarantu byl nepřímo dokázán výskyt jak MRP tak MDR proteinů, které transportují terpenové indolové alkaloidy v katarantu růžovém (Roytrakul 2004, Poustka

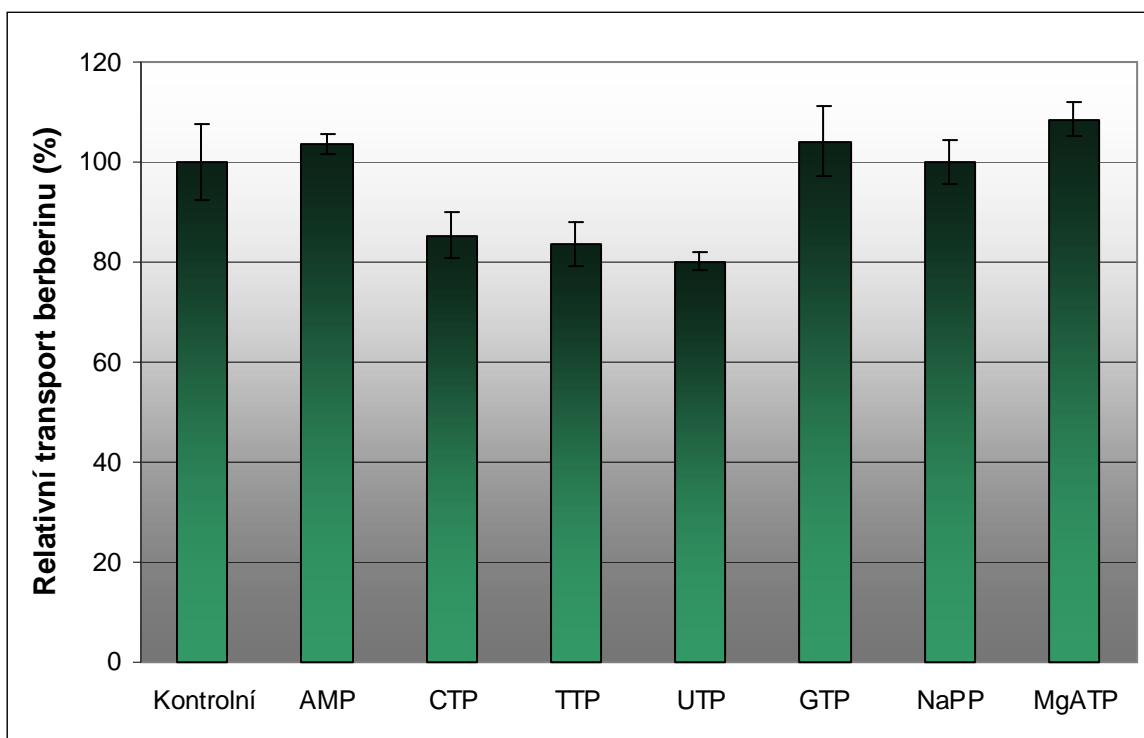


2004). Těmto transportérům byly předloženy vybrané možné substráty a byla sledovaná jejich substrátová specifita (tato práce, Roytrakul, 2004; Poustka, 2004).

Berberin je na vakuolární úrovni v matečné rostlině (*Coptis japonica*) transportován pomocí  $H^+$  antiportu, zatímco na buněčné úrovni je substrátem ABC transportéru (Shitan *et al.*, 2003).

V našem systému vypadá časová křivka akumulace berberinu do vakuol (obr. 26) podobně jako na buněčné úrovni (obr. 20). Je patrné, že berberinový transport není na vakuolární úrovni energizovaný ATP. Zdá se, že jiného zdroje energie pro přenos do vakuol berberin nevyužívá, žádný z použitých fosfátů kvantitativně nezlepšoval transport berberinu (obr. 27). Jelikož některé fosfáty nabídnuté jako možný zdroj energie dokonce signifikantně snižují akumulaci berberinu ve vakuolách, mohlo by se jednat o energeticky závislý export berberinu.

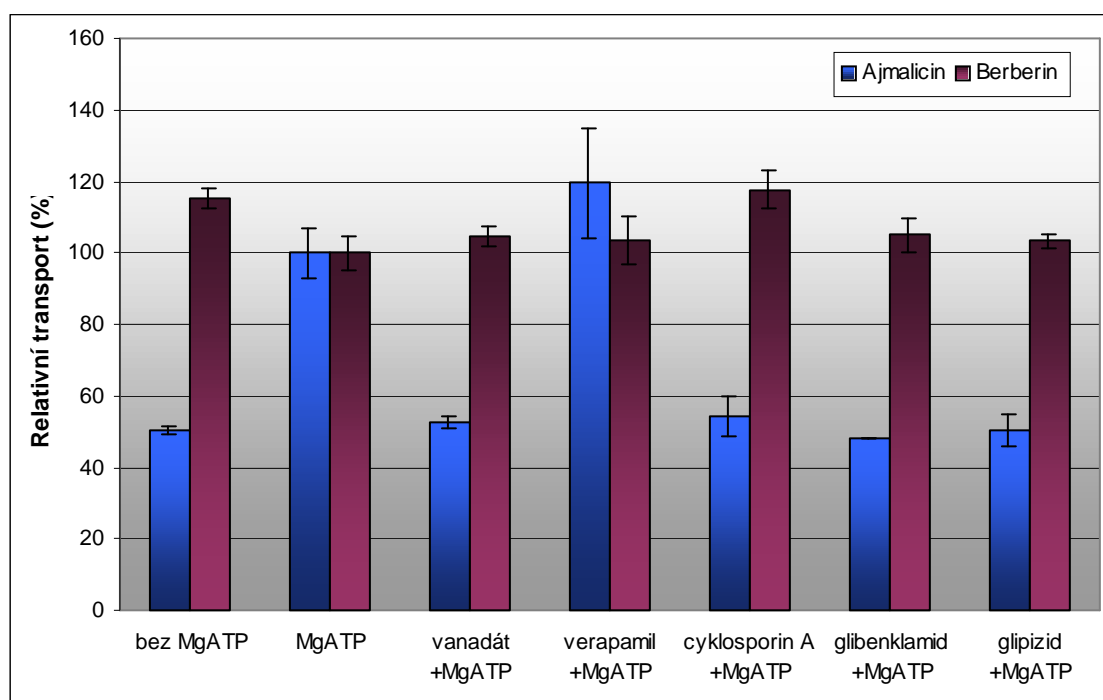
Obr. 27. Efekt různých zdrojů energie na transport berberinu do buněk katarantu růžového



Pohyb endogenního produktu sekundárního metabolismu, alkaloidu ajmalicinu, je na vakuolární úrovni silně ATP-závislý. Podle reakce s inhibitory transportu se usuzuje, že

ajmalicin je substrátem pro vakuolární MRP i MDR typ ABC transportérů. Překvapivě každý podtyp ABC transportéru funguje jako mediátor pro translokaci ajmalicinu jiným směrem; MRP přenáší ajmalicin do vakuol a MDR z vakuol zpět do cytosolu (Poustka, 2004; Roytrakul, 2004). Podrobně studovaný byl i vliv glutationu, hlavního konjugačního činidla detoxikujícího buněčný obsah, na transport ajmalicinu. Mechanismus zvýšené translokace ajmalicinu do vakuol byl popsán jako cis-aktivační. Glutathion aktivuje transport vazbou na MRP transportér z cytosolické strany avšak v jiném místě než se váže substrát. Konjugace glutathionu s ajmalicinem byla vyloučena (Poustka, 2004).

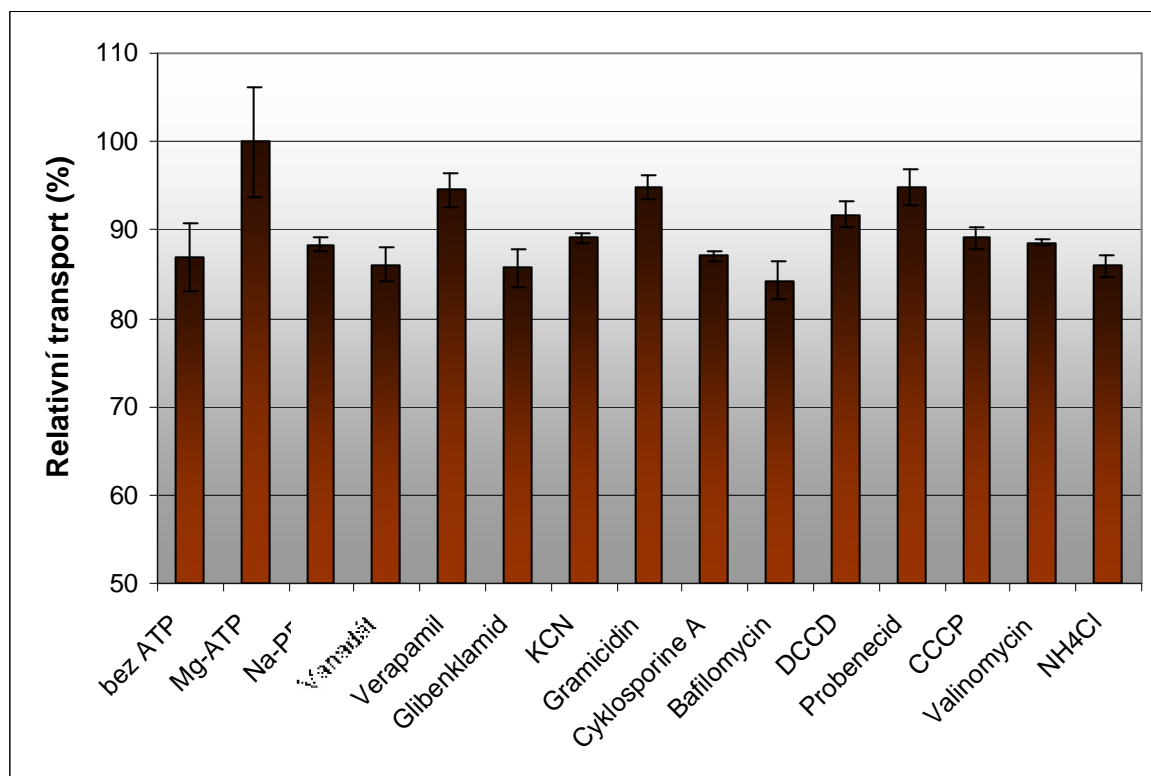
Obr. 28. Porovnání transportních charakteristik ajmalicinu a berberinu na vakuolární úrovni katarantu růžového



Další možné substráty vakuolárního ABC transportéru, které byly testované, jsou tryptamin, chinin (Roytrakul, 2004) a kyselina skořicová. V případě intermediátu biosyntézy terpenových indolových alkaloidů, tryptaminu, i v případě exogenní látky pro katarantus, alkaloidu chininu, byl vyloučen způsob transportu pomocí vakuolárního ABC transportéru.

Podle reakcí s inhibitory je odhadováno, že obě látky jsou ve vakuolách akumulované s pomocí takzvaných V-ATPáz, což je souhrnné označení pro vakuolární membránové pumpy energizované pomocí ATP (Roytrakul, 2004). Akumulace kyseliny skořicové, jak je znázorněno v grafu 29, je závislá na ATP jako zdroji energie a je ovlivněna inhibitory rozrušujícími DpH a Dy na membránovém rozhraní. Největší inhibiční efekt na transport skořicové kyseliny má bafilomycin, což je specifický inhibitor vakuolární ATPázy. Po posouzení efektů ostatních inhibitorů usuzujeme, že kyselina skořicová je transportována do vakuol převážně pomocí V-ATPáz. Nicméně transport pomocí ABC transportéru/ů nemůže být zcela vyloučen. Potentní ABC inhibitor *ortho*-vanadát, stejně jako glibenklamid mají přibližně stejný inhibiční efekt jako NH<sub>4</sub>Cl, rušič DpH na membránovém rozhraní.

Obr 29. Charakteristika mechanismu akumulace kyseliny skořicové v izolovaných vakuolách katarantu růžového na základě inhibičních studií



Z uvedených látek, které byly testované jako možné substráty pro vakuolární ABC transportér/y, se ajmalicin jeví jako modelová látka pro tento transportér, s inhibicemi u jednotlivých efektorů až 50 %. Ostatní testované látky, ať už endogenního či exogenního původu nejsou specifickými substráty katarantového vakuolárního ABC transportéru, přestože některé s vybranými ABC-inhibitory mírně interagují. Míra inhibice u těchto „substrátů“ dosahuje maxima okolo 15 % a inhibitory se stejným výsledným efektem, např.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a gramicidin, nemají stejnou inhibiční úroveň.

Co se týká charakteristiky mechanismu transportu berberinu do vakuol katarantu, není z inhibičních studií možné jednoznačně určit typ transportéru. Akumulace berberinu ve vakuolách nereaguje výrazněji na žádný z použitých inhibitorů nebo modulátorů transportu a je rezistentní k podávaným zdrojům energie. Možnost transportu berberinu do vakuol pomocí nespecifické permeace, difúze, nesmíme opomenout. Avšak vzhledem k masivnosti molekuly berberinu a kvantitativně srovnatelnému množství akumulovaného berberinu a ajmalicinu ve vakuolách za jednotku času, zdá se tato hypotéza málo pravděpodobná. Rychlost difúze látky o molekulové hmotnosti 336,366, navíc v přítomnosti ionizované i neionizované části molekul, nelze porovnávat s rychlostí transportu pomocí energeticky dotovaného specifického transportéru. K objasnění transportního mechanismu berberinu na vakuolární úrovni je třeba více detailní studie využívající například techniky značení molekuly berberinu.

Z našeho pokusu vyplývá, že ABC transportér/y v tonoplastu katarantu nemají širokou substrátovou specifitu, jak je tomu obecně u některých ABC transportérů nalezených v *Arabidopsis* (Higgins, 1992; Rea *et al.*, 1998). Katarantové tonoplastové ABC transportér/y pravděpodobně využívají jistou neznámou strategii ve výběru substrátu, jelikož netransportují výhradně endogenní produkty, ani se nespecializují na xenobiotika (detoxikace). Ani molekulová hmotnost pravděpodobně nehraje zásadní roli ve výběru substrátu, rozdíl mezi

molekulárními hmotnostmi ajmalicinu a berberinu je pouze 16. Jsou publikované zprávy o transportu jak masivních tak malých, třeba i iontových molekul pomocí ABC transportérů (shrnuto v Rea *et al.*, 1998). Otázka funkce ABC transportérů ve vakuolárním systému rostlin je stále neobjasněna.

Tabulka 4. Přehled inhibitorů transportu a jejich efekt na akumulaci berberinu v izolovaných vakuolách katarantu růžového

Modulátor	Koncentrace	Mechanismus účinku	Berberin (% ke kontrolní skupině)
Kontrolní			100 ±8,19
Ortho-vanadát	1 mM	ABC inhibitor	97,01 ±1,53
Glipizid	150 mM	MRP inhibitor	88,06 ±3,17
Glibenklamid	150 mM	MRP inhibitor	94,04 ±5,10
Verapamil	1 mM	MDR inhibitor, blokátor Ca <sup>2+</sup> kanálu	103,73 ±4,83
Cyklosporin A	100 mM	MDR inhibitor	104,92 ±7,19
KCN	10 mM	Inhibitor syntézy ATP	120,91 ±3,71
Probenecid	1 mM	Blokátor aniontového kanálu	98,94 ±4,44
DCCD	2 mM	Blokátor protonového kanálu	103,94 ±0,80
Bafilomycin A1	1 mM	Blokátor V-ATPázy	97,40 ±4,22
CCCP	5 mM	DpH inhibitor	102,87 ±6,05
NH <sub>4</sub> Cl	10 mM	DpH inhibitor	102,66 ±3,76
Gramicidin	10 mM	DpH inhibitor	105,64 ± 7,40
Valinomycin	5 mM	Dy inhibitor	100,20 ± 4,54

