

SOUHRN

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⁺-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 transgenu, byla studovaná intenzita projevu transgenu. Metoda Northern a Western blottingu se v našich experimentech neosvědčila, signál transgenu 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 transgenozy není příliš praktické. Molekulárně biologické techniky při práci s objemným

transportérem vyžadují četné optimalizace, efektivita transgenozy katarantu

mikroprojektilovým bombardováním nedosahuje úrovně tabákové efektivity (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.