

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakognosie



**Transportní mechanismy sekundárních metabolitů přes  
membrány rostlinných buněk**

**Transport mechanisms of secondary metabolites across membranes of plant  
cells**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vedoucí disertační práce: Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Hradec Králové, 2016

Mgr. Jan Kubeš

„Prohlašuji, že tato práce je původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně, pod vedením své školitelky doc. PharmDr. Lenky Tůmové, CSc a konzultanta PharmDr. Jana Martina, PhD. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování své práce čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Disertační práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 294.

V Hradci Králové 25. 10. 2016

.....  
Mgr. Jan Kubeš

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval své školitelce doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. a konzultantovi PharmDr. Janu Martinovi, PhD. za jejich odborné vedení při přípravě a realizaci této práce a během celého postgraduálního studia.

Chtěl bych také poděkovat prof. Dr. Berndtu Weisshaarovi a Dr. Ralfu Stracke z Univerzity Bielefeld a kolektivu týmu Genome research, RNDr. Kateřině Schwarzerové, PhD., PharmDr. Marii Kašparové, PhD., Mgr. Heleně Hendrychové, PhD., Ing. Anně Vildové, PhD. a celému kolektivu katedry farmakognosie.

Děkuji také za finanční podporu Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Univerzitě Karlově (programy SVV 260 294 a FAFIS).

Mé poděkování rovněž patří rodině a přátelům, kteří mě během studia podporovali.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>9</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Rostlinné kultury <i>in vitro</i> .....</b>	<b>10</b>
3.1.1. Historie.....	10
3.1.2. Typy tkáňových kultur .....	10
3.1.3. Využití kultur <i>in vitro</i> .....	12
3.1.4. Složení nutričních medií .....	13
<b>3.2. Elicitace a stres u rostlin.....</b>	<b>14</b>
3.2.1. Reakce na stres.....	14
3.2.2. Abiotický stres .....	15
3.2.3. Biotický stres .....	16
3.2.4. Elicitace.....	17
3.2.5. Vanad a sloučeniny vanadu .....	18
<b>3.3. <i>Trifolium pratense</i> L. – Jetel luční.....</b>	<b>19</b>
3.3.1. Základní charakteristika.....	19
3.3.2. Obsahové látky.....	19
3.3.3. Použití .....	20
<b>3.4. <i>Genista tinctoria</i> L.– Kručinka barvířská .....</b>	<b>21</b>
3.4.1. Základní charakteristika.....	21
3.4.2. Obsahové látky.....	21
3.4.3. Použití .....	22
<b>3.5. Flavonoidy .....</b>	<b>22</b>
3.5.1. Základní charakteristika.....	22
3.5.2. Biosyntéza flavonoidů a isoflavonů.....	23
3.5.3. Lokalizace biosyntézy.....	25
3.5.4. Flavonoidy – farmakokinetika .....	26
3.5.5. Isoflavony – terapeutické účinky .....	28

<b>3.6. Transport sekundárních metabolitů přes membrány .....</b>	<b>31</b>
<b>3.6.1 Úvod .....</b>	<b>31</b>
3.6.2. ABC transportéry .....	31
3.6.3. MATE transportéry .....	35
3.6.4. Protonové pumpy .....	35
3.6.5. Vezikulární transport.....	36
3.6.6. Transport vybraných sekundárních metabolitů.....	38
<b>3.6.7. Látky používané k identifikaci mechanismu transportu. ....</b>	<b>41</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Materiál a metody .....</b>	<b>44</b>
4.1.1. Použité chemikálie .....	44
4.1.2. Přístrojové a laboratorní vybavení .....	47
<b>4.2. Rostlinný materiál.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3. Ovlivnění transportu u buněčné suspenze.....</b>	<b>49</b>
4.3.1. Elicitace.....	49
4.3.2. Kultivace s inhibitory transportních mechanismů .....	50
4.3.3. Příprava extraktů z <i>T. pratense</i> k HPLC analýze.....	50
4.3.4. Příprava extraktů z <i>G. tinctoria</i> k HPLC analýze .....	51
<b>4.4. Ovlivnění transportu u izolovaných vakuol .....</b>	<b>51</b>
4.4.1. Izolace protoplastů .....	51
4.4.2. Izolace vakuol .....	52
4.4.3. Ovlivnění vakuolárního transportu .....	52
<b>4.5. HPLC analýza obsahu isoflavonů.....</b>	<b>53</b>
<b>4.6. Statistické zhodnocení výsledků .....</b>	<b>55</b>
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1. Elicitace suspenzních kultur .....</b>	<b>56</b>
5.1.1. Vliv sloučenin vanadu na obsah isoflavonů v <i>T. pratense</i> .....	56
5.1.2. Vliv sloučenin vanadu na obsah isoflavonů v <i>G. tinctoria</i> .....	59

<b>5.2. Inhibice transportu isoflavonů do media .....</b>	<b>63</b>
5.2.1. Vliv inhibitorů na transport isoflavonů v <i>T. pratense</i> .....	63
5.2.2. Vliv inhibitorů na transport isoflavonů v <i>G. tinctoria</i> .....	70
<b>5.3. Transport genistinu přes vakuolární membránu .....</b>	<b>76</b>
5.3.1. Vliv MgATP na transport genistinu.....	76
5.3.2. Vliv bafilomycinu A1 na transport genistinu.....	78
5.3.3. Vliv DCCD na transport genistinu.....	80
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>82</b>
<b>6.1. Diskuse k elicitaci suspenzních kultur .....</b>	<b>82</b>
6.1.1. Vliv sloučenin vanadu na obsah isoflavonů v <i>T. pratense</i> .....	82
6.1.2. Vliv sloučenin vanadu na obsah isoflavonů v <i>G. tinctoria</i> .....	83
6.1.3. Shrnutí.....	85
<b>6.2. Diskuse k inhibici transportu isoflavonů do media .....</b>	<b>88</b>
6.2.1. Vliv inhibitorů na transport isoflavonů v <i>T. pratense</i> .....	88
6.2.2. Vliv inhibitorů na transport isoflavonů v <i>G. tinctoria</i> .....	90
6.2.3. Shrnutí.....	91
<b>6.3. Diskuse k transportu genistinu přes vakuolární membránu ...</b>	<b>94</b>
6.3.1. Vliv MgATP na transport genistinu.....	94
6.3.2. Vliv bafilomycinu A1 na transport genistinu.....	95
6.3.3. Vliv DCCD na transport genistinu.....	96
6.3.4. Shrnutí.....	97
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>102</b>
<b>8. POUŽITÉ ZKRATKY .....</b>	<b>104</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>106</b>
<b>10. ABSTRAKTY .....</b>	<b>126</b>
<b>11. SEZNAM VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PUBLIKACÍ .....</b>	<b>128</b>

**12. ÚČAST NA KONFERENCÍCH, PRACOVNÍCH  
STÁŽÍCH A SEMINÁŘÍCH..... 129**

# 1. ÚVOD

Rostliny stále představují zdroj molekul, které mají zajímavé farmakologické účinky. Mezi ně patří isoflavony, sekundární metabolity rostlin z čeledi *Fabaceae*, známé pro svou schopnost vázat se na estrogenové receptory, a tím ovlivňovat některé procesy v lidském těle. V samotné rostlině mají tyto látky řadu vlastností. Podílejí se na zbarvení květů, ochraně organismu při napadení a na ovlivnění půdní mikroflóry, která je důležitou součástí metabolismu dusíku u bobovitých rostlin. Isoflavony podobně jako další flavonoidy jsou tvořeny na endoplazmatickém retikulu a transportovány do vakuol, kde se ukládají zásobní a toxické látky nebo jsou exportovány z buněk ven. Jejich transport probíhá pomocí různých mechanismů, které zajišťují distribuci flavonoidů stejně jako dalších primárních i sekundárních metabolitů a látek rostlině cizích. Výzkum těchto mechanismů probíhá na řadě druhů, které slouží jako modelové organismy (*Arabidopsis thaliana*) a jsou mezi nimi různé léčivé či hospodářské (*Catharanthus roseus*, *Zea mays*, *Vitis vinifera*, *Medicago trunculata*, *Glycine max*) rostliny. Tyto rostliny jsou často pěstovány v různých formách *in vitro* kultur, ze kterých jsou následně získávány buňky a orgány, na kterých je transport zkoumán.



## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo identifikovat možný způsob transportu sekundárních metabolitů přes membrány *in vitro* kultur léčivých rostlin. Práce byla rozdělena do několika etap a zaměřila se na transport látek přes plazmatickou membránu do media a na intracelulární transport přes vakuolární membránu. Vzhledem k tomu, že v mé diplomové práci byla řešena problematika elicitace a produkce isoflavonů na suspenzní kultuře *G. tinctoria*, byla tato kultura a příslušné sekundární metabolity zvoleny jako modelový systém pro výzkum transportních mechanismů. Jako druhá kultura byla zvolena *T. pratense* patřící do stejné čeledi a také obsahující isoflavony. V rámci disertační práce byla pozornost soustředěna na tyto dílčí body:

- Rešerše transportních mechanismů sekundárních metabolitů.
- Odvození suspenzních kultur z kalusů *G. tinctoria* a *T. pratense*.
- Elicitační experimenty na vybraných suspenzních kulturách a následná identifikace transportu použitím různých inhibičních látek na přenos isoflavonů do media.
- Izolace protoplastů a vakuol z vybraných suspenzních kultur a sledování, jak látky ovlivňující mechanismus transportu působí na absorpci isoflavonů do vakuol.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1. Rostlinné kultury *in vitro*

#### 3.1.1. Historie<sup>1</sup>

Rostlinné kultury dnes slouží jako významný nástroj při výzkumu fyziologických i patologických jevů. K prvním průkopníkům se řadí francouzský badatel Henri-Louis Duhemel du Monceau, který v roce 1756 studoval reparační mechanismy rostlin a tvorbu hojivého pletiva – kalusu. 19. století přineslo rozvoj pozorovací techniky a buněčné biologie. Začátkem minulého století Gottlieb Haberland položil základy pro další výzkum tkáňových kultur včetně významu totipotence rostlinných buněk a živných medií. V následujících letech a desetiletích byly postupně zvládnuty techniky kultivace tkání a orgánů různých rostlin a zavedeno používání růstových regulátorů.

V roce 1962 Murashige a Skoog připravili medium obsahující vybrané soli, jejichž koncentrace byla několikanásobně vyšší ve srovnání s dříve používanými medii a použili širší spektrum mikroprvků, což umožnilo odvození nových rostlinných kultur.

Z hospodářsky významných technik byly popsány ty, které zlepšovaly nebo umožňovaly lepší rozmnožování a růst rostlin. Důležitým krokem byla infekce bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, která působí nádorové bujení. Takto nově vzniklou tkáň je možné pěstovat bez auxinů; bakterie rodu *Agrobacterium* se také používají pro genetickou transformaci.

#### 3.1.2. Typy tkáňových kultur

##### Kalusové kultury

Kalus může být definován jako nediferencované pletivo, které je rostlinou tvořeno jako obranná reakce na poranění nebo napadení patogenem. Kalusové kultury však mohou být odvozeny i z jediné rostlinné buňky, která prošla diferenciací, přesto si zachovávají totipotenci a mají tak schopnost obnovit znovu celý organismus. Na této zárodečné hmotě se také mohou objevovat zárodky prýtlů nebo kořenů. S tím jak rostlina tvoří hojivé pletivo, mění se některé jeho vlastnosti ve srovnání s původními buňkami, jak ve smyslu vymizení tak objevení nových vlastností, v závislosti na vnějších i vnitřních podnětech. <sup>2</sup>

Kalusové kultury mohou být získány z explantátu – části rostlinné tkáně, která byla za sterilních podmínek odebrána z mateřské rostliny a umístěna na medium s regulátory růstu, dále vystavením semene mediu s takovými fytohormony jako (2,4-D), které vedou ke tvorbě kalusu nebo přímým poraněním rostlin. <sup>3</sup>

### Suspenzní kultury

Suspenzní (buněčné) kultury jsou tvořeny volnými buňkami nebo jejich shluky, které jsou dispergovány v tekutém živném mediu. Nejčastěji bývají získávány z kalusu jeho přemístěním do tohoto tekutého media. Opatrné promíchání vede k uvolnění jak buněčných shluků různé velikosti, tak jednotlivých buněk. <sup>4</sup> Kromě tohoto způsobu bylo popsáno jejich uvolnění přímo z pletiva listů ponořených do živného media. <sup>5</sup>

V porovnání s kalusovými kulturami pěstovanými na pevném podkladu dochází u buněčných suspenzí k rychlejšímu růstu, což je výhodnější z hlediska rychlejšího získávání nových buněk a jejich využití. Díky přímému kontaktu všech buněk s mediem jsou tak jejich vlastnosti snadno ovlivnitelné změnou složení media. <sup>4</sup>

### Protoplastové kultury

Protoplastové kultury jsou kultury buněk, u kterých byla odstraněna buněčná stěna. Protoplasty se dříve získávaly mechanicky, naříznutím plazmolizované tkáně <sup>6</sup>, dnes se izolují pomocí enzymů (cellulasy, pektinasy) nebo využitím obou postupů. Zdrojem protoplastů jsou často suspenzní a kalusové kultury nebo listový mezofyl. <sup>3</sup> Protoplastové kultury nacházejí využití např. při genetické transformaci. <sup>6</sup>

### „Hairy root“ a „adventitious root“ kultury

„Hairy root“ kultury jsou dnes používané zejména pro tvorbu sekundárních metabolitů, která je v tomto typu kultury zvýšená. Tvorba tkáně je indukována *Agrobacterium rhizogenes* a vznikající kořeny mají rychlý růst, genetickou stabilitu a nevyžadují přítomnost růstových regulátorů. <sup>7</sup> *A. rhizogenes* je půdní G- bakterie obsahující Ri (root inducing) plasmid, který je schopen včlenit svou T-DNA do DNA rostliny. <sup>8,9</sup> Použitím „hairy root“ byl získán např. shikonin z *Lithospermum erythrorhizon* nebo silymarin ze *Silybum marianum*. <sup>7</sup>

Pro produkci různých přírodních látek se využívají i „adventitious root“. Na rozdíl od „hairy root“ rostou pomaleji a k jejich tvorbě z různých tkání či orgánů je potřeba růstový hormon.<sup>9</sup>

### Vakuoly

Vakuoly tvoří kultury, ale jsou izolovány z protoplastů. V rostlinné buňce se podílejí jednak na udržování vodní bilance buňky a turgoru, na uskladnění zásobních a toxických látek a některé vakuoly mají podobnou funkci jako živočišné lysozomy.<sup>10</sup>

Složení obsahu vakuol je podmíněno mnoha faktory. Zásobní vakuoly jsou určeny především k shromažďování látek, které vznikají činností metabolismu. Ve vakuolách jsou tak přítomny nejen produkty primárního metabolismu a zásobní látky, ukládají se v nich i enzymy a sekundární metabolity typické pro příslušný organismus a xenobiotika. Tento typ vakuol tak brání buňku před možným nežádoucím účinkem sekundárních metabolitů a zároveň jsou tyto látky chráněny před předčasnou degradací.<sup>11</sup>

### **3.1.3. Využití kultur *in vitro***

*In vitro* kultury rostlin jsou dnes používané v zemědělství a v řadě dalších odvětví (zahradnictví, lesnictví, rostlinná biologie a biotechnologie). Se znalostí známých i nových metodik využívajících zejména genetické inženýrství je možné získat rostliny, které jsou odolnější vůči nepříznivým podmínkám, mají lepší výtěžnost požadovaných látek a lepší vlastnosti, jsou prostě onemocnění a použitelné pro genové transformace.<sup>7</sup>

Rostliny obecně vytváří řadu farmakologicky zajímavých sekundárních metabolitů a jsou proto využívány pro tvorbu těchto látek, které nelze jednoduše připravit synteticky. S ohledem na zvětšující se populaci stoupají i nároky na využití zemědělské půdy potravinářskými, průmyslovými i léčivými rostlinami. Použitím *in vitro* technik zahrnujících různé typy kultur léčivých rostlin, ve spolupráci s dalšími obory, by bylo možné získat nové zdroje pro získávání významných látek v dostatečném množství. V minulosti již byla připravena řada tkáňových a suspenzních kultur produkujících různé skupiny sekundárních metabolitů, které nalézají využití nejen v medicíně, ale také v potravinářství pro úpravu organoleptických vlastností.<sup>9</sup>

Při nastavení správných podmínek došlo u řady kultur ke zvýšení koncentrace některých metabolitů. Na druhou stranu u *in vitro* kultivace dochází i k poklesu produkce požadovaných

látek způsobených vnitřními změnami, které vedou k menšímu výtěžku a zpomalenému růstu. Postupy vytvořené k překonání snížené biosyntézy umožňují získat buněčné linie, které mají ideální růstové a produkční vlastnosti. Používají se elicitory k navýšení tvorby látek nebo k usnadnění uvolňování a získávání metabolitů k odblokování negativní zpětné vazby. Také úprava kultivačních podmínek a složení media může přispět ke změně obsahu látek.<sup>8</sup> Obsah výsledných metabolitů může být navýšen také přidáním jejich prekurzorů a enzymový systém *in vitro* kultur může být využit i k biotransformaci dalších látek na některé požadované sloučeniny.<sup>12</sup> K vyšší tvorbě sekundárních metabolitů také dochází spíše u kultur s větší organizovaností tkáně. Z toho důvodu se zaměřila pozornost i na kultury „hairy“ nebo „adventitious roots“.

#### 3.1.4. Složení nutričních medií

Hlavním předpokladem pro kultivaci rostlin v prostředí *in vitro* je zajištění podmínek, za kterých bude kultura schopna růstu a bude vykazovat požadované vlastnosti. V současnosti je používána řada medií, které mohou být obměňovány pro jednotlivé druhy rostlin úpravou koncentrace nebo změnou určitého růstového faktoru nebo některého vitamínu. Mezi tato media patří především MS (Murashige/ Skoog)<sup>13</sup>, SH (Schenk/Hildebrandt)<sup>14</sup>, Gamborg B5<sup>15</sup> a další.

Nutriční media obsahují určitou koncentraci makroelementů, které jsou součástí primárních metabolitů tvořících základní buněčné struktury nebo se podílejí na buněčné signalizaci a přenosu energie.<sup>16</sup> Mikroelementy jsou pak převážně kofaktory enzymů, které se účastní oxidoredukčních a metabolických reakcí.<sup>17</sup> Tyto látky jsou vázány ve formě anorganických solí. Kromě nich jsou v mediích zastoupeny i organické složky jako vitaminy nebo myo-inositol, stimuluje růst u většiny rostlin, a sacharidy jako zdroj energie a uhlíku. Do medií jsou přidávány i některé L-aminokyseliny pro lepší růst, zejména suspenzních a protoplastových kultur.<sup>18, 19</sup>

Podstatnou součástí nutričních medií jsou růstové hormony, které se liší svým vlivem na růst a vývoj rostlin. Mezi hormony s převážně pozitivním vlivem na růst se řadí především auxin ( $\beta$ -indolyloctová kyselina), cytokininy (kinetin) a gibereliny, mezi inhibiční patří kyselina abcisová (ABA) nebo ethylen. Jednotlivé skupiny hormonů se mohou lišit místem a rozsahem účinku, který je závislý na použité koncentraci. Od těchto hormonů byla odvozena řada dalších látek, které se používají jako růstové regulátory v nutričních mediích (2,4-dichlorfenoxycetová

kyselina, 6-benzylaminopurin).<sup>18, 19, 20</sup> Poměr a koncentrace látek pak může příznivě působit na tvorbu organizované tkáně nebo kalusu.

Samotné *in vitro* kultury mohou být pěstovány na pevných nosičích částečně ponořených do živného media nebo jako buněčné suspenze přímo v tekutém mediu. Dále se používá agar, který vytváří v závislosti na použité koncentraci tuhý až polotuhý gel.<sup>18, 19</sup>

Kromě složení medií, působí na kultury i další faktory jako jsou světelné podmínky, které mohou ovlivnit růst a produkci kultur v závislosti na vlnové délce a intenzitě světla, době jeho působení a typu kultury.<sup>21</sup> Některé rostlinné kultury vyžadují pěstování za ochrany před světlem, např. buněčná suspenze *Beta vulgaris*.<sup>22</sup> Kultivační místnosti bývají upraveny tak, aby bylo možné uchovávat kultury při stabilní teplotě většinou kolem 25 °C.<sup>23</sup> V závislosti na rostlině a způsobu její kultivace může změna teploty podpořit růst kultury a tvorbu sekundárních metabolitů.<sup>24</sup> Pro zachování rozpustnosti solí a udržení optimálního prostředí pro růst buněk je zapotřebí udržení vhodného pH živného media.<sup>4</sup> Hodnota pH bývá v závislosti na kultuře nastavena na 5,5 až 6,0, ale může se měnit během autoklávování.<sup>19</sup>

*In vitro* kultury, které jsou pěstovány v baňkách přímo v tekutém mediu, bývají umístovány na rollery nebo shakery zajišťující jejich permanentní pohyb. U suspenzních kultur se tak zamezí jejich sedimentaci a cirkulace podporuje homogenitu suspenze. Medium samotné je potom pohybem provzdušňováno a také dochází k rovnoměrnějšímu rozdělení nejen živin, ale i produktů pocházejících z kultur.<sup>4</sup>

## **3.2. Elicitace a stres u rostlin**

### **3.2.1. Reakce na stres**

*In vitro* rostlinné kultury jsou schopny produkovat metabolity s různými vlastnostmi, ale množství získaných látek bývá menší než u rostlin rostoucích *in vivo*. Řada sekundárních látek je tvořena k ochraně rostlin před stresem, v minulosti tak byly vyzkoušeny postupy simulující nepříznivé podmínky. U některých kultur došlo ke zvýšení biosyntézy, nicméně tato produkce je zřídka kdy použitelná v praktickém měřítku. Výjimku představuje v současnosti diterpen taxol z buněčných kultur rodu *Taxus* a shikonin z kultur *L. erythrorhizon*. Pomocí studia vnějších podmínek a procesů podílejících se na syntéze sekundárních metabolitů se dají získat informace, které mohou vysvětlit příslušné mechanismy na různých systémových úrovních.<sup>25</sup>

První reakcí na stres abiotického (vliv prostředí) nebo biotického (vliv organismů a jejich produktů) původu, je vyvolání signálu, který připraví rostlinu na změnu metabolismu. Pokud je působící vliv v rámci tolerance, dochází k utužení odolnosti, nicméně při překročení limitu bude rostlina poškozena. I trvalé změny lze postupně opravit, pokud nedošlo k takovému narušení, že je výhodnější se zbavit poškozených orgánů. Při dlouhodobém působení extrémních vlivů pak většinou dochází k zániku organismu. U víceletých rostlin tak existují mechanismy, které umožňují přežít opakující se stres v rámci střídání ročních období. Na rostlinu může působit více stresových podmínek najednou, což vyžaduje aktivaci i více obranných mechanismů, které vytváří komplexní ochranu.<sup>26</sup>

### 3.2.2 Abiotický stres

Fyzikálním faktorem, který může způsobit abiotický stres, je např. teplota, kdy růst a vývoj rostlin probíhá v určitém optimálním intervalu. Mimo toto rozmezí dochází k poruše funkce buněčných membrán a bílkovin. Rostlina se může v závislosti na nízké či vysoké teplotě bránit tvorbou „cold“ nebo „heat-induced“ proteinů, úpravou lipidového metabolismu a složení membrán a dalšími mechanismy.<sup>27</sup>

Mezi další významné zdroje poškození patří záření. Rostliny jsou denně vystaveny záření o různé vlnové délce; některé složky slunečního záření jsou nezbytné pro fotosyntetickou aktivitu, jiné jako  $\gamma$ -radiace o vysoké energii v závislosti na dávce mohou způsobit různé poškození až smrt. U *Centella asiatica* došlo k útlumu tvorby biomasy po ozáření  $\gamma$ -zářením dávkou LD<sub>50</sub>. Na druhou stranu došlo k nárůstu obsahu flavonoidů a malondialdehydu jako indikátoru vznikajících volných radikálů<sup>28</sup>, zatímco tvorba některých anthocyaninů v *Malva sylvestris* byla indukována UV-B zářením.<sup>29</sup>

Častým abiotickým stresem bývá i porucha osmotické rovnováhy vlivem sucha, zasolení půdy nebo teplot pod bodem mrazu.<sup>30</sup> Nepříznivé podmínky aktivují příslušné signální dráhy zahrnující ABA a syntézu proteinů, které mají za úkol chránit buňku před dalším poškozením. Nerovnováha v osmotickém tlaku a turgoru je nejprve stabilizována díky činnosti iontových kanálů a následně pomocí metabolitů s osmotickými vlastnostmi.<sup>30</sup>

Fyziologický stav rostlin je také ovlivněn složením půdy; řada mikroprvků (Fe, Mn, Cu, Zn) může mít v nadměrném množství negativní dopad na růst organismu. Mezi prvky, které mohou vyvolat stres, patří i Cd, Pb, Ni nebo Al. Jejich vstřebávání se pravděpodobně děje pomocí

transportních systémů pro jiné ionty a rostlinný organismus je nerozliší.<sup>27,31</sup> Tyto prvky mohou narušit činnost enzymů, což se projeví např. zakrslým růstem kořenů, ve kterých se hromadí. Z kořenového systému mohou pak být transportovány do zbytku rostliny.<sup>27</sup>

Rostliny mohou vytvářet na svoji ochranu organické látky, které na sebe váží kovy a/nebo je vylučují zpět do půdy pomocí pump. U adaptovaných rostlin dochází např. ke zvýšené produkci a sekreci různých organických kyselin aniontovými kanály do půdy, kde pevně váží  $Al^{3+}$ . V *Melastoma malabathricum* nebo listech *Fagopyrum*  $Al^{3+}$  tvoří komplexy s kyselinami uvnitř jejich buněk.<sup>31</sup> Koncentrování těžkých kovů může probíhat i u dalších druhů a jejich přesun zajišťují různé chelatační látky, např. metallothioneiny a fytochelatiny. Tyto peptidy obsahují různý počet molekul cysteinu, jehož sirná skupina může poutat řadu těžkých kovů. Metallothioneiny také fungují jako chaperony, starají se o správné složení enzymů a umístění prvku v enzymu. Fytochelatiny vznikají v cytosolu jako reakce na výskyt iontů uvnitř buňky a transportují je do vakuol, kde jsou vázány kyselinami.<sup>27,31</sup>

### 3.2.3. Biotický stres<sup>27</sup>

Biotický stres v rámci alelopatie vzniká jako důsledek interakce rostliny s jiným druhem nebo jeho produktem. Mezi blízko rostoucími rostlinami může docházet ke kompetici o zdroje vody, živin a světla. Působení sekundárních metabolitů mezi rostlinami závisí na množství účinné látky a jejím rozptýlení do okolí rostliny. Jednou z látek, která negativně ovlivňovala růst dalších druhů, byl juglon uvolňovaný mikrobiálním štěpením z listů *Juglans regia*.

Rostliny jsou také napadány řadou patogenů, a proto vyvinuly řadu mechanismů zastavujících šíření infekce. Tyto mechanismy se aktivují produkty pocházejícími přímo z patogenů (oligomery chitinu, glykoproteiny hub) nebo látkami uvolňovanými z poškozených rostlinných stěn (oligogalakturonany). Tyto látky přes receptor spouští signální kaskádu vedoucí k syntéze specifických látek nebo k tvorbě ROS (superoxid) a dalších látek důležitých v buněčné signalizaci (kyselina jasmonová).

V rámci obranné reakce se mohou vytvářet „pathogenesis-related proteins“ a široké spektrum jednodušších látek z různých skupin, jejichž koncentrace může být konstitutivní, ale přítomností patogenu se zvyšuje. Tyto látky (alkaloidy, terpeny, flavonoidy) tak tvoří skupinu fytoncidů (inhibitinů). Významnou skupinou sekundárních metabolitů jsou fytoalexiny, které



vznikají až během infekce. Popsané jsou zejména isoflavony z čeledi *Fabaceae*, diterpeny (*Poaceae*), furanokumariny (*Apiaceae*) nebo stilbeny (*Vitaceae*).

#### 3.2.4. Elicitace

Elicitor se dá definovat jako látka nebo jev různé povahy, který je schopen vyvolat fyziologickou odpověď u konkrétního organismu. U rostlin to může být řada sloučenin, které jsou produkty nejen patogenů, ale i látky rostlinou přímo vytvářené v místě napadení.<sup>32</sup> Jako reakci na tyto sloučeniny může rostlina produkovat výše zmíněné fytoalexiny, které se účastní obrany proti některým nákazám. Před zahájením příslušných mechanismů musí dojít k interakci mezi elicitorem a jeho příslušným receptorem, který se nachází na plasmatické membráně nebo uvnitř buňky. Změna konformace receptoru nebo indukce receptorových kinas poté přes efektor spustí příslušnou signální kaskádu, která vede až k vlastnímu zahájení obranné reakce produkcí příslušných molekul.<sup>25</sup>

Kontakt mezi elicitorem (signálem) a receptorem je zásadním bodem mechanismu buněčné odpovědi a byla provedena řada analýz k objasnění struktury obou aktérů. Pro elicitory hub byla nalezena analoga, která mají stejný účinek a zahrnují různé sacharidové struktury (chitin), peptidy a proteiny, látky založené na struktuře lipidů, včetně fragmentů těchto látek. Tyto elicitory (chitin, chitosan,  $\beta$ -glukan) se uplatňují u více druhů rostlin a může tak pro ně teoreticky existovat obecný receptor.<sup>25</sup>

Efektorů vázaných na receptory existuje více typů a zahrnují různé iontové kanály, G-proteiny a proteinkinasy. Ty spouští signalizaci pomocí tzv. druhých posílů, kteří dále šíří signální kaskádu. Aktivací receptorů dochází k reverzibilní fosforylaci nebo defosforylaci proteinů na membráně a v cytoplasmě, k vzestupu cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$ , k depolarizaci membrány a přesunu dalších iontů přes membránu vedoucí ke snížení pH uvnitř buňky, aktivaci mitogenem aktivovaných protein kinas (MAPK), NADPHoxidasy s následnou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS), k expresi genů rané obrany, tvorbě ethylenu a jasmonové kyseliny (JA), k expresi genů pozdní obrany a biosyntéze sekundárních metabolitů. Jednotlivé dráhy mohou probíhat vedle sebe nebo se křížit a vést k různým odpovědím.<sup>25</sup>

Samotná elicítace a produkce sekundárních metabolitů je ovlivněna řadou různých faktorů, jednak charakterem použitého elicitoru, jeho koncentrací/intenzitou a dobou působení. Vliv poté samozřejmě má i samotná rostlinná kultura a její stáří.<sup>33</sup>

### 3.2.5. Vanad a sloučeniny vanadu

Toxicita vanadu a jeho sloučenin spočívá v negativním ovlivnění různých enzymů (ATPas, proteinkinas, ribonukleas a fosfatas). Zasahují také do činnosti enzymů, které ovlivňují genetickou informaci a mohou způsobit její poškození a tvorbu mutací. Nicméně inhibice protein-fosfotyrosinové fosfatasy (PTP) díky podobnosti orthovanadátu s orthofosfátem může mít pozitivní vliv na cukerný metabolismus a snížení inzulinové rezistence u člověka. Negativní vliv vanadu a jeho derivátů na buněčný cyklus a genetickou informaci byl také vyzkoušen na liniích rakovinných buněk. Tato aktivita byla ale závislá na druhu použitých buněk, typu sloučeniny a její koncentrace.<sup>34</sup>

Pozornost na přítomnost vanadu v živých organismech se soustředila poté, co byl objeven v některých mořských druzích, které ho využívají jako součást svých enzymů. Jedná se o vanadové nitrogenasy a na vanadu závislé haloperoxidasy (V-HPO). První se nacházejí v bakteriích, které váží dusík a mění ho na amoniak. Tyto enzymy se nacházejí u mikroorganismů vyskytujících se v prostředí chudém na molybden. V-HPO byly nalezeny v širším spektru organismů, jako řasy a houby. Halogenované organické sloučeniny (terpeny, indoly, fenoly) jsou pak z většiny produkovány mořskými organismy, jako jsou řasy z čeledi *Rhodophyceae* a významnou roli hraje především na vanadu závislá bromoperoxidasa, která se nalézá i u některých lišejníků.<sup>35</sup>

V půdě se jeho množství pohybuje kolem 150 µg/g, ale v místech těžby vanadu jsou tyto hodnoty zvýšeny. Přítomnost vanadu se negativně projevila v celkovém vzrůstu rostlin při porovnání s druhy, které rostly ve vzdálenějších oblastech od místa těžby, kde byla rovněž nalezena nižší koncentrace tohoto prvku.<sup>36</sup> Vyšší koncentrace v kořenech ve srovnání s dalšími orgány byly naměřeny u hydroponických kultur *Brassica campestris ssp. chinensis var. parachinensis* a *Solanum lycopersicum*. U těchto rostlin měl vanad ve vyšších koncentracích negativní vliv na celkový stav rostliny.<sup>37</sup>

Různé sloučeniny vanadu byly již testovány jako elicitory na různých kulturách ke zvýšení produkce některých alkaloidů, saponinů a ovlivnily také fenylalaninlyasu podílející se na syntéze flavonoidů.<sup>38, 39, 40</sup>

### 3.3. *Trifolium pratense* L. – Jetel luční

#### 3.3.1. Základní charakteristika <sup>41</sup>

*Trifolium pratense* (Příloha 1.; s. 1) z čeledi *Fabaceae* dorůstá výšky od 20 do 50 cm a na jeho lodyze se nacházejí typické řapíkaté, trojčetné listy. Drobné květy tvoří hlávku a skládají se z bělozeleného nebo načervenalého kalichu. Korunní lístky mají světle karmínovou, masově růžovou barvu (vyskytují se i světlejší nebo bílé varianty), které tvoří typickou motýlovitou korunu. *T. pratense* se vyskytuje především v Evropě, Severní Africe a Asii na loukách a pastvinách, ale je možné tuto rostlinu nalézt i v Severní a Jižní Americe a na dalších místech.

#### 3.3.2. Obsahové látky

*T. pratense* obsahuje kromě typických isoflavonů i další typy sekundárních metabolitů. Analýzou 57 druhů *T. pratense* pomocí UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography) byl zjištěn obsah fenolických kyselin, klovamidu, flavonoidů a isoflavonů. <sup>42</sup> Nejvyšší koncentrace celkových isoflavonů byly naměřeny v listech, stonku a kořenech v porovnání s květem. Obsah sekundárních metabolitů byl závislý na lokalitě sběru a v testovaných orgánech byly zastoupeny jednotlivé isoflavony v různé koncentraci. U některých rostlin stanovované isoflavony nebyly přítomny. <sup>43</sup> Kromě isoflavonů jako je genistein, daidzein a jejich methylderivátů, se v *T. pratense* nacházejí i další typy (irilin, orobol, texasin). Tyto aglykony se vyskytují i ve formě glykosidu, který může být v různé míře acylován kyselinou octovou nebo jablečnou. <sup>44</sup> Z flavonoidů byl ve vodných extraktech identifikován kempferol, apigenin, luteolin, zatímco jejich glukosidy společně s kvercetinem-3-glukosidem byly nalezeny v ethylacetátovém extraktu. <sup>45</sup> V květech extrahovaných ethanolem byl jako hlavní flavonoid nalezen flavon luteolin a v nižší koncentraci také flavonoly kempferol a myricetin. <sup>46</sup> Květy také obsahovaly procyanidinové polymery. <sup>47</sup>

*T. pratense* může obsahovat i kyanogenní glykosidy. V rodu *Trifolium* jsou přítomny linimarin a lotaustralin; při analýze rostlin z různých oblastí byly nalezeny rostliny s pouze jedním nebo žádným kyanogenním glykosidem. Při srovnání s *T. repens* (jetel plazivý) se u vzorků jetele lučního vyskytovaly kyanogenní glykosidy méně často a i jejich koncentrace byly nižší. <sup>48</sup> V standardizovaném extraktu získaném z *T. pratense* a zkušném v druhé klinické fázi byla také zjištěna přítomnost některých kumarinů, jako dafnoretin, fraxidin, kumestrol, skopoletin a xanthotoxol. <sup>49</sup>

V kořenech byly identifikovány látky, které jsou součástí jetelové silice a působily jako atraktanty (methylbenzoát, *E*-2-hexenal) nebo odpudivě (limonen) na *Hylastinus obscurus* Marsham (lýkohub jetelový) napadající kořeny.<sup>50</sup> Kromě těchto tří látek byli v kořenovém extraktu popsáni další zástupci silic, kteří na chování *H. obscurus* neměli vliv jako benzaldehyd, acetofenon, dekanal,  $\alpha$ -pinen a další.<sup>51</sup> Složení silice v zelených částech rostliny bylo studováno s ohledem na využití *T. pratense* jako krmiva. V čerstvé a sušené rostlině byly nejvíce zastoupeny terpeny, alkoholy a ketony, zatímco v siláži se nacházely převážně estery a některé mastné kyseliny. Z konkrétních zástupců byly v čerstvém *T. pratense* popsány látky jako 3-methyl-1-butanol,  $\beta$ -farnesen, (*z*)- $\beta$ -karyofyllen a řada dalších.<sup>52</sup>

U *T. pratense* byly v kořenech popsány také triterpenické saponiny.<sup>53</sup> V semenech jetele lučního a dalších poddruhů byly v různé míře zastoupeny především soyasaponin I, astragalosid VII a další dva glykosidy.<sup>54</sup>

### 3.3.3. Použití

Rod *Trifolium* s více jak 300 druhy patří mezi významné užitkové rostliny jak z pohledu hospodářského, tak medicínského. Různé druhy byly používány při léčení interních a kožních chorob jako součást tradiční medicíny v Evropě, na Blízkém Východě, v Indii i Severní Americe. Rostlinné přípravky se aplikovaly vnitřně proti kašli, bolesti, zácpě a lokálně na kůži při ekzému a psoriáze.<sup>55</sup>

*T. pratense* a jeho extrakty jsou díky obsahu isoflavonů dnes používány při potížích spojených s menopauzou. Meta-analýza, která se zabývala účinkem extraktů proti návalům horka, ukázala, že u zkoumané skupiny došlo ke snížení výskytu tohoto příznaku. Studie bohužel nepřinesla přímou odpověď na klinickou využitelnost nebo na výskyt potencionálních nežádoucích účinků při dlouhodobém podávání.<sup>56</sup> U extraktu z jetele lučního byla rovněž testována afinita k opioidním receptorům  $\mu$  a  $\delta$ . Extrakt, který obsahoval 30 % isoflavonů, vykazoval aktivitu k oběma receptorům, což by mohlo vysvětlovat některé pozitivní účinky proti příznakům spojených s menopauzou (ovlivnění teploty, nálad).<sup>57</sup>

Použití a účinnost extraktu MF11RCE z *T. pratense* jako další možnosti ke klasické hormonální terapii bylo cílem randomizované, dvojité zaslepené studie s podáváním placebo u postmenopauzálních žen z Ekvádoru. Výsledek studie ukázal, že přípravek s obsahem

isoflavonů zlepšil stav poševní sliznice a oproti kontrole se snížil i počet žen, které trpěly některými příznaky jako dyspareunií. <sup>58</sup>

Brandli a kol., kteří se zabývali problematikou využití *T. pratense* při léčbě benigní hyperplazie prostaty zjistili, že jak čisté látky, tak i isoflavony získané z přípravku s jetelovým extraktem tlumily indukovanou kontraktilitu svaloviny potkaní prostaty. Genistein, formonetin a biochanin A byly neúčinnějšími látkami, bohužel působily až v koncentracích, které by nemusely být v klinickém použití bezpečné. <sup>59</sup> V dalších experimentech byla popsána i inhibice angiogeneze <sup>60</sup> a antiflogistický účinek <sup>61</sup> jetelového extraktu a v něm obsažených isoflavonů na různé modelové tkáně a zvířata.

### **3.4. *Genista tinctoria* L.– Kručinka barvířská**

#### **3.4.1. Základní charakteristika**

Rod *Genista*, který také patří do čeledi *Fabaceae* zahrnuje okolo 87 druhů rostlin. *G. tinctoria* (Příloha 2.; s. 1) je keř až polokeř dosahující výšky do jednoho metru, se žlutě zbarveným květenstvím. Roste na světlých prostranstvích na území Evropy a v některých částech Ruska a Střední Asie. <sup>62</sup> V České republice je ji možné nalézt v nížinách a v některých níže položených oblastech hor. <sup>63</sup>

#### **3.4.2. Obsahové látky**

V *G. tinctoria* se nachází řada sekundárních metabolitů, zejména látky ze skupiny polyfenolů. Z jednoduchých fenolových sloučenin obsahuje kyselinu kávovou, chlorogenovou, ferulovou nebo *p*-kumarovou. Zástupci složitějších polyfenolů jsou především flavonoidy (apigenin, luteolin, glykosidy kvercetinu) <sup>64</sup> a isoflavony (genistein, daidzein a jejich 7-*O*-glukosidy, formonetin). <sup>65</sup> Při srovnání obsahu jednotlivých isoflavonů mezi různými druhy byl zjištěn vyšší obsah glukosidů genistinu, daidzinu a jejich aglykonů v *G. tinctoria* oproti *G. sagittalis* (k. křídlatá), která obsahovala methylderiváty ononin a formonetin. <sup>66</sup>

*G. tinctoria* obsahuje také chinolizidonové alkaloidy jako cytisin (0,7 – 0,8 %) <sup>62</sup>, baptifolin, lupanin, anagrin <sup>67</sup> a také spartein <sup>68</sup>. Obsah alkaloidů se může měnit v průběhu roku a být závislý na lokalitě sběru.

*G. tinctoria* může být pěstována i v podmínkách *in vitro*, kde dochází k určitým změnám sekundárního metabolismu. V kalusových a suspenzních kulturách docházelo k poklesu obsahu

chinolizidinových alkaloidů ve srovnání s volně rostoucími rostlinami, mezi přítomnými alkaloidy dominoval lupanin.<sup>69</sup> Naopak u kalusových kultur byl zaznamenán nárůst estrogenně působících isoflavonů oproti normálně pěstovaným druhům.<sup>70</sup> U rodu *Genista* byly rovněž popsány látky typu triterpenických saponinů (*G. ulicina*)<sup>71</sup> a silic (*G. tinctoria*).<sup>72</sup>

### 3.4.3. Použití

Z historického hlediska se *G. tinctoria* používala v barvířském průmyslu a také v tradiční medicíně. K barvení látek (plátna a vlny) byly využívány květy s typickou žlutou barvou, kterou dávají obsažené flavony jako luteolin a apigenin, isoflavon genistein a jejich glykosidy.<sup>73</sup>

V Itálii byla používána v lidovém léčitelství<sup>74</sup> jako diuretikum a laxativum, ale i jako emetikum ve formě nálevu ze semen, zatímco v Bulharsku z nadzemní části rostliny.<sup>75</sup> Kručinka barvířská se uvádí jako léčivá rostlina i v oblasti západního Středomoří a Turecka, kde se používá nálev z květů k pročištění organismu.<sup>76</sup>

V současné době byl studován např. vliv methanolových extraktů z *G. tinctoria* a *G. sessifolia* na ochranu plasmidové DNA před UV zářením a ROS.<sup>77</sup> Genistein obsažený v rodu *Genista* může hrát roli při léčbě diabetu<sup>78</sup> a další druhy byly testovány např. pro ulceroprotektivní aktivitu (*G. rumelica*).<sup>79</sup>

*G. tinctoria* se v České republice nachází na seznamu rostlin zakázaných při výrobě potravin<sup>80</sup>, ale existují přípravky ve formě sušené nati, které jsou určeny pro nikotinovou odvykací kúru. Cytisin díky určité podobnosti s nikotinem<sup>81, 82</sup> působí jako částečný agonista na nikotinových receptorech a tlumí abstinenci příznaky. Bylo provedeno i několik studií, z nichž vyplynulo, že může zlepšit proces odvykání, přičemž jeho analog dosahoval lepších účinků.<sup>83, 84</sup>

## 3.5. Flavonoidy

### 3.5.1. Základní charakteristika

Flavonoidy jsou jednou z nejrozšířenějších skupin sekundárních metabolitů s více než 6500 popsány látkami<sup>85</sup> a řadí se mezi polyfenolové sloučeniny. Jejich struktura vychází z nejjednoduššího flavanového skeletu (Příloha 3.; s. 1; 2-fenylchroman, 2-fenylbenzopyran), který je tvořen pyranovým kruhem C a dvěma fenolickými kruhy A a B lišícími se biosyntetickým původem. Na tomto skeletu může docházet k různým strukturním, substitučním

a oxidoredukčním obměnám, z čehož vyplývá velký počet odvozených látek.<sup>86</sup> Podle polohy fenylu na kruhu C jsou rozlišovány isoflavany (3-fenylchroman) a neoflavany (4-fenylchroman). Další podskupinou jsou prekurzory flavanonů chalkony, které mají otevřený kruh C<sup>86</sup> a aurony. V rámci každé podskupiny mohou být jednotlivé flavonoidy na různých místech dále obměňovány hydroxylací, methoxylací, glykosidací a acylací glykosidu.

Glykosidace patří mezi mechanismy, které slouží ke zvýšení rozpustnosti flavonoidního aglykonu a chrání rostlinnou buňku před možnými nežádoucími účinky těchto látek. U flavonoidů jsou nejčastěji přítomné *O*-glykosidy s některými monosacharidy, jako je glukosa, galaktosa, rhamnosa, arabinosa nebo xylosa vázané β-glykosidickou vazbou. Mezi disacharidy se řadí např. rutinosa (6-*O*-α-L-rhamnosyl-D-glukosa) nebo neohesperidosa (6-*O*-α-L-rhamnosyl-D-glukosa).

Flavonoidy mohou být v závislosti na přítomnosti asymetrického uhlíku opticky aktivní. S ohledem na strukturu se tak jedná především o ty podskupiny flavonoidů, které nemají dvojnou vazbu mezi C-2 a C-3. Nicméně neaktivní aglykony mohou získat optickou aktivitu glykosidací, kdy je připojen na jejich molekulu sacharid a většina flavonoidních glykosidů pak stáčí rovinu polarizovaného světla doleva.<sup>87</sup>

### 3.5.2. Biosyntéza flavonoidů a isoflavonů<sup>88</sup>

Biosyntéza flavonoidů je v současnosti relativně dobře prostudována. Biosyntézy se účastní řada enzymů, které spadají převážně do tří skupin: P450 hem-dependentní monooxygenasy, NADPH dependentní reduktasy a 2-oxoglutarát dependentní dioxygenasy (2OGD). Na syntéze se podílejí i transferasy a další enzymy s různou aktivitou.