## 5.2. Transgenoze suspenzní tkáňové kultury katarantu růžového

### 5.2.1. Klonování binárních vektorů

cDNA CjMDR1

Číslo genové banky (Gene bank accession number) AB043999

```
1   cctttataag ctcaaaacaa aatgtacaaa atctacagaa cttttatatt cccataactg
61  tgtaactgtg taagctgtaa ataacctttt cattagttgg cacattgaac attggagtgg
121 taggaacatg gccgaagaaa atggccttgg tggatgatcta aacaaccacc aagcgactgc
181 atcaacaagt aactcgcctg tacaaggtgc aaatggaacc tcagaaacaa aaggtgcccc
241 ggaaaaatca gaaaagagca aggaagaaga gaagattggg caaagtgttc catattacaa
301 gctattatcc ttcgcagact caaaagatgt tttgctcatg gtcattggca caattgcagc
361 tgttgccaat ggagcgtcca tgctcttctc gactcttctc cttggagatc tgatcaacgc
421 atttggacaa aatgcaaaaca acacagatac acttcgtgta gtttccaagg tagctctaaa
481 atttgtttat ttgtctattg gagctgggtg tgcatcattc ttccaggtag catgctggat
541 ggtcacaggg gagagacaag ctgcaagaat aaggagttaa tacttgaaaa ctatactgag
601 gcaagatgtc gctttctttg ataaagaaac aaacacgggt gaagtgtttg gaaggatgtc
661 tgggtgacact gttcttattc aagatgccat tggggagaag gttgggaagt tcatacagct
721 attttcaaca ttcataaggag gtttttaaat agcattcgtc aaaggggtggc tcctcacctc
781 tgtcatgttg acctccatac ctctcttctg gttctgtggg gcactcatga ccattactat
841 atccaagatg gcatctcgtg gacaagtgtc ttactcccaa gcagggattg ttgtcgaaca
901 gacgattggc tcaatcagga ctggtgcatc atttactggg gagaagcatg ctgttaccba
961 gtatgaaaag tacctaaaca aggcttactt ggctggtata cacgagggcc tagctagtgg
1021 agtaggtctt ggttcagttc tgttagttat tttttgtagc tatagtttgg ctgtagggtt
1081 tgggtgaaaag atgataattg aaaaaggcta taatggagga aatgtcataa acataattgt
1141 tgctgtggtg accgggtcca tgtctctggg gcaggcatct ccatgcttgg gtgcatttgc
1201 cgctggacaa gctgccgcat ataagatgtt agagaccata aagagaaaac cagagataga
1261 ttcttatgac accagtgggc acaaatcaga tgatatccgt ggagatatcg agttaagggg
1321 tgtttccttc acttatccag ctgaccaga tgagcaaata ttcaacggat tctctctctt
1381 tatccctagt ggcacaacat ccgctttggg gggccagagt ggaagtggaa agtcaacagt
1441 aatcagtcta atagagagat tttatgatcc ccaagctgga gaagtcttta tagatgggtg
1501 aatctgaaag gactttcaac tgagatggat cagagggaaa attggtcctg tcagccagga
1561 acctgtgcta tttgcctcaa gtattagaga taacattgcc tacgggaaag atgggtgcaac
1621 tgttgaagaa attaaagctg caactgagcg tgctaatgct tccaaattca tagacaaact
1681 gcctcagggg ctggacaccc tgggtgggtg gcatgggact cagctctctg gggggcaaaa
1741 acagagaatt gccatagcta gagcaattct caaagacca cgaattctgc ttttagatga
1801 agctactagt gcacttgatg cagaattctg gcacattggt caggaggcat tttagataat
1861 catggtcaat agaactaccg taattgtcgc ccatcgttta agtaccgtga ggaatgctga
1921 tactattgct gtcattcatc gaggaagat cgttgaaaaa ggttcgcatac tggacctcct
1981 gttgaatcct gatggagcat actgccagct tatacgctta caagaaatag gcagaagtga
2041 agtggacaaa gcagaaaatg tagagtcagg cctaaattca agccaacaac actctattgg
2101 acgatcaata agccgaggat catcaggggt tggaaacagt agccgccact cgttttcagt
2161 ctcgtttggg cttcctacgg ggcatattta tgaaactaca gcaggtcctg aatccacttc
2221 tccagcacct attggacaga cacaggaagt tccacttcgt cgccttgcca ctctcaacaa
2281 gccagagata cctgttctac tacttgggtg catactgca atgggtcaatg gagtcatatt
2341 cccaatattt ggtgtactac tttcgagtgt gattaaaaca ttttatgagc cagaagacaa
2401 gcttcggaaa gacactagat tttgggcatt tatgtttatc atccttggcg tggcatcatt
2461 tgttgctgca ccagccacgg catacttctt tgctgtagct ggtttagat taatacaacg
2521 gattcgatcc atgtgtttca ggacgggtggc tcacatggag atcgactggg tcgatgagcc
2581 tgaacacgct agcgggtgcaa ttgggtgcaa gctctctgca gatgcatcta cagtgcgagg
2641 tttggttggg gatgactag ctcttcttgt tcaaaatgca gctactgccg tttgtggttt
2701 ggttattgct tttgtggcaa actggacatt ggctctcatc attcttctct tgatacccct
2761 tataggagtc aatggatatg tccaaatgaa gttcatgaaa gggttcagtg cggatgcaaa
2821 gatgatgtac gaggaagcaa gtcaagtctc taacgatgca gttgggagta taaggacagt
```

```

2881 tgcttctttt tgcgctgaag agaaggtgat gcaactgtac aaaaagaagt gtgaaggccc
2941 aatgaagaca gggataagac aggggttgat cagtggaatt ggatttgga tttccttttt
3001 cttggtggtt aacgtctatg caaccagttt ctatgctgga gcccgctctt tgatgctgg
3061 caaaacaaca ttttctgacg tattcagggg tttcttcgct cttacaatgg ccgctcttgg
3121 gatttctcag tcaagctccc ttgctcctga ttccagtaaa gccaagagtt cactgcttc
3181 tataatttggg atcctcgaca ggaaatcaaa gatagattca agtgatgagt ccggaatgac
3241 agtagaaaat gtaaaggcg aaattgagct tcggcacatc agtttcaagt atccaacaag
3301 gcccgacatt cagattttta gggaccttag cttggctatt cattctggca agacggttgc
3361 tctggttggg gagagtggga gtggaaaatc gacagtcac tcggtgctgc aaagatttta
3421 tgaccctgat tcaggtcata ttacgctaga tggcatagaa attcagaagt ttcagttaag
3481 gtggttgagg ctgcagatgg gtctggtgag ccaggaacct gtattattta atgagacaat
3541 ccgagccaac attgcatacg gcaagggaagg agatgcaaca gagacagaaa ttttagctgc
3601 agctgaacta gcaaatgcac acaagttcat tagtggatta caacaggggt atgatacagt
3661 agttggagag agaggaattc agttatcggg agggcagaag caacgtgtgg caattgcacg
3721 tgctatggta aaagctccga agatattact actagatgaa gcaacaagt cacttgatgc
3781 agagtccgaa cgagtggttc aagatgcttt ggacaaagtc atggtgaacc ggactactgt
3841 ttgggtagcc caccgattat cgacaataaa gaatgcagat gtaatcgag ttgttaaaaa
3901 tggggttatc gctgagaagg gaaagcacia tgatttgatt aatgtcaagg atggagttta
3961 tgcttcattg gtagcgcttc acacaagtgc tcatgatga ggttgcaatt ttaattttcg
4021 ctatgcattt tttccgacaa atttttggt ttgtttttcg gtgtacatta ccatcgactt
4081 tacccttact ttggatttgt atacgaaagg cagtgtaatt ttctgatgaa taaaaagag
4141 gcatggaaga gaaaaagctt ccgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```

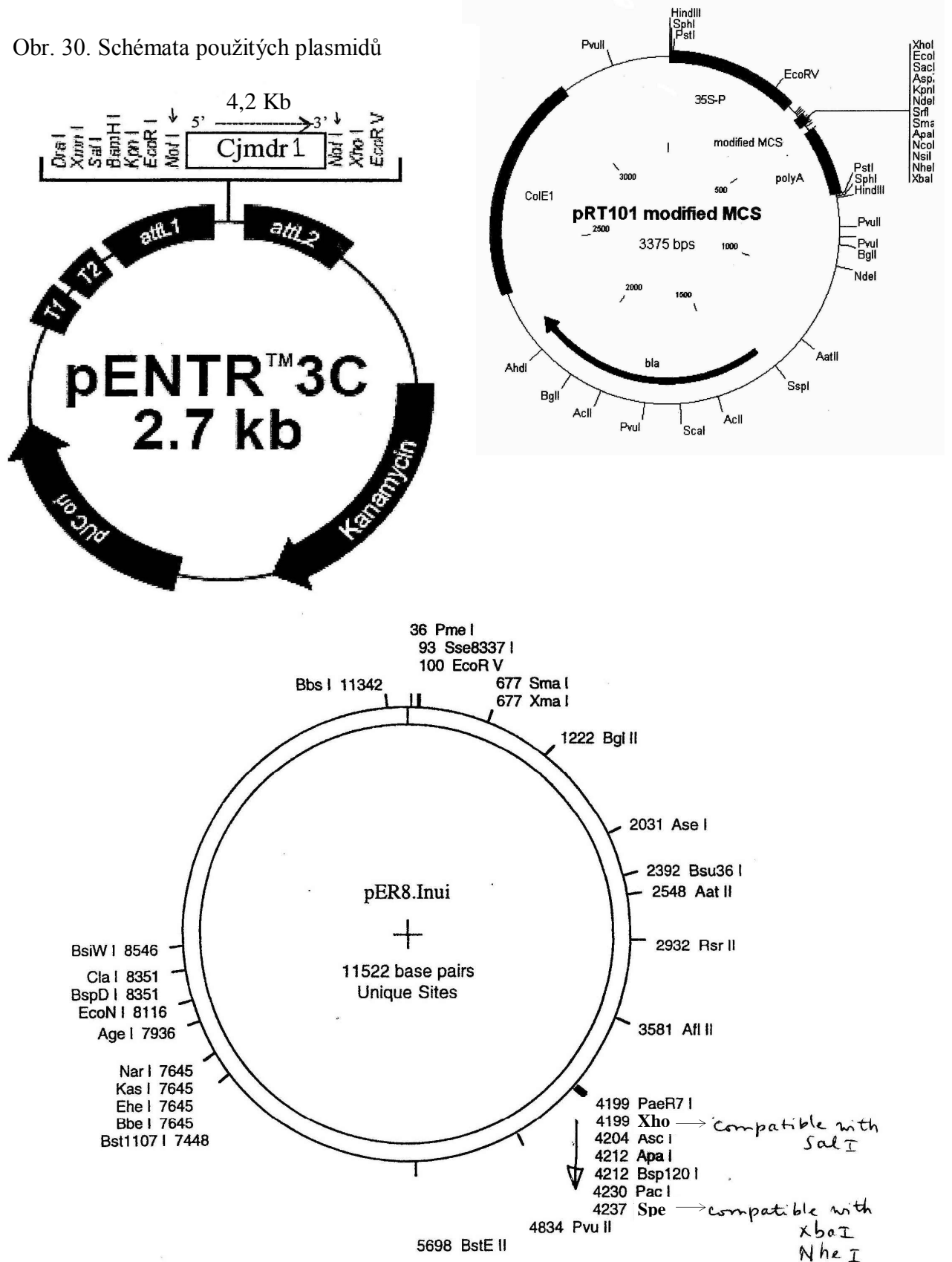
Binární vektory byly připravovány jak je popsáno v materiálech a metodách. Jelikož cílový gen CjMDR1 patří mezi poměrně objemné, 4,2 Kb, není klonování jednoduchou záležitostí a mnoho parametrů ligace muselo být optimalizováno. Hlavní nevýhodou je u velkého úseku DNA malý poměr „lepivých konců“ k celkovému objemu DNA a tudíž díky vyšším prostorovým strukturám DNA nižší pravděpodobnost ligace v porovnání s malými fragmenty. Také výběr restričních enzymů, jejichž štepivé místo se v objemné DNA vyskytuje jen jednou, je limitován. To je i důvodem proč fragment (CjMDR1) musel být štěpen enzymy XhoI a Sall a insertován do vektorů (pRT101, pER8) štěpených pouze XhoI enzymem. Sall a XhoI enzymy jsou kompatibilní.



Pro zvýšení pravděpodobnosti úspěšné ligace byl použit matematický vzorec (viz materiál a metody), který respektuje velikost insertu a vektoru a upravuje tak množství DNA (ng) použité k ligaci. Teoreticky by měl být dostačující poměr lepivých konců 1:1, v praxi se

doporučuje 2-5ti násobný nadbytek fragmentu. Tento násobek byl také předmětem optimalizace. Dalším faktorem, který může ovlivňovat úspěch ligace se zdá být ligační pufr.

Obr. 30. Schémata použitých plasmidů



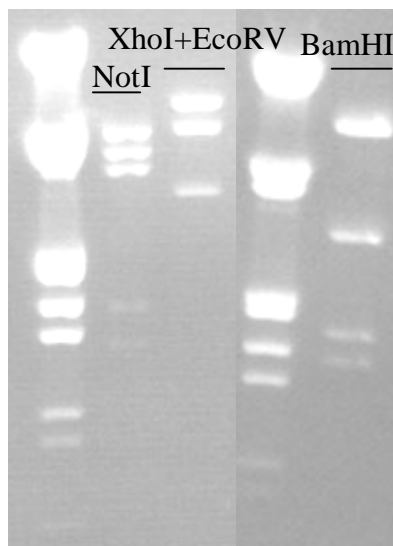


Dodavatel nabízí kvalitativně mírně odlišné tzv. 10x a 2x ligační pufry. Také experimentálně ověřené teploty ligace jsou 4 °C (10x pufr, přes noc), 16 °C (2x pufr přes noc) a pokojová teplota (10x pufr několik hodin). Všechny tyto parametry včetně jejich kombinací byly testovány. Další limitací úspěšného klonování je šance 1:1, že insert bude ve vektoru v opačné orientaci.

Nakonec byl získán konstrukt pER8+CjMDR1 za podmínek 10x ligační pufr, 4 °C přes noc, pětinasobek insertu vůči vektoru a konstrukt pRT101+CjMDR1 s 10x ligačním pufrem, 16 °C přes noc a čtyřnásobným množstvím insertu proti vektoru.

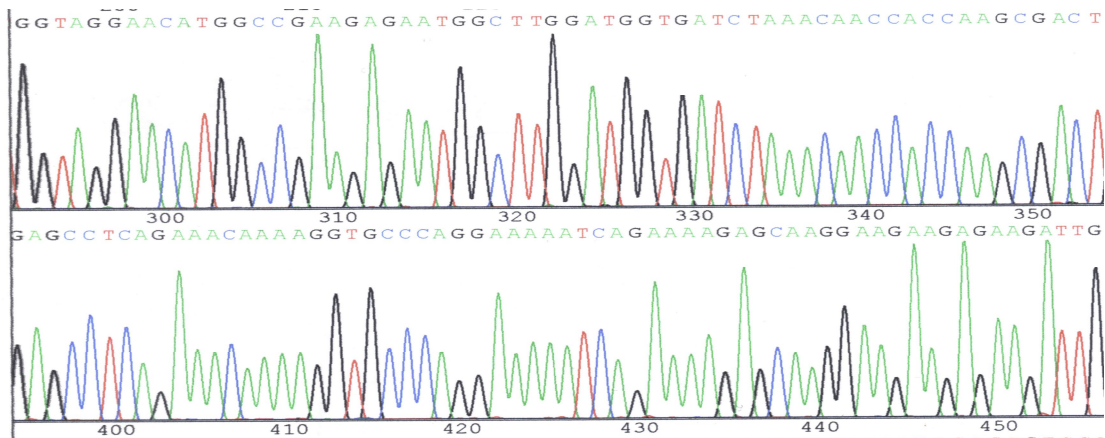
V případě pER8+CjMDR1 byly možné konstrukty nejprve štěpěny enzymy EcoRV/XhoI s předpokládanými restričními fragmenty 7420 bp, 5397 bp a 2900 bp. Pozitivní klon byl dále podroben sérii kombinací restričních enzymů: NotI (5200, 4200, 3500, 1500, 1300 bp), BamHI (8500, 3200, 1722, 1686, 521, 104 a 58 bp), EcoRV (10317 a 5397 bp), XhoI+EcoRV (7400, 5500 a 2900 bp). Pro porovnání fragmentů na gelu byl štěpen i prázdný plasmid pER8 příslušnými enzymy (viz obr 31). Pro absolutní ověření správnosti klonu byl tento poslán na sekvenování.

Obr. 31. Kontrolní štěpení pER8+CjMDR1. Demonstrace fragmentů získaných štěpením konstruktů enzymy NotI, XhoI/EcoRV a BamHI.

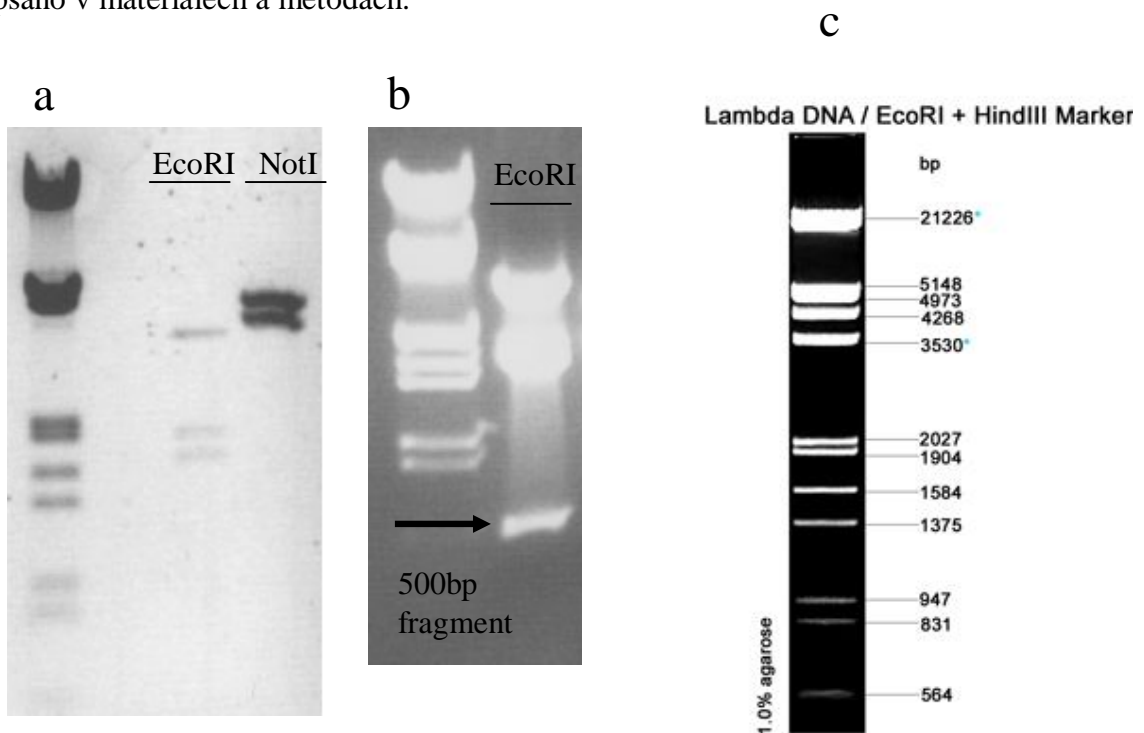


V případě pRT101+CjMDR1 byly možné klony nejprve štěpeny NotI s předpokládanými fragmenty 4,2 Kb, 3,3 Kb. Pro ověření orientace byl slibný klon dále štěpen pomocí enzymu EcoRI (3,3 Kb, 1,89 Kb, 1,78 Kb a 0,5 Kb) viz obr. 33.

Obr. 32. Úsek sekvenčního grafu konstruktů pER8+CjMDR1



Obr. 33. Kontrolní štěpení pRT101+CjMDR1 s NotI restričním enzymem (a) a s EcoRI enzymem (a, b - zvýrazněný 500bp fragment nepostřehnutelný ve více vyvinutém gelu). Ve všech elektroforézách je používán marker (c) připravený z naštěpené Lambda DNA jak je popsáno v materiálech a metodách.



### 5.2.2 Optimalizace bombardování buněk částicemi kovu

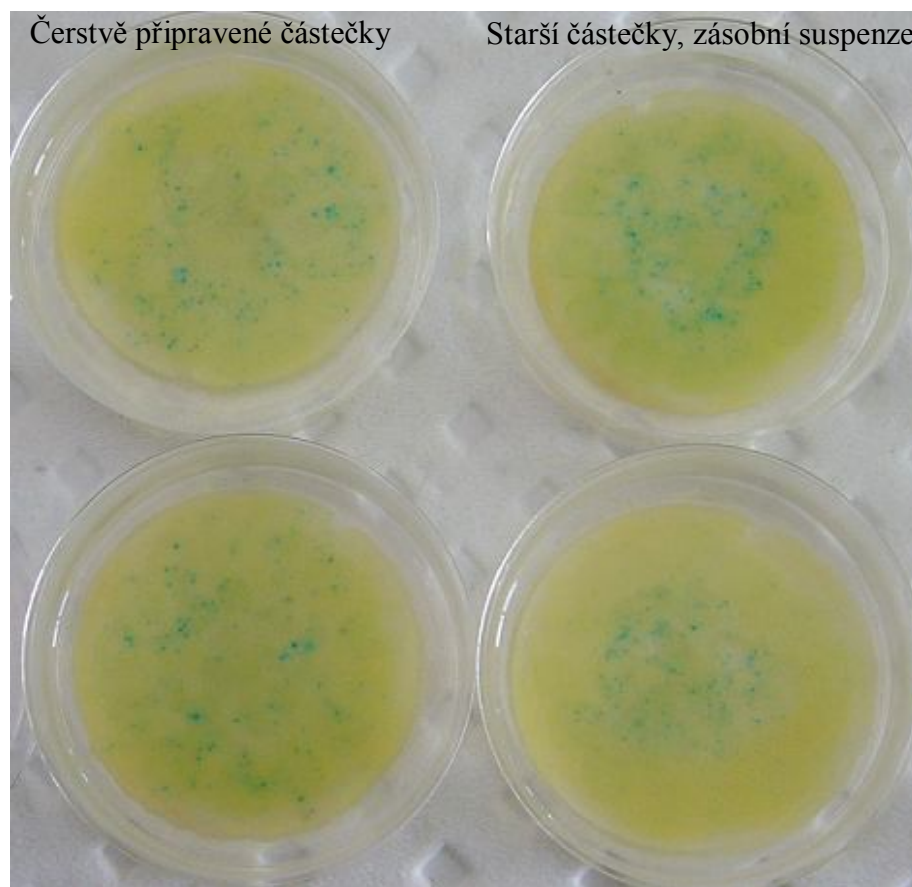
Aby bylo docíleno optimálních podmínek pro bombardování, byly nejprve testovány faktory jako jsou objem tkáňové suspenze, který pak tvoří vhodnou sílu buněk na filtračním papíře, vlhkost buněčné vrstvy (viz materiál a metody) a kvalita připravených wolframových částic. Výsledkem bylo pipetování 4 ml buněčné suspenze. Po filtraci se buňky nechaly v laminárním boxu několik hodin takzvaně odpočinout, což způsobilo lepší přilnutí buněk na whatmanův papír a vyrovnání vlhkosti v buňkách s vlhkostí zpevněného media, na které byly i s papírem umístěny. Nedošlo potom k rozptýlování suspenze do vakua při výstřelu. V předběžném testu byly částice wolframu obaleny konstruktem pro transientní expresi (GUS). Druhý den po transgenozí byly buňky vystaveny působení reakčního činidla (viz metody) a vizuálně hodnocena úspěšnost transformace (viz obr. 34).

K samotné transgenozí suspenzních kultur katarantu růžového byly použity následující konstrukty: pER8+CjMDR1, pER8+GFP (připraveno laborantem v Clusius laboratorij, Leiden), pRT101, pRT101+CjMDR1 (poslední dva zmiňované plasmidy byly při bombardování kombinovány s plasmidem pSDM1501 (= pGL2) nesoucím resistencí vůči hygromycinu).

Transgenní kalusy a následně suspenzní kultury byly získány jak je popsáno v metodách.

Efektivnost transgenozí byla podstatně nižší než zmiňuje Ondřej a Drobník (2002), většinou se pohybovala do deseti resistantních kalusů na Petriho miskě.

Obr. 34. Vizualizace kvality kovových částek a celkové úspěšnosti transgenozie mikroprojektilovým bombardováním



### 5.3. Ověření exprese transgenu

Po dosažení částečně stabilní (stále vyvíjející se systém) suspenzní kultury byla z obou druhů transgenních suspenzí v polovině růstové křivky extrahovaná RNA. U XVE systému (konstrukt s pER8 plasmidem) byl navíc předem systém 16 hodin indukován estradiolem (10  $\mu$ M finální koncentrace) a pro odstranění případného falešně pozitivního signálu byla provedena také „indukce“ rozpouštědlem estradiolu, DMSO.

### 5.3.1. Northern blotting

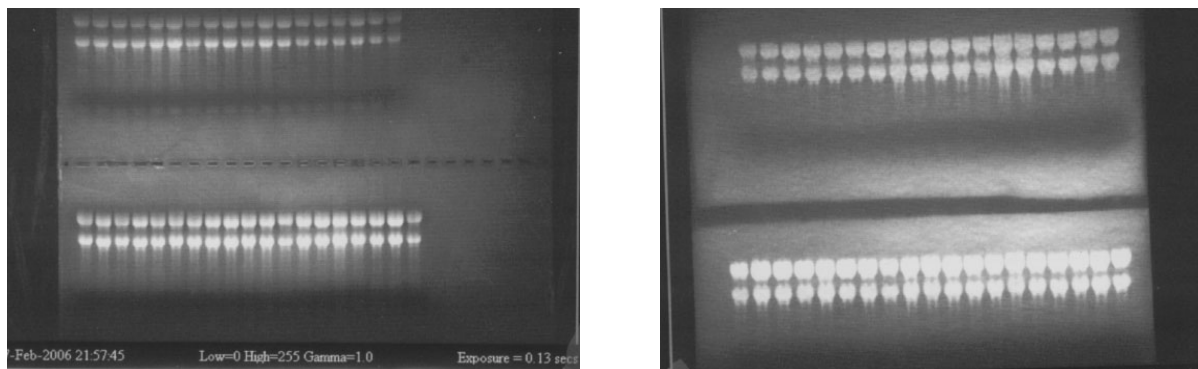
Izolovaná RNA byla podrobena hybridizaci (Northern blotting) jak je popsáno v metodách.

Ze zásobního plasmidu pENTR 3C+CjMDR1 byl pomocí enzymů XhoI a EcoRV vyštěpen CjMDR1 fragment o velikosti 2,9 Kb, který byl použitý jak templát, pro přípravu hybridizační sondy (fragment byl vyříznutý z agarózového gelu, purifikovaný Quiagen kitem a koncentrace DNA byla ověřena). Templát pro GFP byl připraven laborantem. Oba oligonukleotidy byly podrobeny značení radioaktivním fosforem ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP) a značená sonda purifikovaná na koloně (podrobněji v metodách).

Po hybridizaci byly membrány kontrolovány autoradiograficky. Bohužel se nepodařilo žádný výrazný signál zaznamenat a to ani u jednoho konstruktů obsahujícího gen zájmu. Byly sledovány pouze 3 signály ze 20 testovaných kontrolních linií GFP. V první řadě bylo testováno celkem 27 transgenních linií konstruktů pER8+CjMDR1, a 20 linií konstruktů pRT101+CjMDR1. V následující sérii bylo testováno dalších 45 linií pER8+CjMDR1, 7 linií pER8+GFP a 48 linií pRT101+CjMDR1. V případě konstruktů pRT101+CjMDR1 byly po dlouhé expozici pozorovány 2 velice slabé signály, téměř splývající s pozadím. Jednalo se o linie 60 a 39. Pro špatnou rozlišitelnost vůči pozadí to za jasný důkaz exprese transgenu nepovažujeme.

U XVE systému může být nepřítomnost signálu způsobena nedostatečnou indukcí promoteru estradiolem. Možná je třeba i delší doba indukce pro akumulaci mRNA v našich podmínkách. To by vysvětlovalo i poměrně malou odezvu v kontrolním GFP signálu. Proto byl designován experiment s induktorem přítomným 1, 2 a 3 dny. Po hybridizaci byl opět sledován pouze signál u GFP linií a tento byl nejintenzivnější první den po indukci, postupně se intenzita signálu snižovala.

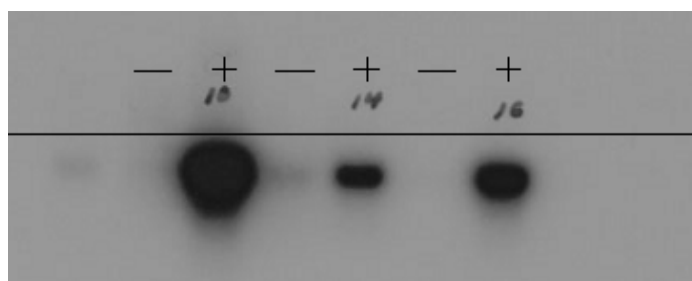
Obr. 35. Příklad RNA gelu a membrány s přenesenou RNA (Northern blotting). Vizualizace a kontrola kvality i množství RNA v gelu pomocí ethidium bromidu



Obr. 36. GFP signál v XVE systému

(+) indukce systému estradiolem,

(-) indukce systému DMSO.



Další faktor, který by mohl být limitující, je kvalita značené sondy. Experimentálně je ověřeno, že čím větší oligonukleotid je použit jako templát pro syntézu sondy, tím je náročnější hybridizace i značení radioaktivním nukleotidem. Byla tedy testována 1 Kb sonda získaná vyštěpením ze zásobního plasmidu (pENTR 3C+CjMDR1) pomocí enzymů BamHI/NotI. Do RNA gelu byl kromě RNA vzorků nanesen velmi zředěný vzorek DNA CjMDR1 a membrána podrobena hybridizaci. Jedinný signál na filmu po autoradiografii byl masivní DNA signál kontrolního genu CjMDR1 sledovaný již po krátké expozici.

Jelikož se zdá, že mRNA transgenu je přítomna jen ve stopových množstvích a intenzita signálu je tak na hranici detekčního limitu Northern blottingu, bylo pokus opakován s dvojnásobným množstvím RNA (tzn. 20 µg). Ani poté nebyl žádný signál zaznamenán.

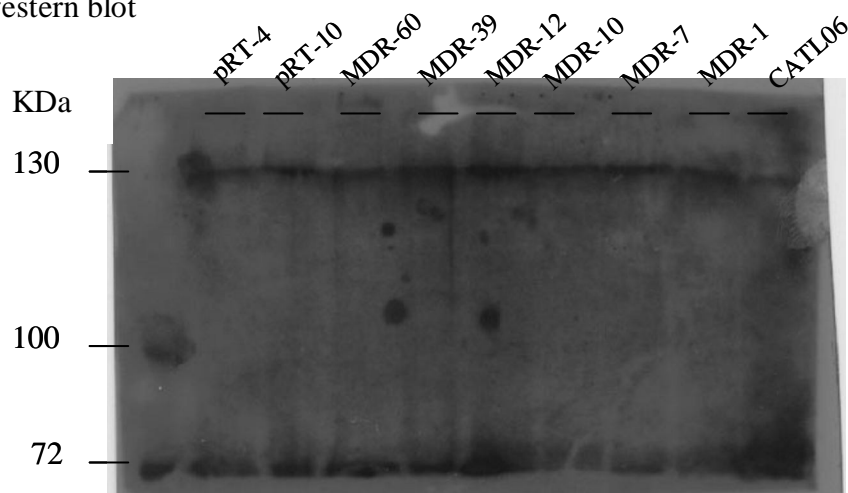
Z výsledků Northern blottingu usuzujeme, že transgenní linie vykazují buď velice nízkou transkripci transgenu, která není detekovatelná Northern blottingem, a/nebo dochází k takovým posttranskripčním úpravám včetně degradace, které už neumožňují detekci mRNA

CjMDR1 Northern blottingem. Možná Northern blottingem nedetekovatelná mRNA nutně neznamená nepřítomnost funkčního transportéru. Jelikož kromě cDNA jsme z Japonska obdrželi i specifické protilátky proti proteinu jež je produktem CjMDR1 genu, selekce nejaktivnějších transgenních linií byla dále plánovaná pomocí Western blottingu. „Gene silencing“ efekt v případě použití XVE systému vylučujeme.