Samotná biosyntéza (Příloha 4; s. 2) vychází ze dvou látek, které vznikají z primárního metabolismu. První látkou je fenylalanin (I), který pochází z metabolické dráhy kyseliny šikimové (produkt biosyntetické reakce fosfoenolpyruvátu a erythroxy-4-fosfátu). Druhou nezbytnou látkou je malonyl-CoA (V), který je produktem acetátového metabolismu.

Z fenylalaninu je enzymem fenylalanin amoniom lyasou (PAL) odštěpen amoniak za vzniku *trans*-skořicové kyseliny (II), která negativní zpětnou vazbou blokuje jeho činnost. *Trans*-skořicová kyselina je hydroxylována na *trans*-4-kumarát (III) pomocí cinamát-4-hydroxylasy (C4H), který je následně aktivován pro další modifikace v rámci syntézy fenylpropanoidů 4-kumarát:CoA ligasou (4CL). Substrátem pro 4CL mohou být i další hydroxyskořicové kyseliny

(kávová, ferulová) a tento enzym se také nalézá v různých isoformách, kdy se rozcházejí dráhy pro flavonoidy a lignany.

Druhá složka biosyntézy flavonoidů – malonyl-CoA (V) vzniká karboxylační reakcí z acetyl-CoA za katalýzy acetyl-CoA karboxylasou (ACC) a spotřeby ATP. ACC se nachází v plastidech, kde se jeho heteromerní forma podílí na tvorbě mastných kyselin. V cytoplasmě je homodimerní enzym produkující malonyl-CoA. V různých zátěžových experimentech bylo zjištěno, že ACC byl indukován abiotickými i biotickými elicitory.

Z 4-kumarát-CoA (IV) a malonylu-CoA je následně tvořen chalkonsynthasou (CHS) základní C<sub>15</sub> skelet, který je dále modifikován. CHS katalyzuje řetězec dekarboxylačních a kondenzačních reakcí, kdy jako jádro slouží kumarát (kruh B), na který se postupně připojují tři molekuly malonylu za vzniku polyketidového řetězce. Tento řetězec následně podléhá cyklizaci a aromatizaci (kruh A). Produktem této reakce pak nejčastěji bývá naringeninchalkon (VI) nebo isoliquiritigenin (XI) činností chalkonreduktasy (CHR). CHS patří do rodiny polyketidových synthas a celá reakce probíhá na jediném místě bez přítomnosti kofaktorů. Podobnou sekvenci jako CHS má i stilben synthasa, produkující strukturně odlišné stilbeny (resveratrol).

Chalkonisomerasa (CHI) uzavírá základní biosyntézu izomerací chalkonu na příslušný 2S-flavanon (VII, naringenin). Tento enzym má jednak isoformu CHI-I pro 6'-hydroxychalkony a také isoformu CHI-II pro 6'-hydroxychalkony a 6'-deoxychalkony. CHI-II byla nalezena převážně u čeledi *Fabaceae* a je nezbytná pro tvorbu opticky aktivní formy. V *in vitro* prostředí izomerační reakce probíhá pouze za vzniku racemátu. Flavanony slouží jako základ pro isoflavony a další metabolity. Hlavní roli zde hraje isoflavon synthasa/2-hydroxyisofavanon synthasa (IFS/2HIS). Tento enzym katalyzuje tvorbu 2R, 3S-2-hydroxyisoflavanonu migrací arylu z C-2 na C-3 a hydroxylaci na C-2, s následnou dehydratací na nenasycený isoflavon. Podle produktu CHS je tak z naringeninů přes 2,5,7,4'-tetrahydroxyisoflavanon (VIII) tvořen genistein (IX), zatímco daidzein (XIII) z liquiritigeninu (XII). 2HIS také patří mezi enzymy skupiny CYP 93.

Jednou z obměn isoflavonů je pak 4'-O-methylace, která vede ke vzniku látek působících jako fytoalexiny. Tyto látky se mezidruhově liší: glyceolliny v *G. max*, phaseoliny ve *Phaseolus vulgaris*, pisatin (XV) v *Pisum sativum*. Methylace je katalyzována 4'-O-methyltransferasou, konkrétně hydroxyisoflavanon 4'-OMT (HI4'OMT) a reakce nejspíše probíhá během syntézy isoflavonů a nikoliv přímo na genisteinu nebo daidzeinu. Kromě hydroxylu v poloze 4' může



být methylován i v poloze 7. Methylovaný derivát genisteinu je biochanin A (X) a daidzeinu formononetin (XIV). Další strukturní obměny, které zahrnují produkci fytoalexinů, jsou různé hydroxylační a redukční reakce vedoucí až k tvorbě vnitřních kruhů činností DMI dehydratasy (DMID), např. u medikarpinu (XVI) *Medicago sativa*. Některé metabolity mohou být navíc prenylovány (glyceolliny, XVII).

Flavonoidy a isoflavony mohou být dále upraveny činností dalších transferas (glukosyltransferasa, malonyltransferasa), které připojují jednoduché cukry nebo organické kyseliny za vzniku polárnějších metabolitů. Kromě lepší rozpustnosti se mohou tyto látky podílet i na transportu molekuly v rámci rostliny.

V současné době se při výzkumu biosyntézy a transportu flavonoidů využívají anthocyanidiny a proanthocyanidiny, které ve vakuole dávají typické zbarvení závislé na pH vakuolární šťávy. Cílenou úpravou potencionálních genů, které kódují enzymy podílející se na metabolismu flavonoidů, vznikají mutanti s poruchou zbarvení osemení.

### 3.5.3. Lokalizace biosyntézy

Výzkum zaměřený na biosyntézu flavonoidů se soustředil i na místo jejich tvorby. U různých druhů byla od 70. let 20. století popsána přítomnost odpovědných enzymů v mikrosomálních frakcích. Postupně bylo vyvozeno, že biosyntéza flavonoidů i jiných fenyylpropanoidů probíhá na cytosolové membráně ER, např. u *Hyperastrum* byl v této organelle potvrzen výskyt PAL, CHS a dalších enzymů.<sup>89</sup> V rámci dalšího sledování byla pozornost zaměřena na to, jestli enzymy zajišťující tvorbu flavonoidů působí samostatně nebo vytvářejí komplexy – metabolony. Tato uskupení mají pro buňku několik výhod. Jednotlivé meziprodukty se shromažďují na jednom místě, takže jsou k dispozici pro navazující reakce jak pro konečnou látku, tak pro další metabolity, které mohou vznikat ve vedlejších drahách, tvorba látek může být snáze říditelná a také lze průběžně odstraňovat vznikající metabolity.<sup>90</sup>

V rámci flavonoidního metabolonu jsou všechny enzymy po CHS a CHI společné jak pro flavonoidy tak isoflavony. Navíc první tři enzymy (PAL, C4'H a 4CL) poskytují meziprodukty pro fenyylpropanoidovou dráhu, ze které vycházejí další fenolové látky.<sup>91</sup> PAL se vyskytuje ve dvou formách PAL1 a PAL2, které se liší svou přítomností v cytosolové a mikrosomální frakci. PAL1 se nachází v obou systémech, PAL2 v cytosolu. C4'H je pak součástí mikrosomální frakce. U transgenního tabáku, u kterého došlo k vyšší expresi C4'H byl pozorován přesun

PAL2 do mikrosomální frakce. Z dalšího sledování bylo odvozeno, že C4'H slouží k soustředění PAL a pravděpodobně se kolem něho mohou shromažďovat i další enzymy.<sup>92</sup> Další experimenty využívající Forsterův rezonanční přenos energie ukázaly, že flavonoidní enzymy mohou tvořit funkční celky.<sup>93</sup>

### 3.5.4. Flavonoidy – farmakokinetika

#### Absorpce

Flavonoidy musí být před absorpcí uvolněny z rostlinné matrice mechanicky, chemicky nebo působením mikroflóry. Příjem flavonoidů ovlivňuje i jejich struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti (rozpuštnost, pKa, hydrofilita, velikost molekuly). Flavonoidy se nalézají v rostlinách většinou ve formě glykosidů a díky hydroxylům jsou glykosidy více rozpustné ve vodném prostředí, ale zároveň se snižuje možnost volné difúze přes stěvní stěnu. Kromě rozpustnosti může hrát roli také ten fakt, že molekula glykosidu není schopna difundovat díky své velikosti.<sup>94</sup>

Prvním místem, kde může docházet k hydrolýze glykosidické vazby je ústní dutina. Podobně jako zbytek gastrointestinálního traktu (GIT) je osídlena mikroorganismy využívajícími  $\beta$ -glukosidasy. Na hydrolýze kvercetin-4'-glukosidu nebo genistein-7-glukosidu se účastnil i epitel ústní sliznice.<sup>95</sup>

V žaludku, kde je díky kyselině přirozeně nízké pH, k hydrolýze glykosidů nedocházelo.<sup>96</sup> Několik studií na zvířatech se zabývalo možností absorpce flavonoidů přes žaludeční stěnu. Po podání genisteinu, daidzeinu a jejich glykosidů do žaludku potkanů, došlo ke vstřebání pouze aglykonů.<sup>97</sup> Srovnatelné závěry byly nalezeny i u kvercetinu a jeho glykosidů isokvercitrinu a rutinu. Vzhledem k obsahu flavonoidů v potravě jako glykosidů, absorpce přes žaludeční stěnu není dominantní.<sup>98</sup>

Na uvolňování flavonoidů z jejich glykosidů se podílejí stěvní mikroorganismy. Některé produkty metabolismu flavonoidů se však objevily v plazmě již půl hodiny po podání, což ukazuje na vstřebávání v tenkém střevě.<sup>94, 99, 100</sup> U zvířat zbavených mikroflóry se ukázalo, že se obsah glykosidů v jejich stolici zvýšil. Příjem hydrofilních glykosidů z cibule byl prokázán ale i u zvířat bez tlustého střeva.

Jedním z enzymů, odpovědných za hydrolýzu glykosidů je laktasa florizin hydrolasa (LPH). LPH je  $\beta$ -glukosidasa vázaná na membráně buněk kartáčového lemu, která uvolňuje laktosu

z mléka; také může štěpit přítomné glykosidy na vstřebatelnější aglykony. <sup>99, 101</sup>. Kromě membránové LPH se u savců nalézají cytosolové  $\beta$ -glukosidasy, např. glukocerebrosidasa. <sup>102</sup>

Jeden z uvažovaných způsobů absorpce byl i pomocí  $\text{Na}^+$ /glukosa kotransportéru (SGLT1), který by přenesl molekuly glukosidů kvercetinů přes střevní stěnu a dál do oběhu. Po podání čistého kvercetin-3-glukosidu u lidí však k jeho zvýšení v plasmě nedošlo. <sup>103</sup>

Nevstřebaňé a nevstřebaťelné flavonoidní glykosidy se dostávají do tlustého střeva, kde mohou podléhat činnosti střevních bakterií, které štěpí glykosidickou vazbu a mohou také degradovat samotné aglykony flavonoidů. V tlustém střevě je obecně absorpce látek menší, což rovněž platí pro příjem flavonoidních glykosidů v tomto úseku GIT. <sup>94</sup>

### Biodostupnost

Struktura flavonoidů ovlivňuje i jejich biodostupnost. Plazmatické hodnoty kvercetinů dosahovaly násobně vyšších koncentrací v kratším čase ve srovnání s rutinem (kvercetin-3-rutinosid), který byl absorbován až v tlustém střevě po degradaci mikroflórou. Jednu z nejvyšších biodostupností měly isoflavony, u kterých byl rozdíl mezi jejich glykosidy a aglykony relativně stejný. Jejich koncentrace v plazmě nicméně stoupala pomalu, což naznačuje jejich vstřebaňání opět až v oblasti tlustého střeva, s ohledem na to, že již zmíněný daidzen-7-glukosid není substrátem pro LPH a podobný předpoklad je i pro další látky z této podskupiny. <sup>104</sup>

### Metabolismus

Metabolismus flavonoidů, podobně jako jiných látek může probíhat v různých orgánech. Orgány odpovědné za odstranění odpadních a nežádoucích látek využívají řadu detoxifikačních enzymů. Biotransformace látek probíhá v několika fázích, zahrnujících hydroxylaci (I. fáze), konjugaci s polární molekulou (II. fáze) a nakonec vyloučení celé sloučeniny (III. fáze). Do první fáze jsou zapojeny enzymy ze skupiny cytochromu P450 (CYP), které se podílejí na oxidaci látek. I přes přítomnost hydroxylových skupin mohou být flavonoidy hydroxylovány enzymy z podskupiny CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9 a CYP2E1. <sup>104, 105, 106</sup> Na hydroxylové skupiny jsou v rámci II. fáze připojeny látky jako kyselina glukuronová, glycin nebo sulfát. Tyto látky se mohou také vázat na degradační produkty vzniklé činností střevní mikroflóry. U

flavonoidů dochází k rozštěpení molekuly v místě heterocyklického kruhu a produkty těchto reakcí mohou být vstřebány nebo do určité míry konjugovány.

### Eliminace

Vstřebané flavonoidy jsou aktivním transportem eliminovány přímo z buněk střevní sliznice nebo žlučí zpět do střevního lumen. Druhý způsob představuje eliminaci metabolitů přes ledviny. Na buněčné úrovni mohou být flavonoidy aktivně vylučovány transportními proteiny. Na Caco-2 buňkách byl nalezen přenašeč z podskupiny MRP-2 z rodiny ATP-binding cassette (ABC) transportérů. Tento protein nalézající se na apikální straně střevních buněk exportoval kvercetin-4'-*O*-glukosid z cytosolu ven, a tak snižoval jeho absorpci a biodostupnost.<sup>107</sup>

### Toxicita

U některých flavonoidů bylo popsáno prooxidační působení či vazba na topomerasu II s následným poškozením DNA.<sup>108</sup> Flavonoidy jsou nicméně považovány za bezpečné sekundární metabolity vzhledem k množství, které se dostane v organismu do oběhu. S ohledem na jejich přítomnost v různých potravinách a nápojích se jim nelze úplně vyhnout, ale dlouhodobý normální příjem nepředstavuje významné riziko. Pouze v případech, kdy bylo pokusným zvířatům podáváno dlouhodobě vysoké množství flavonoidů v potravě nebo ve formě injekce, byl pozorován negativní vliv na zdraví jedinců.<sup>109</sup>

### **3.5.5. Isoflavony – terapeutické účinky**

Isoflavonoidy se v naprosté většině vyskytují u rostlin z podčeledi *Faboideae*, čeledi *Fabaceae*. Mezi lety 1998 a 2011 bylo zaznamenáno více jak 840 nových zástupců této podskupiny. Mezi isoflavonoidy se řadí nejen isoflavony jako genistein, daidzein a jejich glykosidy, ale i acylované formy glykosidů, prenylované isoflavony, redukované isoflavany, isoflavan-4-oly, isoflavanony, rotenoidy, pterokarpany, kumestany a další látky vznikající různými obměnami základní struktury.<sup>110</sup>

Isoflavonoidy jsou tradičně řazeny mezi fytoestrogeny, tedy látky rostlinného původu, které mají na živočišný organismus účinek jako estrogeny. Do popředí zájmu se fytoestrogeny dostaly ve 40. letech minulého století, kdy byl pozorován nárůst problémů s plodností u ovcí,

kteře spásaly jetel v oblasti západní Austrálie. <sup>111</sup> Mezi fytoestrogeny patří i další látky s relativně různorodou strukturou jako jsou kumestany nebo lignany <sup>111</sup>, stilbeny a i některé flavonoidy (apigenin, kempferol) mají estrogení aktivitu. <sup>112</sup>

Společnou vlastností těchto látek je schopnost vázat se na receptor pro endogenní estrogeny (17 $\beta$ -estradiol – E<sub>2</sub>). Zatímco fytoestrogeny jako isoflavonoidy nebo lignany jsou produkty kyseliny šikimové, estrogeny a další steroidní hormony jsou odvozeny od kyseliny mevalonové. I přes zdánlivě odlišné molekuly obou skupin látek se mohou fytoestrogeny vázat na příslušné receptory. Jak estrogeny, tak jejich rostlinná analoga mají šestiuhlíkatý aromatický kruh a molekula obsahuje několik hydroxylových skupin. V živočišném organismu se nacházejí různé tkáně a orgány, které obsahují estrogenové receptory (EstR)  $\alpha$  nebo  $\beta$ , pro které má E<sub>2</sub> relativně stejnou afinitu. <sup>113</sup> Naopak látky jako genistein nebo daidzein se váží převážně na EstR $\beta$  a to až s několikrát větší afinitou než k druhé isoformě (genistein: 4 % EstR $\alpha$ , 87 % EstR $\beta$  při porovnání s E<sub>2</sub>). <sup>111</sup> Tato vazba je ale slabší v porovnání s endogenními látkami, isoflavony a další fytoestrogeny se tak mohou chovat jako agonisté i antagonisté v závislosti na koncentraci. <sup>114, 115</sup> EstR $\alpha$  se nalézají v endometriu, ve stromatu vaječnicků, v dlouhých kostech a v nádorových buňkách prsu; EstR $\beta$  jsou v granulózních buňkách vaječnicků, v srdci, v plicích a v dalších vnitřních orgánech včetně prostaty. <sup>116</sup>

Podobně jako receptory pro další steroidní hormony se i EstR nacházejí v cytosolu buňky. Po navázání ligandu se celý komplex přesouvá do jádra, kde se váže na příslušný gen a způsobuje aktivaci nebo inhibici transkripce příslušné mRNA. Následná odpověď organismu se děje v rámci minut až hodin. Druhý způsob, kterým mohou estrogeny působit na organismus, je přes receptory plazmatické membrány, kdy dojde ke spuštění signální kaskády a odpověď se může dostavit již za několik sekund. <sup>117</sup>

V závislosti na typu orgánu a působící látky pak dochází k různým farmakologickým účinkům zprostředkovaným EstR $\beta$  receptory nebo jiným mechanismem. V současné době existuje řada klinických studií a experimentálních prací, které se zabývají příznivým vlivem isoflavonů z *G. max* na symptomy spojené s menopauzou <sup>118</sup> a jejich inhibičním efektem na osteoporózu, aktivaci osteoblastů u zvířat a humánních buněčných linií <sup>119, 120</sup> a zlepšením metabolismu kostí u postmenopauzálních žen. <sup>121</sup>

U isoflavonů byl také studován jejich možný protirakovinný účinek. V závislosti na koncentraci může genistein podporovat nebo tlumit hormonálně řízený buněčný růst, ale jeho inhibiční vlastnosti se projeví i u buněk, které postrádaly EstR a předpokládá se i jiná cesta jeho

působení. U genisteinu bylo popsáno ovlivnění androgenního receptoru a inhibice různých enzymů (topoisomerasa I a II, 5 $\alpha$ -reduktasa). Zastavení činnosti těchto enzymů může způsobit přerušení buněčného růstu. Také antioxidační aktivita genisteinu může mít vliv na ochranu buněk před poškozením. V práci shrnující molekulární mechanismy antiproliferativního působení genistein zasahoval do buněčného cyklu a ovlivňoval různé signální cesty pro přežití/zánik buňky. Působil i proti angiogenezi a tvorbě metastáz.<sup>122</sup> U buněčné linie rakoviny prsu MDA-MB-231 byl testován vliv různých fytoestrogenů na vznik a šíření metastáz. Na rozdíl od lignanů, isoflavony v *in vitro* podmínkách dokázaly snížit pronikání nádorových buněk už v koncentracích, které jsou dosažitelné při vyšší konzumaci sójových produktů.<sup>123</sup>

Pokles hladiny estrogenů v rámci menopauzy vede ke zvýšenému riziku kardiovaskulárních obtíží. Zároveň v některých vyspělých kulturách s vyšší konzumací sóji, byl pozorován nízký výskyt problémů spojených s oběhovou soustavou.<sup>124</sup>

Lepší poměr HDL/LDL a nižší hodnoty LDL cholesterolu byly po příjmu sojových isoflavonů nalezeny u postmenopauzálních žen.<sup>125</sup> Z hlediska působení na cévy byl u genisteinu pozorován vasodilatační efekt. Po jeho podání do pažní tepny došlo ke zvýšení průtoku krve v předloktí jak u mužů, tak i u premenopauzálních žen. Další sledovaný isoflavon, daidzein, tento účinek postrádal, ale ekvimolární množství E<sub>2</sub> způsobilo podobnou odpověď jako genistein.<sup>126</sup>

Z různých studií také vyplynulo, že isoflavony by mohly mít příznivý vliv na metabolismus cukrů. Potkanům, u kterých byl *diabetes mellitus* navozený streptozocinem, byl podáván genistein a po 3 týdnech byla u pokusných jedinců naměřena vyšší hladina insulinu a glukokinasy, zatímco došlo ke snížení glukosa-6-fosfatasy. Také aktivita jaterních antioxidačních enzymů jako superoxiddismutasa, katalasa nebo glutathionperoxidasa byla zvýšena oproti kontrolním zvířatům. V rámci pozorování byl také podáván sójový protein, u kterého se projevil antidiabetické účinky výrazněji.<sup>127</sup>

Kromě výše uvedených prací byl na různých modelech proveden široký screening potencionálních účinků isoflavonoidů. Genistein společně s equolem chránil kůži bezsrstých myší proti dermatitidě po ozáření UV světlem, zároveň equol působil i proti imunosupresi navozené tímto zářením.<sup>128</sup> Isoflavony mohou mít také pozitivní vliv na některé mozkové struktury, např. hippokampus.<sup>129</sup>

## 3.6. Transport sekundárních metabolitů přes membrány

### 3.6.1 Úvod

K transportu potřebných, odpadních i nežádoucích látek a ke komunikaci buňky a organel s okolním prostředím slouží mnoho různých kanálů, transportérů a dalších mechanismů. Ty umožňují přenos látek, které nejsou schopny volně difundovat přes membránu.

Sekundární metabolity jsou většinou látky s velkou molekulovou hmotností nebo značnou polaritou a nemohou proto volně difundovat přes vakuolární (tonoplast) nebo plasmatickou membránu. K jejich přenosu buňka využívá řadu transportních cest a mechanismů. Tento transportní systém se týká jak celé buňky, tak i jednotlivých organel a je schopen přenést látky i přes koncentrační gradient. V tonoplastu vakuol *A. thaliana*, která patří mezi nejlépe prozkoumané rostliny z hlediska genetiky, bylo popsáno 91 přenašečů zprostředkovávajících transport látek přes membránu. Membrána tonoplastu představuje prakticky jedinou mechanickou překážku pro přenos obsahu dovnitř a vně vakuoly. Transport a shromažďování látek přes membrány pak vyžaduje energii, která může být získána přímo z ATP nebo nepřímo díky protonovému gradientu.<sup>11</sup>

### 3.6.2. ABC transportéry

ATP-binding cassette (ABC) transportéry se řadí do velké a rozmanité skupiny proteinů, které se nacházejí jak u prokaryotických, tak i u eukaryotických organismů. Prostupují přes obě vrstvy membránových lipidů a zprostředkovávají přenos látek za současné hydrolýzy ATP, který slouží jako zdroj energie potřebný pro transport. Kromě toho mohou některé ABC proteiny fungovat jako iontové kanály nebo jako regulační centra pro další typy kanálů. U savců a mikroorganismů pak byly tyto přenašeče intenzivně studovány z důvodu jejich podílu na vzniku rezistence na léčiva. Primárně lze různé typy ABC transportérů rozdělit podle toho, jakým směrem látky prostupují a to na ABC importéry a exportéry. Skupina importérů se nachází zejména u prokaryotických organismů a potřebuje vázací protein, který přenesení cílený substrát na vnější stranu transportéru, odkud pak putuje dovnitř buňky. Druhým typem jsou ABC exportéry, které se nachází i u eukaryotických organismů. Ty transportují látky z cytoplazmy nebo z vnitřní vrstvy lipidového filmu.<sup>130, 131</sup>

Kvartérní struktura ABC proteinů je obecně tvořena dvěma cytoplasmatickými doménami, které zprostředkovávají vazbu a hydrolýzu nukleotidů (NBDs – nucleotide-binding domains) a dvěma

transmembránovými doménami (TMDs, transmembrane domains), které vytváří vlastní kanál pro průchod substrátu. U prokaryotických importérů jsou všechny čtyři domény tvořeny oddělenými samostatnými řetězci bílkovin, tzv. „quarter molecules“. Jednotlivé domény nejsou vzájemně propojené, transportér se tedy skládá ze čtyř samostatných biomolekul. U prokaryotických exportérů jsou již polypeptidy TMDs a NBDs spojeny a vznikají tak „half molecules“, které se tvorbou homodimeru nebo heterodimeru spojí ve funkční jednotku. U eukaryotických organismů jsou všechny domény exportérů tvořeny většinou již jediným polypeptidovým řetězcem a domény vytvářejí „full“ molekulu. Domény mohou být mezi sebou propojeny v různých kombinacích. Pokud jedna z domén v přenašeči chybí, zbylá se chová jako homodimer a zastává její funkci k udržení činnosti systému.<sup>132</sup>

Rostlinné ABC transportéry mohou být rozděleny do 13 skupin podle velikosti svého proteinu. Dále se mohou dělit dle orientace – sekvence domén postupujících dopředu (forward) ve směru TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 nebo naopak reverzně (backward) – NBD1-TMD1-NBD2-TMD2. Jiné rozdělení je podle přítomnosti či nepřítomnosti idiotypické transmembránové a/nebo „linker“ domény a podle celkové podobnosti sekvence. Mezi transportéry s „full“ molekulou se řadí především MDRs (multidrug resistance homologs) a MRPs (multidrug resistance-associated protein homologs).<sup>133</sup>

### Domény vázající nukleotid

NBDs jsou periferně napojeny na cytoplasmatickou stranu membrán. NBDs slouží ABC transportérům jako pohonné jednotky odpovědné za přenos látek a v jejich struktuře se nachází další poddomény. Mezi hlavní části NBDs patří sekvence jako „RecA-like“ a „helical“ (šroubovicová poddoména). Na vazbě a hydrolýze ATP se účastní několik stabilních sekvencí, jako i na nezbytných styčných plochách mezi jednotlivými doménami v kompletním proteinu. Mezi tyto sekvence patří „P-loop“ (Walker-A), který je zodpovědný za navázání nukleotidů. Dalšími částmi jsou „LSGGQ“ (C-loop, ABC signature motif; je v kontaktu s navázaným ATP) a „Walker-B“, která přes glutamátový zbytek zprostředkovává hydrolýzu ATP. „D-loop“ se podílí na kontaktu mezi dvěma NBDs, zatímco „Q-loop“ je ve styku s transmembránovými doménami a také s  $\gamma$ -fosfátovým zbytkem. „A-loop“ se částí svého aromatického postranního řetězce staví proti adeninovému zbytku. Poslední je „switch motif“ a jeho histidinový postranní řetězec, který se pravděpodobně účastní katalytické reakce.<sup>134</sup>



### Transmembránové domény

Funkcí transmembránové domény (TMDs) je tvorba kanálu, přes který proniká konkrétní substrát membránou. U páru TMDs je jejich primární sekvence, délka a struktura odlišná od NBDs, jako i počet  $\alpha$ -šroubovic, které prochází membránou. Proteiny zaměřené na import se skládají z 10 až 20 šroubovic, zatímco exportéry zachovávají stabilní počet 12 šroubovic, kdy připadá šest šroubovic na jednu doménu. Některé ze šroubovic se nemusí podílet pouze na přenosu, ale mohou hrát další role při ukotvení proteinu v membráně a jeho regulaci.<sup>134</sup>

### Mechanismus transportu

Vlastní přenos látek přes ABC proteiny zahrnuje několik dílčích kroků. Po navázání a hydrolýze ATP na NBDs, dojde v těchto doménách ke změnám jejich konformace a tyto změny se následně projeví i v TMDs. Podstatnou úlohu v tomto ději hrají styčná místa obou domén, která se označují jako „transmission interface“. V rámci NBDs jsou na tomto místě přítomny především aminokyselinové řetězce okolo jejich „Q-loop“. TMDs se poté účastní svými  $\alpha$ -šroubovicemi a mohou být označeny jako spojovací šroubovice (coupling helices). Tyto šroubovice jsou pak ve styku se žlábkem na povrchu NBDs na rozhraní dvou poddomén (šroubovicové a RecA-like). Z polohy šroubovic se pak dají odlišit ABC importéry od exportérů.<sup>134</sup>

Jakmile se ATP naváže na NBDs domény, dojde k zúžení prostoru mezi spojovacími šroubovicemi o 10 až 15 Å ve srovnání s doménou bez navázaného nukleotidu. Zúžení vzdálenosti mezi těmito šroubovicemi pak má za následek změnu transmembránových domén ze stavu „inward facing“ (konformace otevřená dovnitř) na „outward-facing“ (otevřená ven). Pro ABC transportéry ze skupiny importérů to znamená, že mohou začít přenášet látky navázané z příslušných vazebných proteinů (cognate binding proteins) a ABC exportéry mohou vypouštět navázané látky do okolního prostředí. Transportéry se pak navrací do „inward“ stavu po odloučení ADP a fosfátu; importéry pak uvolňují své substráty do cytoplasmy a exportéry jsou připraveny na navázání nových látek na svá vazebná místa.<sup>134</sup>

### Skupina MDR

Tato skupina, do které také přísluší humánní P-glykoprotein, patří mezi nejrozsáhlejší podskupinu ABC transportérů. V *A. thaliana* je zahrnuto 22 zástupců tohoto typu přenašečů a AtPGP1 (homolog P-glykoproteinu) se stal prvním rostlinným ABC přenašečem, který byl naklonován. Tento klon vykazoval určitou podobnost stavby svého intronu s introny savčích MDR genů. Tyto geny jsou zodpovědné za tvorbu bílkovin podobných si organizací svých strukturálních domén, z čehož se dá usuzovat, že skupina P-gp vznikla ještě před rozdělením buněk na rostlinné a živočišné.<sup>133</sup> MDRs byly poprvé popsány v živočišných buňkách, které vykazovaly zvýšenou rezistenci k lékům.<sup>135</sup>

### Skupina MRP

MRPs představují druhou největší podskupinu ABC transportérů s „full“ molekulou a stejně jako MDRs skupina mají orientaci „forward“. Liší se ovšem v množství aminokyselin (nejméně 1500) a tedy svou velikostí. Řetězec navíc ve své struktuře obsahuje další charakteristické prvky pro tyto přenašeče.<sup>133</sup> Proteiny MRPs byly u rostlin prvně nalezeny v souvislosti s přenosem látek vázaných na glutathion (GSH) a jejich transport byl závislý na ATP a nikoliv na protonovém gradientu. Tvorba vazby s GSH je několikafázový děj. Ten zahrnuje aktivaci, konjugaci a eliminaci nežádoucích sloučenin. První dvě fáze jsou u rostlin dobře popsány. Cílem detoxikace je vytvořit hydrofilní konjugát, proto jsou cizí látky slučovány s endogenními, polárnějšími sloučeninami jako je glukosa, GSH či malát. Význam GSH a glutathion-S-transferasy, enzymu který vytváří vazbu mezi peptidem a substrátem, spočívá nejen v ochraně před jeho oxidací, ale díky němu je substrát také vychytáván transportními proteiny pro GS-X (kde X představuje navázanou složku), jako jsou právě MRP.<sup>136, 137</sup>

Výzkum, který provedl Martinoia v roce 1993 na neporušených vakuolách získaných z mezofylu *Hordeum vulgare* ukázal, že hromadění glutathionových konjugátů je závislé na MgATP. Při použití konjugátů herbicidu metolachloru s glutathionem a N-ethylmaleinimidem-GS bylo zjištěno, že vychytávání xenobiotika záviselo na přítomnosti MgATP. Nehydrolyzovatelná ATP analoga či pyrofosfát vliv na transport neměly. Proces přenosu obou konjugátů byl sice citlivý na orthovanadát, ale zůstal neovlivněn látkami, které zastavují činnost vakuolární H<sup>+</sup>ATPasy nebo narušují protonový gradient plazmatické stěny vakuoly. Toto naznačilo, že přenos konjugátů dovnitř je zprostředkován konkrétní ATPasou. Výzkum rovněž poukázal na funkci oxidovaného glutathionu jako substrátu pro tento přenašeč, zatímco jeho

redukována forma tuto vlastnost postrádala. Podobný proces jako výše uvedený se vyskytuje u ATPas přítomných v kanalikulární membráně jater, které sekretují glutathionové konjugáty a oxidovaný glutathion do mimobuněčného prostoru. Tímto způsobem byla poprvé potvrzena přítomnost a umístění třetí fáze detoxikace u rostlin. Následně byl tento jev a úloha GS-X sledován postupně s úspěchem i jinými výzkumnými skupinami.<sup>130, 133</sup>

### 3.6.3. MATE transportéry

Skupina MATE (multidrug and toxin extrusion) proteinů byla poprvé popsána u nižších organismů (norM u *Vibrio parahaemolyticus*), nicméně později byly nalezeny i u eukaryot (např. MATE1 a MATE2 v lidském genomu, 58 orthologů u *A. thaliana*). Bílkovina MATE transportérů se skládá ze 400 až 700 aminokyselin se sekundární strukturou nejčastěji dvanácti  $\alpha$ -šroubovic prostupujících membránou, kde vytvářejí dvě pseudosymetrické jednotky (u norM). Ve struktuře MATE transportérů se vyskytuje okolo 40 % shodných sekvencí a z hlediska fylogeneze se dělí na tři velké skupiny.<sup>138</sup>

Významný rozdíl oproti ABC proteinům spočívá v odlišném způsobu přenosu látek. Přenos pomocí ABC je přímo závislý na ATP, zatímco transport zprostředkovaný MATE využívá elektrochemický gradient. Přesný mechanismus tohoto děje nebyl u rostlinného přenašeče popsán, nicméně byla provedena studie u PfMATE druhu *Pyrococcus furiosus*. Protein s navázaným substrátem je protonován, čímž se změní jeho konformace a substrát se může uvolnit. Bílkovina se poté vrací do původního stavu a celý cyklus se opakuje. Přesný princip, jakým je pak substrát navázán na transportér v této pozici, však nebyl ještě popsán.<sup>139</sup>

Jedním z prvních objevených MATE transportérů u rostlin byl ALF5 (aberrant lateral root formation) z *A. thaliana*, jehož defekt zastavoval růst kořenů. Exprese dalšího transportéru *A. thaliana* AtDTX1, který se nachází v plazmatické membráně, do buněk *Escherichia coli* vedla k navození rezistence vůči berberinu a kadmiu a tento MATE protein byl tak rovněž označen jako nositel detoxikačního účinku. Kromě transportu alkaloidů byly následně popsány i další sekundární metabolity a látky přenášené těmito transportéry (AtTT12).<sup>138, 140</sup>

### 3.6.4. Protonové pumpy

Řada mechanismů probíhajících v buňce, včetně transportu, je závislá na protonovém gradientu, který je udržován jak na plazmatické membráně, tak na membránách různých

organel. Na zachování tohoto gradientu se podílejí pumpy, které aktivně transportují protony přes membrány a patří mezi ně např.  $H^+$ -ATPasa plazmatické membrány (PM  $H^+$ -ATPasa), vakuolární  $H^+$ -ATPasa (V-ATPasa) nebo vakuolární  $H^+$ -PPasa (V-PPasa).<sup>141</sup>

PM  $H^+$ ATPasa hraje důležitou roli, jelikož koncentrace protonů uvnitř buňky ovlivňuje transport řady látek nezbytných pro její výživu. V rámci jedné rostliny existují v závislosti na tkáni různé isoformy těchto pump a jejich přítomnost může být ovlivněna i jinými faktory. Kromě transportu se tyto pumpy podílejí i na buněčné signalizaci v rámci různých stresových podmínek nebo otevírání průduchů.<sup>141, 142</sup> PM  $H^+$ ATPasa je tvořena zhruba 950 aminokyselinami, které vytvářejí 10 šroubovic procházejících plazmatickou membránou a cytoplazmatickou doménu. Cytoplazmatická doména se pak skládá z dalších poddomén, na kterých probíhají různé aktivační a regulační procesy.<sup>142</sup>

V-ATPasa patří do rodiny bílkovin, které se nalézají na různých vnitřních membránách eukaryotických organismů. Stejně jako F-ATPasa, která se účastní syntézy ATP, je tvořena dvěma částmi, které se skládají z dalších podjednotek.<sup>143</sup> První část proteinu ( $V_1$ ) skládající se z osmi podjednotek je umístěna periferně a podílí se na štěpení ATP. Druhá část ( $V_0$ ) má 6 podjednotek ukotvených v membráně a slouží k přenosu protonů.<sup>141</sup> Hydrolyza ATP dodává energii k vytvoření protonového gradientu, a tím přispívá k okyselení vakuoly.

$H^+$ -PPasa je tvořena jediným transmembránovým polypeptidem, který se skládá z 14 až 17 šroubovic.<sup>141</sup> Jako zdroj energie pro udržení protonového gradientu využívá pyrofosfát, který je jedním z vedlejších produktů různých metabolických drah. Pyrofosfát obsahuje fosfoanhydrovou vazbu s vysokou energií, její rozštěpení tak dodá potřebnou energii k transportu protonů a okyselení vakuoly.<sup>144</sup> Kromě tonoplastu se může nacházet i na jiných membránách, včetně plazmatické. V rostlinách se rozlišují dva typy  $H^+$ -PPasy podle jejich vztahu k draselným a vápenatým iontům. Typ I, který potřebuje přítomnost  $K^+$  v cytosolu a do určité míry i  $Ca^{2+}$  a typ II, který je na  $K^+$  nezávislý, ale vyžaduje  $Ca^{2+}$ .<sup>141</sup>

### 3.6.5. Vezikulární transport

Jedním ze způsobů, kterým mohou být sekundární metabolity také přenášeny, je transport pomocí vezikul (měchýřků). Pomocí vezikul jsou např. přenášeny různé bílkoviny, které jsou z endoplazmatického retikula transportovány do Golgiho aparátu, odkud mohou být směřovány do dalších částí buňky.<sup>145</sup> Vezikuly také mohou putovat do vakuoly nebo obcházejí Golgiho

aparát a přímo splývají s vakuolární membránou nebo s prevakuolárním kompartmentem. Na řízení tohoto transportu se podílejí tzv. SNARE proteiny, které jsou součástí membrány vezikul (v-SNARE) nebo cílové organely (t-SNARE).<sup>146</sup> Pomocí mikroskopu byly u některých sledovaných rostlin nalezeny malé měchýřky s obsahem sekundárních metabolitů, u kterých se i přes nejasný původ předpokládal podíl na transportu těchto látek.<sup>147</sup>

U buněčné kultury *Papaver somniferum* nebyla zjištěna přítomnost alkaloidů typu morfinu, ale po aplikaci elicitoru došlo k zvýšení produkce benzoisochinolinového alkaloidu sanguinarinu. S tím byla spojená i vyšší exprese příslušných biosyntetických enzymů, které se v tomto případě nalézaly na endoplazmatickém retikulu. Sanguinarin pak byl přítomen ve vakuole a množství malých vezikul, které se po zásahu elicitoru odštěpovaly z retikula, se postupně slučovalo a následně splývalo s tonoplastem. Závěr naznačil zapojení měchýřků do vakuolárního transportu alkaloidů.<sup>148</sup>

V „hairy root“ kultuře u *Ophiorrhiza pumila* byly provedeny transportní testy indolového alkaloidu camptothecinu. Tento alkaloid se nacházel ve vakuolách i v extracelulárním prostoru. Aplikace různých látek, které ovlivňují transportní proteiny v tonoplastu, neměla vliv na obsah tohoto alkaloidu ve vakuole. Naproti tomu při dodání brefeldinu A došlo ke snížení obsahu tohoto alkaloidu ve vakuole a k zvýšené přítomnosti v cytoplasmě a následně také v okolí buněk. Camptothecin je tak patrně z endoplazmatického retikula přenášen do vakuoly pomocí vezikul, které obcházejí Golgiho aparát. Použití monensinu, který působí na dráhu lokalizovanou v této organelle, nemělo na jeho transport vliv.<sup>149</sup>

Transport flavonoidních látek se také může odehrávat za pomoci vezikul, jak bylo prokázáno při mikroskopickém pozorování útvarů přítomných v rostlinách. Tyto útvary ohraničené membránou obsahující zvýšený obsah anthocyaninů, jsou tzv. anthocyanoplasty a nalézají se např. u *V. vinifera* nebo *Raphanus sativus*. Oproti tomu anthocyaninové vakuolární inkluze se vyskytují u více druhů v tkáních produkujících tyto metabolity a pevná membrána je nahrazena membránovými lipidy a proteiny. Inkluze uvnitř vakuoly tak slouží spíše jako zásobní forma, která je dovnitř přenesena až po splynutí s prevakuolárním komplexem. Měchýřky s anthocyaniny mohou také putovat i přes Golgiho aparát.<sup>136</sup>

Vezikulární transport lipofilních metabolitů není zatím příliš znám. U *L. erythrorhizon* byl popsán možný způsob transportu shikoninu, kdy měchýřky s touto látkou putovaly směrem od endoplazmatického retikula k buněčné membráně. Podobně by se tak mohly pohybovat i další lipofilní látky.<sup>150</sup>

### 3.6.6. Transport vybraných sekundárních metabolitů<sup>151</sup>

#### Alkaloidy

Mnohé alkaloidy jsou známé pro svoji schopnost zasahovat do struktury chromozomů, replikace a transkripce DNA, dělení buněk a dalších procesů. Toho se využívá např. v onkologii, kde některá léčiva (docetaxal a paklitaxel z rodu *Taxus*, vinkristin a vinblastin z rodu *Vinca*) vychází ze struktury alkaloidů.<sup>152</sup>

Výrazný cytotoxický účinek na rostliny, které ho nevytvářejí, má také isochinolinový alkaloid berberin. Naopak rostliny jako *Thalictrum minus* nebo *Coptis japonica*, které berberin obsahují, jsou vůči němu odolné. Pokud byl berberin přidán do media s kulturou *C. japonica*, došlo k jeho transportu i přes koncentrační gradient do vakuol. Pomocí RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) byl nalezen a naklonován pravděpodobný transportér pro berberin, který spadl do skupiny MDR. Jeho funkce byla ověřena na oocytech žab *Xenopus*, kde vložený CjMDR1 dokázal rozpoznávat berberin a aktivně ho vychytávat z media. Tento přenos, zprostředkovaný pomocí ABC-transportéru se odehrával na plazmatické membráně, zatímco na vakuolární membráně se uskutečnil pomocí protonového antiportu.<sup>153, 154</sup>

Přenos berberinu byl také sledován u *C. roseus*. Tato rostlina obsahuje alkaloidy indolového typu a berberin zde hrál roli xenobiotika. U normálního *C. roseus* měly aktivátory a inhibitory ABC transportérů vliv na obsah nativních alkaloidů ve vakuole, zatímco přenos berberinu se nezměnil. U transgenního *C. roseus* s vloženým CjMDR1 došlo ke zvýšenému transportu do vakuoly u dvou nativních indolových alkaloidů – ajmalicinu a tetrahydroalstoninu, ale obsah berberinu se i přes přítomnost tohoto transportéru nezměnil, což může ukazovat i na další vlivy, které se mohou uplatňovat při přenosu sekundárních metabolitů.<sup>155</sup>

Další způsob transportu alkaloidů představuje nikotin (*Nicotiana tabacum*), který patří do podskupiny pyridinu. Biosyntéza tohoto sekundárního metabolitu probíhá v kořenech, odkud je poté dřevní částí vodivých pletiv přenášena do vakuol v buňkách listu. Molekuly nikotinu tak musejí překonat několik bariér, než se dostanou na místo určení. V buňkách tabáku BY-2 (Bright Yellow-2) byl identifikován přenašeč Nt-JAT1 (*N. tabacum* jasmonate-inducible alkaloid transporter 1). Bylo zjištěno, že Nt-JAT1 patří do skupiny MATE transportérů podobně jako AtDTX1 a TT12 u *A. thaliana* a jeho aktivita je tak závislá na protonovém gradientu uvnitř vakuoly (H<sup>+</sup>-antiporter). Tento přenašeč neměl substrátovou specifitu, ale rovněž se podílel na přenosu dalšího tabákového alkaloidu anabasinu a některých cizích alkaloidů (hyoscyamin, berberin). Kromě tonoplastu buněk listů, kde Nt-JAT1 působil při příjmu nikotinu, byl také

nalezen v plazmatické stěně kořenových buněk. Zde ale fungoval obráceně a čerpal nikotin z buněk ven do apoplastického prostoru. Tento přenašeč tak zastává důležitou funkci v transportu nikotinu v rámci celé rostliny.<sup>156</sup>

Na plazmatické membráně byl rovněž identifikován další typ transportéru pro nikotin, který ale patří do skupiny purinových permeas, které transportují base nukleotidů a některé podobné látky. Tato NtNUP1 (*N. tabacum nicotin uptake permease*) se účastní na importu nikotinu z apoplastického prostoru a také dalšího alkaloidu anatabinu nebo vitamínu B6.<sup>157</sup>

### Terpenoidy

Skupina terpenoidů zahrnuje více jak 25 000 identifikovaných látek a řadí se tak mezi skupinu sekundárních metabolitů s nejvíce zástupci. Jejich biosyntéza je založena na spojení dvou C<sub>5</sub> jednotek – isopentenyldifosfátu a dimethylallyldifosfátu. S výjimkou sclareolu, diterpenu s antifungálním účinkem nacházejícím se v rostlinách druhu *Nicotiana*, není způsob jejich přenosu přes membrány příliš prozkoumaný.<sup>140</sup>

Jako transportér zodpovědný za přenos na povrch listů byl popsán NtPDR1 (NpABC1), který přísluší do rodiny ABC transportérů. Exprese tohoto přenašeče byla indukována přítomností sclareolu a jeho analogu u *Nicotiana plumbaginifolia*. Orthologa tohoto proteinu, nacházejícím se v plazmatické membráně byla dále nalezena i u *A. thaliana* a *Spirodela polyrrhiza*. Navíc transportéry pro sclareol těchto rostlin byly pozitivně aktivovány po ošření elicitory, což potvrzuje zapojení transportéru při obranné reakci rostliny.<sup>158</sup>

U *Calendula officinalis* byl sledován způsob transportu triterpenického saponinu kyseliny oleanolové v závislosti na různém typu glykosidace. 7-monoglukosid a 7-monoglukuronid této kyseliny měly rozdílnou citlivost na látky modifikující způsob a pohon transportu. Přenos glukosidu se zvýšil v přítomnosti ATP a pyrofosfátu, zatímco sloučenina s glukuronidem byla ovlivněna pouze protein-modifikujícími faktory. Výsledky studie ukázaly, že přenašeč pro glukosidy oleanolové kyseliny je závislý na přísunu energie, zatímco u glukuronidů se jedná o kanál, který zprostředkovává facilitovanou difúzi. U obou látek je však potřeba určit přesný typ transportérů.<sup>159, 160</sup>

## Fenolové sloučeniny, flavonoidy

Do skupiny fenolových sloučenin spadá řada látek jako jednoduché molekuly typu fenylypropanů, kumarinů, lignanů a flavonoidů, ale také polyfenolové trísloviny. Tyto látky se v rostlinách nacházejí často jako glykosidy. Ve vakuolách se tyto sekundární metabolity hromadí pomocí ABC přenašečů z podskupiny MRP, které vychytávají fenolové látky po navázání glukosy, kyseliny glukoronidové nebo glutathionu.<sup>140</sup> Mohou být ale také přemísťovány pomocí dalších transportérů.

Transport skopoletinu (6-methoxy-7-hydroxykumarin) byl pozorován u jedné linie *N. tabacum*, která ho produkuje ve větším množství. Import tohoto kumarinu do buňky byl stimulován přítomností růstového faktoru 2,4-D. V cytosolu byl následně přeměněn na 7-O-glukosid skopolin a tento metabolit byl přenesen do vakuoly na energii závislým transportérem, jehož typ nebyl zatím přesně určen. Podobným způsobem poté reagovaly i další kumariny (umbelliferon, eskuletin), u nichž byla opět splněna podmínka volné 7-hydroxy skupiny na benzenovém jádře.<sup>161</sup>

Flavonoidy mohou být transportovány v rostlinách různým způsobem. V *Zea mays* byl identifikován ZmMRP3, který se účastní na přenosu anthocyaninů. Za důležitý prvek v přenosu těchto sekundárních metabolitů se považuje glutathion-S-transferasa (BZ-2), která chybí v mutantu kukuřice označovaném jako *bronze-2*. U těchto *bz-2* mutantů nedochází k navázání GSH a je tak narušen transport anthocyaninů do vakuoly.<sup>162, 163</sup> Podobně byl narušen přenos těchto metabolitů v dalším mutantu GST – *An9* u *Petunia hybrida*.<sup>164</sup>

Transport sekundárních metabolitů je rovněž závislý na rostlině, ve které se nacházejí. Saponarin je flavonoid nacházející se v *H. vulgare*. Jeho přenos probíhá přes protonový antiport a ten může být inhibován dalším flavonoidem isovitexinem, který tak může být dalším substrátem přenašeče. Odlišný transport probíhá ale u vakuol izolovaných z rostliny, která saponarin neprodukuje, jako je *A. thaliana*. Zde došlo k transportu pomocí ABC přenašečů a je tedy možné, že rostlinná buňka tyto cizí látky přenáší pomocí výkonnějšího ABC transportu, podobně jako se zbavuje některých herbicidů.<sup>165</sup>

Vakuolární MATE transportéry také hrají důležitou roli v přenosu flavonoidů. U *A. thaliana* byl popsán přenašeč AtTT12 (transparent testa), který funguje jako antiport flavonoidů za protony na tonoplastu buněk osemení, které produkují proanthocyanidiny. Z výsledků dalších pokusů vyplývá, že tento protein se podílí na přenosu glykosidů anthocyaninů (cyanidin-3-O-



glukosid, II) a flavan-3-olů. Jejich aglykony, dimery flavan-3-olů a glykosidy flavanolů (kvercetin-3-*O*-rhamnosid) pak tímto transportérem přenášeny nebyly. <sup>166</sup>

U přenašečů AM1 a AM3 (anthoMATE) z *V. vinifera* byly transportovány ty anthocyaniny, které byly acylovány. Malvidin 3-*O*-glukosid ani cyanidin 3-*O*-glukosid transportovány nebyly. Kromě anthocyaninů obsahují plody *V. vinifera* i flavonoly a flavan-3-oly, ale ty jsou na rozdíl od anthocyaninů produkovány v době, kdy nedochází k expresi anthoMATE transportérů a způsob jejich transportu nebyl u této rostliny zatím objasněn. <sup>167</sup>

Orthologa původního MATE proteinu z *A. thaliana* byly později nalezeny i u dalších rostlin, např. *Malus x domestica* nebo *S. lycopersicum*. Stejně jako u kukuřice tak i u vytvořených mutantů těchto druhů došlo ke změně zbarvení. <sup>168</sup>

### 3.6.7. Látky používané k identifikaci mechanismu transportu.

Látky sloužící k přesnější identifikaci mechanismu transportu jsou různé organické nebo anorganické molekuly, které se váží na membránové proteiny nebo mění podmínky v jejich okolí. Pro transportní experimenty na buněčných suspenzích byly využity následující inhibitory mající vliv na transport sekundárních metabolitů:

**Orthovanadát sodný** má tlumivý účinek na PM H<sup>+</sup>-ATPasu a jeho přidání do buněčné kultury *Eschscholtzia californica* vedlo k postupné alkalizaci okolního media. Kromě toho došlo ke snížení vylučování benzofenanthridinových alkaloidů. <sup>169</sup> U *Salmonella typhimurium* byl orthovanadát také schopný inhibovat ABC transportér pro maltosu <sup>170</sup> a používá se i pro inhibici těchto ATPas u rostlin. <sup>165</sup>

**Verapamil** je z farmakologického hlediska řazen mezi antagonisty vápníku. Tato léčiva inhibují jeho vstup do buňky vazbou na kanály pro transport vápníku, které jsou aktivovány změnou membránového potenciálu. Verapamil se díky kvarternímu dusíku váže na podjednotku transportního proteinu, kde blokuje funkci kanálu a tím navodí relaxaci cév nebo tlumí depolarizaci řídicích uzlů v srdci a působí tak jako antiarytmikum. <sup>171</sup> Kromě toho je verapamil také inhibitorem ABC proteinů ze skupiny MDR1. Tento účinek byl studován zejména k překonání tolerance některých léčiv způsobené P-glykoproteinem. <sup>172,173</sup> Jeho účinek byl pozorován i u rostlin, kde po jeho aplikaci došlo u *Thalictrum minus* k hromadění berberinu uvnitř buňky. <sup>174</sup>

**Probenecid** je léčivo, které patří do skupiny urikosurik. Ovlivněním transportních kanálů pro kyselinu močovou zvyšuje její vylučování v ledvinách.<sup>175</sup> Podobně jako verapamil také může ovlivnit vylučování léčiv díky inhibici ABC transportérů s tím rozdílem, že probenecid působí na proteiny ze skupiny MRP1 a MRP2<sup>172</sup> a obecně pak tlumí transport organických aniontů<sup>176</sup> V některých studiích pak probenecid naopak MRP2 stimuloval.<sup>177</sup>

**Glibenklamid** patří mezi deriváty sulfonylmočoviny a je užíván jako antidiabetikum.<sup>178</sup> V B-buňkách slinivky působí na receptory sulfonylmočoviny (SUR1), které také patří mezi ABC proteiny. To vede následně k inhibici draselných kanálů závislých na ATP, čímž se zvýší intracelulární koncentrace draslíku, která následně vede k lepšímu výdeji inzulínu. Glibenklamid také způsobil útlum MRP1 v buňkách plicního nádoru<sup>179</sup> a inhiboval činnost AtMRP5 v *A. thaliana*.<sup>180</sup>

**Gramicidin** patří do skupiny cyklických peptidových antibiotik, která jsou tvořena bakterií *Bacillus brevis*. Toto antibiotikum působí jako selektivní ionofor pro kationty a ovlivňuje jejich transmembránový pohyb. Působením na ionty draslíku může narušit procesy spojené s tímto iontem.<sup>181</sup> U *Saccharomyces cerevisiae* s vloženým transportérem NtMATE1 byl pozorován po jeho aplikaci snížený příjem nikotinu.<sup>182</sup> Gramicidin D pak narušuje tvorbu ATP<sup>183</sup> a byla u něj popsána i inhibiční aktivita proti P-gp ATPase.<sup>184</sup>

**NH<sub>4</sub>Cl** narušením protonového gradientu může také působit na přenos některých látek. NH<sub>4</sub>Cl patří mezi protonofory.<sup>176</sup> Tyto látky jsou schopné přecházet přes membrány, vázat protony na druhé straně a přenášet je zpět, čímž narušují protonový gradient a membránový potenciál. Stejně jako gramicidin D pak ovlivnil příjem nikotinu do kvasinek s NtMATE1.<sup>182</sup>

**Brefeldin A** je makrolidový lakton z *Eupenicillium brefeldianum* a jiných askomycet, které patří do rodu *Penicillium*. Původní využití směřovalo k antivirotickým a antibakteriálním účinkům, ale následně byl popsán jeho inhibiční účinek na transport bílkovin v rámci buňky.<sup>185, 186</sup> Brefeldin A svým účinkem zastavuje vezikulární transport přes inhibici „guanine nukleotide exchange factor“. Ten hraje roli v procesu zahrnujícím změnu GDP na GTP a následné aktivaci ARF GTPasy řídící měchýřkový transport.<sup>187</sup> Kromě toho brefeldin A také rozpouští Golgiho aparát, čímž může dále ovlivnit tento typ pohybu látek.<sup>185</sup>

**Adenosintrifosfát** slouží jako hlavní zdroj energie pro široké spektrum reakcí probíhajících v organismu. Jeho molekula se skládá z adeninu, na který je připojena ribosa s esterově vázanou kyselinou fosforečnou. Na tuto kyselinu jsou vázány dva fosfáty anhydridovou vazbou a právě jejím štěpením dochází k uvolnění potřebné energie. Díky fosfátům má ATP při pH 7,4 záporný

náboj a v buňce je přítomný v komplexu s hořečnatými ionty.<sup>188</sup> MgATP se používá v transportních studiích k ověření, jestli se koncentrace sledovaného metabolitu zvýší po aplikaci této látky, a jestli došlo k zapojení mechanismu závislého na MgATP.

**Bafilomycin A1** je makrolidové antibiotikum, které je produkováno *Streptomyces griseus* spp. *Sulphurus*. Jeho testováním na ATPasach různých membrán bylo zjištěno, že se jedná o výrazný inhibitor V-ATPasy.<sup>189</sup> V práci shrnující poznatky o aktivitě bafilomycinů byl popsán jeho účinek přes vazbu na  $V_0$  podjednotku této pumpy.<sup>190</sup> V určitých koncentracích, které jsou řádově vyšší, může působit i na P-ATPasy nebo ABC transportéry.<sup>190</sup>

**N,N'-dicyklohexylkarbodiimid** (DCCD, DCCD) se používá především v organické syntéze k přípravě peptidů. Jeho schopnost vázat aminokyseliny pravděpodobně stojí za jeho inhibičním účinkem na některé transportní proteiny podílející se na přenosu protonů. DCCD zastavuje činnost jednak F-ATPasy, ale také V-ATPasy, např. u *Acer pseudoplatanus*.<sup>191</sup> U bakteriální  $V_0V_1$ -ATPase pak byl pozorován útlum rotace proteinu po aplikaci DCCD.<sup>193</sup> Kromě ATPas, může DCCD inhibovat i V-PPasy, kdy se váže na tyto přenašeče a zabraňuje tak hydrolýze pyrofosfátu, jak bylo popsáno u *Vignus radiata*.<sup>194</sup>

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Materiál a metody

#### 4.1.1. Použité chemikálie

2,4-difenoxyoctová kyselina (2,4-D) p. a.;SERVA (Německo)

6-benzylaminopurin (BAP) p. a.; SERVA (Německo)

Acetonitril LiChrosolv; Merck (Německo) pro HPLC

Bafilomycin A1 ze *Streptomyces griseus*  $\geq 90\%$ ; Sigma-Aldrich (Německo)

Biochanin A p. a.; Sigma-Aldrich (Německo)

Brefeldin A, Sigma-Aldrich (Německo)

Cellulasa Onozuka R-10 1 U/mg; SERVA (Německo)

Daidzein p. a.; Fluka (Německo)

DCCD puriss.,  $\geq 99.0\%$ ; Sigma-Aldrich (Německo)

Destilovaná a ultračistá voda; Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové (Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan amonný p. a.; PENTA (Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát p. a.; PENTA (Česká republika)

DMSO 98,6%; Sigma-Aldrich (Německo)

Dusičnan draselný p. a.; PENTA (Česká republika)

Ethanol 96%, PENTA (Česká republika)

FeNaEDTA p. a.; Sigma-Aldrich (Německo)

Ficoll 400; Fluka, Sigma-Aldrich (Německo)

Formononetin p. a.; Roth (Německo)

Genistein p. a.; Sigma-Aldrich (Německo)

Genistin p. a.; Fluka (Německo)

Glibenklamid  $\geq 99\%$ ; Sigma-Aldrich (Německo)

Gramicidin z *Bacillus aneurinolyticus* (*B. brevis*); Sigma-Aldrich (Německo)

HEPES  $\geq 99.5\%$ ; Sigma-Aldrich (Německo)

Chlorid amonný p. a.; PENTA (Česká republika)

Chlorid kobaltnatý hexahydrát p. a.; PENTA (Česká republika)

Chlorid vápenatý p. a., PENTA (Česká republika)

Chlorid vápenatý hexahydrát p. a.; PENTA (Česká republika)

Jodid draselný p. a.; PENTA (Česká republika)

Kinetin p. a.; SERVA (Nemecko)

Kyselina boritá p. a.; PENTA (Česká republika)

Kyselina fosforečná p. a.; PENTA (Česká republika)

Kyselina nikotinová; BDH (Velká Británie)

Macerozym R-10; SERVA (Německo)

D-Mannitol  $\geq 98\%$ ; Sigma-Aldrich (Německo)

Metavanadičnan amonný čistý; Lachema Brno (Česká republika)

Methanol čistý; PENTA (Česká republika)

Methanol pro HPLC; Avantor (USA)

MgATP; Sigma-Aldrich (Německo)

Molybdenan sodný p. a.; PENTA (Česká republika)

*myo*-Inositol for plant cell culture; Sigma-Aldrich (Německo)

NaEDTA 99%; Sigma-Aldrich (Německo)

Neutrální červen p. a.; Lachema (Česká republika)

Orthovanadát sodný  $\geq 99\%$ ; Santa Cruz Biotechnology (Německo)

Polyethylenglykol 4000; Sigma-Aldrich (Německo)

Probenecid  $\geq 98\%$ ; Sigma-Aldrich (Německo)

Pyridoxin hydrochlorid; Sigma-Aldrich (Německo)

Sacharosa p. a.; PENTA (Česká republika)

Síran amonný p. a.; PENTA (Česká republika)

Síran hořečnatý p. a.; PENTA (Česká republika)

Síran manganatý p. a.; PENTA (Česká republika)

Síran měďnatý pentahydrát p. a.; PENTA (Česká republika)

Síran vanadylu; Riedel de Haën (Německo)

Síran zinečnatý heptahydrát p. a.; PENTA (Česká republika)

Síran železnatý p. a.; PENTA (Česká republika)

Thiamin hydrochlorid p. a.; Sigma-Aldrich (Německo)

Verapamil 98%; Sigma-Aldrich (Německo)

#### **4.1.2. Přístrojové a laboratorní vybavení**

Analytické váhy Sartorius CPA225D; Sartalex (Česká republika)

Automatické pipety Acura; Socorex (Švýcarsko)

Centrifuga Z326K; Hermle (Německo)

Heidolph rotary evaporator Laborota 4010; Sigma-Aldrich (Německo)

HPLC soustava Jasco; (Japonsko)

Chladicí skříň NS 600.2 VV; Frigera (Česká republika)

Injekční stříkačka

Lab dancer; IKA (Německo)

Laboratorní sklo a porcelán Sial, Simax; Kavalier (Česká republika)

Mikrofiltr 0,2 a 0,45 um; VWR international (USA)

Mikroskop OLYMPUS CH20; Micro-Optics (USA)

Miracloth EMD Millipore; VWR (USA)

Multi-flask Shaker VKS 75, Edmund Bühler, Fisher Scientific (USA)

Okulárová USB kamera AM4023; Dino-Lite (Taiwan)

Orbital Shaker 3015; GFL (Německo)

Parafilm M; Bemis (USA)

Parní sterilizátor PS20 A Chirana; LABO-MS (ČR)

Předvážky KERN 440-45 N; KERN (Německo)

Souprava na homogenizaci tkání CD1-1KT; Sigma-Aldrich (Německo)

Box s laminárním prouděním Fatran LF; Chirana Brno (ČR)

UV Cleaner-Recirculator UVR-Mi; Biosan (Litva)

Vakuová vývěva MZ 2C; Vacuubrand (Německo)

Vialky šroubovací ND9; Fisher Scientific (USA)

Vodní lázeň 1042; GFL (Německo)

Zkumavky Falcon 50 ml; Fisher Scientific (USA)

## 4.2. Rostlinný materiál

### *Trifolium pratense L.*

Kalusová kultura *T. pratense* DO-8 (Příloha 5.; s. 3) byla odvozena z cíleně poraněných částí mladých rostlin. Semena použitých rostlin pocházela ze Šlechtitelské stanice Domoradice a byla kultivována na agarem zpevněném mediu Gamborg B5 (Příloha 9.; s. 4). Z kalusu byla následně připravena suspenzní kultura (Příloha 6.; s. 3). Kultury byly pěstovány v 250ml Erlenmeyerových baňkách na mediu Gamborg B5 s obsahem 2,4-D (9,0121  $\mu\text{M}$ ) a BAP (8,8432  $\mu\text{M}$ ) na pevném nosiči částečně ponořeném v mediu v případě kalusu nebo jako volně dispergované suspenze na třepačce. Pro vzdušnění a zabránění sedimentace u suspenze bylo zajištěno umístěním baněk na třepačku o 115 rpm. Oba typy kultur byly kultivovány při 24 °C a 16hodinovém světelném režimu zajišťovaném zářivkami. Kalusy byly pasážovány po 4 týdnech ve sterilním boxu, který byl před použitím vydezinfikován a ošetřen germicidním zářením. Nová pasáž byla připravena přenesením zdravé tkáně na povrch papírového můstku a baňka se opět uzavřela hliníkovou folií. Suspenze byly připraveny rozrušením kompaktní hmoty kalusu do media pomocí sterilní pinzety a několikanásobným nasátím a vypuštěním buněčných shluků automatickou pipetou a následně pasážovány po čtrnácti dnech. První pasáž suspenze byla odvozena z 59. pasáže kalusu. Pro studium elicitace a mechanismů transportu byla využita suspenzní kultura pasáže 3 až 10 a pasáž 4 – 14 odvozená z 67. pasáže kalusu *T. pratense*.



### *Genista tinctoria* L.

Kalusová kultura *G. tinctoria* (Příloha 7.; s. 3) byla odvozena z rostlin vyrostlých ze semen pocházejících ze Zemědělské fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Suspenzní kultura (Příloha 8.; s. 3) byla z původní kalusové kultury získána stejným způsobem jako u *T. pratense*. Kalusové i suspenzní kultury byly pěstovány na Schenk & Hildebrandt mediu (Příloha 10.; s. 5) s obsahem růstových regulátorů 2,4-D (2,2621  $\mu\text{M}$ ) a kinetinu (0,4646  $\mu\text{M}$ ) v 250ml Erlenmeyerových baňkách obsahujících v případě kalusu papírové můstky. Tepelné a světelné podmínky byly totožné jako u *T. pratense*. Kalusy byly pasážovány každý měsíc ve sterilním boxu, suspenze byly pasážovány po čtrnácti dnech. První pasáž suspenze byla odvozena ze 40. pasáže kalusu a pro výzkum elicitace a inhibice transportu byly použita pasáž suspenze 5 až 8.

## **4.3. Ovlivnění transportu u buněčné suspenze**

### **4.3.1. Elicitace**

Metoda elicitace byla použita pro zvýšení tvorby sekundárních metabolitů a jejich možného uvolňování do živného media. U *T. pratense* byl vyzkoušen jako chemický elicitor nejprve  $\text{VOSO}_4$  v koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$  podle Částkové<sup>194</sup> a následně  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  v koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$ . Pro elitaci byly buněčné kultury připraveny přemístěním 15 ml narostlé suspenze z předchozí pasáže pipetou do 20 ml nového media a tři dny kultivovány při 115 rpm a 24 °C. Následně byl přidán 1 ml elicitoru o požadované koncentraci připravené ze zásobního roztoku elicitorů do suspenzní kultury (Příloha 11.; s. 6). Společně s elicitovanými suspenzemi byly připraveny kontrolní vzorky, kde byl místo sloučenin vanadu přidán 1 ml destilované vody. Kontrolní a elicitem ošetřené vzorky suspenzních kultur byly postupně odebírány po 24 a 48 hodinách, zfiltrvány za normálního tlaku přes skládaný filtr a po promytí destilovanou vodou vysušeny při laboratorní teplotě na filtračním papíře. Media byla ihned zpracována dle kapitoly 4.3.3. nebo v plastových zkumavkách zamražena.

Suspenzní kultura *G. tinctoria* byla připravena a elicitována stejným způsobem. Jako elicitor byl využit opět  $\text{VOSO}_4$  a  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  v přidávaném objemu 1 ml koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$  a jejich působení bylo sledováno v rámci 24 a 48 hodin. Kontrola byla provedena jako v předchozím případě. Odebrané vzorky byly zpracovány stejným způsobem a extrakty připraveny dle 4.3.4.

### 4.3.2. Kultivace s inhibitory transportních mechanismů

Buněčné kultury *T. pratense* i *G. tinctoria* byly kultivovány s inhibitory různých transportních mechanismů, které jsou používány při jejich identifikaci (Příloha 11.; s. 6). K experimentům byly použity suspenzní kultury připravené podle 4.3.1. Před aplikací elicitoru bylo do pokusné baňky přidáno 30  $\mu$ l inhibitoru ze zásobních roztoků a suspenze byly inkubovány jednu hodinu na třepačce za standardních podmínek. Po jedné hodině byl do suspenze přidán 1 ml elicitoru dle výsledků získaných z vlivu elicitorů na jednotlivé kultury (Kap. 5.1) a suspenze byly kultivovány 24 hodin za standardních podmínek. Společně se suspenzemi, kde byl přidán inhibitor a elicitor (Inhibitor; Kap. 5.2), byly připraveny i vzorky pouze s 1 ml elicitoru (Elicitor; Kap. 5.2.) a kontrolní vzorky (Kontrola; Kap. 5.2.). Následně byly kultury zfiltrovány, pevný podíl usušen a společně s médiem zpracován dle 4.3.3. Použitá rozpouštědla neměla statisticky významný vliv na změnu obsahu isoflavonů v sušině a mediu.

### 4.3.3. Příprava extraktů z *T. pratense* k HPLC analýze

Extrakty k HPLC analýze obsahu isoflavonů v sušině a mediu byly připraveny podle postupů vypracovaných na katedře farmakognosie. Vodou propláchnuté a usušené buňkysuspenzní kultury *T. pratense* byly rozdrceny v třecí misce. 0,3000 až 0,5000 g sušiny bylo na analytických vahách odváženo do varné baňky, do které bylo přidáno 15 ml 80% methanolu a varné kuličky. Směs byla dvakrát 15 minut extrahována při 80 °C na vodní lázni pod zpětným chladičem a po vychladnutí zfiltrována přes vatu do odměrné baňky o objemu 25 ml. Vata se zachycenou suspenzí byla vrácena do varné baňky a znovu extrahována 80% methanolem 15 minut. Po vychladnutí byl extrakt přidán do odměrné baňky s prvním extraktem a případně se objem doplnil na 25 ml. 1,5 ml výsledného roztoku bylo přes mikrofiltr (0,45  $\mu$ m) pomocí injekční stříkačky přeneseno do vialky a obsah isoflavonů určen pomocí HPLC.

Změřený objem zfiltrovaného média byl na odparce zredukován na 5 ml a převeden do odměrné baňky na 10 ml. Objem byl doplněn po rysku 80% methanolem. Výsledný roztok byl nejprve přefiltrován přes vatu, 1,5 ml filtrátu bylo přes mikrofiltr (0,45  $\mu$ m) stříkačkou přeneseno do vialky a obsah isoflavonů vyhodnocen pomocí HPLC.

#### **4.3.4. Příprava extraktů z *G. tinctoria* k HPLC analýze**

Extrakty z *G.tinctoria* byly připraveny podobným způsobem jako u *T. pratense*. 0,3000 až 0,5000 g rozdrčené sušiny bylo odváženo do varné baňky a po přidání varných kuliček extrahováno v 10 ml 80% methanolu za varu 10 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po vychladnutí byla suspenze zfiltrována přes vatou do 20ml odměrné baňky a pevný podíl usazený na vatě byl společně s ní vrácen do varné baňky a znovu extrahován v 10 ml 80% methanolem. Druhý extrakt byl přefiltrován přes vatou do odměrné baňky a objem byl doplněn na 20 ml. Výsledný roztok byl přes mikrofiltr (0,45  $\mu$ m) opět přenesen do vialky a obsah isoflavonoidů vyhodnocen pomocí HPLC.

Filtrát získaný po separaci buněčné suspenze z media byl po změření kalibrovanou pipetou zredukován na odparce. Pevný podíl byl rozpuštěn v 10 ml 80% methanolu, roztok byl převeden do 10ml odměrné baňky a objem případně doplněn stejným rozpouštědlem. Po zfiltrování přes vatou byl roztok pomocí mikrofiltru (0,45  $\mu$ m) a injekční stříkačky aplikován do vialek. Obsah isoflavonů byl vyhodnocen pomocí HPLC.

### **4.4. Ovlivnění transportu u izolovaných vakuol**

#### **4.4.1. Izolace protoplastů**

Pro výzkum vakuolárního transportu byla použita 10 dní stará suspenzní kultura *T. pratense* a roztoky uvedené v Příloze 12. (s. 7). Suspenze byla zfiltrována na Büchnerově nálevce za sníženého tlaku tak, aby vzniklá usazenina nebyla zcela vysušena. Po jejím promytí roztokem A (500mM mannitol) a zfiltrování, bylo zhruba 50 g suspenze odváženo do 250ml Erlenmeyerovy baňky a smícháno se 100 ml roztoku enzymů (cellulasa, macerozym). Do buněčné suspenze (Příloha 13.; s. 9) s enzymatickým roztokem bylo přidáno 0,0025 g neutrální červeně pro zvýraznění protoplastů a vakuol (Příloha 14.; s 9.) a baňka byla postavena na třepačku o 115 rpm do kultivační místnosti. Reakce probíhala při 24 °C za ochrany před světlem. Průběžně byl kontrolován nárůst obsahu protoplastů a po třech až čtyřech hodinách došlo u většiny buněk k lýze buněčné stěny (Přílohy 15., 16.; s. 10).

#### **4.4.2. Izolace vakuol**

Pro izolaci vakuol byl využit upravený postup dle Pomahačové.<sup>155</sup> Protoplasty byly přefiltrovány přes vrstvu Miracloth, která slouží k separaci protoplastů od nedegradovaných buněk. Suspenze protoplastů byla rozdělena do čtyř zkumavek a odstředěna v centrifuze HERMLE při 2200 rpm po dobu 10 min. Supernatant byl opatrně odstraněn, pelety byly resuspendovány v 5 ml roztoku B (500mM mannitol, 10mM HEPES) a přeneseny do dvou 50ml zkumavek tak, že každá obsahovala 10 ml protoplastové suspenze. Do každé zkumavky bylo přidáno 20 ml destilované vody, aby došlo k lýze protoplastů a uvolnění vakuol (Příloha 17.; s. 11). Lýza byla podpořena protřepáváním zkumavek a jejich postavením na Labdancer nebo několikanásobným nasátím přes ústí 5ml pipety. Suspenze byla následně rozdělena pipetou po 5 ml do 12 centrifugačních zkumavek a odstředěna při 4000 rpm a 4 °C po dobu 15 minut.

Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v 5% roztoku Ficollu. Suspenze, která obsahovala kromě vakuol nežádoucí balast nebo nelyzované protoplasty, byla případně přečištěna pomocí gradientu vytvořeného roztoky Ficollu o různé koncentraci: na dno centrifugační zkumavky byl napipetován 15% Ficoll, opatrně převrstven 10% Ficollem a následně suspenzí vakuol v 5% Ficollu. Zkumavky s roztoky byly odstředěny při 2200 rpm a 4 °C po dobu 10 minut. Vakuoly se hromadily převážně na mezifázi 10% a 15% Ficollu. Z tohoto rozhraní byly opatrně odebrány pipetou a po spojení všech frakcí následně rovnoměrně rozděleny znovu do 12 centrifugačních zkumavek. Tyto zkumavky byly odstředěny při 4000 rpm a 4 °C po dobu 15 minut.

#### **4.4.3. Ovlivnění vakuolárního transportu**

Po odstranění supernatantu byly pelety vakuol (Příloha 18.; s. 11) resuspendovány v 8 ml kontrolních nebo zkoušených roztoků (Příloha 12.; s. 7-8). Zkoušené roztoky obsahovaly látky ovlivňující transport (MgATP, bafilomycin A1, DCCD) a byly jako kontroly děleny dle přítomnosti (G+) či absence (G-) přidaného genistinu. U každého roztoku byla provedena tři měření. 2 ml směsi od kontrolních a zkoušených vzorků byly ihned přeneseny do nové zkumavky a odstředěny při 4000 rpm a 4 °C po dobu 10 minut. Oddělený supernatant byl smíchán s 1 ml 80% methanolu a pipetou přemístěn do vialky. K peletě vakuol byly přidány 2 ml 80% methanolu a suspenze byla rozmíchána postavením na Labdancer po dobu 15 sekund.

Směs byla přes mikrofiltr (0,2 μm) zfiltrována injekční stříkačkou do vialek. Odběr vzorku byl stejným způsobem zopakován po 2, 4 a 24 hodinách a vzorky byly vyhodnoceny na HPLC.

#### 4.5. HPLC analýza obsahu isoflavonů

K analýze vzorků byla použita chromatografická soustava Jasco skládající se z čerpadla PU-2089, detektoru MD-2015, autosampleru AS-2055, předkolumnového filtru, kolony LiChroCART 250×4 s ochrannou předkolumnkou a se stacionární fází LiChrospher 100 RP-18 (5 μm). Stacionární fáze se skládala ze sorbentu na bázi silikagelu o velikosti částic 5 μm, na jejich hydroxylové skupiny byly navázány nepolární uhlovodíkové řetězce (18 atomů uhlíku) tvořící reverzní fázi. K určení totožnosti a obsahu isoflavonů genistinu, daidzeinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A byly použity jejich vnější standardy (Přílohy 19. – 25.; s. 12-15). Metoda HPLC analýzy těchto metabolitů byla vytvořena na katedře farmakognosie PharmDr. Janem Martinem, PhD. a použita v předchozích pracích.<sup>169</sup>

Eluce mobilní fáze, která obsahovala jako pufr vždy 0,15 % kyseliny fosforečné, probíhala nejprve gradientově. Složení mobilní fáze se měnilo v čase od  $t = 0$ , kdy byla koncentrace 30% methanolu až po 80% methanol v čase  $t = 9$  min. Poté následovala isokratická eluce 80% methanolem do času  $t = 15$  min. Průtok kolonou byl 1,1 ml/min.

Detekce obsahových látek pomocí DAD detektoru probíhala v rozmezí vlnových délek 190 – 450 nm. Údaje o obsahu požadovaných látek byly vypočteny z píků při vlnové délce 260 nm.

Obsah isoflavonů byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřených standardů. Identifikace píků byla provedena na základě retenčních časů a spekter.

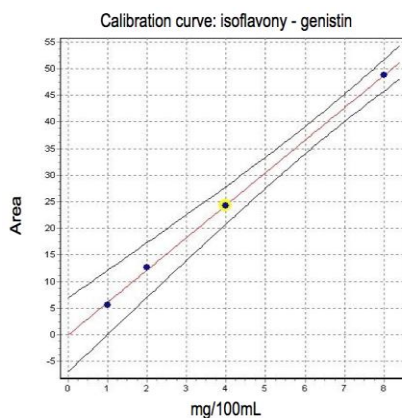
##### 1. Genistin

x: koncentrace (mg/100 ml)

y: plocha;  $y = bx + a$

regresní koeficient: 0.9998

$a = 0$ ;  $b = 6.089$



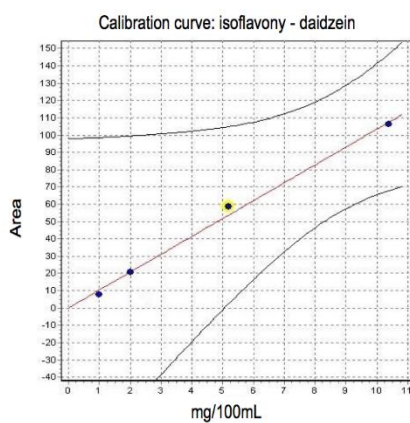
## 2. Daidzein

x: koncentrace (mg/100 ml)

y: plocha;  $y = bx + a$

regresní koeficient: 0.9938

$a = 0$ ;  $b = 10.340$



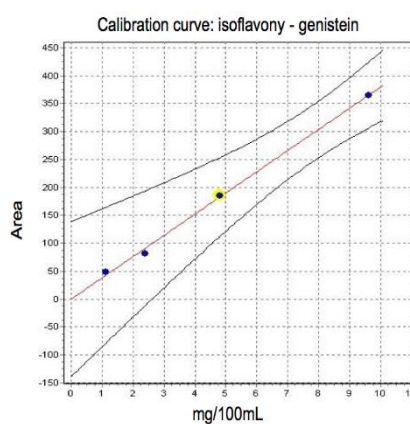
## 3. Genistein

x: koncentrace (mg/100 ml)

y: plocha;  $y = bx + a$

regresní koeficient: 0.9988

$a = 0$ ;  $b = 38.010$



## 4. Formononetin

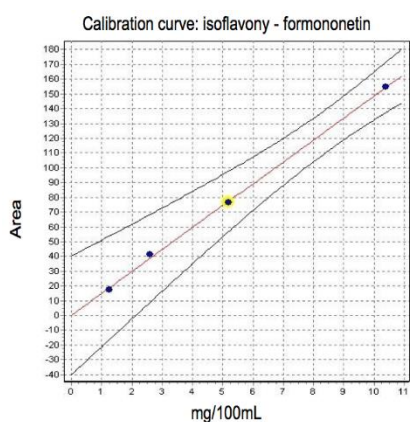
x: koncentrace (mg/100 ml)

y: plocha

$y = bx + a$

regresní koeficient: 0.9994

$a = 0$ ;  $b = 14.860$



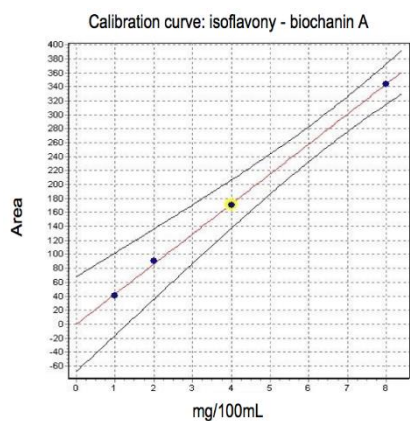
## 5. Biochanin A

x: koncentrace (mg/100 ml)

y: plocha;  $y = bx + a$

regresní koeficient: 0.9997

$a = 0$ ;  $b = 42$



#### 4.6. Statistické zhodnocení výsledků<sup>195, 196</sup>

Konečné výsledky prezentované v grafech jsou aritmetickým průměrem hodnot získaných ze tří jednotlivých měření, která byla provedena pro každý kontrolní i experimentální vzorek. Aritmetický průměr představuje součet naměřených výsledků dělených jejich počtem. Standardní odchylka pak určuje, jak velký je rozptyl hodnot od předpokládaného průměru.

K zjištění toho, jestli byl rozdíl mezi vzorky statisticky významný a došlo po aplikaci elicitoru nebo inhibitoru k relevantní změně obsahu isoflavonů, byl použit dvojitý studentův t-test. Tento t-test byl nepárový vzhledem k tomu, že byly porovnávány dva soubory hodnot získaných z kontrolních nebo experimentálních měření. Rozdíl mezi odchylkami u jednotlivých hodnot byl stanoven pomocí F-testu, který určuje, jestli přidané látky ovlivnily příslušný rozptyl.

Pro každý kontrolní a experimentální vzorek byla provedena tři souběžná stanovení. Počet členů kontrolních měření  $n_1$  a počet pokusných měření  $n_2$  byl roven tři a počet stupňů volnosti  $\underline{v}$  se tak rovnal čtyřem. Kritická hodnota testovacího kritéria  $t(\underline{v})P$  je při tomto počtu  $\underline{v}$  a určené hladině významnosti  $P = 0,05$  rovna 2,78. Jestliže vypočítané kritérium splňovalo podmínky kritické hodnoty a hladiny významnosti ( $p < 0,05$ ), byl rozdíl hodnot statisticky významný.

V grafech byl tento statisticky významný nárůst nebo pokles obsahu isoflavonů označen hvězdičkou. V případě určení vlivu inhibitoru (Kap. 5.2.) označuje hvězdička nad sloupcem inhibitoru statisticky významný rozdíl mezi inhibitorem a elicitem. Hvězdička nad elicitem označuje rozdíl mezi ním a kontrolou. Hvězdička nad kontrolou označuje rozdíl mezi inhibitorem s elicitem a kontrolou.

Statistika byla vypočítána pomocí programu Microsoft Excel 2016.

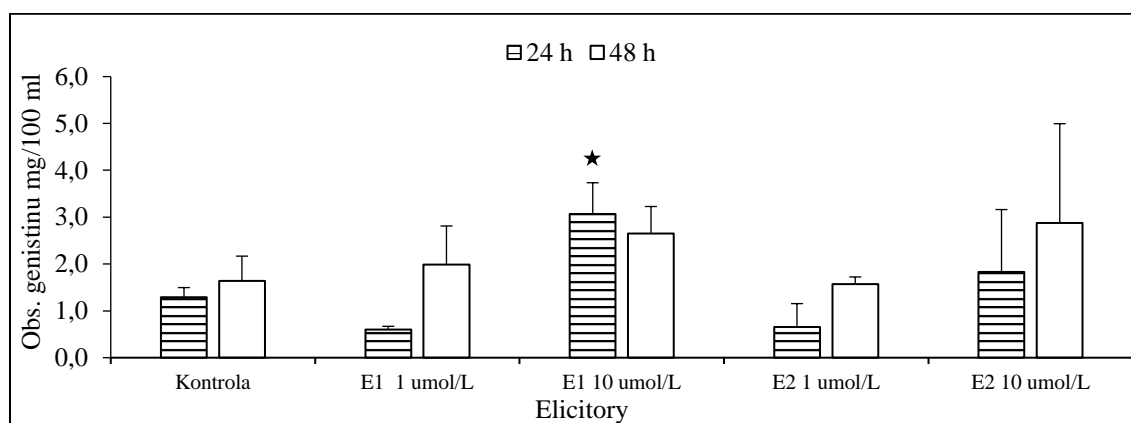
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Elicitace suspenzních kultur

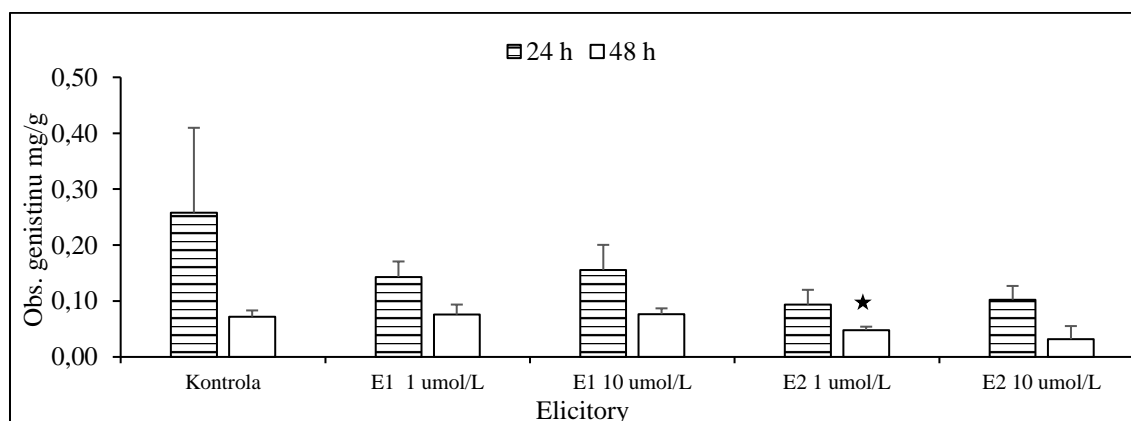
Suspenzní kultury *T. pratense* a *G. tinctoria* byly elicitovány sloučeninami vanadu o různých koncentracích a byl sledován vliv elicitoru na obsah isoflavonů v sušině a na jejich uvolňování do živného media po 24 a 48 hodinách. Jako elicitory byly použity  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  (E1) a  $\text{VOSO}_4$  (E2). Sloupce označené hvězdičkou označují statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a elicitovanými vzorky.