### 5.3.2. Western blotting

Protože XVE systém je podstatně sofistikovanější a více faktorů může hrát regulační roli při transkripci a následné translaci, rozhodli jsme se pokračovat dále pouze s vybranými dobře rostoucími kulturami (na hygromycinovém selekčním mediu) konstitutivní exprese transgenu. Z 13ti těchto linií byly izolovány celkové proteiny, stejně tak jako ze 4 linií získaných bombardováním buněk prázdným vektorem pRT101 a jedné linie nativního katarantu růžového. Vzorky proteinů byly aplikovány do diskontinuálního akrylamidového gelu, gel vyvinut a proteiny elektroforeticky přeneseny na membránu. Ta byla hybridizována s protilátkami a signál byl vizualizovaný luminiscentně (viz metody). Bohužel protilátky pravděpodobně nejsou dostatečně specifické anebo katarantus obsahuje ABC transportér/y blízce příbuzné našemu transgenu. Očekávaný signál byl viditelný ve všech aplikovaných vzorcích, transgenních, kontrolních transgenních i divoké kultuře. Vzhledem k tomu, že *Arabidopsis* obsahuje okolo 135 zatím známých genů ABC transportérů, je možné, že katarantus obsahuje také větší počet ABC transportérů a některý je blízce příbuzný CjMDR1. Míra shody těchto transportérů je taková, že katarantový ABC transportér dává falešně pozitivní signál s protilátkami proti proteinovému produktu CjMDR1. Pokus byl několikrát opakován se stejným výsledkem.

Obr. 37. Vizualizovaný western blot



Kromě růstu linií na selekčním antibiotikovém mediu dosud nemáme žádný pozitivní důkaz, že linie skutečně obsahují náš transgen. Jednou z dalších metod důkazu a podle Lattenmayer *et al.* (2007) i Dean *et al.* (2002) daleko citlivější než Northern blotting, je metoda PCR.

### 5.3.3. PCR, RT-PCR

Pro PCR byla izolovaná RNA a genomová DNA. RNA byla konvertovaná na cDNA jak je popsáno v metodách. Také design specifických primerů je popsán v metodách. Neoptimálnější PCR podmínky našeho systému byly pokusně stanoveny na:

#### PCR směs pro 3 vzorky

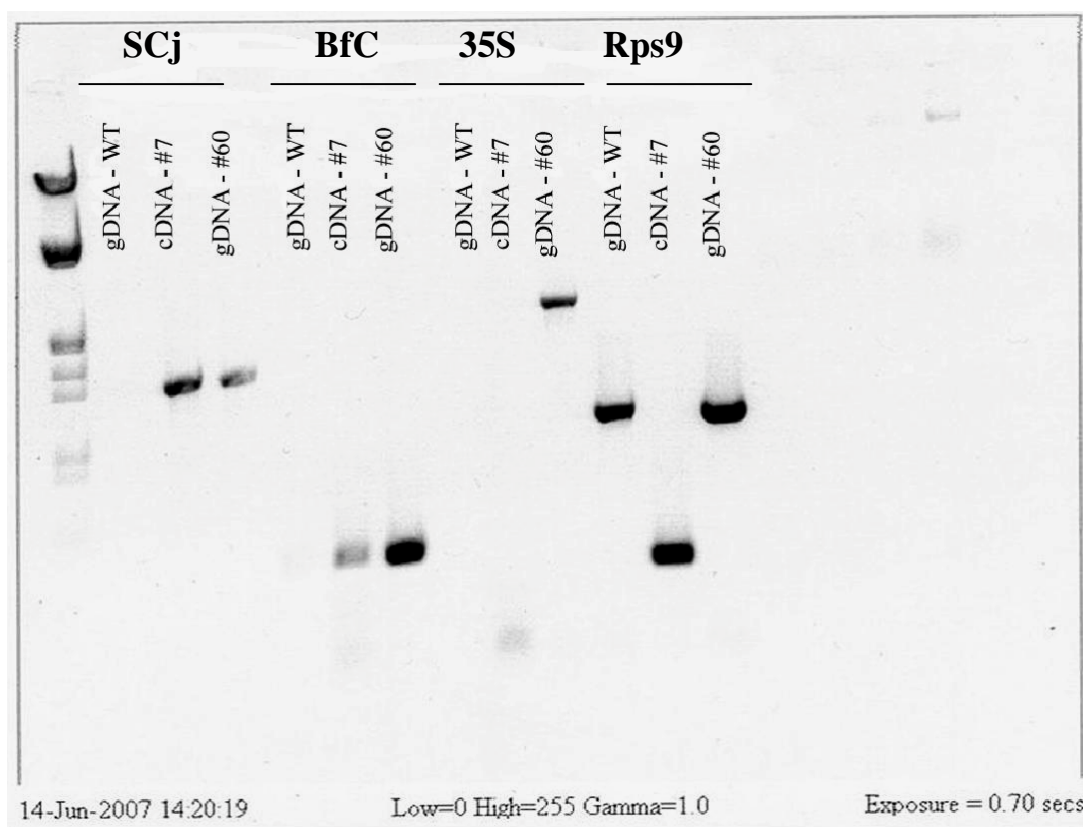
15 µl	10x Taq pufr
3 µl	dNTPs (10 mM)
3 µl	primer Fw (20 pmol/µl)
3 µl	primer Rv (20 pmol/µl)
1,5 µl	Taq polymeráza (2 U/vzorek)
9 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
112,5 µl	H <sub>2</sub> O



### Nastavení termocyklu:

Počáteční denaturace	95 °C	2 min	
Denaturace DNA	95 °C	45 sec	} Tyto kroky se opakovaly ve 35 cyklech
Hybridizace primerů	57 °C	1 min	
Syntéza řetězce DNA	72 °C	90 min	
Dokončení syntézy	72 °C	7 min	

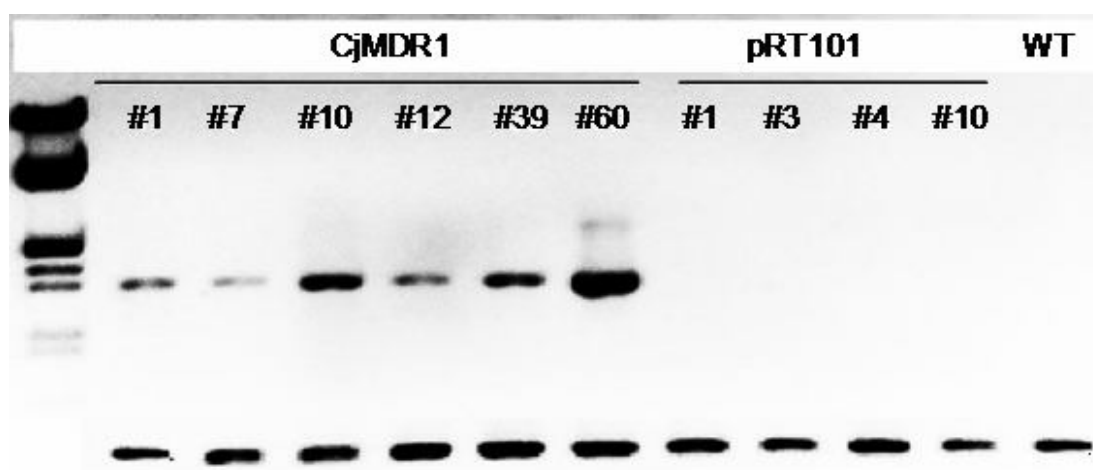
Obr.38. Test všech designovaných primerů se zástupci genomové DNA (gDNA) a cDNA při stejných PCR podmínkách. WT = divoká kultura. Zkratky přímých primerů: SCj-na začátku CjMDR1 genu; BfC-před C doménou; 35S-v 35S promoteru; zpětný primer shodný pro všechny přímé primery-v C doméně; Rps9-primery provozního (housekeeping) genu.



10 µl každé PCR reakční směsi bylo naneseno do gelu, podrobena elektroforéze a vizualizováno (obr. 38). Všechny designované primery poskytovaly za zmiňovaných PCR

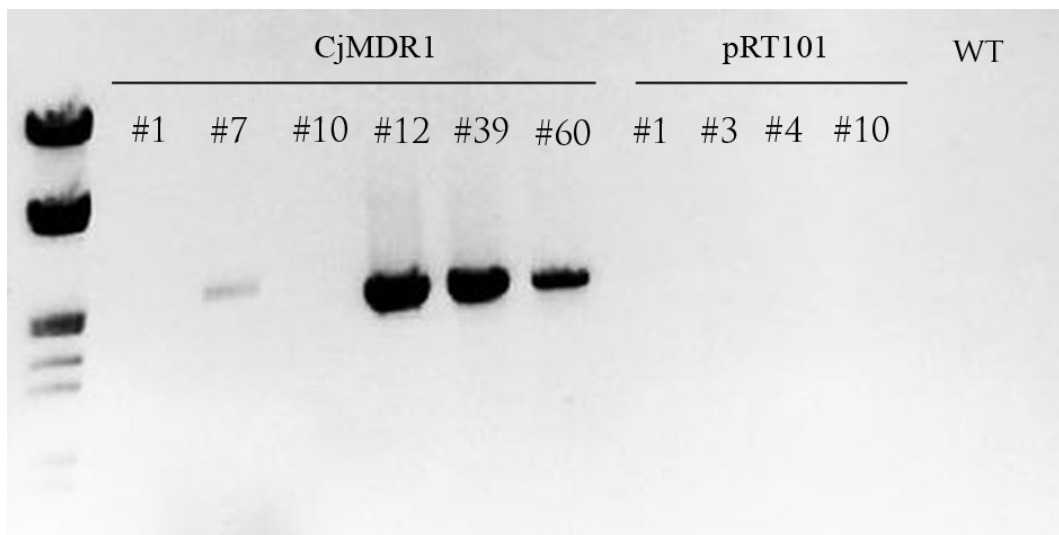
podmínek předpokládané signály se zástupci genomové DNA a cDNA divoké i transgenních kultur. Přímý primer designovaný na počátku CjMDR1 (SCj), byl vybrán pro rozsáhlejší test cDNA ze všech dostupných linií katarantu (obr. 39), zatímco genomová DNA byla testovaná s přímým primerem designovaným v 35S promoteru (obr. 40). Pro ověření kvality (a koncentrace) cDNA byla tato podrobena PCR s primery provozního genu Rps9 (obr. 39).

Obr. 39. PCR vybraných vzorků cDNA, s primery SCj (přímý primer v počátku CjMDR1, zpětný v C doméně). U transgenních linií je patrný 1367 bp signál CjMDR1, zatímco u obou kontrolních linií (pRT101 a WT-divoká linie) se žádný signál nevyskytuje. Ve spodní části obrázku je ověření kvality a koncentrace cDNA pomocí PCR s primery Rps9 proteinu.



Pomocí PCR se podařilo dokázat přítomnost CjMDR1 v našich transgenních liniích. Pozitivní signál se vyskytoval jak ve vzorku RNA (cDNA), tak v genomové DNA - až na dvě linie. To může být způsobeno extrakční metodou nebo dalšími faktory, které nebyly dále testovány a tyto dvě linie byly vyřazeny z následujícího transportního experimentu.

Obr. 40. Genomová DNA vybraných vzorků, PCR s přímým primerem v 35S promoteru. 353 bp signál je patrný pouze u 4 transgenních linií, ne však u kontrolní a divoké linie.



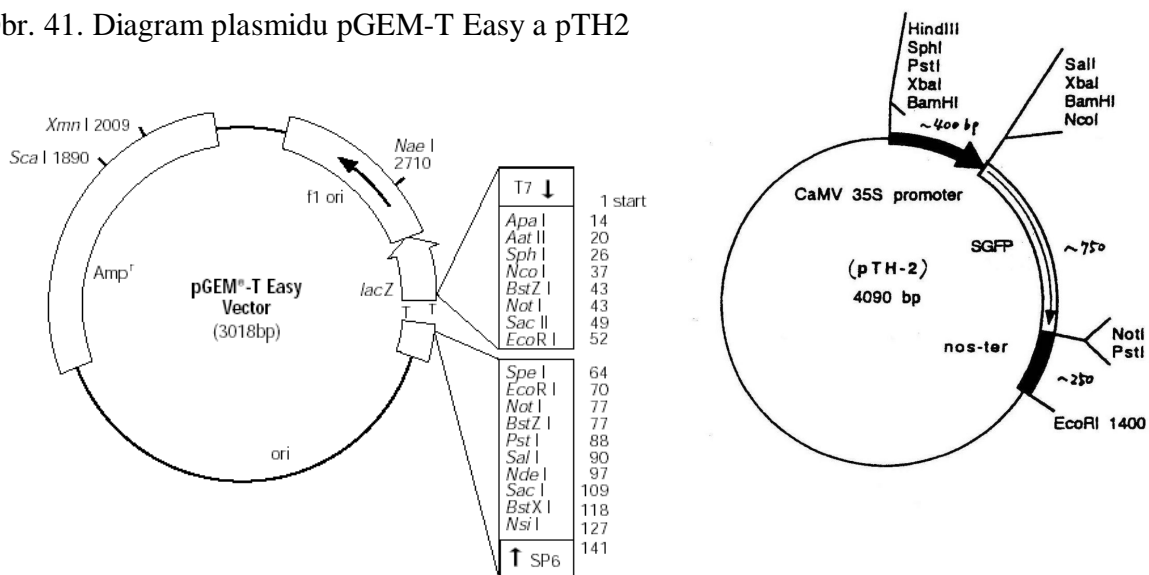
#### 5.3.4. Test lokalizace transportéru

Pro určení membrány, kompartmentu, ve které je náš transportér lokalizován, bylo nutné připravit konstrukt CjMDR1 fúzaný se signálním svítivým proteinem, green fluorescent protein (GFP). Pro vyloučení možných falešně pozitivních výsledků se doporučuje provádět fúzi jak v N-terminální tak v C-terminální části GFP. Pro tyto účely jsou k dispozici plasmidy obsahující GFP; pTH2 pro C-terminální fúzi a pTH2-BN pro N-terminální fúzi. CjMDR1 gen musí být před klonováním upraven (např. zbaven stop kodonu). Design primerů a detaily PCR jsou podrobně popsány v metodách. Teoreticky by získaný PCR produkt mohl být vložen rovnou do pTH2 a pTH2BN. Prakticky (kvůli velikosti PCR produktu) je snadnější použít pomocný plasmid pGEM-T Easy, DNA namnožit v bakteriích *E.coli* a vyštěpené fragmenty CjMDR1 vložit do cílových plasmidů s GFP.

Ligace s plasmidem pGEM-T Easy probíhala podle doporučení výrobce, pouze poměr plasmidu a PCR produktu byl předmětem optimalizace. Bílé kolonie byly podrobeny plasmid

mini preparaci a kontrolně štěpeny pomocí XhoI (4,2 Kb, 3,5 Kb). Pozitivní klony byly poté kontrolně štěpeny ještě pomocí EcoRI (1782 bp, 1893 bp, 500 bp, 3,5 Kb) a XhoI/BamHI (3,2 Kb, 1 Kb, 3,5 Kb).

Obr. 41. Diagram plasmidu pGEM-T Easy a pTH2

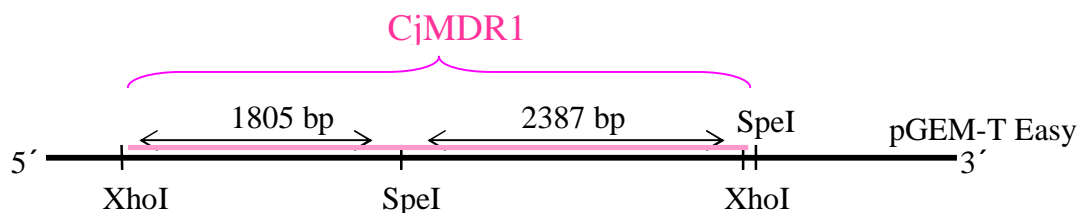


Posledním krokem bylo vyštěpit fragmenty CjMDR1 a CjMDR1 bez STOP kodonu (DSC) pomocí XhoI restričního enzymu a vložit je do připraveného vektoru pTH2 (Sall) a pTH2-BN (XhoI). Opět byly experimentálně hledány optimální podmínky klonování. Nakonec byl získán klon pTH2+ CjMDR1DSC za podmínek ligace 10x ligační pufr, přes noc při 4 °C a při pětinasobném nadbytku fragmentu nad vektorem. Protože klon pTH2-BN+CjMDR1 nebylo možné získat ani kombinací optimalizačních podmínek v několika opakováních, přistoupili jsme k postupnému klonování, tzn. nejprve byl vložen do pTH2-BN fragment XhoI-SpeI (1.8 Kb) (viz obr. 42). Úspěšné byly kombinace a) 1:4 (fragment:vektor), 10x ligační pufr, 4 °C přes noc a b) 1:4, 2x ligační pufr, 16 °C přes noc. Oba získané konstrukty byly ověřeny kontrolním štěpením pomocí EcoRI (1.8 Kb, 4,1 Kb), BamHI (400 bp, 3,7 Kb) a HindIII+EcoRI (1,15 Kb, 2,85 Kb). PTH<sub>2</sub>-BN+SpeI fragment byl použit dále jako vektor. Ze zásobního pGEMTeasy+CjMDR1 byl pomocí SpeI vyštěpen zbylý fragment (2387 bp), přečištěn a vložen do pTH<sub>2</sub>-BN+SpeI. Podařilo se získat celkem 4 pozitivní klony za podmínek a) 1:8 a b) 1:4, 10x ligační pufr, 4 °C přes noc a dva klony při podmínkách c) 1:6,

2x ligační pufr, 16 °C přes noc. Tyto byly podrobeny kontronímu štěpení s EcoRI (1,9 Kb, 1,8 Kb, 4,7 Kb), BamHI (400 bp, 4 Kb, 4,26 Kb) a XhoI/HindIII (2,4 Kb, 1,8 Kb, 1,15 Kb, 3 Kb).

Pro jistotu byly oba získané klony CjMDR1 fúzované s GFP poslány na sekvenování.

Obr. 42. Schéma sekvenčního klonování CjMDR1 do pTH2

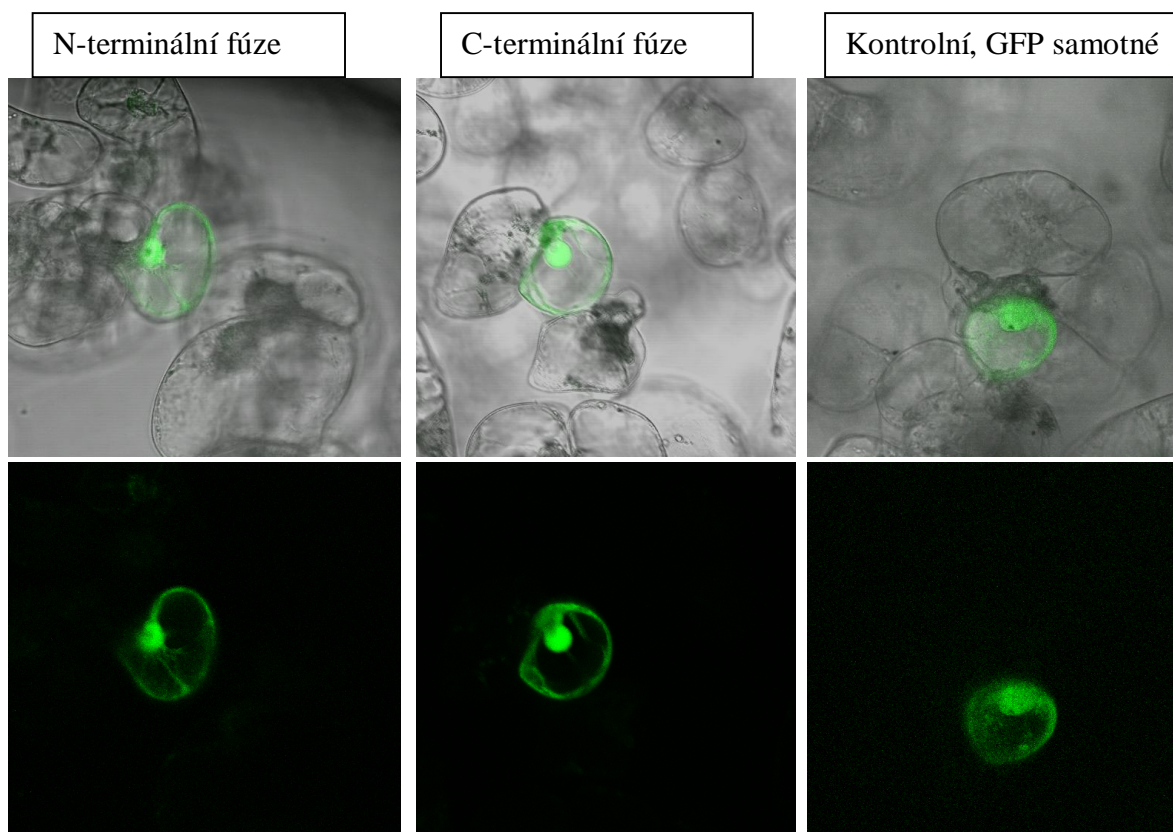


Získanými konstrukty byly poté bombardovány buňky katarantu a druhý den po transgenozí sledovaná fluorescence pod konfokálním mikroskopem. Jako kontrolní byl použit prázdný plasmid pTH2.

Jak je známo již výše, efektivnost transformace katarantu biolistickou metodou není příliš vysoká. Proto byl výběr fluoreskujících objektů pod mikroskopem limitován. Na obr. 43 je vidět distribuce proteinu jak v N-terminální tak v C-terminální fúzi s GFP, stejně jako lokalizace samotného GFP proteinu v buňce. V případě většího časového prostoru by bylo vhodné pokus zopakovat, jelikož rozdíly v lokalizaci proteinu mezi kontrolní a experimentální skupinou nejsou extrémní. Přesto lze v obou experimentálních případech (N-terminální i C-terminální fúze s GFP) pozorovat organizovanější koncentrace signálu v plasmatické membráně, buněčném jádře a pravděpodobně v tonoplastu vakuol. Usuzujeme, že transportér se v plasmatické membráně buňky nachází v přijatelném množství a podle toho budou plánovány i následné transportní experimenty. Jistě by bylo zajímavé izolovat subcelulární kompartmenty a sledovat jak se změnila transportní charakteristiky v jednotlivých organelách. Další výzvou by mohly být metabolické studie na buněčné i subcelulární úrovni, stanovení

vlivu transgenního transportéru na metabolom transgenní buňky. Tyto plány jsou bohužel nad časový rámec a tak je transportní experiment transgenních linií omezen na pohyb vybraných substrátů na buněčné úrovni.

Obr. 43. Fluorescentní signál produkovaný CjMDR1 fúzovaným s GFP



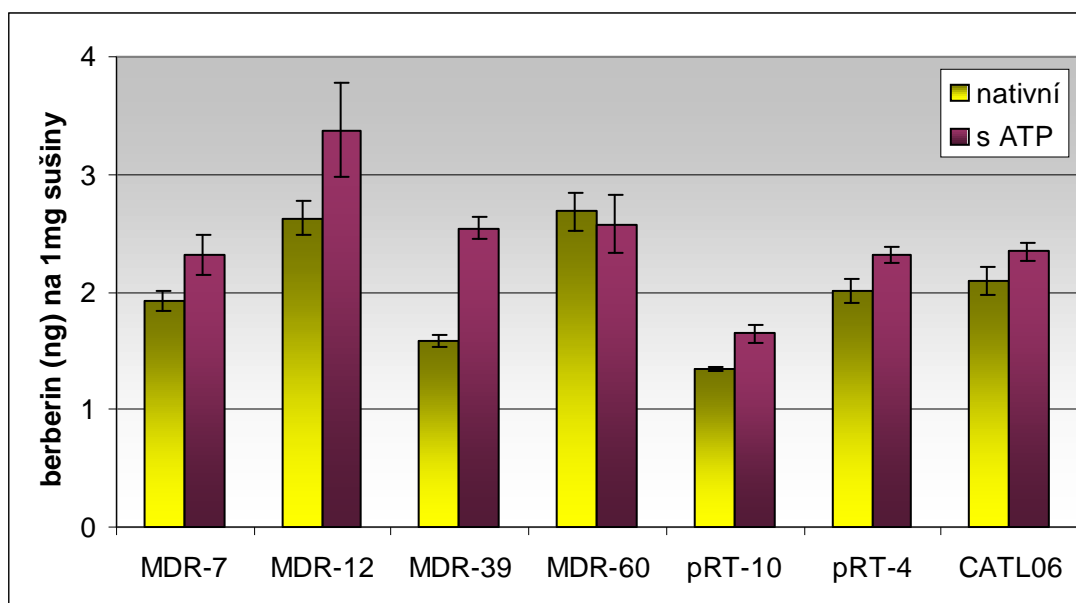
#### 5.4. Vliv CjMDR1 transportéru na transportní charakteristiky vybraných substrátů. Buněčná úroveň

Vybrané transgenní kultury katarantu růžového nesoucí transgen ABC transportéru, CjMDR1, byly testovány na potenciál transportu možných substrátů. Jelikož se z předchozích testů nedá jednoznačně určit „nejlepší“ transgenní linie ve smyslu nejintenzivnějšího mRNA nebo proteinového signálu, byly pro prvotní transportní experimenty vybrány všechny linie s pozitivním signálem RT-PCR. V první řadě byl jako substrát testován berberin. Tento

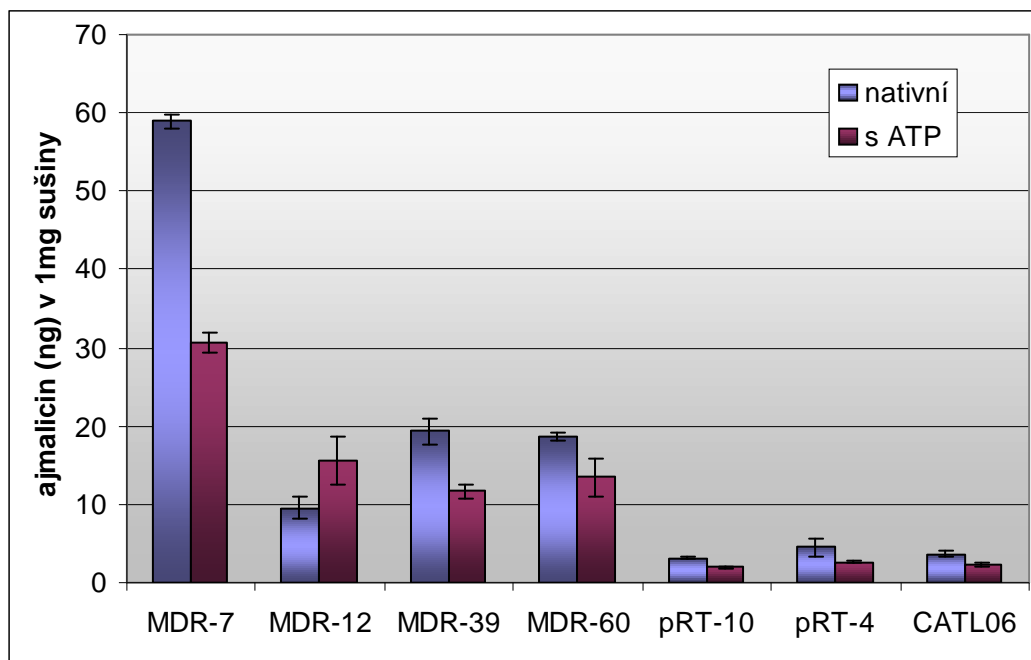
alkaloid sice není vlastní druhu *Catharanthus*, ale je hlavním substrátem pro náš transgenní ABC transportér v *Coptis japonica*. Protože tento transportér využívá ATP jako zdroj energie pro translokaci substrátu, byl transport berberinu do buněk porovnáván v přítomnosti i nepřítomnosti externího ATP. Jak je patrné z obr. 44, přítomnost ATP dramaticky nezvyšuje transport berberinu do buněk, statisticky významný vliv má pouze u jedné linie, MDR-39. V případě ajmalicinu, s výjimkou linie MDR-12, dochází ve všech ostatních liniích ke kvantitativně výhodnějšímu transportu bez přítomnosti vnějšího zdroje energie (viz obr. 45). Proto další experimenty probíhají pouze za přítomnosti buněčných zdrojů energie.

Počet testovaných linií jsme zredukovali na 1) divokou kulturu CATL06, 2) transgenní kontrolní kulturu pRT-4 a 3) transgenní kultury MDR-7 a MDR-60. Tyto byly vybrány protože MDR-7 vykazuje masivní transportní aktivitu ajmalicinu v porovnání s oběma kontrolními skupinami a u MDR-60 byl pozorovaný signál (minimální) v Northern blottingu a následné hybridizaci s radioaktivně značenou sondou.

Obr. 44. Transportní kapacita vybraných transgenních linií katarantu pro alkaloid berberin. Vliv ATP na kvantitu akumulace. CATL06-divoká linie, pRT-kontrolní transgenní linie, MDR-transgenní linie.



Obr. 45. Transportní kapacita vybraných linií pro ajmalicin, modelový ABC-transportérový substrát v katarantu. Vliv ATP na kvantitu akumulace. CATL06-divoká linie, pRT-kontrolní transgenní linie, MDR-transgenní linie.



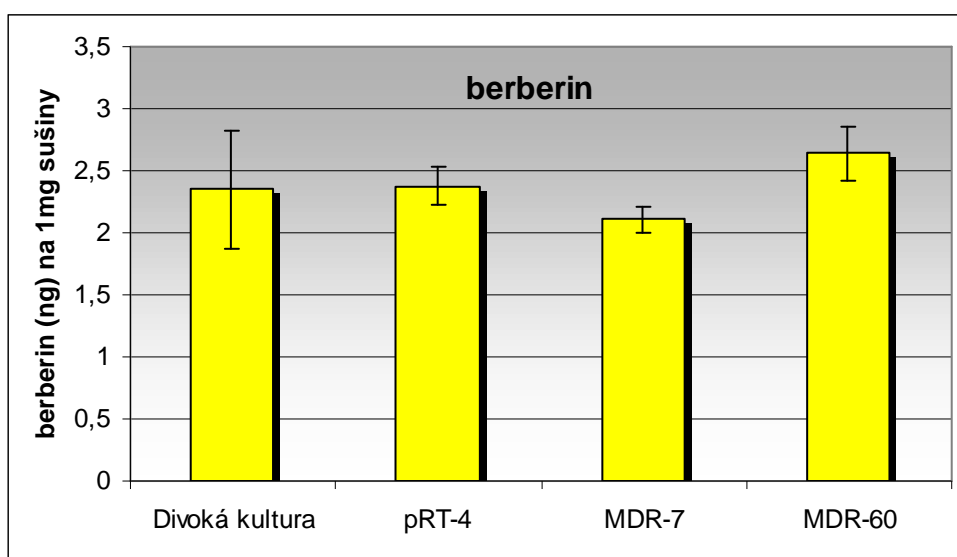
#### 5.4.1. Berberin

Berberin není endogenní látkou katarantu a tak jeho transport na jakékoli úrovni (buněčné, subcelulární) může být ovlivňován regulačními pochody kontrolujícími pohyb xenobiotik do/v/z rostlinných buněk. Přestože byl pokus designován na vnesení berberin transportujícího ABC transportéru do plasmatické membrány katarantu růžového, žádné zvýšení transportu berberinu do buněk v porovnání s divokou a transgenní kontrolní skupinou, jsme neregistrovali. Transportní test byl ukončen po 60ti minutách od přidání alkaloidu k buňkám, je tedy možné, že během hodiny dochází k regulaci prvotně zvýšeného transportu berberinu (způsobeného činností CjMDR1) kontrolními mechanismy a berberin je efektivně vylučován/detoxikován. Možná je berberin transportován do buňky určitým mechanismem a pak je efektivně exportován právě pomocí CjMDR1. O směru toku substrátu našim



transgenním ABC transportérem nemáme žádné informace a jak informuje Terasaka *et al.* (2003) i Roytrakul (2004) a Poustka (2004), v jednom systému může ten samý transportér fungovat jako influxní zatímco v jiném systému jako efluxní transportér, nebo ta samá sloučenina v rámci jednoho systému může využívat jiné podtypy ABC transportéru pro influx a eflux. Nicméně předpokládá se, že CjMDR1 ovlivňuje transport látek do buňky.

Obr. 46. Akumulace berberinu v buňkách katarantu ve vybraných kulturách. MDR-transgenní linie, pRT-kontrolní transgenní linie.

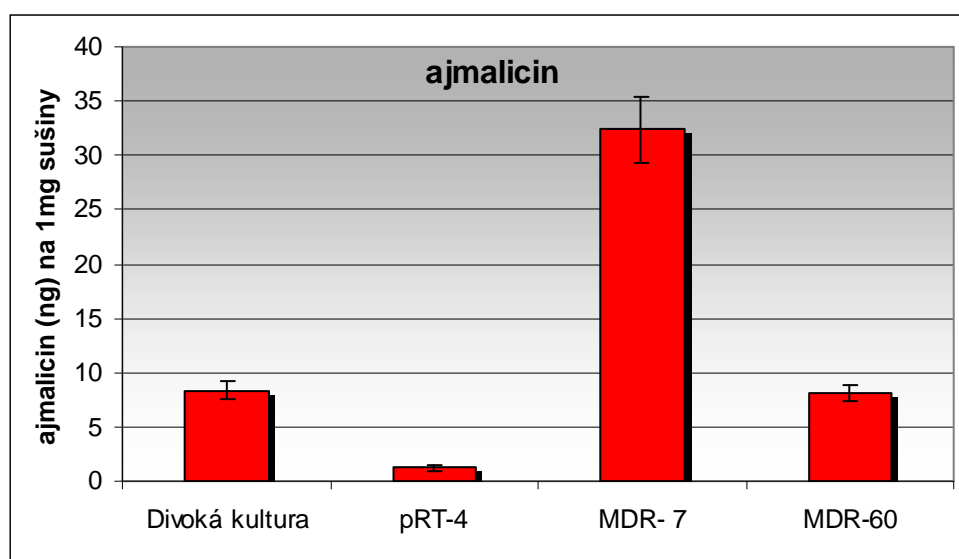


#### 5.4.2. Ajmalicin

Ajmalicin je v buňkách konvertován vakuolární peroxidázou na serpentin (Deus-Neumann *et al.*, 1984; Brown *et al.*, 1984) a udržován uvnitř pomocí tzv. ion-trap mechanismu v nabitě formě (Blom *et al.*, 1991a). Z cytosolu do vakuol je ajmalicin transportován aktivním mechanismem proti koncentračnímu gradientu (Deus-Neuman *et al.*, 1984; Blom *et al.*, 1991a; Poustka, 2004; Roytrakul, 2004). V případě aktivního transportéru nezávislého na koncentračním gradientu v plazmatické membráně dochází ke zvýšení příjmu ajmalicinu

do transgenní buňky (nad kapacitu vylučovacích mechanismů) a následně pravděpodobně dochází k jeho zvýšené akumulaci ve vakuolách (obr. 47). Oba ABC transportéry, vakuolární i plasmatický tedy kooperují a pokud by byla dokázaná zvýšená aktivita vakuolární peroxidázy či nalezena zvýšená hladina serpentinu ve vakuolách, lze mluvit o potenciaci biosyntézy sekundárního metabolitu transgenozí. V obou transgenních liniích byl nalezen potenciál pro signifikantně vyšší transportní kapacitu pro ajmalicin v porovnání s kontrolní transgenní linií. V porovnání s divokou kulturou je statisticky významné zvýšení akumulace pouze u linie MDR-7.

Obr. 47. Akumulace ajmalicinu v buňkách katarantu ve vybraných kulturách. MDR-transgenní linie, pRT-kontrolní transgenní linie.



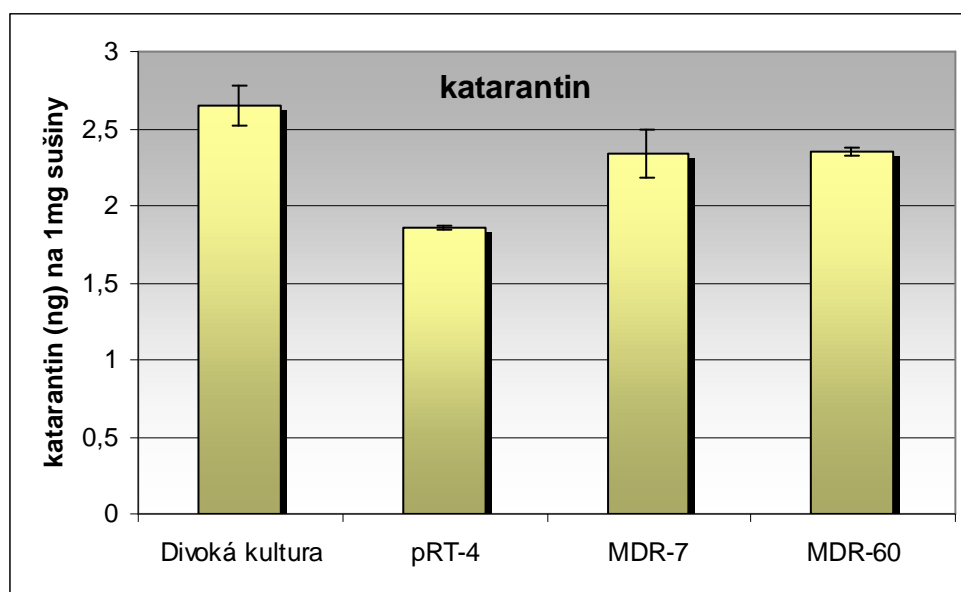