#### 5.1.1. Vliv sloučenin vanadu na obsah isoflavonů v *T. pratense*.

Graf 1.1.a Vliv elicitoru na obsah genistinu v mediu v mg/100 ml

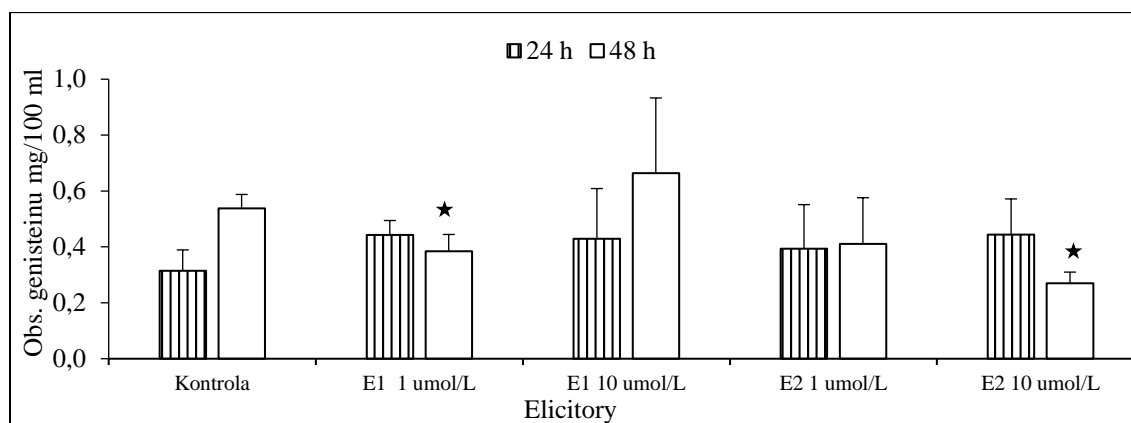


Graf 1.1.b Vliv elicitoru na obsah genistinu v sušině v mg/g

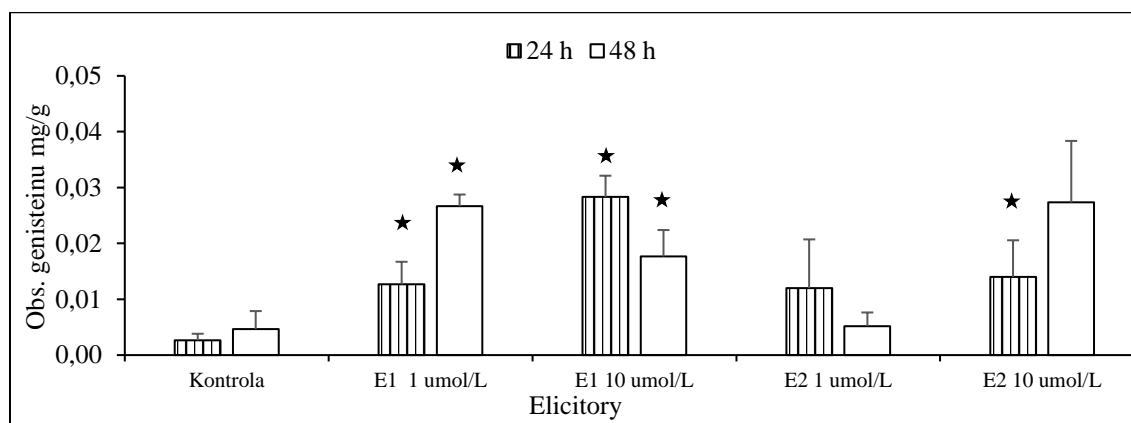




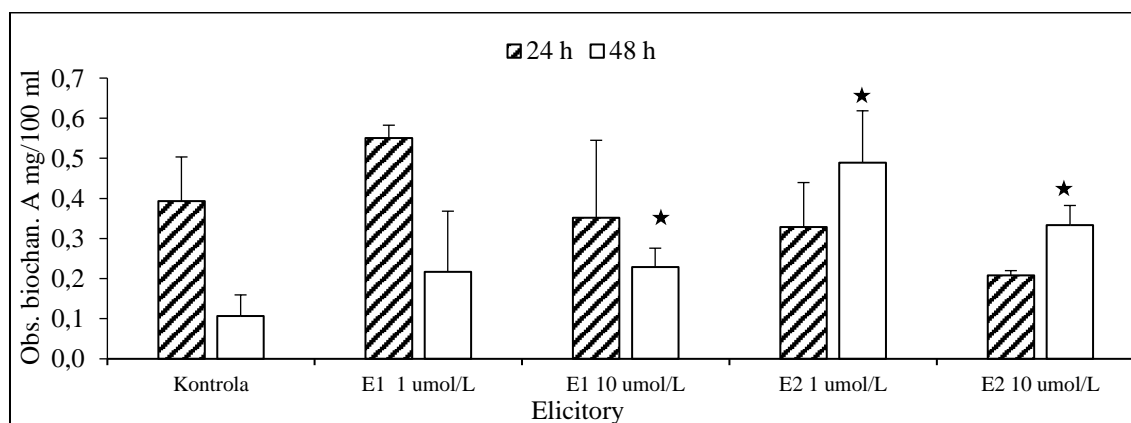
Graf 1.2.a Vliv elicitoru na obsah genisteinu v mediu v mg/100 ml



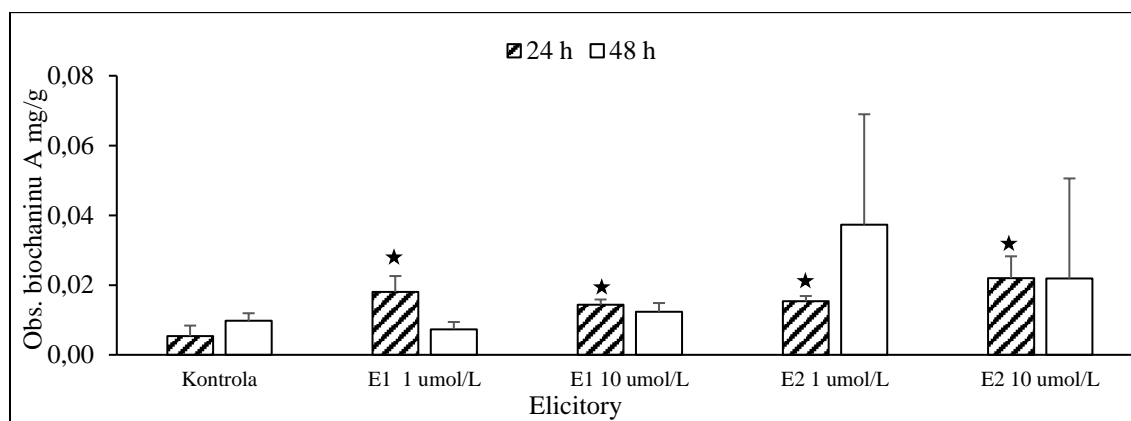
Graf 1.2.b Vliv elicitoru na obsah genisteinu v sušinė v mg/g



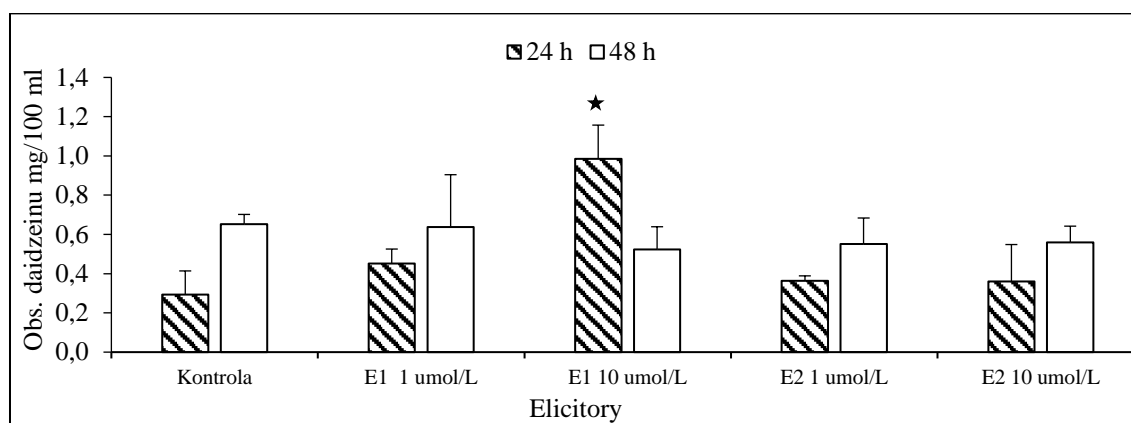
Graf 1.3.a Vliv elicitoru na obsah biochaninu A v mediu v mg/100 ml



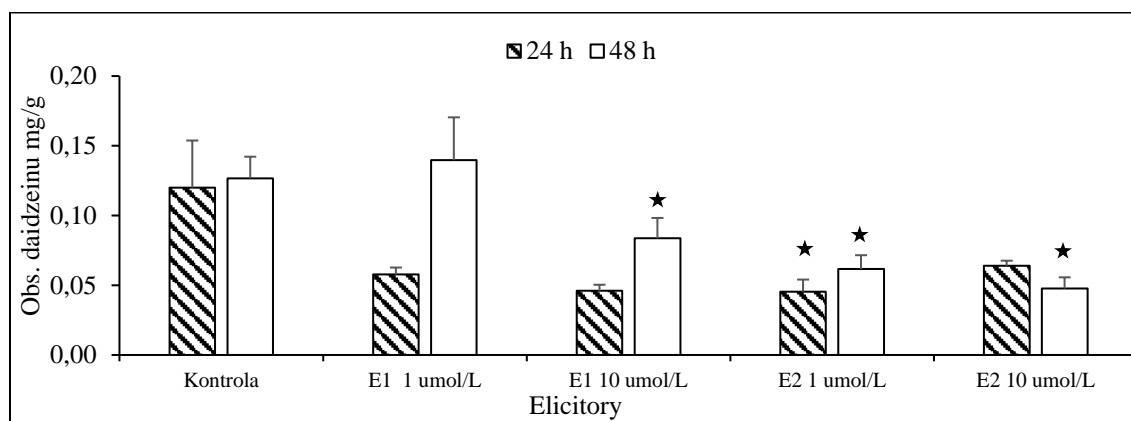
Graf 1.3.b Vliv elicitoru na obsah biochaninu A v sušině v mg/g



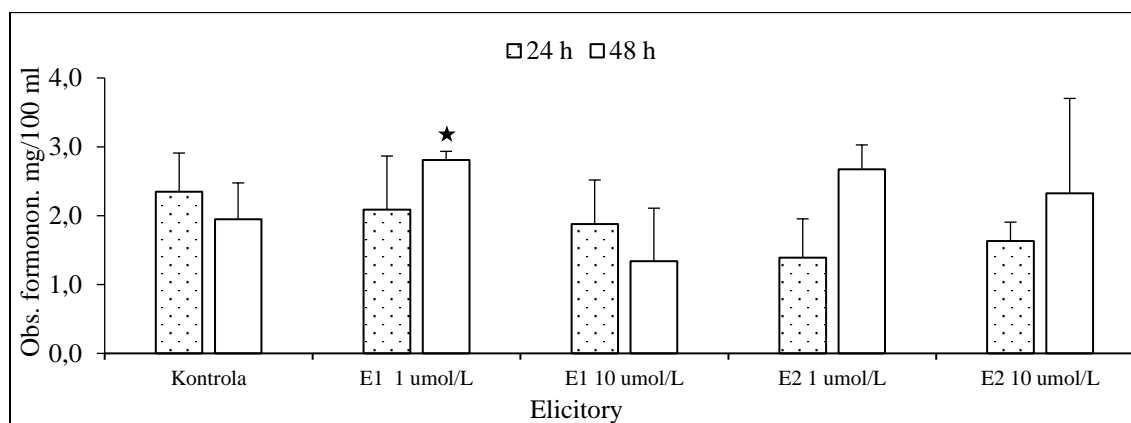
Graf 1.4.a Vliv elicitoru na obsah daidzeinu v mediu v mg/100 ml



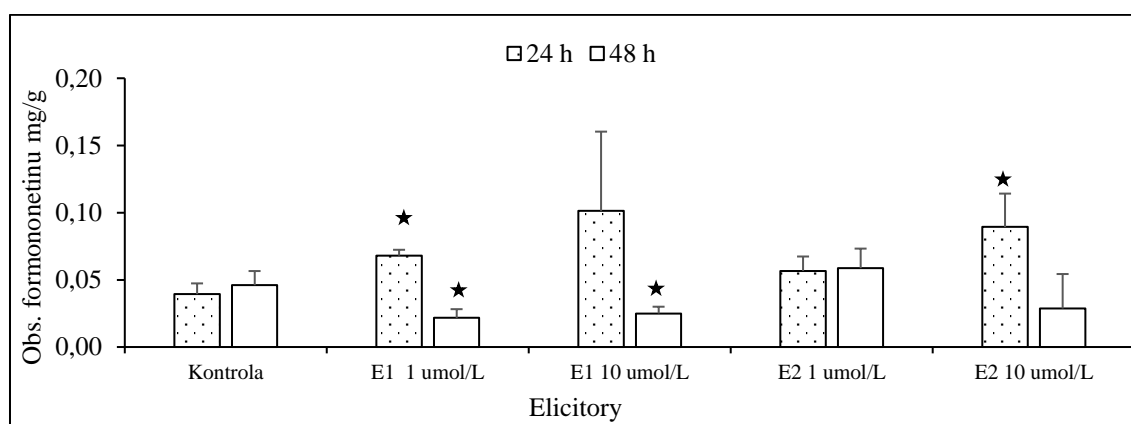
Graf 1.4.b Vliv elicitoru na obsah daidzeinu v sušině v mg/g



Graf 1.5.a Vliv elicitoru na obsah formononetinu v mediu v mg/100 ml

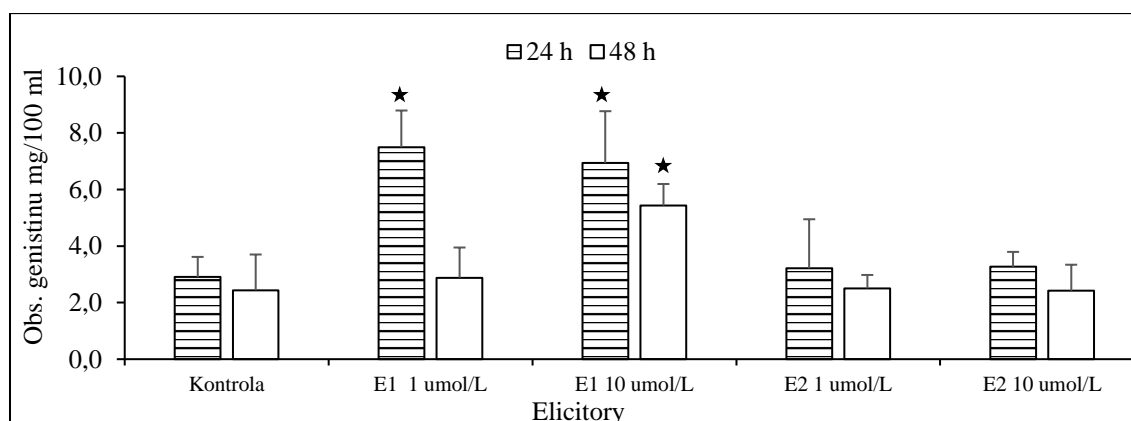


Graf 1.5.b Vliv elicitoru na obsah formononetinu v sušině v mg/g

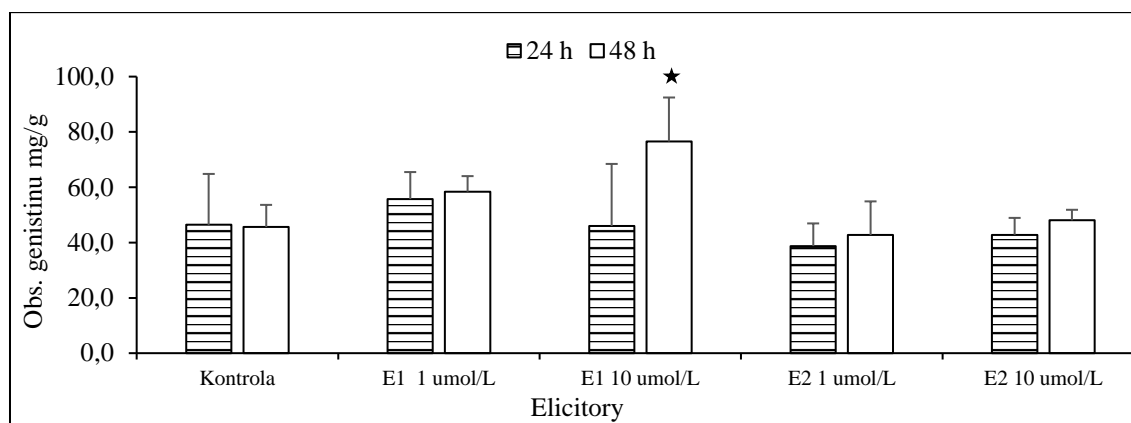


### 5.1.2. Vliv sloučenin vanadu na obsah isoflavonů v *G. tinctoria*

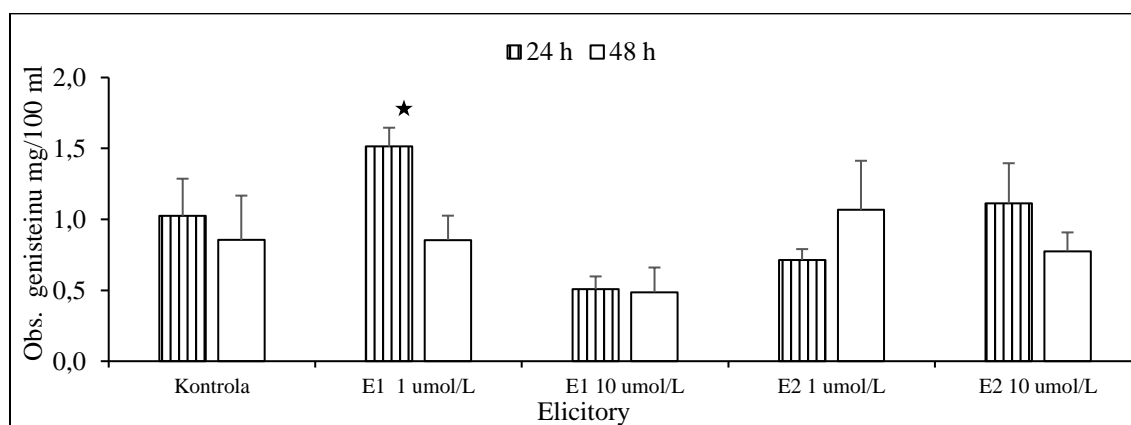
Graf 2.1.a Vliv elicitoru na obsah genistinu v mediu v mg/100 ml



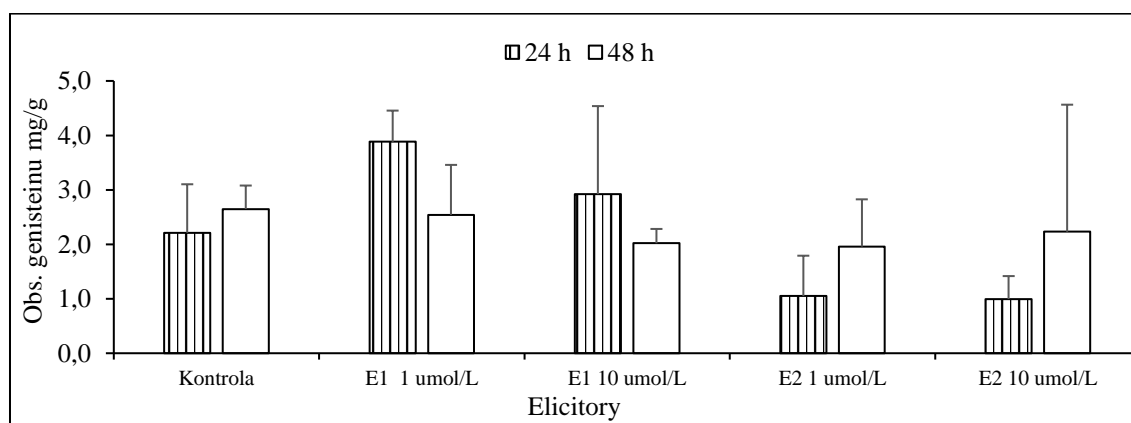
Graf 2.1.b Vliv elicitoru na obsah genistinu v sušině v mg/g



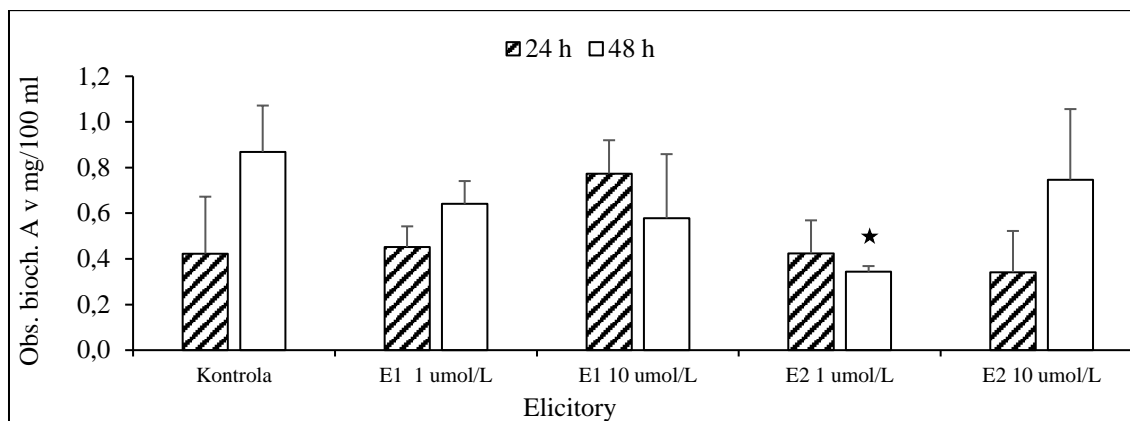
Graf 2.2.a Vliv elicitoru na obsah genisteinu v mediu v mg/100 ml



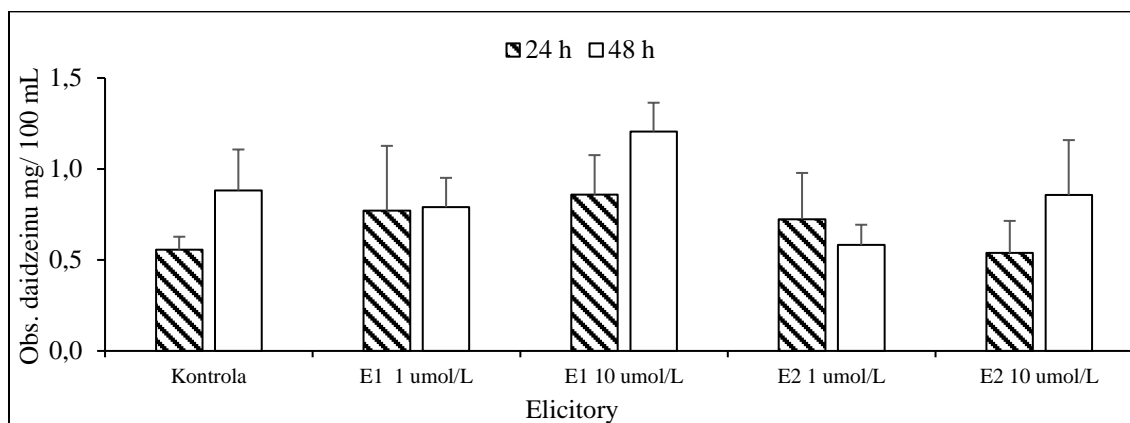
Graf 2.2.b Vliv elicitoru na obsah genisteinu v sušině v mg/g



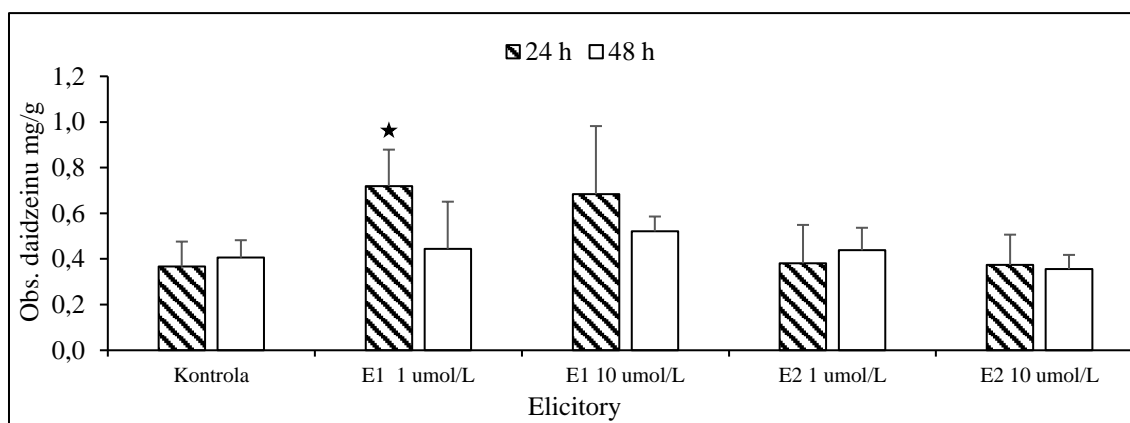
Graf 2.3. Vliv elicitoru na obsah biochaninu A v mediu v mg/100 ml



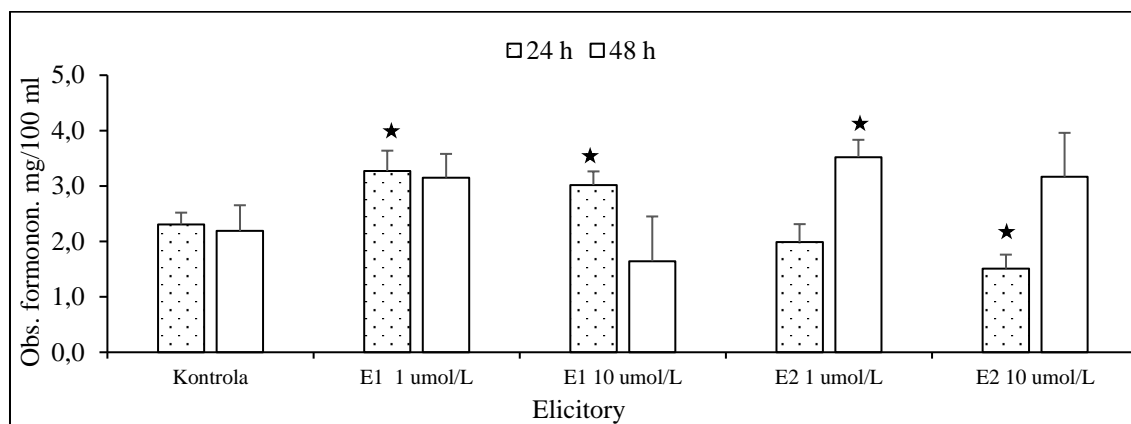
Graf 2.4.a Vliv elicitoru na obsah daidzeinu v mediu v mg/100 ml



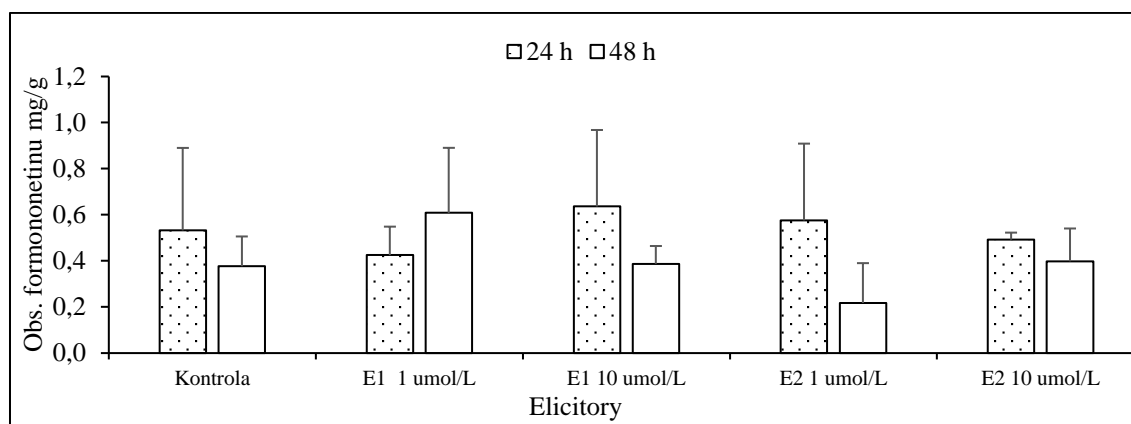
Graf 2.4.b Vliv elicitoru na obsah daidzeinu v sušinė v mg/g



Graf 2.5.a Vliv elicitoru na obsah formononetinu v mediu v mg/100 ml



Graf 2.5.b Vliv elicitoru na obsah formononetinu v suspenzi v mg/g.



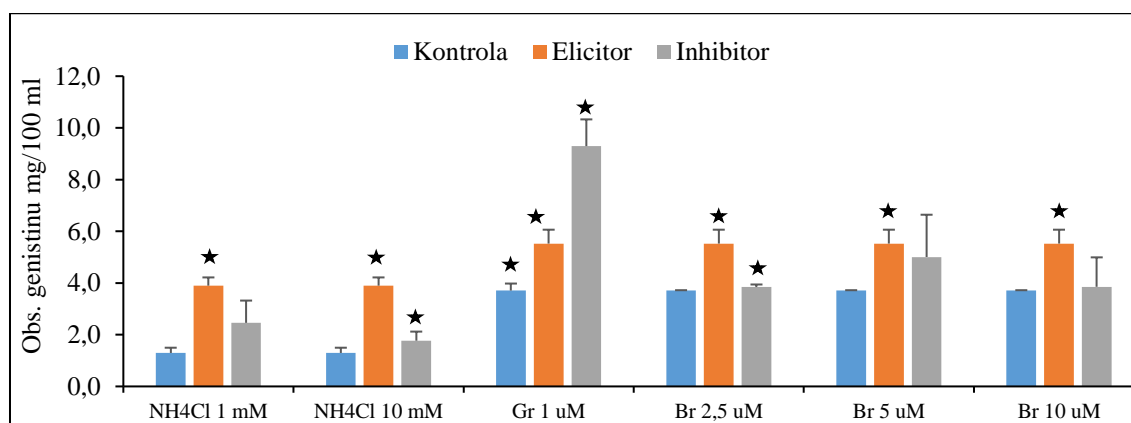
## 5.2. Inhibice transportu isoflavonů do media

Suspenní kultury *T. pratense* a *G. tinctoria* byly kultivovány s elicitorem a různými inhibitory ovlivňující mechanismus sekundárních metabolitů. Tento vliv byl sledován v porovnání s kulturami ošetřenými pouze elicitorem nebo kontrolou. Jako inhibitory byly použity  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , gramicidin (Gr), brefeldin A (Br), orthovanadát sodný (Ort), verapamil (Ver), probenecid (Pr) a glibenklamid (Gl).

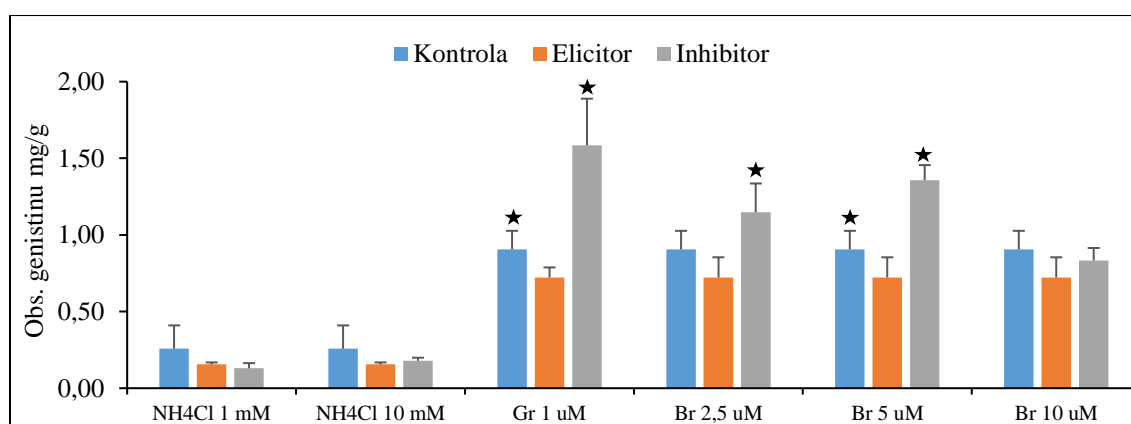
Sloupce označené hvězdičkou označují statisticky významné rozdíly mezi kontrolními vzorky, vzorky s elicitorem a vzorky s elicitorem a inhibitorem (Kap. 4.6.).

### 5.2.1. Vliv inhibitorů na transport isoflavonů v *T. pratense*.

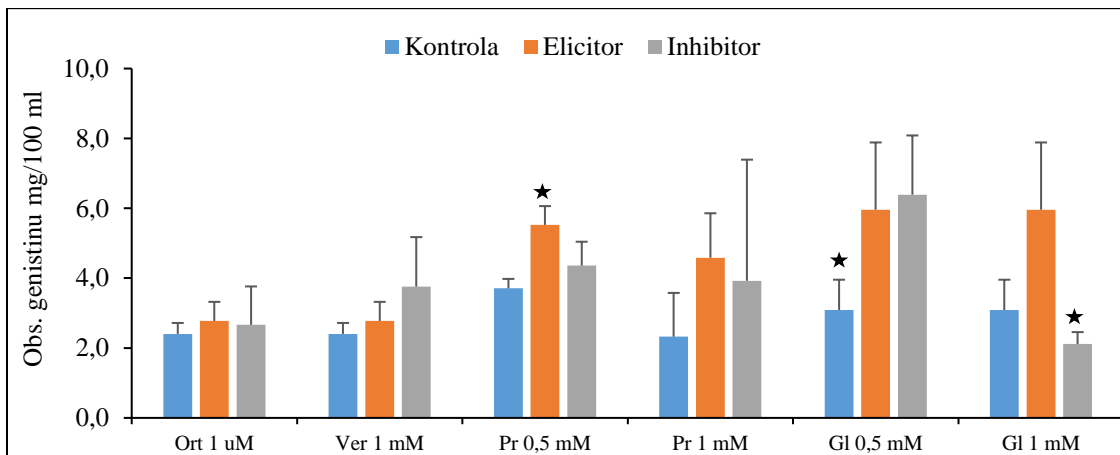
Graf 3.1.a Vliv inhibitorů na obsah genistinu v mediu v mg/100 ml



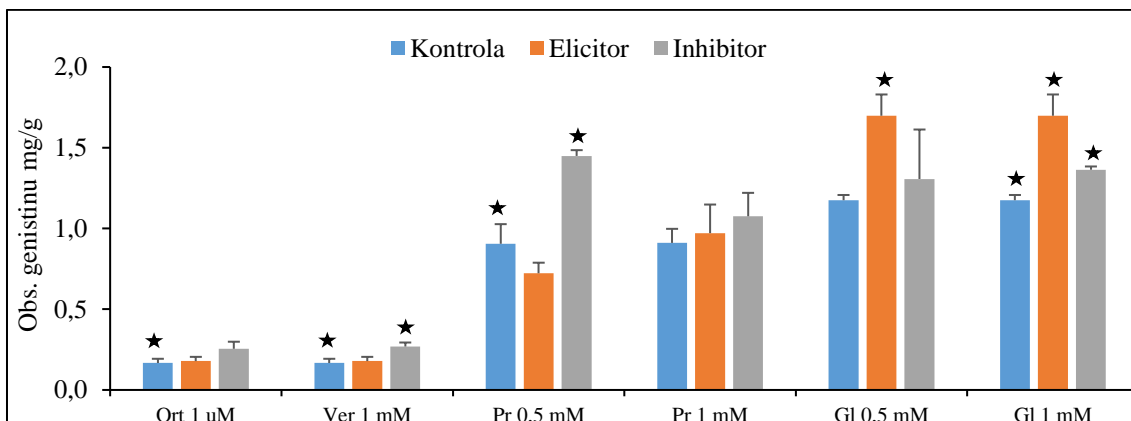
Graf 3.1.b Vliv inhibitorů na obsah genistinu v sušině v mg/g



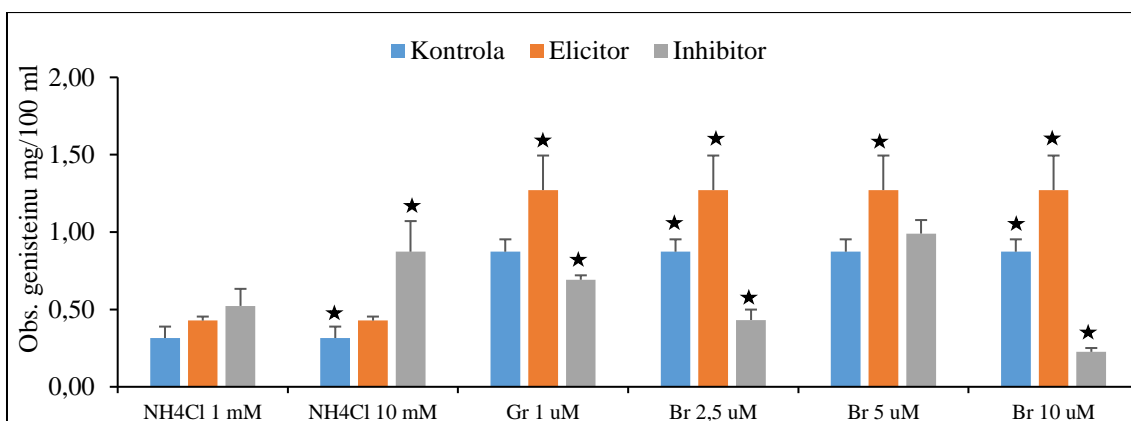
Graf 3.1.c Vliv inhibitorů na obsah genistinu v mediu v mg/100 ml



Graf 3.1.d Vliv inhibitorů na obsah genistinu v sušině v mg/g

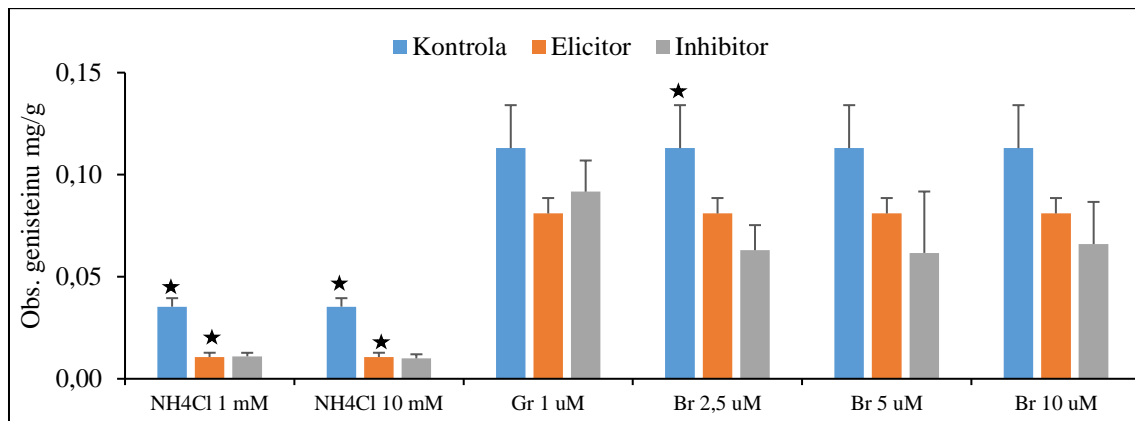


Graf 3.2.a Vliv inhibitorů na obsah genisteinu v mediu v mg/100 ml

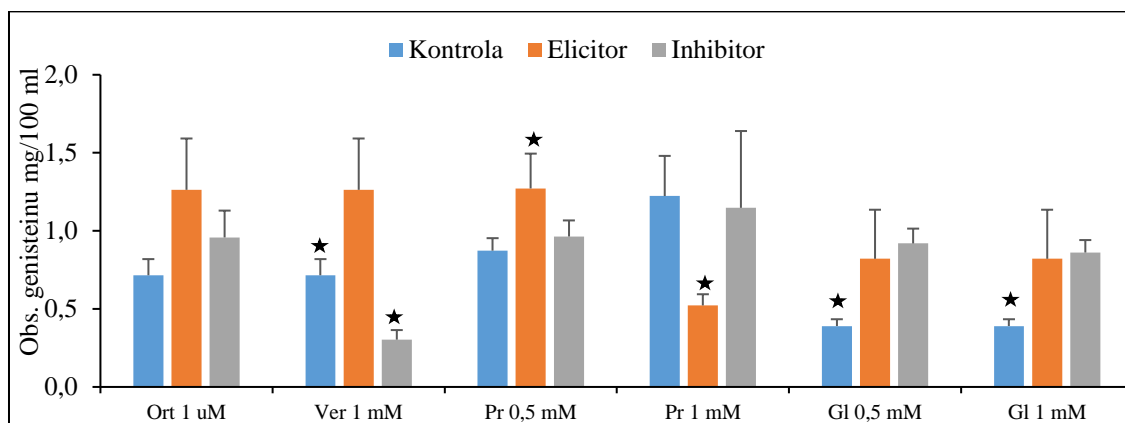




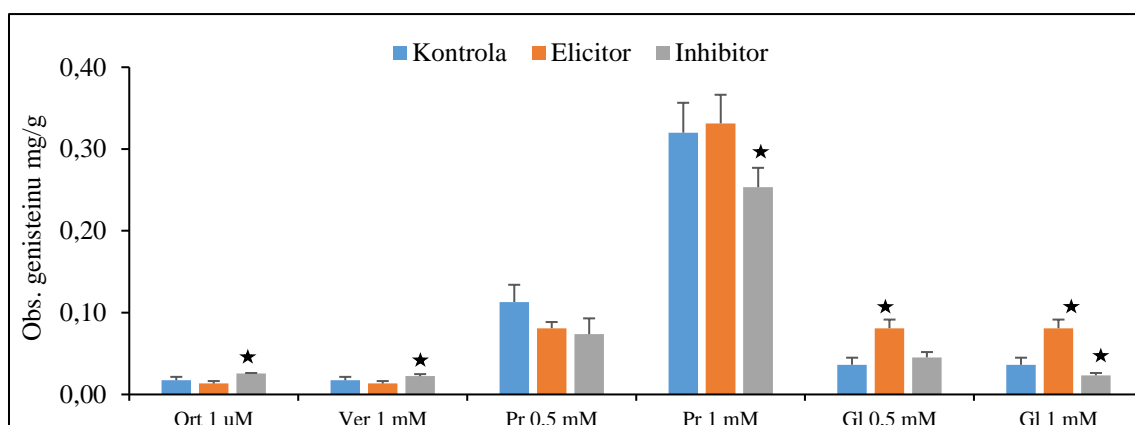
Graf 3.2.b Vliv inhibitorů na obsah genisteinu v sušině v mg/g



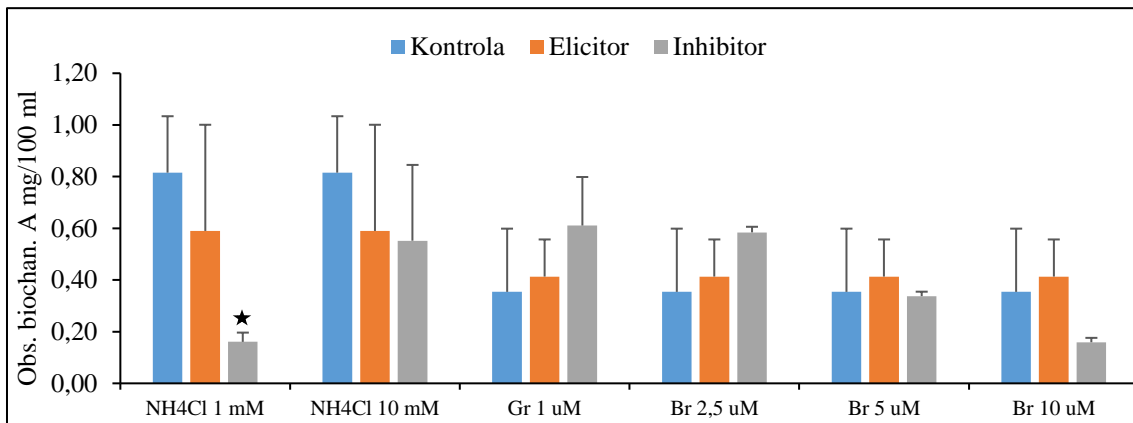
Graf 3.2.c Vliv inhibitorů na obsah genisteinu v mediu v mg/100 ml



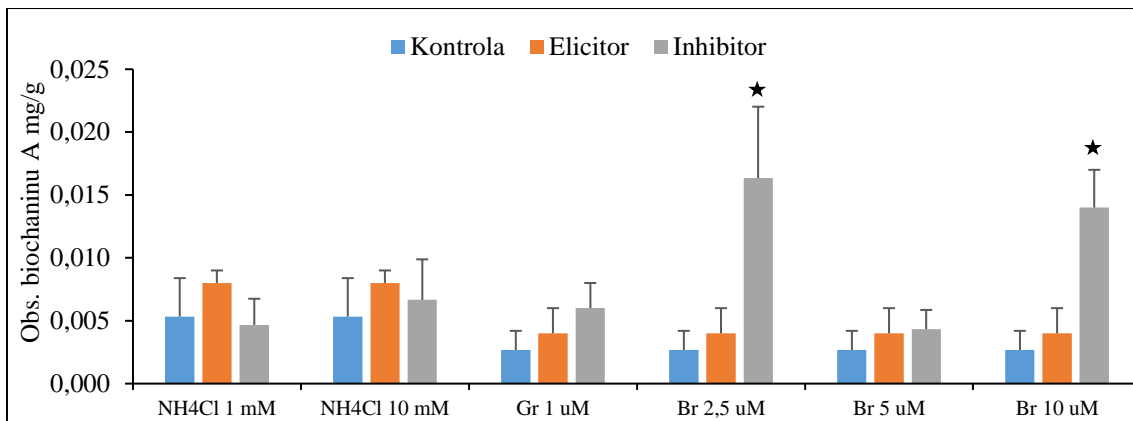
Graf 3.2.d Vliv inhibitorů na obsah genisteinu v sušině v mg/g



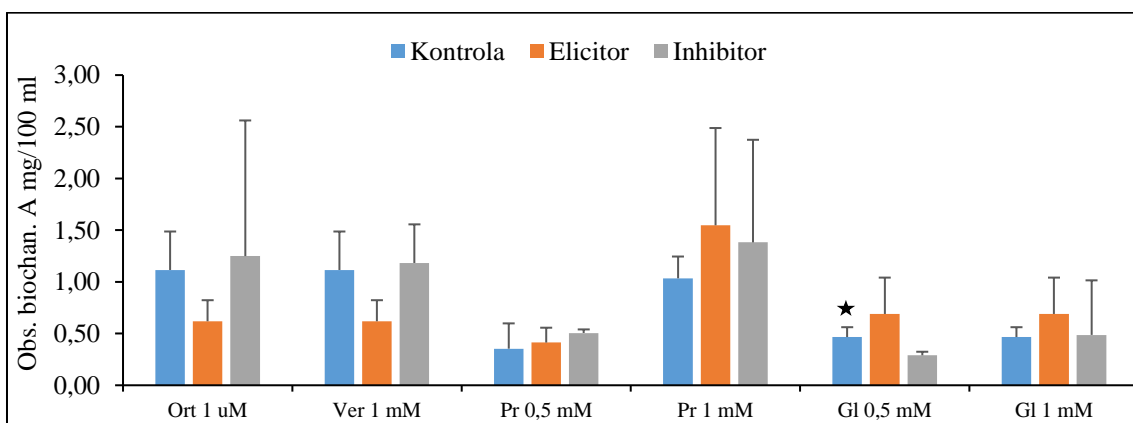
Graf 3.3.a Vliv inhibitorů na obsah biochaninu A v mediu v mg/100 ml



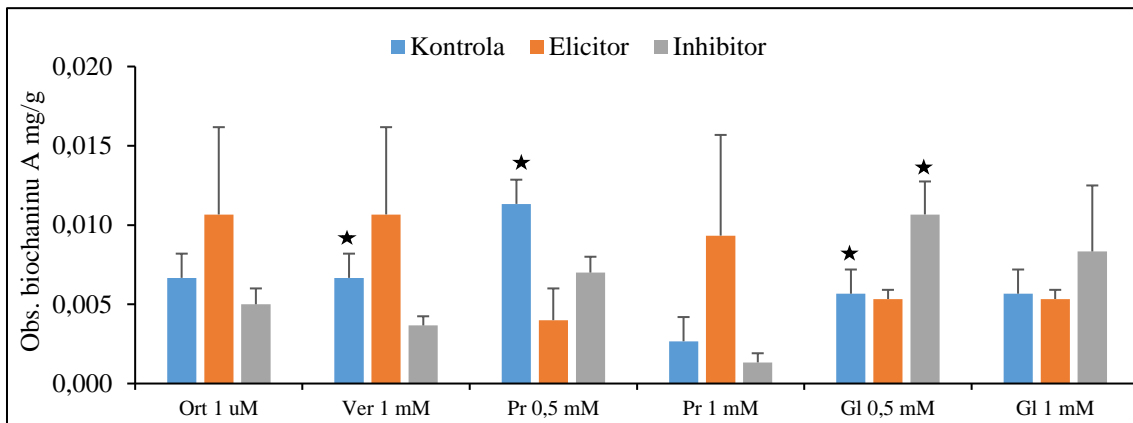
Graf 3.3.b Vliv inhibitorů na obsah biochaninu A v sušině v mg/g



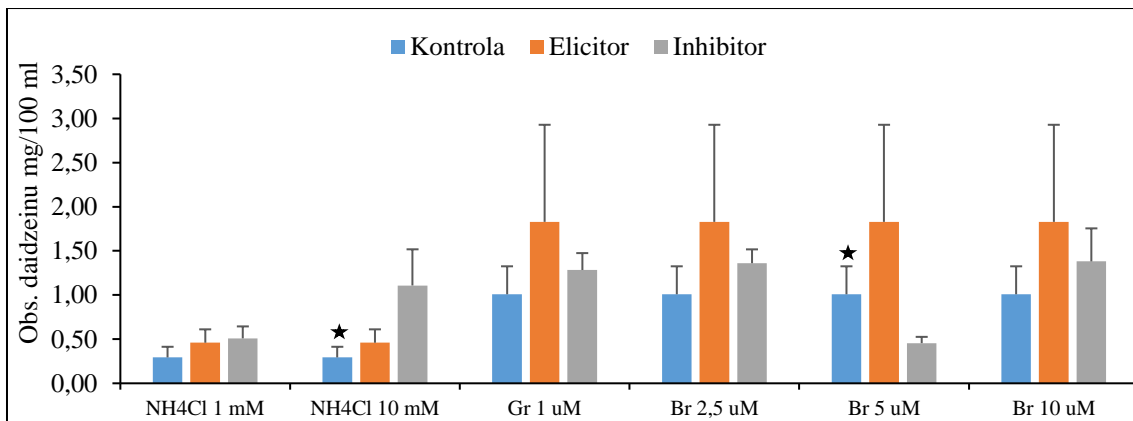
Graf 3.3.c Vliv inhibitorů na obsah biochaninu A v mediu v mg/100 ml