### 5.4.3. Katarantin

Biosyntetická cesta, která končí syntézou katarantinu, není ještě plně pochopena. Katarantin však tvoří jednu z monomerních jednotek nezbytných pro syntézu bisindolových terpenových alkaloidů (van der Heiden *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1988, 1996). Pomocí vakuolární

peroxidázy je vázán s vindolinem za vzniku vinblastinu. Podle Misawa a Goodbody (1996) je syntéza vindolinu katarantem relativně uspokojivá, zatímco hladina katarantinu je v rostlině nedostatečná. Za tímto poznatkem lze vidět regulační krok v syntéze vinblastinu. Regulace může být na úrovni transportu (jak stavebních molekul tak produktů) nebo na úrovni aktivity enzymů biosyntetické kaskády. Pokud by se podařilo zlepšit efektivitu translokace katarantinu do vakuol, kde bude následně vázán s vindolinem, mohlo by zpětnou vazbou docházet k celkové stimulaci biosyntézy prekurzorů včetně dalších odvozených alkaloidů.

V našem případě je pozorovaná statisticky významná zvýšená kapacita transgenních linií v transportu katarantinu oproti kontrolní transgenní kultuře. Ovšem v porovnání s divokou kulturou je transport katarantinu kvantitativně nižší a to jak v kontrolní transgenní tak v obou experimentálních liniích.

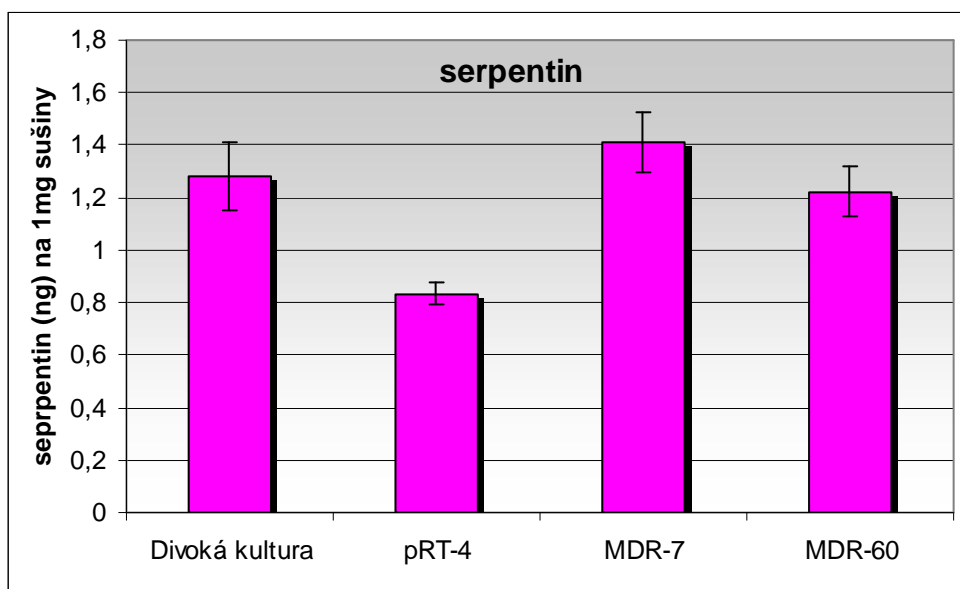
Obr. 48. Akumulace katarantinu v buňkách katarantu ve vybraných kulturách. MDR-transgenní linie, pRT-kontrolní transgenní linie.



#### 5.4.4. Serpentin

Jak bylo zmíněno výše, serpentin je dosud známý jako poslední produkt biosyntetické větve a vzniká konverzí ajmalicinu vlivem vakuolární peroxidázy. Jestli funkce serpentinu spočívá v zásobě ajmalicinu, nebo je to jen neškodná forma “toxických” předcházejících metabolitů či je to hlavní účinná látka rostlinného obranného systému, není zatím jasné. Každopádně akumulace serpentinu vlivem CjMDR1 je statisticky významně zvýšena pokud porovnáváno s kontrolní transgenní linií, ovšem v porovnání s divokou kulturou je akumulace zanedbatelná. Serpentin pravděpodobně vzniká výhradně v tonoplastu, kde je díky své ionizované formě ihned ionotrap mechanismem zachycen a není tedy typickým substrátem pro aktivní transportéry na intercelulární úrovni.

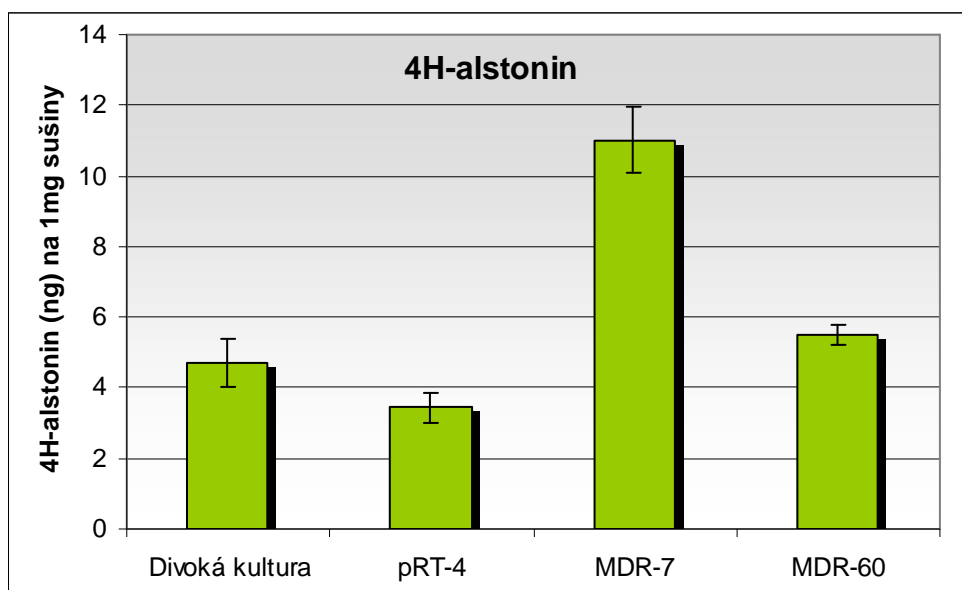
Obr. 49. Akumulace serpentinu v buňkách katarantu ve vybraných kulturách. MDR-transgenní linie, pRT-kontrolní transgenní linie.



#### 5.4.5. Tetrahydroalstonin

Tetrahydroalstonin je syntetizován z katheraminu v cytosolu, pomocí ABC transportéru je akumulován ve vakuolách (Poustka, 2004; Roytrakul, 2004) a konvertován na alstonin, který je podobně jako serpentin zachycen díky svému náboji. V našem případě je tetrahydroalstonin statisticky významně transportován transgenní linií MDR-7 oproti oběma kontrolním skupinám, ne však linie MDR-60. Ta vykazuje statisticky signifikantní navýšení hladiny tetrahydroalstoninu pouze v porovnání s transgenní kontrolní skupinou.

Obr. 50. Akumulace tetrahydroalstoninu v buňkách katarantu ve vybraných kulturách. MDR-transgenní linie, pRT-kontrolní transgenní linie.

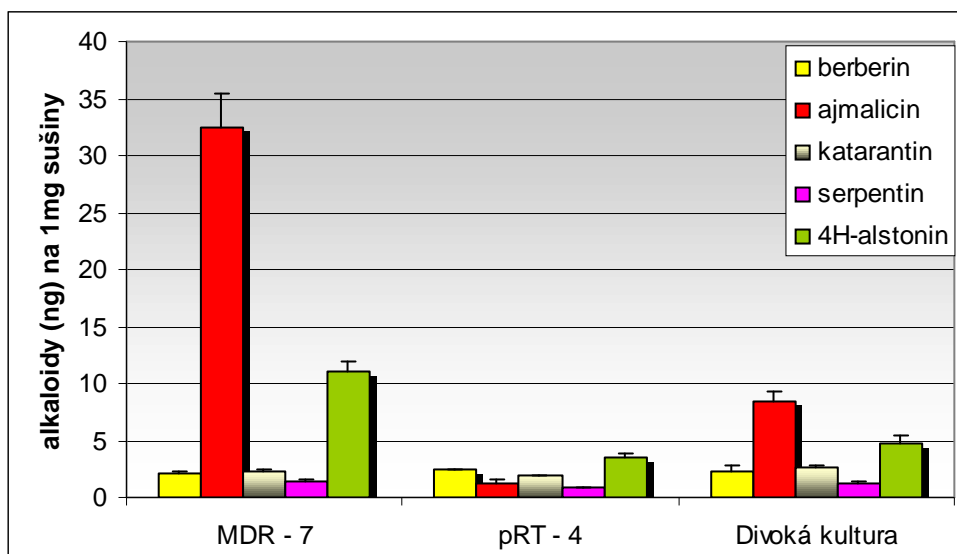


Z rozdílů mezi transportními kapacitami obou kontrolních skupin, transgenní kontrolní a divoké kultury, vyplývá, že celkový proces transgenozy má určitý vliv na transportní kapacitu vybraných substrátů. Statisticky významné snížení transportu transgenní kontrolní kulturou vůči divoké kultuře je pozorováno u 60 % testovaných substrátů. Divoká kultura

katarantu růžového je schopná transportovat některé zkoumané alkaloidy ve stejné míře (serpentin) nebo efektivněji než geneticky upravené linie (katarantin). Skutečností je, že transport substrátů se děje v jednotkách ng na mg sušiny tkáňové kultury a rozdíly mezi divokou a kontrolní transgenní kulturou se tak pohybují do 1 ng alkaloidu na mg sušiny (s výjimkou ajmalicinu, kde je rozdíl mezi kontrolními skupinami 7,1 ng). Také o směru transportu substrátu nemáme žádná data, tudíž možnost, že náš transgen ovlivňuje export některých substrátů z buňky, nesmí být opomenuta. Další experimenty jsou nezbytné pro plné pochopení změněné fyziologie transportu v transgenních liniích.

Transgenní linie MDR-7 vykazuje vyšší transportní kapacitu než linie MDR-60. Ze všech testovaných substrátů je ajmalicin a tetrahydroalstonin transportován touto linií s několikanásobně vyšší efektivitou než v obou kontrolních liniích včetně transgenní MDR-60. Důvodem různé reaktivity transgenních linií může být zřejmě pozice transgenů v genomu po bombardování buněk, stejně jako počet kopií transgenů insertovaných v genomu a různá genetická výbava buněk v suspenzní kultuře (možné polyploidie). Také mikroklima, bezprostřední okolí našeho transgenního proteinu, může hrát roli v substrátové specifitě transportéru. Ta může být ovlivněna mnohými faktory, mezi které patří interakce s dalšími proteiny ko-lokalizovanými v membráně (Blakeslee *et al.*, 2007) a samotná kompozice lipidů membrány. Například lidský MRP1 transportér rozeznává etoposid a daunorubicin ve svém přirozeném prostředí. Ovšem když je tento transportér expresován v buňkách tabáku, transportuje daunorubicin, ale etoposid už jako substrát nerozeznává (Yazaki *et al.*, 2006).

Obr. 51. Transport vybraných substrátů transgenní linií MDR-7, kontrolní transgenní linií pRT-4 a divokou kulturou



Ajmalicin, tetrahydroalstonin i katarantin patří mezi substráty endogenního vakuolárního ABC transportéru (Poustka, 2004; Roytrakul, 2004), serpentín nebyl v tomto směru testován. Z našeho experimentu vyplývá, že transgenní linie MDR-7 je schopna efektivněji akumulovat ajmalicin i tetrahydroalstonin v buňkách katarantu. Akumulace katarantinu a serpentinu je zvýšená (v porovnání s transgenní kontrolní skupinou), na transport berberinu však přítomnost transgenního proteinu v plasmatické membráně nemá vliv. Efekt dalších faktorů na potenciál transportu látek do buněk katarantu není zanedbatelný a měl by být předmětem hlubšího zkoumání.

## **6. Souhrn**



V předložené práci je studovaná problematika transportu jako limitujícího faktoru v biosyntéze sekundárních metabolitů rostlin. Jako modelový rostlinný systém byl vybrán *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Zástupcem aktivního transportéru byl vybrán CjMDR1, člen ABC (ATP-Binding Cassette) protein superfamily, jež je výhradním transportérem berberinu v jeho produkující rostlině, *Coptis japonica*. Získaná data jsou uvedena v následujících bodech.

1. Transport berberinu v nativní suspenzní kultuře katarantu růžového nevykazuje závislost na ATP a vzhledem k inhibičním studiím není substrátem pro nativní ABC transportéry katarantu. Konkrétní mechanismus transportu berberinu na vakuolární či buněčné úrovni se nepodařilo odhalit. Díky vlivu pH na plasmatické membráně na transport berberinu by se mohlo podobně jako v jiných heterologních rostlinách jednat o H<sup>+</sup>-antiport berberinu anebo effluxní přenašeč patřící do skupiny MATE (multidrug and toxic compound extrusion) (Yazaki, 2005).
2. Biolistickou metodou, mikroprojektilovým bombardováním, byla připravena transgenní kultura katarantu růžového. Transgen pocházel z matečné rostliny *Coptis japonica* a jednalo se o plasmatický ABC transportér.
3. U obou transgenních systémů, s chemicky indukovatelnou expresí i s konstitutivní expresí transgenů, byla studována intenzita projevu transgenů. Metoda Northern a Western blottingu se v našich experimentech neosvědčila, signál transgenů se podařilo vizualizovat pouze pomocí techniky RT-PCR. CjMDR1 byl dokázán v cDNA i genomové DNA vybraných transgenních linií katarantu růžového. Po fúzi CjMDR1 se zeleně fluoreskujícím proteinem (GFP) byl tento akumulován s největší pravděpodobností zejména v plasmatické membráně katarantu.
4. Z vybraných transgenních linií vykazuje linie MDR-7 statisticky signifikantní potenciál pro akumulaci ajmalicinu a tetrahydroalstoninu v porovnání s oběma kontrolními

skupinami (kontrolní transgenní a nativní kultura). Akumulace serpentinu a katarantinu je u obou transgenních linií statisticky zvýšená pouze oproti kontrolní transgenní skupině a hladina berberinu nevykazuje žádné kvantitativní statisticky významné změny vůči kontrolním skupinám.

Studium substrátové specifity ABC transportéru v rostlinné kultuře pomocí technik transgenozie není příliš praktické. Molekulárně biologické techniky při práci s objemným transportérem vyžadují četné optimalizace, efektivita transgenozie katarantu mikroprojektilovým bombardováním nedosahuje úrovně tabákové efektivitu (Ondřej a Drobník, 2002) a nejenom metoda vizualizace Western blottingu ale i transportní experimenty samotné mohou být ovlivněny nativními ABC transportéry katarantu. Pro testování substrátové specifity ABC transportérů se jako výhodnější jeví exprese ABC proteinu v *Saccharomyces cerevisiae* zbavených buď pouze Ycf1p, což je hlavní GS-X pumpa (ABC transportér), tak zvaný Yeast cadmium factor 1 a nebo ještě Bpt1p (Bile pigment transporter 1). Ačkoli kvasinky obsahují šest MRP členů ABC superfamily, po odstranění Ycf1p a Bpt1p není detekovatelná žádná ATP dependentní GS-X transportní aktivita, což tvoří tento kmen ideálním systémem pro ABC transportní experimenty (Sharma *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2002).

Ovšem jak řeší Kutchan (2005b), otázkou dnešního metabolického inženýrství je, zdali analyzovat experimentální situaci pomocí teleskopu, mikroskopu anebo úplně nejlépe pomocí obojího najednou. A tak studie dělané na modelových systémech s minimem vnějších faktorů, nemusejí být aplikovatelné do reálné eukaryotické kultury se všemi sofistikovanými regulačními mechanismy a přísnou organizací.

## 7. Summary

In this thesis, the regulation of transport is investigated as a limiting factor in biosynthesis of plant secondary metabolites. CjMDR1 in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. has been selected as a model system of active transporters. CjMDR1 is a member of ABC (ATP-Binding Cassette) protein superfamily. Especially, in previous reports it was found to transport preferably berberine in its producing plant, *Coptis japonica*. In order to look into the role of the ABC transporter berberine was exogenously fed to *Catharanthus roseus* cell line and evaluate the transport of the compound. Based on a series of experiments in this study it can be concluded as follows.

1. Transport of berberine in wild *Catharanthus roseus* was not clearly associated with ATP-dependency. Using diverse inhibitors it was proved that berberine was not an exclusive substrate of native ABC transporters in *Catharanthus*. Alternatively berberine might be transported via H<sup>+</sup>-antiport or efflux transporters from MATE (multidrug and toxic compound extrusion) group which was previously found in other heterologous plants (Yazaki, 2005). In reality in *Catharanthus* some effect of pH on plasmatic membrane on berberine transport has been observed. However, the exact mechanism of berberine transport on vacuolar and cell level was not fully uncovered yet.
2. Transgenic cell lines of *Catharanthus roseus* have been prepared by particle bombarding method (biolistic method). Inserted gene was originally isolated from *Coptis japonica* and encodes plasmatic ABC transporter.
3. Both chemical inducible and constitutively expressing transgenic lines of *Catharanthus roseus* were tested for the presence of the transgene. Signal of the transgene was detected only by PCR, not by Northern or Western blotting technique. Genomic DNA as well as cDNA of transgenic lines was assayed and the presence of the transgene proved. Fusion of CjMDR1 with GFP was preceded and the transporter seems to be considerably localized in plasmatic membrane of *Catharanthus roseus*.

4. Among all the evaluated transgenic lines, MDR-7 displays significantly higher accumulation of ajmalicine and tetrahydroalstonine in comparison with transgenic control and wild type cells. Increased accumulations of serpentine and catharanthine were observed only against transgenic control line, not against wild type cells. On the other hand, berberine transport shows quantitatively the same rate in wild type, transgenic and transgenic control lines.

Substrate specificity of an ABC transporter in plant culture via transgenic approach can not be easily evaluated. The gene of ABC transporter is rather big and all applied molecular biology techniques need several optimization steps, particle bombarding techniques does not show as high sufficiency as in Tobacco case (Ondřej a Drobník, 2002) and besides protein tests, entire transport experiments might be corrupted by native *Catharanthus* ABC transporters. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells with corrupted Yeast cadmium factor 1 (Ycf1p) and possibly also Bpt1p seems to be the good alternative for expression of ABC transporters. Yeast has six MRP ABC members, however after corrupting the above mentioned genes, no ATP dependent GS-X transport activity is detected, which makes this stream ideal system for substrate study of ABC transporters (Sharma *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2002).

However, according to Kutchan (2005b), the biggest challenge of metabolic engineering nowadays is: what kind of tool shall we use to analyze our experiments? Microscope or telescope? Maybe the best would be to use both zooms at the same time. Thus study made on model systems with minimum external factors involvement might not be exactly transposable to real eukaryotic culture with all sophisticated regulation and strict organization.

## **8. Literatura**

1. **Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** 1998. *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky.* Ústí nad Labem: Espero Publishing. Česko.
2. **Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM.** 1999. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 361-398.
3. **Andayani JMJR.** 2001. The isochorismate pathway as a route to 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Catharanthus roseus* cell cultures. Ph.D. Thesis. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Leiden University. Leiden. The Netherlands.
4. **Attard G, Greystoke A, Kaye S, De Bono J.** 2006 Update on tubulin-binding agents. *Pathol Biol* **54(2)**: 72-84.
5. **Bailey JE.** 1991. Towards a science of metabolic engineering. *Science*. **252**: 1668-1675.
6. **Bairoch A.** 1992. PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res* **20**: 2013-2018.
7. **Bakos E, Hegedüs T, Holló Z, Welker E, Tusnády GA, Zaman GJR, Flens MJ, Váradi A, Sarkadi B.** 1996. Membrane Topology and Glycosylation of the Human Multidrug Resistance-associated Protein. *J Biol Chem* **271**: 12322–12326.
8. **Bauer BE, Wolfger H, Kuchler K.** 1999. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 217-236.
9. **Baxter RL, Dorschel CA, Lee S-L, Scott AI.** 1979. Biosynthesis of the antitumor *Catharanthus* alkaloids, conversion of anhydrovinblastine into vinblastine. *J Chem Soc, Chem Commun* **6**: 257-259.
10. **Biemans-Oldenhinkel E, Doeven MK, Poolman B.** 2006. ABC transport architecture and regulatory role of accessory domains. *FEBS Lett* **580**: 1023-1035.
11. **Bird DA, Franceschi VR, Facchini PJ.** 2003. A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell* **15**: 2626-2635.
12. **Blake-Kalff MMA, Coleman JOD.** 1996. Detoxification of xenobiotics by plant cell: characterization of vacuolar amphiphilic organic anion transporters. *Planta* **200**: 426-431.
13. **Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, Geisler M, Nagashima A, Sakai T, Martinoia E, Friml J, Peer WA, Murphy AS.** 2007. Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *PlantCell* **19(1)**: 131–147.
14. **Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS.** 2005. Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 494-500.
15. **Bloom TJM, Sierra M, van Vliet TB, Franke-van Dijk MEI, de Koning P, Iren F, Verpoorte R, Libbenga KR.** 1991a. Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and its conversion into serpentine. *Planta* **183**: 170-177.

16. **Bloom TJM.** 2001b. Transport and accumulation of alkaloids in plant cells. Ph.D. Thesis. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Leiden University. Leiden. The Netherlands.
17. **Bouffard DY, Ohkawa T, Kijima H, Irie A, Suzuki T, Curcio LD, Holm PS, Sassani A, Scanlon KJ.** 1996. Oligonucleotide modulation of multidrug resistance. *Eur J Cancer A* **32**: 1010-1018.
18. **Bracher D, Kutchan TM.** 1992. Strictosidine synthase from *Rauwolfia serpentina*: Analysis of a gene involved in indole alkaloid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **294**: 717-723.
19. **Brown S, Renaudin JP, Prévot C, Guern J.** 1984. Flow cytometry and sorting of protoplasts: technical problems and physiological results from a study of pH and alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Physiol Veg* **22**: 541-554.
20. **Brun G, Dijoux MG, David B, Mariotte AM.** 1999. A new flavonol glycoside from *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* **50**: 167-169.
21. **Bruneton J.** 1999. *Pharmacognosy*. Paris: Lavoisier Publishing. France.
22. **Burlat V, Oudin A, Courtois M, Rideau M, St-Pierre B.** 2004. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol-10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant J* **38**: 131-141.
23. **Cacace S, Schroder G, Wehinger D, Strack D, Schmidt J, Schroder J.** 2003. A flavonol *O*-methyltransferase from *Catharanthus roseus* performing two sequential methylations. *Phytochemistry* **62**: 127-137.
24. **Canel C, Lopes-Cardoso MI, Whitmer S, van der Fits L, Pasquali G, van der Heijden R, Hoge JHC, Verpoorte R.** 1998. Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta* **205**: 414-419.
25. **Coleman JOD, Blake-Kalff MMA, Davies TGE.** 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci* **2**: 144-151.
26. **Collu G, Garcia A, van der Heiden R, Verpoorte R.** 2002. Activity of the cytochrome P450 enzyme geraniol 10-hydroxylase and alkaloid production in plant cell cultures. *Plant Sci* **162**: 165-172.
27. **Collu G, Unver N, Peltenburg-Looman MGA, van der Heiden R, Verpoorte R, Memelink J.** 2001. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett* **508**: 215-220.
28. **Contin A, Heiden R., Lefeber AWM, Verpoorte R.** 1998. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett* **434**: 413-416.
29. **Contin A, van der Heiden R, Verpoorte R.** 1999a. Effects of alkaloid precursor feeding and elicitation on the accumulation of secologanin in a *Catharanthus roseus* cell suspension culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **56**: 111-119.
30. **Contin A, Van der Heiden R, Verpoorte R.** 1999b. Localization of secologanin in *Catharanthus roseus* cells. *Acta Bot Gall* **146**: 105-110.



31. **Contin A, Van der Heiden R, Verpoorte R.** 1999c. Accumulation of loganin and secologanin in vacuoles from suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Sci* **147**: 177-183.
32. **Cox ED, Cook JM.** 1995. The Pictet-Spengler condensation: a new direction for an old reaction. *Chem Rev* **95**: 1797-1842.
33. **Crouzet J, Trombik T, Fraysse ÅS, Boutry M.** 2006. Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Lett* **580**: 1123-1130.
34. **Daddona PE, Hutchinson CR.** 1974. Biosynthesis of the dimeric indole alkaloids. Vincalcoloblastine. *J Am Chem Soc* **96**: 6806-6807.
35. **Davies TG, Theodoulou FL, Hallahan DL, Forde BG.** 1997. Cloning and characterisation of a novel P-glycoprotein homologue from barley. *Gene* **199(1-2)**: 195-202.
36. **Dawson RJP, Locher KP.** 2006. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**: 180-185.
37. **De Luca V, Cutler AJ.** 1987. Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* **85(4)**: 1099-1102.
38. **De Luca V, Fernandez JA, Campbell D, Kurz WG.** 1988. Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* **86(2)**: 447-450.
39. **de Waal A, Meijer AH, Verpoorte R.** 1995. Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*: purification and characterization of multiple forms. *Biochem J* **306**: 571-580.
40. **Dean JD, Goodwin PH, Hsiang T.** 2002. Comparison of relative RT-PCR and Northern blot analyses to measure expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum*. *Plant Mol Biol Rep* **20**: 347-356.
41. **Dean M, Hamon Y, Chininu G.** 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**: 1007-1017.
42. **Decottignies A, Goffeau A.** 1997. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* **15**: 137-145.
43. **Dethier M, De Luca V.** 1993. Partial purification of an *N*-methyltransferase involved in vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* **32**: 673-678.
44. **Deus-Neumann B, Zenk MH.** 1984. A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta* **162**: 250-260.
45. **Dewick PM.** 2002. *Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*. John Wiley & Sons, Chichester, Velká Británie.
46. **Dixon RA.** 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
47. **Doggrell SA.** 2005. Berberine - a novel approach to cholesterol lowering. *Expert Opin Investig Drugs* **14**: 683-685.
48. **Ducos E, Fraysse Å, Boutry M.** 2005. NtPDR3, an iron-deficiency inducible ABC transporter in *Nicotiana tabacum*. *FEBS Lett* **579(30)**: 6791-6795.

49. **Dudler R, Hertig C.** 1992. Structure of an *mdr*-like gene from *Arabidopsis thaliana*. Evolutionary implications. *J Biol Chem* **267(9)**: 5882-5888.
50. **Dudler R, Sidler M.** 1998. Arabidopsis MDR genes: Molecular cloning and protein chemical aspects. *Methods Enzymol* **292**: 162-173.
51. **Eisenreich W, Bachor A, Arigoni D, Rondich F.** 2004. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci* **61**: 1401-1426.
52. **El-Sayed M, Verpoorte R.** 2007. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. *Phytochem Rev* **6**: 277-305.
53. **European Pharmacopoeia 5.0.** 2004. Aubin. Ligugé. Francie. ISBN: 92-871-5281-0
54. **Evans WCh.** 2002. *Pharmacognosy*, Harcourt Publishers Limited. London. Velká Británie.
55. **Facchini PJ.** 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, Cell biology, Molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 29-66.
56. **Forsyth WGC, Simmonds NW.** 1957. Anthocyanidins of *Lochnera rosea*. *Nature* **180**: 247-247.
57. **Fox GG, Ratcliffe RG, Robinson SA, Stewart GR.** 1995. Evidence for deamination by glutamate-dehydrogenase in higher-plants-commentary. *Can J Bot* **73**: 1112-1115.
58. **Frangne N, Eggmann T, Koblischke C, Weissenböck G, Martinoia E, Klein M.** 2002. Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and *Arabidopsis* cell culture vacuoles. Energization occurs by H<sup>+</sup>-antiport and ATP-binding cassette-type mechanism. *Plant Physiol* **128**: 726-733.
59. **Gaedeke N, Klein M, Kolukisaoglu U, Forestier C, Müller A, Ansoerge M, Becker D, Mamnun Y, Kuchler K, Schulz B, Mueller-Roeber B, Martinoia E.** 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter ATMRP5 controls root development and stomata movement. *EMBO J* **20(8)**: 1875-1887.
60. **Gantet P, Memelink J.** 2002. Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends Pharmacol Sci* **23**: 563-569.
61. **Garcia O, Bouige P, Forestier C, Dassa E.** 2004. Inventory and comparative analysis of rice and *Arabidopsis* ATP-binding Cassette (ABC) system. *J Mol Biol* **343**: 249-265.
62. **Gatz C, Lenk I.** 1998. Promoters that respond to chemical inducers. *Trends Plant Sci* **3**: 352-358.
63. **Gatz C.** 1997. Chemical control of gene expression. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 89-108.
64. **Geerlings A, Ibañez MM, Memelink J, van der Heiden R, Verpoorte R.** 2000. Molecular cloning and analysis of strictosidine  $\beta$ -D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J Biol Chem* **275**: 3051-3056.
65. **Geerlings A, Redondo FJ, Contin A, Memelink J, van der Heiden R, Verpoorte R.** 2001. Biotransformation of tryptamine and secologanin into plant terpenoid indole alkaloids by transgenic yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 420-424.

66. **Gerasimenko I, Sheludko Y, Ma X, Stöckigt J.** 2002. Heterologous expression of a Rauwolfia cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to over 2000 monoterpenoid indole alkaloids. *Eur J Biochem* **269**: 2204-2213.
67. **Ghosh AK, Bhattacharyya FK, Ghosh DK.** 1985. *Leishmania donovani*: amastigote inhibition and mode of action of berberine. *Exp Parasitol* **60**: 404-413.
68. **Goodbody AE, Watson CD, Chapple CCS, Vukovic J, Misawa M.** 1988. Extraction of 3',4'-anhydrovinblastine from *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* **27(6)**: 1713-1717.
69. **Gottesman MM, Fojo T, Bates SE.** 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**: 48-58.
70. **Gottesman MM, Ling V.** 2006. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett* **580**: 998-1009.
71. **Guéritte F, Bac NV, Langlois Y, Potier P.** 1980. Biosynthesis of antitumour alkaloids from *Catharanthus roseus*. Conversion of 20'-deoxyeuosidine into vinblastine. *J Chem Soc, Chem Commun* 452-453.
72. **Hallard DAC.** 2000. Transgenic plant cells for the production of indole alkaloids. Ph.D. Thesis. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Leiden University. Leiden. The Netherlands.
73. **Harborne JB.** 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Nat Prod Rep* **18**: 361-379.
74. **Hashimoto T, Yamada Y.** 2003. New genes in alkaloid metabolism and transport. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 163-168
75. **Hedhili S, Courdavault V, Giglioli-Guivarc'h N, Gantet P.** 2007. Regulation of the terpene moiety biosynthesis of *Catharanthus roseus* terpene indole alkaloids. *Phytochem Rev* **6**: 341-351.
76. **Hedrich R, Marten I.** 2006. 30-year progress of membrane transport in plants. *Planta* **224**: 725-739.
77. **Hemscheidt T, Zenk MH.** 1980. Glucosidases involved in indole alkaloid biosynthesis of *Catharanthus* cell cultures. *FEBS Lett* **110**: 187-191.
78. **Hemscheidt T, Zenk MH.** 1985. Partial purification and characterization of a NADPH dependent tetrahydroalstonine synthase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* **4**: 216-219.
79. **Hernández-Domínguez E, Campos-Tamayo F, Vázquez-Flota F.** 2004. Vindoline synthesis in in vitro shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Lett* **26(8)**: 671-4.
80. **Higgins CF, Gottesman MM.** 1992. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* **17**: 18-21.
81. **Higgins CF, Hiles ID, Salmond GPC, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckem SD, Bell AW, Hermondson MA.** 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**: 448-450.
82. **Higgins CF, Linton KJ.** 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 918-926.

83. **Higgins CF.** 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
84. **Higgins CF.** 1995. The ABC of channel regulation. *Cell* **82**: 693-696.
85. **Higgins CF.** 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res Microbiol* **152(3-4)**: 205-210.
86. **Hinder B, Schellenberg M, Rodoni S, Ginsburg S, Vogt E, Martinoia E, Matile P, Hörtensteiner S.** 1996. *J Biol Chem* **271(44)**: 27233-27236.
87. **Hipfner DR, Almquist KC, Leslie EM, Berlách JH, Grant CE, Deeley RG, Cole SPC.** 1997. Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH<sub>2</sub> terminus. *J Biol Chem* **272**: 23623-23630.
88. **Hörtensteiner S, Vogt E, Hagenbuch B, Meier PJ, Amrhein N, Martinoia E.** 1993. Direct energization of bile acid transport into plant vacuoles. *J Biol Chem* **268(25)**: 18446-18449.
89. **Hughes EH, Shanks JV.** 2002. Metabolic engineering of plants for alkaloid production. *Metab Eng* **4**: 41-48.
90. **Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GFL, Kim SH.** 1998. Crystal structure of the ATP binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**: 703-707.
91. **Chahed K, Oudin A, Guivarch N, Hamdi S, Chenieux J-C, Rideau M, Clastre M.** 2000. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from periwinkle: cDNA identification and induced gene expression in terpenoid indole alkaloid-producing cells. *Plant Physiol Biochem* **38**: 559-566.