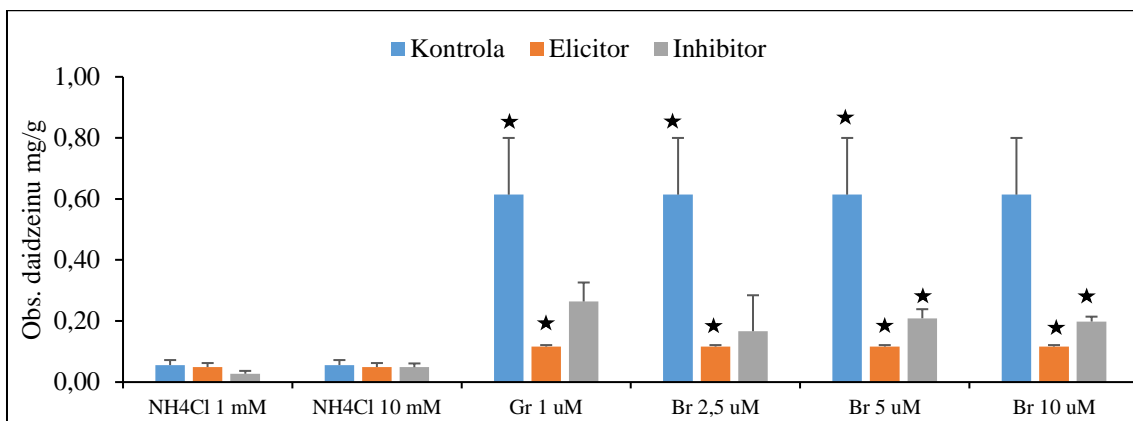
Graf 3.3.d Vliv inhibitorů na obsah biochaninu A v sušině v mg/g



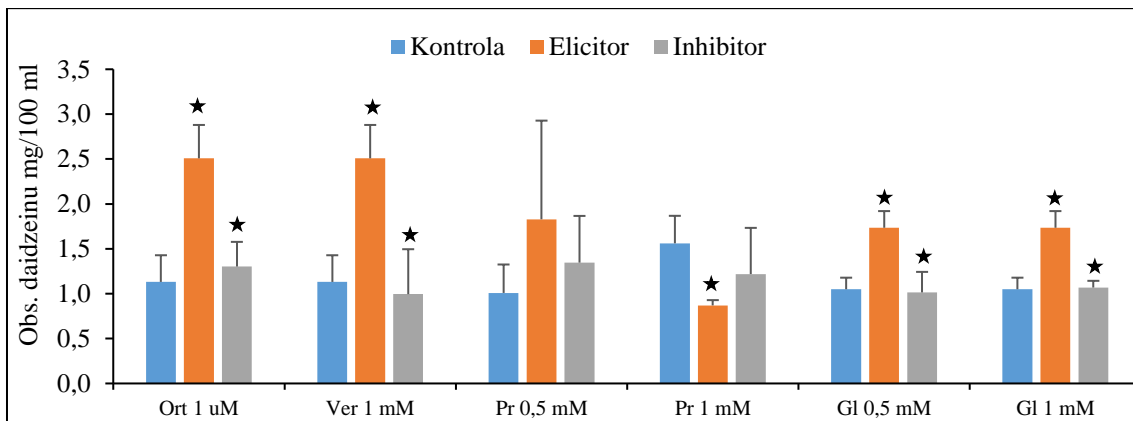
Graf 3.4.a Vliv inhibitorů na obsah daidzeinu v mediu v mg/100 ml



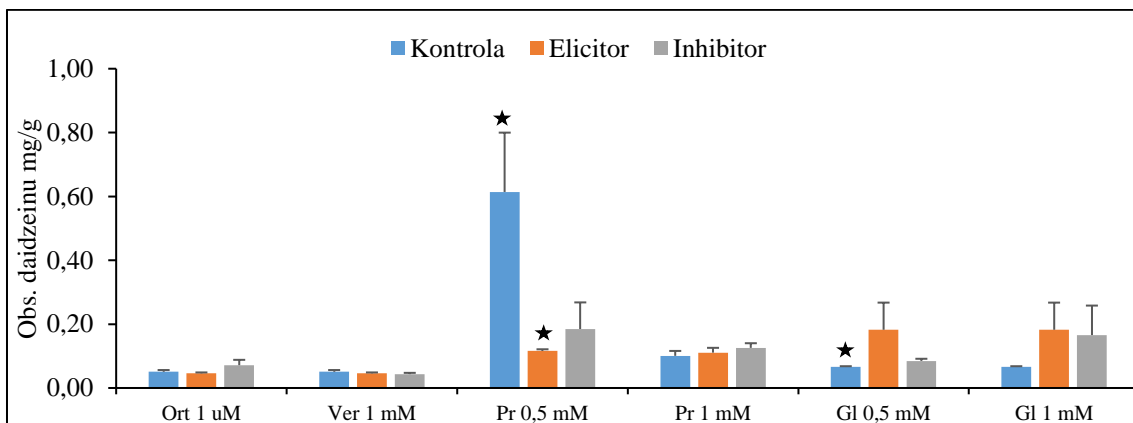
Graf 3.4.b Vliv inhibitorů na obsah daidzeinu v sušině v mg/g



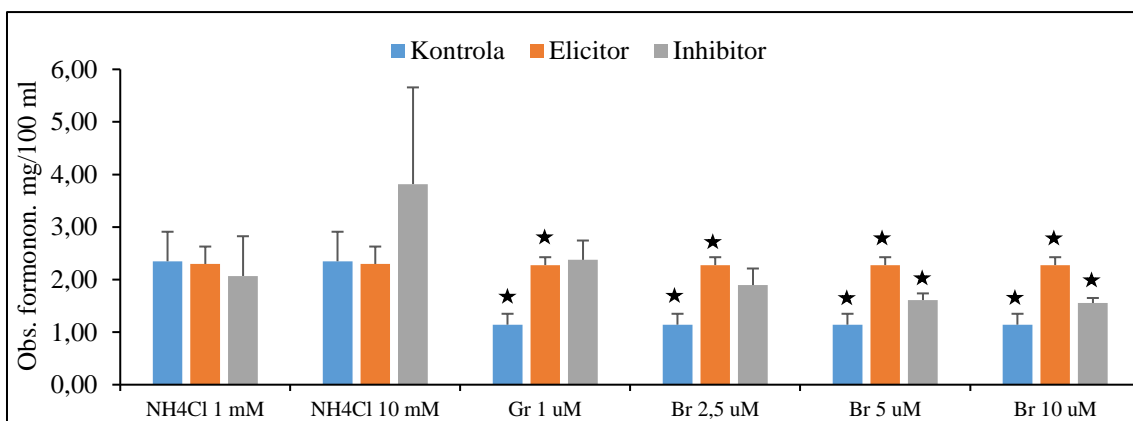
Graf 3.4.c Vliv inhibitorů na obsah daidzeinu v mediu v mg/100 ml



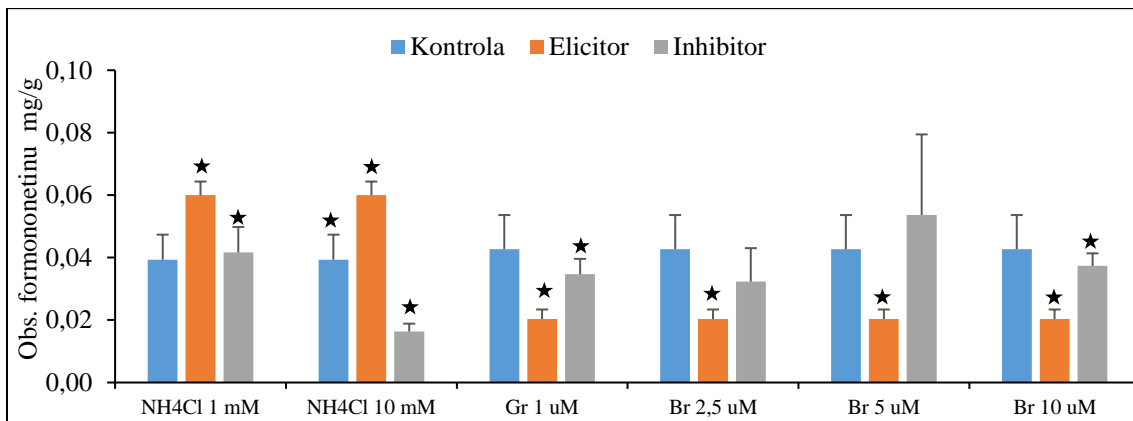
Graf 3.4.d Vliv inhibitorů na obsah daidzeinu v sušině v mg/g



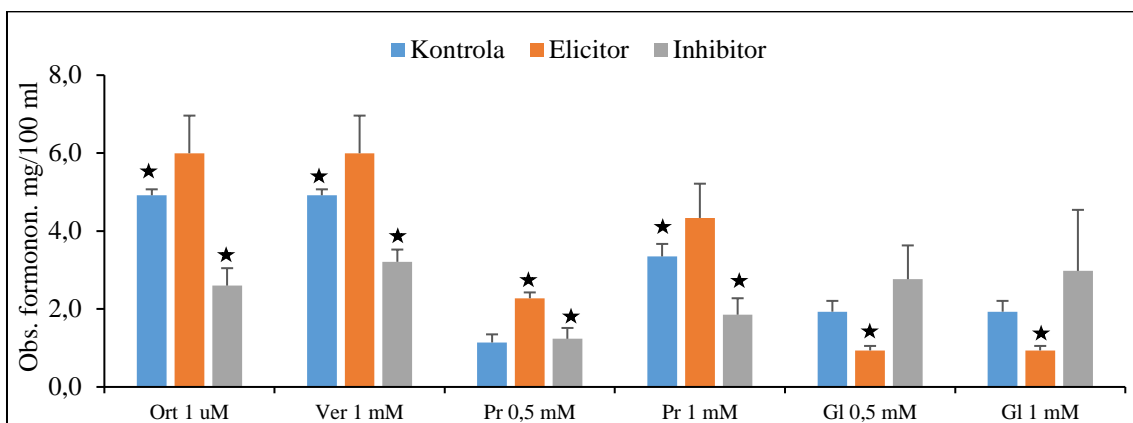
Graf 3.5.a Vliv inhibitorů na obsah formononetinu v mediu v mg/100 ml



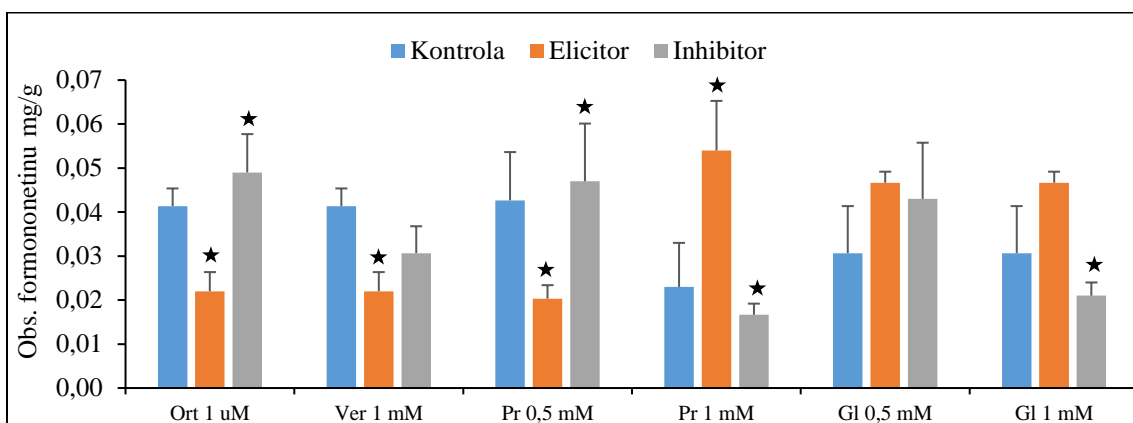
Graf 3.5.b Vliv inhibitorů na obsah formononetinu v sušině v mg/g



Graf 3.5.c Vliv inhibitorů na obsah formononetinu v mediu v mg/100 ml

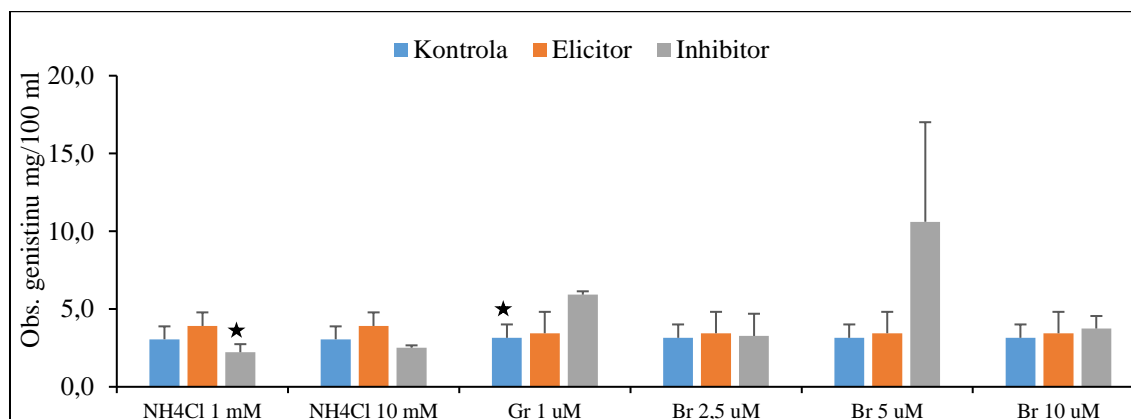


Graf 3.5.d Vliv inhibitorů na obsah formononetinu v sušině v mg/g

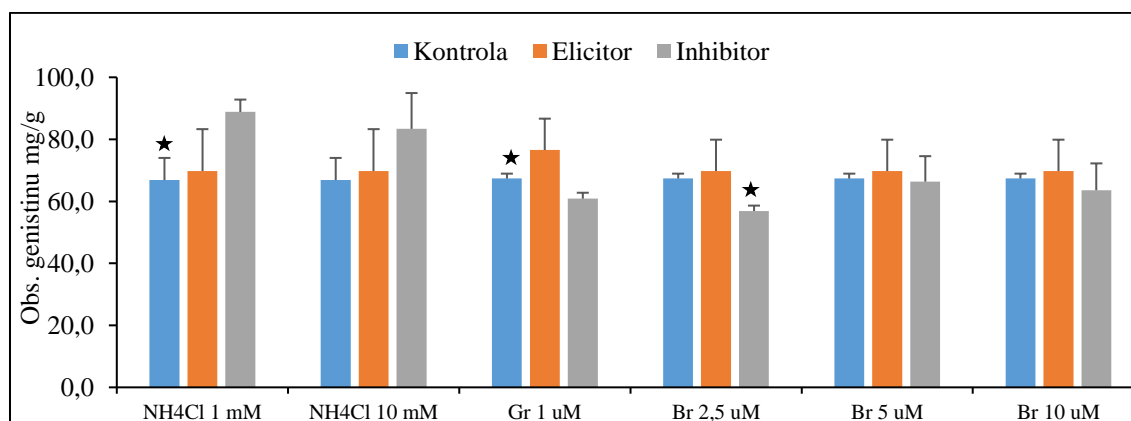


## 5.2.2. Vliv inhibitorů na transport isoflavonů v *G. tinctoria*.

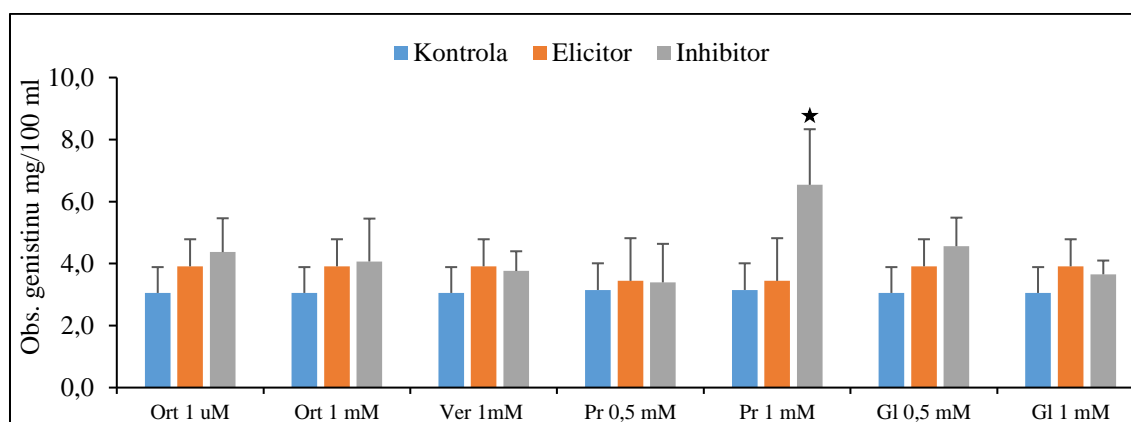
Graf 4.1.a Vliv inhibitorů na obsah genistinu v mediu v mg/100 ml



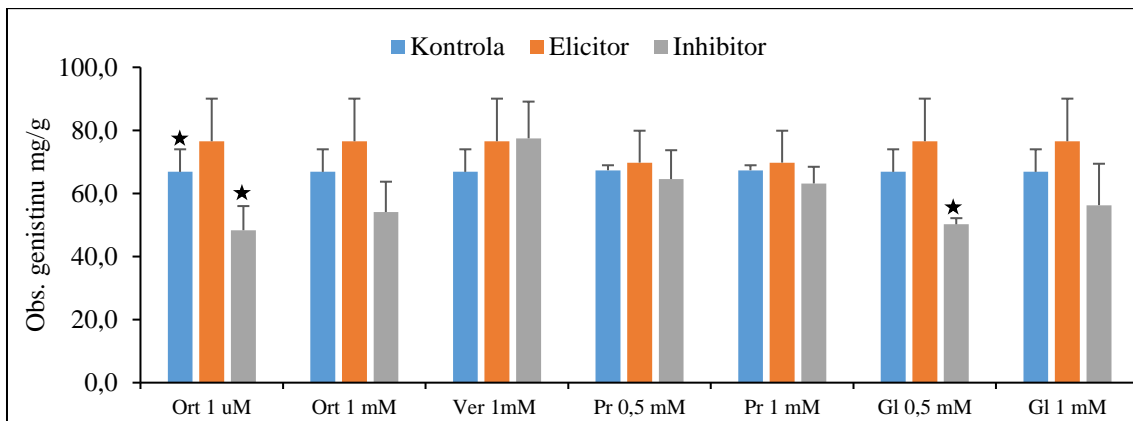
Graf 4.1.b Vliv inhibitorů na obsah genistinu v sušině v mg/g



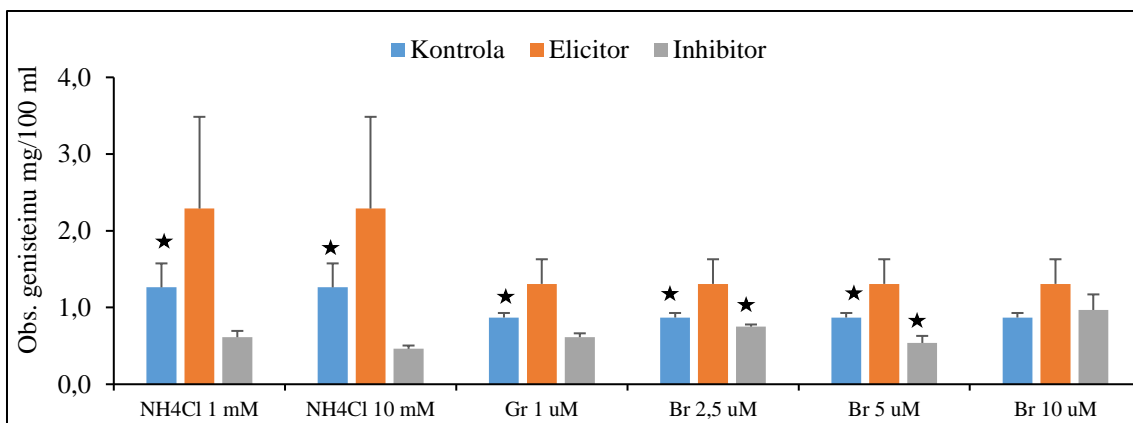
Graf 4.1.c Vliv inhibitorů na obsah genistinu v mediu v mg/100 ml



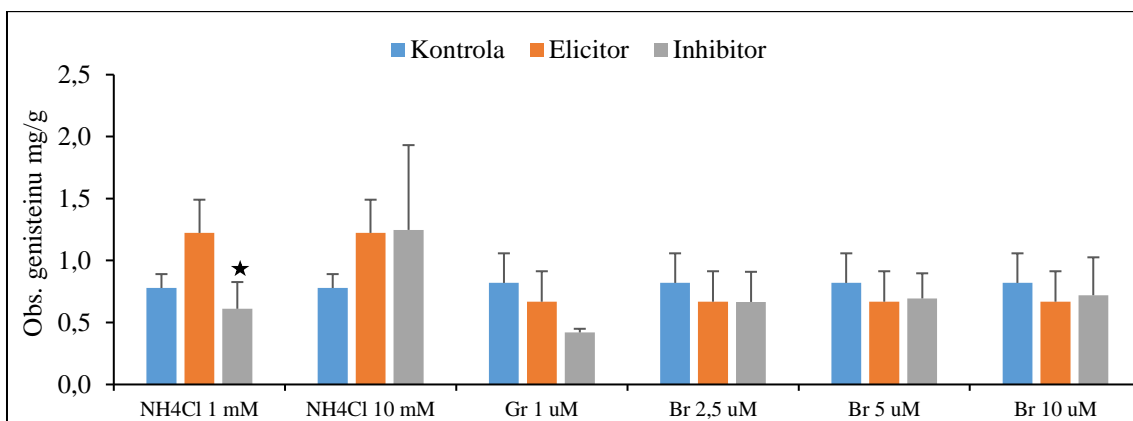
Graf 4.1.d Vliv inhibitorů na obsah genistinu v sušině v mg/g



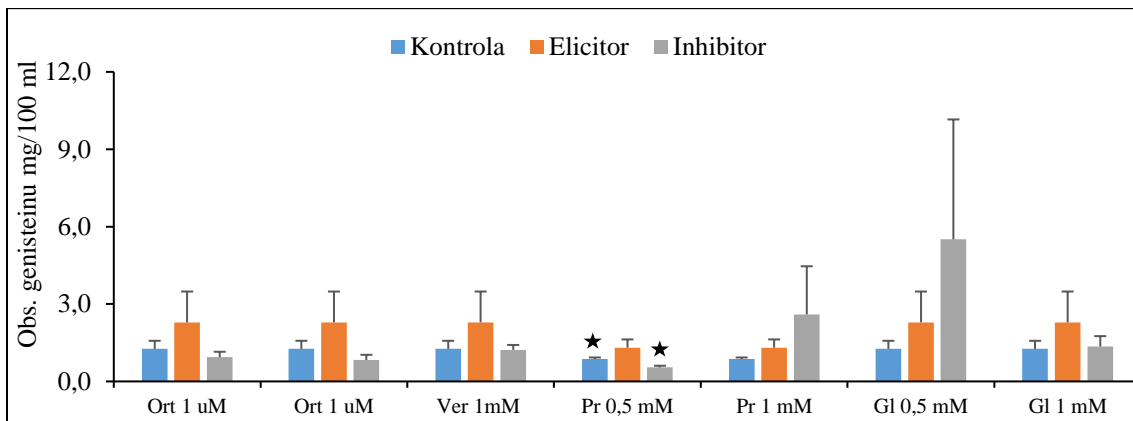
Graf 4.2.a Vliv inhibitorů na obsah genisteinu v mediu v mg/100 ml



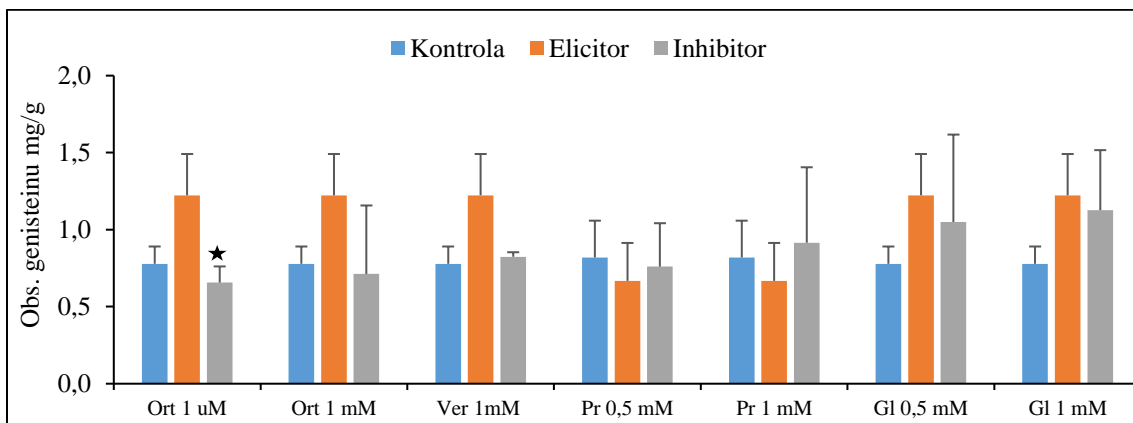
Graf 4.2.b Vliv inhibitorů na obsah genisteinu v sušině v mg/g



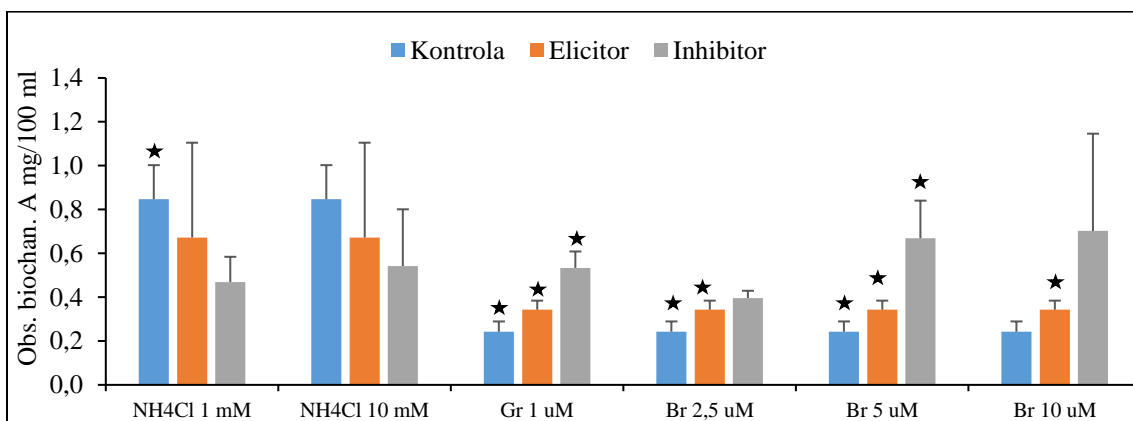
Graf 4.2.c Vliv inhibitorů na obsah genisteinu v mediu v mg/100 ml



Graf 4.2.d Vliv inhibitorů na obsah genisteinu v sušině v mg/g

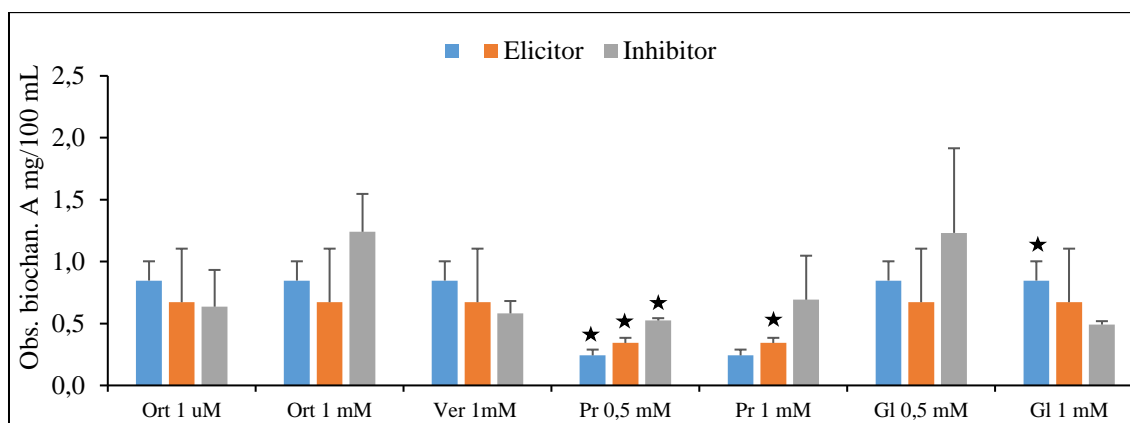


Graf 4.3.a Vliv inhibitorů na obsah biochaninu A v mediu v mg/100 ml

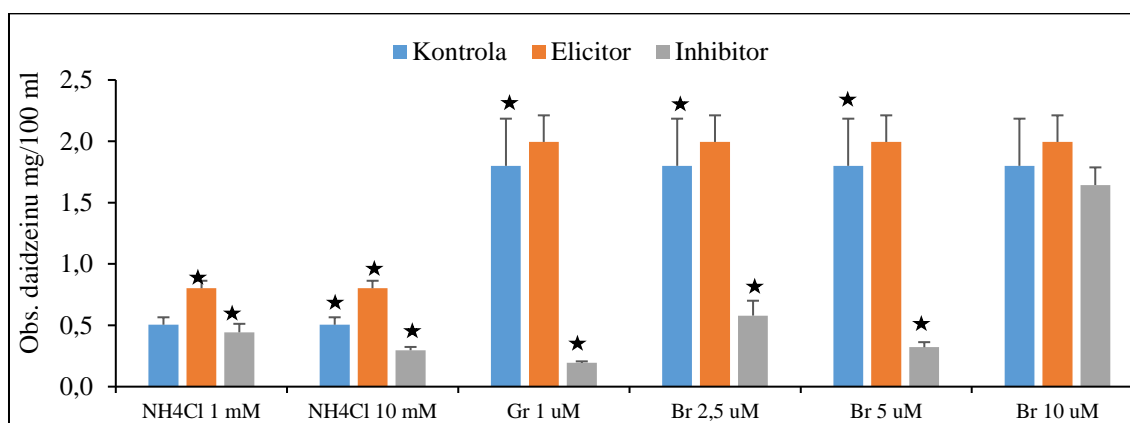




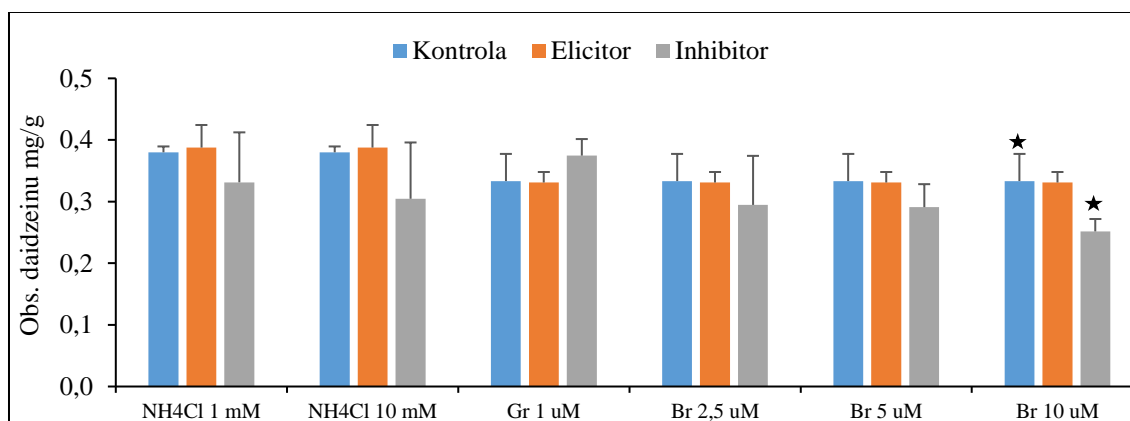
Graf 4.3.b Vliv inhibitorů na obsah biochaninu A v mediu v mg/100 ml



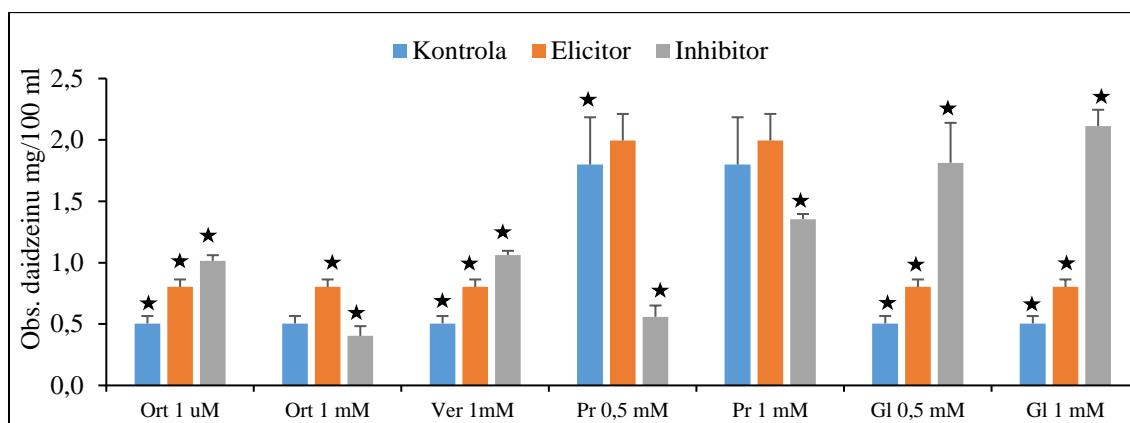
Graf 4.4.a Vliv inhibitorů na obsah daidzeinu v mediu v mg/100 ml



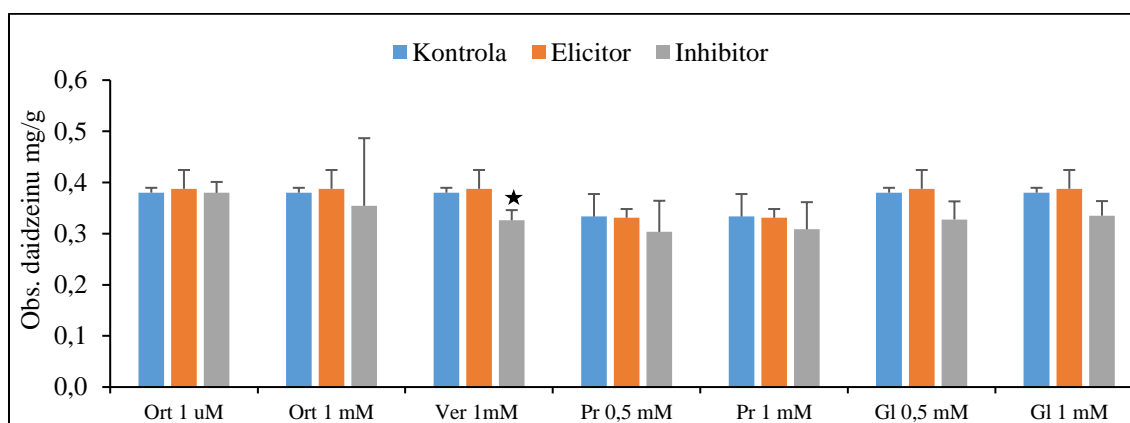
Graf 4.4.b Vliv inhibitorů na obsah daidzeinu v sušině v mg/g



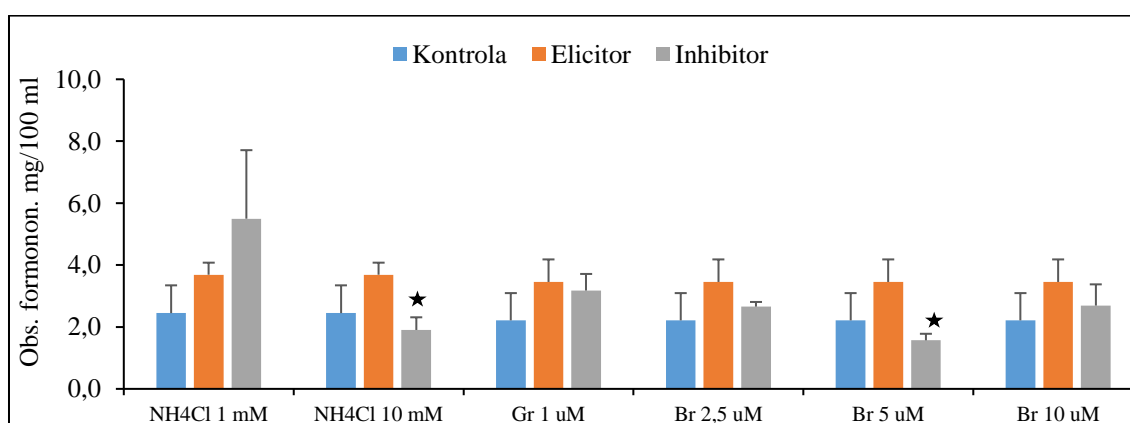
Graf 4.4.c Vliv inhibitorů na obsah daidzeinu v mediu v mg/100 ml



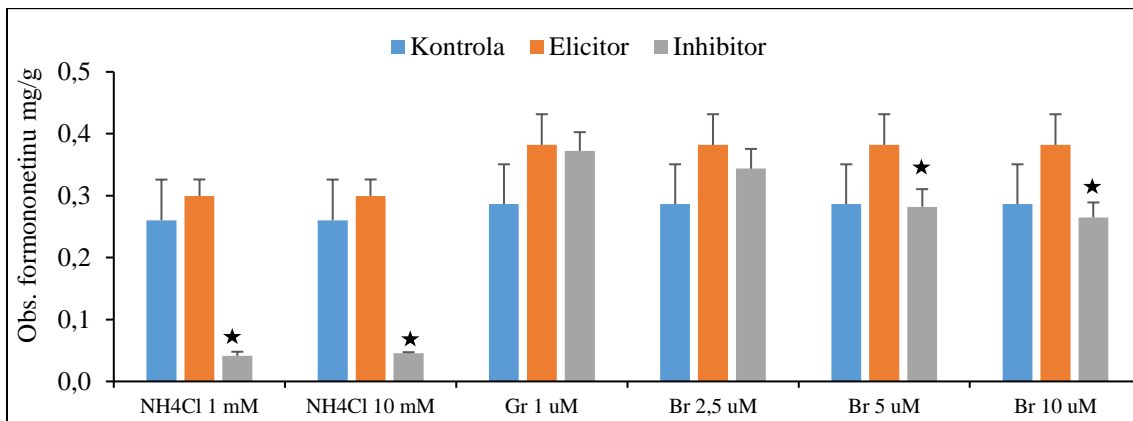
Graf 4.4.d Vliv inhibitorů na obsah daidzeinu v sušině v mg/g



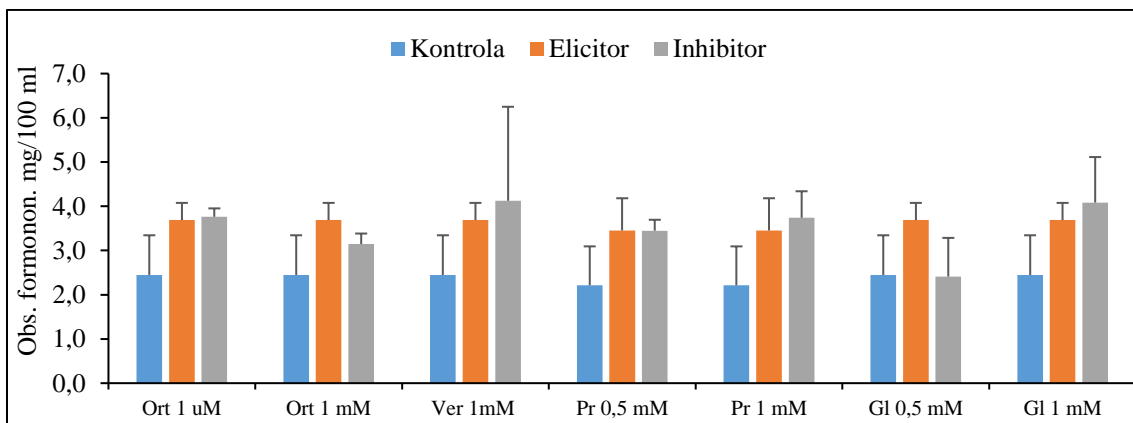
Graf 4.5.a Vliv inhibitorů na obsah formononetinu v mediu v mg/100 ml



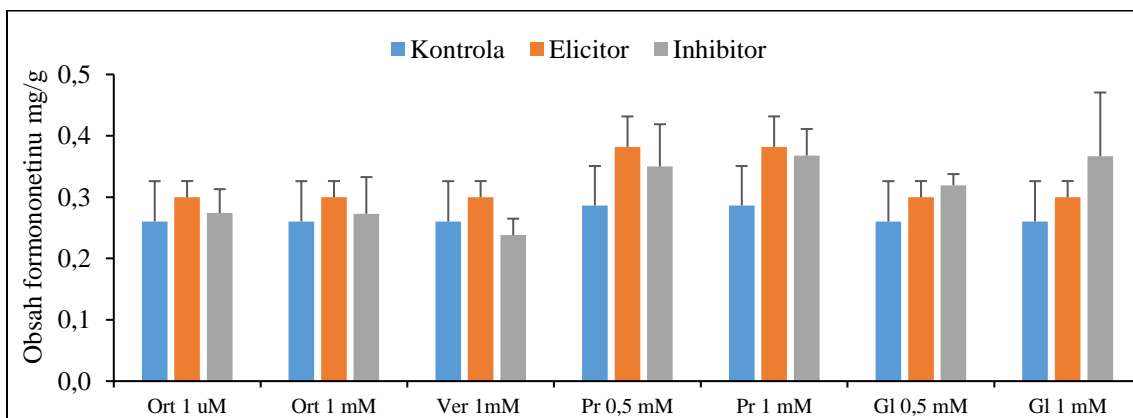
Graf 4.5.b Vliv inhibitorů na obsah formononetinu v sušině v mg/g



Graf 4.5.c Vliv inhibitorů na obsah formononetinu v mediu v mg/100 ml



Graf 4.5.d Vliv inhibitorů na obsah formononetinu v sušině v mg/g



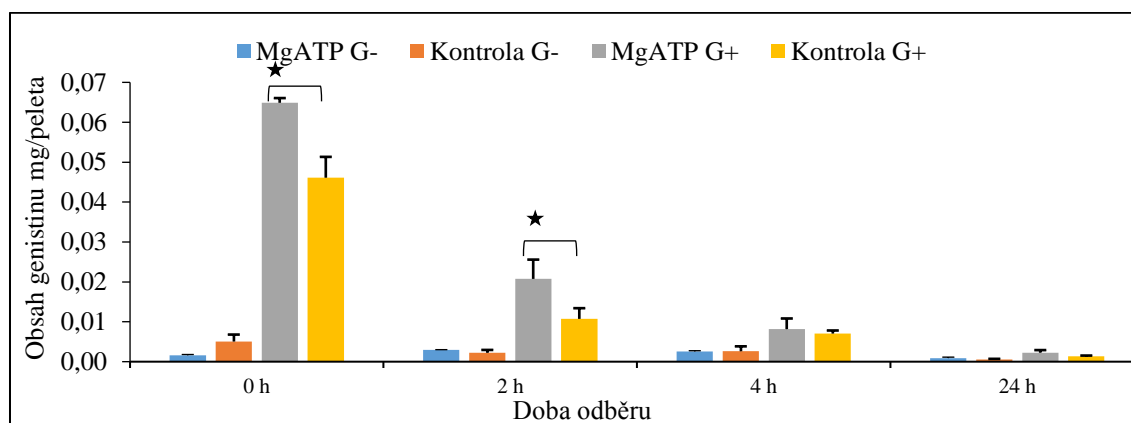
### 5.3. Transport genistinu přes vakuolární membránu

K peletě vakuol izolovaných ze suspenzní kultury *T. pratense* byly přidány různé roztoky obsahující látky ovlivňující transport: MgATP, bafilomycin A1 (Baf) a DCCD. Jejich vliv byl sledován jednak u vzorků bez genistinu (G-) nebo s přidaným genistinem (G+).

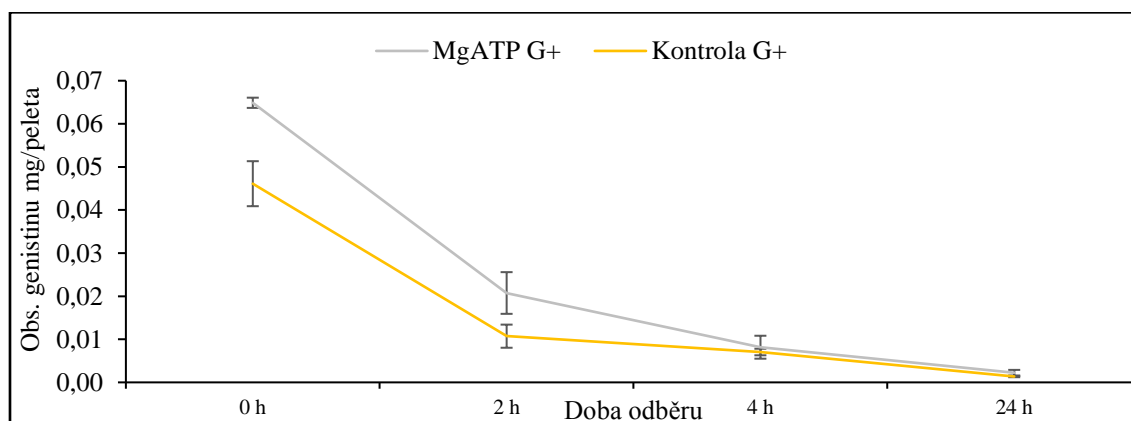
Sloupce označené hvězdičkou označují statisticky významný rozdíl mezi vzorky s látkou ovlivňující transport a kontrolou.