92. **Chappell J.** 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 521-547.
93. **Chilton MD, Drummond MH, Merio DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW.** 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11(2)**: 263-271.
94. **Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J.** 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* **6**: 325-330.
95. **Iizuka N, Miyamoto K, Okita K, Tangoku A, Hayashi H, Yosino S, Abe T, Morioka T, Hazama S, Oka M.** 2000. Inhibitory effect of *Coptidis* rhizome and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines. *Cancer Lett* **148**: 19–25.
96. **Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
97. **Irmeler S, Schroder G, Pierre B St, Rouch NP, Hotze M, Schmidt J, Strack D, Matern U, Schroder J.** 2000. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J* **24(6)**: 797-804.
98. **Ishige F, Takaichi M, Foster R, Chua NH, Oeda K.** 1999. A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants. *Plant J* **18**: 443-448.

99. **Ishikawa T, Li Ze, Lu Y, Rea PA.** 1997. The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function, and gene expression. *Biosci Rep* **17(2)**: 189-207.
100. **Ishikawa T.** 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* **17**: 463-468.
101. **Iwasa K, Nanba H, Lee DU, Kang SI.** 1998. Structure-activity relationships of protoberberines having antimicrobial activity. *Planta Med* **64**: 748-751.
102. **Jasinski M, Stukkens Y, Degand H, Purnelle B, Marchand-Brynaert J, Boutry M.** 2001. A plant plasma membrane ATP binding cassette transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant cell* **13**: 1095-1107.
103. **Johansen JN, Vernhettes S, Höfte H.** 2006. The ins and outs of plant cell walls. *Curr Opin Plant Biotechnol* **9**: 616–620.
104. **Jouhikainen K, Lindgren L, Jokelainen T, Hiltunen R, Teeri TH, Oksman-Caldentey KM.** 1999. Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta* **208**: 545-551.
105. **Juliano RL, Ling V.** 1976. Surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese-hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**: 152-162.
106. **Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML.** 1999. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnol Bioeng* **62**: 97-105.
107. **Ketchum REB, Tandon M, Gibson DM, Begley T, Shuler ML.** 1999. Isolation of Labeled 9-Dihydrobaccatin III and Related Taxoids from Cell Cultures of *Taxus canadensis* Elicited with Methyl Jasmonate. *J Nat Prod* **62(10)**: 1395 – 1398.
108. **Klein M, Burla B, Martinoia E.** 2006. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Lett* **580(4)**: 1112-1122.
109. **Klein M, Geisler M, Suh SJ, Kolukisaoglu HU, Azevedo L, Plaza S, Curtis MD, Richter A, Weder B, Schulz B, Martinoia E.** 2004. Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant J* **39(2)**: 219-236.
110. **Klein M, Mamnum Y, Eggmann T, Schüller C, Wolfger H, Martinoia E, Kuchler K.** 2002. The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Lett* **520**: 63-67.
111. **Klein M, Martinoia E, Hoffmann-Thoma G, Weissenböck G.** 2000. A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *Plant J* **21(3)**: 289-304.
112. **Klein M, Martinoia E, Hoffmann-Thoma G, Weissenböck G.** 2001. The ABC-like vacuolar transporter for rye mesophyll flavone glucuronides is not species-specific. *Phytochemistry* **56**: 153-159.
113. **Klein M, Martinoia E, Weissenböck G.** 1997. Transport of Lucifer yellow CH into plant vacuoles-evidence for direct energization of a sulphonated substance and implications for the design of new molecular probes. *FEBS Lett* **420**: 86-92.

114. **Klein M, Martinoia E, Weissenböck G.** 1998. Directly energized uptake of  $\beta$ -estradiol 17-( $\beta$ -D-glucuronide) in plant vacuoles is strongly stimulated by glutathione conjugate. *J Biol Chem* **273**(1): 262-270.
115. **Klein M, Perfus-Barbeoch L, Frelet A, Gaedeke N, Reinhardt D, Mueller-Roeber B, Martinoia E, Forestier C.** 2003. The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP is involved in guard cell hormonal signaling and water use. *Plant J* **33**(1): 119-129.
116. **Klein M, Weissenböck G, Dufaud A, Gaillard C, Kreuz K, Martinoia E.** 1996. Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucoside and a herbicide glucoside. *J Biol Chem* **271**(47): 29666-29671.
117. **Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sandford JC.** 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells. *Nature* **327**: 70-73.
118. **Kolukisaoglu HÜ, Bovet L, Klein M, Eggmann T, Geisler M, Wanke D, Martinoia E, Schulz B.** 2002. Family business: the multidrug-resistance related protein (MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**(1):107-119.
119. **Kreuz K, Tommasini R, Martinoia E.** 1996. Old enzymes for a new job: Herbicide detoxication in plants. *Plant Physiol* **111**: 349-353.
120. **Kruczynski A, Hill BT.** 2001. Vinflunine, the latest *Vinca* alkaloid in clinical development. A review of its preclinical anticancer properties. *Crit Rev Oncol Hematol* **40**: 159-173.
121. **Kuijt SJH, Lamers GEM, Rueb S, Scarpella E, Ouwkerk PBF, Spaink HP, Meijer AH.** 2004. Different subcellular localization and trafficking properties of KNOX class 1 homeodomain proteins from rice. *Plant Mol Biol* **55**: 781-796.
122. **Kunze R, Frommer WB, Flügge U-I.** 2002. Metabolic engineering of plants: the role of membrane transport. *Metab Eng* **4**: 57-66.
123. **Kutchan TM, Bock A, Dittrich H.** 1994. Heterologous expression of the plant proteins strictosidine synthase and berberine bridge enzyme in insect cell culture. *Phytochemistry* **35**: 353-360.
124. **Kutchan TM, Hampp N, Lottspeich F, Beyreuther K, Zenk MH.** 1988. The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauwolfia serpentina* DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **237**: 40-44.
125. **Kutchan TM.** 1989. Expression of enzymatically active cloned strictosidine synthase from the higher plant *Rauwolfia serpentina* in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **257**: 127-130.
126. **Kutchan TM.** 1993. Strictosidine: from alkaloid to enzyme to gene. *Phytochemistry* **32**: 493-506.
127. **Kutchan TM.** 1995. Alkaloid biosynthesis-the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* **7**: 1059-1070.
128. **Kutchan TM.** 2005a. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Curr Opin Plant Biotechnol* **8**: 292-300.
129. **Kutchan TM.** 2005b. *Predictive* metabolic engineering in plants: still full of surprises. *Trends Biotechnol* **23**: 381-383.

130. **Lans CA.** 2006. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *J Ethnobiol Ethnomed* **2**: 45-45.
131. **Laschat S.** 1996. Pericyclic reactions in biological systems - does nature know about the Diels - Alder reaction? *Angew Chem Int Ed Engl* **35**: 289-291.
132. **Lattenmayer Ch, Trummer E, Schriebl K, Vorauer-Uhl K, Mueller D, Katinger H, Kunert R.** 2007. Characterization of recombinant CHO cell lines by investigation of protein productivities and genetic parameters. *J Biotechnol* **128**: 716-725.
133. **Lau CW, Yao XQ, Chen ZY, Ko WH, Huang Y.** 2001. Cardiovascular actions of berberine. *Cardiovasc Drug Rev* **19**: 234-244.
134. **Lee EK, Kwon M, Ko J, Yi H, Hwang MG, Chang S, Cho MH.** 2004. Binding of sulfonylurea by AtMRP5, an *Arabidopsis* multidrug resistance-related protein that functions in salt tolerance. *Plant physiol* **34**: 528-538.
135. **Lee ChJ, Lee JH, Seok JH, Hur GM, Park YCh, Seol ICh, Kim YH.** 2003. Effect of baicalein, berberine, curcumin and hesperidin on mucin release from airway goblet cells. *Planta Med* **69**: 523-526.
136. **Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y.** 2005. AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant physiol* **138**: 827-836.
137. **Leete E.** 1961. Biogenesis of the *Rauwolfia* alkaloids—II : The incorporation of tryptophan into serpentine and reserpine. *Tetrahedron* **14**: 35-41.
138. **Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ.** 2002. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab Eng* **4**: 67-79.
139. **Li ZS, Alfenito M, Rea PA, Walbot V, Dixon RA.** 1997. Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry* **45(4)**: 689-93.
140. **Li ZS, Zhao Y, Rea PA.** 1995a. Magnesium adenosine 5'-triphosphate-energized transport of glutathione S-conjugates by plant vacuolar membrane vesicles. *Plant Physiol* **107**: 1257-1268.
141. **Li ZS, Zhao Y, Rea PA.** 1995b. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene-elicited increase in vacuole glutathione S-conjugate transport activity. *Plant Physiol* **109**: 177-202.
142. **Lichtenthaler HK, Schwender J., Disch A, Rohmer M.** 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **101**: 643-652.
143. **Lin CC, Ng LT, Hsu FF, Shieh DE, Chiang LC.** 2004. Cytotoxic effect of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, optisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**: 65-69.
144. **Lin HL, Liu WY, Chi CW.** 1999. Up-regulation of multidrug resistance transporter expression by berberine in human and murine hepatoma cells. *Cancer* **85**: 1937-1942.
145. **Linsmaier EM, Skoog F.** 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **18(1)**: 100-127.

146. **Linton KJ, Higgins CF.** 2007. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch* **453(5)**: 555-567.
147. **Liscovitch M, Lavie Y.** 2002. Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. *IDrugs* **5**: 349-355.
148. **Liu G, Sánchez-Fernández R, Li Z, Rea PA.** 2001. Enhanced multispecificity of *Arabidopsis* vacuolar multidrug resistance-associated protein-type ATP-binding cassette transporter, AtMRP2. *J Biol Chem* **276(12)**: 8648-8656.
149. **Loe DW, Deeley RG, Cole SPC.** 1998. Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res* **58**: 5130-5136.
150. **Lorence A, Nessler CL.** 2004. Camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry* **65**: 2735-2749.
151. **Loyola-Vargas VM, Galaz-Avalos RM, Kú-Cauich R.** 2007. *Catharanthus* biosynthetic enzymes: the road ahead. *Phytochem Rev* **6**: 307-339.
152. **Lu Y, Li Z, Drozdowicz YM, Hörtensteiner S, Martinoia E, Rea PA.** 1998. AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparison with AtMRP1. *Plant Cell* **10**: 267-282.
153. **Lu Y, Li Z, Rea PA.** 1997. AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **94(15)**: 8243-8248.
154. **Luijendijk TJC, Stevens LH, Verpoorte R.** 1998. Purification and characterisation of strictosidine  $\beta$ -D-glucosidase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Physiol Biochem* **36**: 419-425.
155. **Madyastha KM, Ridgway JE, Dwyer JG, Coscia CJ.** 1977. Subcellular localization of a cytochrome P450 monooxygenase in vesicles of the higher plant *Catharanthus roseus*. *J Cell Biol* **72**: 302-313.
156. **Mahroug S, Courdavault V, Thiersault M, St-Pierre B, Burlat V.** 2006. Epidermis is a ligotal site of at least four secondary metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs. *Planta* **223**: 1191-1200.
157. **Maliga P.** 2001. Plastid engineering bears fruit. *Nat Biotechnol* **19**: 826-827.
158. **Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V.** 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375**: 397-400.
159. **Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N.** 1993. An ATP-dependent glutathione S-conjugate "export" pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **364**: 247-249.
160. **Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu U, Müller-Röber B, Schulz B.** 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters-more than just detoxifiers. *Planta* **214**: 345-355
161. **McKnight TD, Bergey DR, Burnett RJ, Nessler CL.** 1991. Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants. *Planta* **185**: 148-152.



162. **McKnight TD, Roessner CA, Devagupta R, Scott AI, Nessler C.** 1990. Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*. *Nucleic Acids Res* **18**: 4939-4939.
163. **Memelink J, Gantet P.** 2007. Transcription factors involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochem Rev* **6**: 353–362.
164. **Memelink J, Swords KMM, Staehelin LA, Hoge JHC.** 1994. Southern, Northern and Western blot analysis. In: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (Eds.), *Plant Molecular Biology Manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
165. **Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW.** 2001. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci* **6**: 212-219.
166. **Memelink J.** 2005. Tailoring the plant metabolome without a loose stitch. *Trends Plant Sci* **10**: 305-307.
167. **Menke FLH, Parchmann S, Mueller MJ, Kijne JW, Memelink J.** 1999. Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* **119**: 1289–1296.
168. **Mentewab A, Stewart CN Jr.** 2005. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nat Biotechnol* **23**: 1177–1180.
169. **Meyer P.** 1998. Stabilities and instabilities in transgene expression. In: Lindsey K (Ed.), *Transgenic Plant Research*. Amsterdam: Academic Publishers.
170. **Misawa M, Goodbody AE.** 1996. Production of antitumor compounds by plant cell cultures. In: DiCosmo F, Misawa M (Eds.), *Plant Cell Culture Secondary Metabolism Toward Industrial Application*. London: CRC press.
171. **Misra N, Luthra R, Kumar S.** 1996. Enzymology of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Indian J Biochem Biophys* **33(4)**: 261-273.
172. **Mizukami H, Nordlov H, Lee S-L, Scott AI.** 1979. Purification and properties of strictosidine synthetase (an enzyme condensing tryptamine and secologanin) from *Catharanthus roseus* cultured cells. *Biochemistry* **18**: 3760-3763.
173. **Moons A.** 2003. OsPDR9, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots. *FEBS Lett* **553**: 370-376.
174. **Moore I, Samalova M, Kurup S.** 2006. Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J* **45**: 651-683.