#### 5.3.1. Vliv MgATP na transport genistinu

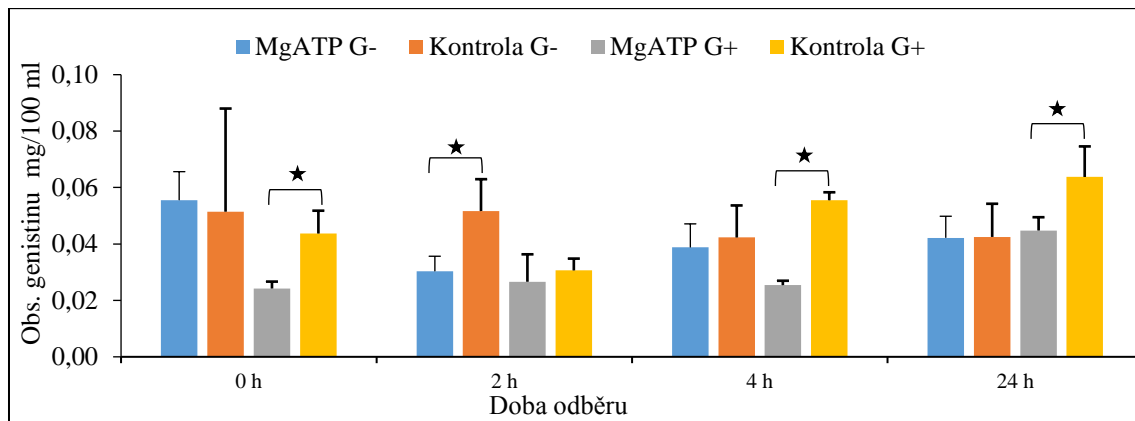
Graf 5.1.1.a Vliv MgATP na obsah genistinu ve vakuolách v mg/peleta



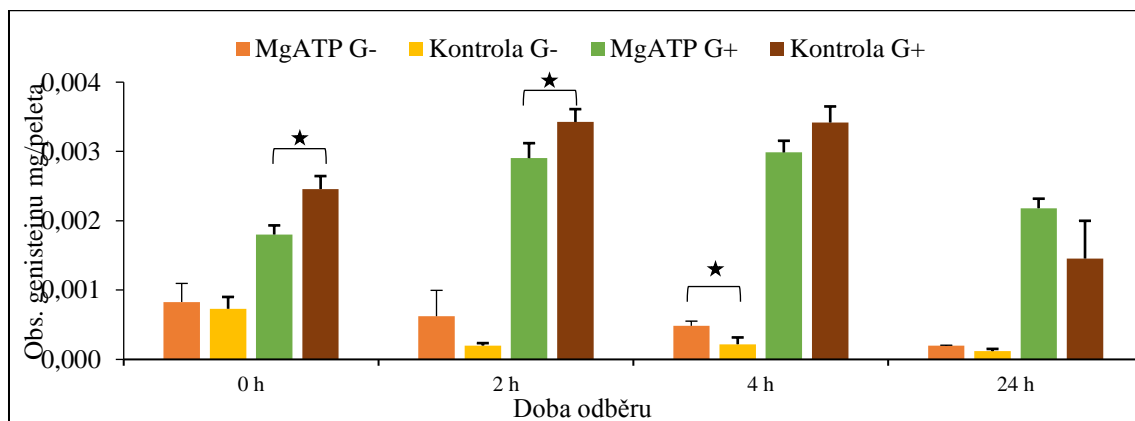
Graf 5.1.1.b Vliv MgATP na obsah genistinu ve vakuolách v mg/peleta



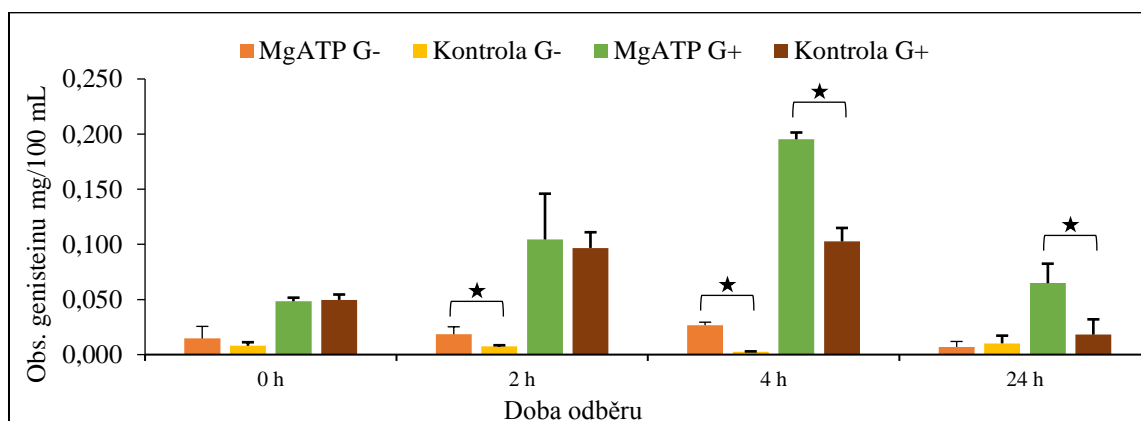
Graf 5.1.2. Vliv MgATP na obsah genistinu v supernatantu v mg/100 ml



Graf 5.1.3 Vliv MgATP na obsah genisteinu ve vakuolách v mg/peleta

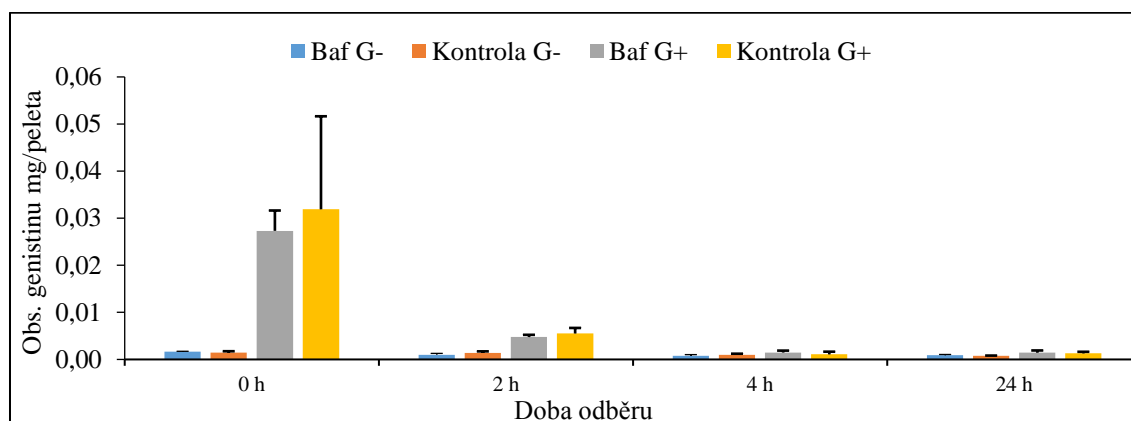


Graf 5.1.4. Vliv MgATP na obsah genisteinu v supernatantu v mg/100 ml

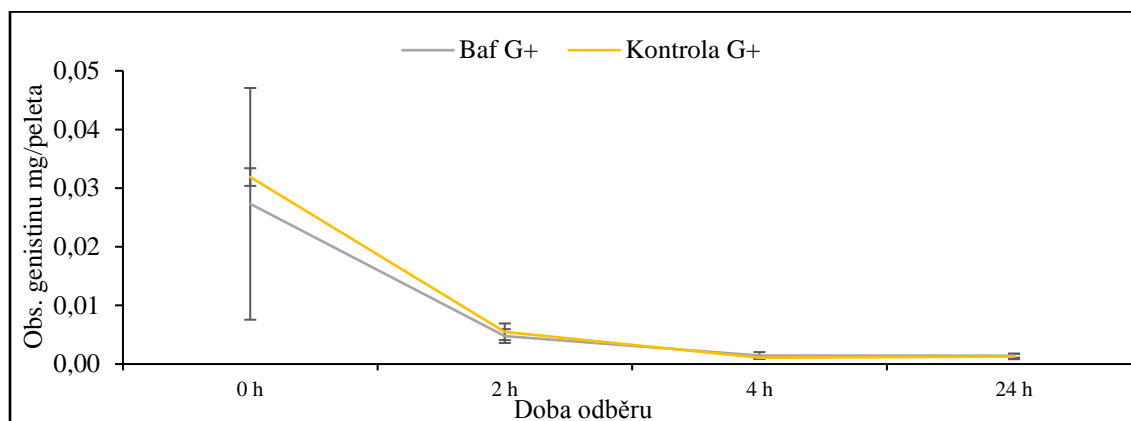


### 5.3.2. Vliv bafilomycinu A1 na transport genistinu

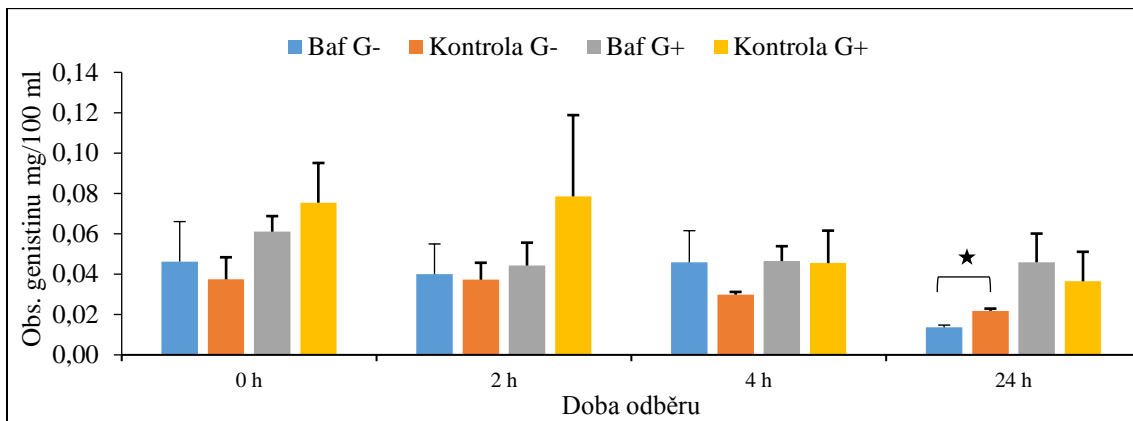
Graf 5.2.1.a Vliv bafilomycinu na obsah genistinu ve vakuolách v mg/peleta



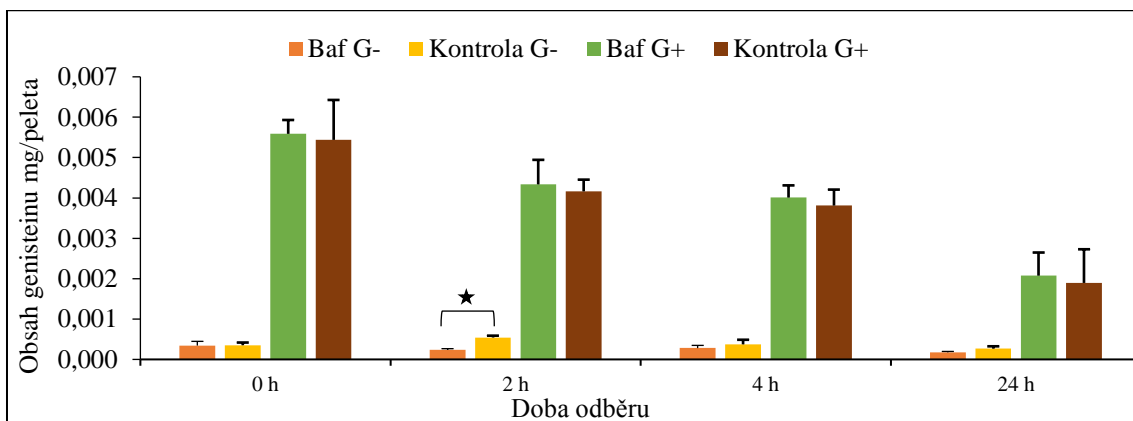
Graf 5.2.1.b Vliv bafilomycinu na obsah genistinu ve vakuolách v mg/peleta



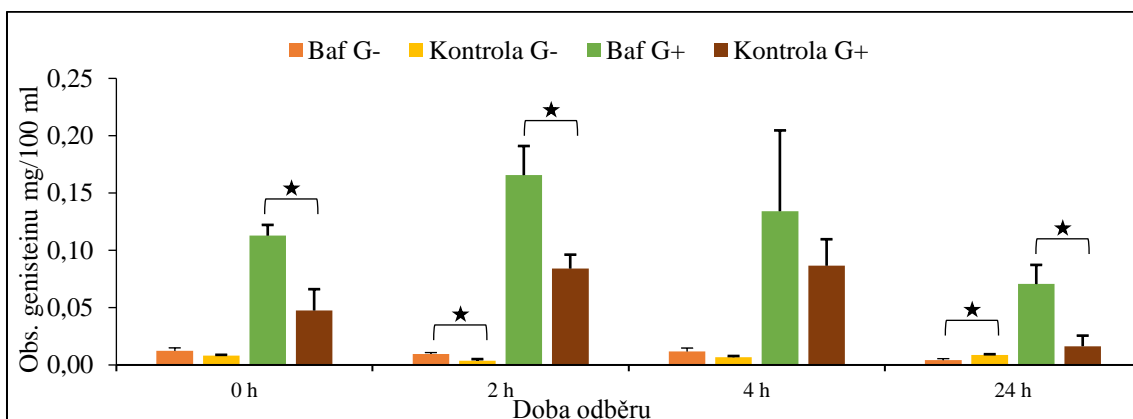
Graf 5.2.2. Vliv bafilomycinu na obsah genistinu v supernatantu v mg/100 ml



Graf 5.2.3. Vliv bafilomycinu na obsah genisteinu ve vakuolách v mg/peleta

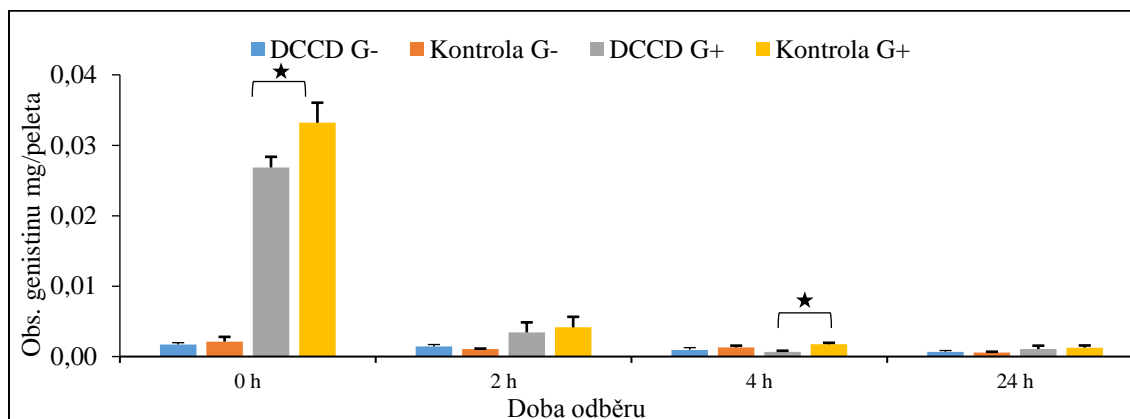


Graf 5.2.4 Vliv bafilomycinu na obsah genisteinu v supernatantu v mg/100 ml

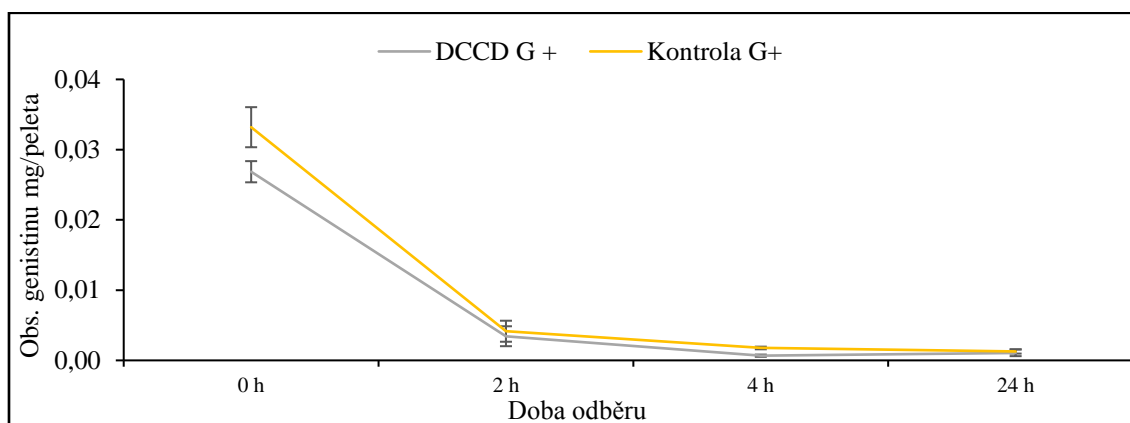


### 5.3.3. Vliv DCCD na transport genistinu

Graf 5.3.1.a Vliv DCCD na obsah genistinu ve vakuolách v mg/peleta

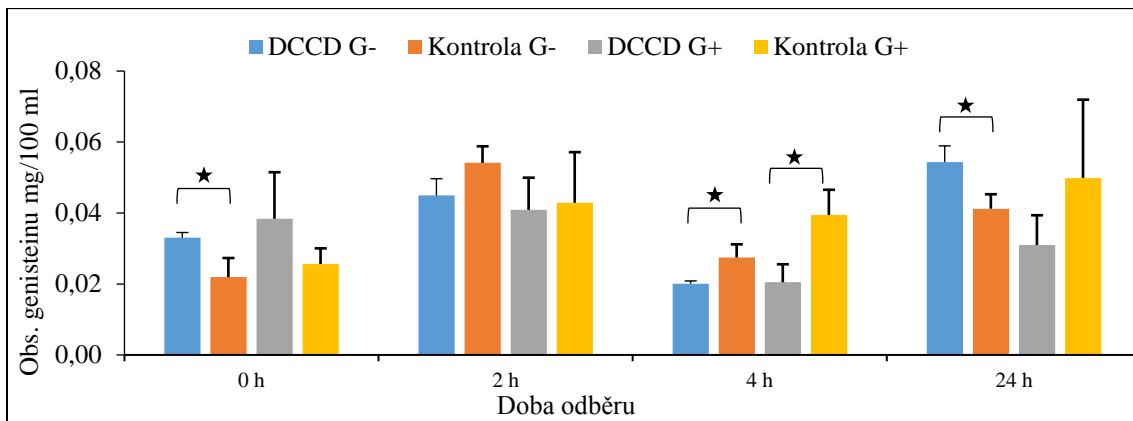


Graf 5.3.1.b Vliv DCCD na obsah genistinu ve vakuolách v mg/peleta

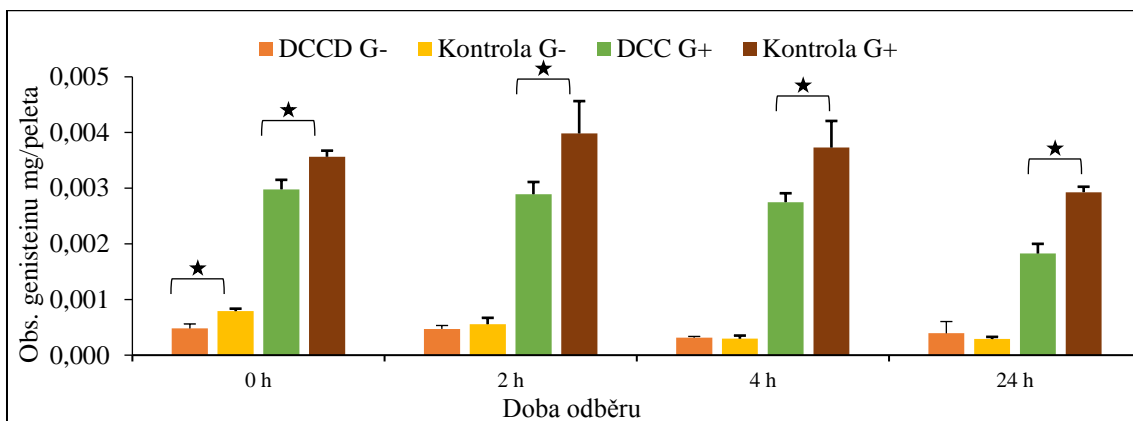




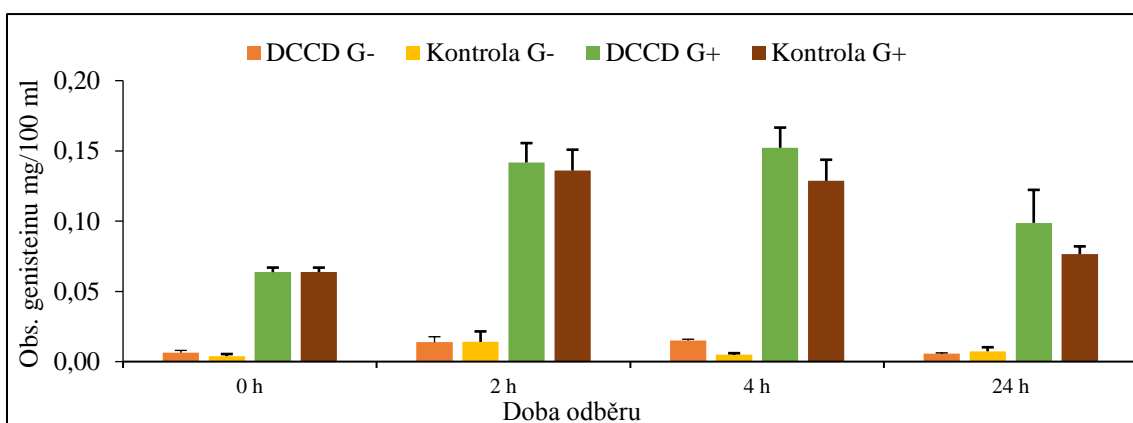
Graf 5.3.2. Vliv DCCD na obsah genisteinu v supernatantu v mg/100 ml



Graf 5.3.1 Vliv DCCD na obsah genisteinu ve vakuolách v mg/peleta



Graf 5.3.4. Vliv DCCD na obsah genisteinu v supernatantu v mg/100 ml



## 6. DISKUSE

### 6.1. Diskuse k elicitaci suspenzních kultur

#### 6.1.1. Vliv sloučenin vanadu na obsah isoflavonů v *T. pratense*.

##### Genistin

Statisticky významné zvýšení obsahu genistinu oproti kontrole o 137 % bylo v mediu naměřeno po elicitaci E1 o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a 24hodinové kultivaci. Tento elicitor o stejné koncentraci zvýšil obsah genistinu i po 48 hodinách, ale nesplňoval kritéria stanovené hladiny významnosti. E2 o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  také zvýšil obsah genistinu po 24 a 48 hodinách, nicméně ani jeden nárůst nebyl statisticky významný (Graf 1.1.a). V sušině kultury *T. pratense* nebyl pozorován statisticky významný rozdíl obsahu genistinu oproti kontrole, která měla po 24 hodinách vyšší koncentraci isoflavonu při srovnání s elicitovanými vzorky. Po elitaci 1  $\mu\text{M}$  roztokem E2 došlo po 48 hodinách ke statisticky významnému snížení množství genistinu v sušině (Graf 1.1.b).

##### Genistein

Statisticky významné snížení obsahu genisteinu v mediu bylo zaznamenáno po aplikaci 1  $\mu\text{M}$  roztoku E1 a 48hodinové kultivaci. Po 48hodinové elicitaci roztokem E2 (10  $\mu\text{M}$ ) došlo také k významnému snížení obsahu genisteinu v mediu. Nárůst obsahu genisteinu po aplikaci elicitorů nebyl statisticky významný. (Graf 1.2.a). Obsah genisteinu významně vzrostl v sušině po použití obou koncentrací elicitoru E1 v obou sledovaných časových intervalech. Koncentrace 1  $\mu\text{M}$  zvýšila výrazně obsah genisteinu po 48 hodinách, zatímco koncentrace 10  $\mu\text{M}$  už po 24 hodinách, kdy došlo k desetkrát většímu nárůstu obsahu genisteinu oproti kontrole. Elicitor E2 (10  $\mu\text{M}$ ) zvýšil po 24 hodinách množství tohoto isoflavonu v sušině podobně jako elicitor E1 (1  $\mu\text{M}$ ) (Graf 1.2.b).

##### Biochanin A

U biochaninu A nastal statisticky významný nárůst jeho obsahu v mediu po aplikaci roztoků E2, kdy roztok o koncentraci 1  $\mu\text{M}$  po 48 hodinách zvýšil obsah více než 10  $\mu\text{M}$  roztok E2 a také než 10  $\mu\text{M}$  roztok E1. Jistý nárůst v mediu byl pozorovatelný i u E1 (1  $\mu\text{M}$ , 24 h), ale nebyl

statisticky významný (1.3.a). Vyšší koncentrace biochaninu A v sušině byly naměřeny po 24hodinové kultivaci s E1 i E2. Nejvyšší statisticky významný rozdíl mezi elicitorem a kontrolou byl zaznamenán po aplikaci roztoku E2 (10  $\mu$ M). Působením elicitoru E2 došlo k nárůstu množství isoflavonu i po 48 hodinách, ale rozdíly mezi elicitovanými a kontrolními vzorky nebyly statisticky významné (Graf 1.3.b).

### **Daidzein**

Podobně jako u genistinu došlo k statisticky významnému nárůstu přítomnosti daidzeinu o 135 % v mediu pouze po 24hodinové kultivaci s roztokem E1 (10  $\mu$ M) (Graf 1.4.a). V sušině byl pozorován statisticky významný pokles daidzeinu po 24 hodinách po aplikaci 1  $\mu$ M roztoku E2 a po 48hodinové kultivaci s elicitory E1 (10  $\mu$ M) a E2 (1  $\mu$ M; 10  $\mu$ M) (Graf 1.4.b).

### **Formononetin**

Po použití elicitorů E1 a E2 došlo u všech elicitovaných kultur po 24hodinové kultivaci k poklesu koncentrace formononetinu v mediu oproti kontrole. Žádný rozdíl ale nebyl statisticky významný. Jediný statisticky významný rozdíl byl nárůst obsahu formononetinu o 44 % pozorovaný po aplikaci 1  $\mu$ M roztoku E1 a 48hodinové kultivaci (Graf 1.5.a). V sušině bylo pozorováno statisticky významné zvýšení obsahu formononetinu po použití roztoku E1 (1  $\mu$ M) a E2 (10  $\mu$ M) a kultivaci 24 hodin. Nárůst jeho množství byl naměřen i po přidání E1 (10  $\mu$ M, 24 h), ale výsledek nebyl statisticky významný. Po 48 hodinách působení E1 v obou koncentracích došlo k statisticky významnému poklesu obsahu formononetinu v sušině oproti kontrole (Graf 1.5.b).

## **6.1.2. Vliv sloučenin vanadu na obsah isoflavonů v *G. tinctoria***

### **Genistin**

Významný nárůst obsahu genistinu v mediu byl pozorován po 24hodinové elicitaci roztoky E1 (1  $\mu$ M: nárůst o 158 %; 10  $\mu$ M: 139 %) a po 48hodinové elicitaci roztokem E1 (10  $\mu$ M, 123 %). Roztok E2 významně neovlivnil obsah genistinu v mediu (Graf 2.1.a). Statisticky významný nárůst množství genistinu oproti kontrole byl naměřen v sušině pouze po aplikaci roztoku E1 (10  $\mu$ M) a 48hodinové kultivaci (Graf 2.1.b).

## **Genistein**

Nejvyšší koncentrace genisteinu byla v mediu naměřena po 24hodinové kultivaci s E1 (1  $\mu\text{M}$ ), kdy byl nárůst isoflavonu oproti kontrole statisticky významný. Další použité koncentrace elicitorů se neprojevíly ve sledovaných časech statisticky významnými rozdíly obsahu genisteinu (2.2.a). V sušině nebyl nárůst obsahu genisteinu po 24hodinové kultivaci roztokem E1 o koncentraci 1  $\mu\text{M}$  statisticky významný. U ostatních koncentrací elicitorů a sledovaných časů také nebyl pozorován statisticky významný nárůst obsahu tohoto isoflavonu (2.2.b).

## **Biochanin A**

U biochaninu A nebylo pozorováno statisticky významné zvýšení jeho obsahu oproti kontrole v mediu i přes jistý nárůst po aplikaci E1 (10  $\mu\text{M}$ , 24 h). Po 48hodinové elicitaci E2 (1  $\mu\text{M}$ ) byl zaznamenán významný pokles koncentrace tohoto isoflavonu (Graf 2.3.). Obsah biochaninu A v sušině *G. tinctoria* byl mimo mez detekovatelnosti.

## **Daidzein**

I přes zvýšený obsah daidzeinu u některých extraktů získaných z media elicitem ošetřených suspenzí, nebylo pozorováno statisticky významné uvolnění tohoto isoflavonu po aplikaci elicitorů E1 a E2 (Graf 2.4.a). V suspenzní kultuře, kde byl použit roztok E1 (1  $\mu\text{M}$ ) byl pozorován statisticky významný nárůst obsahu daidzeinu v sušině o 96 % oproti kontrole po 24 hodinách. Po 24hodinové aplikaci elicitoru E2 (10  $\mu\text{M}$ ) byla také naměřena vyšší koncentrace daidzeinu, ale nebyla statisticky významná (2.4.b).

## **Formononetin**

Statisticky významné uvolnění formononetinu do media oproti kontrole bylo pozorováno po 24 hodinách elicitace s roztoky E1 a 48 hodinách s E2 (1  $\mu\text{M}$ ). Aplikace elicitoru E2 (10  $\mu\text{M}$ , 24 h) způsobila statisticky významný pokles obsahu tohoto isoflavonu (Graf 2.5.a). V sušině nebyl pozorován statisticky významný nárůst množství formononetinu oproti kontrole (Graf 2.5.b).

### 6.1.3. Shrnutí

U *T. pratense* došlo po aplikaci elicitoru E1 k statisticky významnému nárůstu všech sledovaných isoflavonů v mediu s výjimkou genisteinu. Vyšší obsah metabolitů ale závisel na použité koncentraci elicitoru a době kultivace. Po aplikaci 1 μM roztoku E1 bylo v živném mediu zvýšené množství formononetinu po 48 hodinách. Použití 10 μM elicitoru E1 způsobilo nárůst genistinu a daidzeinu po 24 hodinách, zatímco biochaninu A po 48 hodinách. Statisticky významný nárůst nastal u biochaninu A i po přidání 1 a 10 μM elicitoru E2 a 48hodinové kultivaci. V sušině byl naměřen zvýšený obsah genisteinu po aplikaci roztoku E1 (1 μM i 10 μM) u obou intervalů odběru a také u roztoku E2 (10 μM, 24 h). Elicitor E2 o stejné koncentraci (10 μM) a době kultivace (24 h) způsobil i nárůst obsahu formononetinu a biochaninu A. Elicitor E1 pak zvýšil obsah formononetinu a biochaninu i po aplikaci 1 μM roztoku a kultivaci 24 hodin. Po aplikaci některých elicitorů a statisticky významnému nárůstu obsahu isoflavonů v mediu bylo v sušině příslušných vzorků pozorováno snížené množství těchto isoflavonů. Tento jev nastal např. u genistinu (E1, 10 μM, 24 h), daidzeinu (E1, 10 μM, 24 h) nebo formononetinu (E1, 1 μM, 48 h). Naopak vyšší obsah isoflavonů v sušině než v mediu oproti kontrole byl zaznamenán u genisteinu (E1, 10 μM, 48 h; E2, 1 μM, 48 h) nebo formononetinu (E2, 10 μM, 48 h). Statisticky významný rozdíl v obsahu isoflavonů oproti kontrole ale nastal většinou pouze u media nebo u sušiny. Také poměr obsahu isoflavonů v kontrolních a elicitovaných vzorcích se lišil mezi mediem a sušinou. U biochaninu A (E1, 1 μM, 24 h) došlo ke zvýšení jeho obsahu jak v mediu, tak v sušině.

V mediu získaném po elicitaci suspenzní kultury *G. tinctoria* byl naměřen statisticky významný nárůst genistinu a formononetinu po aplikaci 1 a 10 μM elicitoru E1 a 24hodinové kultivaci. V mediu, kde byl použit elicitor E1 o koncentraci 1 μM, došlo po 24 hodinách ke statisticky významnému zvýšení obsahu genisteinu. Elicitor E2 pak způsobil statisticky významný nárůst u formononetinu po 24 hodinách (koncentrace 10 μM) a 48 hodinách (1 μM). V sušině bylo pozorováno vyšší množství genisteinu a daidzeinu naměřené po aplikaci 1 μM roztoku elicitoru E1 a následné 24 hodinové kultivaci. Stejný elicitor pak způsobil statisticky významný nárůst genistinu po 48 hodinách v koncentraci 10 μM. U *G. tinctoria* se statisticky významné zvýšení koncentrace isoflavonů v mediu oproti kontrole projevilo i nárůstem obsahu v sušině u genistinu (E1, 1 μM, 24 h; 10 μM, 48 h), daidzeinu (E1, 1 μM, 24 h) nebo genisteinu (E1,

1  $\mu\text{M}$ , 24 h). Ve většině případů ale nebyl rozdíl v druhém typu vzorků statisticky významný. U formononetinu se statisticky významný nárůst obsah v mediu po elicitaci roztoky E1 (1  $\mu\text{M}$ , 24 h) a E2 (1  $\mu\text{M}$ , 48 h) projevil statisticky nevýznamným poklesem v sušině.

Primárním cílem elicitace suspenzních kultur *T. pratense* a *G. tinctoria* sloučeninami vanadu bylo nalézt takovou koncentraci, která by zvýšila obsah vybraných isoflavonů v mediu. Vhodný elicitor byl následně využit pro transportní experimenty v další části práce. U kultur *T. pratense* a *G. tinctoria* byla pozornost zaměřena na genistin, jeho aglykon genistein a 4'-*O*-methyl analog biochanin A. Dále byl pozorován aglykon daidzein a jeho derivát formononetin.

Vlivem sloučenin vanadu na rostlinný organismus se v minulosti zabývala řada prací, a to především z hlediska inhibice růstu hospodářských plodin a neutralizace tohoto působení, např. chelatací.<sup>197</sup> Těžké kovy, mezi které vanad patří, mohou přes autooxidaci nebo Fentonovu reakci vytvářet volné radikály, mohou se vázat na strukturální molekuly buněk nebo vytěšňovat jiné ionty z jejich vazeb na biomolekuly.<sup>198</sup> Sloučeniny vanadu v oxidačním stupni pět mohou být redukovány některými enzymy závislými na NAD(P)H (např. lipoyldehydrogenasa) na sloučeniny ve stupni čtyři za tvorby  $\text{H}_2\text{O}_2$  a následně hydroxylového radikálu.<sup>199</sup> Z hlediska ovlivnění biomolekul se  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  společně s niklem podílel na inhibici biosyntézy polárních lipidů u *Pinus banksiana*, které jsou součástí membrán.<sup>200</sup> U  $\text{VOSO}_4$  byla popsána hydroxylace deoxyguaninu s následným poškozením DNA tvorbou zlomů.<sup>201</sup>

Působení vanadu na rostliny z čeledi *Fabaceae* bylo sledováno u hydroponicky pěstovaného *P. vulgaris*. Aplikace  $\text{VOSO}_4$  vedla k úbytku hmotnosti a k hromadění vanadu především v kořenech a k poklesu obsahu vápníku.<sup>202, 203</sup> Oproti tomu vanadát neměl na vegetativní vývoj *P. vulgaris* negativní vliv.<sup>204</sup> U *Cicer arietinum* způsobil naopak  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  poškození DNA u jedinců citlivých na vanad, zatímco u odolných rostlin se negativní vliv na DNA neprojevil. Oba typy rostlin měly vyšší aktivitu antioxidantních enzymů a snížený obsah chlorofylu a proteinů. V mediu byla také pozorována zvýšená vodivost způsobená patrně uvolněním elektrolytů do okolního prostředí následkem poškození membrán. To bylo dáno do souvislosti se zvyšující se koncentrací vanadu.<sup>205</sup> U některých organismů, jako jsou kvasinky *Hansenula polymorpha* vedlo přidání orthovanadátu sodného do media také k nárůstu antioxidantních enzymů. Na rozdíl od síranu měďnatého však přidání vanadátu nevedlo k poškození buněčných membrán.<sup>206</sup>

Tvorba ROS pomocí sloučenin vanadu a následná reakce s membránovými lipidy může vést k biosyntéze oxylipinů. Oxylipiny působí jako další signály vedoucí k zahájení obranných

mechanismů buňky s následnou produkcí příslušných sekundárních metabolitů.<sup>207</sup> Použití sloučenin vanadu jako elicitoru bylo studováno např. u *C. roseus*, kde  $\text{VOSO}_4$  zvýšil obsah ajmalicinu a catharanthinu<sup>208</sup>, taxolu v *Taxus baccata*<sup>209</sup> nebo nikotinu u *N. tabacum*, cv. *Virginiana*, ale ne u cv. *Burley*.<sup>210</sup>  $\text{VOSO}_4$  byl u *N. tabacum* použit ve dvou koncentracích (40 a 80  $\mu\text{M}$ ). Účinek těchto elicitorů pak závisel nejen na zmíněném typu rostliny, případně orgánu, ale i použité koncentraci. Na suspenzní kultuře *Panax ginseng* bylo také otestováno několik různých sloučenin vanadu o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ .  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  společně s  $\text{NaVO}_3$  způsobily nejvyšší nárůst obsahu ginsenosidů v sušině oproti kontrole, zatímco  $\text{VOSO}_4$  dosahoval pouze 65% účinnosti  $\text{NaVO}_3$ . Obsah saponinů v mediu pozorován nebyl.<sup>211</sup>

Na samotné elicitaci a uvolňování sekundárních metabolitů se podílí řada faktorů, mezi které patří samotný charakter elicitoru, jeho koncentrace nebo intenzita a doba, po kterou působí. Roli hraje také typ kultury a podmínky, za kterých je pěstována.<sup>33</sup> U některých kultur způsobil elicitor vyšší obsah látek v buňkách i v mediu, zatímco u jiných došlo k exportu látek beze změny obsahu v sušině.<sup>212</sup> Produkce isoflavonů v *in vitro* kulturách *G. tinctoria* byla sledována i v porovnání s volně rostoucími rostlinami. Při nastavení vhodných podmínek produkovaly *in vitro* kultury více sekundárních metabolitů.<sup>72</sup> Na tvorbu sekundárních látek také mohlo mít vliv i stáří kultury, kdy ve zmíněné studii byly použity mladé kalusy, zatímco suspenzní kultury *T. pratense* a *G. tinctoria* pro elicitační a následné transportní experimenty byly odvozeny ze starších kalusů. Růst buněk a tvorba látek pak odpovídá určité růstové křivce. Kromě těchto změn, které nastávají v průběhu jednoho cyklu, mohou být kultury ovlivněny i střídáním intervalu světlo/tma. U genů ovlivňujících fotosyntézu byla nalezena závislost na cirkadiánním rytmu. Některé geny fenyylpropanoidové dráhy, které syntetizují látky chránící rostlinu před světlem, měly nejvyšší aktivitu před rozedněním.<sup>213</sup> V rámci provedené elicitace byly brány pouze dva časové intervaly a není tak možné určit dlouhodobější vliv.

Pro transportní experimenty u *T. pratense* byl vybrán 10  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , kde došlo po 24 hodinách k statisticky významnému nárůstu genistinu a daidzeinu v živném mediu. Při této koncentraci také došlo k určitému uvolnění genisteinu, ale jeho statisticky významný nárůst jeho množství byl naměřen v sušině. Pro výzkum transportních mechanismů u *G. tinctoria* byl použit 1  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{VO}_3$ . V této koncentraci nastalo po 24 hodinách statisticky významné zvýšení obsahu genistinu, genisteinu a formononetinu v mediu a v případě dalšího isoflavonu, daidzeinu, také v sušině.

## 6.2. Diskuse k inhibici transportu isoflavonů do media

### 6.2.1. Vliv inhibitorů na transport isoflavonů v *T. pratense*.

#### Genistin

Po aplikaci inhibitorů došlo k poklesu obsahu genistinu v mediu v případě  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM), brefeldinu A (2,5  $\mu\text{M}$ ) a glibenklamidu (1 mM) (Graf 3.1.a; 3.1.c). V sušině byl pozorován statisticky významný nárůst koncentrace genistinu po ošetření gramicidinem, brefeldinem A (2,5 a 5  $\mu\text{M}$ ), glibenklamidem (1 mM), orthovanadátem a probenecidem (0,5 mM) (Graf 3.1.b; 3.1.d). Přenos genistinu do media byl patrně závislý na ABC transportérech ze skupiny ABCC/MRP. Pokles jeho obsahu v mediu po aplikaci těchto inhibitorů se projevil zvýšením jeho množství v sušině. Na přenosu genistinu se mohl podílet i vezikulární transport, protože došlo k obdobným změnám po aplikaci brefeldinu A (2,5  $\mu\text{M}$ ). Některé látky jako gramicidin pak zvýšily obsah genistinu v mediu i sušině, kde naopak  $\text{NH}_4\text{Cl}$  obsah genistinu neovlivnil.

#### Genistein

Statisticky významný pokles obsahu genisteinu v mediu nastal po přidání gramicidinu, brefeldinu A (2,5 a 10  $\mu\text{M}$ ) a verapamilu. Naopak jeho vyšší obsah v mediu oproti kontrole bez inhibitoru i elicitoru vyvolala aplikace  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM) a glibenklamidu (Graf 3.2.a; 3.2.c). V sušině došlo k statisticky významnému poklesu množství genisteinu oproti kontrole po přidání  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a brefeldinu A (2,5  $\mu\text{M}$ ) (Graf 3.2.b). U probenecidu (1 mM) a glibenklamidu (1 mM) nastal pokles oproti elicitovaným vzorkům (Graf 3.2.d). I přes to, že nižší obsah genisteinu v mediu nebyl u orthovanadátu statisticky významný, k nárůstu množství tohoto aglykonu došlo v sušině po ošetření tímto inhibitorem a také verapamilem. Ten inhibuje ABC transportéry z podskupiny MDR. Tento typ přenašeče mohl být ovlivněn i gramicidinem, který blokuje činnost P-gp ATPasy a také snížil koncentraci genisteinu v mediu. Ostatní inhibitory způsobily spíše snížení obsahu genisteinu v mediu i sušině (brefeldin A), nebo nárůst v sušině nebyl statisticky významný (gramicidin).  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , probenecid a glibenklamid zvýšily nebo nepotlačily uvolňování genisteinu do media.



## **Biochanin A**

K statisticky významnému poklesu koncentrace biochaninu A v mediu došlo po aplikaci  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 mM) (Graf 3.3.a). Statisticky významný pokles obsahu tohoto isoflavonu u inhibitorů ovlivňujících ATPasy byl nalezen pouze u glibenklamidu (0,5 mM) oproti kontrole bez inhibitoru i elicitoru (Graf 3.3.c). V sušině došlo k statisticky významnému nárůstu množství biochaninu A po aplikaci brefeldinu A (2,5 a 10  $\mu\text{M}$ ) a glibenklamidu (0,5 mM) (Graf 3.3.b; 3.3.d). Podobně jako v předchozích případech byly statisticky významný obsah biochaninu A mezi inhibovanými a kontrolními vzorky naměřen u inhibitorů ABC přenašečů a u brefeldinu A. Výsledky dalších inhibitorů teoreticky podporovaly tyto závěry, ale kvůli odchylkám naměřených výsledků není možné určit, jaké další inhibitory ovlivnily transport biochaninu A.

## **Daidzein**

Statisticky významný obsah daidzeinu v mediu u vzorků pouze s elicitem a vzorků, kde byly použity inhibitory, byl nižší po aplikaci orthovanadátu, verapamilu a také glibenklamidu (0,5 a 1 mM) (Graf 3.4.c). Brefeldin A (5  $\mu\text{M}$ ) také způsobil významný pokles obsahu daidzeinu, ale pouze oproti kontrole bez elicitoru (Graf 3.4.a). V sušině s inhibitorem byl pozorován nižší obsah daidzeinu oproti kontrole při použití gramicidinu, probenecidu (0,5 mM) a brefeldinu A (všechny koncentrace) (Graf 3.4.b; 3.4.d). Zároveň vyšší rozdíl mezi inhibovanými a elicítovanými vzorky byl statisticky významný pouze u brefeldinu A (5 a 10  $\mu\text{M}$ ). Z výsledků vyplývá, že daidzein může být také transportován pomocí ABC transportérů, vzhledem k poklesu jeho obsahu v mediu po aplikaci orthovanadátu, i když jeho nárůst v sušině nebyl statisticky významný. Ostatní ABC inhibitory, které snížily obsah tohoto isoflavonu v mediu, ale neukázaly výrazný, statisticky významný nárůst oproti kontrolám, s výjimkou glibenklamidu (0,5 mM). Vzhledem k nárůstu obsahu daidzeinu v sušině oproti elicítovaným kontrolám po aplikaci brefeldinu A (5 a 10  $\mu\text{M}$ ), kdy pokles v mediu byl významný pouze po aplikaci 5  $\mu\text{M}$  roztoku tohoto inhibitoru, se vezikulární transport také může účastnit na přenosu tohoto isoflavonu.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  způsobil zvýšené uvolňování daidzeinu do media oproti kontrole, zatímco v suspenzi byl pozorován jeho nevýznamný pokles (Graf 3.4.b).

## **Formononetin**

U formononetinu došlo ke statisticky významnému poklesu jeho obsahu v mediu po aplikaci brefeldinu A (5 a 10  $\mu\text{M}$ ), orthovanadátu, verapamilu a probenecidu (Graf 3.5.a; 3.5.c). Naopak k významnému zvýšení koncentrace formononetinu v sušině došlo přidáním brefeldinu A (10  $\mu\text{M}$ ), orthovanadátu a probenecidu (0,5 mM) (Graf 3.5.b; 3.5.d). Transport formononetinu probíhal patrně pomocí ABC transportéru (MRP) a pravděpodobně i za účasti vezikul. Inhibitory narušující pH gradient v některých případech zřejmě ovlivnily rozdíly v obsahu formononetinu mezi zkoušenými a kontrolními vzorky, ale ze zjištěných výsledků se nedá jejich vliv na transport přesně určit.