175. **Moreno PRH, Poulsen Ch, van der Heiden R, Verpoorte R.** 1996. Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell suspension cultures. *Enzyme Mikrob Tech* **18**: 99-107.
176. **Moreno PRH, van der Heijden R, Verpoorte R, ten Hoopen JG.** 1988. Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus*: a literature survey II. Updating from 1988-1993. *Plant Cell Tiss Org Cult* **42**: 1-25.
177. **Morgan JA, Shanks JV.** 2000. Determination of metabolic rate-limitations by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *J Biotechnol* **79**: 137-145.

178. **Morre DJ, Brightman A, Scherer G, Dorp BV, Penel C, Auderset G, Sandelius AS.** 1987. Highly purified tonoplast fractions by preparative free-flow electrophoresis. In: Marin B (Ed.), *Plant Vacuoles*. New York: Plenum Publishing Corporation.
179. **Morris ME, Zhang S.** 2006. Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Science* **78**: 2116-2130.
180. **Murashige T, Skoog F** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.
181. **Netsch MI, Gutmann H, Luescher S, Brill S, Schmidlin CB, Kreuter MH, Drewe J.** 2005. Inhibitory activity of a green tea extract and some of its constituents on multidrug resistance-associated protein 2 functionality. *Planta Med* **71(2)**: 135-141.
182. **Niwa Y, Hirano T, Yoshimoto K, Shimizu M, Kobayashi H.** 1999. Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *Plant J* **18**: 455-463.
183. **Nobili S, Landini I, Giglioni B, Mini E.** 2006. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr Drug Targets* **7(7)**:861-879.
184. **O'Connor SE, Maresh JJ.** 2005. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat Prod Rep* **23**: 532-547.
185. **O'Keefe BR, Mahady, GB, Gills JJ, Beecher CWW.** 1997. Stable vindoline production in transformed cell cultures of *Catharanthus roseus*. *J Natl Prod* **60**: 261-264.
186. **Ondřej M, Drobník J.** 2002. *Transgenozé rostlin*. Praha: Academia. Česko.
187. **Otani M, Shitan N, Sakai K, Martinoia E, Sato F, Yazaki K.** 2005. Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology* **138**: 1939-1946.
188. **Otsu CT, da Silva I, de Molfetta JB, da Silva LR, de Almeida-Engler J, Engler G, Torraca PC, Goldman GH, Goldman MHS.** 2004. NtWBC1, an ABC transporter gene specially expressed in tobacco reproductive organs. *J Exp Botany* **55(403)**: 1643-1654.
189. **Oudin A, Courtois M, Rideau M, Clastre M.** 2007. The iridoid pathway in *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis. *Phytochem Rev* **6**: 259–276.
190. **Ozben T.** 2006. Mechanism and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett* **580(12)**: 2903-2909
191. **Pasquali G, Porto DD, Fett-Neto AG.** 2006. Metabolit engineering of cell culture versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. *J Biosci Bioeng* **100(4)**: 287-296.
192. **Patzlaff JS, van der Heide T, Poolman B.** 2003. The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA. *J Biol Chem* **278**: 29546-29551.
193. **Pennings EJ, van den Bosch RA, van der Heiden R, Stevens LH, Duine JA, Verpoorte R.** 1989. Assay of strictosidine synthase from plant cell cultures by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **176**: 412-415.

194. **Pfützner A, Stöcking J.** 1982. Partial purification and characterization of geissoschizine dehydrogenase from suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* **21**: 1585-1588.
195. **Pfützner U, Zenk MH.** 1987. Isolation and immobilization of strictosidine synthase. *Methods Enzymol* **136**: 342-350.
196. **Pfützner U, Zenk MH.** 1989. Homogeneous strictosidine synthase isoenzymes from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med* **6(55)**: 525-530.
197. **Piddock LJ.** 2006. Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 629-636.
198. **Pighin JA, Zheng H, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, Samuels AL.** 2004. Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306(5696)**: 702–704.
199. **Piovan A, Filippini R.** 2007. Anthocyanins in *Catharanthus roseus* *in vivo* and *in vitro*: a review. *Phytochem Rev* **6**: 235–242.
200. **Poulsen C, Verpoorte R.** 1991. Roles of chorismate mutase, isochorismate synthase and antranilate synthase in plants. *Phytochemistry* **30(2)**: 377-386.
201. **Poustka F.** 2004. Tonoplastový transport terpenoidních alkaloidů a jejich prekurzorů v *Catharanthus roseus* (L.) G. Don *in vitro*. Disertační práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Karlova Universita v Praze. Hradec Králové. Česko.
202. **Prabhu V, Chatson KB, Abrams GD, King J.** 1996. C-13 nuclear magnetic resonance detection of interactions of serine hydroxymethyltransferase with C1-tetrahydrofolate synthase and glycine decarboxylase complex activities in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **112**: 207–216.
203. **Qiangrong P, Wang T, Lu Q, Hu X.** 2005. Schizandrin B-A novel inhibitor of P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* **335**: 406-411.
204. **Rea PA, Li Z-S, Lu Y-P, Drozdowicz YM, Martinoia E.** 1998. From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 727-760.
205. **Rea PA.** 1999. MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. *J Exp Bot* **50**: 895-913.
206. **Restrepo AJ.** 2005. Transport of salicylic acid and related phenolic compounds across the vacuolar membrane of *Catharanthus roseus* plant cells. MSc. Thesis. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Leiden University. Leiden. The Netherlands.
207. **Rius M, Nies AJ, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D.** 2003. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* **38**: 374-384.
208. **Roessner CA, Devagupta R, Hasan M, Williams HJ, Scott IA.** 1992. Purification of an indole alkaloid biosynthetic enzyme, strictosidine synthase, from a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Protein Express Purif* **3**: 295-300.
209. **Rogers B, Decottignies A, Kolaczowski M, Carvajal E, Balzi E, Goffeau A.** 2001. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biotechnol* **3**: 207-214.

210. **Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H.** 1993. *Biochem J* **295**: 517-524.
211. **Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahn H.** 1996. *J Am Chem Soc* **118**: 2564-2566.
212. **Roytrakul S.** 2004. Transport of alkaloids and its precursors through the vacuolar membrane of *Catharanthus roseus*. Ph.D. Thesis. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Leiden University. Leiden. The Netherlands.
213. **Ruetz S, Gros P.** 1994. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell* **77**: 1071-1081.
214. **Russe JA, Roy MK, Sanford JC.** 1992. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol* **98(3)**: 1050-1056.
215. **Sakai K, Shitan N, Sato F, Ueda K, Yazaki K.** 2002. Characterization of berberine transport into *Coptis japonica* cells and the involvement of ABC protein. *J Exp Bot* **53(376)**: 1879-1886.
216. **Sakai K, Shitan N, Sato F, Ueda K, Yazaki K.** 2002. Characterization of berberine transport into *Coptis japonica* cells and the involvement of ABC protein. *J Exp Bot* **53**: 1879-1886.
217. **Samanani N, Park S-U, Facchini PJ.** 2005. Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell* **17**: 915-926.
218. **Sanford JC, Klein TM, Wold ED, Allen N.** 1987. Delivery of substances into cells and tissue using a particle bombardment process. *J Plant Sci Tech* **5**: 27-37.
219. **Sánchez-Fernández R, Ardiles-Diaz W, Van Montagu M, Inze D, May MJ.** 1998. Cloning and expression analyses of *AtMRP4*, a novel MRP-like gene from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **258(6)**: 655-662.
220. **Sánchez-Fernández R, Davies TGE, Coleman JOD, Rea PA.** 2001a. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276(32)**: 30231-30244.
221. **Sánchez-Fernández R, Rea PA, Davies TGE, Coleman JOD.** 2001b. Do plants have more genes than humans? Yes, when it comes to ABC proteins. *Trends Plant Sci* **6**: 347-348.
222. **Santelia D, Vincenzetti V, Azzarello E, Bovet L, Fukao Y, Düchtig P, Mancuso S, Martinoia E, Geisler M.** 2005. MDR-like ABC transporter *AtPGP4* is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett* **579(24)**: 5399-5406.
223. **Santelia D, Vincenzetti V, Azzarello E, Bovet L, Fukao Y, Düchtig P, Mancuso S, Martinoia E, Geisler M.** 2005. MDR-like ABC transporter *AtPGP4* is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett* **579**: 5399-5406.
224. **Sasabe M, Toyoda K, Shiraishi T, Inagaki Y, Ichinose Y.** 2002. cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: *NtPDR1* is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Lett* **518(1-3)**: 164-168.
225. **Sasaki T, Ezaki B, Matsumoto H.** 2002. A gene encoding multidrug resistance (MDR)-like protein is induced by aluminum and inhibitors of calcium flux in wheat. *Plant Cell Physiol* **43(2)**: 177-185.

226. **Sathyavathi G.V. et al.** 1987. *Medicinal plants of India*. Vol. 2. New Delhi: Indian Council of Medical Research. India. (Cit. dle Zenk et al., 1988).
227. **Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, Tamura K, Choi K, Morishige T, Fujimot H, Yamada Y.** 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc Nat Acad Sci USA* **98(1)**: 367-372.
228. **Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, Tamura K, Choi K, Morishige T, Fujimoto H, Yamada Y.** 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *PNAS* **98**: 367-372.
229. **Sauna ZE, Ambudkar SV.** 2000. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2515-2520.
230. **Scott AI, Gueritte F, Lee SL.** 1978. Role of anhydrovinblastine in the biosynthesis of the antitumor dimeric indole alkaloids. *J Am Chem Soc* **100**: 6253-6255.
231. **Scott AI, Lee SL, Wan W.** 1977. Indole alkaloid biosynthesis: Partial purification of "ajmalicine synthetase" from *Catharanthus roseus*. *Biochem Biophys Res Commun* **75**: 1004-1009.
232. **Scott AI, Qureshi AA.** 1969. Biogenesis of Strychnos, Aspidosperma, and Iboga alkaloids. Structure and reactions of preakuammicine. *J Am Chem Soc* **91**: 5874-5876.
233. **Shapiro AB, Ling V.** 1997. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem* **250**: 130-137.
234. **Sharma KG, Mason DL, Liu GS, Rea PA, Bachhawat AK, Michaelis S.** 2002. Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eucaryot Cell* **1**: 391-400.
235. **Sharom FJ, Liu R, Romsicki Y, Lu P.** 1999. Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 327-345.
236. **Shitan N a Yazaki K.** 2007. Accumulation and membrane transport of plant alkaloids. *Curr Pharm Biotechnol* **8(4)**: 244-252.
237. **Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K.** 2003. Involvement of CjMDR1, a plant multifrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *PNAS* **100(2)**: 751-756.
238. **Shitan N, Tanaka M, Terai K, Ueda K, Yazaki K.** 2007. Human MDR1 a MRP1 recognise berberine as their transport substrate. *Biosci Biotechnol Biochem* **71(1)**: 242-245.
239. **Shnyder SD.** 2004. Vinflunine. *IDrugs* **7(9)**: 851-859.
240. **Schleucher J, Vanderveer PJ, Sharkey TD.** 1998. Export of carbon from chloroplasts at night. *Plant Physiol* **118**: 1439-1445.
241. **Schröder G, Unterbusch E, Kaltenbach M, Schmidt J, Strack D, De Luca V, Schröder J.** 1999. Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. *FEBS Lett* **458**: 97-102.

242. **Schulz B, Kolukisaoglu HÜ.** 2006. Genomics of plant ABC transporters: The alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS Lett* **580**: 1010-1016.
243. **Sidler M, Hassa P, Hasan S, Ringli C, Dudler R.** 1998. Involvement of an ABC transporter in a developmental pathway regulating hypocotyl cell elongation in the light. *Plant Cell* **10(10)**: 1623–1636.
244. **Smart CC, Fleming AJ.** 1996. Hormonal and environmental regulation of a plant PDR5-like ABC transporter. *J Biol Chem* **27**: 19351-19357.
245. **Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM, Ottenhofer R, van der Lugt NMT, van Roon MA, van der Walk MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P.** 1993. Homozygous disruption of the murine MDR2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* **75**: 451-462.
246. **Songstad DD, De Luca V, Brisson N, Kurz WGW, Nessler CL.** 1990. High-levels of tryptamine accumulation in transgenic tobacco expressing tryptophan decarboxylase. *Plant Physiol* **94(3)**: 1410-1413.
247. **Sottomayor M, Cardoso IL, Pereira LG, Barceló AR.** 2004. Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochem Rev* **3**: 159-171.
248. **Sottomayor M, Di Cosmo F a Barceló AR.** 1997. On the fate of catharanthine and vindoline during the peroxidase-mediated enzymatic synthesis of  $\alpha$ -3',4'-anhydrovinblastine. *Enzyme Mikrob Tech* **21**: 543-549.
249. **Sottomayor M, López-Serrano M, DiCosmo F, Barceló AR.** 1998. Purification and characterization of  $\alpha$ -3',4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *FEBS Lett* **428**: 299-303.
250. **Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, ZenewiczLA, Lewis K.** 2000. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *PNAS* **97(4)**: 1433-1437.
251. **Stevens LH, Blom TJM, Verpoorte R.** 1993. Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase strictosidine  $\beta$ -D-glucosidase in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata*. *Plant Cell Rep* **12**: 573-576.
252. **Steward FC, Mapes MO, Kent AE, Holsten RD.** 1964. Growth and development of cultured plant cells. *Science* **143**: 20-27.
253. **Stöckigt J, Hemscheidt T, Höfle G, Heinstejn P, Formacek V.** 1983. Steric course of hydrogen transfer during enzymatic formation of 3 $\alpha$ -heteroyohimbine alkaloids. *Biochemistry* **22**: 3448-3452.
254. **Stöckigt J, Höfle G, Pfitzner A.** 1980. Mechanism of the biosynthetic conversion of geissoschizine to 19-epi-ajmalicine in *Catharanthus roseus*. *Tetrahedron Lett* **2**: 1925-1926.