### **6.2.2. Vliv inhibitorů na transport isoflavonů v *G. tinctoria*.**

#### **Genistin**

U genistinu došlo ke statisticky významnému poklesu jeho obsahu v mediu po aplikaci  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 mM). Aplikace gramicidinu způsobila významné zvýšení tohoto isoflavonu v mediu oproti kontrole (Graf 4.1.a) a probenecidu (1 mM) oproti elicitovaným vzorkům (4.1.c). V sušině byl pozorován významný nárůst genistinu po ošetření  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 mM) oproti kontrole bez elicitoru (Graf 4.1.b). V ostatních statisticky významných případech ale došlo k poklesu obsahu genistinu (Graf 4.1.d). Z výsledků tak vyplývá, že transport ovlivnil pouze  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , který ovlivňuje protonový gradient.

#### **Genistein**

U genisteinu došlo ke statisticky významnému poklesu jeho obsahu v mediu oproti elicitovaným a/nebo kontrolním vzorkům po aplikaci  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , gramicidinu, brefeldinu (2,5 a 5  $\mu\text{M}$ ) a probenecidu (0,5 mM) (Graf 4.2.a; 4.2.c). V sušině pak nenastalo statisticky významné zvýšení obsahu genisteinu, ale pouze pokles u suspenzí ošetřených  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 mM) a orthovanadátem (1  $\mu\text{M}$ ) (Graf 4.2.b; 4.2.d). U suspenzí je také možné pozorovat určitý nárůst genisteinu v případě inhibitoru probenecidu, který ale není statisticky významný. Genistein byl tak transportován patrně pomocí ABC transportérů. U  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a gramicidinu pak v buňkách došlo k dalšímu poklesu obsahu tohoto isoflavonu. Brefeldin A nezpůsobil výraznou změnu obsahu isoflavonu v sušině oproti elicitované kontrole při žádné použité koncentraci.

## **Biochanin A**

Obsah biochaninu A byl hodnocen pouze u medií, vzhledem k jeho nízkému obsahu v suspenzi. Gramicidin a brefeldin A (2,5 a 5  $\mu\text{M}$ ) významně zvýšily obsah tohoto isoflavonu v mediu oproti kontrolám a podobný účinek měl i probenecid. K statisticky významnému poklesu jeho obsahu oproti neelicitované kontrole došlo u kultur, kde byl přidán  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a glibenklamid (1 mM) (Graf 4.3.a; 4.3.b). S ohledem na naměřená data tak nelze stanovit možný vliv inhibitorů na transport biochaninu A.

## **Daidzein**

Pokles obsahu daidzeinu v mediích po ošetření inhibitory byl statisticky významný u  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , gramicidinu, brefeldinu A (2,5 a 5  $\mu\text{M}$ ), orthovanadátu (1 mM) a probenecidu (Graf 4.4.c). Po aplikaci orthovanadátu (1  $\mu\text{M}$ ), verapamilu a glibenklamidu (Graf 4.4.c) nastal v mediu nárůst obsahu tohoto isoflavonu. V sušině došlo ke statisticky významnému snížení množství daidzeinu po přidání brefeldinu A (10  $\mu\text{M}$ ) a verapamilu (Graf 4.4.b; 4.4.d). V ostatních sušinách nebyl zjištěn významný nárůst koncentrace daidzeinu po aplikaci inhibitorů.

## **Formononetin**

Přítomnost formononetinu v mediu byla významně snížena ve vzorcích s přidaným  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM) a brefeldinem A (5  $\mu\text{M}$ ) (Graf 4.5.a) V sušině došlo ke statisticky významnému poklesu formononetinu opět po ošetření  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 a 10 mM) a brefeldinem A (5 a 10  $\mu\text{M}$ ) (Graf 4.5.b). Obsah formononetinu u suspenzí s brefeldinem A byl však podobný jako u kontroly bez elicitoru. Tyto rozdíly nebyly statisticky významné, podobně jako u dalších použitých inhibitorů. U inhibitorů zobrazených v grafech 4.5.c a 4.5.d nebyla pozorována statisticky významná změna v obsahu formononetinu. Formononetin mohl být pravděpodobně přenášen do vnějšího prostředí pomocí ABC transportérů a patrně i vezikulárním transportem.

### **6.2.3. Shrnutí**

U *T. pratense* byl zaznamenán přenos isoflavonů převážně pomocí mechanismů, které byly ovlivnitelné látkami působícími na ABC transportéry (glibenklamid, probenecid) nebo na vezikulární transport (brefeldin A). U *G. tinctoria* byly zjištěné výsledky hůře porovnatelné, ale

proces transportu nebude pravděpodobně odlišný, podobně jako u druhů popisovaných jinými autory.<sup>214, 215</sup>

Aktivní přesun genistinu z buněk do okolí byl pozorován u kořenové soustavy *G. max*.<sup>214</sup> Také u *A. thaliana*, kde byly flavonoidy aplikovány do prostředí kolem různých rostlinných orgánů, byl pozorován transport v rámci rostliny. Naringenin, dihydrokvercetin a dihydrokempferol byly absorbovány přes konec a střed kořene a také kotyledonem, odkud se pohybovaly do vzdálenějších částí, zatímco kvercetin a kempferol byly transportovány pouze koncem kořene. V závislosti na místě vstřebání pak přesun flavonoidů probíhal v povrchových buňkách nebo v tkáni cév. Vzhledem k poměrně lokalizovanému výskytu těchto metabolitů a jejich jednosměrnému pohybu po absorpci kotyledonem bylo vyvozeno, že transport v rámci rostliny neprobíhal difúzí, ale spíše aktivním transportem. Z výsledků inhibičních testů posléze vyplynulo, že tento transport byl tlumen přítomností glutathionu a glibenklamidu a mohl se odehrávat pomocí ABCC přenašečů. U orthovanadátu, který byl také použit, nedošlo v tomto případě ke statisticky významnému ovlivnění transportu.<sup>215</sup> Tato studie ukázala, že pohyb flavonoidů v rámci rostliny může být závislý na ABC přenašečích i přesto, že nedošlo k významnému poklesu aktivity po použití orthovanadátu, jako tomu bylo např. u genistinu v *T. pratense* (Graf 3.1.c).

U *A. thaliana* byl rovněž ukázán export látek fenolového charakteru do vnějšího prostředí. Po přidání různých inhibitorů do media bylo zjištěno, že verapamil a nifedipin, které slouží jako blokátory Ca<sup>2+</sup> kanálů, potlačily uvolňování některých látek. Vzhledem k tomu, že mohou ovlivňovat i ABC transportéry, mohly být metabolity přenášeny pomocí těchto bílkovin.<sup>216</sup> Transport genisteinu do media u *T. pratense* (3.2.c), tak mohl být závislý na mechanismu, který je ovlivněn těmito inhibitory.

Studie Sugiyama a kol. z roku 2007, která se zabývala transportem různých isoflavonů přes plazmatickou membránu, ukázala, že přenos genisteinu byl závislý na přítomnosti MgATP.<sup>214</sup> Práce byla provedena na vezikulách typu plazmatické membrány, které byly získány z kořenů *G. max*, ke kterým byly přidány různé inhibitory a samotný genistein. Transport genisteinu byl zde inhibován vanadátem a také absencí MgATP. Látky jako NH<sub>4</sub>Cl, gramicidin nebo nigericin, které ovlivňují pH gradient a membránový potenciál, vliv neměly. Také léčiva, která mohou působit tlumivě na činnost různých skupin ABC transportérů jako verapamil (ABCB) nebo glibenklamid (ABCC) neovlivnily přenos genisteinu. Samotný transport však mohl být ovlivněn dalšími isoflavony a flavonoidy, kdy probíhala pouze třetinová absorpce po přidání aglykonů jako je daidzein, formononetin nebo biochanin A. Oproti tomu glykosidy isoflavonů

snížily přenos zhruba o desetinu.<sup>214</sup> S ohledem na naměřené výsledky u *T. pratense* a *G. tinctoria* mohlo díky zvýšené přítomnosti metabolitů vlivem elicitorů teoreticky dojít k ovlivnění transportu i těmito látkami. Ověření jejich vzájemné kompetice na transportních bílkovinách tak představuje možný budoucí směr výzkumu na těchto rostlinách. Kromě stanovovaných čtyř aglykonů a jednoho glykosidu, suspenzní kultury obsahovaly patrně i další isoflavony, které mohly transport ovlivnit.

Některé látky fenolového charakteru mohou být přes plazmatickou membránu transportovány i dalšími typy ABC přenašečů. Látky (konyferylalkohol, sinapylalkohol, kumarylalkohol), které se podílejí na tvorbě ligninu na vnější straně membrány, vycházejí stejně jako flavonoidy z fenylypropanoidové biosyntetické dráhy a jsou transportovány do extracelulárního prostoru. Jako jeden z možných přenašečů byl identifikován AtABCG29 z rodiny PDR. Tento transportér vnesený do kvasinek zvýšil absorpci kumarylalkoholu oproti kontrole, kdy přenos byl poté inhibován vanadátem, nikoliv však  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .<sup>217</sup>

V práci zaměřené na koniferin, glukosid koniferylalkoholu, který je součástí ligninu buněčných stěn, byla pozorována jeho zvýšená absorpce po aplikaci MgATP do vezikul izolovaných z xylému několika druhů topolů a nahosemenných stromů. Přidáním látek, které narušují protonový gradient jako  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nebo gramicidin, došlo k výraznému poklesu aktivity příjmu tohoto glukosidu u vakuol obou typů dřevin; transport koniferinu tak byl závislý na činnosti  $\text{H}^+$ -ATPasy. Na plazmatické membráně ale přenos tohoto glukosidu pozorován nebyl, a to i po aplikaci MgATP.<sup>218</sup>

U *Oryzae sativa* byl identifikován přenašeč PEZ1 patřící do MATE skupiny. Vyřazením jeho genu došlo k poklesu exportu fenolových látek typu protokatechové nebo kávové kyseliny.<sup>219</sup> Není proto vyloučeno, že se podobný transportér nenachází i u dalších rostlin včetně *T. pratense* a *G. tinctoria*, kde by se mohl podílet na transportu flavonoidů podobně jako některé MATE přenašeče vakuol. Vzhledem k aktivaci tohoto proteinu byla diskutována role MATE transportérů na plazmatické membráně u *Z. mays* coby faktoru podílejícího se na rezistenci vůči hliníku. Zatímco ZmMATE1 exportoval citrát, přesná povaha substrátu ZmMATE2 nebyla nalezena. S ohledem na uvolňování látek typu flavonoidů v přítomnosti hliníku bylo spekulováno, že i ony mohou být přenášeny tímto transportérem.<sup>220</sup> Pokles obsahu některých isoflavonů po použití  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Graf 4.1.a) nebo gramicidinu (Graf 3.2.a) mohl být teoreticky způsoben ovlivněním tohoto typu transportérů, nicméně v předchozích studiích přenos flavonoidů těmito inhibitory ovlivněn nebyl.

Výzkum transportu silymarinového komplexu u suspenzní kultury *Silybum marianum*, sloužil jako příklad pro provedené transportní experimenty na buněčných kulturách *T. pratense* a *G. tinctoria*. Látky ovlivňující protonový gradientu na export silymarinu nepůsobily, zatímco některé látky tlumící činnost ABC transportérů ze skupiny ABCC (probenecid, glibenklamid) snížily obsah flavonoidů v mediu. Kromě těchto látek také brefeldin A potlačil uvolňování těchto sekundárních metabolitů a mohl se tak jako u některých isoflavonů podílet na exportu metabolitů.<sup>221</sup>

### **6.3. Diskuse k transportu genistinu přes vakuolární membránu**

#### **6.3.1. Vliv MgATP na transport genistinu**

Ve vakuolách vzrostl po přidání kontrolních roztoků s genistinem (kontrola G+) jeho obsah devětkrát oproti vzorkům bez přídavku tohoto glykosidu (kontrola G-) v čase 0 h (Graf 5.1.1.a) a tento nárůst byl statisticky významný. U vzorků, ke kterým byl přidán navíc i MgATP (MgATP G+), byla koncentrace genistinu o 40% vyšší při porovnání s kontrolou G+. V dalších sledovaných intervalech byl naměřený obsah isoflavonu nižší, ale rozdíl mezi MgATP G+ a kontrolou G+ byl pozorovatelný. Transport genistinu do vakuol probíhal relativně nezávisle na MgATP s ohledem na jeho přítomnost v kontrolním vzorku G+, ale MgATP do jisté míry jeho absorpci zvýšila. U vakuol, ke kterým byly přidány roztoky bez genistinu, se vliv MgATP neprojevil.

V supernatantu (Graf 5.1.2.) byly naměřeny podobné koncentrace mezi vzorky s genistinem i bez něj. Supernatant roztoku MgATP G+ obsahoval snížené množství isoflavonu oproti kontrole a tento rozdíl byl statisticky významný. Oproti vakuolám, ale koncentrace genistinu zůstávala v supernatantu vzorků G+ relativně konstantní a vyšší koncentrace glykosidu byly naměřeny až po 24 hodinách.

Kromě předpokládaného genistinu byl naměřen ve vakuolách a supernatantu i jeho aglykon genistein. Po aplikaci kontrolních roztoků obsahujících glykosid došlo k trojnásobnému nárůstu obsahu genisteinu oproti kontrole G- v čase 0 h. Kontrolní měření použitého standardu genistinu neukázalo kontaminaci nebo degradaci vzorku a genistein tak musel být uvolněn z glykosidů průběhu experimentu. Graf 5.1.3. znázorňuje postupný nárůst genisteinu ve vakuolách, kdy ve vzorcích obsahujících pouze genistin byla jeho koncentrace vyšší a tento rozdíl byl statisticky významný. Podobně jako u genistinu, byl genistein přítomen ve vakuolách

již ve vzorcích odebraných ihned po přípravě. Nicméně aplikace roztoků MgATP G+ nezvýšila obsah aglykonu ve vakuolách oproti kontrole G+, kde byla koncentrace genisteinu vyšší.

V supernatantu (Graf 5.1.4.) byl následně pozorován nárůst genisteinu během prvních čtyřech hodin pozorování, kdy po začátku měření byl genistein v experimentálních i kontrolních roztocích již přítomen. V intervalu 4 h došlo k nárůstu obsahu genisteinu ve vzorcích ošetřených MgATP oproti kontrole. V případě kontrolních vzorků se obsah genisteinu ve vakuolách i supernatantu po dvou a čtyřech hodinách významně neměnil, na rozdíl od výše zmíněného supernatantu po aplikaci roztoku s MgATP G+. MgATP nemá patrně na transport genisteinu přes vakuolární membránu vliv, ale mohl působit na jeho uvolnění z genistinu.

### **6.3.2. Vliv bafilomycinu A1 na transport genistinu**

Během druhého experimentu, kdy byl testován bafilomycin A1, došlo opět k nárůstu obsahu genistinu ve vakuolách ošetřených příslušnými roztoky s glykosidem (Baf G+ a kontrola G+) (Graf 5.2.1.) Bafilomycin A1 působil do určité míry jako inhibitor, ale díky odchylce u kontrolních vzorků nebyl zhruba 15% pokles obsahu genistinu oproti kontrole statisticky významný. V dalších intervalech odběru bylo množství genistinu ve vakuolách menší, nicméně po 2 hodinách byl ještě patrný rozdíl ve prospěch roztoku genistinu bez inhibitoru.

V supernatantu (Graf 5.2.2.) byla naměřena vyšší koncentrace genistinu v kontrolních vzorcích s tímto isoflavonem oproti vzorkům s bafilomycinem A1, což by bylo v rozporu s výsledky získanými z pelety. Nicméně rozdíly mezi výsledky nebyly statisticky významné. S výjimkou měření po 24 hodinách, kdy nastal statisticky významný pokles genistinu u Baf G- oproti kontrole G-, nebyly pozorovány jiné významné rozdíly mezi kontrolou a inhibovanými vzorky.

Ve vakuolách byla v případě bafilomycinu A1 a kontroly G+ opět zaznamenána vysoká koncentrace genisteinu v porovnání se vzorky bez genistinu (Graf 5.2.3.). V žádném ze sledovaných intervalů nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi vzorky Baf G+ a kontrolou G+, ale vyšší hodnoty obsahu aglykonu byly naměřeny po aplikaci inhibitoru. Obsah genisteinu ve vakuolách poté postupně ve sledovaných intervalech klesal. Po dvou hodinách došlo pouze u Baf G- k statisticky významnému nárůstu obsahu isoflavonu oproti kontrole G-.

Odebraný supernatant také obsahoval vyšší koncentraci genisteinu v experimentech, kde byl přidán genistin. Zkoušené roztoky Baf G- obsahovaly více genistinu oproti kontrole v prvních třech odebíraných intervalech. Po 24 h byla koncentrace vyšší v supernatantu kontroly G-.

Tento rozdíl mezi zkoušenými a kontrolními vzorky byl v časech 2 h a 24 h statisticky významný.

V supernatantu (Graf 5.2.4.) byl dobře pozorovatelný rozdíl v koncentraci genisteinu u Baf G+ a kontrolou G+. S výjimkou vzorků odebraných po čtyřech hodinách, byl v supernatantu zaznamenán statisticky významný nárůst obsahu aglykonu po ošetření inhibitorem. Podobně jako v případě aplikace MgATP (Graf 5.1.4.) byl obsah genisteinu v kontrolním vzorku po dvou a čtyřech hodinách vyšší. K nárůstu poté došlo u vzorků s látkou ovlivňující transport.

### **6.3.3. Vliv DCCD na transport genistinu**

DCCD také snížil koncentraci genistinu ve vakuolách (Graf 5.3.1.a) oproti kontrole i přes to, že došlo v 0 h k nárůstu obsahu isoflavonu u inhibovaných i kontrolních vzorků s genistinem. Obsah genistinu u DCCD G+ klesl oproti kontrole G+ o 16,5 % a toto snížení bylo statisticky významné. V dalších měřeních nastal opět pokles absorpce genistinu u inhibovaného i kontrolního vzorku s genistinem, nicméně vakuoly s DCCD obsahovaly tohoto glykosidu méně.

V supernatantu (Graf 5.3.2) byl po prvním odběru naměřen statisticky významný pokles genistinu v kontrole G- oproti vzorkům, kde byl použit DCCD. U vzorků G+ nebyl v čase 0 h tento rozdíl statisticky významný. V dalších sledovaných intervalech byl ale obsah v kontrole G+ vyšší oproti DCCD G+. Také hodnoty vzorků, které neobsahovaly genistin, byly relativně podobné se vzorky G+.

Po aplikaci roztoku s DCCD a genistinem nastalo ve vakuolách (Graf 5.3.3.) snížení obsahu genisteinu v porovnání s kontrolou G+. Množství genisteinu bylo nicméně stále vyšší oproti vzorkům, kde nebyl v zkoušených či kontrolních roztocích genistin přítomen. Rozdíl v obsahu genisteinu mezi kontrolními a zkoušenými roztoky byl ve všech sledovaných časech statisticky významný. Pouze po 24 hodinách došlo k jeho poklesu oproti předchozím časům odběru.

V supernatantu (Graf 5.3.4.) byla přítomnost genisteinu zaznamenána ihned po prvním odběru vzorků po přípravě směsi vakuol s roztoky. Rozdíly v hodnotách obsahu genisteinu po aplikaci roztoku s inhibitorem a genistinem a kontrolou G+ nebyly statisticky významné a zvýšily se opět po dvou a čtyřech hodinách. Vyšší koncentrace pak byla naměřena u vzorků s inhibitorem.



#### 6.3.4. Shrnutí

Ve všech vzorcích s přidaným genistinem byla naměřena jeho zvýšená koncentrace ve vakuolách. V kontrole G+ se tato koncentrace pohybovala v čase 0 h na podobné úrovni u všech vzorků, v prvním měření s MgATP byla tato koncentrace vyšší. V dalších časových intervalech pak obsah genistinu v pokusných i kontrolních vzorcích klesl. V čase 0 h byla koncentrace genistinu u MgATP G+ vyšší oproti kontrole G+, naopak inhibitory absorpci genistinu oproti kontrole snížily.

Změny obsahu genistinu v experimentálním a kontrolním supernatantu je těžké určit s ohledem na vysoké rozdíly naměřených výsledků u jednotlivých vzorků. Ve srovnání s vakuolami byly hodnoty mezi kontrolními vzorky v počátečním čase 0 h více rozdílné a v případě bafilomycinu A1 pak byla koncentrace kontroly G+ vyšší oproti Baf G+. V časovém intervalu 24 h u MgATP G+, DCCD G+ a jejich kontrol byl naměřen vyšší obsah genistinu, což by odpovídalo nižším koncentracím u vakuol. Tyto rozdíly mohly být ve zkoušených i v kontrolních roztocích vyvolané hydrolyzou genistinu, jak je popsáno dále.

Obsah genisteinu ve vakuolách v kontrole G+ se s výjimkou vzorků u pokusů s bafilomycinem, kde byl v čase 0 h vyšší v porovnání s ostatními stanoveními, pohyboval na podobné úrovni a během prvních čtyř hodin nedocházelo k výrazným změnám jeho koncentrace. U MgATP G+ bylo počáteční množství genisteinu nižší a i přes mírný nárůst nedosahoval jeho obsah v peletě koncentrace kontroly G+ (Graf 5.1.3.). U obou inhibitorů docházelo naopak k postupnému snižování koncentrace genisteinu v dalších časových intervalech při srovnání s časem 0 h i přes rozdíly v počátečním obsahu oproti kontrolám (Graf 5.2.3 a 5.3.3.).

Koncentrace genisteinu v supernatantu v kontrolních vzorcích s přidaným genistinem byla větší při porovnání s kontrolou G-. S výjimkou Baf G+ byl obsah genisteinu u pokusných vzorků s genistinem podobný. V dalších časových intervalech pak koncentrace aglykonu stoupala u všech vzorků s přidaným genistinem a u MgATP G+ a Baf G+ byly rozdíly mezi pokusnými a kontrolními vzorky větší (Graf 5.1.4. a 5.2.4.). Po 24 hodinách se obsah genisteinu u všech vzorků snížil.

V minulosti byl zkoumán mechanismus vakuolárního transportu nejen sekundárních metabolitů, které rostlina vytváří, ale i látek pocházejících z jiných druhů. Jak bylo popsáno v teoretické části, látky rostlině vlastní byly do určité míry nezávislé na přidání MgATP, ale byly citlivé na inhibitory (bafilomycin A1, gramicidin, NH<sub>4</sub>Cl) ovlivňující protonový gradient, který zprostředkovává transport pomocí MATE transport. Naopak orthovanadát jako inhibitor

ATPAs potlačoval absorpci spojenou s hydrolysou ATP. V některých případech inhibitory působily do určité míry na oba způsoby transportu, ale účinek jedné skupiny látek byl dominantnější.<sup>165, 201, 222</sup> Při výzkumu transportu glukosidu kyseliny salicylové, která slouží jako signální molekula, byla tato látka u *G. max* a *Beta vulgaris* absorbována do izolovaných vakuol různými způsoby. U *G. max*, podobně jako zde v případě genistinu, byl glukosid SA po přidání 3mM MgATP absorbován v prvních 30 minutách a maxima dosáhl během první hodiny, ale transport bez MgATP byl pouze okolo 16 %. Transport u *B. vulgaris* byl bez MgATP minimální. Aplikace inhibitorů ukázala určitý pokles aktivity u *G. max* po přidání bafilomycinu A1 (9 %) a gramicidinu (17%), ale zvýšenou citlivost v závislosti na množství vanadátu. Naopak vanadát neměl na rozdíl od bafilomycinu a gramicidinu na transport glukosidu SA u *B. vulgaris* vliv.<sup>201</sup>

Menší rozdíl v obsahu sekundárního metabolitu ze skupiny flavonoidů mezi kontrolou a vzorkem s 3mM MgATP byl pozorován u saponarinu u *H. vulgare*. Tento rozdíl činil zhruba 22 %, zatímco u *A. thaliana*, která tento glukosid přirozeně neobsahuje a byla v práci rovněž použita, k transportu bez MgATP téměř nedocházelo. Inhibitor NH<sub>4</sub>Cl a bafilomycin A1 potlačily transport saponarinu u *H. vulgare*, kdy NH<sub>4</sub>Cl měl silnější účinek (příjem saponarinu vakuolami pouze 20 %), zatímco bafilomycin A1 (81 %) snížil absorpci zhruba jako dále použitý vanadát (85 %). Absorpce u druhé rostliny byla opět citlivá na přítomnost vanadátu (příjem saponarinu 34,7 %), nikoliv však látek narušujících H<sup>+</sup> gradient.<sup>165</sup>

Na druhou stranu může být i přenos látek rostlině vlastních závislý na MgATP a citlivý k vanadátu. U *Secale cereale* nebyla absorpce jeho glukuronidu luteolinu s výjimkou valinomycinu látkami jako bafilomycin A1 příliš ovlivněna. Afinita k ABC transportéru pak byla pravděpodobně dána záporným nábojem způsobeným přítomností karboxylových skupin.<sup>223</sup>

Transport sekundárních metabolitů ze skupiny flavonoidů se také často zaměřuje na látky, které se podílejí např. na zbarvení semen. U *A. thaliana* a dalších rostlin byla identifikována řada proteinů, které jsou zapojeny do biosyntézy a transportu těchto metabolitů. Inhibicí jejich genů pak vznikají mutanti, kteří mají poruchu zbarvení osemení a odpovědné proteiny jsou označovány jako „transparent testa“. U *A. thaliana* byl identifikován přenašeč TT12 patřící do skupiny MATE, který byl odpovědný za přenos glukosidů anthocyaninů.<sup>166</sup>

V „hairy roots“ kulturách *Medicago trunculata* (*Fabaceae*) byl sledován přenos flavan-3-olů a také glukosidu daidzinu, jako zástupce isoflavonů. Příjem tohoto isoflavonu do vezikul byl do

určité míry ovlivněn látkami, které narušují protonový gradient, nicméně jeho absorpce byla významně snížena až po aplikaci vanadátu. Naopak metabolity jako epikatechin-3'-*O*-glukosid nebo katechin-3'-*O*-glukosid byly citlivé na bafilomycin A1 nebo gramicidin. Z výsledků byl učiněn závěr, že transport daidzinu u *M. trunculata* probíhá spíše pomocí ABC přenašeče, zatímco pro flavan-3-oly byl identifikován MATE1 transportér. S ohledem na to, že přidání genistinu ovlivnilo obsah daidzinu ve smyslu kompetice, mohl by být genistin u *M. trunculata* rovněž transportován podobným mechanismem.<sup>222</sup> Následující studie identifikovala v *M. trunculata* MATE2 přenašeč, který slouží jako transportér pro acylované flavonoidy. Vyřazením jeho genu sice došlo ke snížení obsahu formononetin-7-*O*-glukosid malonátu v květech, ne však v listech. Množství dalšího isoflavonu genistein-7-*O*-glukosid malonátu také nebylo ovlivněno. Navíc u některých isoflavonů došlo ke zvýšení jejich obsahu (7-*O*-glukosidy biochaninu A a formononetinu).<sup>224</sup>

Hodnoty, které byly naměřeny v této práci zkoumající vakuolární transport u *T. pratense* (Graf 5.1.1.) ukazují, že po aplikaci MgATP došlo ke zvýšení obsahu genistinu v peletě, nicméně i bez jeho použití absorpce glukosidu probíhala podobně jako v případě saponarinu u *H. vulgare*. Inhibitor V-ATPasy bafilomycin A1 (0,03 mM) způsobil podobně pouze 15% pokles (Graf 5.2.1), což vzhledem k vysoké odchylce nebylo průkazné. V některých studiích byl transport jednotlivých metabolitů, závislý na protonovém gradientu, ovlivňován bafilomycinem A1 v různé míře i při použití stejné koncentrace.<sup>165,222</sup> Použití dalšího inhibitoru protonových pump, DCCD, přineslo podobný, ale statisticky významný rozdíl (19 %) v obsahu absorbovaného genistinu mezi kontrolními a pokusnými vzorky s tímto inhibitorem (Graf 5.3.1.). Nicméně se nedá s jistotou potvrdit nebo vyvrátit vliv V-ATPasy a protonového gradientu na transport. Je také možné, že použitá koncentrace sice inhibovala tento enzym, ale nebyla dostatečná k vazbě na V-PPasu, která tak mohla udržovat do určité míry protonový gradient. To by zároveň vysvětlovalo zachovanou absorpci genistinu u bafilomycinu A1.

V současné dostupné literatuře nebyla nalezena práce, která by se zajímala pouze o transport glykosidů isoflavonů dovnitř vakuoly. U výše zmíněného *M. trunculata* byly testované MATE1 a MATE2 přenašeče nalezeny pomocí sekvence transportéru z *A.thaliana* pro anthocyaniny. Zde testovaný daidzin a další isoflavony nebyly primárně pomocí těchto proteinů přenášeny, ale byly spíše odkázány na pohyb přes ABC přenašeče. Nicméně u *M. trunculata* bylo popsáno okolo 40 možných MATE transportérů.<sup>222</sup> Možná identifikace konkrétního transportéru pro genistin u *T. pratense* by byla významným přínosem do problematiky, nicméně přesahuje současné možnosti pracoviště.

Přítomnost genisteinu ve vakuolách a supernatantu je možné vysvětlit činností  $\beta$ -glukosidas, které se nacházejí v cytoplazmě nebo jsou součástí membrán včetně tonoplastu.<sup>225</sup> Použité roztoky měly pH vyšší než pět a byly přidány k vakuolám v krátkém čase po jejich přípravě. S ohledem na to, že byly použity experimentální i kontrolní roztoky o stejném složení jako v práci Ludmily Chládekové, která navíc hydrolýzu jí použitého flavonoidního glykosidu baicalinu nepopsala, je možné, že k uvolnění genisteinu došlo činností těchto enzymů.<sup>226</sup>

Hydrolýza glykosidů isoflavonů byla pozorována i u potravinářských produktů, získávaných z plodů *G. max* a vznikajících během jejich zpracování. Na procesu štěpení se mohou podílet např. některé mikroorganismy z rodu *Rhizopus*, sloužící k fermentaci sóji. Z tohoto rodu jsou získávány i některé enzymy používané při získávání protoplastů, ale kontaminace vzorků zbytkem roztoku cellulasy a pektinasy je vysoce nepravděpodobná.  $\beta$ -glukosidas jsou rovněž součástí semen a hydrolýza tak může probíhat během jejich máčení.<sup>227</sup>

Isoflavony jsou také exportovány do vnějšího prostředí buňky, kdy byl na plazmatické membráně již popsán exportér ze skupiny ABC.<sup>208</sup> Přesný způsob exportu na vakuolární membráně není znám, ale předpokládá se podobný mechanismus. Působením MeJA jako signální molekuly reagující na poranění vyvolalo u *M. trunculata* zvýšenou transkripci genů pro  $\beta$ -glukosidas a také pro ABC proteiny.<sup>225</sup> Je tedy teoreticky možné, že u *T. pratense* mohlo dojít v průběhu izolace protoplastů k indukci tvorby těchto enzymů, které následně hydrolysovaly genistin přítomný v roztoku nebo uvolňovaný z vakuol.

Ve studiích sledujících transport flavonoidů dovnitř vakuol, je pozornost zaměřena spíše na jejich glykosidy, ale přenos aglykonů nebo jejich absence byl také zaznamenán. U výše zmíněných MATE1 a 2 nebyly aglykony použitých metabolitů těmito transportéry přenášeny. Na rozdíl od genistinu pak aglykony genistein a daidzein významně neovlivnily příjem daidzinu do vakuol.<sup>222</sup> U *mate2* rostlin pak došlo k poklesu aglykonů, nicméně nebylo uvedeno jasné vysvětlení tohoto poklesu.<sup>224</sup>

V práci, která byla provedena u isoflavonového derivátu medikarpinu, nedocházelo u samotného aglykonu k transportu přes vakuolární membránu před i po přidání MgATP. Teprve jeho navázání na GSH pomocí glutathiontransferasy vedlo k jeho absorpci, kterou inhibovala přítomnost vanadátu. Na tomto typu přenosu spojeného s GSH se podílejí zejména proteiny ze skupiny ABC z podskupiny MRP.<sup>228, 163</sup>

V rámci pozorování glukosidu SA v *G. max*, byl změřen i obsah samotné salicylové kyseliny. Její absorpce byla po přidání MgATP zhruba poloviční oproti glykosidu. Na druhou stranu byl

aglykon absorbován dvakrát více než glykosid v nepřítomnosti MgATP. U *B. vulgaris* k transportu samotného aglykonu docházelo minimálně v obou stanoveních. Ostatní inhibitory pak u SA zkoušeny nebyly.<sup>201</sup>

V prvním odběru vzorků ihned po přidání genistinu byl pozorován jeho nárůst ve vakuolách po aplikaci MgATP. Nicméně u kontroly bez MgATP byl také naměřen vyšší obsah genistinu oproti vzorkům bez tohoto isoflavonu. Použití inhibitorů protonových pump jako je bafilomycin A1 a DCCD, pak vedlo k poklesu množství genistinu ve srovnání s kontrolou bez těchto látek, kde byla koncentrace opět vyšší oproti vzorkům bez genistinu. Transport genistinu přes vakuolární membránu *T. pratense* se tak může odehrávat pomocí MATE transportérů. Ty jsou závislé na činnosti protonových pump, kdy činnost V-ATPasy může být také podpořena přidáním MgATP. Inhibice jednoho typu protonové pumpy poté nemusela být dostatečná k zablokování celého mechanismu. Vzhledem k nárůstu obsahu genistinu po přidání MgATP však není zcela vyloučena ani možnost účasti ABC transportéru.

## 7. ZÁVĚR

V provedené studii byla pozornost zaměřena na transport isoflavonů přes membrány u *Trifolium pratense* a *Genista tinctoria*. Během teoretické přípravy byla vypracována rešerše zabývající se transportními mechanismy u různých sekundárních metabolitů. V průběhu experimentální práce bylo dosaženo těchto výsledků:

1) Statisticky významný vliv sloučenin vanadu na uvolňování isoflavonů do media oproti kontrole byl nalezen u *T. pratense* i u *G. tinctoria*. Množství jednotlivých isoflavonů v kulturách bylo ovlivněno různými koncentracemi použitých elicitorů a také dobou kultivace těmito látkami. U obou suspenzních kultur byl pro následující experimenty jako elicitor vybrán  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  o koncentraci 1  $\mu\text{M}$  (*G. tinctoria*) a 10  $\mu\text{M}$  (*T. pratense*), se kterým byly rostliny kultivovány po dobu 24 hodin.

2) Obsah isoflavonů v mediu a sušině byl u *T. pratense* po elicitaci  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  ovlivněn u jednotlivých isoflavonů převážně inhibitory působícími na ABC transportéry ze skupiny MRP jako je probenecid nebo glibenklamid. Změna koncentrace genisteinu v mediu nastala i po aplikaci verapamilu, který ovlivňuje spíše ABC transportéry ze skupiny MDR. Kromě toho byla koncentrace v mediu ovlivněna brefeldinem A, který působí na vezikulární transport.

3) Určení transportního mechanismu u isoflavonů *G. tinctoria* bylo obtížnější vzhledem k naměřeným výsledkům, které bohužel nepřinesly významné rozdíly mezi inhibovanými a kontrolními vzorky. Vzhledem k poznatkům o transportu přes plazmatickou membránu u jiných rostlin je ale možné, že k přenosu isoflavonů dochází také pomocí ABC transportérů.

4) Ze suspenzní kultury *T. pratense* byly izolovány protoplasty a následně vakuoly, na jejichž membráně byl sledován transport genistinu. Z poklesu tohoto isoflavonu ve vakuolách po aplikaci inhibitorů jako bafilomycin A1 nebo DCCD oproti kontrole se dá usuzovat, že na jeho přenosu se podílejí protonové pumpy a MATE transportéry. Nárůst genistinu v peletě, který nastal po aplikaci MgATP, mohl být způsoben jednak aktivací V-ATPasy, ale teoreticky také účastí ABC transportéru.

Kromě genistinu byl ve vakuolách a supernatantu naměřen i zvýšený obsah genisteinu. Z výsledků vyplývá, že genistein byl do vakuol transportován mechanismem závislým na protonových pumpách. Zvýšená koncentrace tohoto aglykonu v supernatantu mohla být způsobena vyšší nabídkou genistinu, který nebyl absorbován v důsledku použitých inhibitorů.

V případě MgATP mohlo dojít k aktivaci hydrolýzy glykosidické vazby na vnější straně vakuolární membrány.

5) U suspenzní kultury *G. tinctoria* nedošlo při použití standardních metod k dostatečnému uvolnění protoplastů a následně vakuol. Transport isoflavonů přes tonoplast u této kultury tak nemohl být sledován.

Objasnění mechanismu transportu pro sekundární metabolity přes plazmatickou nebo vakuolární membránu představuje první krok k identifikaci konkrétního transportéru a jeho zapojení do metabolismu a využití dané látky rostlinou. Ve studiích zaměřených na identifikaci transportéru se následující postup věnuje nalezení co největší shody v genomových databázích mezi již identifikovaným transportérem (např. AtTT12) a hypotetickým přenašečem (MATE 1), který může být odpovědný za přenos studovaného sekundárního metabolitu.<sup>222</sup> Po izolaci a úpravě příslušné genetické informace z rostlinného materiálu pro daný transportér ji lze vložit do vhodného vektoru. Po transformaci vektoru s např. buňkami kvasinek je možné sledovat přenos metabolitu dovnitř cytoplasmy. Ověření totožnosti a funkce transportéru je také možné ověřit vytvořením mutantní rostliny, kde je tento protein zablokován. V případě úspěšné identifikace a vyřazení přenašeče pak k transportu testovaného metabolitu nedochází. Tento výzkum však vyžaduje speciálně vybavené pracoviště, nicméně jeho základ tvoří právě poznání mechanismu transportu jednotlivých látek.

## 8. POUŽITÉ ZKRATKY

2,4-D – 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina	E <sub>2</sub> - 17β-estradiol
4CL – 4-kumarát:CoA ligasa	E1 – NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> – Metavanadát amonný
ABC – ATP-binding cassette	E2 – VOSO <sub>4</sub> – Síran vanadylu
ACC – Acetyl-CoA karboxylasa	EstR – Estrogenový receptor
ADP – Adenosindifosfát	Gl – Glibenklamid
ARF – ADP ribosylation factor	Gr – Gramicidin
ALF5 – Aberrant lateral root formation	GSH – Glutathion
ATDTX1 – <i>A. thaliana</i> detoxification 1	GST – Glutathiontransferasa
AtPDP1 – <i>A. thaliana</i> P-glykoprotein homolog 1	GTP – Guanidintrifosfát
AtTT12 – <i>A. thaliana</i> Transparent Testa 12	HEPES – (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid)
ATP – Adenosintrifosfát	HI4'OMT – Hydroxyisoflavanon 4'-methyltransferasa
AM – anthoMATE	HPLC/UPLC – High/Ultra-Performance Liquid Chromatography
Baf – Bafilomycin A1	CHI - Chalkonisomerasa
BAP – 6-benzylaminopurin	CHR – Chalkonreduktasa
Br – Brefeldin A	CHS – Chalkonsynthasa
BY-2 – Bright Yellow-2	IFS/2HIS – Isoflavonsynthasa/ 2-hydroxyisoflavanonsynthasa
CYP – Cytochrom P	JA – Jasmonová kyselina
C4H – Cinamát-4-hydroxylasa	LPH – Laktasa florizin hydrolase
DAD – Diode array detector	MAPK – Mitogen activated proteinkinase
DCCD – N,N'-dicyklohexylkarbodiimid	
DMID – DMI dehydratasa	
DMSO - Dimethylsulfoxid	



MATE – Multidrug and toxin extrusion protein

MeJA – Methyljasmonát

MeOH – Methanol

MDA – Malonylaldehyd

MDR – Multidrug resistance homologs

MRP – Multidrug resistance-associated protein

MS – Murashige & Skoog

NtNUP1 – *N. tabacum* Nicotin Uptake Permease

Ort – Orthovanadát sodný

PAL – Fenyloalaninamoniumlyasa

P-gp – P-glykoprotein

PM H<sup>+</sup>ATPasa – Plasmatic mmembrane H<sup>+</sup>ATPase

Pr – Probenecid

PTP – Protein-fosfotyrosinová fosfatáza

SGLT1 – Sodium/glucose transporter

SH – Schenk & Hildebrandt

NBD – Nucleotide binding domain

Nt-JAT1 – *N. tabacum* jasmonate-inducible alkaloid transporter

Nt-NUP – *N. tabacum* nicotin uptake permease

PDR – Pleiotropic drug resistance protein

PP – Pyrofosfát

ROS – Reactive oxygen species

rpm – Rotation per minute

SNARE – Soluble NSF attachment protein receptor

SUR – Sulfonylurea receptor

TMD – Transmembrane domain

TT – Transparent testa

V-ATPase – Vacuolar H<sup>+</sup> ATPase

Ver – Verapamil

V-HPO – Vanad dependent haloperoxidase

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. THORPE, T. A. History of plant cell culture. in *Plant tissue culture: Techniques and Experiments*, 2013, 1, 1-22.
2. IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. A plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*. 2013, 25, 3159–3173.
3. SMITH, R. H. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Academic Press, 2013. 6, 63-79.
4. GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure-background. In: *Plant propagation by tissue culture*. 3. vyd. Springer Netherlands, 2008. 1, 1-28.
5. GEILE, W.; WAGNER, E. Rapid development of cell suspension cultures from leaf sections of *Chenopodium rubrum* L. *Plant Cell & Environment*. 1980, 3, 141-148.
6. DAVEY, M. R.; ANTHONY, P.; POWER, J. B., LOWE, K. C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*. 2005, 23, 131-171
7. HUSSAIN, A.; NAZIR, H.; ULLAH, I.; QARSHI, I. A. Plant tissue culture: current status and opportunities. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. INTECH Open Access Publisher, 2012. 1, 1-28.
8. RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2002, 20, 101-153.
9. GAOSHENG, H.; JINGMING, J. Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture* INTECH Open Access Publisher, 2012. 11, 197-210.
10. MARTY, F. Plant Vacuoles. *The Plant Cell*. 1999, 11, 587-599.
11. ETXEBERRIA E., POZUETA-ROMERO J., GONZALEZ P. In and out of the plant storage vacuole. *Plant Science*. 2012, 190, 52-61.
12. MURTHY, H. N.; PAEK, K.-Y.; LEE, E.-J. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2014, 118, 1-16.
13. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962, 15, 473-479.
14. SCHENK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 1972 50,199-204.

15. GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 1968, 50, 15-158.
16. MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*. 2009, 12, 250–258.
17. HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*. 2009, 12, 259–266.
18. SAAD, A. I.; ELSHAHED, A. M. Plant tissue culture media. *Recent advances in plant in vitro culture*. 2012, 29-40.
19. SMITH, R. H. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Academic Press, 2013. 3, 31-43.
20. JAHODÁŘ, L. *Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty*, 1. vyd., Karolinum Praha, 1998. 38-43.
21. ZHONG, J-J. Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 2001, 72, 1-26.
22. AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. New medium composition for high betacyanin production by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2002, 66 (4), 902-905.
23. DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. *Experiments in plant tissue culture*. 2. vyd. Press Syndicate of the University of Cambridge, 1985. 2, 16-20.
24. GEORGIEV, M. I.; WEBER, J.; MACIUK, A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 83, 809–823.
25. ZHAO, J. T., DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2005, 23, 283-333.
26. SCHULZE, E.-D.; BECK, E.; MÜLLER-HOHENSTEIN, K. *Plant Ecology*. Heidelberg, Springer Berlin, 2005. 1.1, 7-19.
27. GLOSER, J.; PRÁŠIL, I. Fyziologie stresu. In *Fyziologie rostlin*. 1: vid. Praha: Academia, 1998. 15, 412-431.
28. MOGHADDAM, S. S.; JAAFAR, H.; IBRAHIM, R.; RAHMAT, A.; AZIZ, M.-A.; PHILIP, M. Effects of Acute Gamma Irradiation on Physiological Traits and Flavonoid Accumulation of *Centella asiatica*. *Molecules*, 2011, 16, 4994-5007.
29. JAYALAKSHMI, N. R.; SARASWATHI, K. J. T.; VIJAYA, B; RAMAN, D. N. S.; SHREENIVAS, D. P. H. S. Effect of UV-B radiation on growth and anthocyanin

- production in *Malva sylvestris* L. *International Journal of Agriculture Sciences*. 2011, 3(2), 97-102.
30. MUNNIK, T.; MEIJER, H. J. G. Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Letters*. 2001, 498,172-178.
  31. RAMÍREZ-RODRIGUEZ, V.; LOPEZ-BUCIO, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Adaptive responses in plants to nonoptimal soil pH. In *Plant abiotic stress*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2005. 6.7, 153-155.
  32. GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F., DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*. 2002, 37, 263-285.
  33. NAMDEO, A. G., Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 2007, 1(1), 69-79.
  34. KORBECKI, J.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; CHLUBEK, D. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochimica Polonica*. 2012, 59(2), 195-200.
  35. WINTERAND, J. M.; MOORE B. S. Exploring the chemistry and biology of vanadium-dependent haloperoxidases. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 284(28), 18577-18581.
  36. PANICHEV, N.; MANDIWANA, K.; MOEMA, D.; MOLATLHEGI, R.; NGOBENI, P. Distribution of vanadium (V) species between soil and plants in the vicinity of vanadium mine. *Journal of hazardous materials*. 2006, 137, 649-653.
  37. VACHIRAPATAMA, N.; JIRAKIATTIKUL, Y.; DICINOSKI, G.; TOWNSEND, A. T.; HADDAD, P. R. Effect of vanadium on plant growth and its accumulation in plant tissues. *Journal of Science and Technology*. 2001, 33(3), 255-261.
  38. BHAGWATH, S. G.; HJORTSØ, M. A. Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubrine A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. *Journal of Biotechnology*. 2000, 80, 159-167.
  39. PALAZÓN, J.; CUSIDÓ, R. M.; BONFILL, M., MALLOL, A.; MOYANO, E.; MORALES, C.; PIÑOL, M. T. Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003, 41, 1019-1025.
  40. HATTORI, T.; OHTA, Y. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activation and isoflavone glucoside accumulation in suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*, by phytoalexin elicitors, vanadate, and elevation of medium pH. *Plant Cell*

- Physiology*. 1985, 26(6), 1101-1110.
41. CIBULKA, R. *Trifolium Pratense L.* – jetel luční/d'atelina lúčna [on-line]. c2007, poslední revize 2016 [cit. 2016-06-09]. <<http://botany.cz/cs/trifolium-pratense/>>
  42. OLESZEK, W.; STOCHMAL, A.; BOGDAN, J. Concentration of isoflavones and other phenolics in the aerial parts of *Trifolium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 8095-8100.
  43. WU, Q.; WANG, M.; SIMON, J. E. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2003, 1016, 195-209.
  44. KLEJDUS, B.; VITAMVÁSOVÁ-ŠTĚRBOVÁ, D.; KUBÁŇ, V. Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography–mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction *Analytica Chimica Acta*. 2001, 450, 81-97.
  45. KAURINOVIC, B.; POPOVIC, M.; VLAISAVLJEVIC, S.; SCHWARTSOVA, H.; VOJINOVIC-MILORADOV, M. Antioxidant Profile of *Trifolium pratense L.* *Molecules* 2012, 17, 11156-11172.
  46. TUNDIS, R.; MARRELLI, M.; CONFORTI, F.; TENUTA, F. C.; BONESI, M.; MENICHINI, F.; LOIZZO, M. F. *Trifolium pratense* and *T. repens* (Leguminosae): Edible flower extracts as functional ingredients. *Foods*. 2015, 4, 338-348.
  47. SIVAKUMARAN, S.; MEAGHER, L. P.; FOO, L. Y.; LANE, G. A.; FRASER, K.; RUMBALL, W. Floral procyanidins of the forage legume Red clover (*Trifolium pratense L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, 1581-1585.
  48. MUZASHVILI, T.; MONIUSZKO-SZAJWAJ, B.; PECIO, L.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Ultrapformance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of cyanogenic glucosides in *Trifolium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, 62, 1777-1782.
  49. BOOTH, N. L.; NIKOLIC, D.; VAN BREEMEN, R. B.; GELLER, S. E.; BANUVAR, S.; SHULMAN, L. E.; FARNSWORTH, N. R. Confusion regarding anticoagulant coumarins in dietary supplements. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2004, 76(6), 511-516.
  50. QUIROZ, A.; ORTEGA, F.; RAMÍREZ, C. C.; WADHAMS, L. J.; PINILLA, K. Response of the Beetle *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleoptera: Scolytidae) to Red Clover (*Trifolium pratense L.*). *Environmental Entomology*. 2005, 34(3), 690-695.
  51. TAPIA, T.; PERICH, F.; PARDO, F.; PALMA, G.; QUIROZ, A. Identification of

- volatiles from differently aged red clover (*Trifolium pratense*) root extracts and behavioural responses of clover root borer (*Hylastinus obscurus*) (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae) to them. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007, 35, 61-67.
52. FIGUEIREDO, R.; RODRIGUES, A. I., COSTA, M. DO C. Volatile composition of red clover (*Trifolium pratense* L.) forages in Portugal: The influence of ripening stage and ensilage. *Food Chemistry*. 2007, 104, 1445-1453.
  53. OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry*. 2002, 61, 165-170.
  54. OLESZEK, W.; JURZYSTA, M. Isolation, chemical characterization and biological activity of red clover (*Trifolium pratense* L.) root saponins. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 1986, 55(2), 247-252.
  55. SABUDAK, T.; GULER, N. *Trifolium* L. – A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytotherapy Research*. 2009, 23, 439-446.
  56. COON, J. T.; PITTLER, M. H.; ERNST, E., *Trifolium pratense* isoflavones in the treatment of menopausal hot flashes: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*. 2007, 14, 153-159.
  57. NISSAN, H. P.; LU, J.; BOOTH, N. L.; YAMAMURA, H. I.; FARNSWORTH, N. R.; WANG, Z. J. A red clover (*Trifolium pratense*) phase II clinical extract possesses opiate activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007, 112(1), 207-210.
  58. CHEDRAUI, P.; HIDALGO, L.; MIGUEL, G. S.; MOROCHO, N.; ROSS, S. Red clover extract (MF11RCE) supplementation and postmenopausal vaginal and sexual health. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2006, 95, 296-297.
  59. BRANDLI, A.; SIMPSON, J. S.; VENTURA, S. Isoflavones isolated from red clover (*Trifolium pratense*) inhibit smooth muscle contraction of the isolated rat prostate gland. *Phytomedicine*. 2010, 17, 895-901.
  60. KRENN, L.; PAPER, D. H. Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.) *Phytomedicine*. 2009, 16, 1083-1088.
  61. RAMOS, G. P.; APEL, M. A.; DE MORAIS, C. B.; CEOLATO, P. C.; SCHAPOVAL, E. S.; DALL'AGNOL, M.; ZUANAZZI, J. A. S. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of red clover *Trifolium pratense* dry extract. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2012, 22(1), 176-180.
  62. GAZALIEV, A. M.; ZHURINOV, M. Z.; TULEUOV B. I. Isolation, analysis, biosynthesis, and modification of the alkaloid cytisine. *Chemistry of Natural Compounds*. 1991, 3, 259-269.

63. HOUSKA J. *Genista tinctoria* L. – kručinka barviřská/kručinka farbiarska [online]. c2007, poslední revize 2016[cit. 2016-06-15]. <<http://botany.cz/cs/genista-tinctoria/>>
64. HANGANU, D.; OLAH, N.-L.; BENEDEC, D.; MOCAN, A.; CRISAN, G.; VLASE, L.; POPICA, I.; ONIGA, I. Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of *Genista tinctoria* L. and *Genistella sagittalis* (L.) Gams (*Fabaceae*). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, 29(1), 301-307.
65. TERO-VESCAN, A.; IMRE, S.; VARI, C. E.; OŞAN, A.; DOGARU, M. T.; CSEDÖ C. Determination of some isoflavonoids and flavonoids from *Genista tinctoria* L. by HPLC-UV. *Farmacia*, 2009, 57(1), 120-127.
66. HANGANU, D.; VLASE, L.; OLAH, N.-L. Phytochemical Analysis of Isoflavons from some *Fabaceae* Species Extracts. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2010, 38(1), 57-60.
67. TSYPPYSHEVA1, I. P.; PETROVA, P. R.; BAYKOVA, I. P.; GALKIN, E. G.; FEDOROV, N. I.; GALIN, F. Z.; YUNUSOV, M. S. Seasonal dynamics of alkaloids of *Genista tinctoria* L. growing at the Southern Ural Region. *Natural Products. An Indian Journal*. 2014, 10(7), 215-218.
68. TERO-VESCAN, A.; VARI, C.-E.; VLASE, L. Alkaloid content of some potential isoflavonoids sources (native *Genista* species). Long-term safety implications. *Farmacia*. 2014, 62, 1109-1117.
69. WINK, M. Quinolizidine alkaloids: Biochemistry, metabolism, and function in plants and cell suspension cultures. *Planta Medica*. 1988, 53(6),509-514.
70. ŁUCZKIEWICZ, M.; GŁÓD, D. Callus cultures of *Genista* plants – in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Science*. 2003, 165(5), 1101-1108.
71. BOUTAGHANE, N; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Harakat, D.; Simon, A.; Kabouche, Z. Triterpene saponins of *Genista ulicina* Spach. *Phytochemistry*. 2013, 93, 176-181.
72. VLADIMIROVA, I. N.; GEORGIYANTS, V. A., Lipohilic substances from *Genista tinctoria*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2013, 49(1), 91-92.
73. TROALEN, L. G.; PHILLIPS, A. S.; PEGGIE, D. A.; BARRAN, P. E.; HULME, A. N. Historical textile dyeing with *Genista tinctoria* L.: a comprehensive study by UPLC-MS/MS analysis. *Analytical Methods*. 2014, 6(22), 8915-8923.
74. MENALE, B.; AMATO, G.; DI PRISCO, C.; MUOIO, R. Traditional uses of plants in North-Western Molise (central Italy). *Delpinoa*. 2006, 48, 29-36.

75. LEPORATTI, M. L.; IVANCHEVA, S. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003, 87(2), 123-142.
76. FAKIR, H.; KORKMAZ, M.; GÜLLER, B. Medicinal plant diversity of western Mediterranean region in Turkey. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2009, 3(2), 30-40.
77. RIGANO, D.; CARDILE, V.; FORMISANO, C.; MALDINI, M. T.; PIACENTE, S.; BEVILACQUA, J.; RUSSO, A.; SENATORE, F. *Genista sessilifolia* DC. and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. *Chemico-biological interactions*. 2009, 180(2), 211-219.
78. BALEKARI, U.; VEERESHAM, C. Insulinotropic agents from medicinal plants. *The Journal of Pharmaceutical Sciences & Emerging Drugs* 2. 2014, 1: 2.
79. RAINOVA, L.; NAKOV, N. BOGDANOVA, S. MINKOV, E. STANEVA-STOYTICHEVA, D. Ulceroprotective activity of the flavonoids of *Genista rumelica* Vel. *Phytotherapy Research*. 1988, 2(3), 137-139.
80. Vyhláška č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin. In *Sbírka zákonu*, 17. 6. 2008. ISSN 1211-1244
81. TUTKA, P.; ZATOŇSKI, W. Cytisine for the treatment of nicotine addiction: from a molecule to therapeutic efficacy. *Pharmacological Report*. 2006, 58(6), 777-798.
82. BARLOW, R. B.; JOHNSON, O. Relations between structure and nicotine-like activity: X-ray crystal structure analysis of (–)- cytisine and (–)- lobeline hydrochloride and a comparison with (–)- nicotine and other nicotine-like compounds. *British journal of pharmacology*. 1989, 98(3), 799-808.
83. ETTER, J.-F. Cytisine for smoking cessation: a literature review and a meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*. 2006, 166(15), 1553-1559.
84. CAHILL, K.; STEAD, L. F.; LANCASTER, T.; POLONIO, I. B. Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation. *Sao Paulo Medical Journal*. 2012, 130(5), 346-347.
85. CORRADINI, E.; FOGLIA, P.; GIANANTI, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural product research*. 2011, 25(5), 469-495.
86. COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry*. 1996, 7(2), 66-76.



87. KONG D.-Y. Flavonoids. In: *Introduction to Natural Products Chemistry*. CRC Press USA, 2012. 9, 169-188.
88. DAVIES, M. K. M; SCHWINN, K. E. Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis. In *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. CRC Press USA, 2006. 3, 143-218.
89. WAGNER, G J.; HRAZDINA, G. Endoplasmic reticulum as a site of phenylpropanoid and flavonoid metabolism in *Hippeastrum*. *Plant physiology*. 1984, 74(4), 901-906.
90. WINKEL, B. S. J. Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2004, 55: 85-107.
91. JØRGENSEN, K.; RASMUSSEN, A. V.; MORANT, M.; NIELSEN, A. H.; BJARNHOLT, N.; ZAGROBELNY, M. Ł.; BAK, S.; MØLLER, B. L Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Current opinion in plant biology*. 2005, 8(3), 280-291.
92. ACHNINE, L.; BLANCAFLOR, E. B.; RASMUSSEN, S.; DIXON, R. A. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*. 2004, 16, 3098-3109.
93. CROSBY, K. C.; PIETRASZEWSKA-BOGIEL, A.; GADELLA, T. W.; WINKEL, B. S. Förster resonance energy transfer demonstrates a flavonoid metabolon in living plant cells that displays competitive interactions between enzymes. *FEBS Letters*, 2011, 585.14: 2193-2198.
94. HOLLMAN, P. C, H. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology*. 2004, 42, 74-83.
95. WALLE, T.; BROWNING, A. M.; STEED, L. L.; REED, S. G.; WALLE, U. K. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *The Journal of nutrition*. 2005, 135, 48-52
96. DUPONT, M. S.; GEE, J. M.; PRICE, K. R.; JOHNSON, I. T. The availability of flavonol glycosides for small intestinal transport. *Gut*. 1999, 44, 129A
97. PISKULA, M. K.; YAMAKOSHI, J.; IWAI, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Letters*. 1999, 447, 287-291.
98. CRESPIY, V., MORAND, C., BESSON, C.; MANACH, C.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002, 50, 618-621.
99. DAY, A. J., CAÑADA, F. J., DÍAZ, J. C., KROON, P. A., MCLAUCHLAN, R., FAULDS, C. B., PLUMB, G. W; MORGAN, M. R. A.; WILLIAMSON, G. Dietary

- flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*. 2000, 468, 166-170.
100. KING, R A.; BURSILL, D. B. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *The American journal of clinical nutrition*. 1998, 67, 867-872.
  101. LEESE, H. J.; SEMENZA, G. On the identity between the small intestinal enzymes phlorizin hydrolase and glycosylceramidase. *Journal of Biological Chemistry*. 1973, 248, 8170-8173.
  102. DANIELS, L. B.; COYLE, P. J.; CHIAO, Y. B.; GLEW, R. H.; LABOW, R. S. Purification and characterization of a cytosolic broad specificity beta-glucosidase from human liver. *Journal of Biological Chemistry*. 1981, 256, 13004-13013.
  103. SESINK, A. L. A.; O'LEARY, K. A.; HOLLMAN, P. C. H. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *The Journal of nutrition*. 2001, 131, 1938-1941.
  104. WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004, 36.7: 829-837.
  105. OTAKE, Y.; WALLE, T. Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2, and CYP2C9. *Drug metabolism and disposition*, 2002, 30,7, 103-105.
  106. HU, M.; KRAUSZ, K.; CHEN, J.; GE, X.; LI, J.; GELBOIN, H. L.; GONZALEZ, F. J. Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones. *Drug Metabolism and Disposition*. 2003, 31, 924-931.
  107. WALGREN, R. A.; KARNAKY, K. J.; LINDENMAYER, G. E.; WALLE, T. Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'- $\beta$ -glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000, 294(3), 830-836.
  108. SKIBOLA, Christine F.; SMITH, Martyn T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000, 29(3), 375-383.
  109. HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*. 2002, 96, 67-202.
  110. VEITCH, N C. Isoflavonoids of the leguminosae. *Natural Product Reports*. 2013. 30(7), 988-1027.
  111. MURKIES, A L.; WILCOX, G; DAVIS, S. R. Phytoestrogens 1. *The Journal of Clinical*

- Endocrinology & Metabolism*. 1998, 83(2), 297-303.
112. KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B. O.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J. A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology*. 1998, 139(10), 4252-4263.
  113. ALBULESCU, M; POPOVICI, M. Isoflavones-biochemistry, pharmacology and therapeutic use. *Revue Roumaine de Chimie*. 2007, 52(6), 537-50.
  114. MIADOKOVÁ, E. Isoflavonoids – an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary toxicology*. 2009, 2(4), 211-218.
  115. MESSINA, M.; MCCASKILL-STEVENSON, W.; LAMPE, J. W. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006, 98(18). 1275-1284.
  116. HARRIS, D. M.; BESSELINK, E.; HENNING, S. M.; GO, V. L. W.; HEBER, D. Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha-or beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2005, 230, 558-568.
  117. KUIPER, G. G.; CARLSSON, B. O.; GRANDIEN, K. A. J.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON; J. A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*. 1997, 138, 863-870.
  118. USUI, T. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocrine journal*, 2006, 53, 7-20.
  119. YAMAGUCHI, M. Isoflavone and Bone Metabolism: Its Cellular Mechanism and Preventive Role in Bone Loss. *Journal of Health Science*, 2002, 48, 209-222.
  120. SRIVASTAVA, K., TYAGI, A. M., KHAN, K., DIXIT, M., LAHIRI, S., KUMAR, A., CHANKGKIJA, B.; KHAN, M. P.; NAGAR, G. K.; YADAV, D. K.; MAURYA, R.; SINGH, S. P.; JAIN, G. K.; WAHAJUDDIN; TRIVEDI, R.; CHATTOPADHYAY, N. SINGH, D. Isoformononetin, a methoxydaidzein present in medicinal plants, reverses bone loss in osteopenic rats and exerts bone anabolic action by preventing osteoblast apoptosis. *Phytomedicine*. 2013, 20, 470-480.
  121. KRITZ-SILVERSTEIN, D; GOODMAN-GRUEN, D L. Usual dietary isoflavone intake, bone mineral density, and bone metabolism in postmenopausal women. *Journal of women's health & gender-based medicine*. 2002, 11(1), 69-78.
  122. SARKAR, F. H.; ADSULE, S.; PADHYE, S.; KULKARNI, S.; LI, Y. The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy. *Mini*

- reviews in medicinal chemistry*. 2006, 6, 401-407.
123. MAGEE, P. J.; MCGLYNN, H; ROWLAND, I. R. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro*. *Cancer Letters*. 2004, 208, 35-41.
  124. DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. *Phytochemistry*. 2002, 60, 205-211.
  125. WANGEN, K. E.; DUNCAN, A. M.; XU, X.; KURZER, M. S. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*. 2001, (73), 225-231.
  126. WALKER, H. A.; DEAN, T. S.; SANDERS, T. A. B.; JACKSON, G.; RITTER, J. M.; CHOWIENCZYK, P. J.; The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilation of human forearm vasculature with similar potency to 17  $\beta$ -estradiol. *Circulation*. 2001, 103, 258-262.
  127. LEE, J.-S. Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life sciences*. 2006, 79, 1578-1584.
  128. WIDYARINI, S.; SPINKS, N.; HUSBAND, A. J.; REEVE, V. E; Isoflavonoid Compounds from Red Clover (*Trifolium pratense*) Protect from Inflammation and Immune Suppression Induced by UV Radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 2001, 74(3), 465-470.
  129. KHODAMORADI, M., ASADI-SHEKAARI, M., ESMAEILI-MAHANI, S., ESMAEILPOUR, K., & SHEIBANI, V. Effects of genistein on cognitive dysfunction and hippocampal synaptic plasticity impairment in an ovariectomized rat kainic acid model of seizure. *European journal of pharmacology*. 2016, 786, 1-9.
  130. THEODOULOU, F. L. Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2000, 1465, 79-103.
  131. DASSA, E; BOUIGE, P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in microbiology*. 2001, 152, 211-229.
  132. HIGGINS, C. F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Research in microbiology*. 2001, 152, 205-210.
  133. REA, P. A. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology*. 2007, 58, 347-375.
  134. HOLLENSTEIN, K.; DAWSON, R. J. P.; LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 2007, 17, 412-418.
  135. PECHANDOVÁ, K.; BUZKOVÁ, H.; SLANAŘ, O.; PERLÍK, F. Efluxní

- transmembránový transportér – P-glykoprotein. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. 2006, 4, 196-201.
136. ZHAO, J.; DIXON, R. A. The ‘ins’ and ‘outs’ of flavonoid transport. *Trends in plant science*. 2010, 15, 72-80.
  137. KLEIN, M.; BURLA, B.; MARTINOIA, E. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Letters*. 2006, 580(4), 1112-1122.
  138. OMOTE, H.; HIASA, M.; MATSUMOTO, T.; OTSUKA, M.; MORIYAMA, Y.: The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2006, 27.11: 587-593.
  139. TANAKA, Y.; HIPOLITO, C. J.; MATURANA, A. D.; ITO, K.; KURODA, T.; HIGUCHI, T.; KATOH, T.; KATO, H. E.; HATTORI, M.; KUMAZAKI, K.; TSUKAZAKI, T.; ISHITANI, R.; SUGA, H.; NUREKI, O. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature*. 2013, 496, 247-251.
  140. YAZAKI, K.; SUGIYAMA, A.; MORITA, M.; SHITAN, N. Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*. 2008, 7, 513-524.
  141. GAXIOLA, R. A.; PALMGREN, M. G.; SCHUMACHER, K. Plant proton pumps. *Febs Letters*. 2007, 581, 2204-2214.
  142. FUGLSANG, A. T.; PAEZ-VALENCIA, J.; GAXIOLA, R. A. Plant Proton Pumps: Regulatory Circuits Involving H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase. *Transporters and Pumps in Plant Signaling*. 2010, 7, 39.
  143. SCHUMACHER, K. pH in the plant endomembrane system – an import and export business. *Current Opinion in Plant Biology*. 2014, 22, 71-76.
  144. MAESHIMA, M. Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*. 2000, 1465, 37-51.
  145. HWANG, I. Sorting and anterograde trafficking at the Golgi apparatus. *Plant Physiology*, 2008), 148(2), 673–683.
  146. BETHKE, P. C.; JONES, R. L. Vacuoles and prevacuolar compartments. *Current opinion in plant biology*. 2000, 3, 469-475.
  147. SHITAN, N.; KATO, K.; SHOJI, T. Alkaloid transporters in plants. *Plant Biotechnology*. 2014, 31, 453-463.

148. ALCANTARA, J.; BIRD, D. A.; FRANCESCHI, V. R.; FACCHINI, P. J. Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant physiology*. 2005, 138, 173-183.
149. SIRIKANTARAMAS, S.; SUDO, H.; ASANO, T.; YAMAZAKI, M. Transport of camptothecin in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*. *Phytochemistry*. 2007, 68, 2881-2886.
150. YAZAKI, K. Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion in Plant Biology*. 2005, 8(3), 301-307.
151. KUBEŠ, J.; MARTIN, J.; TŮMOVÁ, L. Transport sekundárních metabolitů přes rostlinné membrány. *Chemické listy*. 2016, 110, 26-30.
152. LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Grada Publishing a. s. 2004, 17.3, 546-547.
153. OTANI, M.; SHITAN, N.; SAKAI, K.; MARTINOIA, E.; SATO, F.; YAZAKI, K. Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology*. 2005, 138, 1939-1946.
154. YAZAKI, K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters*. 2006, 580, 1183-1191.
155. POMAHAČOVÁ, B.; DUŠEK, J.; DUŠKOVÁ, J.; KAZUFUMI, Y.; ROYTRAKUL, S.; VERPOORTE, R. Improved accumulation of ajmalicine and tetrahydroalstonine in *Catharanthus* cells expressing an ABC transporter. *Journal of Plant Physiology*. 2009, 166, 1405-1412.
156. MORITA, M.; SHITAN, N.; SAWADA, K.; VAN MONTAGU, M. C. E.; INZÉ, D.; RISCHER, H.; GOOSSENS, A.; OKSMAN-CALDENTEY, K-M.; MORIYAM, Y.; YAZAKI, K. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, 106, 2447-2452.
157. KATO, K.; SHITAN, N.; SHOJI, T.; HASHIMOTO, T. Tobacco NUP1 transports both tobacco alkaloids and vitamin B6. *Phytochemistry*. 2015, 113, 33-40.
158. JASIŃSKI, M.; STUKKENS, Y.; DEGAND, H.; PURNELLE, B.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; BOUTRY, M. A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *The Plant Cell*. 2001, 13, 1095-1107.

159. SZAKIEL, A.; JANISZOWSKA, W. The mechanism of oleanolic acid monoglycosides transport into vacuoles isolated from *Calendula officinalis* leaf protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002, 40, 203-209.
160. SZAKIEL, A.; RUSZKOWSKI, D.; JANISZOWSKA, W. Saponins in *Calendula officinalis* L. – structure, biosynthesis, transport and biological activity. *Phytochemistry Reviews*. 2005, 4, 151-158.
161. TAGUCHI, G.; FUJIKAWA, S.; YAZAWA, T.; KODAIRA, R.; HAYASHIDA, N.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI, M. Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2, 4-D-treated tobacco cells. *Plant science*. 2000, 151, 153-161.
162. ALFENITO, M. R.; SOUER, E.; GOODMAN, C. D.; BUELL, R.; MOL, J.; KOES, R.; WALBOT, V. Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *The Plant Cell*. 1998, 10, 1135-1149.
163. GOODMAN, C. D.; CASATI, P.; WALBOT, V. A multidrug resistance – associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *The Plant Cell*. 2004, 16, 1812-1826.
164. MUELLER, L. A.; GOODMAN, C. D.; SILADY, R. A.; WALBOT, V. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology*, 2000, 123.4: 1561-1570.
165. FRANGNE, N.; EGGMANN, T.; KOBLISCHKE, C.; WEISSENBÖCK, G.; MARTINOIA, E.; KLEIN, M. Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and *Arabidopsis* cell culture vacuoles. Energization occurs by H<sup>+</sup>-antiporter and ATP-binding cassette-type mechanisms. *Plant Physiology*. 2002, 128, 726-733.
166. MARINOVA, K.; POURCEL, L.; WEDER, B.; SCHWARZ, M.; BARRON, D.; ROUTABOUL, J. M.; DEBEAUJON, I.; KLEIN, M. The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H<sup>+</sup>-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *The Plant Cell*. 2007, 19, 2023-2038.
167. GOMEZ, C.; TERRIER, N.; TORREGROSA, L.; VIALET, S.; FOURNIER-LEVEL, A.; VERRIÈS, C.; SOUQUET, J-M.; MAZAURIC, J-P, KLEIN, M.; Cheynier V.; Ageorges A. *Vitis vinifera* MATE-type Proteins Act as Vacuolar H-Dependent Acylated Anthocyanin Transporters. *Plant Physiology*. 2009, 150, 402-415.
168. TAKANASHI, K.; SHITAN, N.; YAZAKI, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. *Plant Biotechnology*. 2014, 31, 417-430.
169. VILLEGAS, M.; SOMMARIN, M.; BRODELIUS, P. E. Effects of sodium orthovanadate

- on benzophenanthridine alkaloid formation and distribution in cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2000, 38(3), 233-241.
170. HUNKE, S.; DROSE, S.; SCHNEIDER, E. Vanadate and bafilomycin A 1 are potent inhibitors of the ATPase activity of the reconstituted bacterial ATP-binding cassette transporter for maltose (MalFGK 2). *Biochemical and biophysical research communications*, 1995, 216(2), 589-594.
171. LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Grada Publishing a. s. 2004. 4.2.3, 143-147.
172. WIGLER, P. W. Cellular drug efflux and reversal therapy of cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1996, 28, 279-284.
173. POTSCHKA, H.; BALTES, S.; LÖSCHER, W. Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy Research*. 2004, 58, 85-91.
174. TERASAKA, K.; SAKAI, K.; SATO, F.; YAMAMOTO, H.; & YAZAKI, K. *Thalictrum minus* cell cultures and ABC-like transporter. *Phytochemistry*. 2003, 62, 483-489.
175. LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Grada Publishing a. s. 2004. 12, 343-347.
176. KLEIN, M.; MARTINOIA, E.; HOFFMANN-THOMA, G.; WEISSENBOCK, G. A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *The Plant Journal*. 2000, 21(3), 289-304.
177. HUISMAN, M. T.; CHHATTA, A. A.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J. H.; SCHINKEL, A. H. MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. *International Journal of Cancer*. 2005, 116, 824-829.
178. LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Grada Publishing a. s. 2004. 14.5.2.,453-458.
179. PAYEN, L.; DELUGIN, L.; COURTOIS, A.; TRINQUART, Y.; GUILLOUZO, A.; FARDEL, O. The sulphonylurea glibenclamide inhibits multidrug resistance protein (MRP1) activity in human lung cancer cells. *British journal of pharmacology*. 2001, 132(3), 778-784.
180. GAEDEKE, N.; KLEIN, M.; KOLUKISA OGLU, U.; FORESTIER, C.; MÜLLER, A.; ANSORGE, M.; BECKER, D.; MAMNUN, Y.; KUCHLER, K.; SCHULZ, B.; MUELLER-ROEBER, B.; MARTINOIA, E. The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter



- AtMRP5 controls root development and stomata movement. *The EMBO journal*. 2001, 20(8), 1875-1887.
181. DEAN, J. V.; MILLS, J. D. Uptake of salicylic acid 2-O- $\beta$ -D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiologia plantarum*. 2004, 120, 603-612.
  182. SHOJI, T.; INAI, K.; YAZAKI, Y.; SATO, Y.; TAKASE, H.; SHITAN, N.; YAZAKI, K.; GOTO, Y.; TOYOOKA, K.; MATSUOKA, K.; HASHIMOTO, T. Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant physiology*. 2009, 149, 708-718.
  183. LUVISETTO, S.; AZZONE, G. F. Local protons and uncoupling of aerobic and artificial.  $\lambda_{\mu\text{H}}$ -driven ATP synthesis. *Biochemistry*. 1989, 28, 1109-1116.
  184. BORGNA, M. J.; EYTAN, G. D.; ASSARAF, Y. G. Competition of hydrophobic peptides, cytotoxic drugs, and chemosensitizers on a common P-glycoprotein pharmacophore as revealed by its ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1996, 271(6), 3163-3171.
  185. KLAUSNER, R. D.; DONALDSON, J. G.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of Cell Biology*, 1992, 116(5), 1071-1080.
  186. WANG, Y. J.; WU, Y. F.; XUE, F.; WU, Z. X.; XUE, Y. P.; ZHENG, Y. G.; SHEN, Y. C. Isolation of brefeldin A from *Eupenicillium brefeldianum* broth using macroporous resin adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2012, 895, 146-153.
  187. MOSSESSOVA, E.; BICKFORD, L. C.; GOLDBERG, J. SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*, 2003. 114, 483-495.
  188. LEDVINA, M.; STOKLASOVÁ, A.; GERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny I. díl.*, 1. vyd. Karolinum Praha, 2005. 7.2.2, 66-67.
  189. BOWMAN, E. J.; SIEBERS, A.; ALTENDORF, K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988, 85, 7972-7976.
  190. DRÖSE, S.; ALTENDORF, K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *Journal of Experimental Biology*. 1997, 200, 1-8.
  191. MAGNIN, T.; FRAICHARD, A.; TROSSAT, C.; PUGIN, A. The tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase of *Acer pseudoplatanus* is a vacuolar-type ATPase that operates with a phosphoenzyme intermediate. *Plant Physiology*. 1995, 109, 285-292.
  192. YOKOYAMA, K.; NAKANO, M.; IMAMURA, H.; YOSHIDA, M.; TAMAKOSHI, M.

- Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278, 24255-24258.
193. MAESHIMA, M.; YOSHIDA, S. Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *Journal of Biological Chemistry*. 1989, 264(33), 20068-20073.
194. ČÁSTKOVÁ, L. *Ovlivnění produkce explantátové kultury Trifolium pratense L. II*, Hradec Králové: Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta. Katedra farmakognosie, 2013. 54. Vedoucí diplomové práce PharmDr. Marie Kašparová, PhD.
195. BEDÁŇOVÁ, I. *Parametrické testy – Studentův t-test*, [online]. c2012, poslední revize 2015 [cit. 2016-09-05]. <<http://cit.vfu.cz/statpotr/potr/teorie/predn3/ttest.htm>>
196. GLANTZ, S A. *Primer of biostatistics*. 4 vyd. New York. 2001. 4, 65-112.
197. THAM, L. X.; NAGASAWA, N.; MATSUHASHI, S.; ISHIOKA, N. S.; ITO, T.; KUME, T. Effect of -degraded chitosan on plants stressed with vanadium. *Radiation Physics and Chemistry*, 2001, 61, 171-175.
198. SCHÜTZENDÜBEL, A; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*. 2002, 53(372), 1351-1365.
199. SHI, X; DALAL, N. S. NADPH-dependent flavoenzymes catalyze one electron reduction of metal ions and molecular oxygen and generate hydroxyl radicals. *FEBS Letters*. 1990, 276(1-2), 189-191.
200. KHAN, A. A.; MALHOTRA, S. S. Effects of vanadium, nickel and sulphur dioxide on polar lipid biosynthesis in jack pine. *Phytochemistry*. 1987, 26(6), 1627-1630.
201. SHI, X.; JIANG, H.; MAO, Y.; YE, J.; SAFFIOTTI, U. Vanadium (IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage. *Toxicology*, 1996, 106, 27-38.
202. KAPLAN, D. I., ADRIANO, D. C., CARLSON, C. L., & SAJWAN, K. S Vanadium: toxicity and accumulation by beans. *Water, Air, and Soil Pollution*. 1990, 49, 81-91.
203. SACO, D.; MARTIN, S.; SAN JOSE, P. Vanadium distribution in roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*: morphological and ultrastructural effects. *Biologia Plantarum*, 2013, 57(1), 128-132.
204. MARTÍN, S.; SACO, D. Effect of vanadate on *Phaseolus vulgaris* L.: vegetative development and nitrogen metabolism. *Journal of plant nutrition*. 1995, 18, 1139-1148.
205. IMTIAZ, M.; MUSHTAQ, M. A.; RIZWAN, M. S.; ARIF, M. S.; YOUSAF, B.; ASHRAF, M.; SHUANGLIAN, X.; RIZWAN, M.; MEHMOOD, S.; TU, S. Comparison

- of antioxidant enzyme activities and DNA damage in chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes exposed to vanadium. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, 23, 19787-19796.
206. MANNAZZU, I.; GUERRA, E.; FERRETTI, R.; PEDICONI, D.; FATICHENTI, F. Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2000, 1475, 151-156.
  207. MITHÖFER, A; SCHULZE, B; BOLAND, W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*. 2004, 566, 1-5.
  208. SMITH, J. I.; SMART, N. J.; MISAWA, M.; KURZ, W. G. W.; TALLEVI, S. G.; DICOSMO, F. Increased accumulation of indole alkaloids by some cell lines of *Catharanthus roseus* in response to addition of vanadyl sulphate. *Plant Cell Reports*. 1987, 6(2), 142-145.
  209. KHOSROUSHAHI, A. Y.; VALIZADEH, M.; GHASEMPOUR, A.; KHOSROWSHAHLI, M.; NAGHDIBADI, H; DADPOU, R. M. R.; OMIDI, Y. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell cultures of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*. 2006, 30, 262-269.
  210. SÁNCHEZ, T; MARTÍN, S; SACO, D. Some Responses of two *Nicotiana tabacum* L. cultivars exposed to vanadium. *Journal of Plant Nutrition*. 2014, 37, 777-784.
  211. HUANG, C.; ZHONG, J.-J. Elicitation of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax ginseng* by vanadate. *Process Biochemistry*. 2013, 48, 1227-1234.
  212. CAI, Z; KASTELL, A.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Reports*. 2012, 31, 461-477.
  213. HARMER, S. L.; HOGENESCH, J. B.; STRAUME, M.; CHANG, H. S.; HAN, B.; ZHU, T.; WANG, X.; KREPS, J. A.; KAY, S. A. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, 2000, 290, 2110-2113.
  214. SUGIYAMA, A.; SHITAN, N.; YAZAKI, K. Involvement of a soybean ATP-binding cassette-type transporter in the secretion of genistein, a signal flavonoid in legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant Physiology*. 2007, 144, 2000-2008.
  215. BUER, C. S.; MUDAY, G. K.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2007, 145, 478-490.
  216. LOYOLA-VARGAS, V. M.; BROECKLING, C. D.; BADRI, D.; VIVANCO, J. M. Effect of transporters on the secretion of phytochemicals by the roots of *Arabidopsis*

- thaliana. *Planta*. 2007, 225, 301-310.
217. ALEJANDRO, S., LEE, Y., TOHGE, T., SUDRE, D., OSORIO, S., PARK, J., BOVET, L.; LEE, Y.; GELDNER, N.; FERNIE, A. R.; MARTINOIA, E. AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Current Biology*, 2012, 22, 1207-1212.
218. TSUYAMA, T.; KAWAI, R.; SHITAN, N.; MATOH, T.; SUGIYAMA, J.; YOSHINAGA, A.; TAKABE, K.; FUJITA, M.; YAZAKI, K. Proton-dependent coniferin transport, a common major transport event in differentiating xylem tissue of woody plants. *Plant physiology*. 2013, 162, 918-926.
219. ISHIMARU, Y., KAKEL, Y., SHIMO, H., BASHIR, K., SATO, Y., SATO, Y.; NISHIZAWA, N. K. A rice phenolic efflux transporter is essential for solubilizing precipitated apoplasmic iron in the plant stele. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286, 24649-24655.
220. MARON, L. G., PIÑEROS, M. A., GUIMARÃES, C. T., MAGALHAES, J. V., PLEIMAN, J. K., MAO, C., SHAFF, J.; BELICUAS, S. N. J.; KOCHIAN, L. V. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal*, 2010, 61, 728-740.
221. PRIETO, D.; CORCHETE, P. Transport of flavonolignans to the culture medium of elicited cell suspensions of *Silybum marianum*. *Journal of Plant Physiology*. 2014, 171, 63-68.
222. ZHAO, J.; DIXON, R. A. MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2009. 21, 2323-2340.
223. KLEIN, M.; MARTINOIA, E.; HOFFMANN-THOMA, G.; WEISSENBÖCK, G. The ABC-like vacuolar transporter for rye mesophyll flavone glucuronides is not species-specific. *Phytochemistry*. 2001, 56, 153-159.
224. ZHAO, J.; HUHMANN, D.; SHADLE, G.; HE, X. Z.; SUMNER, L. W.; TANG, Y.; DIXON, R. A. MATE2 mediates vacuolar sequestration of flavonoid glycosides and glycoside malonates in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*. 2011, 23, 1536-1555.
225. NAOUMKINA, M.; FARAG, M. A.; SUMNER, L. W.; TANG, Y.; LIU, C. J.; DIXON, R. A. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(46), 17909-17915.

226. CHLÁDEKOVÁ, L. *Ovlivnění metabolismu a transportu flavonoidů v kulturách in vitro II.*, Hradec Králové: Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta. Katedra farmakognosie, 2009. 57. Vedoucí diplomové práce PharmDr. Jan Martin, PhD.
227. MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S.. Studies on  $\beta$ -glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1995, 59(9), 1623-1627.
228. LI, Z. S.; ALFENITO, M.; REA, P. A.; WALBOT, V.; DIXON, R. A. Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry*, 1997, 45(4), 689-693.

### **Citace přejatých obrázků**

Příloha 1. Zell H.: Commons.wikimedia.org: File: Trifoliumpratense002.jpg [online] 13.10.2016. Dostupný pod licencí Creative Commons na www:

<[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/09/Trifolium\\_pratense\\_002.JPG/450px-Trifolium\\_pratense\\_002.JPG](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/09/Trifolium_pratense_002.JPG/450px-Trifolium_pratense_002.JPG)>

Příloha 2. Zell H.: Commons.wikimedia.org: File: Genista tinctoria002.jpg [online] 13.10.2016. Dostupný pod licencí Creative Commons na www:

<[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f5/Genista\\_tinctoria\\_002.JPG](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f5/Genista_tinctoria_002.JPG)>

## 10. ABSTRAKTY

### Abstrakt

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Katedra farmakognosie

Kandidát: Mgr. Jan Kubeš

Školitel: PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Název disertační práce: Transportní mechanismy sekundárních metabolitů přes membrány rostlinných buněk

V rámci studia metabolismu isoflavonů byla pozornost zaměřena na způsob jejich transportu v rostlinách nebo *in vitro* kulturách. Tento výzkum zahrnuje identifikaci mechanismu přenosu přes membrány buněk nebo vakuol, který se odehrává pomocí transportních proteinů nebo vezikul. Přenos pěti isoflavonů (genistin, genistein, biochanin A, daidzein a formononetin) do živného media byl sledován u suspenzních kultur *Trifolium pratense* L. a *Genista tinctoria* L. Po aplikaci roztoků  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  (1 a  $10\mu\text{M}$  koncentrace) došlo u *G. tinctoria* a *T. pratense* po 24 hodinách k zvýšení obsahu isoflavonů v živném mediu. Tento nárůst byl inhibován látkami, které ovlivňují aktivitu různých transportních mechanismů. Na koncentraci většiny isoflavonů v mediu s kulturou *T. pratense* působily převážně látky inhibující ABC proteiny z podskupiny MRP, kdy obsah genisteinu byl spíše ovlivněn MDR inhibitory. Na přítomnost isoflavonů v mediu také negativně působil brefeldin A, který inhibuje vesikulární transport. V sušině byl poté pozorován vzestup obsahu některých těchto isoflavonů. U kultury *G. tinctoria* byl snížený obsah isoflavonů v mediu po aplikaci inhibitorů pozorován ojediněle a nebylo tak možné učinit přesnější závěr. Na koncentraci jednotlivých isoflavonů působily různé látky, jako v případě  $\text{NH}_4\text{Cl}$  u genistinu, který ovlivňuje protonový gradient. V sušině nebyl většinou pozorován statisticky významný nárůst obsahu sledovaných látek ve vzorcích ošetřených inhibitory. Transport genistinu byl zkoumán i na vakuolární membráně, kdy došlo k poklesu jeho absorpce po aplikaci látek ovlivňujících protonový gradient. Přenos tohoto glykosidu tak probíhá pravděpodobně pomocí MATE transportéru. V supernatantu i vakuolách byla také pozorována zvýšená koncentrace genisteinu, který se během pozorování uvolňoval z přidaného glykosidu. Přítomnost tohoto aglykonu ve vakuolách byla ovlivněna inhibitorem protonové pumpy.

## Abstract

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University

Department of pharmacognosy

Candidate: Mgr. Jan Kubeš

Supervisor: PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Title of Doctoral thesis: Transport mechanisms of secondary metabolites across membranes of plant cells

An attention was focused on the metabolism of isoflavones in recent years, including their transport within plants and cultures *in vitro*. A research is focused on the transport mechanism identification across cell or vacuolar membrane. There are localized different transporters as or the transport of some metabolites can take place through membrane vesicles. The release of five isoflavones (genistin, genistein, biochanin A, daidzein and formononetin) into nutrient medium was observed in suspension culture of *Genista tinctoria* L and *Trifolium pratense* L. These cultures were treated with  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  solutions (1 a 10  $\mu\text{M}$  concentration) when isoflavon content in medium was higher after 24 hours. This increased volume of isoflavones was suppressed by different transport mechanism inhibitors. The transport of isoflavones in *T. pratense* was influenced by ABC inhibitors from MRP subfamily, but genistein concentration in medium was lower after treatment with MDR subfamily inhibitors. Brefeldin A, which blocks vesicular transport, also decreased concentration of isoflavones in nutrient medium. The transport mechanism of the observed isoflavones in *G. tinctoria* was not exactly described due to the results in nutrient medium. There was also lack of statistically significant increase of isoflavones amount in dry mass after inhibitors treatment. The volume of secondary metabolites was effected by different inhibitors, when genistin concentration in medium was decreased by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  application, which has impact on proton gradient and corresponding transporters. Genistin absorption was also observed in isolated vacuoles. Its transport into vacuoles was blocked by proton pumps inhibitors, which maintain proton gradient, thus the transport probably took place through MATE proteins. There was also measured higher concentration of genistein in supernatant and vacuoles in the samples. This aglycon was released from added genistin and its absorption by vacuoles was dependent on proton pump inhibitor.

## 11. SEZNAM VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PUBLIKACÍ

### Recenzované publikace v časopisech s IF:

KUBEŠ, J.; TŮMOVÁ, L.; MARTIN, J.; VILDOVÁ, A.; HENDRYCHOVÁ, H.; SOJKOVÁ, K. The production of isoflavonoids in *Genista tinctoria* L. cell suspension culture after abiotic stressors treatment. *Nature Product Research*. 2014, 28, 2253-2263. IF=1,057 (2016 Thomson Reuters©, 2016 Journal Citation Reports®)

KUBEŠ, J.; MARTIN, J.; TŮMOVÁ, L. Transport sekundárních metabolitů přes rostlinné membrány. *Chemické listy*. 2016, 110, 26-30. IF=0,272 (2014 Journal Citation Reports®)

TŮMOVÁ L.; TŮMA J.; DOLEŽAL, M.; DUČAIOVÁ, Z.; KUBEŠ, J. New Synthetic pyrazinecarboxamide derivatives as potential elicitors in production of secondary metabolites in *in vitro* cultures. *Pharmacognosy Magazine*. 2016, 12, 57–62. IF (2015) = 0,831 (2015 Journal Citation Reports®, Thomson Reuters, 2016).

### Recenzované publikace:

VILDOVÁ, A.; KUBEŠ, J.; TŮMOVÁ, L. Léčivé rostliny s imunostimulačními účinky. *Praktické lékařství*. 2013, 9, 90-94.



## 12. ÚČAST NA KONFERENCÍCH, PRACOVNÍCH STÁŽÍCH A SEMINÁŘÍCH

### Konference:

Sympóziu o léčivých rostlinách a přírodních léčivých rostlinách. Pezinok, 13. – 14. 6. 2016.

KUBEŠ J.; MARTIN, J.; KAŠPAROVÁ, M.; TŮMOVÁ, L. Isoflavone transport in *Trifolium pratense*. (poster)

6. postgraduální a 4. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové, 9. – 10. 2. 2016

KUBEŠ, J.; MARTIN, J.; KAŠPAROVÁ, M., TŮMOVÁ, L. Transport mechanisms in cell membrane of Red clover. (přednáška)

7th International Conference on Polyphenols and Health Tours, 27-30 Oct. 2015.

KARLÍČKOVÁ, J.; KUBEŠ, J.; MÍSAŘ, J.; MARTIN, J.; TŮMOVÁ, L.; MLADĚNKA, P. Interaction of iron and copper with small phenolic acids, human colonic metabolites of quercetin. (poster)

5. postgraduální a 3. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové. 3. – 4. 2. 2014.

KUBEŠ J., STRACKE R., TŮMOVÁ L., WEISSHAAR B. Identification of MRE in promoter of flavonol synthase. (přednáška)

4. postgraduální a 2. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové, 28. – 29. 1. 2014.

KUBEŠ J., MARTIN J., VILDOVÁ A., TŮMOVÁ L. Isolation of protoplast from plant cultures *in vitro*. (přednáška)

18. odborný seminář – Aktuální otázky pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin, Lednice 5. – 6. 12. 2012

MARTIN, J.; KUBEŠ, J.; TŮMOVÁ L. Prevence a léčba alkoholismu – využití potenciálu léčivých rostlin. (poster)

**Pracovní stáže:**

6měsíční pracovní stáž. Faculty of Biology, The Chair of Genome research, Universität Bielefeld, Bielefeld, Německo 4. 3. – 3. 9. 2014. Financováno z programu FAFIS

**Semináře:**

Research in Plant Genetics. Mendelovo Muzeum, Masarykova Univerzita, Brno, 7-10. 9. 2015.

Kurz základů vědecké práce. Akademie věd ČR, Praha, 10-14. 6. 2013.

Novinky v instrumentaci Agilent Technologies. Praha, 25. 3. 2013.

Biotechnologie a genetické modifikace v zemědělství a životním prostředí. Zemědělská kancelář Velvyslanectví USA v Praze, 18. 3. 2013.

Cyklus odborných přednášek firem Thermo Fischer Scientific, Pragolab s.r.o., Nicolet s.r.o, Pardubice, 7. 11. 2012.