255. **Stöckigt J.** 1978. Indirect involvement of geissoschizine in the biosynthesis of ajmalicine and related alkaloids. *J Chem Soc, ChemCommun* 1097-1099.

256. **St-Pierre B, De Luca V.** 1995. A Cytochrome P-450 Monooxygenase Catalyzes the First Step in the Conversion of Tabersonine to Vindoline in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* **109**: 131-139.
257. **St-Pierre B, Laflamme P, Alarco A, De Luca V.** 1998. The terminal *O*-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J* **14(6)**: 703-713.
258. **St-Pierre B, Vazquez-Flota FA, de Luca V.** 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell* **11**: 887-900.
259. **Stuart KL, Kutney JP, Honda T, Worth BR.** 1978. Intermediacy of 3',4'-Dehydrovinblastine in the Biosynthesis of Vinblastine-Type Alkaloids. *Heterocycles* **9**: 1419-1427.
260. **Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, Trombik T, Vanham D, Boutry M.** 2005. NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol* **139(1)**: 341-52.
261. **Swanson SJ, Bethke PC, Jones RL.** 1998. Barley aleurone cells contain two types of vacuoles: haracterization of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell* **10**: 685-698.
262. **Swarbreck D, Ripoll PJ, Brown DA, Edwards KJ, Theodoulou F.** 2003. Isolation and characterisation of two multidrug resistance associated protein genes from maize. *Gene* **315**: 153-164.
263. **Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM.** 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5(3)**: 219-234.
264. **Taiz L & Zeiger E.** 2002. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA.
265. **Takebe J, Labib G, Melchers G.** 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften* **5**: 318-320.
266. **Taylor CT, Baird AW.** 1995. Berberine inhibition of electrogenic ion transport in rat colon. *Br J Pharmacol* **116**: 2667-2672.
267. **Terasaka K, Sakai K, Sato F, Yamamoto H, Yazaki K.** 2003. *Thalictrum minus* cell cultures and ABC-like transporter. *Phytochemistry* **62**: 483-489.
268. **Theodoulou FL, Clark IM, He X-L, Pallett KE, Cole DJ, Hallahan DL.** 2003. Co-induction of glutathione-S-transferases and multidrug resistance associated protein by xenobiotics in wheat. *Pest Manag Sci* **59(2)**: 202-214.
269. **Theodoulou FL, Clark IM, Pellett KE, Hallahan DL.** 1998. A herbicide safener-induced MRP homologue from wheat. 11<sup>th</sup> International Workshop on Plant membrane Biology, Cambridge, UK, 9-14 srpen 1998. (Cit. dle Theodoulou *et al.*, 2000)
270. **Theodoulou FL.** 2000. Plant ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 79-103.
271. **Thomas H, Coley HM.** 2003. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* **10**: 159-165.

272. **Thomas JC, Adams DG, Nessler CL, Brown JK, Bohnert HJ.** 1995. Tryptophan decarboxylase, tryptamine, and reproduction of the whitefly. *Plant Physiol* **109**: 717-720.
273. **Thomas JC, Akroush AM, Adamus G.** 1999. The indole alkaloid tryptamine produced in transgenic *Petunia hybrida*. *Plant Physiol Biochem* **37**: 665-670.
274. **Tietze L-F.** 1983. Secologanin, a biogenetic key compound - synthesis and biogenesis of the iridoid and secoiridoid glycosides. *Angew Chem Int Ed Engl* **22**: 828-841.
275. **Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hörtensteiner S, Matile P, Amrhein N, Martinoia E.** 1998. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J* **13(6)**: 773-780.
276. **Töpfer R, Matzeit V, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss H-H.** 1987. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res* **15**: 5890-5890.
277. **Treimer JF, Zenk MH.** 1979a. Strictosidine synthase from cell cultures of apocynaceae plants. *FEBS Lett* **97**: 159-162.
278. **Treimer JF, Zenk MH.** 1979b. Purification and Properties of Strictosidine Synthase, the Key Enzyme in Indole Alkaloid Formation. *Eur J Biochem* **101**: 225-233.
279. **Tsai P, Tsai T.** 2004 Hepatobiliary excretion of berberine. *Drug metab dispos* **32(4)**: 405-412.
280. **Turner JG, Novacky A.** 1974. The quantitative relationship between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction. *Phytopathology* **64**: 885-890.
281. **Tyler VE, Brady LR, Robbers JE.** 1988. Pharmacognosy, 9th edition. Lea & Febiger, Philadelphia. USA
282. **Uesato SK, Kanomi S, Iida A, Inouye H, Zenk MH.** 1986. Mechanism for iridane skeleton formation in the biosynthesis of secologanin and indole alkaloids in *Lonicera tatarica*, *Catharanthus roseus* and suspension culture of *Rauwolfia serpentina*. *Phytochemistry* **25**: 839-842.
283. **Uher D.** 1999. Právní úprava ochrany biodiverzity a nakládání s geneticky modifikovanými organismy v EU a ČR (srovnání). Diplomová práce. Právnická fakulta. Karlova Univerzita v Praze. Praha. Česko.
284. **van den Brûle S, Smart CC.** 2002. The plant PDR family of ABC transporters. *Planta* **216**: 95-106.
285. **Van der Heiden R, Verpoorte R, ten Hoopen JG.** 1989. Cells and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. *Plan Cell Tiss Organ Cult* **18**: 231-280.
286. **Vazquez-Flota F., De Carolis E, Alarco A, De Luca V.** 1997. Molecular cloning and characterization of deacetoxyvindoline 4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Mol Biol* **34**: 935-948.
287. **Veau B, Courtois M, Oudin A, Chenieux J-C, Rideau M, Clastre M.** 2000. Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. *Biochim Biophys Acta* **1517**: 159-163.



288. **Verpoorte R, Memelink J.** 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 181-187.
289. **Verpoorte R, van der Heijden R, Moreno PRH.** 1997. Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. In: Cordell GA (Ed.), *The Alkaloids*, Vol **49**. New York: Academic Press.
290. **Verpoorte R, van der Heijden R, van Gulik WM, ten Hoopen HJG.** 1991. Plant biotechnology for the production of alkaloids: Present status and prospects. In: Brossi A (Ed.), *The Alkaloids*, Vol **40**. New York: Academic Press.
291. **Verpoorte R, van der Heijden R, ten Hoopen HJG, Memelink J.** 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol Lett* **21**: 467-479.
292. **Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu U, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EJ, Yazaki K, Theodoulou FL.** 2008. Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* **13(4)**: 151-159.
293. **Walczak HA, Dean JV.** 2000. Vacuolar transport of the glutathione conjugate of *trans*-cinnamic acid. *Phytochemistry* **53(4)**: 441-446.
294. **Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ.** 1982. Distantly related sequences in the a- and b- subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945-951.
295. **Wang S, Zheng Z, Weng Y, Yu Y, Zhang D, Fan W, Dai R, Hu Z.** 2004. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. *Life Sci* **74**: 2467-2478.
296. **Whitmer S, Canel C, Hallard D, Gonçalves C, Verpoorte R.** 1998. Effects of alkaloid precursor feeding and elicitation on the accumulation of secologanin in a *Catharanthus roseus* cell suspension culture. *Plant Physiol* **116**: 853-857.
297. **Yamamoto H, Katano N, Ooi A, Inoue K.** 2000. Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450. *Phytochemistry* **53**: 7-12.
298. **Yamamoto K, Takase H, Abe K, Saito Y, Suzuki A.** 1993. Pharmacological studies on antidiarrheal effects of a preparation containing berberine and geranii herba. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **101**: 169-175.
299. **Yamazaki Y, Sudo H, Yamazaki M, Aimi N, Saito K.** 2003. Camptothecin Biosynthetic Genes in Hairy Roots of *Ophiorrhiza pumila*: Cloning, Characterization and Differential Expression in Tissues and by Stress Compounds. *Plant Cell Physiol* **44**: 395-403.
300. **Yazaki K, Shitan N, Takamatsu H, Ueda K, Sato F.** 2001. A novel *Coptis japonica* multidrug-resistant protein preferentially expressed in the alkaloid-accumulating rhizome. *J Exp Bot* **52 (357)**: 877-879.
301. **Yazaki K, Yamanaka N, Masuno T, Konagai S, Shitan N, Kaneko S, Ueda K, Sato F.** 2006. Heterologous expression of a mammalian ABC transporter in plant and its application to phytoremediation. *Plant Mol Biol* **61(3)**: 491-503.
302. **Yazaki K.** 2005. Transporters of secondary metabolites. *Curr Opin Plant Biotechnol* **8**: 301-307.

303. **Ye GN, Daniell H, Sanford JC.** 1990. Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol Biol* **15**: 809-819.
304. **Zenk M.H.** 1995. Chasing the enzymes of alkaloid biosynthesis. In: Golding BT, Griffin RI, Maskill H (Eds.), *Organic reactivity: physical and biological aspects*. Newcastle upon Tyne: The Royal Society of Chemistry.
305. **Zenk MH** 1980. Enzymatic Synthesis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids. *J Nat Prod* **43**: 438-451.
306. **Zenk MH, El-Shagi H, Schulte U.** 1975. Antraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Med Suppl* **33**: 79-101.
307. **Zenk MH, Rueffer M, Kutchan TM, Galneder E.** 1988. Future trends of exploration for the biotechnological production of isoquinoline alkaloids. In: Yamada Y (Ed.), *Applications of Plant Cell and Tissue Culture*. Chichester: John Wiley & Sons.
308. **Zhang X-H, Brotherton JE, Widholm JM, Portis AR.** 2001. Targeting a nuclear anthranilate synthase  $\alpha$ -subunit gene to the tobacco plastid genome results in enhanced tryptophan biosynthesis. Return of a gene to its pre-endosymbiotic origin. *Plant Physiol* **127**: 131-141.
309. **Zhao J, Verpoorte R.** 2007. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. *Phytochem Rev* **6**: 435–457.
310. **Zhu YQ, Xu KX, Luo B, Wang JW, Chen XY.** 2003. An ATP-binding cassette transporter GhWBC1 from elongating cotton fibers. *Plant Physiol* **133(2)**: 580-588.
311. **Zuo J, Chua NH.** 2000. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Curr Opin Biotechnol* **11(2)**: 146-151.
312. **Zuo J, Niu Q, Chua N.** 2000. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* **24**: 265-273.

## Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací

### Postery a přednášky:

Pomahačová B, Roytrakul S, Poustka F, Dušek J, Dušková J, Verpoorte R. Transport of xenobiotic compound in *Catharanthus roseus* cell culture. In: Programme 2, Metabolic Engineering and Systems Biology, [s.n.], p. 2. Symposium Delft Research Centre Life Science and Technology & Graduate Research School Biotechnological Science Delft Leiden. 2.11. 2006. Delft, Nizozemsko.

Pomahačová B, Roytrakul S, Poustka F, Dušek J, Dušková J, Verpoorte R.. Transport of xenobiotic compound in *Catharanthus roseus* cell culture. In: Bříza J, Pavingerová D, Špak J (Eds.) Book of Abstracts, Attavena České Budějovice, p. 127. ISBN 80-86778-16-9. 6<sup>th</sup> International Symposium in the Series RECENT ADVANCES IN PLANT BIOTECHNOLOGY. 12.-16.9. 2005. České Budějovice, Česko.

Pomahačová B, Dušková J, Dušek J, Verpoorte R. Introduction of the CjMDR1 transporter gene from ABC family to the *Catharanthus roseus* cells. In: Programme 2, Metabolic Engineering and Systems Biology, [s.n.], p. 4. Symposium Delft Research Centre Life Science and Technology & Graduate Research School Biotechnological Science Delft Leiden. 31.10. 2007. Delft, Nizozemsko.

Pomahačová B, Dušková J, Dušek J, Verpoorte R. Introduction of the CjMDR1 transporter gene from ABC family to the *Catharanthus roseus* cells. In: Book of Abstracts, [s.n.], p. 34. PLANT SYSTEM BIOLOGY International Symposium. 24-25.4. 2008. Leiden, Nizozemsko.

Pomahačová B. Transport of berberine, benzylisochinoline alkaloid, in *Catharanthus roseus*. Secondary metabolites meeting. 25.8. 2004. Gorlaeus laboratoria, Leiden University, Nizozemsko.

Van der Kooy F, Pomahačová B. GMP Production of cannabinoids and their metabolites. STW (Stichting technisch-wetenschappelijk) meeting. 5.6. 2008. Bedrocan BV Medicinale Cannabis, lokalita přísně tajná, Nizozemsko.

Pomahačová B, van der Kooy F. Cannabis smoke condensate versus vaporized Cannabis. STW (Stichting technisch-wetenschappelijk) Cannabis meeting. 12.12. 2008. Bureau Medicinale Cannabis, Den Haag, Nizozemsko.

Pomahačová B. Monitoring the galanthamine level in different plant sources of *Amaryllidaceae* family in certain developmental stage of the plants. Holland Biodiversity meeting. 16.8. 2007. Plant Praktijkonderzoek, Lisse, Nizozemsko.

Pomahačová B. Monitoring the galanthamine level in *Narcissus pseudonarcissus* Carlton. Holland Biodiversity meeting. 4.6. 2008. Gorlaeus laboratoria, Leiden University, Nizozemsko.

Pomahačová B. Monitoring the galanthamine level in *Narcissus pseudonarcissus* Carlton after various treatments. Holland Biodiversity meeting. 26.2. 2009. Plant Praktijkonderzoek, Lisse, Nizozemsko.

*Původní práce:*

Pomahačová B, Matoušková J, Poustka F, Dušková J, Dušek J. 2006. The study on the influence of natural substances in the explant cultures of *Datura meteloides* DC. Ex Dunal. *Folia Pharm Univ Carol* **34**: 29-35.

Pomahačová B, Dušek J, Dušková J, Yazaki K, Roytrakul S, Verpoorte R. 2009. Improved accumulation of ajmalicine and tetrahydroalstonine in *Catharanthus* cells expressing an ABC transporter. *J Plant Physiol* (v tisku), online Apr 29.

Van der Kooy F, Pomahačová B, Verpoorte R. 2008. Cannabis smoke condensate I: the effect of different preparation methods on tetrahydrocannabinol levels. *Inhal Toxicol* **20(9)**: 801-804.

Van der Kooy F, Pomahačová B, Verpoorte R. 2009. Cannabis smoke condensate II: influence of tobacco on tetrahydrocannabinol levels. *Inhal Toxicol* **21(2)**: 87-90.

Pomahačová B, Van der Kooy F, Verpoorte R. 2009. Cannabis smoke condensate III: The cannabinoid content of vaporised *Cannabis sativa*. *Inhal Toxicol* (v tisku).

Lubbe A, Pomahačová B, Choi YH, Verpoorte R. 2009. Quantitative analysis of galanthamine from *Narcissus pseudonarcissus* bulbs by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Phytochem Anal* (v tisku).

Pomahačová B, Castaño A, Choi YH, Verpoorte R. (2009). Evaluation of *Narcissus* bulbs fungal infection using NMR metabolite profiling methods. *Environ Exp Bot* (submitted).